

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie des populations et des organismes



Mémoire

De fin d'Etude en vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Biologie
Option : Entomologie médicale

Thème

"L'effet du paracétamol sur le cycle de développement de deux espèces de Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*) et leur rôle comme un échantillon alternatif d'analyse toxicologique"

Présenté par :

Mlle AZZOUZI Hadjer

Soutenue publiquement le : 17/09/2015

Devant le jury composé de :

Présidente :	Dr DJAZOULI-ALIM Z.	MCA / BPO	Univ. Blida 1
Promoteur :	Dr BENDJOUDI D.	MCA / BPO	Univ. Blida 1
Co-promoteur:	Mr DJEDOUANI B.	INCC/GN	BOUCHAOUI
Examineur :	Dr KARA-TOUMI F/Z.	MCA / BPO	Univ. Blida 1

.....2014 /2015.....

Remerciements

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à son élaboration.

Tout d'abord je remercie Dieu tout puissant pour m'avoir donné la force, le courage et la persévérance pour mener à bien ce mémoire.

Je remercie énormément mon promoteur *Dr Djamel Bendjoudi Maître de Conférences A* au département de Biologie des Populations et des Organismes pour son aide précieuse qui m'a accompagné tout au long de mon travail, pour ses valeureux conseils et sa disponibilité.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon Co-promoteur *Mr Djedouani B.* de l'INCC/GN pour m'avoir enseigné, guider et appris beaucoup de choses dans ce domaine de la criminalistique, et pour sa patience et ses nombrables efforts.

J'adresse mes remerciements au *Dr Djazouli-Alim Z., Maître de Conférences A* au département de Biologie des Populations et des Organismes pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury. Egalement *Dr Kara-Toumi F/Z. Maître de Conférences A* au département de Biologie des Populations et des Organismes d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce présent travail.

Je remercie le *Directeur* et les responsables de *l'Institut national de criminalistique et de criminologie* de Bouchaoui, pour m'avoir bien accueilli au sein de leur établissement.

Je remercie *Mr Toumi M.* le chef du laboratoire d'Entomologie, et toute l'équipe du département de la médecine légale de l'INCC/GN pour leur accueil, leur respect et leur gentillesse.

Je remercie les infirmiers spécialisés *Mr Djebbouri A.* et *Mr Benalia M.* pour leur aide précieuse, et également je remercie la toxicologue *Mme Guiloubi W.* pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie ma superbe famille qui ont toujours eu confiance en moi et qui ont toujours été présents, même dans les moments les plus délicats. Je les remercie énormément de s'être sacrifié afin de financer, mes études et mes sorties.

Je remercie mes collègues de travail *Zarouri R.* et *Taleb M.* pour leur soutien et leur aide, et pour les bons moments qu'on a passé ensemble.

Je remercie mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

Résumé

Les décès par suite d'overdose étant en augmentation, les médecins légistes se trouvent, de plus en plus, face à des cadavres dans un état de décomposition avancée. Ceux-ci ont donc recours à des entomologistes forensiques afin de les aider dans la détermination de la cause du décès et dans l'estimation de la date de mort (IPM). Dès lors la présente étude s'intéresse sur ce même fait, qui s'articule autour de deux axes ; l'effet du paracétamol sur le taux de développement de deux espèces de Calliphoridae (*Calliphora vicina* et *Lucilia sericata*), et son éventuelle présence dans les larves et pupes de ces deux même espèces. Quatre lapins (*Néo zélandais/ le Californien*, Race albinos) ont été choisis comme substrat nutritif pour note expérimentation, trois d'entre eux ont été injectés par 03 différentes doses de Paracétamol (60mg/kg, 100mg/kg et 200mg/kg) et le 4^{ème} lapin a été placé comme témoin. Le paracétamol à effectivement eu un effet sur le développement des deux espèces de Calliphoridae, en augmentant leur taille par rapport au témoin, et a influencé sur le calcul de l'intervalle post-mortem (IPM) pour certaines doses concernant la 2^{ème} espèce (*L. sericata*). L'analyse toxicologique a annoncé un résultat négatif par rapport à la présence du paracétamol ou de ses métabolites dans les larves et pupes des deux espèces par GC/MS. Ces résultats indiquent que la présence de médicaments pourrait influencer sur l'estimation des intervalles *post-mortem* (IPMs) sans pour autant être retrouvées dans les analyses toxicologiques.

Mots clés : *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, paracétamol, analyse toxicologique, entomologiste forensique

Abstract

The death from overdose is increasing; coroners are, increasingly, in the face of corpses in an advanced state of decomposition. They therefore resort to forensic entomologists to assist them in determining the cause of death and the estimated date of death (PMI). Henceforth this study focuses on this very fact, which revolves around two axes; the effect of paracetamol on the development rates of two species of Calliphoridae (*Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*), and its presence in the larvae and pupae of these same species. Four rabbits (*New Zealand/ Californian*, white rabbits) were chosen as nutrient substrate for rating experiment, three of them were injected by 03 different doses of paracetamol (60mg / kg, 100mg / kg and 200mg / kg) and the fourth rabbit was placed as a witness.

Paracetamol do actually affect the development of two species of Calliphoridae, increasing their size compared with the control, and influence on the calculation of the post-mortem interval (PMI) for certain doses regarding the second species (*L. sericata*). The toxicological analysis to announce a negative result compared to the presence of paracetamol or its metabolites in the larvae and pupae of both species by GC / MS. These results indicate that the presence of drugs may influence on the estimation of postmortem intervals (PMIs) without being found in toxicological analysis.

Keywords: *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, paracetamol, toxicological analysis, drugs, forensic entomologists

ملخص

الوفاة جراء الجرعة الزائدة في إزدیاد ، الطیبیب الشرعی هو ، علی نحو متزاید، فی مواجهة الجثث فی حالة متقدمة من التحلل. لذا فإنهم یلجأون إلى علماء الحشرات فی الطب الشرعی لمساعدتهم فی تحديد سبب الوفاة ووقت الوفاة (PMI). من الآن فصاعدا تركز هذه الدراسة علی هذه الحقیقة، التي تدور حول محورین؛ تأثير الباراسیتامول علی معدلات التمیمة لنوعین من الخوتعیات (*Calliphora vicina* و *Lucilia sericata*)، ووجوده فی الیرقات والشرائق لهذه الأنواع نفسها. وقد تم اختیار أربعة أرانب (نیوزیلندا / کالیفورنیا، الأرانب البیضاء)، کرکیزة غذائیة للملاحظة والتجرب، حققت ثلاثة منهم بجرعات مختلفة من الباراسیتامول (60 مغ / کغ، 100 مغ / کغ و 200 مغ / کغ) والأرنب الرابع وضع کشاهد .

الباراسیتامول له فی الواقع تأثير علی تطور النوعین من الخوتعیات، فی زیادة حجمهما مقارنة مع الشاهد و له تأثير علی حساب فترة ما بعد الوفاة (PMI) لجرعات معینة علی النوع الثاني (*L. sericata*) . فی تحلیل السموم بواسطة GC / MS, أعلنت نتیجة سلیبية مقارنة مع وجود الباراسیتامول أو عناصره فی الیرقات والشرائق لكلا النوعین. حیث تشير هذه النتائج إلى أن وجود الأدوية قد يؤثر علی تقدير فترات ما بعد الوفاة (PMI) دون وجودها فی تحلیل السموم.

الكلمات الرئيسية : الخوتعیات, باراسیتامول, تحلیل السموم, الطب الشرعی.

Glossaire

- **ante-mortem** : avant la mort.
- **arthropodes nécrophages** : les arthropodes se nourrissant sur les cadavres (humain ou animaux).
- **criminalistique** : Ensemble des techniques mises en œuvre par la justice et les forces de police et de gendarmerie pour établir la preuve du crime et identifier son auteur (anthropométrie, médecine légale, toxicologie, etc.).
- **intervalle post-mortem** : le temps écoulé depuis la mort.
- **cosmopolite** : trouvées dans tous les habitats.
- **pédofaune** : La faune du sol, est l'ensemble de la faune effectuant tout son cycle de vie dans le sol.
- **poïkilothermes** : Les animaux à « sang froid » ou poïkilotherme, sont des animaux ayant une température corporelle qui varie avec celle de leur milieu (\neq homéothermes).
- **brachycères** : Brachycera, est un sous-ordre d'insectes diptères qui comprend les mouches muscoïdes aux antennes courtes.
- **astico-thérapie** : larvo-thérapie, désigne le soin apporté à une plaie des tissus mous par les asticots de diptères, principalement de la mouche verte (*Lucilia sericata*).
- **Sarco-saprofage** : groupe d'insectes consommateurs de cadavres humains.
- **bioaccumulation** : désigne la capacité de certains organismes (végétaux, animaux, fongiques, microbiens) à absorber et concentrer dans tout ou une partie de leur organisme certaines substances chimiques, éventuellement rares dans l'environnement.
- **xénobiotiques** : Un xénobiotique est une substance présente dans un organisme vivant mais qui lui est étrangère (il n'est ni produit par l'organisme lui-même, ni par son alimentation naturelle).
- **exuvies** : Chez les arthropodes ou chez les vertébrés, l'exuvie est l'enveloppe (cuticule chitineuse ou peau) que le corps de l'animal a quittée lors de la mue ou de la métamorphose.
- **chitinisé** : constitué de chitine, comme pour la carapace des arthropodes.
- **analyte** : Substance chimique dont on cherche à connaître les propriétés.
- **taxons** : un taxon est une entité conceptuelle qui est censée regrouper tous les organismes vivants possédant en commun certains caractères taxinomiques ou diagnostiques bien définis.

- **état d'ébriété** : Fait d'être sous l'emprise de l'alcool.
- **la région nasopharyngée** : relatif au nez et au pharynx.
- **analgésique** : Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments utilisés en médecine dans le traitement de la douleur (antalgie ou analgésie) d'un patient.
- **antipyrétique** : Les antipyrétiques sont des médicaments dont le but est de lutter contre un symptôme, la fièvre.
- **hépatotoxicité** : L'hépatotoxicité se définit par la capacité d'une substance à détruire les cellules du foie. Dans la grande majorité des cas, cette destruction est liée à la prise d'un médicament, on parle alors d'hépatotoxicité médicamenteuse.
- **intoxications poly-médicamenteuses** : intoxication par plusieurs médicaments à la fois.
- **acétaminophène** : le Paracétamol.
- **L'ibuprofène** : il s'agit de la substance active d'un médicament AINS (anti-inflammatoire non stéroïdien) utilisé pour soulager les symptômes de l'arthrite, de la dysménorrhée primaire, de la pyrexie ; et comme analgésique, spécialement en cas d'inflammation.
- **La nomenclature** : Une nomenclature désigne une instance de classification (code, tableau, liste, règles d'attribution d'identité...) faisant autorité et servant de référence dans le cadre d'une discipline donnée.
- **voix intraveineuse** : Une injection intraveineuse est une injection d'un liquide dans une veine en général à l'aide d'une seringue et d'une aiguille. Elle est notamment utilisée lorsque l'effet de la substance administrée doit être rapide : il peut s'agir d'un médicament, d'un analgésique, d'un marqueur en imagerie médicale ou d'une drogue.
- **Euthanasie** : mort douce.
- **la région occipitale** : Le lobe occipital est une région du cerveau des vertébrés. Il est situé à l'arrière de la tête, à côté du lobe pariétal et du lobe temporal.
- **la phase pré-pupale** : la phase avant d'entrer dans la pupation.
- **Pupaison** : Transformation d'une larve en nymphe, ou d'une nymphe en adulte à l'intérieur d'une pupa et le temps pendant lequel cette transformation s'effectue.

LAROUSSE : Dictionnaires de Français
(<http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>)

Liste des abréviations

- **IPMs** : Intervalles Post-Mortem.
- **PMI (anglais)** : Post mortem interval.
- **ADJ** : Accumulation des degrés jours (**ADD (anglais)**: Accumulated degree days).
- **ADH** : Accumulation des degrés heurs (Accumulated degree hours).
- **RIA (anglais)**: Radioimmunoassay.
- **GC (anglais)** : Gas Chromatography.
- **GC / MS (anglais)**: Gas chromatography–mass spectrometry.
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince (**TLC (anglais)**: Thin layer chromatography).
- **HPLC/MS (anglais)**: High-performance liquid chromatography–mass spectrometry.
- **AAPCC (anglais)**: American Association of Poison Control Centers.
- **EI (anglais)** : Electronic Impact.

Liste des tableaux

Tableau 1: Seuils de développement inférieur (températures de base) des différentes espèces de Diptères.....	12
Tableau 2: Exemples de certains médicaments détectés avec les insectes	19
Tableau 3: Echantillonnage de larves et de pupes du ‘‘Témoin’’ (Dose 00) de <i>C. vicina</i>	34
Tableau 4: Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 01 de <i>C. vicina</i>	34
Tableau 5: Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 02 et Dose 03 de <i>C. vicina</i>	35
Tableau 6: Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 0 (Témoin) de <i>L. sericata</i>	35
Tableau 7: Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 01 et Dose 02 de <i>L. sericata</i> ..	36
Tableau 8: Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 03 de <i>L. sericata</i>	36
Tableau 9 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 15 larves après 24 h d’incubation.....	40
Tableau 10 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 14 larves après 48 h d’incubation.....	41
Tableau 11 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 12 larves après 48 h	42
Tableau 12 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 11 larves après 96 h d’incubation.....	43
Tableau 13 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 10 larves après 120 h	45
Tableau 14 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 09 larves après 144 h	45
Tableau 15 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 08 pupes après 168 h	46
Tableau 16 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 15 larves après 48 h d’incubation.....	51
Tableau 17 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 14 larves après 96 h d’incubation.....	52
Tableau 18 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 12 larves après 144 h d’incubation.....	53
Tableau 19 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 11 pupes après 192 h d’incubation.....	54
Tableau 20: Données de base pour les deux espèces	58
Tableau 21: Les résultats du calcul des degrés heures accumulées pour <i>C. vicina</i>	58
Tableau 22: Les résultats du calcul des degrés heures accumulées pour <i>L. sericata</i>	59

Listes des figures

Figure 1: Eco-zones terrestres majeurs du monde ‘‘régions biogéographiques’’	3
Figure 2: Morphologie général d'un insecte Coléoptère) – Vue dorsale.....	4
Figure 3: Cycle de développement d'un diptère Calliphoridae	6
Figure 4: <i>Calliphora vicina</i> Robineau-Desvoidy	8
Figure 5: <i>Lucilia sericata</i> (Meigen)	8
Figure 6: <i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819).....	9
Figure 7: Le développement des insectes en relation avec les seuils de températures supérieur et inférieur	12
Figure 8: <i>Calliphora vicina</i> (♀ adulte)	23
Figure 9: <i>Lucilia sericata</i> (♂ et ♀ adultes) élevé avec du sucre et de l'eau	24
Figure 10: La boîte du prélèvement de <i>C. albiceps</i>	24
Figure 11: Lapins « <i>Néo zélandais/ le Californien</i> , Race albinos » à l'intérieur des cages avec nourriture	25
Figure 12: Fliale de 100ml de Paracétamol	25
Figure 13: Structure chimique du paracétamol	25
Figure 14: Viande de bœuf recouverte par une cage métallique.....	27
Figure 15: Boîte d'incubation de <i>C. vicina</i>	28
Figure 16: Distinction entre ♂ et ♀ de <i>L. sericata</i> et <i>C. vicina</i>	29
Figure 17: Boîte d'incubation de <i>L. sericata</i>	29
Figure 18: Boîte d'élevage de <i>Chrysomya albiceps</i>	30
Figure 19: Injection intraveineuse dans l'oreille et la cuisse du lapin	31
Figure 20: Boîte d'élevage de <i>C. vicina</i>	32
Figure 21: Viande légèrement découpé pour facilité aux femelles le dépôt des œufs	32
Figure 22: Le logiciel de mesure des premiers stades larvaires (L1).....	37
Figure 23: Le chromatogramme standard du paracétamol.....	39
Figure 24 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 24 heures d'incubation	41
Figure 25 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 48 heures d'incubation	42
Figure 26 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 72 heures d'incubation	43

Figure 27 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 96 heures d’incubation	44
Figure 28 – Valeurs moyenne entre différentes doses et témoin pour 10 larves après 120 heures d’incubation	45
Figure 29 – Différence de moyenne entre dose 01 et 02 et témoin pour 09 larves après 144 heures d’incubation	46
Figure 30 – Taille moyenne pour 08 pupes de <i>L. sericata</i> prise après 168 heures d’incubation	47
Figure 31 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 01 par rapport au témoin	48
Figure 32 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 02 par rapport au témoin	49
Figure 33 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 03 par rapport au témoin	50
Figure 34 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 48 heures d’incubation	51
Figure 35 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 96 heures d’incubation	52
Figure 36 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 144 heures d’incubation	53
Figure 37 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 192 heures d’incubation	54
Figure 38 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 01 par rapport au témoin	55
Figure 39 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 02 par rapport au témoin	56
Figure 40 – L’évolution de la taille moyenne de la dose 03 par rapport au témoin	57
Figure 41: La taille moyenne des différentes doses et du témoin de <i>C. vicina</i> pendant tout le cycle du développement.	60
Figure 42: La taille moyenne des différentes doses et du témoin de <i>L. sericata</i> pendant tout le cycle du développement.	62

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I: Données Bibliographiques	2
1.1.- L'entomologie médico-légale	2
1.1.1.- Historique	2
1.2.- L'entomofaune des cadavres	3
1.2.1.- Les insectes associés aux cadavres	4
1.2.2.- L'Ordre des Diptera	5
1.2.3.- Paramètres influençant la colonisation entomologique.....	9
1.3.- L'utilisation des insectes dans les enquêtes judiciaires	10
1.3.1.- Datation de la mort.....	10
1.3.2.- Enfants et personnes âgées maltraités	13
1.3.3.- L'ADN et l'entomologie forensique	13
1.3.4.- L'entomotxicologie médico-légale	13
1.4.- Le Paracétamol	21
1.4.1.- Généralité	21
1.4.2.- L'administration du médicament et le surdosage	22
Chapitre II: Matériel et Méthodes	23
2.1.- Objet de l'étude	23
2.2.- Matériel.....	23
2.2.1.- Matériel biologique	23
2.2.2.- Produits chimiques	25
2.2.3.- Equipement, Instruments, Consommable	26
2.3.- Méthodes	27
2.3.1.- L'origine des espèces choisies	27
2.3.2.- L'expérimentation Entomo-toxicologique	30
2.3.3.- Test entomotxicologique	37
Chapitre III: Résultats et discussion	40
3.1.- Résultats des mesures des deux espèces de Diptères dès l'éclosion jusqu'au stade ... pupale en fonction des doses de paracétamol	40

3.1.1.- Les mesures prises concernant l'espèce <i>L. sericata</i>	40
3.1.2.- Les mesures prises concernant l'espèce <i>C. vicina</i>	51
3.1.3.- Le calcul de l'intervalle post-mortem	58
3.1.4.- L'effet du paracétamol sur le cycle de développement des deux espèces	59
3.2.- L'analyse toxicologique.....	62
Conclusion générale	64
Recommandations	64
Références	66
Annexe I: Photographique.....	70
Annexe II: Graphique.....	86
Annexe III: Démonstrative	97

Introduction

Les insectes et autres arthropodes peuvent se révéler être des outils précieux dans l'enquête sur les homicides, les suicides et autres décès humains sans surveillance. Une analyse attentive de la communauté d'insectes rencontrés sur un corps en décomposition, combinée avec la connaissance de la biologie des insectes, l'écologie et les conditions environnementales locales peuvent souvent fournir des indications légistes précieuses. Ceux-ci peuvent inclure l'estimation du temps écoulé depuis la mort, le mouvement de la dépouille après la mort, indication de blessures ante-mortem, et la présence de drogues ou de toxines (Goff *et al.*, 2001).

Les insectes peuvent également servir en tant que spécimens de rechange fiables pour l'analyse toxicologique en l'absence des tissus et des fluides corporels normalement échantillonnés à de telles fins (Murthy *et al.*, 2001). Bien que les données examinées (voir chapitre III) concernant les effets potentiels des médicaments et des toxines, dans ce cas le paracétamol, sur les taux de développement des insectes sont de portée limitée, il est raisonnable de supposer que ces substances, contenues dans les tissus dont les insectes se sont nourris, ont le potentiel pour modifier les modèles de développement. Les études sur l'utilisation des arthropodes nécrophages comme spécimens toxicologiques alternatifs et de l'impact que les toxines des tissus et des contaminants ont sur le développement des insectes immatures se nourrissant de ces substances comprennent actuellement les principales avenues d'exploration dans le domaine émergent de l'entomotoxicologie (Goff *et al.*, 2001).

Ce travail est le premier du genre réalisé en Algérie, qui a pour le but d'introduire cette nouvelle discipline dans le domaine de la criminalistique, l'entomotoxicologie peut se révéler être un outil précieux dans la science médico-légale. Donc, une recherche plus approfondie et globale est nécessaire, pour que le plein potentiel de cette discipline émergente peut être reconnu. De ce fait, nous avons testé « L'effet du paracétamol sur le cycle de développement de deux espèces de Calliphoridae (*C. vicina*, *L. sericata*) et leur rôle comme un échantillon alternatif d'analyse toxicologique ».

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres dont le premier se veut une synthèse bibliographique en particulier sur l'entomologie médico-légale, l'entomotoxicologie, ainsi que sur le paracétamol, son administration et le surdosage. Le deuxième chapitre est consacré au matériel utilisé de même que les différentes analyses effectuées lors de la réalisation de nos expérimentations. Quant au troisième chapitre, il regroupe l'ensemble des résultats obtenus et leurs discussions. Nous finalisons ce travail par une conclusion générale, et proposons des perspectives.

1.1.- L'entomologie médico-légale

L'entomologie forensique est une discipline des sciences forensiques qui étudie les insectes et d'autres arthropodes dans un contexte médico-légal. Actuellement, les insectes nécrophages ne sont plus exclusivement utilisés pour estimer la période écoulée entre le décès d'une victime et la découverte du corps ou intervalle post-mortem. Ils peuvent aussi apporter des informations dans les cas d'abus et de négligences chez les enfants ou les personnes âgées, sur les causes de la mort, et l'identité des victimes, etc (Frederickx *et al.*, 2011).

1.1.1.- Historique

Le premier cas d'utilisation des insectes lors d'une enquête rapporté dans la littérature remonterait au 10^{ème} siècle, en Chine. La présence de mouches sur le crâne aurait permis de détecter une plaie à l'origine du décès (Benecke, 2001). Le même type de cas est relaté plus de 200 ans plus tard en Chine suite au meurtre d'un homme aux champs, la présence d'un grand nombre de mouches sur le front d'un autre paysan amena l'enquêteur à le désigner comme étant le meurtrier (Benecke 2001; Wyss et Cherix 2006). Ces exemples, souvent rapportés, ne concernent cependant qu'une partie limitée du processus d'expertise entomologique : l'attraction des mouches par les plaies et la présence de sang frais.

Le problème de la colonisation de la viande par les mouches et leurs larves a été étudié en Europe à partir du 17^{ème} siècle dans le cadre de la controverse scientifique sur la génération spontanée. Les premières expériences de Redi Francisco, datées de 1671, démontrèrent que les larves observées sur la viande provenaient de pontes de mouches, et que l'accès des adultes conditionnait donc le développement ultérieur des larves. Au milieu du 19^{ème} siècle, des enquêteurs français se mirent à estimer la durée de présence des insectes sur un corps pour dater le décès (Benecke, 2001). Les bases de la démarche scientifique d'expertise étaient posées : identification des insectes prélevés, détermination de la succession probable des espèces, déduction de la saison de ponte. Cette méthodologie fut formalisée par Mégnin à la fin de ce même siècle avec la mise en relation de l'état de décomposition du corps et des préférences nutritives des différents insectes nécrophages (Megnin, 1894). Cette méthode fut par la suite baptisée la méthode des escouades. Depuis cette époque, les connaissances se sont affinées, notamment par l'utilisation de modèles animaux. Ceux-ci sont choisis pour des caractéristiques spécifiques dans le but d'être utilisés pour la recherche expérimentale, l'enseignement, pour ensuite extrapoler les résultats à l'homme (Amendt *et al.*, 2004).

1.2.- L'entomofaune des cadavres

Lorsqu'une espèce animale meurt, elle est rapidement visitée et colonisée par de nombreux organismes tels que des bactéries, des champignons, des arthropodes dont les insectes ainsi que des vertébrés (mammifères et oiseaux) (Carter *et al.*, 2007).

Au sein de nos écosystèmes tempérés, parmi les animaux consommateurs, les insectes nécrophages sont les plus spécialisés. Associés aux décomposeurs, ils participent à la minéralisation des matières organiques. Leur rôle est donc primordial au sein des écosystèmes terrestres où ils remplissent la fonction "d'éboueurs entomologiques" (Leclercq et Verstraeten, 1993). Le cadavre constitue pour ces différentes espèces un substrat nourricier, un site de reproduction, un refuge ou encore un territoire idéal bien que fluctuant au rythme des processus de décomposition. Cependant, toutes les dégradations imposées au cadavre ne sont pas dues à la seule activité entomologique et microbienne, certains cadavres mal ou non inhumés peuvent subir des déprédations causées par les rongeurs, les renards et les corbeaux, y compris les animaux domestiques à savoir les chiens et les chats (De Vault *et al.*, 2003 ; Dekeirsschieter *et al.*, 2011). La faune des insectes se nourrissant sur un corps est déterminée par l'emplacement, l'heure et organismes associés, leur localisation peut se référer à la région géographique ou dans les environs immédiats du cadavre. Certains insectes sont cosmopolites, ou trouvés dans des endroits à travers le monde. D'autres sont réservés à une éco-zone terrestre particulière (Fig. 1) (Rivers et Dahlem, 2014).

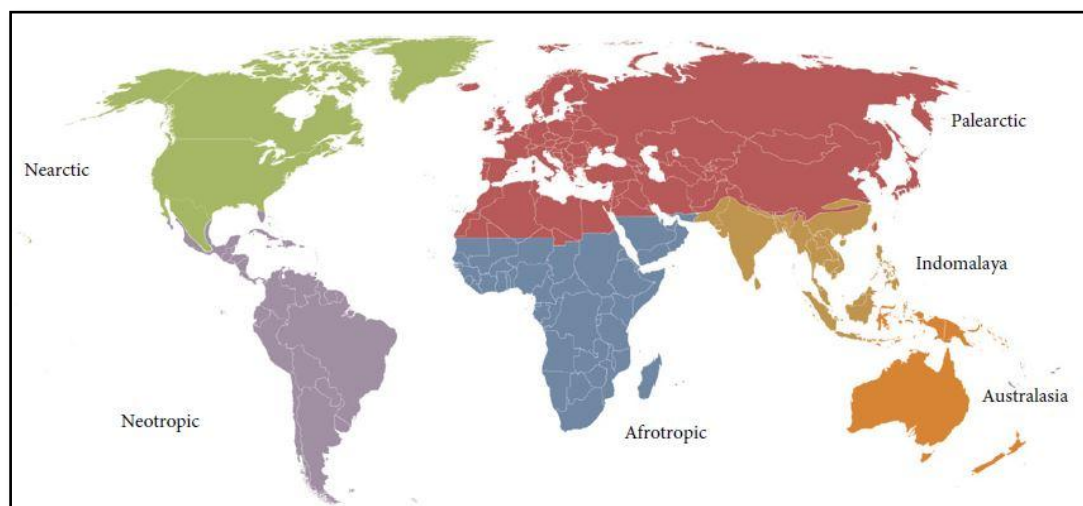


Figure 1 : Eco-zones terrestres majeurs du monde "régions biogéographiques" (Rivers et Dahlem, 2014).

1.2.1.- Les insectes associés aux cadavres

Les insectes, classés au sein des arthropodes, qui se caractérisent par la présence d'un boîtier de corps durci (exosquelette). Ce dernier se divise en trois régions distinctes ; la tête (Head), le thorax et l'abdomen (Fig.2).

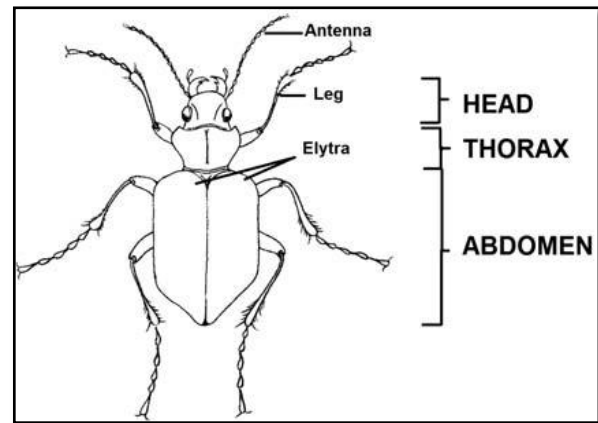


Figure 2: Morphologie général d'un insecte Coléoptère – Vue dorsale (Gennard, 2012).

Les insectes nécrophages et nécrophiles, principalement les Diptères et les Coléoptères, sont fréquemment retrouvés au sein de l'écosystème-cadavre. Pour ces insectes, le cadavre est une ressource éphémère très riche qu'ils vont coloniser de manière plus ou moins prévisible. L'entomofaune des cadavres seraient attirées par les odeurs cadavériques émises par le corps en décomposition. En fonction de leurs caractéristiques écologiques, on distingue quatre groupes écologiques autour d'un cadavre (Leclercq, 1978 ; Smith, 1986; Wyss et Chérix, 2006), une cinquième catégorie est parfois citée, il s'agit des espèces dites accidentelles dont la présence sur le corps est le fait du hasard (Arnaldos *et al.*, 2005).

En effet, les insectes associés aux cadavres se répartissent en quatre catégories :

- Les **espèces nécrophages** : se nourrissent des tissus cadavériques et plus spécifiquement des liquides. On peut citer parmi cette catégorie, les Diptères appartenant aux familles des Calliphoridae et des Sarcophagidae, mais également des Coléoptères des familles des Silphidae et des Dermestidae (Dekeirsschieter *et al.*, 2012);
- Les **espèces nécrophiles** : sont des prédateurs ou parasites des espèces nécrophages, principalement des larves et des pupes de Diptères. On rencontre régulièrement des Coléoptères (Silphidae, Histeridae, Staphylinidae), des Diptères (Calliphoridae et Stratiomyidae) ainsi que des Hyménoptères (Campobasso *et al.*, 2001; Wyss et Cherix, 2006). Les larves de certains Diptères peuvent devenir prédatrices à partir d'un certain stade de développement. C'est le cas, par exemple, des larves de stade III appartenant au genre *Muscina* (Diptera, Muscidae) (Gaudry, 2002) et de certaines *Chrysomya* (Diptère, Calliphoridae) (Leclercq, 1978);
- Les **espèces omnivores** : se nourrissent tant du cadavre que des espèces dites nécrophages et nécrophiles présentent sur le corps. Les principales espèces omnivores sont

généralement des Hyménoptères (fourmis et guêpes) ainsi que des Coléoptères (J. Dekeirsschieter *et al.*, 2012) ;

○ Les **espèces opportunistes** : perçoivent la présence du cadavre comme une extension de leur habitat. Elles utilisent le cadavre comme une annexe de leur biotope afin de s'abriter, se réchauffer, hiberner et parfois même pour se nourrir (Leclercq et Vestraeten, 1992). Elles sont originaires de la végétation environnante ou de la pédofaune et peuvent exceptionnellement être prédateur des espèces nécrophages (Campobasso *et al.*, 2001). On y dénombre des collemboles, des araignées, des mille-pattes, des Lépidoptères mais aussi des acariens qui se nourrissent des moisissures et champignons qui peuvent se développer sur le corps en décomposition (Campobasso *et al.*, 2001; Wyss et Cherix, 2006).

Il faut noter que seuls les deux premiers groupes sont utiles en entomologie forensique, ils regroupent un grand nombre de Diptères et de Coléoptères (Amendt *et al.*, 2004).

1.2.2.- L'Ordre des Diptera

C'est l'un des plus grands ordres d'insectes, composé de mouches et a plus de 86 000 espèces connues. Les mouches peuvent être trouvées dans presque tous les habitats, et la plupart de ces espèces associées à un cadavre ont des pièces buccales sous forme d'éponges. Les larves des insectes sont appelés asticots et la plupart sont de couleur crème, doux, sans pattes, et non pas de tête visible (Byrd et Castner, 2001).

Les Diptères sont holométaboles, c'est-à-dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes (Fig. 3). Ils pondent environ 150 à 200 œufs regroupés en agglomérat et qui donneront des larves de type vermiforme (Gennard, 2007 ; Bourbonnais, 2010). Ils ne pondent pas sur des tissus momifiés ou déshydratés car les œufs et les larves ont besoin d'humidité pour se développer mais aussi parce que les larves du premier stade larvaire n'ont pas de crochets buccaux assez puissants pour percer la peau. Ceci explique donc pourquoi les femelles pondent à proximité des orifices humides (Amendt *et al.*, 2004).

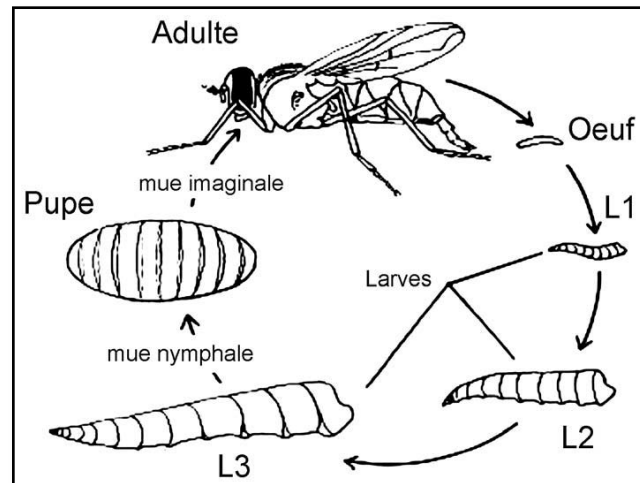


Figure 3 : Cycle de développement d'un diptère Calliphoridae (Charabidz, 2008).

Selon Greenberg et Kunich (2002), tous les insectes sont poïkilothermes, par conséquent, leur vitesse de développement dépend principalement de la température extérieure. Le développement de toutes les espèces de diptères est le même et se compose de trois étapes d'alimentation appelés stades, une nymphose et d'un stade adulte (Fig. 3). Le taux de progression peut être affectée par un certain nombre de facteurs, y compris l'humidité, la température, la saison, l'emplacement...etc. Par conséquent, il est difficile de déterminer la durée exacte du cycle de vie.

1.2.2.1.- Les différents stades de développement des Diptères (Calliphoridae)

- **Premier stade larvaire (L1)** : extrêmement petit avec une alimentation vorace, la larve augmente habituellement en taille d'environ 2 mm à 4 mm (Greenberg et Kunich, 2002). Ce stade se termine par un processus appelé mue.
- **Deuxième stade larvaire (L2)** : dans ce stade, la larve se développe à environ 8 mm de longueur (Greenberg et Kunich, 2002). " L'alimentation est plus accomplie dans cette étape par rapport au premier stade, en grande partie en raison de l'augmentation de la taille des larves" (Haskell *et al.*, 1997). Le deuxième stade est généralement le plus court des trois phases d'alimentation, d'une durée d'environ 8 à 12 heures dans la plupart des espèces à des températures modérées. Cette étape se termine par une autre mue, ajoutent les mêmes auteurs.

- **Le troisième stade (L3) :** Cette étape selon Anderson (2000) peut être séparée en deux stades comportementaux distincts: l'étape d'alimentation et phase après l'alimentation. Pendant l'étape d'alimentation, les larves se nourrissent voracement jusqu'à ce qu'elles atteignent une taille maximale, à ce stade, les larves arrêtent leur alimentation et s'éloignent de la source de nourriture pour trouver un endroit sûr pour la nymphose. "Cette errance est l'étape post-alimentation du troisième stade" (Anderson, 2000). Cette étape peut prendre un certain nombre de jours pendant lesquels les larves commencent leur nymphose et commence à diminuées de taille (Greenberg et Kunich, 2002).
- **La Nymphose :** pendant la période de nymphose la structure de l'adulte est formée à l'intérieur. Lorsque la transformation est complète, les adultes émergent des pupes (Greenberg et Kunich, 2002).

1.2.2.2.- Biologie des Calliphoridae (Blowflies)

Les Calliphoridae communément surnommées "mouches vertes et bleues" sont une famille de Diptères brachycères (Byrd et Castner, 2000 ; Byrd et Castner, 2009). C'est une famille d'un très grand nombre d'espèces, dont plus de 1100 espèces ont été recensées à travers le monde (Wyss & Cherix, 2006). Ils sont, avec les Sarcophagidae et les Muscidae, les espèces les plus importantes qui fournissent des informations relatives à l'estimation précise de l'intervalle post-mortem. Les Calliphoridae sont attirées par les cadavres et les excréments, avec quelques espèces exploitant des plaies ouvertes. Cette famille de Diptères est divisée en neuf sous-familles, dont les Chrysomiinae, les Luciliinae et les Calliphorinae sont les plus importantes (Jain *et al.*, 2009). Cette dernière comporte 09 genres dont les *Calliphora* et les *Cynomya*. Vingt-six espèces de *Calliphora* sont recensées dans le monde tandis que le genre *Cynomya* n'en recense que deux (Jain *et al.*, 2009).

La famille des Calliphoridae comprend de nombreuses espèces qui sont bien connus du grand public. Les adultes ne sont pas secrètes et atterrissent souvent dans des endroits ensoleillés qui sont visibles à l'œil humain. Beaucoup de mouches de la viande commune sont métalliques vert clair ou bleu, Emerald et Sapphire, elles sont considérées comme des pierres précieuses du monde des insectes. Mais la beauté de ces mouches est tempérée par notre connaissance de leur enfance secrètes passée s'alimentant de la chair en décomposition (Greenberg, 1991). Les Calliphoridae ne sont pas tous nécrophages, mais beaucoup le sont.

Vu l'importance de la famille des Calliphoridae dans le domaine des sciences forensiques « criminalistique » trois espèces de cette famille attirent notre attention à savoir ; *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata* et *Chrysomya albiceps*.

- ***Calliphora vicina*** (Robineau-Desvoidy) (Fig. 4) est une espèce nécrophage très commune à travers le monde et a été utilisée dans une variété d'enquêtes criminelles (Smith, 1986). Cette espèce est souvent vue autour des maisons suburbaines et urbaines aux matins chauds et ensoleillés du printemps. Elle est connue pour entrer dans les maisons, ce qui est une raison pour laquelle elle peut sembler plus courante dans les études de cas médico-légaux. On a beaucoup écrit sur la biologie de cette espèce, y compris les taux d'élevage des formes immatures à différentes températures constantes (Anderson, 2000; Marchenko, 2001), qui font de cette espèce très utile pour la détermination des IPMs.



Figure 4: *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy - Photo Dahlem and Edwards in Rivers et Dahlem (2014) (~10 mm).

- ***Lucilia sericata*** (Meigen) (Fig. 5) est l'une des espèces les plus communes et les plus répandues de ce genre, partout dans le monde (Hall, 1948). D'un vert métallique, mais pas aussi brillant comme *L. coeruleiviridis* et *L. mexicana*, présentant souvent un peu d'un éclat cuivré. C'est une espèce d'une très grande importance dans le domaine médico-légal et beaucoup a été écrit sur sa biologie, y compris les travaux détaillés sur sa croissance et son développement larvaire (Tarone et Foran, 2008). *L. sericata* joue un rôle aussi bien dans la science médicale et vétérinaire et son utilisation en astico-thérapie peut aider à guérir des infections qui sont autrement dit incurables (Rueda *et al.*, 2010).



Figure 5: *Lucilia sericata* (Meigen) - Photo Dahlem and Edwards in Rivers et Dahlem (2014) (~8 mm).

• *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) *Chrysomya albiceps* (Fig. 6) est un insecte nécrophage, qui diffère des autres mouches à viande nécrophages dans le comportement prédateur facultatif des deuxième et troisième stades. Les expériences au laboratoire et les observations sur le terrain montrent que les asticots de *C. albiceps* peuvent réduire de manière significative l'abondance des larves de mouches à viande indigènes quand ils se déposent sur la même culture expérimentale ou cadavre (Grassberger *et al.*, 2003). *C. albiceps* est originaire de l'Afrique, de la région de la Méditerranée et du Moyen-Orient (Gagné, 1981). Les femelles de cette espèce préfèrent pondre entre les grappes d'œufs des autres Calliphoridae (Zumpt, 1965). La ponte de *C. albiceps* est légèrement retardée par rapport à d'autres Calliphoridae, mais leurs larves peuvent éradiquer les larves des colonisateurs antérieures (Grassberger et Frank 2004).



Figure 6 : *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) Photo de Szpila *et al.*, (2008) (~8 mm).

1.2.3.- Paramètres influençant la colonisation entomologique

La colonisation d'un cadavre par les insectes peut être favorisée ou au contraire entravée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (Wells et Lamotte, 1997). Outre l'accessibilité du corps, la saison et les conditions météorologiques vont fortement influencer le développement et la succession des insectes sur le corps (Campobasso *et al.*, 2001), donc la localisation du corps et la zone biogéoclimatique (zone rurale ou zone urbaine) détermine les espèces entomologiques qu'il est théoriquement possible de retrouver sur un cadavre.

La présence de toxines sur ou à l'intérieur du corps peut limiter son attractivité pour les insectes nécrophages et peut également interférer avec leur croissance (Wells et Lamotte, 1997). Le type d'organisme mort qui va servir de substrat nourricier comme les mammifères et les oiseaux influencent également la guildes des insectes nécrophores (Amendt *et al.*, 2004). La concurrence pour la source de nourriture est le facteur le plus important affectant la taille et l'achèvement de l'histoire de la vie du cadavre. Smith (1986) a énuméré les façons dont cela se produit:

1. La compétition intra-spécifique peut réduire la taille des larves et peut réduire le nombre et la fécondité des adultes individuels.
2. La compétition interspécifique a des résultats similaires à la concurrence intra-spécifique, plus une possibilité d'élimination totale.
3. Les prédateurs et les parasites-sélectifs de la prédation ou parasitisme d'une espèce peut être avantageux à une espèce concurrente.

1.3.- L'utilisation des insectes dans les enquêtes judiciaires

Les « indices » entomologiques retrouvés sur une scène de crime peuvent avoir plusieurs utilités. La principale d'après Haskell *et al.* (1997) étant de pouvoir déterminer la date, la saison et le lieu géographique de la mort mais aussi des déplacements éventuels du corps ou l'ingestion de drogues. Wyss et Cherix (2006) signalent que les résultats des expertises entomologiques ne concernent plus seulement la datation de la mort, la dissimulation d'un corps ou de son déplacement éventuel. Le potentiel des insectes nécrophages et nécrophiles est très important, tant par la fiabilité et la diversité des informations fournies par ceux-ci. Ils peuvent ainsi apporter des informations dans les cas d'abus et de négligences chez les enfants ou les personnes âgées ajoutent les mêmes auteurs. De multiples travaux ont également démontrés la possibilité d'utiliser les insectes afin d'obtenir des informations sur les causes du décès ou sur l'identité des victimes par l'ADN extrait du tube digestif notamment les insectes Sarcosaprophages (Benecke et Lessig, 2001; Benecke et Wells, 2001; Amendt *et al.*, 2004 ; Gupta et Setia, 2004 ; Gomes et Von Zuben, 2006 ; Gennard, 2007).

1.3.1.- Datation de la mort

Le temps écoulé depuis la mort, ou de l'intervalle post-mortem (PMI), est une question d'une importance cruciale dans les enquêtes sur les homicides et autres décès prématurés. Cette information peut aider à identifier le criminel et la victime en éliminant les suspects et la connexion du défunt avec des personnes portées disparues pour la même quantité de temps (Catts, 1990 ; Geberth, 1996). Même lorsque la cause de la mort est naturelle, le temps de la mort peut avoir des implications importantes pour les questions juridiques telles que l'héritage et l'assurance (Henssge *et al.*, 1995). Un cadavre attire une variété de vertébrés et d'invertébrés nécrophages (Putman, 1983), pendant que les produits de la décomposition peuvent produire des changements dans la flore et la faune (Bornemissza,

1957). Il a longtemps été observé que les insectes associés aux cadavres de vertébrés affichent un processus d'IPM dépendants (Hall, 1990). Un de ces procédés est le développement d'espèces d'insectes dont les larves consomment les tissus morts. Les mouches dans les familles des Calliphoridae, Sarcophagidae et Muscidae sont les plus visibles en raison de la taille, le nombre et l'omniprésence. Ceux-ci sont souvent succédés par des coléoptères dans les familles des Silphidae et Dermestidae (Smith, 1986).

1.3.1.1.- Le calcul de l'intervalle post-mortem

Après avoir identifié le spécimen trouvé sur le cadavre, la deuxième étape consiste à lier cette information à la température enregistrée sur la scène de crime pour déterminer combien de temps a pris la larve pour atteindre ce stade de développement (Gennard, 2012). La température qui couvre la période depuis laquelle la personne a été vu vivante pour la dernière fois, est obtenue des stations météorologiques locales. Ces informations collectées procurent une estimation de la température sur la scène de crime avant que le corps a été découvert. A travers cette information on peut déterminer la longueur de temps que les mouches ont pris pour se transformer de l'œuf jusqu'au stade retrouvé sur le cadavre. Par implication, ceci est la meilleure façon d'estimer l'intervalle post-mortem (PMI) qui est actuellement disponible (Gennard, 2012).

Une telle estimation du temps passé depuis la mort est basée sur la vitesse de développement des insectes. Ces derniers sont des êtres à sang-froid, alors leur développement est influencé par la température. En dessous du seuil de la température, le développement s'arrête ; en dessus d'un seuil de température spécifique, le taux de développement diminue aussi. Néanmoins, entre ces deux points le taux de croissance des insectes juvéniles est considéré d'avoir une relation linéaire avec la température (Fig. 7).

Le seuil de température maximum pour différentes espèces d'insectes varie (Wigglesworth, 1967). Le seuil supérieur de température est rarement expérimenté lors des investigations de la majorité des scènes de crime, alors ce facteur est rarement important. Néanmoins, si la température reste à proximité ou bien au maximum pour une longue période de temps, cela peut affecter l'estimation du PMI, dont la croissance des insectes sera plus longue que d'habitude. Aux températures particulièrement basses, le développement ne pourra pas être possible.

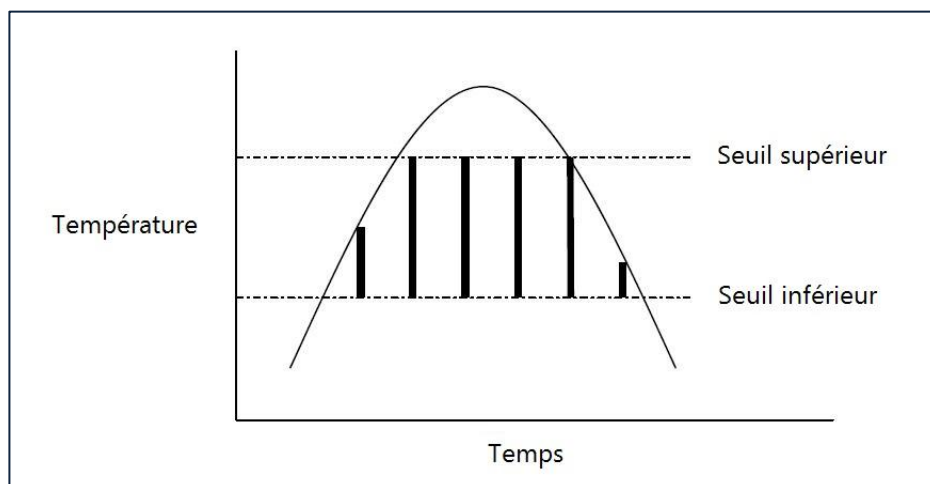


Figure 7 : Le développement des insectes en relation avec les seuils de températures supérieur et inférieur (Gennard, 2012).

Le calcul du cycle de développement des premiers insectes colonisant le cadavre est l'un des facteurs les plus importants influençant la durée de développement des larves de Diptères est la température (Wyss et Cherix, 2006). Chaque espèce possède une vitesse de développement qui lui est propre ; il existe des tables publiées sur les durées de développement des espèces forensiques de Diptères (Marchenko, 1988 ; Marchenko, 2001). L'accumulation des degrés jours (ADJ) ou degré heures (ADH) est la méthode recommandée pour déterminer le temps de développement des insectes (Niederegger *et al.*, 2010).

Tableau 1 : Seuils de développement inférieur (températures de base) des différentes espèces de Diptères

Species	Base temperature °C
<i>Calliphora vicina</i>	2.0
<i>Calliphora vomitoria</i>	3.0
<i>Protophormia terraenovae</i>	7.8
<i>Lucilia sericata</i>	9.0
<i>Chrysomya albiceps</i>	10.2
<i>Phormia regina</i>	11.4
<i>Muscina stabulans</i>	7.2

(Gennard, 2012)

1.3.2.- Enfants et personnes âgées maltraités

Les insectes nécrophages peuvent aussi révéler certains cas de maltraitements et de négligences sur les personnes âgées ou les enfants en bas âges (Benecke et Lessig, 2001; Gennard, 2007). En effet, les larves de certains Diptères nécrophages, telles que *Lucilia sericata*, sont attirées par les odeurs, comme l'ammoniac, provenant de l'urine et des fèces. La présence d'asticots au niveau d'une blessure (escarres) ou d'un orifice naturel d'une personne vivante provoque des lésions et indique souvent que la personne est négligée. Ces lésions, appelées myiases des plaies ou traumatiques, apparaissent sous forme d'abcès et de furoncles de coloration rougeâtre. L'estimation de l'âge de ces larves permet d'avoir des informations sur le corps et donc depuis quand la personne est délaissée.

1.3.3.- L'ADN et l'entomologie forensique

L'identification moléculaire des insectes se nourrissant de cadavres peut être une technique importante en entomologie médico-légale, en particulier si les espèces larvaires indéterminées sont récupérées sur une scène de crime. L'analyse est souvent réalisée par des biologistes moléculaires, bien que les réponses soient interprétées par des entomologistes. En traitement des dossiers, les stades de développements immatures des insectes collectés d'un cadavre sont élevés à l'âge adulte afin d'identifier les espèces en utilisant la morphologie. Ceci est un processus lent, en utilisant des méthodes moléculaires, aux côtés de l'identification morphologique peut, à l'occasion, être un moyen plus rapide et plus précis pour fournir la base pour la détermination du PMI (Gennard, 2012).

1.3.4.- L'entomotoxicologie médico-légale

Les Toxicologues judiciaires qualitativement et quantitativement identifient les médicaments et les poisons qui peuvent être pertinents à la cause et les circonstances du décès. Une des applications les plus courantes de données post-mortem de la toxicologie est son utilisation pour définir des concentrations thérapeutiques, toxiques et mortelles pour les médicaments (Drummer, 2006). Dans la plupart des cas, les échantillons toxicologiques sont recueillis lors de l'autopsie. Alternativement, si un corps est mal décomposé, les os, les cheveux, les larves et les nymphes d'insectes sont recueillies et analysés. Les tissus d'insectes ou leurs restes (pupes vides, excréments, etc.) peuvent être utilisés pour identifier l'éventuelle présence des médicaments et des toxines dans les tissus en décomposition dont

les insectes se sont nourries (Monthei, 2009). Selon Gagliano-Candela et Aventaggiato (2001), Sohal et Lamb en 1977 était le premier qui a utilisé les insectes comme spécimens dans l'analyse toxicologique. De nos jours, de nombreuses recherches ont été faites sur l'entomotoxicologie ; Les études réalisées peuvent être classées en deux aspects ; études qui ont porté sur la fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologiques et des travaux effectués pour étudier les effets de drogues sur le développement des insectes médico-légale d'une importance majeure (Djedouani, 2008).

1.3.4.1.- Définition

L'entomotoxicologie est l'étude de la bioaccumulation des xénobiotiques chez les insectes ou d'autres arthropodes en vue de déterminer la présence de ces mêmes xénobiotiques au niveau du cadavre (Introna *et al.*, 2001 ; Gagliano-Candela et Aventaggiato, 2001). En effet, l'extraction de xénobiotiques provenant des insectes s'avère nécessaire lorsque le corps est trop décomposé (absence de tissus, de sang ou d'urine) pour procéder à des analyses toxicologiques sur des échantillons de tissus « classiques » (Benecke, 2007 ; Amendt *et al.*, 2010).

Le matériel biologique d'intérêt en entomotoxicologie se compose essentiellement de larves, de pupes, d'insectes adultes (aussi bien les Diptères que les Coléoptères), de pupes vides, d'exuvies et même parfois de matière fécale de Coléoptères (Gagliano-Candela et Aventaggiato, 2001). En effet, les larves de Diptères, qui se nourrissent sur un corps intoxiqué, ne métabolisent qu'en partie les drogues ou toxines prises par la personne lorsque celle-ci était vivante (Amendt *et al.*, 2010). Le transfert de ces substances se fera également aux Coléoptères qui se nourrissent de ces larves ou directement du cadavre. C'est ce qu'on appelle un phénomène de seconde bioaccumulation (Introna *et al.*, 2001). L'étude entomotoxicologique permet donc d'identifier et de quantifier la présence de xénobiotiques chez les arthropodes se nourrissant sur les cadavres (Tracqui *et al.*, 2004 ; Amendt *et al.*, 2010). Il est donc ainsi possible d'avoir une idée des causes du décès (Tracqui *et al.*, 2004). L'entomotoxicologie permet également une meilleure estimation des IPMs (Tracqui *et al.*, 2004).

1.3.4.2.- Historique

Les premières détections de xénobiotiques chez les insectes datent des années 1970 ; elles ont débuté par des analyses de métaux lourds chez les Diptères (Introna *et al.*, 2001). En 1982, ces analyses ont permis d'élucider les circonstances de la mort d'une femme en Finlande, retrouvée à un stade de décomposition avancé et couverte de larves de Diptères (Nuorteva et Nuorteva, 1982 ; Amendt *et al.*, 2010). En ce qui concerne l'analyse des drogues, des observations fortuites avaient déjà été faites en 1958 sur la différente colonisation des Diptères sur des carcasses de rats empoisonnés avec différents produits (Introna *et al.*, 2001).

En 1985, Marcel Leclercq fut le premier à démontrer la présence d'arsenic chez les Diptères lors d'un empoisonnement (Leclercq et Brahy, 1985 ; Introna *et al.*, 2001). D'autres recherches ont été menées en 1989, Gunatilake et Goff ont détecté des traces de Malathion dans des larves prélevées sur un cadavre (Gunatilake et Goff, 1989 ; Amendt *et al.*, 2010). Depuis, différentes drogues et diverses techniques ont été testées sur les larves de Diptères dans le but de les utiliser comme des échantillons toxicologiques en vue de détecter des substances comme les benzodiazépines (Kintz, 1990 ; Sadler *et al.*, 1995), la morphine (Hedouin *et al.*, 2001 ; Georges *et al.*, 2009), le Paracétamol (O'Brien et Turner, 2004) ou encore la codéine (Kharbouche *et al.*, 2008).

1.3.4.3.- Application de l'entomotoxicologie et les différentes techniques d'analyse

utilisées

Comme mentionné précédemment, il n'est pas inhabituel pour les restes humains d'être découverts dans un état très décomposé ou sous forme de squelette. Historiquement, il a été difficile d'obtenir des informations toxicologiques dans de tels cas de décomposition avancé dû en grande partie à un manque de tissus analysables suffisants. Cependant, une variété d'arthropodes et leur peau larvaire et pupale, sont couramment rencontrés sur les restes putréfiés, momifiés, et squelettisés. Plusieurs études récentes ont détaillé la détection de toxines et de substances contrôlées, à la fois dans les insectes et les restes chitinisés récupérés sur les victimes en état de décomposition. Dans ces rapports, les arthropodes ont généralement été récupérés homogénéisés et, ensuite, traités d'une manière similaire aux autres tissus et fluides traditionnels ou soumis à des techniques d'extraction mises au point pour l'analyse des tissus rigoureux tels que les cheveux et les ongles (Byrd et Castner, 2001).

La détection réussie de substances a été accomplie par plusieurs méthodes d'extraction à partir des asticots, de nymphes et des adultes de diptères et même des excréments de coléoptères (Miller *et al.*, 1994). Les insectes peuvent également être des animaux modèles fiables pour des études immuno-histochimiques pour la détection et l'arpentage du métabolisme de certaines substances (Amendt *et al.*, 2010). Les procédures analytiques ont inclus le dosage Radio-immunologique (RIA), Chromatographie en phase gazeuse (GC), Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse (GC / MS), Chromatographie sur couche mince (CCM), ou Chromatographie liquide à haute performance / spectrométrie de masse (HPLC / MS).

a.- La GC / MS

La Chromatographie en phase gazeuse (GC) est sans doute l'une des principales techniques utilisées pour le dépistage / identification / quantification de nombreux groupes de substances toxiques alimentaires non polaires et / ou semi-polaires (ou leurs produits de dérivation). La puissance élevée de séparation susceptible d'être atteinte (nombre potentiel de plateaux théoriques) en combinaison avec un large éventail de détecteurs utilisant différents principes de détection à laquelle il peut être couplé, rend la GC un outil important souvent irremplaçable dans l'analyse des (ultra) niveaux de toxicité des composants (Hajšlová et Cajka, 2007). Le procédé le plus indiqué est le fractionnement des échantillons par chromatographie suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (MS), parce que leur précision combinée permet la séparation, l'identification et la quantification des substances chimiques et des contaminants à partir de substances illicites à des quantités infimes (Moore et Casale 1994; Collins *et al.*, 1997).

La Chromatographie en phase gazeuse est remarquable pour sa très haute résolution et sa sensibilité. Avec elle, il est possible d'analyser des échantillons composés de plusieurs substances à des quantités infimes, un fait qui limiterait l'utilisation d'autres techniques. D'autre part, la préparation des échantillons doit suivre plusieurs étapes et les résultats peuvent prendre un temps considérable (Collins *et al.*, 1997). Ce travail se concentre sur l'optimisation des opérations impliquées dans la détection du Paracétamol, à savoir : l'introduction d'extrait de l'échantillon purifiée sur la colonne de GC, la séparation de ses composants sur une colonne d'analyse et de détection de l'analyte cible par le dispositif le plus couramment utilisé le détecteur de la spectrométrie de masse (MS) ; il convient de noter

que la pratique de préparation d'échantillons joue un rôle crucial dans l'obtention des paramètres requis de méthode analytique particulière.

1.3.4.4.- Analyse toxicologique des échantillons entomologiques et protocole de collecte et de préservation des arthropodes

Sur la collecte de preuves entomologiques en particulier sur la scène de mort, les experts devraient porter des vêtements de protection, des gants et des couvre-chaussures ou des bottes principalement pour éviter toute contamination de la scène avec des fibres ou autres matériaux (Amendt *et al.*, 2007).

Tout le matériel ou équipement utilisé pour prélever l'échantillon et l'analyse toxicologique doivent être propre et, si possible, lavé à l'eau chaude. Un film plastique (mages de pack®) ou du papier d'aluminium peuvent être mis dans un couvercle de verre pour éviter la contamination de l'échantillon. Les tissus, le fluide et les insectes doivent être recueillis dans des flacons sans conservateurs ou de toute contamination extérieure. Dans la plupart des cas, un stockage réfrigéré avant l'analyse est recommandé. Si possible, devrait également stocker une partie des individus de chaque échantillon dans différents flacons sous l'état réfrigéré, à garder comme échantillon de référence. Les échantillons peuvent être recueillis sur le cadavre (orifices naturels, les yeux, les plaies traumatiques ou partout sur le corps), des vêtements, des chaussures et autour du cadavre (Amendt *et al.*, 2007).

Bien que de nombreux échantillons pour l'analyse soient les mieux envoyés dans leur état d'origine, d'autres nécessitent des additifs pour les maintenir dans des conditions optimales jusqu'à ce qu'ils atteignent le laboratoire (Knight, 1991). Les échantillons entomologiques peuvent être recueillis, à l'aide de pinces et cuillères pour recueillir les stades immatures des mouches, pinceau fin pour la collecte des œufs, ou la capture directement par la main pour les insectes adultes (Amendt *et al.*, 2007). L'analyse toxicologique devrait être faite dès que possible pour garantir l'intégrité des échantillons (Amendt *et al.*, 2010).

1.3.4.5.- Fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologique

De nombreuses études ont été faites pour étudier la fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologiques; comme mentionné ci-dessus l'utilisation des insectes dans l'analyse toxicologique a d'abord été démontrée par Sohal et Lamb en 1977,

qui a observé l'accumulation des métaux tels le cuivre, calcium, fer et zinc chez les insectes. Qu'en 1982, Nuorteva et Nuorteva ont indiqué que le mercure a été détecté dans les larves de diverses espèces de mouches de la viande se nourrissant de tissus contenant des concentrations connues de ce métal. Ces études ont démontré la bioaccumulation de toxines et de métaux dans les organismes d'insectes où ils se nourrissaient de sources de nutriment contaminées. La science forensique est l'une des disciplines qui a bénéficié de cette nouvelle découverte. De nombreuses études ont été mentionnées dans la littérature, pour être menées en vue d'enquêter sur l'importance des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologique. La plupart des études semblent être effectuées sur les insectes collectés à partir de cadavres humains dans lesquels la mort était par la drogue et / ou toxines liées.

D'autres recherches ont été effectuées en utilisant des animaux comme des lapins injectés avec une concentration connue du médicament ou une toxine cible, cette méthode a été utilisée par Goff *et al.* (1997) et Carvalho *et al.* (2001), une autre méthode utilisée par O'Brien et Turner en (2004) consistait à utiliser les tissus internes et les muscles d'agneau ou de porc contenant une concentration connue de médicament ou une toxine cible comme source de nourriture pour nourrir les larves. Au cours de cette recherche, il a été remarqué que la plus grande quantité de recherches ont été menées sur certaines espèces de la famille des diptères par exemple *Chrysomya rufifacies*, *Ch. putoria*, *Ch. megacephala* et *Ch. albiceps* de la famille des Chrysomilidae, *Calliphora vicina* et *Lucilia sericata* de la famille des Calliphoridae et *Parasarcophaga ruficornis* et *Boetterisca peregrina* de la famille des Sarcophagidae. Une fois de plus Goff *et al.* (1989), ont utilisé avec succès les larves de deux espèces entomologiques de diptères (*Chrysomya megacephala* et *Ch. rufifacies*) s'alimentant sur un corps de sexe masculin putréfié, pour détecter les drogues par GC (Fig. 8). En 1990, plusieurs analyses toxicologiques ont été réalisées sur un corps putréfié dont le PMI a été estimé de 67 jours ; Kintz *et al.* (1990) ont réalisé l'analyse toxicologique par HPLC sur des échantillons des organes décomposés et des larves qui colonisaient le cadavre, dans ce travail cinq différents médicaments prescrits ont été détectés et quantifiés dans les deux échantillons de larves et d'organes; Phénobarbital, les benzodiazépines (triazolam, oxazépam) et deux antidépresseurs (alimémazine, clomipramine). A travers ce travail, il a été démontré que les échantillons entomologiques étaient plus faciles à analyser, et montré plus d'avantages que les échantillons putréfiés. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être établie entre la concentration détectée dans les tissus putréfié et celle détectée dans les larves.

Nolte *et al.*, (1992) ont recueilli les pupes vides trouvés sur un cadavre d'un toxicomane et analysées par GC / MS qui a conduit à la détection de la cocaïne. Un an plus tard, en 1993, Wilson *et al.* ont essayé de détecter trois antidépresseurs différents dans trois sources différentes d'échantillon ; les larves, les muscles et les tissus humains, et les pupes vides de *Calliphora vicina*. En utilisant l'HPLC les trois antidépresseurs ; l'amitriptyline, la nortriptyline et la propoxyphène ont été détectés avec succès chez les larves et les tissus musculaires humains, mais aucun d'entre eux n'a été détectés dans les pupes. Ensuite, Miller *et al.* (1994) ont effectué une analyse sur les pupes de Diptères récupérés sur les restes humains par GC / MS et ont détecté avec succès une intoxication à l'amitriptyline.

Tableau 2: Exemples de certains médicaments détectés avec les insectes (Kapil et Reject, 2013).

Espèces d'insectes	Médicaments
<i>Parasarcophaga ruficornis</i>	Methamphetamine
<i>Sarcophaga tibialis</i>	Cortisol
<i>Lucilia sericata</i>	Methadone
<i>Calliphora stygia</i>	Morphine
<i>Chrysomya albiceps</i>	Paracetamol, Diazepam
<i>Chrysomya megacephala</i>	Malathion
<i>Calliphora vicina</i>	Temazepam, Methadone

1.3.4.6.- Impact des xénobiotiques sur le développement des insectes nécrophages

Les mouches sont les insectes les plus couramment utilisés dans l'entomotoxicologie. Certains effets de ces médicaments sur les mouches dépendent de la concentration des médicaments tandis que d'autres dépendent simplement de sa présence (Kapil et Reject, 2013). Les médicaments peuvent avoir une variété d'effets sur les taux de développement des mouches. Des substances comme la cocaïne, l'héroïne, la morphine, la méthamphétamine, de méthylène Dioxymethamphetamine, triazolam, oxazepam, Chloripriamine, barbituriques, malathion, Nortriptyline et Amitriptyline, et le paracétamol sont couramment rencontrés dans les cas où l'entomotoxicologie légale est utilisée (Kapil et

Reject, 2013). Des études antérieures cités ci-dessus ont porté sur l'utilisation potentielle des insectes comme spécimens alternatifs pour les analyses toxicologiques; les résultats démontrent l'utilité de tester les insectes associés aux restes décomposés. Un médicament ou une toxine peuvent être détectés dans les larves lorsque son taux d'absorption dépasse le taux d'élimination, mais ce n'est pas encore connue exactement comment la larve bio-accumule ou élimine la drogue, et comment cela affecte le développement des larves (Introna *et al.*, 2001). Les effets des médicaments et de toxines sur le taux de développement des diptères est une question primordiale à résoudre avant d'utiliser les larves pour la détermination du PMI. Par exemple, dans le cas de l'empoisonnement avec le malathion rapporté par Gunatilake et Goff, les étapes de développement de *C. megacephala* et *C. rufifacies* étaient indicative d'un intervalle post-mortem minimum de cinq jours, alors que la victime avait été vu vivante 8 jours avant la découverte du corps. Dans les situations de plein air hawaïennes et pour un intervalle post-mortem d'une semaine, de nombreuses autres espèces de mouches et de coléoptères prédateurs comme les Staphylinidae et les Histeridae auraient pu être envisagé en association avec des restes humains. La présence des deux seules espèces de larves de mouches sur le cadavre a appuyé les conclusions des auteurs que le malathion dans les tissus retarde l'invasion des cadavres par divers taxons d'arthropodes ainsi que la ponte des œufs pendant plusieurs jours (Introna *et al.*, 2001).

L'étude des effets de la cocaïne sur le taux de développement des Sarcophagidae (*B. peregrina*) Goff *et al.* (1989), ont démontré que les larves se développent plus rapidement 36 heures après la naissance si élevées sur le foie et /ou la rate des lapins préalablement administrés à la dose létale de cocaïne ou deux fois une telle dose. L'accélération du développement larvaire est poursuivie pendant les 76 heures suivantes après l'éclosion. Le total du temps de développement nécessaire à la nymphose et l'émergence des adultes a été raccourci en conséquence. En ce qui concerne le développement des larves en état d'ébriété, Lord en 1990 décrit le cas d'une femme de 20 ans trouvé dans le début du stade de gonflement colonisée par les asticots de *Lucilia sericata* et *Cynomyopsis cadaverina* sur le visage et le haut du torse. La plupart des larves étaient de 6-9 mm de longueur totale indiquant un PMI de 7 jours, alors que seulement une seule mouche de la zone de la région nasopharyngée mesurait 17,7 mm de longueur totale indiquant une période de 3 semaines. La croissance rapide de cette grande larve semblait être dépendante de la quantité de cocaïne dans la région nasale. Une enquête ultérieure a montré que la victime était une toxicomane qui avait prit de la cocaïne peut de temps avant sa mort (Introna *et al.*, 2001). En 2008, Djedouani a étudié

l'effet de l'amitriptyline sur le taux de développement des larves élevées sur la viande de porc. Cet auteur, a utilisé cinq doses différentes (00 ng/g, 100 ng/g, 300 ng/g, 500 ng/g et 2500 ng/g), correspondants successivement à la dose zéro (Témoin), thérapeutique, toxique, létale, et 5 fois la dose létale. Le résultat a démontré que le taux de développement larvaire change en dépend de la dose, plus la concentration d'amitriptyline est élevée dans le substrat, moins la taille des larves est grande et le cycle de développement est retardé par rapport à l'échantillon témoin.

1.4.- Le Paracétamol

1.4.1.- Généralité

Le paracétamol (N-acétyl-p-aminophénol ou APAP) est un agent analgésique et antipyrétique largement utilisé et disponible sous plusieurs formulations, à la fois comme agent unique ou en combinaison avec d'autres agents (opioïdes, antihistaminiques, etc.). Introduit sur le marché en 1955, on voit apparaître dans la littérature dès 1966 des descriptions d'hépatotoxicité secondaires au paracétamol. Encore en 2008, les analgésiques constituaient la 1^{ère} catégorie de substances impliquées dans les expositions humaines rapportées à l'Association américaine des centres antipoison (AAPCC), représentant 13,3 % de toutes les expositions. Parmi les substances impliquées dans les décès, les formulations avec paracétamol arrivent au 5^e rang (7,45 %) et le paracétamol seul se place au 8^e rang (5,33 %). Les intoxications au paracétamol représentent la première cause d'insuffisance hépatique aiguë. Pour le réanimateur impliqué dans la prise en charge d'intoxications polymédicamenteuses, une connaissance approfondie des mécanismes de toxicité et de la prise en charge des intoxications au paracétamol est donc essentielle (Larocque *et al.*, 2013). Un siècle après son introduction, l'acide acétylsalicylique (aspirine) est de loin l'analgésique le plus couramment utilisé, en partageant sa position de leader avec le paracétamol de nouveau venu (acétaminophène), et malgré le fait que d'autres composés largement utilisés, tels que l'ibuprofène, ont au cours des dernières années été introduits dans plus de la contre-versions. Les deux sont également toujours encore prescrits par les médecins et sont généralement utilisés pour la douleur légère à modérée, la fièvre associée à des maladies communes courantes, et des troubles allant de rhume et de la grippe au mal de dents et maux de tête. Cependant, leur plus grande utilisation est par les consommateurs qui les obtient directement de la pharmacie, ainsi en dehors des pharmacies dans de nombreux pays (Aronson, 2010). Le métabolisme du paracétamol, en soit non toxique, constitue le fondement de sa toxicité. Il est

l'exemple classique d'un xénobiotique subissant une transformation métabolique générant un produit toxique (Baud *et al.*, 2013). Depuis que le paracétamol et les analgésiques similaires sont impliqués dans un grand nombre de décès par surdose chaque année, cette information est d'une importance où la croissance des Calliphoridae est utilisée pour estimer l'intervalle post-mortem minimum (O'Brien et Turner, 2004).

1.4.2.- L'administration du médicament et le surdosage

Le paracétamol est un analgésique largement utilisé, efficace et bien toléré, mais grâce à sa grande disponibilité, est la substance la plus couramment utilisée dans l'auto-intoxication (SEDA-18, 94) et ainsi une cause fréquente de surdosage accidentel, surtout chez les enfants (SEDA-22, 114). Bien que les enfants de 6 ans et moins sont rarement l'objet d'hépatotoxicité, même avec un surdosage accidentel (Penna et Buchanan, 1991), peut-être en raison des différences d'âge dépendant de la cinétique du paracétamol (Rumore et Blaiklock, 1992). Le paracétamol est l'un des médicaments les plus couramment ingéré dans l'auto-empoisonnement et l'ingestion accidentelle par les enfants (Aronson, 2010). L'insuffisance hépatique fulminante se produit dans 1-5% des cas de surdosage de paracétamol 3-6 jours après l'ingestion (Brotodihardjo *et al.*, 1992), avec le décès fréquents chez les personnes qui prennent 20-25 g. Il ya seulement une marge étroite entre la dose maximale normale de 24 heures et ce qui peut causer des dommages au foie et d'insuffisance hépatique aiguë. Sans doute, certaines personnes sont plus sensibles que d'autres à la toxicité du paracétamol, car, bien que 6 g a été rapporté comme toxique dans certains cas, la plupart des toxicités sont observées avec 12 g ou plus (Stricker, 1985 ; Meredith, 1986).

2.1.- Objet de l'étude

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire d'entomologie du département de la médecine légale de l'Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale de Bouchaoui (INCC/GN). Il consiste à tester l'effet du paracétamol sur le développement de trois (03) espèces de Diptères, Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*); et voir d'éventuelle présence de ce xénobiotique dans les larves de ces mêmes espèces, par un test toxicologique réalisé au laboratoire de toxicologie de l'INCC. Tout cela a pour but purement médico-légal, afin de déterminer la cause de la mort par les substances étrangères (xénobiotiques) et leur impact sur le développement des larves qui peut influencer sur l'estimation de l'intervalle post-mortem (PMI). A cet effet une liste de matériel a été préparé, et des méthodes conçues.

2.2.- Matériel

2.2.1.- Matériel biologique

2.2.1.1.- Matériel entomologique

Trois (03) espèces de diptères d'une grande importance forensique ont été choisies à savoir *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata* et *Chrysomya albiceps*.

a.- *Calliphora vicina* : Obtenue de la nature à l'aide d'un dispositif expérimental conçu à ce but (Voir 2.3.1.2.- a).



Figure 8 : *Calliphora vicina* (♀ adulte) (Originale).

b.- *Lucilia sericata* : Des femelles et des mâles ont été obtenue du laboratoire d'entomologie / INCC-GN issue d'une affaire traitée au laboratoire provenant de Bechar.

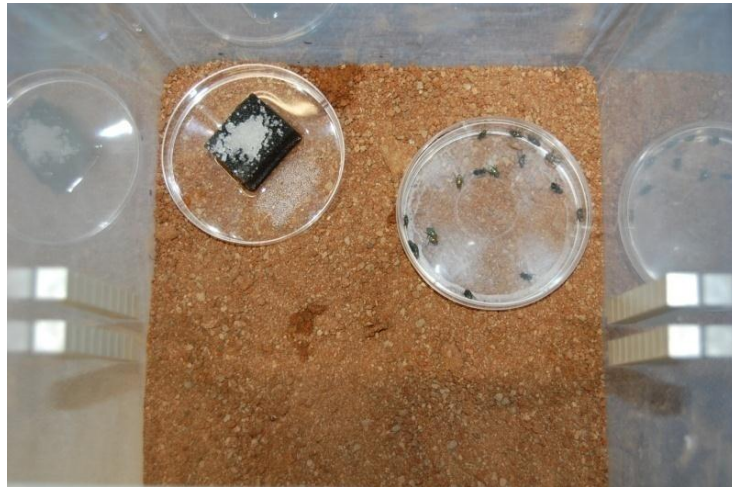


Figure 9 : *Lucilia sericata* (♂ et ♀ adultes) élevé avec du sucre et de l'eau (Originale).

c.- *Chrysomya albiceps* : Ramener du prélèvement d'un cadavre de lapin dans le cadre d'un travail de mémoire sur la faune cadavérique au environ de Blida ; Benitamou (Zarouri, com. pers.) (Fig. 10).



Figure 10 : La boîte du prélèvement de *C. albiceps* (Originale).

2.2.1.2.- Le substrat nutritif

Quatre lapins de la race albinos « *Néo zélandais/ le Californien* » ramené de Saïdal de Médéa, qui pèsent respectivement 1,88 kg ; 1,92 kg ; 2,08 kg ; 2,16 kg (Fig. 9) (Annexe I.1).



Figure 11 : Lapins « Néo zélandais/ le Californien, Race albinos » à l'intérieur des cages avec nourriture (Originale).

2.2.2.- Produits chimiques

2.2.2.1.- Le paracétamol (l'Acétaminophène injectable) : 1g par 100ml (10mg/ml).

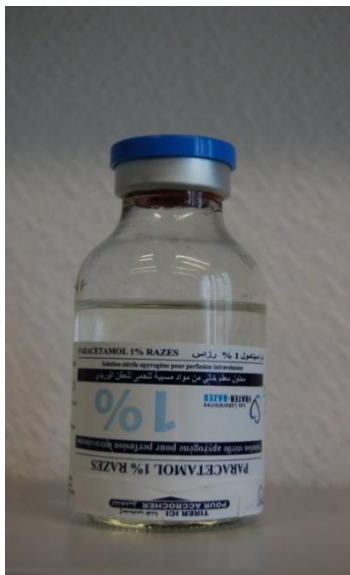


Figure 12 : Fliale de 100ml de Paracétamol (Originale).

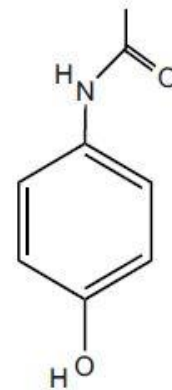


Figure 13 : Structure chimique du paracétamol (Vivian et Jonathan, 2010)

- *. **Nom générique :** Acétaminophène intraveineux ou paracétamol,
- *. **Nom chimique :** N-acétyl-para-aminophénol,
- *. **Classe :** antipyrétique, analgésique, complément d'anesthésie,
- *. **Structure chimique :** voir la figure 13.

Dosage

L'acétaminophène est disponible en tant que 1 g en perfusion qui ne nécessite pas de reconstitution. Il doit être administré plus de 15 minutes et peut être donné par un périphérique. Il est comparable à d'autres analgésiques pour le traitement de la douleur post-opératoire modérée (Vivian et Jonathan, 2010). L'hépatotoxicité liée l'acétaminophène est plus fréquente chez les patients atteints de surdoses accidentelles, l'abus d'alcool et maladie hépatique sous-jacente (Myers et al., 2008). L'œdème cérébral est une cause majeure de décès dans le surdosage aigu d'acétaminophène (Craig et al., 2010).

Provenance

Obtenu de Saïdal par l'INCC, le paracétamol injectable a été choisi vu qu'il répond à plusieurs critères juger adéquat à notre objectif, à savoir, la forme liquide nous permet d'administrer ce xénobiotique facilement tout en étant sûr de la dose à injecter « Vu que les lapins utilisés dans notre expérimentation sont de masse pondérale inférieure à 10 kg, les doses utilisées ont été référencés aux doses prescrites chez l'enfant ». Le paracétamol est l'origine des intoxications liées à une tentative de suicide ou à un surdosage accidentel (Mégarbane *et al.*, 2006). Dans les intoxications médicamenteuses chez l'enfant, la mortalité est faible (< 2 %), et augmente avec l'âge (Brissaud *et al.*, 2006).

2.2.2.2.- Méthanol CH₃OH : Pour la désinfection (Annexe I.2.a).

2.2.2.3.- L'éthanol C₂H₆O : A 80 %, utilisé pour la conservation des larves (Adams et Hall, 2003) (Annexe I.2.b).

2.2.3.- Equipement, Instruments, Consommable

L'équipement, les instruments et le consommable utilisés dans la présente étude est développé dans les annexes I.3, I.4 et I.5.

2.3.- Méthodes

2.3.1.- L'origine des espèces choisies

2.3.1.1.- Identification des espèces

Le recours à l'indice entomologique sur une scène de crime, que se soit son objectif (estimation des IPMs, recherche de toxines...), fait appel en premier lieu à l'identification des insectes retrouvés sur la scène. L'identification par les critères morphologiques est la méthode la plus utilisée vu quelle permet d'économiser le temps et les dépenses. Cette méthode est basée sur l'utilisation des clés d'identification à travers les critères morphologiques, qui nécessite une bonne connaissance sur la nomenclature des différents composants du corps de l'insecte (Gennard, 2012).

L'identification des espèces a été réalisée à l'aide d'un stéréo-microscope avec caméra « Stemi 2000-C » (Annexe I.3.a), en suivant les clés d'identification des larves et des adultes de Calliphoridae « Blowflies » (Akbarzadeh *et al.*, 2015). L'identité des spécimens a été confirmée par des spécialistes du laboratoire d'entomologie INCC. (Voir Annexe III.1).

2.3.1.2.- Site et dispositif expérimental

a.- *C. vicina*

A été obtenue de la nature à l'aide d'un dispositif expérimental constitué d'un morceau de viande de bœuf d'environ 1,5 kg déposé à l'air libre dans l'espace vert au voisinage de l'INCC/GN, Bouchaoui, est recouvert par une cage métallique dont la grille permet le passage des insectes tout en empêchant les autres carnivores d'avoir accès à la viande (Fig. 14).



Figure 14 : Viande de bœuf recouverte par une cage métallique (Originale).

Après 20 minutes environ, les premiers insectes sont venus visiter le morceau de viande. Le lendemain des agglomérations de couleur blanche ont été observées sur la viande. Il s'agit des œufs (Annexe I.7) déposés par les insectes nécrophages. Ces œufs ont été soigneusement collectés à l'aide d'un pinceau fin, mouillé à l'eau du robinet et mis en culture dans une boîte (Fig. 15) avec de la viande de bœuf et incubé à 26° C. et une humidité relative de 70 %. Après l'émergence des adultes, ils ont été identifiés par la suite. Parmi les individus identifiés, l'espèce *Calliphora vicina* était sélectionnée. Les autres espèces ont été relâchées dans la nature.



Figure 15: Boite d'incubation de *C. vicina* (Originale).

b.- L. sericata

Vu le nombre restreint des adultes de *L. sericata* fourni par le laboratoire, un protocole de multiplication du nombre a été mis en application. En première étape on s'est assuré de la présence de deux sexes (mâle et femelle) la distinction des sexes a été réalisable par l'examen des caractères morphologiques spécifiques de chacun ; Chez les mâles, les yeux sont proches les uns des autres et la distance entre eux est petite. Par contre, celle des femelles la distance est plus grande, et la séparation est plus apparente (Fig. 16).

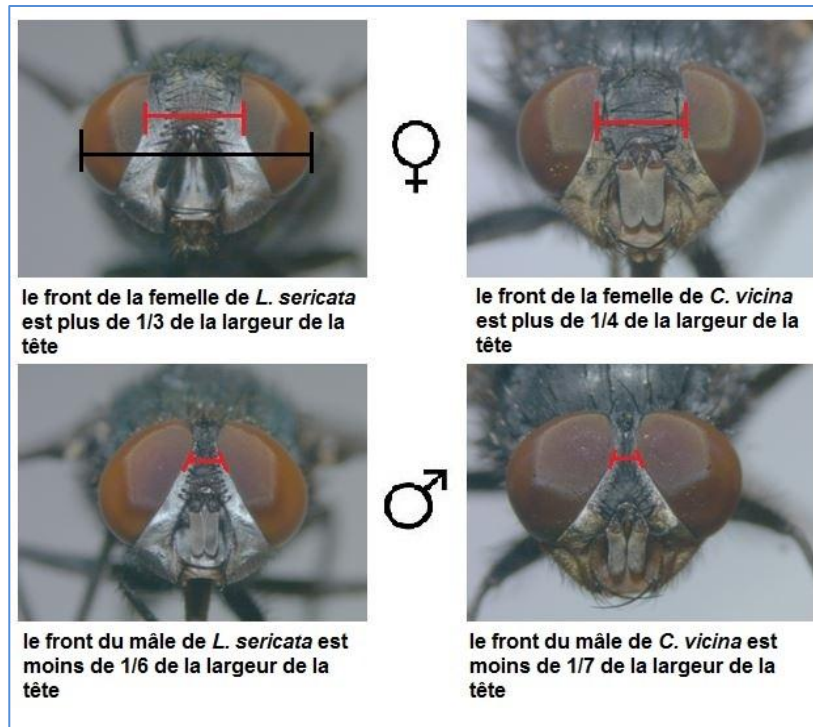


Figure 16: Distinction entre ♂ et ♀ de *L. sericata* et *C. vicina* (Originale).

En deuxième étape les mâles et les femelles fournis par le laboratoire ont été mis dans une boîte utilisée pour l'accouplement (Annexe I.4.d). Pendant 02 jours, les insectes ont été maintenus en vie nourris avec du sucre et de l'eau, le troisième jour un morceau de viande de bœuf (~100g) a été fourni aux insectes pour les stimuler à pondre (Annexe I.6.a). Après environ 02 jours, les femelles ont déposés leurs œufs sur le morceau de viande. La viande a été récoltée et mise en culture à 26° C. avec une humidité relative de 70 % (Fig. 17).

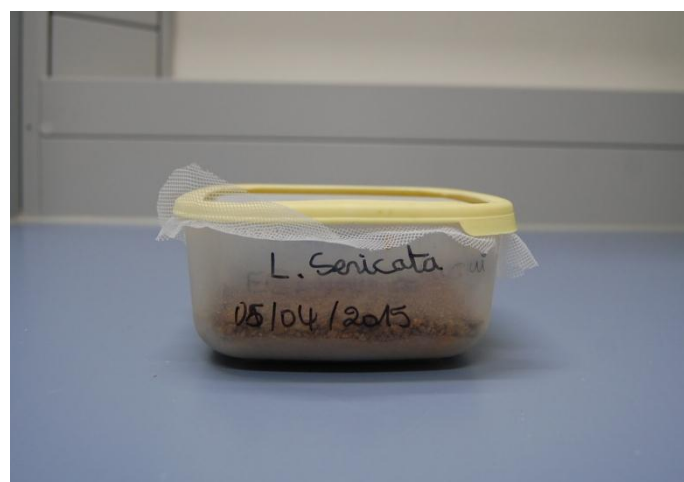


Figure 17: Boîte d'incubation de *L. sericata* (Originale).

c.- *C. albiceps*

Après l'émergence des adultes. Ces derniers ont été mis au congélateur pendant 05 minutes pour les assommés et puis récoltés de leur boîte d'origine (Fig. 10) et transférés dans des boîtes d'élevages (Fig. 18).



Figure 18 : Boîte d'élevage de *Chrysomya albiceps* (Originale).

2.3.2.- L'expérimentation Entomo-toxicologique

Cette expérimentation à double objectif ; Le premier est de tester l'effet du paracétamol sur le taux de développement de trois espèces de Calliphoridae (*C. vicina*, *L. sericata* et *C. albiceps*). Le deuxième objectif consiste à la détection du paracétamol dans les larves des 03 espèces au cours des différentes périodes de leur développement (test entomotoxicologique).

2.3.2.1.- L'effet du Paracétamol sur le taux de développement des différentes espèces

Pour atteindre cette objectif un protocole expérimental a été mis en place, comporte deux phases;

- ❖ **Phase I :** Consiste à générer une source nutritive contenant différentes doses de paracétamol. 03 doses de paracétamol ont été sélectionnées, avec un témoin (Annexe II.1) :
 - **Dose 01:** 60 mg / Kg/ 24h.
 - **Dose 02:** 100 mg / kg/ 24h.
 - **Dose 03:** 200 mg / kg/ 24h.
 - **Témoin (Dose 0) :** 00 mg / kg.

a.- L'Administration du paracétamol chez les lapins

La solution du paracétamol a été administrée aux lapins par voie intraveineuse (oreille ou cuisse) (Fig. 19) et parmi les quatre lapins choisis, trois d'entre eux ont été injectés par 03 différentes doses de paracétamol comme cité supra, puis les lapins ont été tués 20 min. après la dernière injection. Un programme d'injection a été préalablement établie (Voir Annexe II.2). Cette opération a été prise en charge par un personnel qualifié de l'INCC-GN « deux infirmiers ».



Figure 19: Injection intraveineuse dans l'oreille (*photo à gauche*) et la cuisse (*photo à droite*) du lapin (Originale).

b.- L'Euthanasie et préparation des substrats nutritifs

Les lapins ont été abattus par euthanasie avec un coup précis assommant l'animal porté sur la région occipitale (Veterinärwesen, 1993), et mis au congélateur à -5° C. (La morgue). Les abats ont été éliminés selon la procédure interne de gestion des déchets de l'INCC. Le lendemain la peau des lapins a été enlevée et la viande découpée en 3 morceaux (thorax, abdomen et cuisses) puis mise dans des boîtes étiquetées (Annexe I.6.b (A)). Cette opération a été réalisée dans la salle d'autopsie de l'INCC.

c.- La stimulation des pontes

- *Calliphora vicina*

Une cuisse était prise de chaque lapin de différentes doses (Annexe I.6.b (B)), déposée chacune dans sa boîte d'incubation respective après avoir été préparée auparavant (Annexe III.3) et transférée dans les boîtes d'élevage de *C. vicina* (08 femelles par boîte),

(Annexe I.6.d), pour être utilisée comme substrat nutritif et d'oviposition, Les boîtes ont été placées ensuite près des fenêtres (éclairage naturelle) (Annexe I.6.f). Les autres morceaux de lapin ont été conservés au réfrigérateur à - 5° C. (Annexe I.6.c). Les boîtes ont été surveillées de près et dès que les femelles ont déposées leurs œufs (Annexe I.7), les boîtes d'incubation ont été retirées, étiquetées et placées à l'incubateur à 26° C. + Humidité relative de 70 % et un éclairage artificiel pendant 08 heures par jour (Annexe I.6.g).



Figure 20 : Boîte d'élevage de *C. vicina* (Originale).

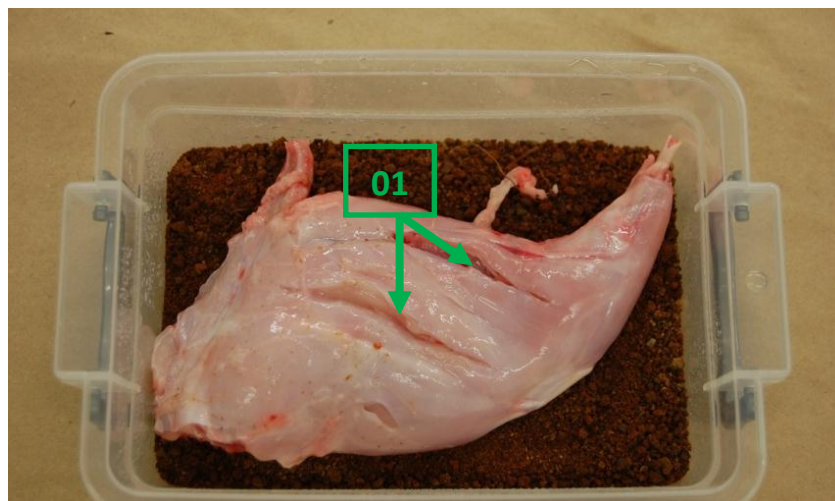


Figure 21 : Viande légèrement découpé (01) pour facilité aux femelles le dépôt des œufs (Originale).

- *Lucilia sericata*

La même procédure a été suivie pour *L. sericata* en ce qui concerne la stimulation des pontes, dont le substrat a été pris des réserves conservées auparavant (Annexe I.6.c).

- *Chrysomya albiceps*

La même procédure établie préalablement pour les deux premières espèces a été suivie pour celle-ci (Annexe I.6.e). La stimulation des pontes de *C. albiceps* n'a pas donné de résultat tout au long des deux semaines. Le processus a été annulé suite à la mort de l'espèce et le temps restreint.

- ❖ **Phase II** : Procéder aux mesures des larves et à l'observation de leur taux de croissance à travers différents stades de leur développement.

A.- L'échantillonnage

Il existe toujours une difficulté pour spécifier la taille optimale d'un échantillon. Pour de nombreuses expériences de laboratoire de base, les tailles d'échantillons de moins de 10 sont communes (Drummer, 2006). Puisque la ponte obtenue est d'environ 150 œufs, 10% de la population a été choisie pour l'échantillonnage établi sur les deux espèces en suivant le plan d'échantillonnage réalisé dans les tableaux ci-dessous. Chaque larve a été prise puis tuée à l'eau chaude environ (>80° C.) (Amendt et al., 2007) sans être remise en culture (Annexe I.8), cette méthode nous facilite de mesurer les larves.

Des échantillons de larves allant de 15 jusqu'à 08 individus de chaque dose ont été pris, analysés morphologiquement en déterminant chaque stade larvaire (Annexe III.2), puis mesurés par la longueur de chaque larve pendant ces différents stades de développements (L1, L2, L3, pupes). Chaque échantillon a été stocké à -5° C. jusqu'à ce que la période d'échantillonnage se termine, puis soumis à l'analyse toxicologique pour la détection du Paracétamol. Le temps de la nymphose ainsi que le temps de l'éclosion ont été enregistrés.

A1.- Plan d'échantillonnage de larves et de pupes de *C. vicina*

Le plan d'échantillonnage suivi lors des prélèvements de larves et de pupes de *C. vicina* est présenté dans les tableaux **03, 04 et 05**.

Tableau 3 : Echantillonnage de larves et de pupes du "Témoin" (Dose 00) de *C. vicina*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
10/04/2015	24	L1	/	/	/
	48	L2	X	/	15
	72	L2	/	/	/
	96	L3	X	X	14
	120	L3	/	/	/
	144	L3	X	X	12
	168	Pupe	/	/	/
	192	Pupe	X	X	11

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

Tableau 4 : Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 01 de *C. vicina*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
11/04/2015	24	L1	/	/	/
	48	L2	X	/	15
	72	L2	/	/	/
	96	L3	X	X	14
	120	L3	/	/	/
	144	L3	X	X	12
	168	Pupe	/	/	/
	192	Pupe	X	X	11

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

Tableau 5 : Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 02 et la Dose 03 de *C. vicina*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
10/04/2015	24	L1	/	/	/
	48	L2	X	/	15
	72	L2	/	/	/
	96	L3	X	X	14
	120	L3	/	/	/
	144	L3	X	X	12
	168	Pupe	/	/	/
	192	Pupe	X	X	11

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

A2.- Plan d'échantillonnage des larves et des pupes de *L. sericata*

Le plan d'échantillonnage suivi lors des prélèvements de larves et de pupes de *L. sericata* est présenté dans les tableaux **06**, **07** et **08**.

Tableau 6 : Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 0 (Témoin) de *L. sericata*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
01/05/2015	24	L1	X	/	15
	48	L2	X	/	14
	72	L3	X	X	12
	96	L3	X	X	11
	120	L3	X	X	10
	144	Pupe	X	X	09
	168	/	/	/	/

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

Tableau 7 : Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 01 et Dose 02 de *L. sericata*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
30/04/2015	24	L1	X	/	15
	48	L2	X	/	14
	72	L2	X	/	12
	96	L3	X	X	11
	120	L3	X	X	10
	144	L3	X	X	09
	168	Pupe	X	X	08

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

Tableau 8 : Echantillonnage de larves et de pupes de la Dose 03 de *L. sericata*.

Date de ponte	Temps écoulé depuis la ponte (h)	Stade du développement	Prise des mesures	Ech. pour analyse toxicologique	Nb. Individus par dose
02/05/2015	24	L1	X	/	15
	48	L2	X	/	14
	72	L3	X	X	12
	96	L3	X	X	11
	120	L3	X	X	10
	144	Pupe	X	X	09
	168	/	/	/	/

/ : Echantillonnage non pris; X : Echantillonnage; h : heure; Ech. : Echantillonnage; Nb. : Nombre

B.- Les mesures de larves et de pupes

Les mesures de la taille des larves pour *C. vicina* ont été prises chaque 48h, à compté du jour de la ponte. Trois mesures ont été prises (48h, 96h, 144h) avant que les larves entrent dans la phase pupale, dont une seule mesure a été prise au début de cette phase (192h). Tandis que les mesures pour *L. sericata* ont été prises chaque 24h depuis la ponte, dont 07 mesures ont été prises jusqu'au stade pupale (24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168h).

Les premières mesures du premier stade larvaire L1 ont été réalisées avec un logiciel « ZEN 2012 » (Fig. 22) qui nous a permis de mesurer la taille des larves à travers le stéréomicroscope (Annexe I.3.a), tandis que les mesures des autres stades larvaires (L2, L3, Pupe)

ont été réalisées avec le pied à coulisse digital (Annexe I.4.e), vu que leur taille ne permet pas d'être mesurer avec ce même logiciel.

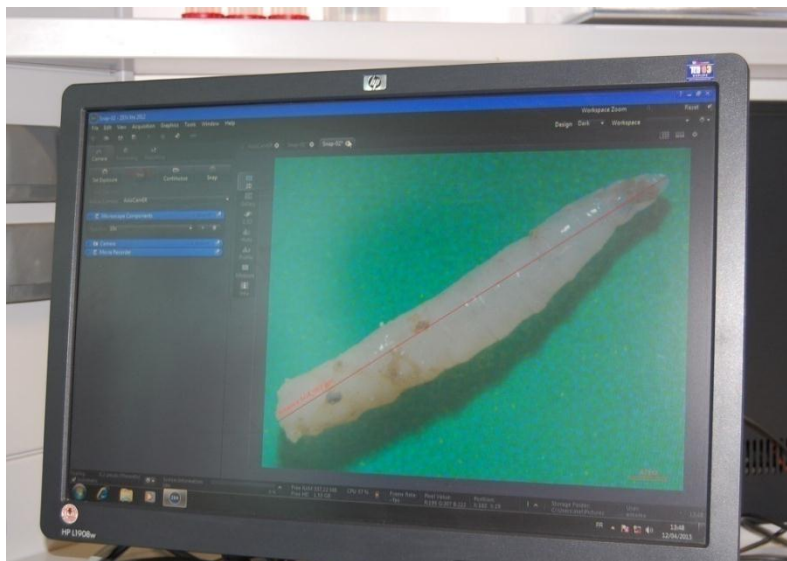


Figure 22 : Le logiciel de mesure des premiers stades larvaires (L1) (Originale).

2.3.3.- Test entomotoxicologique

Consiste à la détection du paracétamol dans les larves à différentes périodes de leur développement. La procédure analytique choisie est la Chromatographie en phase gazeuse - Spectrométrie de masse (GC / MS) ; réalisée par un personnel qualifié du laboratoire de Toxicologie de l'INCC/GN.

2.3.3.1.- Méthodes d'analyse entomotoxicologique

a) Matériel mis en œuvre

Un chromatographe TRACE GC ULTRA THERMO équipé d'une colonne 5MS (longueur 30 m, diamètre intérieur 0,25 mm et épaisseur du film 0,25 μm), couplé à spectromètre de masse D.S.QII THERMO (Annexe I.3.c).

b) Préparation de l'échantillon

Les échantillons obtenus de la première phase de l'étude ont été préparés pour l'analyse toxicologique, chaque échantillon a été broyé à l'aide d'une tige métallique propre dans son tube de prélèvement, puis dilué dans l'eau distillée. L'extraction a été faite comme suit ;

- . Préparation de la solution (R1): faire dissoudre 20 g du Sulfate de Sodium pour analyse (Na_2SO_4) dans 50ml H_2O ultra pure.
- . Préparation du solvant d'extraction (R2) : Diéthyléther ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) / Acétate de d'éthyle ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) (50 /50) (v/v).
- . Préparation de la solution NaOH 1M (R3): Peser 40mg NaOH et dissoudre dans 40 ml H_2O ultra pure.
- . Extraction dans des tubes à centrifuger (15ml) en polypropylène : 2.5 ml du milieu à analyser + 2ml de R1 + 5 ml de R2.
- . Mélanger les tubes pendant 15 min avec le mélangeur rotateur.
- . Centrifuger les tubes pendant 10 min à 3000 tr/min à 22°C.
- . Récupérer la phase organique dans un tube à hémolyse en verre, mettre sous flux d'azote (Liebisch Labortechnik) à 60o jusqu'à évaporation à moitié.
- . Eliminer la couche qui se trouve entre les deux phases, extraire la phase aqueuse une deuxième fois dans un tube à centrifuger (15mL) en polypropylène : ajouter 2 mL de R1+ 5 mL de R2+ 500 μL de R3.
- . Mélanger les tubes pendant 15 min avec le mélangeur rotateur.
- . Centrifuger les tubes 10 min à 3000tr/min.
- . Récupérer la phase organique dans le tube à hémolyse en verre, évaporé à moitié et continuer jusqu'à évaporation total.
- . Reprendre le résidu à sec avec 100 μl de méthanol qualité HPLC.
- . Injecter 1 μl dans le chromatographe et analyser selon la méthode appropriée.

c) Paramètre du GC/MS

Les échantillons on été analyser sous les paramètres suivants ; la température est maintenue à 50° C. pendant une minute, programmé ensuite à 280° C. avec une vitesse de chauffe de 10° C. /min ; la température est maintenue pendant 11 min. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert sont respectivement de 230° C. et 280° C. L'injection est effectuée en mode split (1/50) et le volume d'injection est fixé à 1 μl . L'hélium qui est de pureté N60, est utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 1 ml/min. Le spectromètre de masse opère en mode impacte électronique (EI), dont la température de la source est fixée à 230° C. Les spectres de masse sont enregistré au standard de 70eV dans la gamme de m/z 50-650 et ceci en mode Full Scan.

d) Le Chromatogramme

Les avantages d'utiliser des larves à la place des tissus de l'organisme peuvent être vus en Chromatographie (Amendt *et al.*, 2010). Les Chromatogrammes obtenus à partir d'extraits de larves présentent des pics endogènes moins contaminants que les chromatogrammes à partir d'extraits du corps humain (Kintz *et al.*, 1990). Ceci est particulièrement utile si le matériel échantillonné est décomposé, et les insectes sont assez facilement recueillis et élevés dans le laboratoire.

Pour la détection de la présence du Paracétamol dans les différents échantillons de larves collectés à partir des tissus de lapin (viande) contenant les différentes doses, un chromatogramme identique à celui du standard du paracétamol (Fig. 23) doit s'afficher sur l'écran de l'ordinateur associé à la GC/MS, après l'analyse.

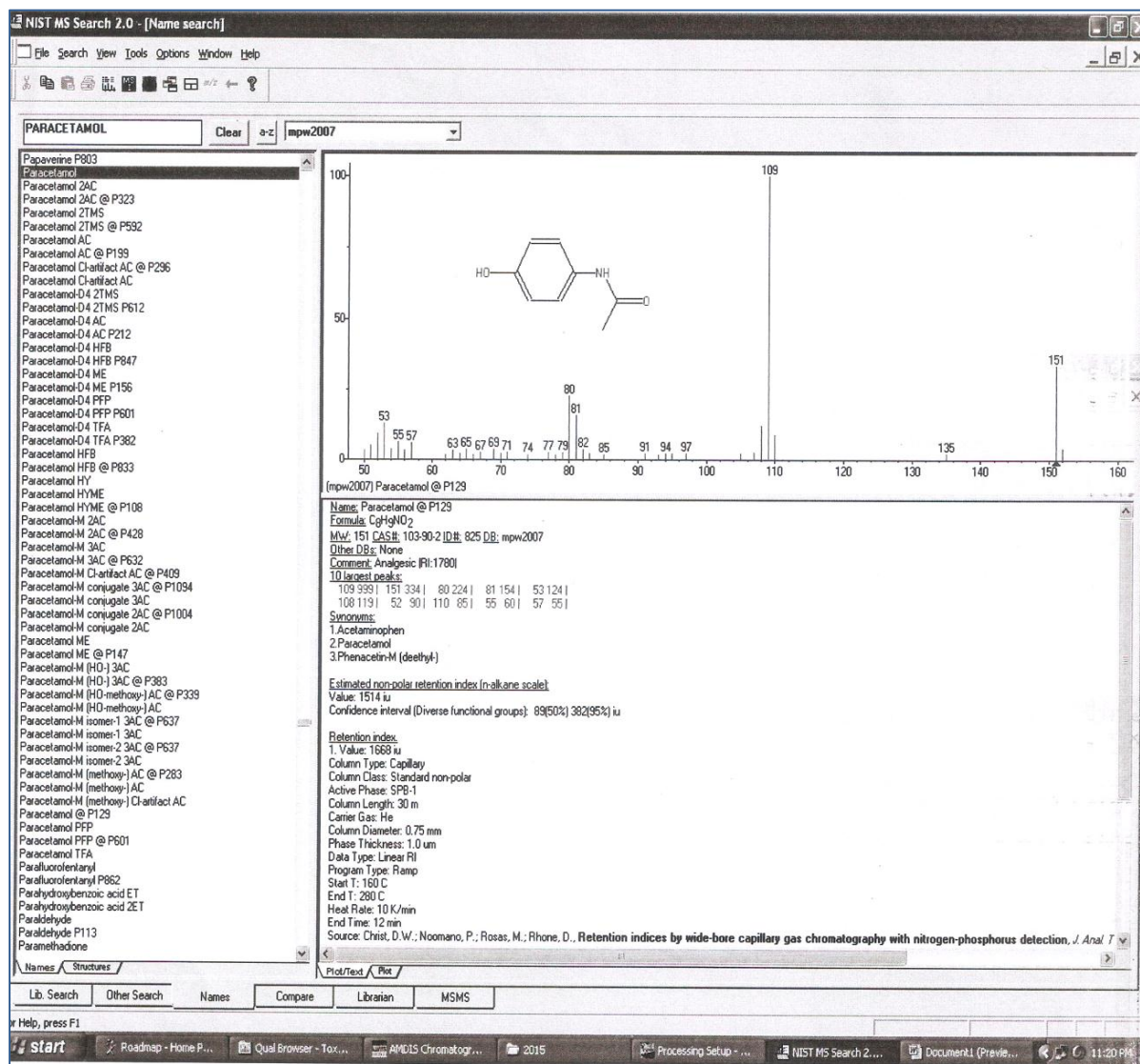


Figure 23 : Le chromatogramme standard du paracétamol (Originale).

Dans ce chapitre seront présentés les résultats de l'étude de l'effet du paracétamol sur le taux de développement de deux espèces de Diptères, Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*), l'éventuelle détection et présence de ce xénobiotique ou son métabolite dans les larves de ces mêmes espèces par GC-MS et l'influence du paracétamol sur l'estimation de l'intervalle post-mortem (PMI).

3.1.- Résultats des mesures de tailles des deux espèces de Diptères dès l'éclosion jusqu'au stade pupale en fonction des doses de paracétamol

Les mesures prises au cours de cette étude ont concerné les deux espèces de Calliphoridae sur les quatre doses de paracétamol utilisées ; chaque espèce a été mesurée à part, en suivant le plan d'échantillonnage mentionné préalablement. Les résultats obtenus ont été enregistrés sur les tableaux (Annexe II.3) dès l'éclosion des œufs jusqu'au stade pupale.

3.1.1.- Les mesures prises concernant l'espèce *L. sericata*

3.1.1.1.- Après 24 heures d'incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur les larves de *L. sericata* après 24 h d'incubation

Tableau 9 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 15 larves après 24 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	1,21	3,19	4,42	3,15
Valeurs maximales	3,51	5,08	5,75	6,03
Moyenne + Ecart type	2,75 ± 0,64	4,16 ± 0,58	5,33 ± 0,38	5,52 ± 0,73

Les résultats des mesures des larves de *L. sericata* après 24h depuis la ponte, (Tab. 9) démontrent une variation « importante » de la taille des larves nourries sur le même substrat contenant différentes doses de paracétamol ; On observe que la taille des larves chez le témoin varie entre 1,21 et 3,51mm avec une moyenne égale à 2,75 mm, ce qui est nettement inférieur aux tailles des larves observées chez les doses 02 et 03 avec des moyennes de 5,33 et 5,52 mm respectivement; ce qui donne une différence de 2,58 mm du témoin par rapport à la dose

02 et de 2,77 mm par rapport à la dose 03 (Fig. 24). Tandis que la différence est de 1,41 mm entre le témoin et la dose 01 (moy. = 4,16 mm).

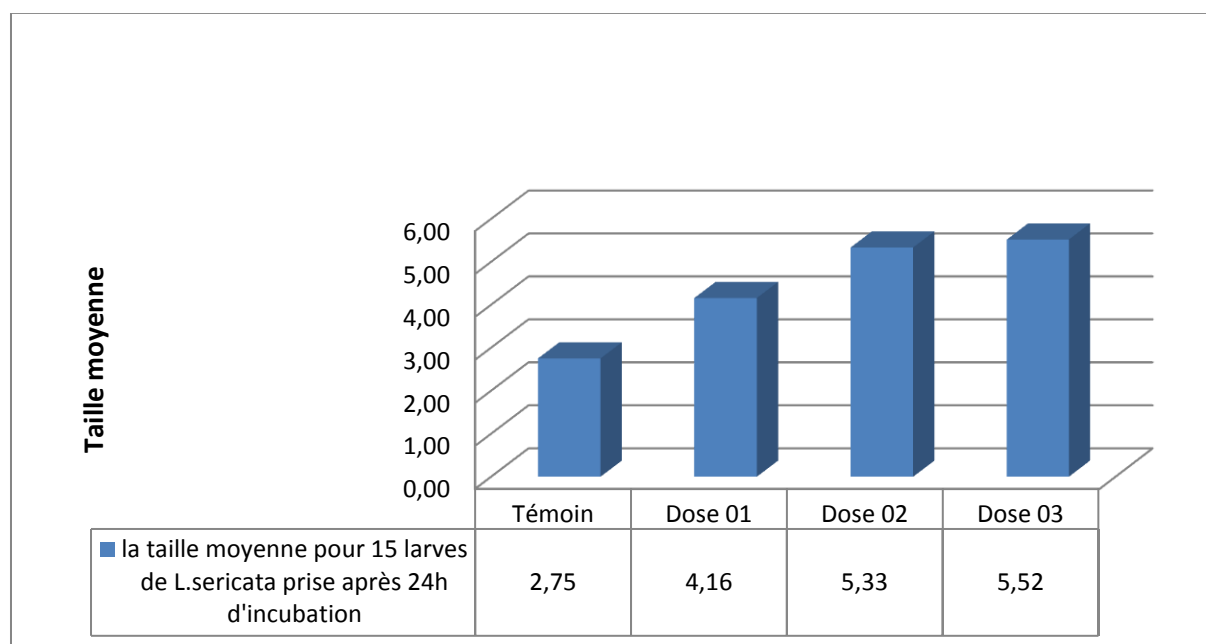


Figure 24 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 24 heures d'incubation

3.1.1.2.- Après 48 heures d'incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur *L. sericata* après 48 h d'incubation.

Tableau 10 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 14 larves après 48 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	9,64	10,82	11,65	9,99
Valeurs maximales	11,43	13,5	13,61	13,28
Moyenne + Ecart type	10,62 ± 0,57	11,97 ± 0,72	12,58 ± 0,55	11,50 ± 0,92

Après 48h d'incubation, les résultats des mesures (Tab. 10), démontrent une « légère » variation de la taille des larves entre le témoin et les différentes doses, dont la taille des larves du témoin varie entre 9,64 et 11,43 mm (moy. = 10,62 mm). La plus grande différence des mesures de taille sont observées entre le témoin et la dose 02 avec 1,96 mm, et entre le témoin

et la dose 01 avec 1,35 mm (Fig. 25). Elle demeure faible entre les tailles des larves du témoin et la dose 03 (0,88 mm).

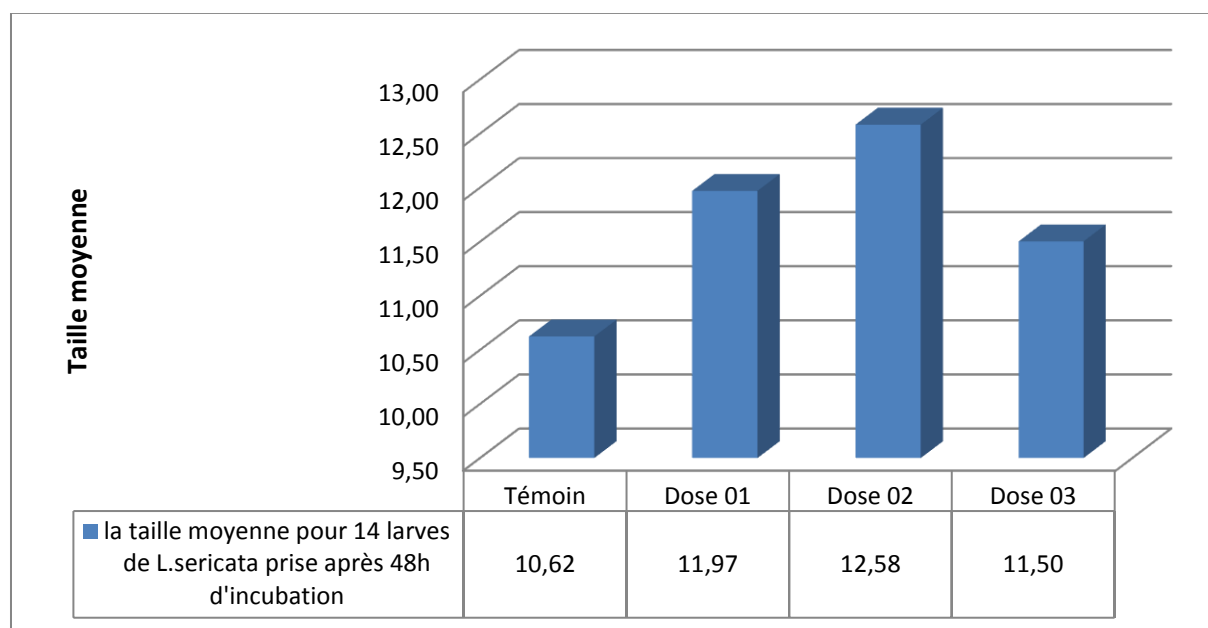


Figure 25 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 48 heures d’incubation

3.1.1.3.- Après 72 heures d’incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur *L. sericata* après 72 h d’incubation

Tableau 11 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 12 larves après 48 h

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	12,92	14,43	13,71	13,52
Valeurs maximales	15,06	16,66	15,63	14,89
Moyenne + Ecart type	13,97 ± 0,55	15,32 ± 0,70	14,56 ± 0,60	13,99 ± 0,41

Après 72h d’incubation, la taille des larves du témoin varie entre 12,92 et 15,06 mm (moy. = 13,97 mm). On observant les résultats on constate que la différence de taille entre le témoin et la dose 03, est presque nulle (0,02 mm), et entre le témoin et la dose 02, est moindre (0,59 mm). En ce qui concerne la différence de taille entre le témoin et la dose 01 est plus au moins élevée par rapport aux autres doses avec 1,35mm (Tab. 11 ; Fig. 26).

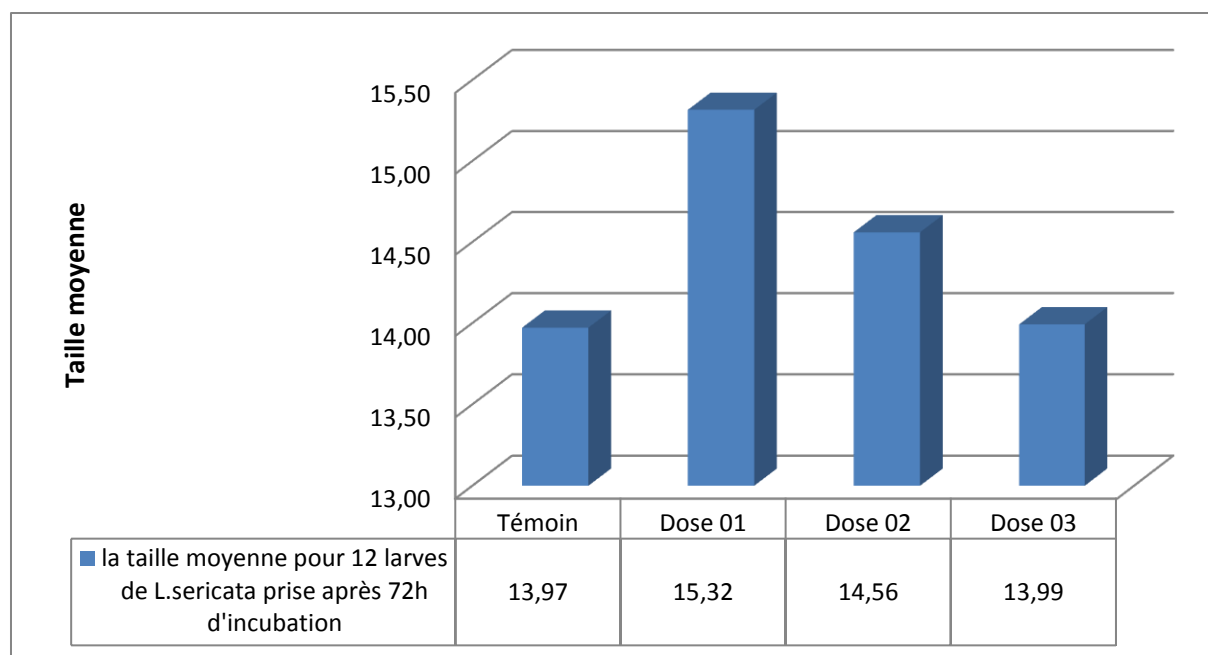


Figure 26 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 72 heures d’incubation

3.1.1.4.- Après 96 heures d’incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur *L. sericata* après 96 h d’incubation.

Tableau 12 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 11 larves après 96 h d’incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	14,13	13,37	11,61	11,56
Valeurs maximales	14,89	15,26	14,14	12,62
Moyenne + Ecart type	14,42 ± 0,25	14,18 ± 0,70	13,03 ± 0,93	12,05 ± 0,36

Après 96h d’incubation, les résultats des mesures démontrent une « diminution » de la taille des larves des trois doses par rapport au témoin (Fig. 27). On remarque une faible différence de 0,24mm entre le témoin qui affiche une moyenne de 14,42 mm et la dose 01 avec une moyenne de 14,18 mm, et une différence plus au moins élevée de 1,39 mm entre le témoin et la dose 02 (13,03 mm) (Tab. 12). Tandis que pour la dose 03 qui est d’une moyenne de 12,05mm, on observe une grande différence de taille de 2,37mm entre cette même dose et le témoin.

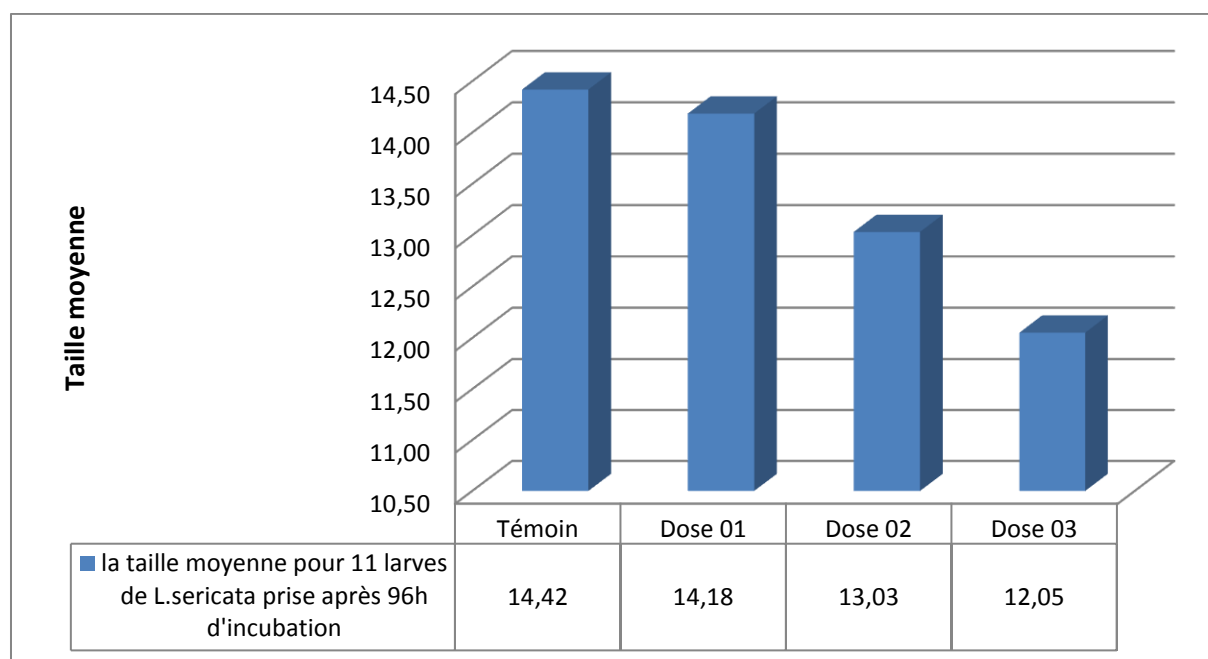


Figure 27 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 96 heures d’incubation

3.1.1.5.- Après 120 heures d’incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur *L. sericata* après 120 h d’incubation.

Tableau 13 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 10 larves après 120 h

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	13,50	14,07	13,12	11,60
Valeurs maximales	14,43	14,98	13,95	12,58
Moyenne + Ecart type	14,00 ± 0,32	14,49 ± 0,30	13,51 ± 0,27	11,92 ± 0,31

Après 120h d’incubation, le témoin affiche une moyenne de 14,00 mm (Tab. 13). On observe que la dose 03 continue a diminué avec une moyenne de 11,92 mm d’où la différence entre elle et le témoin est de 2,08 mm. Tandis que pour les doses 01 et 02, une « légère » augmentation de taille des larves est observée avec une différence de 0,49mm entre ces doses et le témoin (Fig. 28).

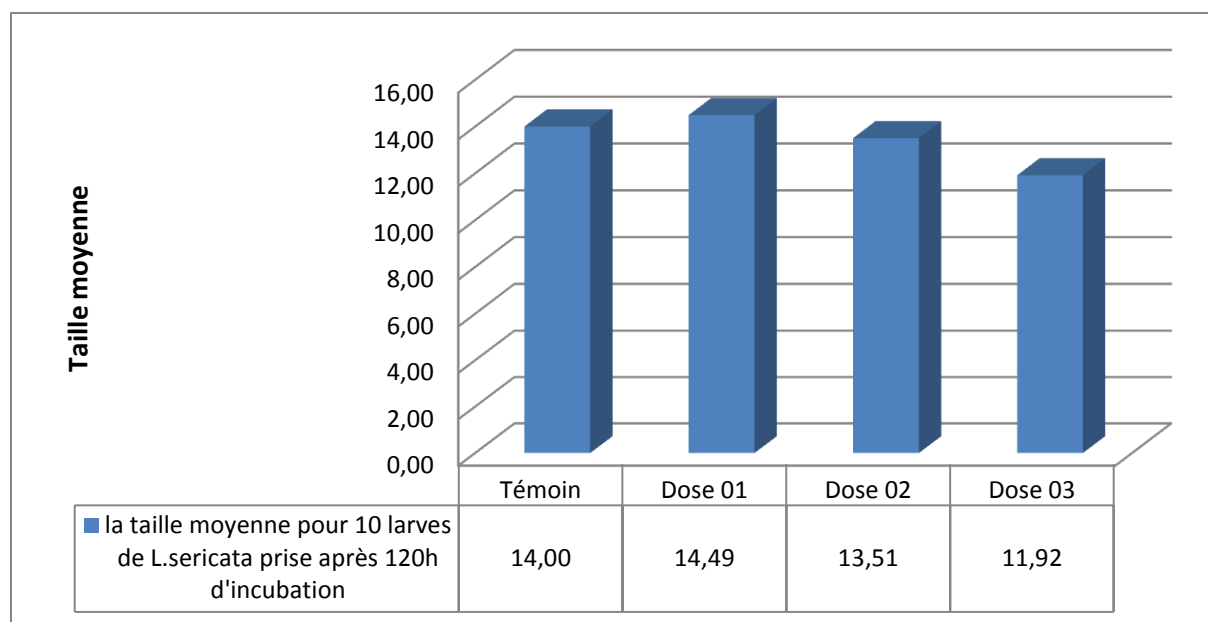


Figure 28 – Valeurs moyenne entre différentes doses et témoin pour 10 larves après 120 heures d'incubation

3.1.1.6.- Après 144 heures d'incubation

Dans le tableau 14 les mesures prises sur *L. sericata* après 144 h d'incubation seront développées.

Tableau 14 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 09 larves après 144 h

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	Pupe	13,49	12,71	Pupe
Valeurs maximales	Pupe	14,37	13,53	Pupe
Moyenne + Ecart type	/	13,97 ± 0,25	13,27 ± 0,24	/

Après 144h d'incubation, les larves du témoin et de la dose 03 sont entrées dans le stade pupale, des mesures de taille ont été effectuées uniquement sur les larves des dose 01 et dose 02 (Tab. 14 ; Fig. 29). La taille des larves de la dose 01 a été d'une moyenne de 13,97 mm, valeur très proche de celle enregistrée sur les larves de la dose 02 qui était de 13,27 mm. On observe de ces résultats que la taille moyenne des larves des deux doses a commencé à diminuer.

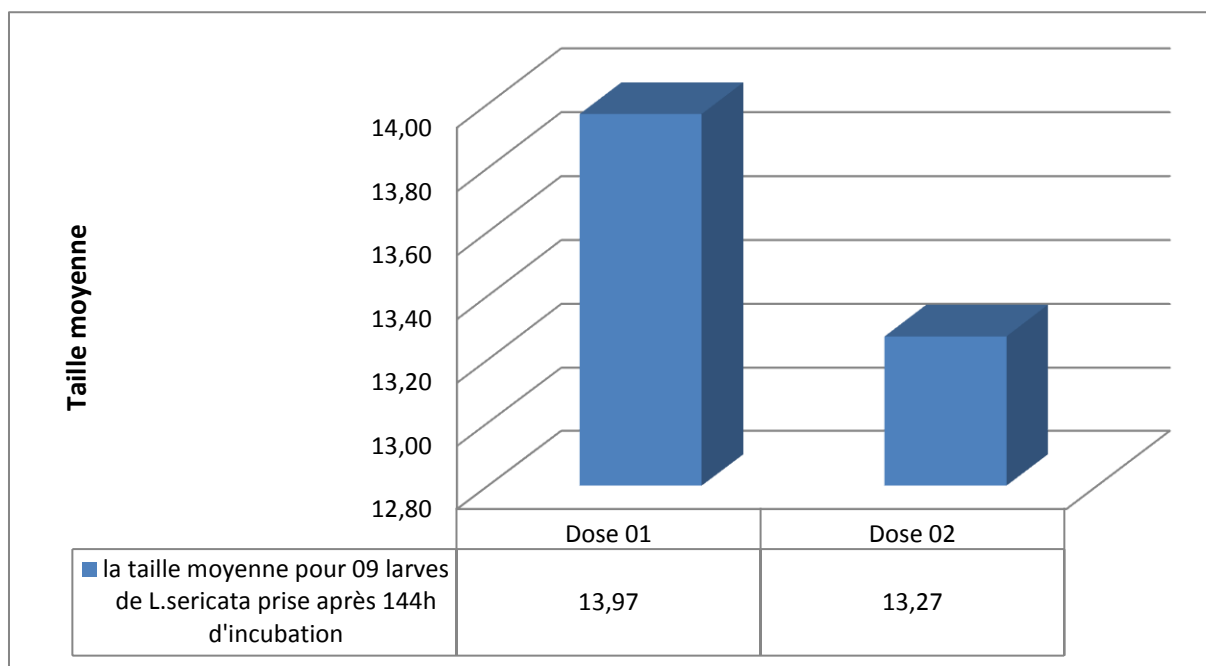


Figure 29 – Différence de moyenne entre dose 01 et 02 et témoin pour 09 larves après 144 heures d'incubation

3.1.1.7.- Après 168 heures d'incubation

Dans le tableau 15 les mesures prises sur *L. sericata* après 168 h d'incubation sont présentés.

Tableau 15 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 08 pupes après 168 h

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	7,12	6,90	7,68	6,97
Valeurs maximales	7,60	7,12	7,95	7,40
Moyenne + Ecart type	7,28 ± 0,18	7,00 ± 0,07	7,83 ± 0,09	7,18 ± 0,15

Après 168 h d'incubation, tous les individus nourries sur les différentes doses sont entrés dans la phase pupale, il est à noter que les larves nourries sur le substrat contenant la dose 03 et celles nourries sur le substrat témoin, ont atteint la phase pupale 24h avant les individus nourris sur la dose 01 et 02. Des mesures de la taille des pupes on été effectuées le même jour, vu que les pupes ne changent pas de taille. Les résultats cités dans le tableau 15, démontrent que les valeurs des tailles moyennes de l'ensemble des mesures se rapprochent

entre elles, dont la plus grande est de 7,83 mm (larves dose 02) et la plus petite est de 7,00 mm observée chez les larves nourries sur la dose 01 (Fig. 30).

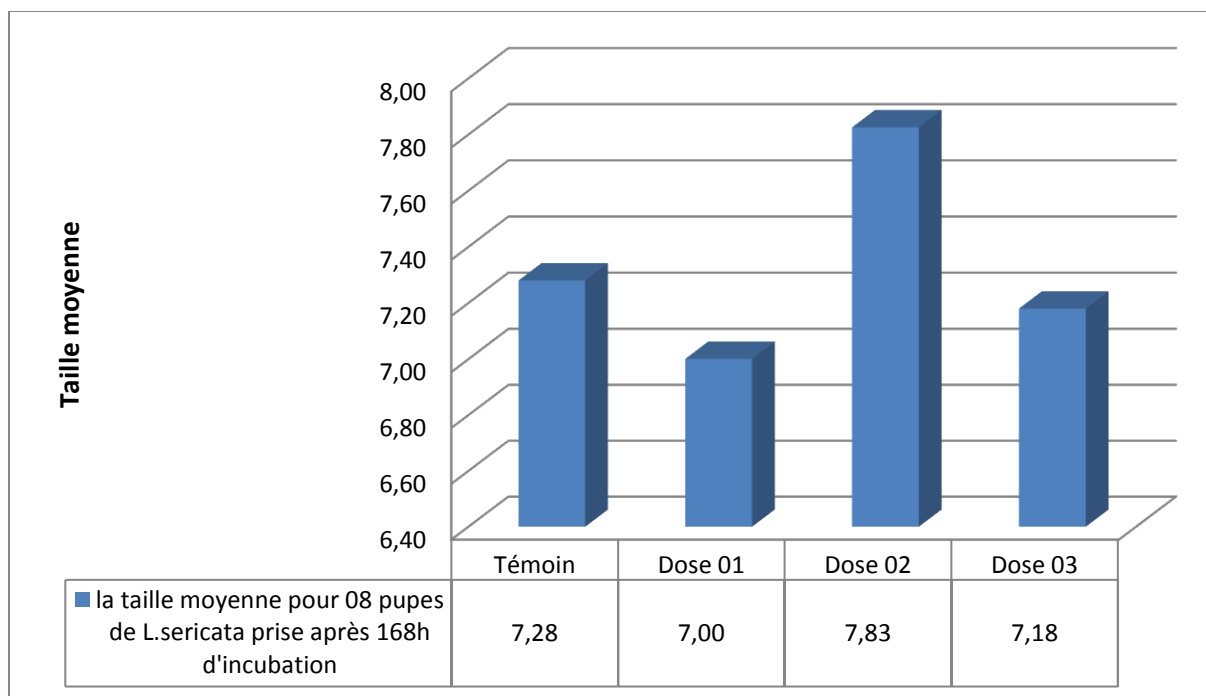


Figure 30 – Taille moyenne pour 08 pupes de *L. sericata* prise après 168 heures d'incubation

3.1.1.8.- Interprétation des résultats obtenus des différentes doses et du témoin pendant tout le cycle

D'après les figures de **24** à **30**, on observe que la dose du paracétamol dans le support nutritif n'a pas affecté les taux de développements des larves pendant les deux premiers jours, par contre dès le 3^{ème} jours, une différence significative a été observée entre les différentes doses et entre les doses et le témoin. Il est à noter que les larves témoin diffèrent significativement par rapport aux larves nourries sur les différentes doses, tout au long du cycle, avec quelques croisements entre le témoin et les différentes doses dans une période précise (Fig. 42).

3.1.1.9.- La taille moyenne de chaque dose de *L. sericata* prise pendant tout le cycle

L'évolution des tailles moyennes prises sur les doses 01, 02 et 03 et le témoin pendant tout le cycle de vie de *L. sericata* est mentionnée dans les figures **31**, **32**, et **33**.

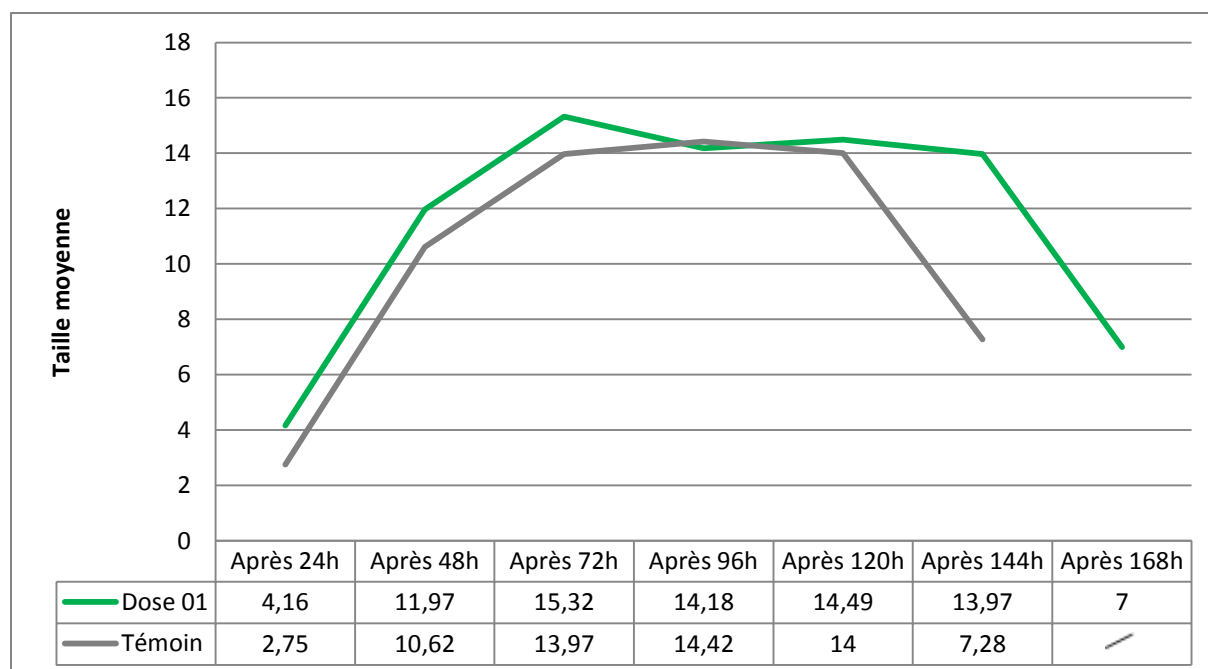


Figure 31 – L'évolution de la taille moyenne de la dose 01 par rapport au témoin

D'après la figure 31, on observe que les larves nourries sur les lapins contenant la 1^{ère} dose de paracétamol (Dose 01) ont augmentés de taille constamment pendant environ les 72 premières heures pour atteindre un pique environ de 15 mm et demi de longueur, ce qui n'est pas le cas pour les larves du témoin qui ont atteint un pique (environ 14 mm et demi) après 96 h. De 72 à 96 heures, les larves de la dose 01 ont légèrement diminuées de taille d'environ 1 mm, pour se stabiliser à ce niveau jusqu'à 144^{ème} heure. Cette augmentation de taille est naturelle vu que les larves se développent en taille et en masse pendant cette phase de leur développement (1^{er} et 2^{ème} stade) (Voir 1.2.2.1).

Une diminution constante de taille s'est produite chez les larves de la dose 01 pour atteindre un minimum de 7 mm. Par contre ce processus a été observé chez les larves du témoin en avance (vers 120h) par rapport à ceux de la Dose 01. Cette diminution de taille s'explique par la phase pré-pupale durant la quelle les larves se nourrissent moins et perdent en poids et en taille avant de former les cocons pupale (Voir 1.2.2.1).

Il est clairement observé (Fig. 31) que les larves de la dose 01 ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin avec une légère diminution de la taille des larves de la dose 01 par rapport à celles du témoin au 4^{ème} jour du développement. Ceci est due probablement à la présence du paracétamol (le paracétamol a peut être accéléré le développement des larves au début du cycle de développement puis le ralentissant légèrement vers la fin, au début de la phase pré-pupale), ce qui a prolongé le cycle pour les larves de la dose 01.

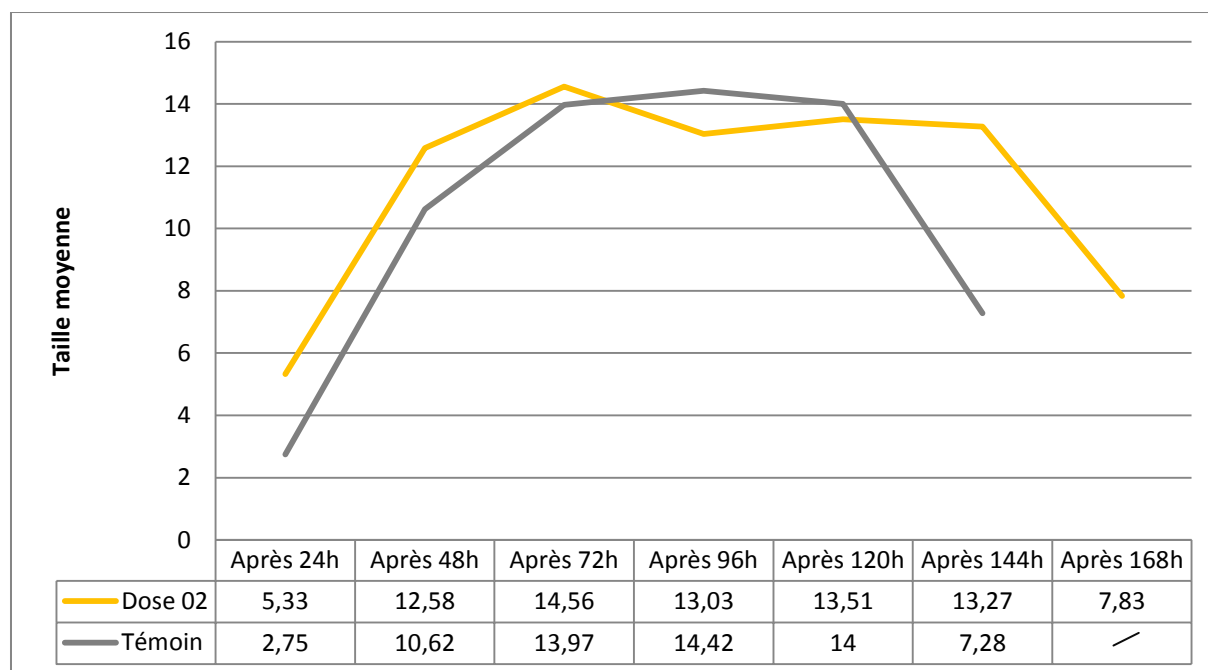


Figure 32 – L'évolution de la taille moyenne de la dose 02 par rapport au témoin

D'après la figure 32, on observe que les larves nourries sur les lapins contenant la 2^{ème} dose de paracétamol (Dose 02) ont augmentés de taille perpétuellement pendant environ les 72 premières heures pour atteindre un pique environ de 15 mm de longueur, alors que les larves du témoin ont atteint leur pique (environ 14 mm et demi) après 96 h. De 72 h à 96 h les larves de la dose 02 ont légèrement diminués de taille d'environ 1 mm, pour se stabiliser à ce niveau jusqu'à 144^{ème} heure. Une diminution constante est importante de taille s'est produite chez les larves de la dose 02 pour atteindre un minimum d'environ 7 mm. Par contre ce processus a été observé chez les larves du témoin en avance (vers 120h).

Il est clairement observé (Fig. 32), que les larves de la dose 02 ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin, avec une diminution de la taille des larves de la dose 02 par rapport au témoin au 4^{ème} jour du développement, qui est plus au moins importante à celle observée pour la dose 01 auparavant. Ce qui peut être due à la présence du paracétamol (le paracétamol a peut être accéléré le développement des larves au début du cycle de développement puis le ralentissant lentement vers la fin, au début de la phase pré-pupale), ce qui a prolongé le cycle pour les larves de la dose 02.

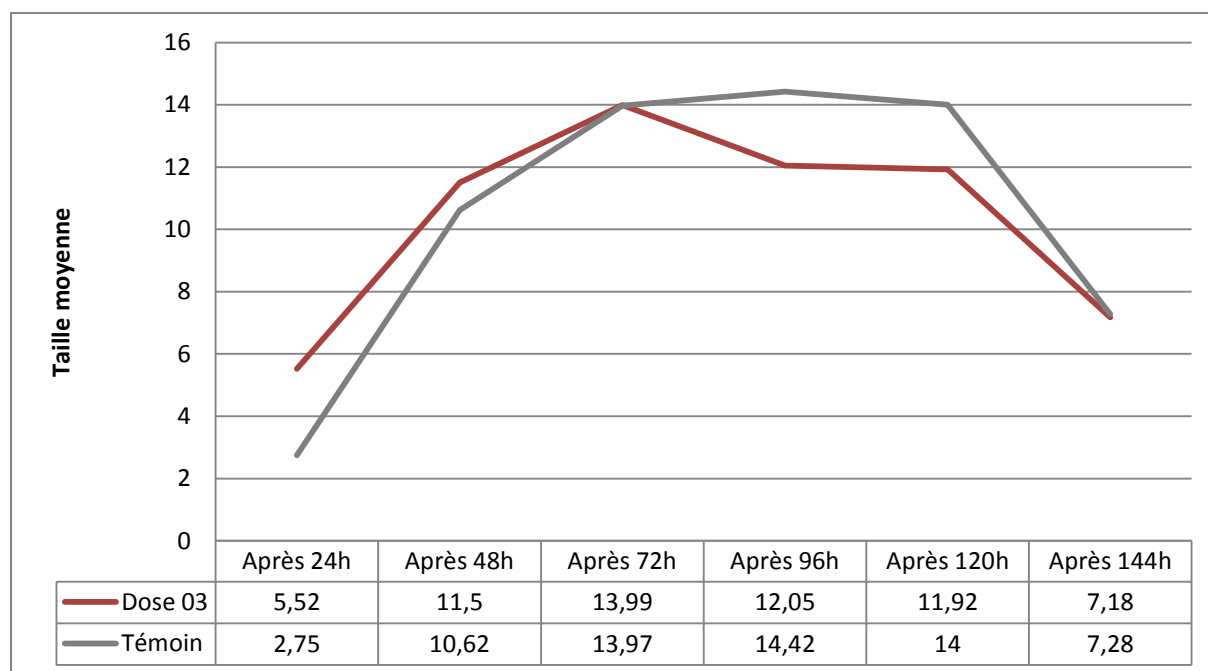


Figure 33– L'évolution de la taille moyenne de la dose 03 par rapport au témoin

D'après la figure 33, on observe que les larves nourries sur les lapins contenant la 3^{ème} dose de paracétamol (Dose 03) ont augmentés de taille constamment pendant environ les 72 premières heures pour atteindre un pique environ 14 mm de longueur. Par contre les larves du témoin ont atteint leur pique (environ 14 mm et demi) après 96 h. De 72 à 96 h les larves de la dose 03 ont significativement diminués de taille d'environ 2 mm, pour se stabiliser à ce niveau jusqu'à 120^{ème} heure. Une diminution constante est importante de taille s'est produite chez les larves de la dose 03 et celles du témoin pour atteindre un minimum d'environ 07 mm.

Il est clairement observé (Fig. 33), que les larves de la dose 03 ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin avec une diminution de la taille des larves de la dose 03 par rapport au témoin au 4^{ème} jour du développement, qui est plus importante à celle observée précédemment pour la dose 01 et 02. Cette différence de taille est peut être due à la présence du paracétamol (le paracétamol a peut être accéléré le développement des larves au début du cycle de développement puis le ralentissant rapidement vers la fin, au début de la phase pré-pupale). Les résultats obtenus avec la dose 03 ne s'alignent pas avec les résultats des deux autres doses précisément en ce qui concerne l'effet du paracétamol sur le cycle de développement des larves dans sa dernière phase.

3.1.2.- Les mesures prises concernant l'espèce *C. vicina*

3.1.2.1.- Après 48 heures d'incubation

Dans le tableau 16, les mesures prises sur les larves de *C. vicina* après 48 h d'incubation sont présentés.

Tableau 16 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 15 larves après 48 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	2,30	4,02	4,35	4,73
Valeurs maximales	3,78	5,60	5,84	6,72
Moyenne + Ecart type	2,76 ± 0,43	5,22 ± 0,58	5,25 ± 0,43	6,01 ± 0,64

Les résultats des mesures des larves de *C. vicina* après 48h depuis l'incubation, (Tab. 16) démontrent une variation « importante » de la taille des larves nourries sur le même substrat contenant différentes doses de paracétamol ; On observe que la taille des larves chez le témoin varie entre 2,30 et 3,78 mm avec une moyenne égale à 2,76 mm. Ce qui est clairement inférieur aux tailles des larves observées chez les doses 01, 02 et 03 avec des moyennes respectivement de 5,22, 5,25 et 6,01 mm ; ce qui donne une différence du témoin de 2,46 mm par rapport à la dose 01, de 2,49 mm par rapport à la dose 02 et de 3,25 mm par rapport à la dose 03 (Fig. 34).

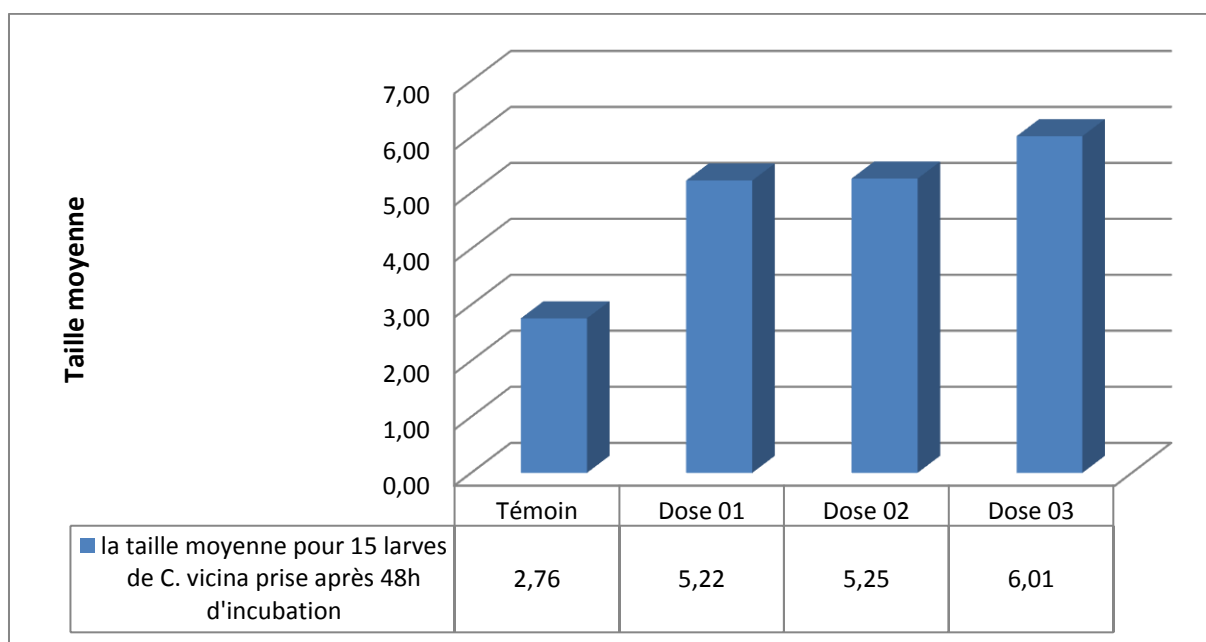


Figure 34 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 48 heures d'incubation

3.1.2.2.- Après 96 heures d'incubation

Dans le tableau 17, les mesures prises sur les larves de *C. vicina* après 96 h d'incubation sont présentés.

Tableau 17 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 14 larves après 96 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	14,72	16,92	16,58	17,37
Valeurs maximales	16,19	18,29	17,60	19,73
Moyenne + Ecart type	15,49 ± 0,42	17,64 ± 0,41	17,11 ± 0,36	18,28 ± 0,70

Après 96h d'incubation, les résultats des mesures (Tab. 17), démontrent une « grande » variation de la taille des larves par rapport au témoin et les différentes doses, dont la taille des larves du témoin varie entre 14,72 et 16,19 mm (moy. = 15,49 mm). La plus grande différence des mesures de taille est observée entre le témoin et la dose 03 avec 2,79 mm, puis entre le témoin et la dose 01 avec une différence de 2,15 mm (Fig. 35). Elle demeure importante entre les tailles des larves du témoin et de la dose 02 (1,62 mm).

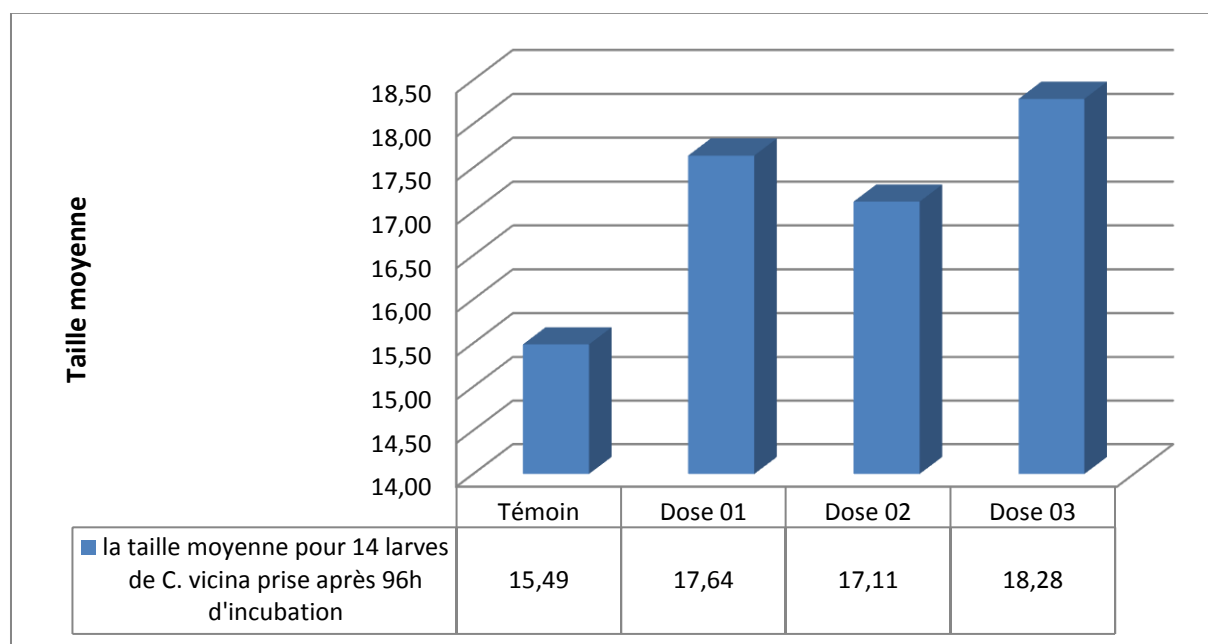


Figure 35 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 96 heures d'incubation

3.1.2.3.- Après 144 heures d'incubation

Dans le tableau 18, les mesures prises sur les larves de *C. vicina* après 144 h d'incubation sont présentés.

Tableau 18 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 12 larves après 144 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	15,08	17,25	16,08	16,07
Valeurs maximales	17,50	18,88	17,48	17,52
Moyenne + Ecart type	15,87 ± 0,72	18,24 ± 0,45	16,61 ± 0,43	16,51 ± 0,41

Après 144h d'incubation, la taille des larves du témoin varie entre 15,08 et 17,50 mm (moy. = 15,87 mm). On observant les résultats on constate que la différence de taille entre témoin et dose 03, est faible (0,64 mm), et entre le témoin et la dose 02 est un peu plus grande (0,74 mm). En ce qui concerne la différence de taille entre le témoin et la dose 01, est plus élevée par rapport au autres doses avec 2,37 mm (Tab. 18 ; Fig. 36).

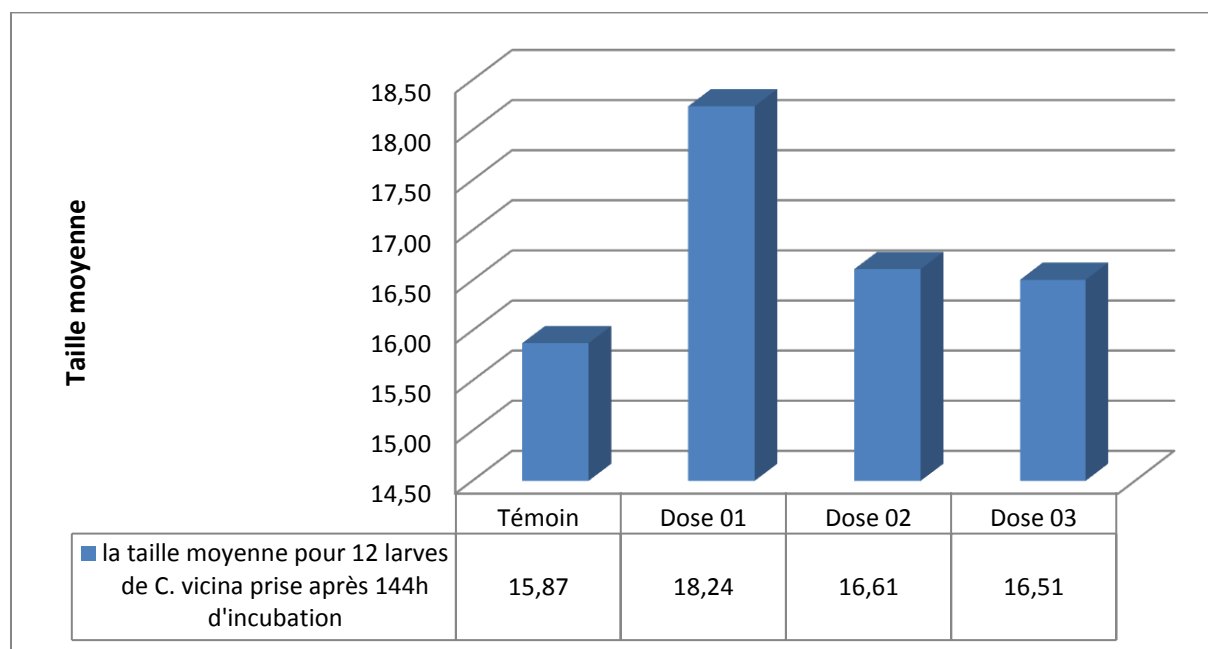


Figure 36 –Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 144 heures d'incubation

3.1.2.4.- Après 192 heures d'incubation

Dans le tableau suivant les mesures prises sur les pupes de *C. vicina* après 192 h d'incubation

Tableau 19 - Valeurs minimales et maximales des mesures prises pour 11 pupes après 192 h d'incubation

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
Valeurs minimales	9,24	9,62	9,38	9,27
Valeurs maximales	10,07	10,42	10,11	10,46
Moyenne + Ecart type	9,58 ± 0,31	9,94 ± 0,28	9,62 ± 0,24	9,73 ± 0,33

Après 192 h d'incubation, tous les individus nourris sur les différentes doses sont entrés dans la phase pupale. Les résultats du tableau 19, démontrent que les valeurs des tailles moyennes de l'ensemble des mesures se rapprochent entre elles avec une légère différence dont la plus grande est de 9,94 mm (larves dose 01) et la plus petite est de 9,58 mm observée chez les larves du témoin (Fig. 37).

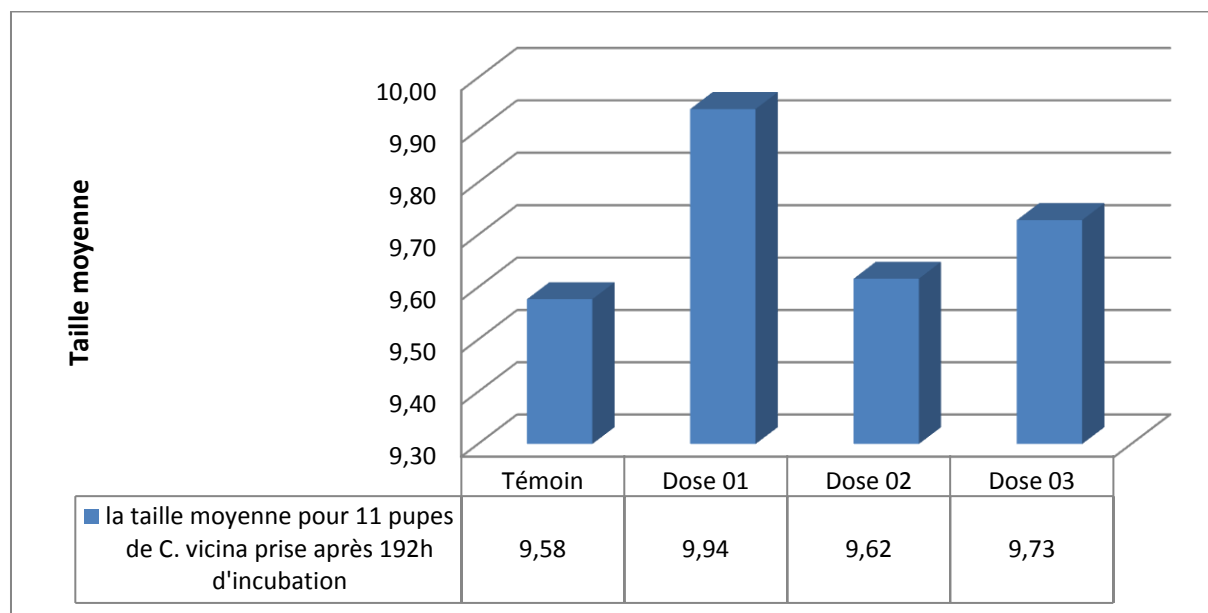


Figure 37 – Valeurs moyennes entre différentes doses et témoin après 192 heures d'incubation

3.1.2.5.- Interprétation des résultats obtenus des différentes doses et du témoin pendant tout le cycle

D'après les figures 34, 35, 36 et 37, on observe qu'il n'y a pas eu de différence significative entre les différentes doses du paracétamol pendant les deux 1^{ers} jours du développement, par contre la différence commence à accroître légèrement dès le 4^{ème} jour. A l'exception des larves nourries sur le témoin qui diffèrent significativement par rapport aux larves nourries sur les différentes doses, tout au long du cycle (Fig. 41).

3.1.2.5.- La taille moyenne de chaque dose de *C. vicina* prise pendant tout le cycle

L'évolution des tailles moyennes prises sur les doses 01, 02 et 03 et le témoin pendant tout le cycle de vie de *C. vicina* est mentionné dans les figures 38, 39, et 40.

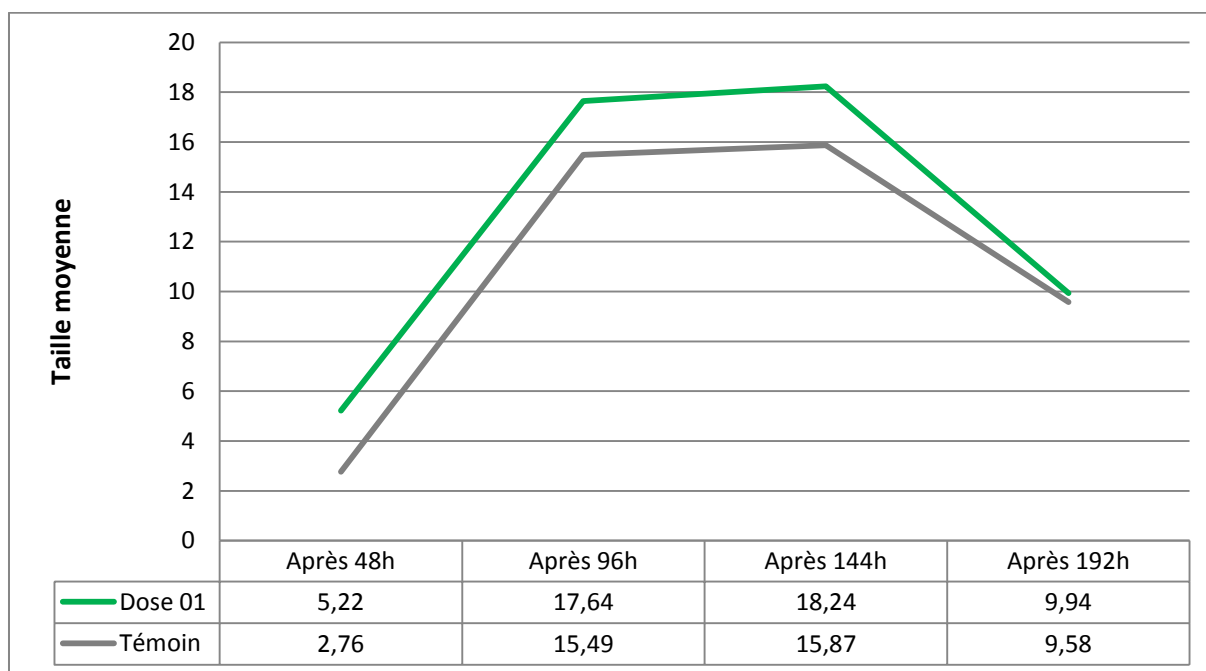


Figure 38 – L'évolution de la taille moyenne de la dose 01 par rapport au témoin

D'après la figure 38, on observe que les larves de la dose 01 et du témoin ont augmentées de taille constamment et rapidement pendant environs 96 heures, puis continue à augmenter légèrement pour atteindre un pique à la 144^{ème} heure d'environ 18 mm de longueur pour les larves de la dose 01, et environ 16 mm pour les larves du témoin. Après les 144 h, une diminution constante est importante de taille s'est produite chez les larves de la dose 01 et celles du témoin pour atteindre un minimum d'environ 09 mm et demi.

Il est clairement observé (Fig. 38), que les larves nourries sur le lapin contenant la 1^{ère} dose de paracétamol ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin. Cela est peut être due à la présence du paracétamol. Le paracétamol a peut être accéléré le développement des larves en augmentant leur tailles sans prolonger ou bien ralentir le cycle de développement, ce qui est clairement observé par la similarité des graphes de la dose 01 par rapport au témoin qui démontre qu'une ample augmentation de taille.

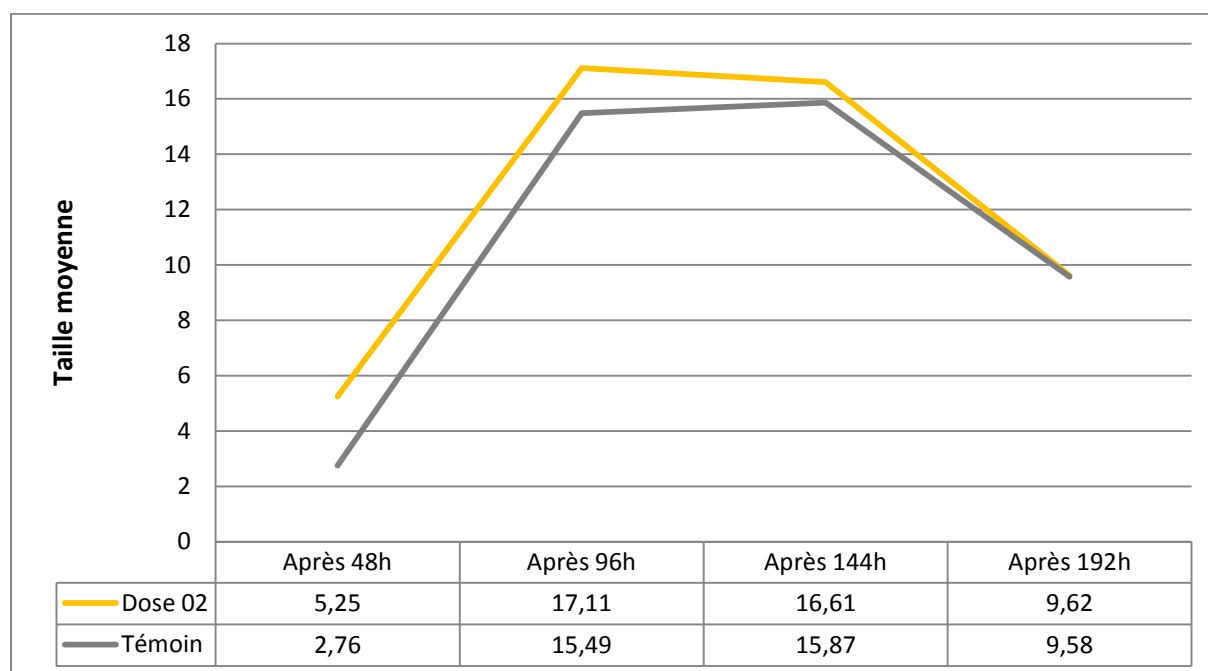


Figure 39 – L'évolution de la taille moyenne de la dose 02 par rapport au témoin

D'après la figure 39, on observe que les larves de la dose 02 et du témoin ont augmentées de taille rapidement et constamment pendant environ 96 heures pour atteindre un pique d'environ 17 mm de longueur pour les larves de la dose 02. De 96 à 144 h, les larves de la dose 02 ont légèrement diminuées de taille (0,5 mm), alors que les larves du témoin continuent à augmenter de taille légèrement pour atteindre un pique à la 144^{ème} heure d'environ 16 mm de longueur. Après 144 heures, une diminution constante est importante de taille s'est produite chez les larves de la dose 02 et celles du témoin pour atteindre un minimum d'environ 09 mm et demi.

Il est clairement observé (Fig. 39), que les larves nourries sur le lapin contenant la 2^{ème} dose de paracétamol ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin. Cela est peut être due à la présence du paracétamol. Le paracétamol a peut être accéléré le développement des larves

en augmentant leur tailles sans prolonger ou ralentir le cycle de développement, ce qui est clairement observé par la similarité des graphes de la dose 02 par rapport au témoin qui démontre une ample augmentation de taille, avec une légère différence de 96 à 144h.

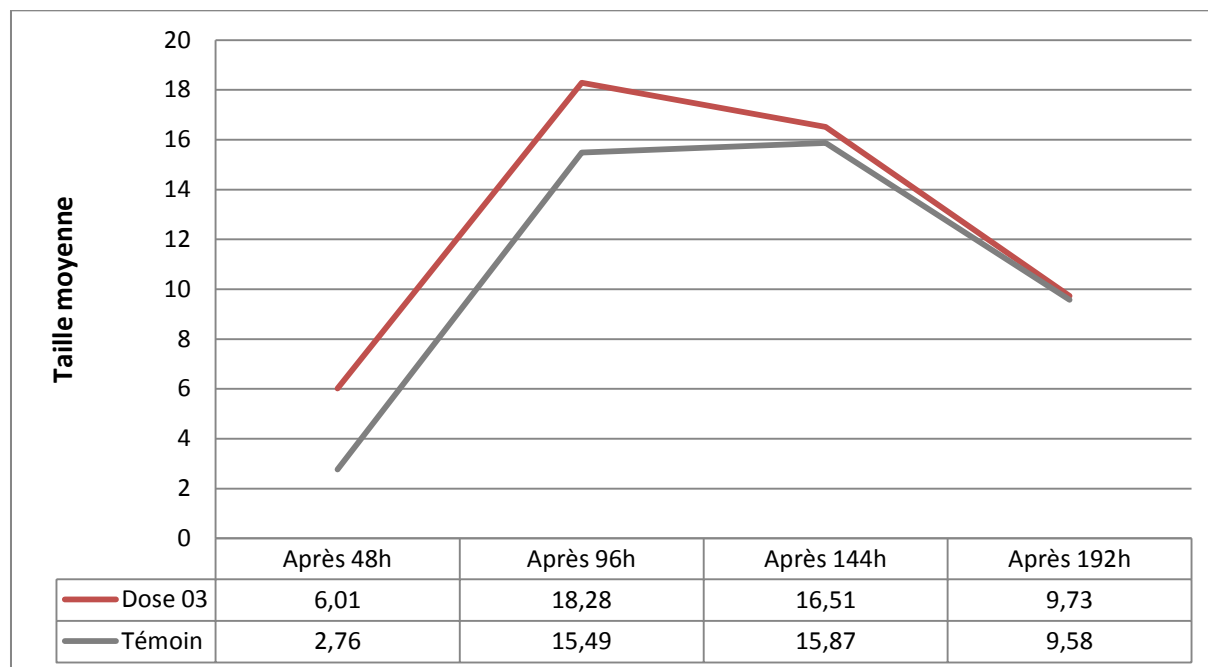


Figure 40 – L'évolution de la taille moyenne de la dose 03 par rapport au témoin

D'après la figure 40, on observe que les larves de la dose 03 et du témoin ont augmentées de taille rapidement et constamment pendant environ les 96 heures pour atteindre un pique environ de 18 mm de longueur pour les larves de la dose 03. De 96 à 144 heures, les larves de la dose 03 ont significativement diminuées de taille d'environ 2 mm de longueur, alors que les larves du témoin continuent à augmenter de taille légèrement pour atteindre un pique à la 144^{ème} heure d'environ 16 mm de longueur. Après les 144 heures, une diminution constante est importante de taille s'est produite chez les larves de la dose 03 et celles du témoin pour atteindre un minimum d'environ 09 mm et demi.

Il est clairement observé (Fig. 40), que les larves nourries sur le lapin contenant la 3^{ème} dose du paracétamol ont été toujours de taille supérieure à celle du témoin. Cela est peut être due à la présence du paracétamol. Ce dernier, a peut être accéléré le développement des larves en augmentant leur tailles sans prolonger ou ralentir le cycle de développement, ce qui est clairement observé par la similarité des graphes de la dose 03 par rapport au témoin qui démontre une ample augmentation de taille, avec une légère différence de 96h à 144h.

3.1.3.- Le calcul de l'intervalle post-mortem

Dans le tableau 20, sont présentées les données de bases pour les deux espèces de mouches étudiées.

Tableau 20 : Données de base pour les deux espèces

Paramètres	Seuil	Cumul
<i>Lucilia sericata</i>	9	207
<i>Calliphora vicina</i>	2	388

a.- *C. vicina* : le calcul de l'intervalle poste mortem (Voir 1.3.1.1) a été fait selon l'équation suivante:

$$\text{Time}_{(\text{hours})} * (\text{Temperature} - \text{Base temperature}) = \text{ADH}$$

(Gennard 2012)

Les résultats des degrés heures accumulés pour l'espèce *C. vicina* sont cités dans le tableau 21:

Tableau 21 : Les résultats du calcul des degrés heures accumulées (ADH) pour *C. vicina*

Paramètres	D0 (Témoin)	D1	D2	D3
Date de ponte	11/04/2015	12/04/2015	11/04/2015	11/04/2015
Date d'émergence	27/04/2015	28/04/2015	27/04/2015	27/04/2015
ADH	390	390,5	391	391

D'après les résultats obtenus lors du calcul des ADHs de *C. vicina* pour l'estimation de l'intervalle post-mortem des lapins injectés avec différentes doses (Tab. 21), on observe que le témoin et les différentes doses se rapprochent par rapport aux degrés heures accumulés calculés. Pour le témoin, l'ADH calculé est égale à 390, ce qui concorde avec les données du degré heures accumulées de base de l'espèce (ADH = 388), qui justifie une différence de 2° C. seulement pour le témoin, de 2,5° C. pour la dose 01 et de 3° C. pour les doses 02 et 03. Le calcul des IPMs serait proche pour ne pas dire identique.

b.- *L. sericata*: le calcul de l'intervalle poste mortem (Voir 1.3.1.1) a été fait selon l'équation suivante:

$$\text{Time}_{(\text{hours})} * (\text{Temperature} - \text{Base temperature}) = \text{ADH}$$

(Gennard 2012)

Les résultats des degrés heures accumulés pour l'espèce *L. sericata* sont cités dans le tableau 22.

Tableau 22 : Les résultats du calcul des degrés heures accumulées (ADH) pour *L. sericata*

Paramètres	D0 (Témoin)	D1	D2	D3
Date de ponte	01/05/2015	30/04/2015	30/04/2015	01/05/2015
Date d'émergence	14/05/2015	14/05/2015	14/05/2015	14/05/2015
ADH	206	225	225	206

D'après les résultats obtenus lors du calcul des ADHs de *L. sericata* pour l'estimation de l'intervalle post-mortem des lapins injectés avec les différentes doses (Tab. 22), on observe que le témoin est la dose 03 ont montré une similarité lors du calcul des degrés heures accumulés (ADH = 206), ce qui concorde parfaitement avec les données du degré heures accumulées de base de l'espèce (ADH = 207), qui justifie une différence de 1° C. seulement. Par contre, le calcul des ADHs pour les doses 01 et 02 a donné un résultat de l'ADH = 225. Cette différence entre ces doses (01 et 02) et le témoin s'explique par la prolongation du cycle qui a été observé auparavant (Fig. 31 et 32), ce qui donne une différence d'environ 18° C. est un calcul d'IPM qui est retardé de 17,54 h.

3.1.4.- L'effet du paracétamol sur le cycle de développement des deux espèces

Un deuxième domaine d'étude a été fait dans la littérature pour étudier les effets de drogues sur le développement d'importants insectes médico-légal; qui comprennent les groupes d'insectes nécrophages qui sont liés à des cadavres, les mouches de la viande (diptères: Calliphoridae) sont probablement les plus importants (Wei Yun *et al.*, 2004).

a.- *C. vicina*

L'investigation de l'effet du paracétamol sur le taux du développement de *C. vicina*, à démontré que les différentes doses mises en question de ce xénobiotique ont accélérés le développement des larves de cette espèce durant les quatre premiers jours de leur cycle de vie. Après le 4^{ème} jour, les doses 02 et 03 ont légèrement ralentie le développement des larves (Fig.41). Le calcul des ADHs de *C. vicina* (Tab. 21) démontre une similarité entre les différentes doses par rapport au témoin, ce qui donne un calcul d'IPM des différentes doses nettement proche à celui du témoin. Par ceci on conclut que le paracétamol a affecté le taux de croissance des larves en augmentant leur taille initial, sans pour autant influencer sur le cycle du développement (sans le prolonger ou bien le ralentir). Nos résultats s'accordent avec les travaux d'O'Brien et Turner (2004) effectués sur l'impact du paracétamol sur le développement des larves de *Calliphora vicina*, d'où ils ont conclu que l'ingestion du paracétamol ou de ses métabolites accélèrent légèrement les taux de croissance des larves pendant les 2-4 jours de développement. Ce qui peut générer une différence d'environ 12 heures lors de l'estimation du PMI calculé au cours de cette période, et que l'effet du paracétamol n'a pas été dépendant de la quantité de paracétamol utilisé.

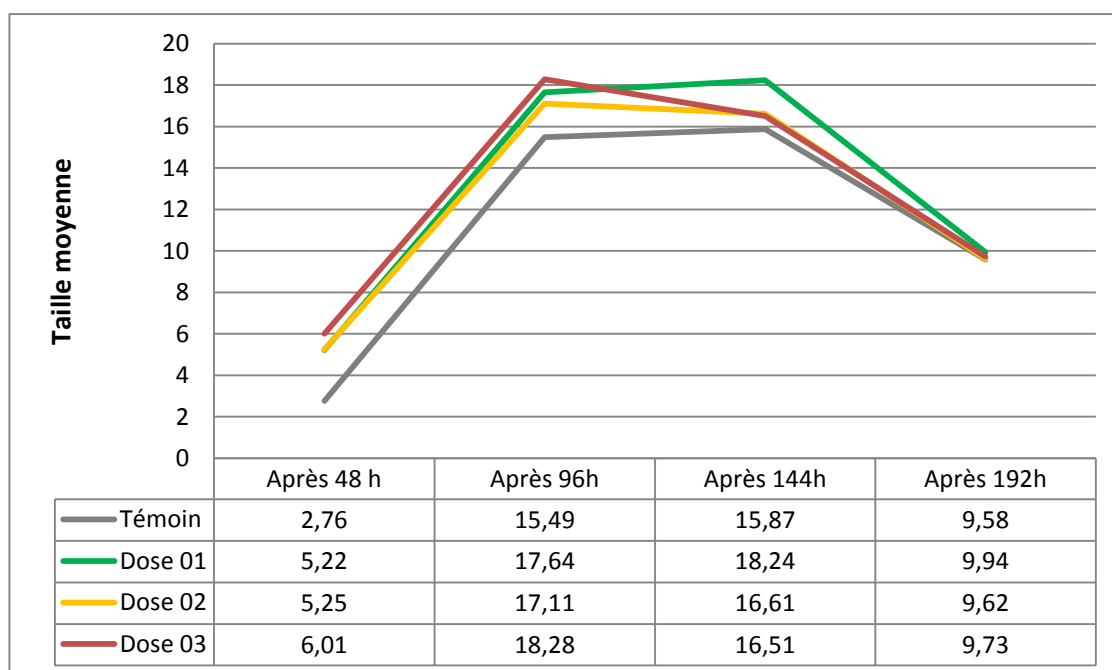


Figure 41 : La taille moyenne des différentes doses et du témoin de *C. vicina* pendant tout le cycle du développement.

b.- *L. sericata*

L'investigation de l'effet du paracétamol sur le taux du développement de *L. sericata*, a démontré que les différentes doses mises en question de ce xénobiotique ont accéléré le développement des larves de cette espèce durant les premières 24h d'incubation. Pendant les 24h suivantes (de 48h à 72h), on observe un développement moins rapide, puis une chute importante de taille durant le 3^{ème} jusqu'au 4^{ème} jour, pour qu'il se stabilise à ce seuil pendant 24h pour la dose 03 ; par contre cette stabilisation a duré 48h pour les doses 01 et 02. Il est à noter que les larves nourries sur le substrat témoin, se sont développées de la même manière que les autres doses uniquement pendant les premières 72h d'incubation, puis la taille des larves s'est stabilisée pendant les autres 48h, et finalement une chute rapide de la taille a été observée pendant les dernières 24h de leur cycle de vie (Fig. 42). Le calcul des ADHs de *L. sericata* (tab.22) démontre une similarité entre la dose 03 par rapport au témoin, ce qui donne un calcul d'IPM de la dose 03 identique à celui du témoin ; alors que pour les doses 02 et 03 on a observé après les calculs, une différence des IPMs qui est légèrement plus éloigné par rapport au témoin. Par ceci on conclut que le paracétamol a affecté le taux de croissance des larves en augmentant leur taille initiale, tout en prolongeant le cycle pour la dose 01 et 02. Les travaux réalisés sur l'effet du paracétamol sur le taux de développement de *L. sericata*, restent fragmentaires. Dès lors d'autres xénobiotiques ont été utilisés dans ce genre d'expérimentations. Par exemple, Bourel *et al.* (1999) ont étudié les effets de la morphine sur le développement de *Lucilia sericata*, leur expérimentation diffère dans la façon dont Goff *et al.*, (1991) ont mené leur travail expérimental. Bourel *et al.*, (1999) ont alimenté les larves de *Lucilia sericata* sur toute la carcasse de lapin au lieu de les amener juste sur les tissus du foie. Les résultats ont montré que le taux de croissance des larves de *Lucilia sericata* a diminué d'une manière dépendante de la dose. Ces résultats sont à l'opposé de ceux trouvés par Goff *et al.* (1991). Les résultats contrastés obtenus par Goff *et al.* (1991) et Bourel *et al.* (1999), pourraient être dus à une possible existence de différences spécifiques dans la famille pour la réponse physiologique à la présence de morphine dans le substrat. Dayananda et Kiran (2013), notent que la pharmacocinétique des médicaments chez les insectes dépend de l'espèce, le stade de développement, ainsi que sur leur activité d'alimentation.

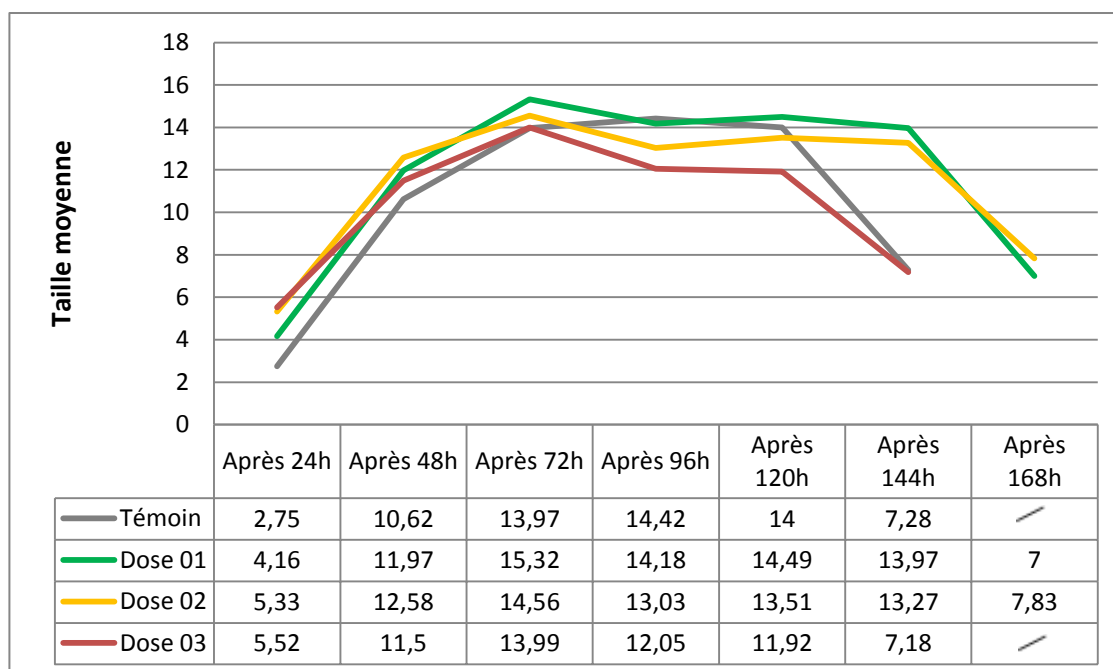


Figure 42 : La taille moyenne des différentes doses et du témoin de *L. sericata* pendant tout le cycle du développement.

3.2.- L'analyse toxicologique

Les échantillons prélevés pour l'analyse toxicologique des deux espèces (*C. vicina* et *L. sericata*) ont été envoyés au laboratoire de toxicologie de l'INCC, et analysés pour la détection du paracétamol par la méthode d'analyse biochimique choisie (GC/MS). L'analyse des larves et des pupes a annoncé un résultat négatif par rapport à la présence du paracétamol ou de ses métabolites ; pour toutes ses différentes doses utilisées, et ceci concernant les deux espèces. Cela est peut être du à plusieurs facteurs qui ont interféré directement ou indirectement avec la présence et la bioaccumulation du paracétamol dans les tissus de l'insecte. Parmi eux on site :

- ✚ Le paracétamol a peut être été évacué par l'espèce lors des mues, où l'insecte se débarrasse de toute les toxines présentes dans son organisme tout au long de sa transformation.
- ✚ Le nombre d'échantillons ou bien la taille de l'échantillon a peut être été insuffisante, ce qui a minimisé l'assiduité du paracétamol lors de sa détection avec la GC/MS.
- ✚ La méthode d'analyse choisie est peut être non conforme pour ce type de xénobiotique.

Il y a eu des preuves dans les travaux effectués, que pendant les 2-4 premières semaines de décomposition, divers médicaments influent sur le taux et le modèle de développement des larves de diptères. Les Coléoptères (Ordre: Coléoptera) et les mouches (Ordre: Diptera) sont les insectes les plus couramment utilisés dans l'entomotoxicologie et toute étape altérée dans le développement de ces insectes peuvent souvent indiquer la présence de toxines dans le cadavre sur lequel les insectes se sont nourris (Murthy *et al.*, 2001).

Plusieurs travaux ont été menés dans la littérature pour la détection des xénobiotiques dans les larves de Diptères (Wilson *et al.*, 1993; Moe *et al.*, 2001; Sarica *et al.*, 2004; Kharbouche *et al.*, 2008...etc). *Calliphora vicina* et *Lucilia sericata* font partie des espèces les plus étudiées pour leur grande importance forensique et pour le fait qu'ils sont parmi les premiers envahisseurs d'un corps en décomposition et sont fréquemment utilisées pour l'estimation de l'intervalle post-mortem. Dans le cas de la détection du Paracétamol, Wilson *et al.* (1993) ont signalé une tentative échouée pour détecter le paracétamol dans *Calliphora vicina*. Il a ensuite été suggéré par Sadler *et al.* (1995) que "Un médicament sera détecté chez les larves lorsque son taux d'absorption dépasse le taux d'élimination ...". Cela peut expliquer l'absence du paracétamol dans le rapport précédent. Sadler et ses collègues ont recueilli des tissus chargés de médicaments à partir de trois cas de suicide et les ont nourris à *C. vicina*. Ces médicaments comprenaient les antidépresseurs / relaxants musculaires amitriptyline, témazépam, trazodone et trimipramine. Ces mêmes auteurs, ont signalé des concentrations détectables de tous les médicaments dans les larves, avec une baisse de la quantité de drogue détectée après huit jours associés à la pupaison. Une absorption similaire a été observée après le transfert des larves à partir des tissus chargés de drogues aux tissus sans drogues. Ces médicaments pourraient être détectés parce que leur taux d'élimination n'a pas été aussi rapide que le paracétamol. Cependant, il a également été démontré que les drogues peuvent modifier la durée de développement des larves sans pour autant être retrouvées dans les analyses de larves (O'Brien et Turner, 2004). Elles passeraient donc inaperçues et les IPMs seraient, de ce fait, mal estimés (O'Brien et Turner, 2004).

Conclusion générale

Ce travail a été conçu dans le but de déterminer la présence du paracétamol dans les tissus de larves et de pupes d'insectes de deux espèces de diptères Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*), et de voir l'impact de ce même xénobiotique sur leurs taux de développement.

Pour la détection du paracétamol qui a été négative par rapport à sa présence dans les tissus des insectes choisis, une raison à cela est que le médicament ne peut être détecté chez les larves lorsque la vitesse d'absorption est supérieure à la vitesse d'élimination (Murthy et al., 2001), également des échantillons de pupes et de larves au troisième stade larvaire ne contiennent pas de concentrations de médicaments, ce qui suggère que les médicaments ne s'accumulent pas au cours de tout le cycle de vie des larves. Cela conduit les entomologistes à théoriser que les toxines sont éliminées du système des larves au fil du temps si elles ne reçoivent pas une alimentation constante de la toxine. Par contre Le paracétamol semble affecter légèrement le développement larvaire, en particulier pendant les 2-4 jours de développement où la croissance a été accélérée par rapport au contrôle concernant les différentes doses et pour les deux espèces étudiées, avec une seule exception pour la 2^{ème} espèce (*L. sericata*) d'où sa croissance a été retardée dès le 3^{ème} jour du développement ce qui peut engendrer une différence d'environ 17,54 h pour l'estimation d'IPM calculé au cours de cette période. Les résultats d'ensemble, cependant, n'indiquent pas une différence significative dans la croissance en ce qui concerne les concentrations de paracétamol ingéré par les larves.

Ces résultats obtenus suggèrent que le paracétamol, ou son produit de dégradation, influencent légèrement le développement des larves des Calliphoridae, cependant, plus de travail est nécessaire, en particulier dans le domaine de l'établissement de ce qu'est les niveaux et pour combien de temps le paracétamol reste dans un cadavre, afin de déterminer si cela doit prendre une considération pratique dans un contexte médico-légale.

Recommandations :

- Refaire le travail avec une période prolongée d'injections de paracétamol.
- Multiplier le nombre de répétition par la multiplication du nombre d'animaux par doses.

- Refaire le travail tout en augmentant la population initiale des larves pour augmenter le volume de l'échantillon, et de commencer l'analyse toxicologique dès le 1^{er} stade larvaire.
- Plus de travail est nécessaire pour l'optimisation de la méthode d'analyse toxicologique ou bien choisir d'autres méthodes d'analyses.
- Multiplier le nombre des mesures dans le temps moins de 24h, voir chaque 12h.
- D'autres espèces de Calliphoridae peuvent être soumises au protocole d'expérimentation.
- Vu le volume de travail et la complexité du protocole, il est fortement suggérer de séparer les deux parties (l'impact du xénobiotique et l'analyse toxicologique) ou de mettre en place une équipe de deux groupes.

Références bibliographiques

- **Akbarzadeh K., Wallman J.F., Sulakova H. et Szpila K.** (2015). Species identification of Middle Eastern blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. *Parasitol Res*, 114: 1463–1472.
- **Amendt J., Campobasso C.P., Gaudry E., Reiter C., LeBlanc H.N. et Hall M.J.R.** (2007). Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int. J. Legal Med.*, 121: 90–104.
- **Aronson J.K.** (2010). *Meyler's Side Effects of Analgesics and Anti-inflammatory Drugs*. Edition Elsevier B.V., Oxford, United Kingdom, pp. 200- 209.
- **Byrd J.H. et Peace M.R.** (2012). Entomotoxicology: Drugs, Toxins, and Insects. *Forensic Chemistry Handbook*, First Edition. Edited by Lawrence Kobilinsky, Canada, pp. 483-490.
- **Charabidze D.** (2012). La biologie des insectes nécrophages et leur utilisation pour dater le décès en entomologie médico-légale. *Annales de la Société entomologique de France*, **48** (3-4) : 239-252.
- **Charabidze D., Morvan G., Dupont D., Gosset D. et Bourel B.** (2008). ForenSeek: un programme de simulation du développement des insectes nécrophages dédié à l'entomologie médico-légale. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)*, **44** (3) : 385-392.
- **Dacko B.S.N.** (2011). *The Effect of Arsenic Trioxide on the Grey Flesh Fly Sarcophaga bullata (Diptera: Sarcophagidae)*. A Thesis for the Degree of Master of science, Faculty of Texas Tech University, 14-16.
- **Dayananda R., Kiran J.** (2013). Entomotoxicology. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine*, **3** (2): 71-74.
- **De Carvalho L.M.L.** (2010). *Toxicology and Forensic Entomology. Current Concepts in Forensic Entomology*. Edition Amendt J., Goff M.L., Campobasso C.P., Grassberger M., Brazil, pp. 163- 168.
- **Dekeirsschieter J.** (2007). *Etude des odeurs émises par des carcasses de porc (Sus domesticus L.) en décomposition et suivi de la colonisation postmortem par les insectes nécrophages*. Mémoire Bio-ingénieur en Nature, Eaux et Forêts, faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux, 26 p.

- **Dekeirsschieter J., Verheggen F., Frederickx C., Marlet C., Lognay G. et Haubruge E.** (2012). Comment les insectes communiquent-ils au sein de l'"écosystème-cadavre"? L'écologie chimique des insectes nécrophages et nécrophiles. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology*, **65** : 3-13.
- **Djedouani B.** (2008). *Antidepressant analysis in larvae and animals meat Comparative study*. A thesis for the degree of Master in Forensic science, University of Teesside, pp. 3-13.
- **Drummer O.H.** (2007). Post-mortem toxicology. *Forensic Science International*, 165: 199–203.
- **Frederickx C., Dekeirsschieter J., Verheggen F.J. et Haubruge E.** (2011). L'entomologie forensique, les insectes résolvent les Crimes. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology*, **63** (4) : 237-249.
- **Frederickx C., Verheggen F., Bonnet S et Haubruge E.** (2012). Recensement de *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, de *Calliphora vomitoria* L. et de *Cynomya mortuorum* L. (Diptera: Calliphoridae) dans les collections entomologiques des étudiants de Gembloux Agro-Bio Tech sur la période 1995-2009. *Entomologie faunistique – Faunistic Entomology*, **64** (3) : 57-62.
- **Für Veterinärwesen B.** (1993). Directives concernant les méthodes d'euthanasie pour les animaux d'expérience. *Directive Protection des animaux*. Edition : Office vétérinaire fédéral, Berne, Switzerland, p 4.
- **Gennard D.** (2012). *Forensic Entomology: An Introduction*, 2nd ed. by John Wiley & Sons, Ltd, India, pp. 121- 125.
- **Goff M.L., Lord D.L.** (2001). Entomotoxicology: Insects as Toxicological Indicators and the Impact of Drugs and Toxins on Insect Development. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. Edition: Jason H. Byrd, James L. Castner, USA, pp. 331- 338.
- **Grassberger M., Friedrich E., Reiter C.** (2003). The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *Int J Legal Med*, 117: 75–81.
- **Gruner S.V.** (2004). *The forensically important Calliphoridae (insecta: diptera) of pig carrion in rural north-central florida*. A thesis for the degree of Master of Science, University of florida, p.14.
- **Hajšlová J., Cajka T.** (2007). Gas chromatography–mass spectrometry (GC– MS). *Food Toxicants Analysis*. Edition Picó Y., Prague, Czech Republic, 419 p.

- **Introna F., Campobasso C.P., Goff M.L.** (2001). Entomotoxicology. *Forensic Science International*, 120: 42-47.
- **Kapil V., Rejeet P.M.P.** (2013). Assessment of Post Mortem Interval, (PMI) from Forensic Entomotoxicological Studies of Larvae and Flies. *Entomol Ornithol Herpetol*, 2: 104.
- **Larocque A.** (2013). Implications thérapeutiques des différents modes d'intoxication au paracétamol chez l'adulte. *Intoxications aiguës*. Sous la direction de Baud F., Hantson P. et Thabet H., Canada, 179 p.
- **Lee V.K. and Jahr J.S.** (2011). Acetaminophen injectable. *The Essence of Analgesia and Analgesics*. Edition Sinatra R.J., Jahr J.S., Watkins-Pitchford J.M., Cambridge, United kingdom, pp. 258- 259.
- **Matthew Anderson M. and Kaufman P.E.** (2011). Common Green Bottle Fly or Sheep Blow Fly *Lucilia sericata* (Meigen) (Insecta: Diptera: Calliphoridae). *Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611*.
- **Monthei D.R.** (2009). *Entomotoxicological and Thermal Factors Affecting the Development of Forensically Important Flies*. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy, the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, p 14.
- **Murthy C.R.V. et Mohanty M.** (2001). Entomotoxicology: A Review. *J. Indian Acad. Forensic Med.*, 32 (1), 82- 84.
- **O'Brien C., Turner B.** (2004). Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *Int. J. Legal. Med.*, 118: 188-189.
- **Rivers D.B., Dahlem G.A.** (2014). *The Science of Forensic Entomology*, First Edition by John Wiley & Sons, Ltd, India, pp. 71- 78.
- **Rudy C.M.** (2010). *Etude comparative de la colonisation entomologique post-mortem sur carcasses de porc (Sus domesticus L.) mort par overdose de cocaïne et de pentobarbital*. Mémoire Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Liège, pp. 11- 17.
- **Sanei-Dehkordi A., Khamesipour A., Akbarzadeh K., Akhavan A.A., Rassi Y., Oshaghi M.A., Miramin-Mohammadi A., Eskandari S.E., Rafinejad J.** (2014). Experimental colonization and Life Table of the *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera:Calliphoridae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2 (6): 45-48.
- **Sattari M. and Mashayekhi S.O.** (2012). Acetaminophen overdose, biomarkers, and management. *Acetaminophen properties, clinical uses and adverse effects*. Edition: Atash javaherian and Pasha latifpour, New York, USA, 108 p.

- **Szpila K.** (2010). Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance. *Current Concepts in Forensic Entomology*. Edition Amendt J., Goff M.L., Campobasso C.P., Grassberger M., Brazil, pp. 43-53.
- **Szpila K., Matuszewski S., Bajerlein D., Konwerski S.** (2008). *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819), a forensically important blowfly (Diptera: Calliphoridae) new for the Polish fauna. *Polish journal of entomology*, 77: 351-355.
- **Wells J.D., Lamotte L.R.** (2001). Estimating the Postmortem Interval. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. Edition Jason H. Byrd, James L. Castner, USA, pp. 263- 264.

Annexe I : Photographique

1. La pesé des lapins



Figure 1 : Le lapin mis dans un bac pour être peser (exemple).

2. Produit chimique

a) Le Méthanol



Figure 2 : La bouteille de Méthanol d'où une concentration de 70% a été préparée.

b) L'éthanol



Figure 3 : La bouteille d'éthanol d'où une concentration de 80% a été préparée.

3. Equipement

Note : L'équipement sur lequel on a eu recours lors de notre travail est mentionné si dessous.

- a) **Stéréo-microscope Zeiss/Stemi 2000-C avec caméra :** Utilisée pour l'observation et l'identification des larves et des adultes.



Figure 4 : Le stéréo-microscope avec capacité de grossissement x100.

- b) **Enceinte climatique (Salle de macération)** : Une chambre utilisée pour l'incubation réglée à 26°C. à Humidité relative de 70%.



Figure 5 : L'enceinte climatique située dans la salle de macération.

- c) **GC/MS** : Dispositif utilisé pour l'analyse toxicologique.



Figure 6 : L'appareillage de la GC/MS au niveau du laboratoire de Toxicologie.

- d) **Plaque chauffante** : Utilisée pour chauffer de l'eau pour tuer les larves tout en gardant leur taille normale.



Figure 7 : La plaque chauffante.

- e) **Balance** : Utilisée pour peser les lapins. Un bac a été placé, en suite la balance remis à zéro, chaque lapin a été pesé individuellement.



Figure 8 : La balance.

- f) **Frigos (La morgue)** : Utilisé pour la conservation de la viande, du substrat nutritif et pour assommer les mouches adultes lors de leur transfert et leur identification.



Figure 9 : Les frigos réglés à -5°C.

- g) **Cages** : Cages en acier qui ont été mises en place et étiquetées, pour contenir les lapins injectés avec les différentes doses (02 lapins par cage).



Figure 10 : Les cages en acier Dimension ; LxLxh (80x60x60).

4. Instruments

Note : Les différents instruments utilisés au cours de notre travail sont listés si dessous.

- a) **Pinces + Pinceau :** Les pinces ont été utilisées pour la récolte des larves, des pupes et des adultes. Tandis que le pinceau était utilisé pour la récolte des œufs.



Figure 11 : Les pinces



Figure 12 : Le pinceau

- b) **Boîtes d'incubation :** Boîtes en plastique transparent protégées par un filet et scellé aux extrémités, permettant une bonne aération et empêchant les adultes d'y sortir lors de l'émergence, réparties par couleur, utilisées pour l'incubation.

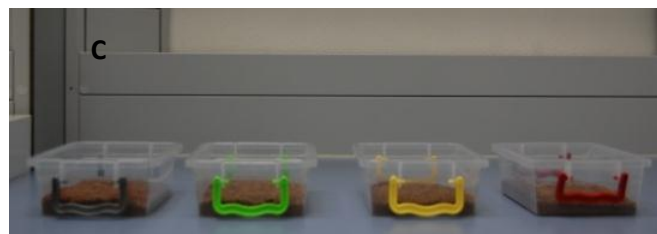


Figure 13 : **A:** la boîte fermée; **B:** la boîte avec son couvercle; **C:** les différentes boîtes pour chaque doses, réparties par couleur de gauche à droite comme suit (Témoin, Dose 01, Dose 02, Dose 03).

- c) **Boîtes d'élevage des insectes** : Boîtes en plastique transparent, protégées par un filet et scellées aux extrémités, permettant une bonne aération et empêchant les insectes de sortir, utilisées pour l'élevage.



Figure 14 : Exemple de boîte d'élevage des mouches.

- d) **Boîte pour l'accouplement**: Boîte en plastique transparent protégées par un filet scellé aux extrémités, avec deux chambres séparées, mises en contact lors de la stimulation des mâles et des femelles pour la réalisation de l'oviposition (fabriqué par Mr Djedouani B.).

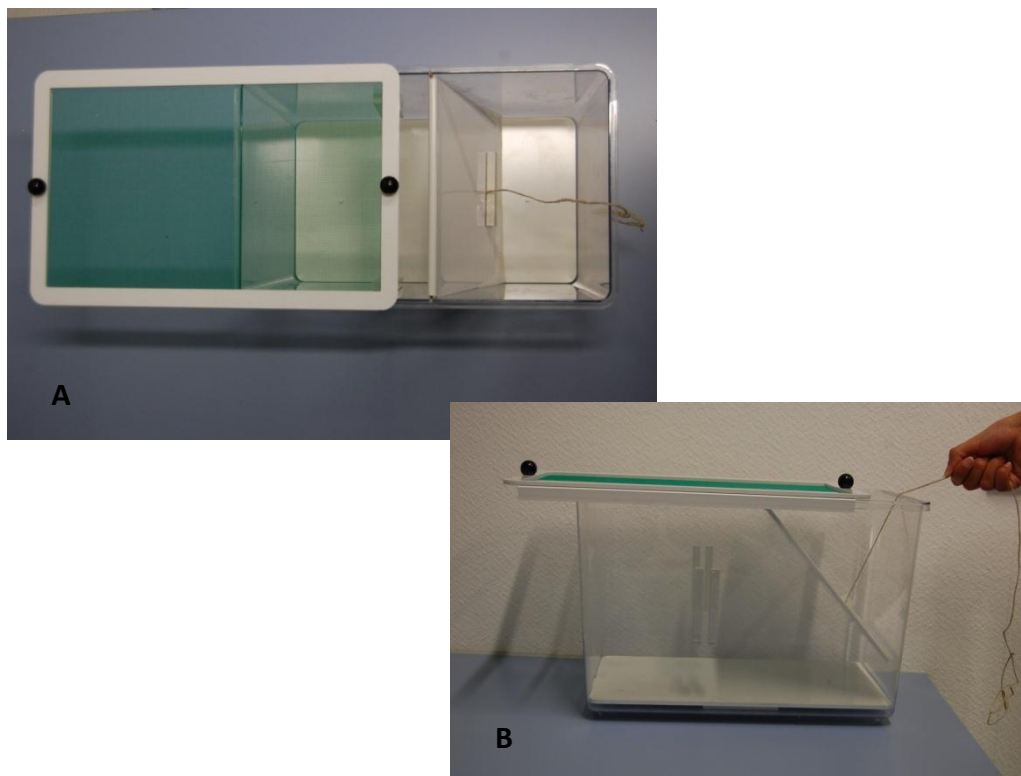


Figure 15 : **A**: la boîte utilisée pour l'accouplement de *L. sericata* (vus d'en haut) ; **B**: la boîte utilisée pour l'accouplement (vus latérale).

e) **Pied à coulisse digital (Mitutoyo Absolute).**

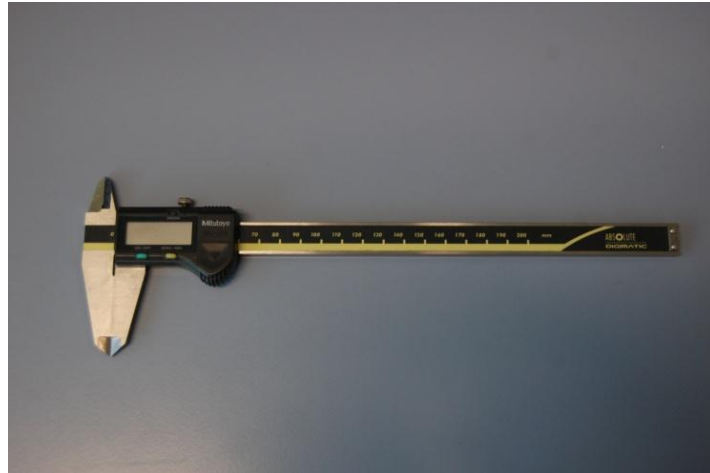


Figure 16 : Le pied à coulisse digital utilisé pour les mesures des larves et des pupes.

f) **Seringues** : Utilisées pour les injections intraveineuses 2,5 ml 25G 5/8.



Figure 17 : Le matériel utilisé lors des injections (seringues, alcool, paracétamol, cotons).

g) **Pissette** : Contenant de l'alcool.

h) **Ciseaux.**

i) **Couteau.**

j) **Bac en plastique.**

5. Consommable

Note : Le matériel consommé au cours de notre travail est listé si dessous.

- a) **Boîte de pétri :** Pour différents usages (La récolte des œufs, le transport des adultes...etc.)



Figure 18 : Boîtes de pétri.

- b) **Viande de bœuf.**



Figure 19 : La viande de bœuf congelée, utilisée comme substrat nutritif alternatif pour l'attraction de *C. vicina*, et la stimulation de *L. sericata* pour l'obtention d'une 2^{ème} génération d'adultes.

c) Gants « nitrile ».



Figure 20 : Les gants utilisés au laboratoire.

d) Désinfectant + Papier essuie tout.

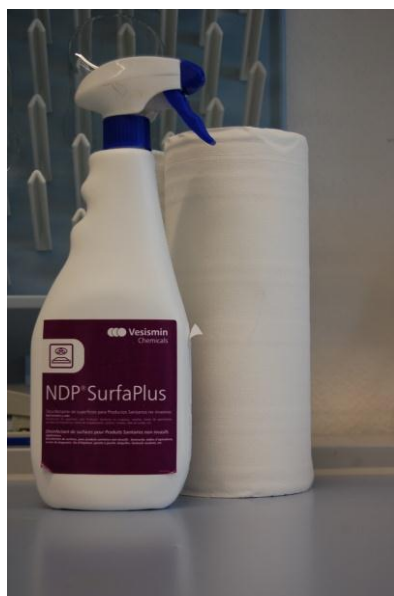


Figure 21 : Matériel utilisé pour le nettoyage et la désinfection de la surface de travail.

6. Installation du dispositif expérimental

a) La boîte d'accouplement au moment de la stimulation de la ponte



Figure 22 : La viande de bœuf déposée pour la stimulation de *L. sericata*.

b) La viande des lapins contenant les différentes doses



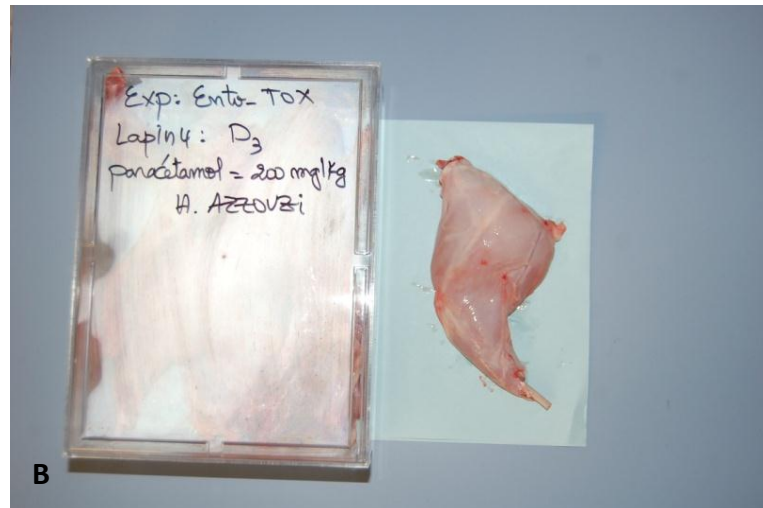


Figure 23 : **A** : la viande des lapins découpée en morceaux (thorax, abdomen et cuisses), contenant les différentes doses ; **B** : la cuisse prise (exemple : Dose 03) pour être utilisée comme substrat nutritif et d'oviposition.

c) La conservation du substrat nutritif



Figure 24 : Les boîtes contenant la viande de lapin sont déposées au réfrigérateur à -5°C.

d) La stimulation des pontes

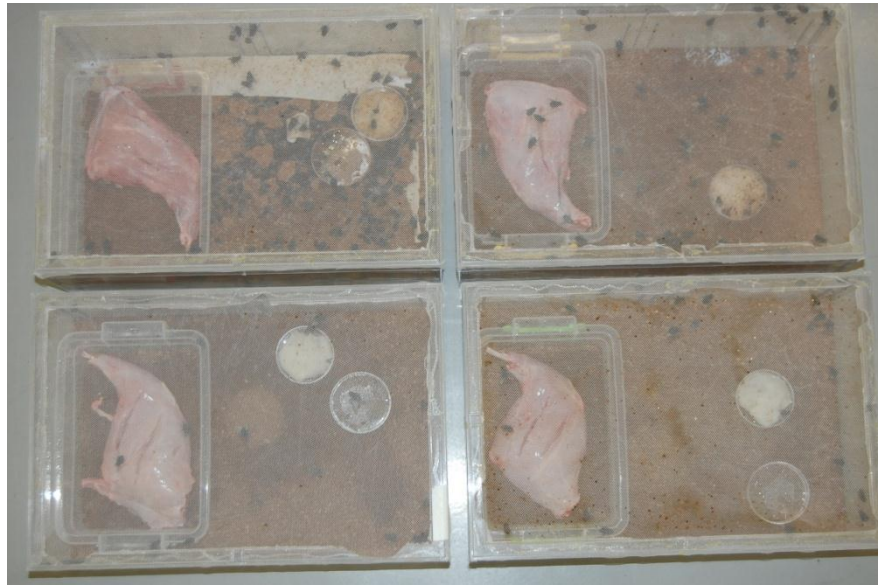


Figure 25 : les boîtes d'incubation déposées à l'intérieur des boîtes d'élevage pour la stimulation des pontes.

e) La stimulation des pontes pour *C. albiceps*

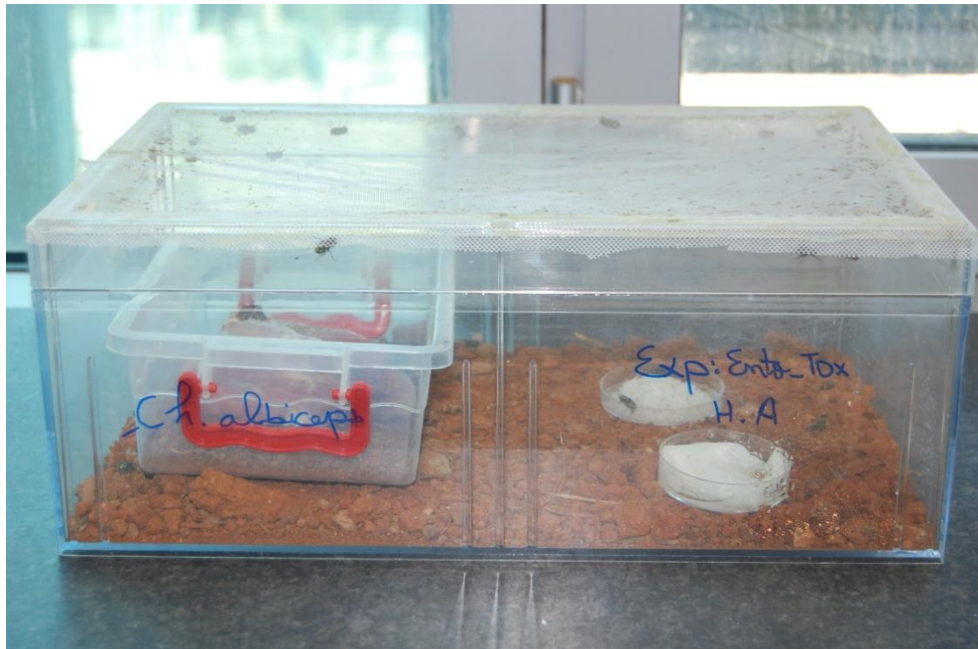


Figure 26 : Les boîtes d'incubation contenant le substrat nutritif pour la stimulation des pontes à l'intérieur des boîtes d'élevage de *C. albiceps* (exemple : Dose 03).

f) L'emplacement des boîtes d'élevage



Figure 27 : Les boîtes d'élevage de *C. vicina* déposées à proximité des fenêtres.

g) Les boîtes d'incubation



Figure 28 : Les boîtes contenant les substrats à différentes doses avec les œufs de *C. vicina*, placées à l'incubateur à 26°C avec humidité relative de 70%.

7. Le dépôt des œufs

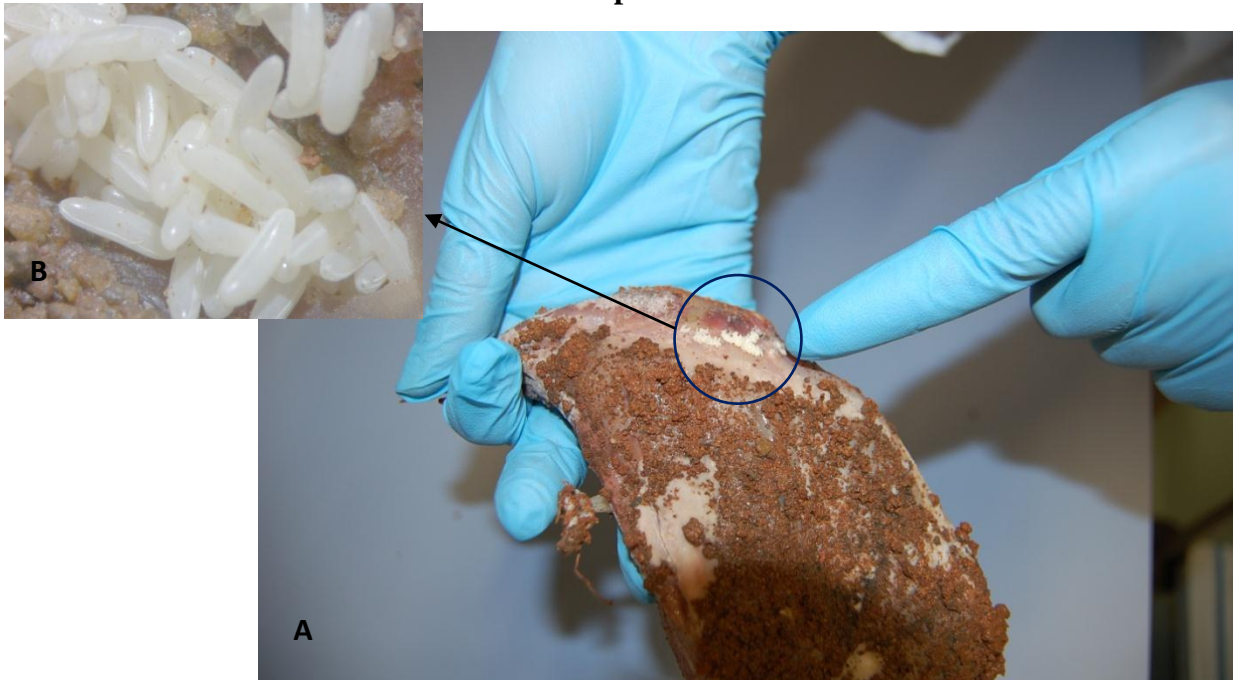
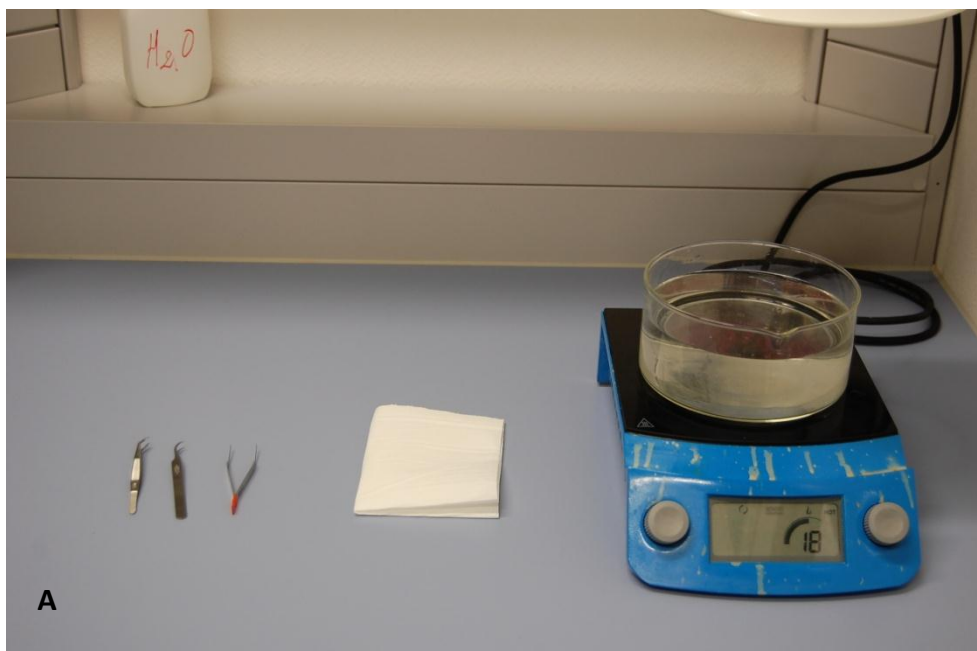


Figure 29 : A : Les œufs de *C. vicina* déposés sur la partie inférieure de la viande de lapin ; B : Les œufs de *C. vicina* observés sous le stéréo-microscope.

8. L'échantillonnage



A

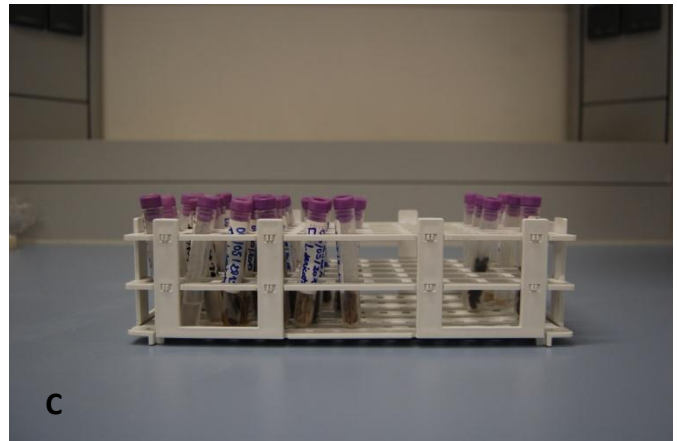


Figure 30 : **A :** Le matériel utilisé lors de l'échantillonnage ; **B :** L'eau chaude utilisée pour tuer les larves et la passoire pour les retirer ; **C :** les tubes de chaque échantillon avec la date, le nom de l'espèce et la dose.



Figure 31 : L'état de la larve (exemple : larve L3) après avoir été tuée à l'eau chaude, bien étalée donc elle a gardé sa taille réelle (~17 mm).



Figure 32 : Pupa de Calliphoridae (exemple : *L. sericata* (~8 mm)).

Annexe II : Graphique

1. Les étiquettes des doses de paracétamol

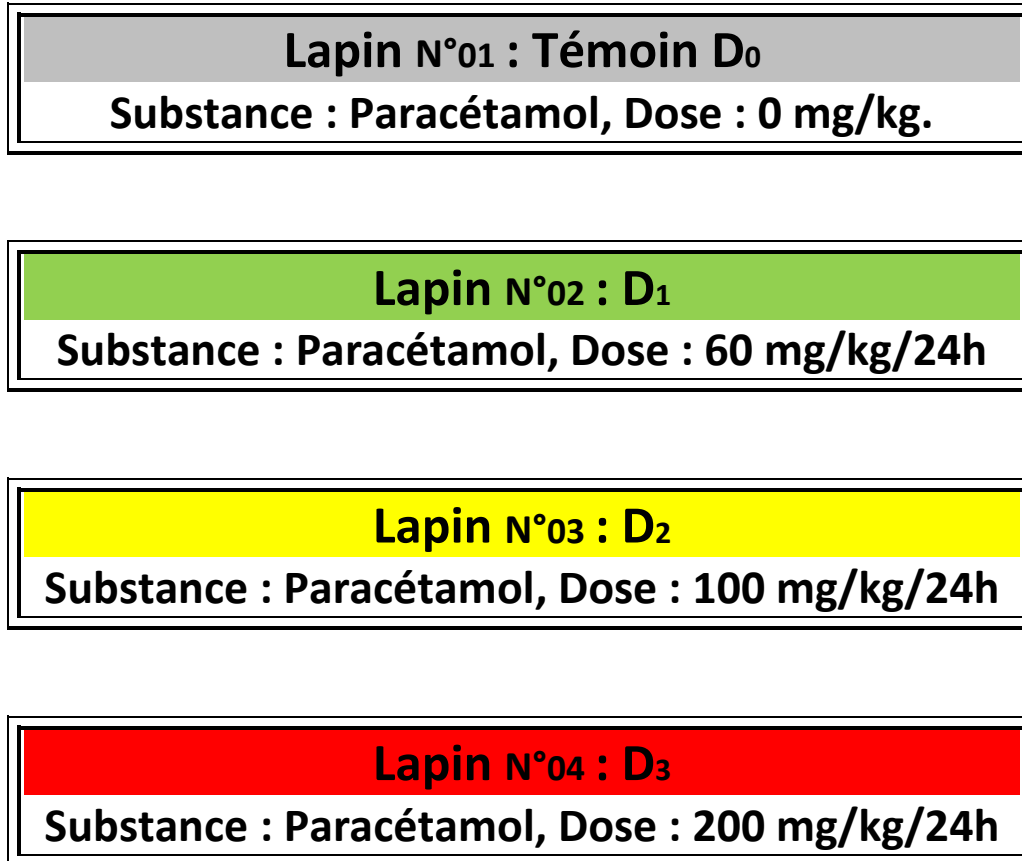


Figure 33 : Les étiquettes de chaque lapin choisies pour une dose précise, collées aux différents emplacements des cages pour identifier chaque lapin.

2. Les tableaux d'injections

Tableau 1 : Les injections de la 1^{ère} dose de paracétamol réalisées sur le lapin n°02.

Lapin N°02 D01			
Substance : Paracétamol. Dose : 60 mg/kg/24h			
injections	Volume	Date et heures	Observations
Injection N°01. 15mg/ml.	1.5 ml.	Date : 05/04/2015 Heures : 9 :40	Les lapins n'ont subis aucune réaction lors des injections et après. « Aucun cas clinique n'a été suivi »
Injection N°02. 15mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 13 :50	
Injection N°03. 15mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 16 :00	
Injection N°04. 15mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 9 : 10	
Injection N°05. 15mg/ml.	Date : 06/04/2015 Heures : 13 :45		
Injection N°06. 15mg/ml.	Date : 06/04/2015 Heures : 16 :10		

Tableau 2 : Les injections de la 2^{ème} dose de paracétamol réalisées sur le lapin n°03.

Lapin N°03 D02			
Substance : Paracétamol.			
Dose : 100 mg/kg/24h			
injections	Volume	Date et heures	Observations
Injection N°01. 25mg/ml.	2.5 ml.	Date : 05/04/2015 Heures : 9:48	Les lapins n'ont subis aucune réaction lors des injections et après. « Aucun cas clinique n'a été suivi »
Injection N°02. 25mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 14 :00	
Injection N°03. 25mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 16 :10	
Injection N°04. 25mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 9 :15	
Injection N°05. 25mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 13 :50	
Injection N°06. 25mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 16 :15	

Tableau 3 : Les injections de la 3^{ème} dose de paracétamol réalisées sur le lapin n°04.

Lapin N°04 D03			
Substance : Paracétamol.			
Dose : 200 mg/kg/24h			
injections	Volume	Date et heures	Observations
Injection N°01. 50mg/ml.	05 ml.	Date : 05/04/2015 Heures : 9 :58	Les lapins n'ont subis aucune réaction lors des injections et après. « Aucun cas clinique n'a été suivi »
Injection N°02. 50mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 14 :10	
Injection N°03. 50mg/ml.		Date : 05/04/2015 Heures : 16 :20	
Injection N°04. 50mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 9 :20	
Injection N°05. 50mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 13 :55	
Injection N°06. 50mg/ml.		Date : 06/04/2015 Heures : 16 :20	

3. Les tableaux des différentes mesures de larves et de pupes

Tableau 4 : les tableaux des mesures de larves et de pupes de *C. vicina*.

Expérience : En.Tox.				
Nom et prénom : Hadjer Azzouzi				
LAB : Entomologie médicale (INCC)			Esp : <i>Calliphora vicina</i>	
Tab.01 : Les mesures (longueur) de 15 larves <i>C. vicina</i> prise après 48h de la ponte.				
D N°	Témoïn	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	2,46	4,02	5,84	6,05
2.	3,04	4,06	4,35	6,60
3.	2,76	4,29	4,72	6,04
4.	2,69	5,22	4,79	4,87
5.	2,35	5,22	4,97	6,17
6.	3,78	5,49	4,98	6,53
7.	2,36	5,50	5,15	5,80
8.	3,04	5,51	5,17	6,46
9.	2,75	5,53	5,37	6,51
10.	2,47	5,55	5,45	6,72
11.	2,31	5,56	5,48	5,00
12.	3,24	5,56	5,49	6,11
13.	2,59	5,57	5,57	6,17
14.	2,30	5,58	5,62	6,42
15.	3,18	5,60	5,80	4,73
Tot.	41,33	78,27	78,78	90,17
Moye.	2,76 ± 0,43	5,22 ± 0,58	5,25 ± 0,43	6,01 ± 0,64

Tab.02 : Les mesures (longueur) de 14 larves *C. vicina* prise après 96h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	15,42	17,62	17,84	17,87
2.	15,56	17,96	16,58	17,92
3.	16,19	18,29	16,65	17,89
4.	15,46	17,66	16,75	17,54
5.	16,03	18,03	16,85	19,26
6.	15,16	17,26	16,96	19,73
7.	15,28	17,38	16,98	17,50
8.	14,72	16,92	17,02	18,80
9.	15,68	17,98	17,12	18,80
10.	15,22	17,42	17,20	18,07
11.	15,17	17,27	17,28	18,03
12.	15,53	17,63	17,37	18,38
13.	16,15	18,25	17,40	18,81
14.	15,22	17,25	17,60	17,37
Tot.	216,79	246,92	239,57	255,97
Moye.	15,49 ± 0,42	17,64 ± 0,41	17,11 ± 0,36	18,28 ± 0,70

Tab.03 : Les mesures (longueur) de 12 larves *C. vicina* prise après 144h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	15,25	17,25	16,08	16,07
2.	15,58	17,88	16,16	16,16
3.	16,00	18,00	16,29	16,18
4.	15,08	18,08	16,33	16,23
5.	15,11	18,11	16,47	16,27
6.	15,17	18,17	16,51	16,42

7.	16,20	18,20	16,61	16,42
8.	16,21	18,28	16,65	16,55
9.	16,23	18,43	16,67	16,57
10.	17,50	18,70	16,78	16,68
11.	16,57	18,87	17,32	17,00
12.	15,58	18,88	17,48	17,52
Tot.	190,48	218,85	199,35	198,07
Moye.	15,87 ± 0,72	18,24 ± 0,45	16,61 ± 0,43	16,51 ± 0,41

Tab.04 : Les mesures (longueur) de 11 Pupes *C. vicina* prise après 192h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	9,58	9,99	9,59	9,68
2.	10,04	10,28	10,11	9,69
3.	9,64	9,86	9,40	9,58
4.	9,60	10,18	9,49	9,85
5.	9,27	10,42	9,69	10,46
6.	9,80	9,63	9,68	9,76
7.	9,25	9,84	9,43	9,82
8.	10,07	10,02	9,95	10,04
9.	9,37	9,86	9,40	9,58
10.	9,24	9,62	9,38	9,27
11.	9,49	9,64	9,66	9,28
Tot.	105,35	109,34	105,78	107,01
Moye.	9,58 ± 0,31	9,94 ± 0,28	9,62 ± 0,24	9,73 ± 0,33

Tot. : Le total ; **Moye.** : La moyenne

Tableau 5 : les tableaux des mesures de larves et de pupes de *L. sericata*.

Expérience : En.Tox.				
Nom et prénom : Hadjer Azzouzi				
LAB : Entomologie médicale (INCC)			Esp : <i>Lucilia sericata</i>	
Tab.01 : Les mesures (longueur) de 15 larves <i>L. sericata</i> prise après 24h de la ponte.				
N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	3,05	3,74	4,71	5,25
2.	2,55	4,58	5,53	6,00
3.	2,56	4,50	5,53	5,30
4.	2,89	4,38	5,20	5,97
5.	2,73	4,04	5,61	5,91
6.	2,76	4,35	5,03	3,15
7.	1,21	4,38	5,42	5,02
8.	2,62	4,67	5,13	5,35
9.	3,09	3,94	5,75	6,03
10.	3,51	4,98	5,72	5,97
11.	3,23	3,51	5,50	5,73
12.	3,32	5,08	4,42	5,52
13.	3,12	3,25	5,63	5,90
14.	3,12	3,19	5,28	5,80
15.	1,49	3,77	5,54	5,87
Tot.	41,25	62,36	80,00	82,78
Moye.	2,75 ± 0,64	4,16 ± 0,58	5,33 ± 0,38	5,52 ± 0,73

Tab.02 : Les mesures (longueur) de 14 larves *L. sericata* prise après 48h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	11,13	11,6	13,61	11,95
2.	10,36	12,44	13,33	13,28
3.	11,37	10,82	11,65	11,43
4.	11,43	12,34	12,98	11,34
5.	11,01	12,2	11,79	11,89
6.	10,5	11,06	13,15	12,46
7.	10,26	11,8	12,57	11,30
8.	10,41	12,11	12,38	12,36
9.	11,32	11,61	12,66	10,12
10.	10,6	13,5	12,74	11,55
11.	10,36	12,48	12,22	12,00
12.	9,68	12,64	12,23	10,51
13.	10,66	11,95	12,37	10,86
14.	9,64	11,03	12,47	9,99
Tot.	148,73	167,58	176,15	161,04
Moye.	10,62 ± 0,57	11,97 ± 0,72	12,58 ± 0,55	11,50 ± 0,92

Tab.03 : Les mesures (longueur) de 12 larves *L. sericata* prise après 72h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	15,06	14,79	14,91	14,34
2.	13,87	16,66	14,17	13,52
3.	14,05	15,00	15,26	13,52
4.	13,76	15,86	14,32	13,63
5.	13,82	15,39	13,94	13,70
6.	13,97	15,54	15,27	13,82
7.	14,48	15,06	14,35	13,84
8.	12,92	16,42	15,63	14,00
9.	13,27	15,14	13,71	14,07
10.	14,34	15,05	14,19	14,11
11.	13,95	14,45	14,15	14,47
12.	14,17	14,43	14,82	14,89
Tot.	167,66	183,79	174,72	167,91
Moye.	13,97 ± 0,55	15,32 ± 0,70	14,56 ± 0,60	13,99 ± 0,41

Tab.04 : Les mesures (longueur) de 11 larves *L. sericata* prise après 96h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	14,19	13,53	13,80	11,79
2.	14,65	13,39	13,96	11,59
3.	14,68	13,88	13,98	11,56
4.	14,13	14,96	12,31	12,40
5.	14,43	14,52	14,14	12,10
6.	14,49	13,37	13,57	11,78
7.	14,45	15,26	11,61	12,62
8.	14,27	13,42	12,10	12,46
9.	14,89	14,29	13,32	12,26
10.	14,28	14,48	12,10	11,92
11.	14,14	14,93	12,46	12,08
Tot.	158,60	156,03	143,35	132,56
Moye.	14,42 ± 0,25	14,18 ± 0,70	13,03 ± 0,93	12,05 ± 0,36

Tab.05 : Les mesures (longueur) de 10 larves *L. sericata* prise après 120h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	13,50	14,27	13,12	11,60
2.	14,24	14,07	13,28	12,08
3.	14,43	14,83	13,95	11,64
4.	13,75	14,24	13,66	12,58
5.	13,90	14,18	13,56	11,65
6.	13,78	14,77	13,26	11,74
7.	14,34	14,61	13,41	12,07
8.	13,73	14,51	13,33	12,21
9.	14,05	14,47	13,68	11,78
10.	14,32	14,98	13,82	11,89
Tot.	140,04	144,93	135,07	119,24
Moye.	14,00 ± 0,32	14,49 ± 0,30	13,51 ± 0,27	11,92 ± 0,31

Tab.06 : Les mesures (longueur) de 09 larves *L. sericata* prise après 144h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	Pupe	13,77	13,53	Pupe
2.	Pupe	13,49	13,19	Pupe
3.	Pupe	13,94	13,41	Pupe
4.	Pupe	13,94	13,43	Pupe
5.	Pupe	14,25	13,24	Pupe
6.	Pupe	13,80	13,37	Pupe
7.	Pupe	14,05	13,27	Pupe
8.	Pupe	14,04	13,45	Pupe
9.	Pupe	14,37	12,71	Pupe
10.	Pupe	14,03	13,12	Pupe
Tot.	0,00	139,68	132,72	0,00
Moye.	0,00	13,97 ± 0,25	13,27 ± 0,24	0,00

Tab.07 : Les mesures (longueur) de 09 Pupes *L. sericata* prise après 168h de la ponte.

D N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	7,12	7,12	7,85	7,10
2.	7,16	7,00	7,95	6,97
3.	7,30	6,98	7,68	7,12
4.	7,19	7,00	7,93	7,04
5.	7,40	7,00	7,76	7,23
6.	7,15	6,90	7,79	7,15
7.	7,10	7,10	7,87	7,40
8.	7,50	7,01	7,78	7,21
9.	7,60	6,90	7,82	7,40
Tot.	65,52	63,01	70,43	64,62
Moye.	7,28 ± 0,18	7,00 ± 0,07	7,83 ± 0,09	7,18 ± 0,15

Tot. : Le total ; **Moye.** : La moyenne

Annexe III : Démonstrative

1. L'identification des espèces de Calliphoridae

Pour l'identification des larves, on a pris quelques unes, tuées à l'eau chaude (>80°C.) (Amendt et al., 2007) puis observées au stéréo-microscope. Pour l'identification des adultes, ils ont été placés au congélateur pendant 10 min pour les assommer puis rapidement identifiés au stéréo-microscope avec les clés d'identification de « Akbarzadeh et al., 2015 ; Szpila 2010 ».

✚ La première espèce a été déterminée comme *Calliphora vicina* en suivant les critères si dessous :

○ **L'identification des larves :** l'identification a été réalisée sur les larves du 3^{ème} stade larvaire (L3).

1. Abdominal segments of the larva without such protuberances. **2**
2. Oral sclerite at least partly sclerotised. **3**
3. Oral sclerite well sclerotised along the whole length. **6**
6. Spines small, arranged in short rows (check on the thoracic segments) . . . **7**
7. Posterior spiracles relatively close together (SDF≈1.0). **8**
8. Anterior spinose bands incomplete only on abdominal segments VI and VII ***Calliphora vicina***

○ **L'identification des adultes :**

1. Stem-vein without row of hairs above **2**
2. Lower calypter with hairs on dorsal surface; thorax nonmetallic, dark and dusted (Fig. 1b) **13 (Calliphorinae)**
13. Three pairs of acrostichal setae on postsutural surface of thorax (Fig. 2k); abdomen shining blue with white dusting; cerci and surstyli almost the same length **14 (*Calliphora* spp.)**
14. Facial ridges, mouth edge, and anterior part of genal dilation yellowish-red (Fig. 2l); hairs on genal dilation and postgena black (Fig. 2l); anterior spiracle yellow (Fig. 2l) ***Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830)**

✚ La deuxième espèce a été déterminée comme *Lucilia sericata* en suivant les critères si dessous :

○ **L'identification des larves** : l'identification a été réalisée sur les larves du 3^{ème} stade larvaire (L3).

1. Abdominal segments of the larva without such protuberances **2**
2. Oral sclerite totally unsclerotised **10**
10. Spines with serrated tips on thoracic segments rare or absent, all spines small of similar size **12**
12. Distance between each P1 similar to distance between P1 and P2
 ***Lucilia sericata***

○ **L'identification des adultes** :

1. Stem-vein without row of hairs above **2**
2. Lower calypter without hairs on dorsal surface; thorax bright green metallic, rarely bluish or cuprous (Fig. 1c) **15 (Luciliinae)**
15. Katatergite bare or pubescent (Fig. 3h, i) **16 (Lucilia spp.)**
16. Basicosta bright yellow (Fig. 3a) **17**
17. Posterior slope of humeral callus with 6–8 hairs (Fig. 3a); surface of notopleuron between last notopleural seta and edge of notopleuron with 8–16 hairs (Fig. 3a); central occipital area with 2–8 setulae (rarely 1) below each inner vertical seta (Fig. 3c) ***Lucilia sericata* (Meigen, 1826)**

✚ La troisième espèce a été déterminée comme *Chrysomya albiceps* en suivant les critères si dessous :

○ **L'identification des larves** : l'identification a été réalisée sur les larves du 3^{ème} stade larvaire (L3).

1. Segments abdominaux de la larve avec de nombreuses protubérances charnues. ***Chrysomya albiceps***

○ **L'identification des adultes** :

1. Stem-vein with row of hairs above (Fig. 1a) **3 (Chrysomyinae)**

3. Greater ampulla with stiff erect hairs (Fig. 1d); dorsal surface of lower calypter with dense hairs (Fig. 1d) **4 (*Chrysomya* spp.)**
4. Anterior spiracle bright, white-yellowish (Figs 1d, k; 2g) **8**
8. Anterior wing margin transparent **9**
9. Katepisternal setae 1+1 (Fig. 1i); at least some hairs on lateral surfaces of tergite V white (Fig. 2d) **10**
10. Dorsal part of thorax shiny, with little dusting (Fig. 2c); black transverse marginal abdominal bands on abdominal segments III and IV very narrow, up to about a quarter on segment III and usually not more than about one sixth in segment IV (Fig. 2d); posterior edge of tergite V of female with crevice/incision (Fig. 2d) **11**
11. Third antennal segment wholly dark, blackish-brownish (Fig. 2e); proepimeral seta absent (Fig. 1d) (rarely present on one or both sides) ***Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819)**

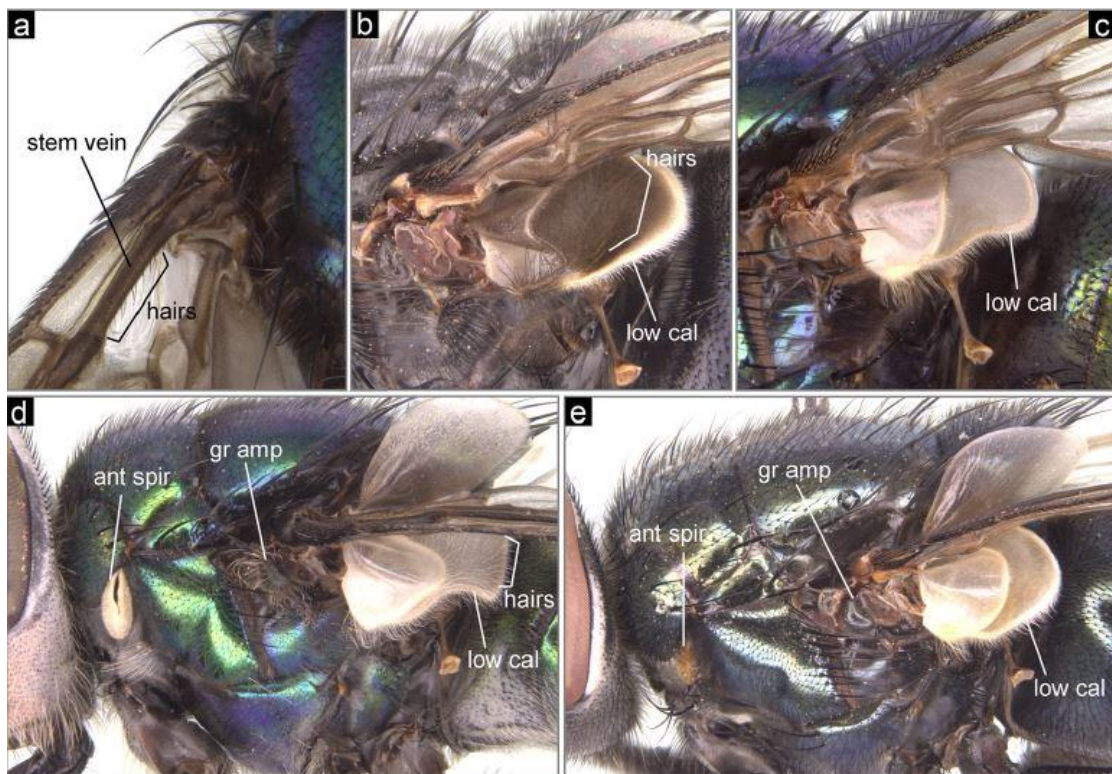


Figure 1: Les critères d'identification pour la détermination des différentes familles de Diptères (Akbarzadeh et al., 2015).

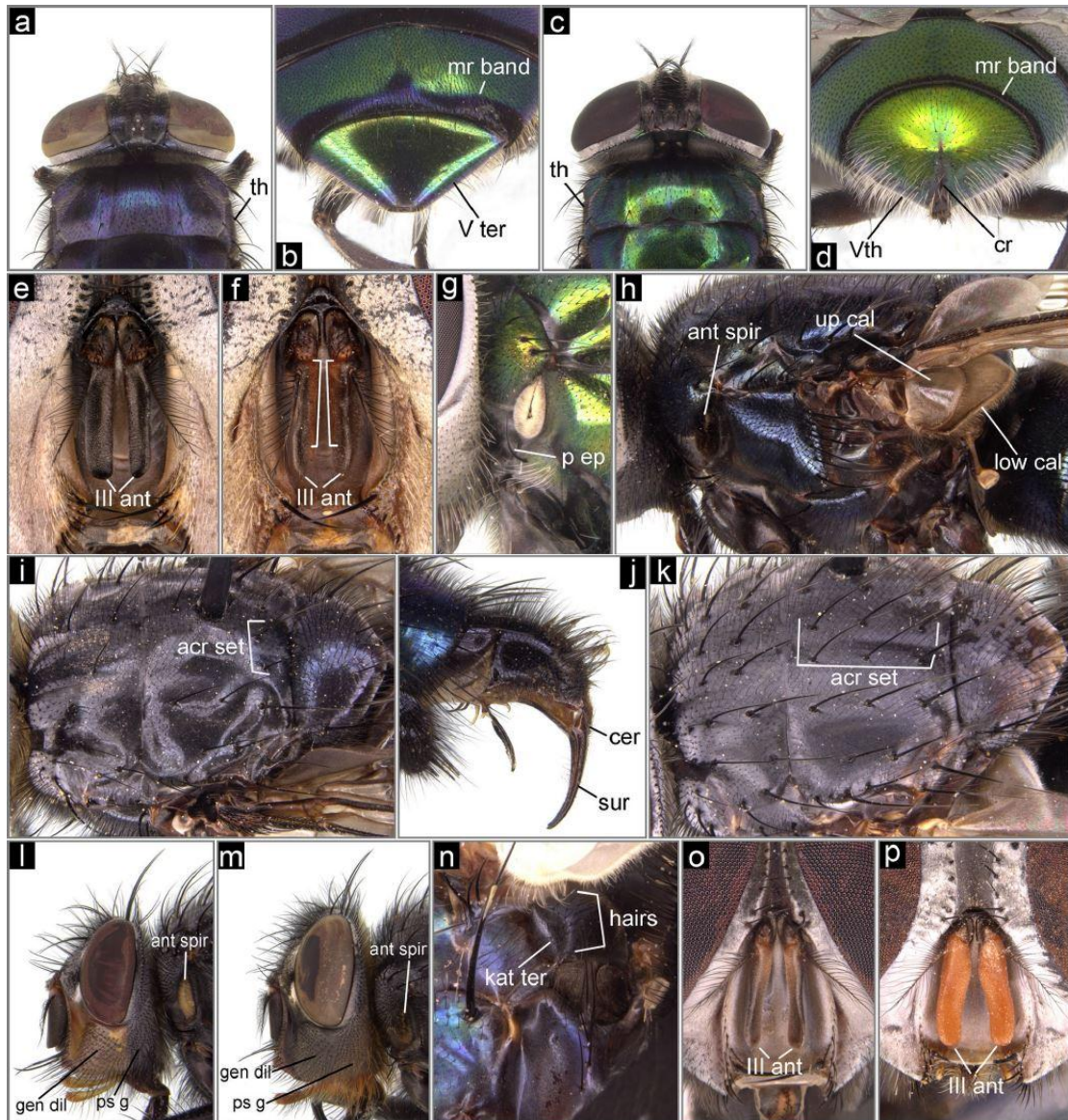


Figure 2: Les critères d'identification pour la détermination des différents genres et espèces de Diptères (Akbarzadeh et al., 2015).

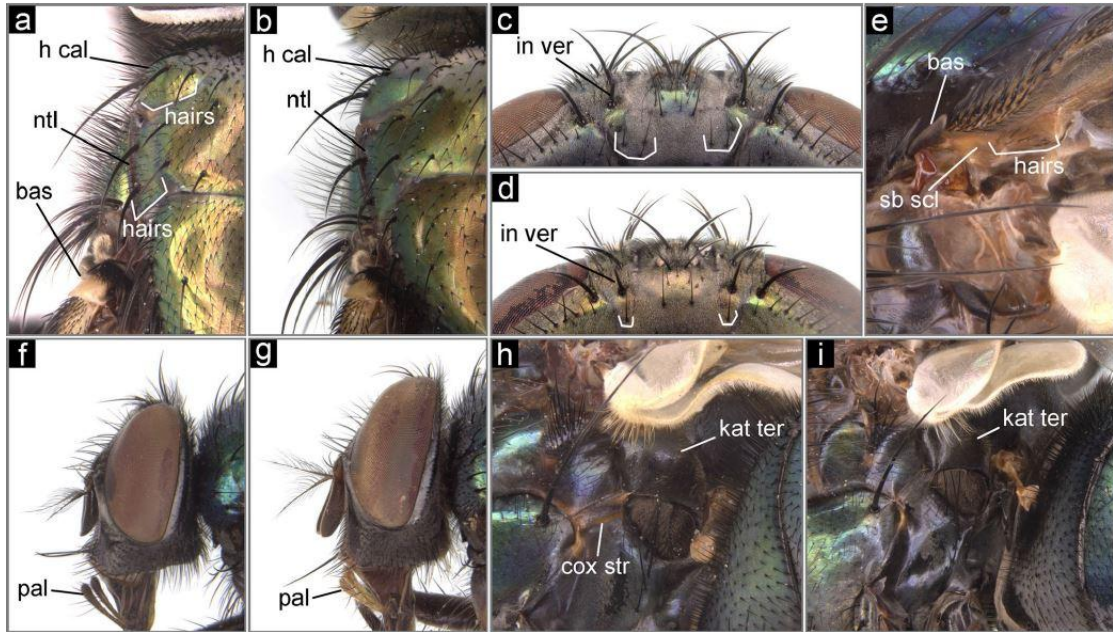


Figure 3: Les critères d'identification pour la détermination des différents genres et espèces de Diptères (Akbarzadeh et al., 2015).

2. L'identification des stades larvaires

L'identification des différents stades larvaires a été faite par l'observation des spiracles postérieures des larves sous le stéréo-microscope.

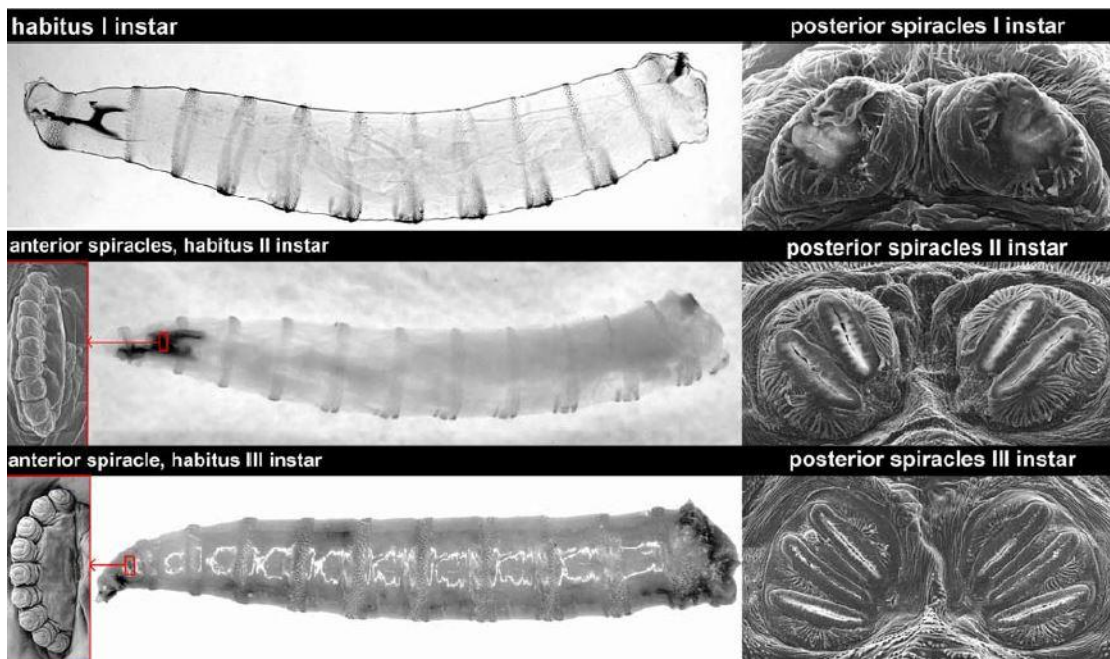


Figure 4: Comment reconnaître les différents stades larvaires ; I instar : L1, II instar : L2, III instar : L3 (Szpila 2010).

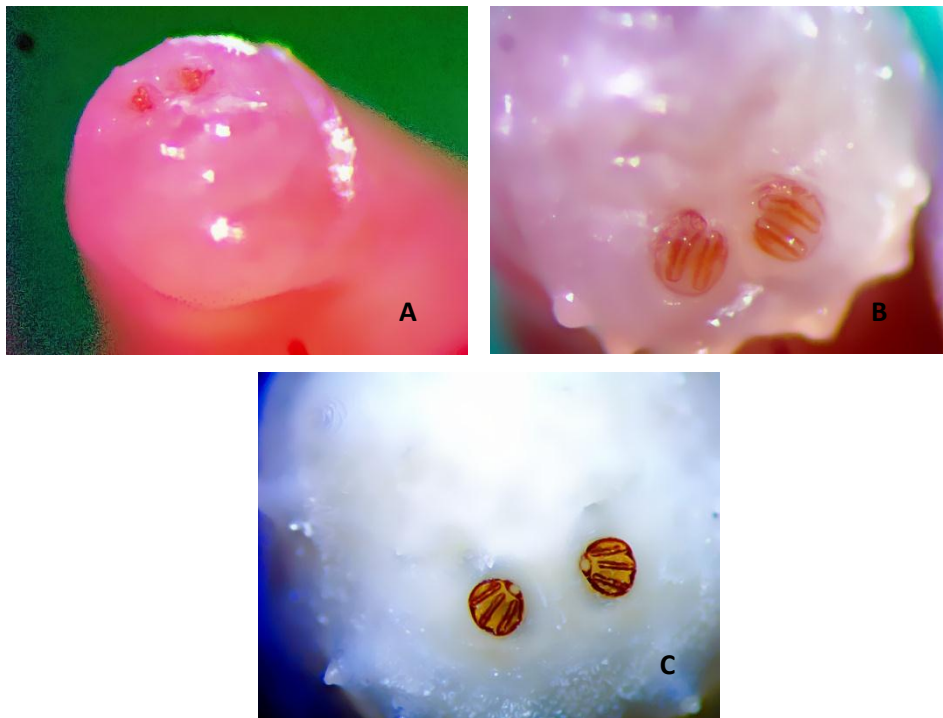


Figure 34: **A** : la larve du 1^{er} stade larvaire, **B** : la larve du 2^{ème} stade larvaire, **C** : la larve du 3^{ème} stade larvaire, (la couleur des images a été changée pour que les spiracles postérieures soient bien apparentes, dont la couleur d'origine des larves est crémeuse) (Originale).

3. La préparation des boîtes d'incubation



Figure 35 : Les boîtes d'incubation préparées avant les dépôts du substrat nutritif, en ajoutant de la terre, humidifiée avec de l'eau (la même procédure a été réalisée pour les boîtes d'élevage).