

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'impact de l'amitriptyline sur le taux de développement des larves de *Lucilia sericata* (Diptère, Calliphoridae)

Présenté par :

Soutenue publiquement le : 21/09/2016

Mlle BOURAOUA Zehor

Présidente :	Dr TAIL G.	MCA/BPO	Univ. Blida 1
Promoteur :	Dr BENDJOUDI D.	MCA / BPO	Univ. Blida 1
Co-promoteur :	M. DJEDOUANI B.	INCC/GN	Bouchaoui/Alger
Examinatrice :	Pr. KARA-TOUMI F/Z.	MCA/BPO	Univ. Blida 1

.....2015 /2016.....

Résumé

Les insectes nécrophages peuvent fournir des informations utiles sur le temps, le lieu et la cause du décès. En outre, ils peuvent servir de spécimens alternatifs fiables pour l'analyse toxicologique dans les cas où les tissus humains et fluides, normalement prises pendant les autopsies, ne sont pas disponibles, en raison de la décomposition du cadavre.

Ce travail, porte dans un premier lieu à étudier l'impact de l'amitriptyline sur le taux de développement des larves de *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae) élevés sur des tissus des quatre lapins (*Néo zélandais*) administré oralement par différentes doses d'amitriptyline: 32mg (L1), 48mg (L2), 64mg (L3). Le quatrième lapin (L4) qui a été utilisé comme un témoin. Les résultats ont montré que l'amitriptyline a eu un impact sur le développement des larves de *L.sericata*, En diminuant leur taille par rapport au témoin. Il affecte également sur le calcul de l'intervalle post mortem (IPM). Le résultat de la détection de la présence d'Amitriptyline dans les larves de *Lucilia sericata* par CG-MS, il révèle que l'Amitriptyline a été détectée dans toutes les larves testées, ce qui confirme la fiabilité de ces échantillons pour l'analyse toxicologique.

Mots clés : Amitriptyline, nécrophage, *Lucilia sericata*, larve, toxicologique, CG-MS,

Abstract :

Necrophagous insects may provide useful information about the time, place and cause of death. In addition, they can serve as reliable alternative specimens for toxicological analysis in cases where human tissue and fluids, normally taken during autopsies, are not available, due to decomposition of the corpse. At first place ; this work's aim is to study the effect of the amitriptyline on the growth rate of maggots of *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae) that have been feeding on the tissue of the four rabbits (*New zelandais*) administered orally with different doses of amitriptyline : 32mg (R1), 48mg (R2), 64mg (R3). The fourth rabbit (R4) which was used as a control. The results showed that the larval growth rate changed in dose dependant manner. The results showed that amitriptyline had an impact on the development of L.sericata larvae by diminishing their size compared with the control. It also affects the calculation of the post-mortem interval. The result of the detection of the presence Amitriptyline in *Lucilia sericata* larvae using GC-MS, it reveals that Amitriptyline was detected in all tested larvae, confirming the reliability of these specimens for toxicology analysis.

Keywords : Necrophagous insects, toxicological analysis, *Lusilia sericata*, Caliphoridae amitriptyline, CG-MS,

المخلص

قد توفر حشرات آكلات الجيف معلومات مفيدة عن زمان ومكان وسبب الوفاة وبالإضافة إلى ذلك فإنها يمكن أن تكون كعينات بديلة يمكن الاعتماد عليها لتحليل السموم في الحالات التي تكون فيها الأنسجة البشرية والسوائل التي تأخذ عادة خلال التشريح غير متوفرة نظرا لتحلل الجثة. هذا العمل يحمل في المقام الاول دراسة تأثير الأميتريبتيلين على يرقات من الخِشْفُ الرِّغْبِيّ (ذوات الجناحين: الخوتعيات) التي تم تغذيتها على أنسجة أربعة أرناب(نيوزلندا) تدار شفويا بجرعات مختلفة من الأميتريبتيلين : 32 مع(1/)، 48 مغ (2/)، 64 مغ (3/). و الارنب الرابع (4) استخدم كشاهد. وأظهرت النتائج أن الأميتريبتيلين كان لها تأثير على تطور الخِشْفُ الرِّغْبِيّ؛ عن طريق تقليص حجمها مقارنة مع الشاهد؛ كما يؤثر أيضا على حساب فترة ما بعد الوفاة. نتيجة الكشف عن وجود الأميتريبتيلين في الخشف الزغبي اليرقات بواسطة CG-MS . تكشف أن الأميتريبتيلين وجد في جميع اليرقات التي تم اختبارها، مؤكدا على موثوقية اعتماد هذه العينات لتحليل السموم.

الكلمات المفتاحية: حشرات آكلات الجيف، تحليل السموم، الخِشْفُ الرِّغْبِيّ، الخوتعيات، الأميتريبتيلين، CG-MS

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	2
1.1.- Entomologie médico légale :.....	2
1.1.1.- Historique sur l'entomologie médico-légale.....	2
1.1.2. Les arthropodes associés aux cadavres.....	3
1.1.2.1. - Les Calliphoridae.....	4
1.1.2.1.1 : <i>Lucilia sericata</i>	5
1.1.2.2.- Cycles biologiques des Diptères Calliphoridae.....	6
1.2.- Applications d'entomologie médico-légale.....	8
1.2.1.- Calcul de l'intervalle post-mortem.....	8
1.2.2.- L'entomotxicologie.....	9
1.2.2.1. Définition.....	9
1.2.2.2 : Historique.....	10
1.2.2.3: Détection des drogues et l'analyse toxicologique.....	11
1.2.2.4.- Effet des xénobiotiques sur le développement des insectes.....	14
1.3.- Procédures de prélèvement et d'analyse.....	15
1.3.1.- Collecte des échantillons entomologiques.....	15
1.3.2.- Prétraitement des échantillons pour le transport, la conservation et l'analyse.....	16
1.3.3.- Techniques analytiques.....	17
1.3.4.- La CG/MS.....	18
1.3.4.1. Principe de GC-MS.....	18
1.3.4.2. Instrumentation et travail du GC-MS.....	18
1.3.5. La substance utilisé.....	20
1.3.5.1. Amitriptyline.....	20
1.3.5.2. L'administration et le surdosage.....	21
Chapitre II : Matériels et Méthodes.....	22
2.1. Objet de l'étude.....	22
2.2.- Matériel.....	22
2.2.1: Matériels biologique :.....	22
2.2.1.1 : Le substrat nutritif.....	22
2.2. 1.2. : Matériels entomologiques.....	24
2.2.2 : Matériels non biologique.....	26

2.2.3. Equipement, Instrument, Consommable	26
2.3.- Méthodes de capture de <i>Lucilia sericata</i>	25
2.4.- expérimentation Entomotoxicologique	28
2.4.1. Source de nourriture	28
2.4.2. Stimulation pour la ponte	29
2.4.3. Mise en élevage	30
2.4.4. L'échantonnage des larves	31
Résultats et Discussion	39
3.1.- Les résultats du taux de croissance des larves.....	39
3.1.1.- La taille larvaire de la 1 ^{ère} répétition	39
3.1.1.1.- Après 24hd'incubation	39
3.1.1.2. Après 48h d'incubation.....	40
3.1.1.3.- Après 72h d'incubation.....	41
3.1.1.4.- Après 96 h d'incubation.....	42
3.1.1.5.- Après 120 h d'incubation.....	43
3.1.1.6.- Interprétation des résultats obtenus de différentes doses et du témoin pendant tout le cycle	43
3.1.2.- Les mesures effectuées sur la 2 ^{ème} répétition	44
3.1.2.1.- Après 24h d'incubation.....	44
3.1.2.2. Après 48h d'incubation.....	45
3.1.2.3.- Après 72h d'incubation.....	46
3.1.2.4.- Après 96 hd'incubation.....	47
3.1.2.5.- Après 120 h d'incubation.....	48
3.1.3.- Les mesures effectuées sur la 3 ^{ème} répétition.....	49
3.1.3.1.- Après 24hd'incubation.....	49
3.1.3.2. Après 48h d'incubation.....	50
3.1.3.3.- Après 72h d'incubation.....	51
3.1.3.4.- Après 96 h d'incubation.....	52
3.1.3.5.- Après 120 h d'incubation.....	53
3.2.- La taille moyenne des larves de différentes doses et du témoin de chaque répétition pendant la période d'expérimentation.....	54
3.3.- Le calcul de l'intervalle post-mortem	57
3.3.1.- Les résultats de calcul des degrés heures accumulées pour les 3 répétitions	57
3.3.1.1.- ADH de la 1 ^{ère} répétition	57
3.3.1.2.- ADH de la 2 ^{ème} répétition.....	58
3.3.1.3.- ADH de la 3 ^{ème} répétition.....	59

3.3.2.- Interprétation des résultats	59
3.4.- L'effet de l'amitriptyline sur le taux de développement de <i>L.sericata</i>	60
3.5.- L'analyse toxicologique	62
Conclusion générale	66
Recommandations	66
Références	67
Annexes	77

Titres des tableaux et des figures utilisés	
Liste des tableaux	
Tableau 01 : Les résultats de pesage des lapins.	22
Tableau 02 : le programme d'administration de l'amitriptyline aux lapins	28
Tableau 03 : Les différentes volumes de l'Amirymptyline a administrées chez les trois lapins	29
Tableau 04 : Plan d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 1ère répétition	33
Tableau 05 : Plan d'échantillonnage Dose 01 de la 1ère répétition	33
Tableau 06 : Plan d'échantillonnage dose 02 de la 1ère répétition	34
Tableau 07 : Plan d'échantillonnage dose 03 de la 1ère répétition	34
Tableau 08 : Plan d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 2ème répétition	34
Tableau 09 : Plan d'échantillonnage (Dose 01) de la 2ème répétition	35
Tableau 10 : Plan d'échantillonnage (Dose 02) de la 2ème répétition	35
Tableau 11 : Plan d'échantillonnage (Dose 03) de la 2ème répétition	35
Tableau 12 : Plan d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 3ème répétition	36
Tableau 13 : Plan d'échantillonnage (Dose 01) de la 3ème répétition	36
Tableau 14 : Plan d'échantillonnage (Dose 02) de la 3ème répétition	37
Tableau 15 : Plan d'échantillonnage (Dose 03) de la 3ème répétition	37
Tableau 16 : Paramètres de l'instrument GC-MS	38
Tableau 17 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation	39
Tableau 18 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 14 larves après 48h d'incubation	40
Tableau 19 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation	41
Tableau 20 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 10 larves après 96h d'incubation	42
Tableau 21 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures	43

prise sur 09 larves après 120h d'incubation	
Tableau 22 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation	44
Tableau 23 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 14 larves après 48h d'incubation	45
Tableau 24 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation	46
Tableau 25 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 10 larves après 96h d'incubation	47
Tableau 26 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 09 larves après 120h d'incubation	48
Tableau 27 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation	49
Tableau 28 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 14 larves après 48h d'incubation	50
Tableau 29 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation	51
Tableau 30 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 10 larves après 96h d'incubation	52
Tableau 31 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 09 larves après 120h d'incubation	53
Tableau 32 : Taille moyenne de différente dose et du témoin de la 1 ^{ère} répétition	54
Tableau 33 : Taille moyenne de différente dose et du témoin de la 2 ^{ème} répétition	55
Tableau 34 : Taille moyenne de différente dose et du témoin de la 3 ^{ème} répétition	57
Tableau 35 : Données de base pour <i>L. sericata</i> pour le calcul de l'IPM	58
Tableau 36 : Résultats de calcul de l'ADH de la 1 ^{ère} répétition	59
Tableau 37 : Résultats de calcul de l'ADH de la 2 ^{ème} répétition	59
Tableau 38 : Résultats de calcul de l'ADH de la 3 ^{ème} répétition	60
Tableau 39 : Moyenne générale des ADHs pour les 3 répétitions de chaque dose	60

Liste des figures	
Figure 01 : <i>Lucilia sericata</i>	5
Figure 02 : Cycle de developpement holometabole d'un diptere calliphoridae	7
Figure 03 : des composés médicamenteux recouvrés auprès des larves de Calliphoridae et Sarcophagidae	13
Figure 04 : diagramme schématique de CG-MS	18
Figure 05 : L'amitriptyline et le principal métabolite	20
Figure 06 : lapins « néo zélandais» de la race Albinos dans une cage métallique avec nourriture (Originale)	23
Figure 07 : <i>Lucilia sericata</i> femelle adulte	23
Figure 08 : Flacon de 20 ml d'amitriptyline	24
Figure 09 : le piège a été déposé à l'air libre	25
Figure 10 : Dimorphisme sexuelle au niveau des yeux : plus écartés chez la femelle que chez le mâle	26
Figure 11 : la boîte d'accouplement	27
Figure 12 : Administration du médicament par la voie orale	28
Figure 13 : les cachettes contenant le foie du témoin ont été déposées dans la cage pour stimuler la ponte.	29
Figure 14 : la boîte d'élevage (exemple : le témoin de la 1 ^{ère} répétition)	30
Figure 15 : Vue postérieure d'une larve de <i>Lucilia sericata</i> (Diptera : Calliphoridae) au deuxième stade larvaire (L2)	31
Figure 16 : Vue postérieure d'une larve de <i>Lucilia sericata</i> (Diptera : Calliphoridae) au troisième stade larvaire (L3)	31

Glossaire

- **Antemortem** : antérieur à la mort, avant la mort
- **Asticots** : les larves
- **Boulimie** : est un trouble complexe, multi-factoriel qui se caractérise concrètement par des crises compulsives où la prise alimentaire prend des proportions incontrôlables.
- **Coprophages** : consiste à consommer des matières fécales.
- **Dimorphisme sexuel** : est l'ensemble des différences morphologiques plus ou moins marquées entre les individus mâle et femelle d'une même espèce.
- **Eénurésie nocturne** : est une affection caractérisée par la survenue pendant le sommeil de mictions involontaires et inconscientes chez l'enfant de plus de cinq ans ou l'adulte.
- **Elution** : est le procédé dans lequel les solutés sont poussés à travers la phase stationnaire par un mouvement de la phase mobile (Skoog et al., 1996).
- **Emulsion** : est un mélange intime de deux substances liquides.
- **Extraction**: Procédé d'isolement d'un ou plusieurs composants de la masse de la matrice.
- **Gangreneuse** : qui se rapporte à la gangrène, nécrose des tissus par manque d'oxygène
- **Holométaboles**: métamorphose complète. individus immatures (larves, par exemple) ne ressemblent pas aux adultes (Elzinga, 2000).
- Homogénéité: Un matériau de consistance uniforme et la composition.
- **Intervalle Postmortem**: La longueur de temps entre la mort d'un individu ou d'un animal et la découverte du cadavre par les humains (Catts and Goff, 1992). Synonyme de temps écoulé depuis la mort, et le temps écoulé depuis le décès.
- **Larve poste- alimentation** (post- feeding) : Stade comportemental distinct dans le troisième stade d'une mouche. Au cours du stade poste- alimentation, les larves de mouche cessent de se nourrir, et migrent loin de la source d'alimentation. Pendant la phase de poste- alimentation, le contenu de l'intestin est digéré, et une seule couche de cellules graisseuses est déposée sous la cuticule (Greenberg and Kunich, 2002).
- **Larvipare** : les œufs éclosent dans la femelle (Greenberg and Kunich, 2002).
- **Mue**: Le processus par lequel les insectes et autres arthropodes ont versé leur exosquelette. (Elzinga, 2000).
- **Nécrophages** : qui se nourrit de cadavres.

- **Nécrose** : forme de mort cellulaire « accidentelle » causée par une altération physique, une toxine ou par certaines infections bactériennes ou virales.
- **Névralgie post-herpétique** (NPH) est une complication douloureuse et réfractaire de l'herpès zostère.
- **Ovipare** : Les insectes pondent des œufs
- **Oviposition** : l'acte de pondre des œufs (Greenberg and Kunich, 2002).
- **Poikilothermes** Un organisme qui ne dispose pas d'un système de régulation de température, et par conséquent, a une température corporelle qui varie avec la température de son environnement (Elzinga, 2000).
- **Recaptage** : pompage et stockage d'une substance dans les espaces intercellulaires par les terminaisons des fibres nerveuses.
- **Saprophages** : qui se nourrit de substances organiques en décomposition.
- **Spiracle** : Une ouverture dans l'extrémité arrière d'un corps de la larve à travers laquelle l'air passe dans la trachée pour les tubes de respiration de l'insecte (Greenberg and Kunich, 2002).
- **stupéfiant**, aussi appelé drogue
- **Ubiquiste** : se dit des espèces que l'on rencontre dans des milieux écologique très différents.
- **Ulcère** : est une plaie de la peau, des yeux ou d'une muqueuse, accompagnée d'une désintégration du tissu.
- **volume de distribution** : est le volume apparent, dans lequel une substance (par exemple un médicament) est distribuée, après l'absorption et la répartition de différents tissus dans le corps (Klaassen and Watkins, 1999).
- **xénobiotique** : composés étrangers au système biologique. Se réfère généralement à des composés de l'homme fait résistantes ou récalcitrants à la biodégradation et / ou décomposition.

Liste des abréviations

- **AMT** : Amitriptyline
- **ATC** : Antidépresseur tricyclique
- **CCM** : la chromatographie sur couche mince
- **F** : Feeding (anglais), stade d'Alimentation (français)
- **GC-MS** : Chromatographie de phase gazeuse – spectrophotométrie de masse
- **GC** : chromatographie en phase gazeuse
- **HPLC / SM** : Chromatographie en phase liquide à haute performance / la spectrométrie de masse

- **HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance
- **IPM** : Intervalle post-mortem
- **PF** : Post feeding (anglais) Post alimentation (français)

- **RIA** : Dosage radio-immunologique
- **FPIA** : *Fluorescence Polarization Immunoassay*. Dosage immunologique par polarisation de fluorescence

Introduction

Introduction

L'analyse des insectes nécrophages, pour détecter les substances toxiques et d'étudier les effets sur le développement des insectes, est connu comme entomotoxicologie (Goff et Lord, 2001). Lors d'une scène de crime, les insectes, en particulier les larves, peuvent être utiles en tant que source d'information sur l'empoisonnement et / ou la consommation de drogues d'une victime (Gennard, 2012). Les larves qui se nourrissent de cadavres peuvent séquestrer des médicaments et des substances toxiques qui ont été ingérés par la personne décédée (Wyss et Cherix, 2006).

Un corps dans un état de décomposition avancée ou qui sont squelettés peuvent être difficiles à examiner pour les substances toxicologiquement importantes due à l'absence de sources appropriées tels que les tissus, le sang ou l'urine. Cependant l'analyse des insectes rencontrés peut permettre une évaluation toxicologique de la cause du décès (Nolte *et al.*, 1992; Goff et Lord, 1994, 2001; Introna *et al.*, 2001; Campobasso *et al.*, 2004).

Des médicaments ou des substances toxiques ingérées peuvent influencer le développement des insectes nécrophages (O'Brien et Turner, 2004).

Ce travail est une suite de recherche de celui réalisé pour la première en Algérie par Azzouzi (2015) comme discipline du domaine de la criminalistique, en tant qu'outil dans la science médico-légale. Dans cette étude répond ainsi à un double objectif de l'effet de l'amitriptyline sur le taux de développement de la mouche *Lucilia sericata* et la détection ce xénobiotique dans les larves de la même espèce de Diptera.

Ce manuscrit comporte trois chapitres dont le premier se veut une compilation de données bibliographiques sur l'entomologie médicale, et son application, ainsi sur les procédures d'analyse et d'analyse. Le second chapitre est consacré au matériel utilisé de même que les différentes analyses effectuées lors de la réalisation de la partie expérimentale. Le dernier chapitre regroupe les résultats avec leur discussion. Enfin, le travail sera finalisé par une conclusion suivie par des perspectives.

Chapitre I

1.1.- 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 (Hall 2001). Le but principal de l'entomologie médico-légale est d'établir l'intervalle post-mortem (PMI), c.à.d. le temps écoulé depuis la mort (Nuorteva 1977, Greenberg 1991, Amendt *et al.* 2004, 2007, Lefebvre and Gaudry 2009). Elle n'est pas la seule utilisation des insectes en criminalistique. En effet, les insectes peuvent aussi donner des indices à l'entomologiste forensique en ce qui concerne le lieu du décès, s'il y a eu ou non dissimulation du corps ou encore sur d'éventuels déplacements *postmortem* du cadavre. Les insectes peuvent aussi fournir des informations sur les causes du décès et même en l'absence de cadavre, révéler l'identité de la personne décédée en analysant l'ADN présent dans le système digestif des larves. L'utilisation des insectes en tant que bio-indicateurs et auxiliaires miniaturisés de police se révèlent être précieuse et non négligeable (Dekeirsschieter, 2012).

1.1.1.- Historique sur l'entomologie médico-légale

La première utilisation d'insectes dans les enquêtes sur la criminalité remonte au 13^{ème} siècle d'un village chinois (McKnight, 1981). Pendant l'époque médiévale, la corrélation entre les asticots sur un cadavre et la ponte des mouches adultes n'a pas été reconnue, bien que l'illustration réaliste et détaillée des cadavres contenant des asticots ne fût pas inhabituelle (Amendt *et al.*, 2004). Au début du 19^{ème} siècle, il a été noté que les mouches ont été attirées par les cadavres à un stade très précoce de la décomposition (Anonymous 1814). La première application de l'entomologie médico-légale dans une salle d'audience française en 1850 peut être considérée comme une percée pour cette discipline (Bergert, 1855). Kraemer (1857) décrit les possibilités et les problèmes associés à l'utilisation des insectes pour l'estimation du PMI (Intervalle Post-Mortem). Yovanovich (1888) et Mégnin (1894) ont été les premiers experts légistes qui ont tenté d'évaluer la succession d'insectes sur les cadavres, adéquatement établir la science de l'entomologie médico-légale. Au cours des trois dernières décennies, l'utilité de l'entomologie médico-légale dans les enquêtes de la mort a été largement documenté par plusieurs cas d'études dans les pays occidentaux principalement l'Europe et les États-Unis (Singh et Sharma., 2008). (Nuorteva *et al.* (1967) ont été parmi les premiers à utiliser l'entomologie médico-légale pour la détermination de PMI en Europe. Au début du 21^{ème} siècle, l'entomologie médico-légale est venue à être acceptée comme un outil judiciaire important dans de nombreux pays (Goff, 1991 ; Campobasso *et al.*, 2001).

1.1.2.- Les arthropodes associés aux cadavres

Un cadavre en décomposition représente une source temporaire et changeante de nourriture pour une communauté distincte et variée d'organismes (Putman 1983 ; Kocarek, 2003).

Des centaines d'espèces d'arthropodes vont être attirées par un corps en décomposition, principalement des Diptères, des Coléoptères et leurs larves (Leclercq, 1996 ; Amendt et al., 2004 ; Wyss et Cherix, 2006 ; Benecke, 2007). Les arthropodes vont se nourrir ou se reproduire dans et sur le corps, suivant la biologie de l'espèce, leur spécialisation alimentaire et le stade de décomposition du corps (Kocarek, 2003 ; Benecke, 2007).

En fonction de leur régime trophique, les arthropodes que l'on retrouve sur un cadavre ont été classés en cinq groupes écologiques différents (Amendt et al., 2004 ; Arnaldos et al., 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

- **Les espèces nécrophages** : Elles arrivent les premières sur le cadavre et s'en nourrissent en se succédant suivant les stades biochimiques de sa dégradation (Amendt et al., 2004 ; Arnaldos et al., 2005 ; Wyss et Cherix, 2006). Les plus importants sont les Diptères Calliphoridae, Muscidae, Sarcophagidae, Fanniidae, Piophilidae et Phoridae mais aussi des Coléoptères Dermestidae, Silphidae, Cleridae et Nitidulidae (Leclercq, 1996 ; Wyss et Cherix, 2006).

- **Les espèces nécrophiles** : sont 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** : Elles se nourrissent aussi bien du cadavre que de ses habitants (nécrophages et nécrophiles). Des Hyménoptères comme les guêpes et fourmis ainsi que certains Coléoptères font partie de ce groupe (Leclercq, 1996 ; Amendt *et al.*, 2004 ; Arnaldos et al. 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

- **Les espèces opportunistes** : Elles utilisent le corps comme une extension de leur environnement (Comme refuge ou source de chaleur par exemple). On rencontre des collemboles, des papillons et des araignées (Leclercq, 1996 ; Amendt *et al.*, 2004 et Arnaldos et al., 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

- **Les espèces accidentelles** : Leur présence, au niveau du cadavre, est simplement due au hasard (Arnaldos *et al.*, 2005).

Dans le cadre de l'entomologie criminelle, les deux premiers groupes sont les plus importants. Ce sont essentiellement des Diptères et des Coléoptères (Leclercq, 1996 ; Amendt *et al.*, 2004). Les espèces nécrophages vont apparaître selon une séquence plus ou moins prévisible ; elles sont les plus importantes pour établir le moment de la mort (Arnaldos *et al.*, 2005). Les espèces nécrophiles et omnivores vont apparaître plus ou moins en même temps et vont rester sur le corps jusqu'à la fin de l'activité entomologique (Arnaldos *et al.*, 2005)

1.1.2.1.- Les Calliphoridae

La famille Calliphoridae est connue comme le colonisateur initial dans la succession des faunes sur des cadavres humains (Smith, 1986). Par conséquent, ils sont les indicateurs médico-légaux primaires et les plus précis du temps de la mort et leur taux de développement sont nécessaires pour permettre plus précises estimation PMI (Grassberger et Reiter, 2001). Les calliphoridae sont des mouches de taille moyenne à grande variant de 4 à 16 mm. Souvent les adultes sont en partie bleu ou vert métallique, ou alors on trouve une longue pilosité dorée sur le thorax (Wyss et Cherix, 2006). Les larves sont des asticots de forme cylindro-conique. Sur le dernier segment on trouve des tubercules entourant la plaque stigmatique. Les calliphoridae sont des mouches assez rapides avec un vol plutôt bruyant (Wyss et Cherix, 2006). Elles sont classiquement les premières à être attirées par un cadavre, dès le décès de la victime et même lors de son agonie (Amendt *et al.*, 2004). Elles sont d'abord attirées par le sang frais ou coagulé et l'odeur de la décomposition puis elles pondent leurs œufs, même au niveau des vêtements. Elles se dirigent pour pondre vers les orifices naturels tels que les yeux, la bouche et le nez ou les orifices uro-génitaux (si la personne est dénudée) car les premières larves (L1) sont incapables de percer la peau immédiatement après leur éclosion (Amendt *et al.*, 2004 ; Wyss et Cherix, 2006 ; Capinera, 2008). La grande majorité des espèces sont ovipares mais quelques unes sont larvipares, c'est à dire que la femelle « pond » des larves (Wyss et Cherix, 2006). Les larves sont principalement nécrophages, coprophages et saprophages (Wyss et Cherix, 2006).

Ces « mouches à viande » ont un vol rapide et bruyant. Elles se nourrissent de liquides variés, provenant de matière organique en décomposition (viande, fruits...) ou encore des fleurs (nectar). De l'eau sucrée les attirent facilement. Les femelles ont toujours besoin d'une nourriture protéinée nécessaire à la maturation des œufs (Lemonnier *et al.*, 2012).

a. *Lucilia sericata* : *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae), Ceci est communément appelé les mouches verte (Gennard, 2007), sont de petite taille (6-9 mm) et préfèrent les zones ensoleillées en plein air (Roe ; 2014). Elles sont côtières dans leur distribution et préfèrent les climats chauds et humides (Valachová *et al.*, 2013). *L. sericata* est une mouche nécrophage qui est important dans la médecine légale, parce qu'il est utilisé comme un indicateur biologique dans l'estimation de l'intervalle post-mortem (PMI) (Anderson, 2000; Tarone et Foran, 2008; Zurawski *et al.* 2009). Les études sur le cycle biologique de *L. sericata* ont été menées précédemment sur des échantillons prélevés sur des cadavres en décomposition pour déterminer le PMI (Kamal, 1958; Greenberg, 1991; Anderson, 2000; Grassberger et Reiter, 2001). Il a également un rôle important dans la médecine humaine car ses larves sont utilisés pour la cicatrisation des lésions chroniques qui ne répondent pas aux traitements conventionnels, tels que les ulcères contenant du tissu nécrotique ou gangreneuse (Church et Courtenay, 2002; Cartier et Combemale, 2008; Gupta, 2008).

Ils sont ubiquistes, couvrant un large éventail de paysages, et peuvent être l'une des espèces de caliphoridae les plus courants dans le monde (Hall, 1948; Greenberg, 1991; Byrd et Castner, 2010).

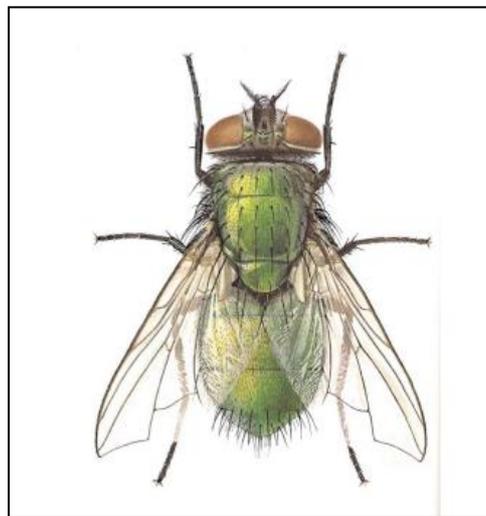


Figure 1 : *Lucilia sericata* (Greenberg 1971).

1.1.2.2.- Cycles biologiques des Diptères Calliphoridae

Selon Greenberg et Kunich (2002), tous les insectes sont poïkilothermes, en conséquence, leur taux de développement est principalement dépendante 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 un stade adulte. Le taux de progression peut être affectée par un certain nombre de facteurs, y compris l'humidité, la température, la saison, l'emplacement et d'autres. Par conséquent, il est difficile de déterminer avec précision la durée de la vie (Fig. 2).

- **Les œufs** : Diptères tend à pondre des œufs en lots et amas de œufs sont pondus dans des endroits sur le cadavre qui confèrent une protection, l'humidité et la nourriture. En général, le nombre d'œufs pondus est d'environ 150-200 (Gennard, 2007). L'œuf de calliphoridae est généralement très brillant et blanc, d'une taille allant d'environ 0,9 mm à plus de 1,50 mm de long et 0,3-0,4 mm de large (Rognes, 1991). L'émergence du premier stade larvaire de l'œuf est appelé éclosion (Gennard, 2007).

- **Les larves du premier stade larvaire (L1)** : extrêmement petit et vorace alimentation, la larve augmente généralement la 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)** : à ce stade, la larve se développe à environ 8 mm de longueur (Greenberg et Kunich, 2002). D'après Haskell *et al.*, (1997), plus l'alimentation est réalisée à ce stade par rapport au premier stade larvaire, principalement en raison de la taille accrue des larves. Le deuxième stade est généralement la plus courte de la durée des trois étapes d'alimentation, d'une durée d'environ 8 à 12 heures dans la plupart des espèces à des températures modérées (Haskell *et al.*, 1997). Cette étape se termine par une autre mue.

- **Le troisième stade L3** : Selon Anderson (2000), cette étape peut être séparée en deux étapes distinctes: stade comportemental alimentation et stade post d'alimentation. Pendant l'étape d'alimentation, les larves se nourrissent voracement jusqu'à ce qu'ils atteignent une taille maximale, à ce stade, l'arrêt d'alimentation de larves errer loin de la source de nourriture et de trouver un endroit sûr pour se transformer en pupes. Cette errance est la phase post d'alimentation du troisième stade larvaire (Anderson, 2000). Le stade errant peut prendre un certain nombre de jours où les larves commencent leur nymphose (Greenberg et Kunich, 2002). Cette errance est la phase post d'alimentation du troisième stade larvaire (Anderson, 2000).

- **Nymphose** : Pendant la période de nymphose la structure de l'adulte est formée à l'intérieur. Lorsque la transformation a terminé les adultes émergent des pupes (Greenberg et Kunich, 2002).

Certains facteurs biotiques comme inter-densité des larves et / ou de la compétition intra-spécifique influent également sur la durée totale du développement (Ullyett 1950 ; Hanski 1987 ; Goodbrood and Goff 1990 ; Wells and Greenberg 1992 ; Von Zuben *et al.* 2000).

Pourtant, les facteurs abiotiques peuvent influencer sur ces insectes le temps de développement conduisant à des erreurs sur l'estimation PMI, comme la température (Logan *et al.* 1976; Reibe *et al.* 2010 ; Ngoen-klan *et al.* 2011 ; Nassu *et al.* 2014), la photopériode (Mello *et al.* 2012), l'humidité (Greenberg 2002), les caractéristiques des différents substrats qui sont utilisés pour la reproduction des insectes (Day et Wallman, 2006; Zuha *et al.* 2012; Niederegger *et al.* 2013). Et la présence de substances toxiques dans les substrats (Goff and Lord 1994; Souza *et al.* 2011).

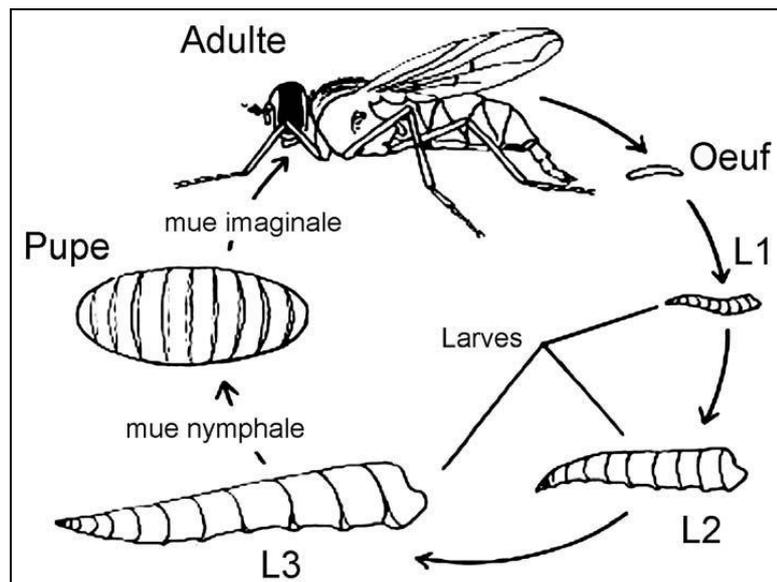


Figure 2 : Cycle de développement d'un diptère calliphoridae (Charabidze, 2008).

1.2.- Applications d'entomologie médico-légale

La première application qui nous vient à l'esprit quand on parle d'entomologie forensique est l'utilisation des insectes pour estimer la date du décès. On parle plus précisément d'intervalle post-mortem (IPM), celui-ci se définit comme étant le laps de temps écoulé entre la date du décès et la date de découverte du corps (Nuorteva, 1977 ; Benecke 2004 ; Wyss et Cherix, 2006). Cependant les insectes récoltés sur le lieu du décès et/ou sur le corps peuvent également servir à déterminer les causes de la mort notamment dans les cas de décès par substances toxiques (drogues, poisons, toxines, alcool, etc.), on parle d'entomotoxicologie (Beyer *et al.*, 1980 ; Bourel *et al.*, 2001b ; Introna *et al.*, 2001 ; Amendt *et al.*, 2004).

1.2.1.- Calcul de l'intervalle post-mortem

On définit l'IPM comme étant l'intervalle de temps entre le moment de la mort et la découverte du cadavre (Wyss et Cherix, 2006). Il existe deux méthodes, ayant pour but de déterminer l'IPM, en se basant sur les insectes (Wyss et Cherix, 2006).

La première méthode se base sur le cycle de développement des Diptères nécrophages (presque uniquement des Calliphoridae). Pour être correcte, cette méthode doit tenir compte de nombreux facteurs tels que l'accessibilité du corps aux insectes dès le décès et des conditions climatiques favorables à l'activité des mouches. En effet, on part du postulat que si les mouches ont accès au substrat, le jour des premières pontes correspond au jour du décès (Dekeirsschieter, 2007).

La deuxième méthode utilise les escouades pour déterminer l'IPM, selon Wyss et Cherix, cette méthode n'est pas pertinente et est peu fiable [Wyss et Cherix, 2006]. En effet, la succession chronologique des espèces sur un cadavre n'est pas immuable. Le taux de décomposition du corps est variable de même que le cycle de développement de l'insecte, tout deux fortement influencés par les conditions climatiques locales (Dekeirsschieter., 2007).

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).

- L'équation utilisée pour calculer les degrés-heures accumulés est:

$$\text{Temps (heures)} \times (\text{Température} - \text{température seuil minimum}) = \text{ADH} \quad (\text{Gennard.,2012})$$

La limite inférieure de température est appelée température seuil minimum. Cette valeur est également propre à chaque espèce (Greenberg et Kunich 2002 ; Amendt *et al.*, 2004, 2007).

1.2.2.- L'entomotoxicologie

L'utilisation d'insectes nécrophages comme spécimens de données qualitatives pour la détection de la drogue est bien documenté et largement acceptée. En outre, les modèles de colonisation d'insectes sont les facteurs les plus courants utilisés pour l'intervalle post-mortem (PMI) estimation, en particulier lorsque la découverte du cadavre est retardée et les tissus mous se décomposent (Kharbouche. ; *et al* 2007).

Les larves de diptères se nourrissent sur les tissus décomposés, qui peuvent contenir des substances xénobiotiques en raison de l'exposition au médicament antemortem (Kharbouche. ; *et al* 2007).

L'analyse des larves trouvées dans les cadavres peut, par conséquent, contribuer à l'identification qualitative des médicaments présents dans le corps (Kintz *et al.*, 1990 a ; Kintz *et al* 1990b., Kintz *et al* 1994., Introna *et al.* ;1990., Nolte *et al* 1992). En outre, des médicaments dans les tissus putréfiés peuvent avoir une influence sur le développement des diptères nécrophages qui peut affecter l'estimation du PMI (Goff *et al.*, 1991 ; Goff *et al.* ; 1992 ; Goff *et al.*,1993 ; Bourel. ;1999 ; Carvalho., 2001 ; O'Brien *et al.*, 2004).

1.2.2.1.- Définition

L'Entomotoxicologie est l'analyse des insectes nécrophage pour détecter les substances toxiques et d'étudier leurs effets sur le développement des insectes (Goff et Lord, 2001). Elle peut aider les pathologistes à l'intoxication stupéfiante ou la drogue des cadavres. En effet, les spécimens d'insectes peuvent servir d'échantillons fiables de rechange pour l'examen des substances toxicologiquement pertinentes en l'absence de sources appropriées (tissus, sang) (Goff et Lord, 2001 ; Campobasso *et al.*, 2004). Les insectes rencontrés ou leurs larves peuvent révéler l'évaluation toxicologique de la cause du décès (Goff et Lord., 2001 ; Campobasso *et al.*, 2004), car ils se nourrissent sur les cadavres et peuvent séquestrer des médicaments et d'autres substances toxiques, ingestion contraire de la personne décédée

(Singh et Sharma., 2008). Les spécimens d'insectes et incorporent bio-accumulent métabolites chimiques des drogues dans leurs propres tissus tels que les barbituriques, la cocaïne, les amphétamines et même des poisons. Les tissus d'insectes ou même remaniant de pupes / spécimens larvaires peuvent être macérés et traitées pour détecter ces substances, même après plusieurs années de mort (Singh et Sharma, 2008). Mais le médicament ou toxique ingéré peuvent influencer ou modifier le développement des mouches nécrophages, provoquant ainsi un risque de calcul incorrect PMI (Singh et Sharma, 2008). Donc, avant d'utiliser les spécimens d'insectes pour la détermination PMI, l'entomologiste légiste devrait être conscient de l'ampleur des effets des médicaments et de toxines sur leur taux de développement (Goff et Lord., 1994) ou sur leur invasion retardée des tissus (Gunatilake et Goff., 1989).

Deuxièmement, l'absence de médicament dans les larves peut ne pas indiquer que le médicament n'a pas été présent dans les tissus cadavériques (Sadler *et al.* 1997a, 1997b). Ainsi l'analyse chimique des asticots trouve sur, dans ou autour des cadavres peut révéler la présence de médicaments / produits chimiques / poisons spécifiques, en particulier dans les cas où aucun des tissus humains sont disponibles aux fins d'enquête (Singh et Sharma, 2008).

1.2.2.2.- Historique

Les premiers rapports ont été décrits par Sohal et Lamb à la fin des années 1970. Ces auteurs ont démontré l'accumulation de différents métaux, dont le cuivre, le fer, le zinc et le calcium, dans les tissus des mouches adultes (Sohal et Lamb, 1977 ; Sohal et Lamb, 1979).

En 1982, Nuorteva et Nuorteva décrit la récupération du mercure provenant de diverses espèces d'asticots de Calliphoridae nourrir sur les tissus de poissons contenant des concentrations connues de mercure (Nuorteva et Nuorteva, 1982).

En 1985, Marcel Leclercq fût le premier à démontrer la présence d'arsenic chez des Diptères lors d'un empoisonnement (Leclercq et Brahy, 1985, Introna *et al.*, 2001).

D'autres recherches ont été menées et 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, 1990c ; Sadler *et al.*, 1995), l'amitriptyline (Goff *et al.*, 1993), 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).

1.2.2.3.- Détection des drogues et l'analyse toxicologique

Déjà à la fin des années 1970, Sohal et Lamb (1977, 1979) ont démontré l'accumulation de divers métaux, y compris le cuivre, le fer et le zinc chez les adultes de *Musca domestica* Linnaeus (Muscidae). Nuorteva (1982) ont rapporté la présence de mercure dans les larves, pupes et adultes de Calliphoridae élevés sur le mercure contenant du poisson sous forme méthylé. Le mercure a également été détecté dans les Staphylinidae antitadant sur les larves de diptère élevées sur les poissons. Ces expériences entomotoxicologique ont été appliquées au cas médico-légal d'un cadavre féminin découvert dans la décomposition avancée dans une zone rurale de la Finlande et largement colonisé par les larves diptères. La faible concentration de mercure mesurée par l'analyse toxicologique des mouches adultes a permis de localiser la zone géographique où la victime est venue, une zone relativement libre de la pollution par le mercure.

En ce qui concerne la détection des poisons, dès 1958, Utsumi (1958) ont observé que les diptères ont été attirés d'une manière différente par des carcasses de rats en fonction du poison causant la mort. En 1985, Leclercq et Brahy (1985) ont montré d'abord la présence d'arsenic dans les diptères des familles de Piophilidae, Psychodidae et fanniidae dans un cas d'empoisonnement à l'arsenic a eu lieu en France. Dans un empoisonnement suicidaire, Gunatilake et Goff (1989) détectés organophosphates (malathion) dans les asticots de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Calliphoridae) et *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Calliphoridae) soumis à des analyses toxicologiques en utilisant GC.

En ce qui concerne la détection des médicaments sur ordonnance, Beyer *et al.* (1980) a illustré le suicide avec des barbituriques d'une femme de 22 ans trouvée dans la squelettisation initiale, 14 jours après qu'elle avait été vu vivant. En raison de la décomposition avancée, non fluides organiques et / ou des tissus sont disponibles pour l'analyse toxicologique. Il les plus représentatives larves de *Macellaria cochliomyia* (Fabricius) (Calliphoridae) ont été analysé par GC et TLC, les résultats ont révélé la présence de phénobarbital. D'autres cas illustrant le potentiel d'entomotoxicologie dans les cas médico-légaux sont décrits par Kintz *et al.* (1990a). Dans un cadavre, a trouvé environ 2 mois après décès, analyse toxicologique par chromatographie en phase *liquide* de certains organes (coeur, poumons, foie et des reins) et des larves Calliphoridae a montré la présence de cinq médicaments sur ordonnance parmi lesquels les benzodiazépines (triazolam, oxazépan), barbituriques (phénobarbital) et les antidépresseurs tricycliques (alimémazine et clomipramine). L'analyse comparative des résultats toxicologiques ont montré une plus grande sensibilité de la méthode utilisant des

larves diptères comme échantillons plutôt que des tissus de cadavres. Triazolam, en fait, n'a pas été détecté dans la rate et les reins, mais seulement dans les asticots. Dans d'autres cas, Kintz et al. (1990c) a établi une corrélation entre les concentrations des médicaments dans les asticots et les tissus humains. Ils ont détecté bromazépam et lévomépromazine en matière cérébrale, de la clavicule et les larves *Piophilidae* (*Piophilidae*) trouvées dans les restes humains complètement pourris.

Les mêmes auteurs (1990b) détectés morphine et phénobarbital à partir de larves Calliphoridae qui avait mis au point sur le cadavre d'un abuseur d'héroïne chronique trouvé putréfié environ 10 jours après la mort et des organes internes (sang, foie, le cœur, les reins et le cerveau). Les deux substances ont été analysées en utilisant un CG liquide et l'immunodosage par *polarisation de fluorescence* (FPIA). Toujours par FPIA, Introna et al. (1996) a obtenu des résultats positifs sur pupes vide de *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Calliphoridae) qui avaient été élevés sur des substrats contenant des concentrations connues de morphine (supérieure à 10 mcg / g). Wohlenberg et al. (1992) identifiés le nortriptyline par GCMS de larves trouvées sur les restes squeletté d'un homme de 40 ans et sur des fragments de muscles, les os, la peau et les cheveux.

Un autre des études analytiques a été réalisée en, par Sadler et al. sur trois cadavres humains, la cause du décès a été déterminée à l'auto-empoisonnement (Fig. 3). Les larves de *Calliphora vicina* ont été recueillies à partir des cadavres et analysées en utilisant deux techniques, GC / MS a été utilisé pour détecter et quantifier l'amitriptyline qui a révélé être à une concentration de (0,10µg / g). HPLC a été utilisée pour détecter et quantifier d'autres composés, Les résultats ont montré la présence de témazépam (0,52 µg / g), la trazodone (0,13 µg / g), la trimipramine (0,28µ g / g).

Calliphora vicina a été utilisé dans un travail expérimental réalisé par O'Brien et Turner (2004) dans le but de tester la possibilité d'identifier et de quantifier certains médicaments et les barbituriques par HPLC. Un muscle d'agneau a été utilisé comme source de nourriture pour nourrir les larves. Montant différent de acétylsalicylique (aspirine), le paracétamol, le sulfate d'amphétamine et de trois barbituriques différentes; barbital, le phénobarbital et amylobarbitone ont été homogénéisée et ajouter à la source de nourriture. Les résultats de l'analyse par HPLC ont montré que la propriété physico-chimique de chaque substance a un impact sur le processus de bioaccumulation dans le système des larves. Certaines des substances (paracétamol et l'aspirine) n'ont pas pu être détectées dans l'échantillon de larves

qui limite l'utilisation de larves comme source d'échantillon pour analyse toxicologique. O'Brien et Turner (2004) ont conclu que «Les résultats de l'analyse HPLC a montré que la propriété physico-chimique de chaque substance a eu un impact sur le processus de bioaccumulation dans le système des larves". Wilson *et al.* (1993) explique la non détection de ces substances par les larves été capable de métaboliser et d'éliminer rapidement de leur système.

Le obtenu par O'Brien et Turner (2004) et d'après ce que Wilson *et al.* (1993), il ne serait pas possible de détecter les deux cibles antidépresseur de cette étude dans les deux échantillons de larves pour la raison; les larves peuvent métaboliser et éliminer les deux composés rapidement de leur corps, soit parce que la concentration peut être inférieure à la limite de la détection. La première est très peu probable parce que dans d'autres études, il a été montré qu'il était possible de détecter à la fois l'amitriptyline et la nortriptyline dans les larves. Pour éviter le deuxième problème, il était prévu de recueillir un nombre important de larves par échantillon alors concentré l'échantillon avant de l'analyser par HPLC.

Calliphoridae	Sarcophagidae
Alimenmazine	Amitrptyline
Amitrptyline	Barbiturates
Arsenic	Cocaine (benzoylecgonine)
Barbiturates	Heroin
Bromazepam	Malathion
Clomipramine	Methamphetamines
Cocaine (benzoylecgonine)	Mercury
Laudanum	phencyclidine
Levomepromazine	3,4-Methylenedioxymethamphetamine
Mercury	
Morphine	
Oxazepam	
Phenobarbital	
Triazolam	

Figure 3 - Des composés médicamenteux recouverts auprès des larves de Calliphoridae et Sarcophagidae (Byrd et Peace, 2011)

1.2.2.4.- Effet des xénobiotiques sur le développement des insectes

Des études antérieures ont porté sur l'utilisation potentielle des insectes comme des spécimens alternatifs pour les analyses toxicologiques; Les résultats démontrent l'utilité de tester les insectes associés aux restes décomposés (Introna *et al.*, 2001). Un médicament ou une toxine peuvent être détectés dans les larves lorsque son taux d'absorption est supérieure à la vitesse d'élimination, mais il ne sait pas encore exactement comment bioaccumulent de larves ou d'éliminer la drogue, et la façon dont celles-ci affectent le développement des larves (Introna *et al.*, 2001).

Les effets des médicaments et des toxines sur le taux de développement des diptères est une question primordiale pour résoudre avant d'utiliser les asticots pour la détermination PMI (Introna *et al.*, 2001). L'impact de la cocaïne et son principal métabolite benzoylecgonine sur le développement de *Boettcher Isca peregrina* (diptères: Sarcophagidae) a été étudiée par Goff *et al.* (1989). Les larves ont été élevées sur les tissus provenant de trois lapins différents qui ont été injectés avec 35 mg, 69 mg ou 137 mg de cocaïne. Ces doses ont été calculées pour représenter sub-létale médiane, sub-létale, létale médiane, et des doses létales médianes deux fois, respectivement. Le deuxième et le troisième stade larvaire élevé sur des tissus de lapin contenant des produits métaboliques des doses létales et des doses létales médianes deux fois de la cocaïne développé 12 à 18 heures plus rapidement que les larves élevées sur le tissu de lapin dépourvu de cocaïne ou les tissus de lapin contenant les produits métaboliques de la dose sub-létale (Goff *et al.*, 1989). En outre, l'apparition de nymphose est survenue plus tôt dans la larve élevée sur les tissus de lapin dose létale médiane et deux fois létales. Cependant, la durée de la nymphose, par rapport à la colonie de contrôle n'a pas été modifiée dans l'une des colonies d'élevage sur les tissus contenant de la cocaïne et de son principal métabolite (Goff *et al.*, 1989).

Dans une autre étude menée par Goff *et al.* (1991), les effets de l'héroïne, la morphine, sur le développement de *Isca Boettcher peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) ont été étudiés en injectant à des lapins avec 6 mg, 12 mg, 18 mg et 24 mg d'héroïne. Les niveaux d'héroïne injectée ont été calculés pour représenter les niveaux de morphine en héroïne trouvés décès liés à l'homme. Le taux de croissance des larves a accéléré dans les colonies d'élevage sur les tissus de lapin contenant de la morphine jusqu'à 29 heures. En contraste, la durée de la période de nymphose a été prolongée par une moyenne de 18-36 heures pour les quatre colonies expérimentales; cependant, dans le cas de la dose de 6 mg d'héroïne, la durée prolongée de la période de nymphose n'a pas été significatif (Goff *et al.* 1991).

Borel *et al.* (1999) ont également étudié l'effet de la morphine sur le développement d'une espèce d'insectes médico-légale. Cependant, contrairement à la recherche effectuée par Goff *et al.* (1991), Bourel *et al.* (1999) a élevé les larves de *L. sericata* sur la totalité de la carcasse de lapin, et pas seulement sur foie de lapin. Avec cela à l'esprit, la recherche menée par Borel *et al.* (1999), les lapins expérimentaux dosés avec 12,5 mg, 25 mg et 50 mg de morphine par perfusion de l'artère de l'oreille. La présence de morphine dans les tissus utilisés pour l'élevage *L. sericata* diminue le taux de croissance des larves, d'une manière dépendante de la dose; les larves élevées sur les tissus de lapins qui contiennent la plus forte dose de morphine se développent plus lentement que ceux élevés sur les tissus de lapin contenant moins de morphine.

Ces exemples démontrent que les insectes trouvés sur les cadavres peuvent être utilisés dans l'analyse toxicologique, mais aussi d'illustrer le risque de calculer un intervalle post-mortem incorrecte en raison d'un taux de développement des stades immatures modifiés. D'autres recherches devraient se concentrer sur la bioaccumulation et le métabolisme des médicaments chez les insectes nécrophages et leurs effets sur le taux de développement.

1.3.- Procédures de prélèvement et d'analyse

1.3.1.- Collecte des échantillons entomologiques

Pour les recherches entomotoxicologiques, l'utilisation de larves de diptères calliphoridae (asticots) est recommandée car ces insectes sont les premiers à coloniser le cadavre. De plus, ces espèces très communes sont généralement abondantes sur les scènes de crime (Gosselin et Bourel, 2014).

Le prélèvement d'insectes en vue d'analyses toxicologiques pourrait donc sembler simple, puisqu'on pourrait penser qu'il suffit de « prendre quelques asticots » sur le cadavre. Mais cette manière de procéder conduit systématiquement à une forte variabilité dans la détection des drogues. Les larves ou les pupes des différents sites sont prélevées à l'aide d'une pince ou d'une spatule et sont conservées séparément dans des flacons en plastique numérotés d'environ 50ml (Gosselin et Bourel, 2014). Les flacons doivent permettre l'entrée d'air, mais empêcher l'évasion d'asticots (Amendt *et al.*, 2011). Le transport pour analyse toxicologique doit être le plus court possible (Gosselin et Bourel, 2014).

La colonisation des différentes régions du corps peut se produire dans une séquence différente. Les premières zones d'un corps à colonisées sont les orifices naturels (les yeux, le nez, la bouche, l'anus ou la région génitale) (Amendt *et al.*, 2011). De nombreux auteurs

(Tracqui *et al.*, 2004 ; Bourel *et al.*, 2001b ; Sadler *et al.*, 1995) ont démontré l'importance de prélèvements à différents endroits du corps du fait de la grande variabilité de la concentration de drogues entre sites de prélèvements. Cette observation s'explique logiquement par la distribution différentielle des drogues dans le corps en fonction de leurs propriétés physico-chimique, conduisant à des concentrations variables entre organes et tissus (Gosselin et Bourel; 2014). Des larves issues de populations différentes peuvent donc présenter des concentrations différentes de drogues en raison de la stabilité et de la redistribution post mortem des substances toxiques dans le cadavre. Il est donc primordial de déterminer l'espèce mais aussi le stade de développement et l'activité larvaire avant l'utilisation de techniques analytiques (Gosselin *et al.*, 2011). Tracqui *et al.* (2004) décrivent pour ce faire un échantonnage minimal de 30 spécimens par site de prélèvement.

1.3.2.- Prétraitement des échantillons pour le transport, la conservation et l'analyse :

Les larves ou les pupes pleines doivent être tuées par congélation à -20° C (Introna *et al.*, 1990 ; Pounder, 1991 ; Wood *et al.*, 2003 ; Campobasso *et al.*, 2004 ; Tracqui *et al.*, 2004 ; Gosselin *et al.*, 2011). Par la suite, elles sont stockées à sec à -20°C ou dans de l'alcool est recommandé afin d'assurer la stabilité des drogues et de diminuer l'extraction possible de celles-ci lors de la macération dans l'alcool. Les pupes vides sont stockées dans des conditions sèches au réfrigérateur (2-6° C.). L'autre étape importante précédant l'analyse est la décontamination (nettoyage) des prélèvements (Gosselin et Bourel; 2014).

En effet, des concentrations de drogues plus élevées ont été observées pour les échantillons non lavés en comparaison de ceux préalablement lavés (Sadler *et al.*, 1995). Les spécimens doivent donc être lavés de l'eau déminéralisée (Gosselin *et al.*, 2011), une solution physiologique de NaCl ou du méthanol (Kintz *et al.*, 1990b).

Une fois les insectes tués et décontaminés, les échantillons sont préparés pour analyse. La préparation des échantillons dépend du stade de développement des insectes mais aussi de la drogue recherchée (Gosselin et Bourel; 2014).

Les insectes étant solides, ils vont d'abord être macération/homogénéisés (Roeterdink *et al.*, 2004 ; Wolff *et al.*, 2004), ou digérés en utilisant des acides, bases ou enzymes (Gunn *et al.*, 2006 ; Gagliano-Candela et Aventaggiato, 2001), ou encore pulvérisés par broyage (Gosselin *et al.*, 2011 ; Introna *et al.*, 1990 ; Tabor *et al.*, 2005). Cette dernière technique permet la pulvérisation d'un seul échantillon (par exemple une seule larve), évitant ainsi la contamination croisée entre les différents échantillons (Gosselin *et al.*, 2010). Une fois les échantillons pulvérisés, les drogues sont extraites des insectes. La plupart entomotoxicologistes utilisent des techniques d'extraction classiques tels que la précipitation des protéines,

l'extraction liquide-liquide (LLE) ou l'extraction en phase solide (SPE) (Gosselin *et al.*, 2011a).

1.3.3.- Techniques analytiques

Au cours d'une étude comparative, Kintz *et al.* (1990) ont obtenu une plus grande sensibilité à l'aide de larves de mouches à la place de la matière en putréfaction. La préparation et l'extraction de substances toxiques à partir d'échantillons entomologiques présente certains avantages par rapport aux tissus humains normaux: l'échantillonnage est rapide et facile et aucune émulsion a été notée lors de l'étape d'extraction, alors que ce qui est parfois observé avec les tissus humains. En outre, les chromatogrammes obtenus lors de l'analyse présentent moins de pics endogènes et cela est particulièrement important dans le cas du matériel putréfié. En outre, les concentrations du médicament semblent stables chez les insectes, sans que cela soit le cas pour plusieurs tissus post-mortem (Gagliano-Candela *et al.*, 2001). De plus, la quantification des médicaments chez les insectes est d'intérêt pour les études de développement des insectes.

Après une macération des larves, des analyses telles que la chromatographie sur couche mince (CCM), dosage radio-immunologique (RIA), chromatographie en phase gazeuse (GC), chromatographie en phase gazeuse / de masse spectrométrie (GC / MS), ou Chromatographie en phase liquide à haute performance / la spectrométrie de masse (HPLC / SM) peut être effectuée (Gagliano-Candela et Aventaggiato 2001; Goff and Lord 2001). Cela peut également être appliqué aux insectes adultes ou même des restes de coques larvaires et pupes, qui sont souvent trouvés sur les lieux de la mort, même après plusieurs années (Miller *et al.* 1994; Bourel *et al.* 2001a, 2001b).

Toutefois, les techniques d'extraction des poisons et les médicaments varient selon les caractéristiques chimiques des substances à détecter (métalliques ou organiques toxiques) et le type de matériau à utiliser (Gagliano-Candela, 2001).

La capacité de quantifier les concentrations de médicaments dans les larves individuelles est particulièrement utile dans les enquêtes relatives à l'effet des médicaments sur le développement des insectes (Wood *et al.*, 2005).

1.3.4.- La CG/MS

La combinaison des deux composants dans un système CGMS unique constitue un instrument capable de séparer des mélanges en leurs composants individuels, d'identification, puis de fournir des informations quantitatives et qualitatives sur les montants et la structure chimique de chaque composé (Marvin et Master, 2007).

1.3.4.1. Principe de GC-MS:

GC / MS d'une combinaison de deux techniques d'analyse différentes, chromatographie en phase gazeuse (GC) et la spectrométrie de masse (MS), est utilisée pour analyser des mélanges complexes organiques et biochimiques (Skoog *et al.* 2007). L'instrument GC-MS est constitué de deux composants principaux. La partie de chromatographie en phase gazeuse sépare les différents composés de l'échantillon en impulsions de produits chimiques purs en fonction de leur volatilité (Oregon State University, 2012) en faisant circuler un gaz inerte (phase mobile), qui transporte l'échantillon, à travers une phase stationnaire fixe dans la colonne (Skoog et al., 2007). Les spectres des composés sont collectés à leur sortie une colonne chromatographique par le spectromètre de masse, qui identifie et quantifie les produits chimiques selon leur rapport masse sur charge (m/z). Ces spectres peuvent ensuite être stockés sur l'ordinateur et analysés (Oregon State University, 2012)

1.3.4.2. Instrumentation et travail du GC-MS:

La figure 1 est le schéma de principe GC-MS. Ses différents éléments et leurs fonctions sont décrits ci-dessous.

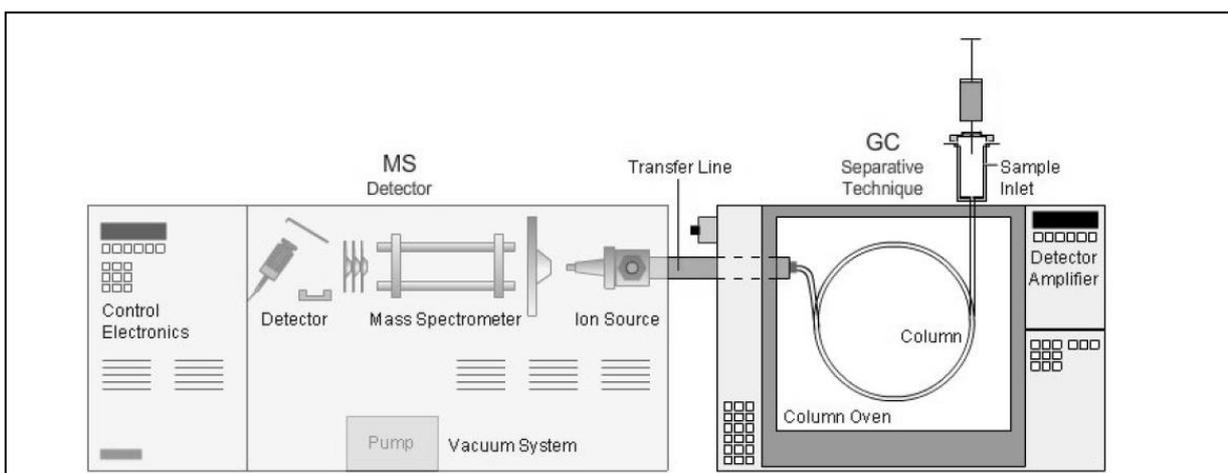


Figure 04 : diagramme schématique de CG-MS (Syed Zameer et Khushnuma, 2007)

Selon Syed Zameer Hussain et Khushnuma Maqbool, 2007 un système CGMS est composé de:

- **Le gaz vecteur** est alimenté à partir des cylindres par l'intermédiaire des régulateurs et des tubes à l'instrument.
- **Injecteur** : Chromatographie en phase gazeuse utilise une phase mobile gazeuse pour transporter des composants de l'échantillon, soit à travers des colonnes remplies de particules de silice enrobées ou des colonnes capillaires creuses contenant la phase stationnaire, appliquée sur la paroi intérieure.
- **Colonne** : Chromatographie en phase gazeuse utilise une phase mobile gazeuse pour transporter des composants échantillons à travers des colonnes soit à travers des colonnes remplies de particules de silice enrobées ou des colonnes capillaires creuses contenant la phase stationnaire, appliquée sur la paroi intérieure.
- **Four**: chromatographie en phase gazeuse ont des fours qui sont programmables de température;
- **Spectromètre de masse**: La séparation des ions de phase est obtenue dans le spectromètre de masse en utilisant des champs électriques et / ou magnétiques pour différencier les ions.
- **La source d'ions** : Dans la source d'ions, les produits sont ionisés avant l'analyse dans le spectromètre de masse.
- **Analyseur de masse**: Il existe plusieurs types très populaires de l'analyseur de masse associée à l'analyse de routine GC-MS et tous diffèrent dans la manière fondamentale dans laquelle ils se séparent des espèces sur une masse à la charge base.
- **Système à vide**: analyseurs de masse exigent des niveaux élevés de vide afin de fonctionner d'une manière prévisible et efficace.
- **Détecteur** : Le faisceau d'ions qui se dégage de l'analyseur de masse, doivent être détectées et transformées en un signal utilisable.
- **Electronics Control**: Les paramètres MS peut être sélectionné et contrôlé à partir de ce panneau.

1.3.5.- La substance utilisée :

1.3.5.1.- l'Amitriptyline

L'amitriptyline : diméthylamino-3 propylidène)-5dibenzo (a,d) cycloheptadiène-1.4), qui comporte un noyau à trois cycles, et une amine tertiaire avec deux groupes méthyles sur l'atome d'azote de la chaîne latérale. La formule moléculaire est la suivante : C₂₀H₂₃N (Moffat *et al.*, 2004).

Amitriptyline est un antidépresseur tricyclique dérivé de la dibenzocycloheptène largement utilisé dans le traitement de la dépression (Baselt, 2004) et d'autres situations telles que la boulimie, la névralgie post-herpétique et de l'énurésie nocturne (Baldessarini *et al.*, 1996).

Ce médicament est chimiquement basique et se présente sous la forme de sel de chlorhydrate (pKa 9,4) sur le marché (Yazdi *et al.* 2008), Publié par l'US Food and Drug Administration pour une utilisation clinique en 1961 pour le traitement de la dépression (Bynum *et al.*, 2005). La fonction de ces médicaments est de bloquer le recaptage des neurotransmetteurs, de la noradrénaline et de la sérotonine dans le système nerveux central (Esrafilii *et al.*, 2007) et de l'antagonisme des cholinergiques muscariniques, histamine H₁, et les récepteurs alpha-adrénergiques (Richelson *et al.* 1989). Cet antidépresseur tricyclique subit un métabolisme pour générer son principal métabolite, la nortriptyline (figure. 05), et deux métabolites hydroxylés, 10-hydroxy-amitriptyline et 10-hydroxy-nortriptyline (Bynum *et al.*, 2005).

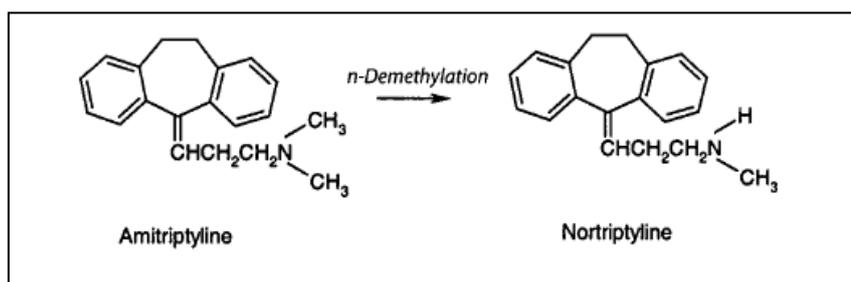


Figure 05 : L'amitriptyline et le principal métabolite (Bynum *et al.* 2005)

Amitriptyline (AMT) est lipophile et son volume de distribution est très grand et très variable 6-36 L / kg. Le médicament est rapidement distribué dans les tissus et sa concentration dans les tissus est 3-180 fois plus élevée (par exemple dans les poumons) par rapport au plasma (Derzsiova *et al.* 2006). Amitriptyline est métabolisé et excrété par les reins, en partie sous forme libre ou conjuguée à l'acide glucuronique (Pedersen.1980). Amitriptyline est souvent

prescrit conjointement avec un autre antidépresseur tricyclique, par imipramine, et donc de nombreuses tentatives de suicide sont causées par ces deux médicaments (Durakovic et al.1982).

1.3..5.1- L'administration et le surdosage

Amitriptyline résorbe lentement du tractus gastro-intestinal et sa concentration plasmatique est très faible pendant 4-8 heures, seulement 0,2-0,5% de la dose utilisée par voie orale. La valeur la plus élevée du plasma de l'amitriptyline se produit dans les 6 heures qui persistent dans le plasma jusqu'à 8 heures, et se prolonge en cas de surdosage (Derzsiova et al. 2006). Le métabolite actif de l'amitriptyline est nortriptyline. Nortriptyline est un antidépresseur tricyclique avec anticholinergique doux et des propriétés sédatives modérées. Cela est presque complètement absorbé par le tractus gastro-intestinal et la plus forte concentration plasmatique de nortriptyline se produit dans les 4-8 heures (Derzsiova et al.,2006). La demi-vie d'élimination est comprise 9-25 h. Le volume de distribution est de 20-45 kg. La liaison aux protéines plasmatiques est de 95,6% (Baselt *et al.*,1982).

Les effets de toxicité se développent dans les 30 minutes de surdosage et le pic de 2 h à 6 h. des effets anticholinergiques prédominent dans les cas de faible ingestion de dose. En cas d'ingestion de dose élevée, dépression marquée du système nerveux central est couplé avec cardiotoxicité, convulsions et hypotension (Güloglu *et al.* 2011, Foulke, 1995).

L'Amitriptyline se produit généralement après 30-60 min. Cependant, après l'ingestion de préparations à libération lente, la manifestation d'effets toxiques peut prendre aussi longtemps que 12 h (koppel *et al.*1992). Intoxication amitriptyline aiguë sévère se manifeste par une perte de conscience, des crampes généralisées, diverses arythmies (Islek *et al.*2004; Koppel *et al.*1992; Trafford *et al.*1980), une atteinte sévère de la circulation vasculaire, l'hypotension, l'hyperthermie, des voies respiratoires et une insuffisance cardiaque. En outre, après une intoxication aiguë amitriptyline rhabdomyolyse avec myoglobulinurie et une insuffisance rénale aiguë peut se développer (Seyffart.1997).

La dose thérapeutique est comprise entre 50 et 150 mg par voie orale conduisant à des gammes de concentration sanguine thérapeutique entre 0,01 et 0,16 mg / L par jour (Baselt, 2004), les concentrations plasmatiques maximales sont atteintes en 2-4 h. L'intervalle de concentration plasmatique thérapeutique d'Amitriptyline est dans un ordre de grandeur de 60-280 ng ml⁻¹ (koppel et al.1992). Amitriptyline est considéré comme toxique à des taux sanguins > 0,50 mg / L ou si elle est combinée avec la concentration d'un métabolite > 1,0 mg /

L. (Levine., 1999). Les taux sériques fatales exactes de l'amitriptyline chez les enfants ne sont pas connus (Kolsal *et al.*2009). Les antidépresseurs tricycliques (ATC) sont l'une des principales causes de décès par ingestion du médicament. Les décès dus à une surdose amitriptyline ont eu lieu chez les adultes avec des doses aussi faibles que 600 mg (Bailey *et al.*, 1980).

Chapitre II

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 Criminologie et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale de Bouchaoui (INCC/GN) pendant 3 mois de stage pratique. Les objectifs de la présente étude étaient de deux ordres: d'une part, de détecter la présence de l'Amitriptyline ou son métabolite dans les larves de *Lucilia sericata* par un test toxicologique réalisé au laboratoire de toxicologie de l'INCC et, d'autre part, d'étudier l'effet de ce xénobiotique sur la taille des larves de cette espèce et son influence sur leur cycle de développement qui peut affecter à l'estimation de l'intervalle post mortem PMI.

2.2.- Matériel

2.2.1.- Matériels biologique

2.2.1.1.- Le substrat nutritif : Le choix du modèle expérimentale est particulièrement important lors d'études expérimentales (Gosselin et Boure, 2014).

Les lapins ont été choisis pour cette expérience car ils métabolisent comme similaire chez les humains (Beck *et al.* 2002). Quatre (04) lapins « néo zélandais » de la race Albinos de sexe féminin (Fig. 06) ont été obtenus d'une ferme à Médéa et transférés au laboratoire d'entomologie de l'INCC/GN. Les lapins ont été pesés (Annexe I, 1) et identifiés par des numéros de 01 à 04. Les résultats des pesages ont été notés (tableau 01).

Les individus 01, 02, et 03 ont été sélectionnés pour être l'origine du substrat nutritif contenant différentes doses de l'amitriptyline par contre le sujet n° 04 a été dédié pour être l'origine du substrat non contaminé par l'amitriptyline.

Tableaux 01 : Les résultats de pesage des lapins.

N° lapin	Lapin 01	Lapin 02	Lapin 03	Lapin 04
Poids (Kg)	2,55	2,05	2,33	2,96



Figure 06 : lapins « néo zélandais» de la race Albinos dans une cage métallique avec nourriture (Originale)

2.2.1.2.- Matériel entomologiques

Les adultes de *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) (voir figure 07) ont été utilisé dans cette étude en raison de leur importance en entomologie forensique. Cette espèce a été obtenue de la nature grâce a un dispositif expérimentale (détaillé dans le titre 2.3.1.1)

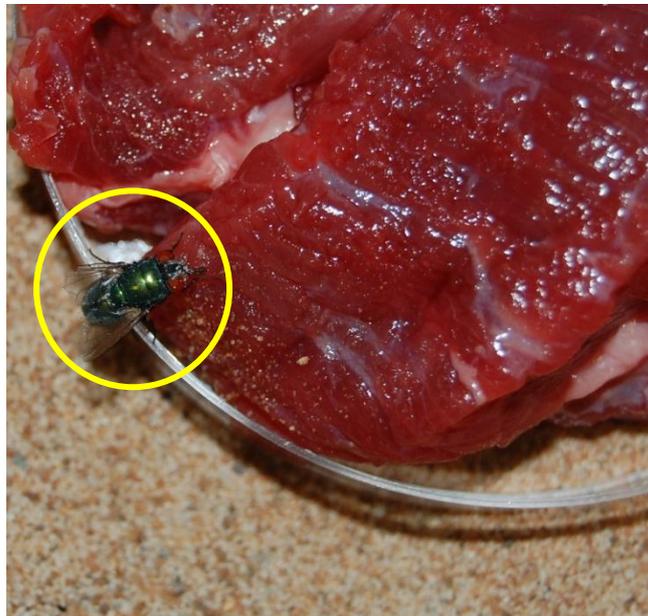


Figure 07 : *Lucilia sericata* femelle adulte (originale)

2.2.2.- Matériel non biologique

a.- l'Amiriphtyline : Le produit chimique utilisé dans cette présente étude est l'amiriphtyline chlorhydrate 40mg/ml solution pour gouttes buvable 20ml (Fig. 08) :



Figure 08 : Flacon de 20 ml d'amiriphtyline (originale)

- **Choisi du médicament :** L'amiriphtyline antidépresseurs tricycliques a été choisi pour plusieurs raisons, y compris son coût relativement faible. En plus dans la littérature de nombreux travaux traitent sur la pharmacocinétique de l'amiriphtyline, les concentrations tissulaires post-mortem et l'analyse chromatographique. Depuis, l'amiriphtyline n'est pas une drogue illégale, les installations de laboratoire régulières étaient appropriées pour son stockage, et ce traitement était plus approprié pour l'étude présente qu'une substance illégale telle que la cocaïne.

b.- **Méthanol CH_3OH :** Pour la désinfection (Annexe I, 2, a)

c.- **L'éthanol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$:** 80 % utilisé pour la conservation des larves (Annexe I, 2, b).

d.- **Solution d'extraction (R1):** préparé par la dissoudre de 20 g du Sulfate de Sodium pour analyse (Na_2SO_4) dans 50ml H_2O ultra pure.

e.- **Solution d'extraction (R2) :** préparé de 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).

f.- **Solution d'extraction (R3) (NaOH 1M) :** préparé par la dissoudre de 40mg NaOH et dans 40 ml H_2O ultra pure.

2.2.3.- Equipement, Instrument, Consommable

L'ensemble des équipements, instruments et consommables utilisés dans la présente étude est placé en Annexe (I.3, I.4 et I.5).

2.3.- Méthodes de capture de *Lucilia sericata*

L'espèce *Lucilia sericata* ciblé par cette expérimentation a été obtenue de la nature grâce à un dispositif expérimentale spécifique constituer d'un piège menu d'un appât (le foie du lapin dédié au control) (Annexe I, 4, d).

Le piège a pour principe de permettre de capturer des insectes sont qu'ils on accès a l'appât pour les empêcher de pondre sur lieux.

- **En première étape** le piège à été déposé en dehors dans l'espace vert situé au voisinage du laboratoire d'entomologie INCC/GN de Bouchaoui (Fig. 10). Après environ une heure des mouches de couleur vert ont été observé à l'intérieur du piège. Les insectes adultes récoltés ont été transférer au laboratoire et ont été placé dans le congélateur (Annexe I.3.d) à -5°C pendant dix (10) minutes environ afin de les assommer.



Figure 09 : Piège déposé à l'air libre (originale)

- **En deuxième étape** : Les mouches sont récupérer et identifier sous le stéréomicroscope couplé avec la vidéo et une chaîne d'acquisition d'images (Annexe I.3.c) en utilisant les clés d'identification décrites par (Szpila, 2012) , uniquement l'espèce *Lucilia sericata* sont sélectionnés, en se assurant que les deux sexes, mâle et femelle sont présent par examen morphologique spécifique pour chaque sexe (Fig. 11) ; où trouver un dimorphisme sexuel chez les adultes au niveau des yeux : les yeux des

mâles se touchant presque alors que ceux des femelles sont très éloignés (Wyss et Cherix, 2006). Les autres espèces ont été relâchées dans la nature.

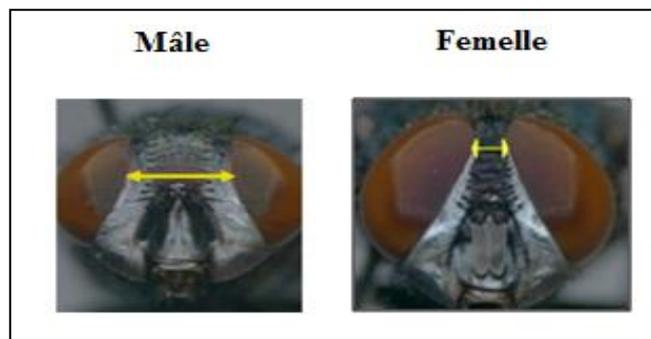


Figure 10 : Dimorphisme sexuelle au niveau des yeux : plus écartés chez la femelle que chez le mâle (originale).

- **La troisième étape** a été consacrée à la multiplication du nombre des adultes capturés de *L. sericata*, à cet effet un protocole a été mis en application ; les mâles et les femelles capturés ont été mis dans une boîte utilisée pour l'accouplement (36 X 24 X 14 cm), contenant un morceau de viande de bœuf d'environ (~100g) et de l'eau (Annexe I, 6, c). Le lendemain des œufs ont été observés sur la viande sous forme d'agglomérations de couleur blanche. La viande a été récoltée et mise dans une boîte d'élevage en plastique transparente munie d'un couvercle dont la surface est remplacée par un filet de petits maills (Fig.12), et mis en culture à 24° C et une humidité relative de 70 % (Annexe I.3.b).



Figure 11 : boîte d'incubation de *Lucilia sericata* (originale).

Les adultes émergés ont été transférés dans une cage d'insecte de grande dimension (60 X 34 X 53 cm) (Annexe I, 4, c), nourris pendant deux semaines de sucre et de l'eau (Annexe I, 6, b).

Pendant la 2^{ème} semaine le régime alimentaire a été renforcé par la poudre de lait et environ 2ml de sang par jour pour permettre la maturation ovarienne (Gosselin *et al.* 2011).

A la fin de la 3^{ème} la nourriture a été retirée pendant quatre (4) jours à la fin des insectes on a stimulé pour pondre.

2.4.- expérimentation Entomotoxicologique

2.4.1.- Source de nourriture

a.- Les doses sélectionnées : On vu de l'absence des données de la pharmacocinétique de l'amitriptyline chez les animaux, spécifiquement les lapins. Trois doses de l'amitriptyline ont été sélectionnées, avec un témoin : la dose 1 : (32mg), la dose 2 : (48mg), la dose 3 : (64 mg). Les concentrations ont été sélectionnées sur la base de rapports de décès humains (Manning *et al.*, 1976).

Les doses sélectionnées ont été administrées aux lapins selon le programme qui a été démontré sur le ci-dessus (tab. 3).

Tableau 02 : le programme d'administration de l'amitriptyline aux lapins :

	Date	Heure de l'administration des doses (mg)		Dose journalière (mg)	Observation
		08 :30	15 :00		
Lapin 01	20/03/2016	16 mg	16 mg	32 mg	Aucune réaction lors et après la prise
Lapin 02	20/03/2016	24 mg	24 mg	48 mg	
Lapin 03	20/03/2016	32 mg	32 mg	64 mg	

b.- Calcul du volume d'amitriptyline administré : Un flacon d'amitriptyline de volume 20ml avec concentration massique de 40 mg.ml⁻¹ a été obtenu de la pharmacie sous ordonnance médicale. Ce médicament est une forme liquide pour faciliter l'administration par voie orale. On connaît que 100µl d'AMT correspond à 4 mg d'amitriptyline. Le volume d'amitriptyline administré à chaque lapin est calculé par l'équation suivante :

$$V_X = 100 \times D_x / 4$$

Ou

$$V_X = 25 \times D_x$$

V_x : le volume de l'AMT a administré en (μ l).

D_x : la dose d'AMT sélectionnée en (mg).

Tableau 3 : Les différentes volumes de l'Amirymptiline a administrées chez les trois lapins :

Le nombre de lapin	La dose d'AMT (mg)	Le volume d'AMT (μ l)	Le nombre de fois a administré l'AMT par la micropipette
Lapin 01	32mg	800 μ l	8 fois/jour
Lapin 02	48mg	1200 μ l	12 fois/jour
Lapin 03	64mg	1600 μ l	16 fois/jour

c.- Administration de l'amitriptyline aux animaux de l'expérimentation :

L'amitriptyline a été administré par voie oral (Fig. 15) a l'aide d'une micropipette (Annexe I.4.a) aux trois lapins (01, 02 et 03) afin d'obtenir un substrat nutritif (viande du lapin) contenant différents doses de ce médicament.



Figure 12 : Administration du médicament par la voie orale (originale)

d.- Scarification des lapins : Les lapins ont été tués par un coup violent à la tête (Aegtmeyer *et al.*, 1977), ensuite les lapins abattu ont été dépouillé de leurs peau et vider de leurs viscères puis mis au congélateur à -5° C. Les abats éliminer selon la procédure interne de gestion des déchets de l'INCC. Le lendemain, la viande découpée en petits morceaux d'environ 40 g. puis mise dans des boites plastiques étiquetées (Annexe I, 6, a).

2.4.2.- Stimulation pour la ponte

La stimulation a été effectuée par des petits morceaux de viande fraiche du lapin 04 (une source protéique). La viande a été mise dans des gobelets jetable en carton couverts par des couvercles de petite boites de Pétrie (55mm de diamètre), une ouverture d'environ

deux centimètre de longueur et un cm d'hauteur (02 X 01cm) a été crée comme une entré à la cachette (Annexe I, 6, d).

Les pots sont utilisés comme des cachettes pour la ponte des œufs vu que les insectes préfèrent les milieux moins éclairés pour pondre. Neuf (09) cachettes préparées à été placé à l'intérieur de la cage d'insectes (Fig.16). En moins de trente (30) minutes, les premières pontes ont été observées sous forme de petite agglomération de couleur blanche sur les morceaux de viande. Les œufs on été collecté chaque une demi heure et préservés dans un réfrigérateur a 08° C, pour retarder leur éclosion. La procédure à été répéter chaque demi heure pendant tous la matinée. Le moment de la ponte a été noté.



Figure 13 : Les cachettes contenant le foie du témoin ont été déposées dans la cage pour stimuler la ponte. A : la forme extérieur B : la forme intérieur (Originale).

2.4.3.- Mise en élevage

a.- Préparation des boites d'élevage

Douze (12) boites en plastique transparent de 0,5L, (9 cm d'hauteur sur 9 cm de diamètre), leur couvercle ont été percé et remplacer par un filet de petites mails (Annexe I, 4, f). Les couvercles des boites on été choisie de différent couleurs (quatre couleurs) dont chaque couleur est dédiée pour différencier les boites contenant une des doses des autres (3 boites vert pour la dose 01, 3 boites orange pour la dose 02, 3 boites mauve pour la dose 03 et 3 boites rose pour le control). Un tiers des boites a été remplie par une couche de la sciure de bois, ce qui a permis l'absorption des odeurs (Kharbouche *et al.*2008) ; suivie d'une couche de sable fine pour absorber l'humidité, en fin un morceau de viande d'environ 40g d'une des quartes doses a été mis à la surface (Annexe I, 6, e).



Figure 14 : la boîte d'élevage (exemple : le témoin de la 1^{ère} répétition)

b.- Transfert des larves sur le substrat nutritif

Des amas d'œufs collectés ont été transférés sur un substrat nutritif (viande de bœuf frisée) et gardés dans le laboratoire à température (22° C.) après 22 heures des larves ont été observées. 160 larves ont été transférées dans des boîtes d'élevage (Annexe I, 7). L'ensemble des boîtes ont été transférées dans la chambre d'élevage à une température de 24° C., une humidité relative de 70 % et avec un éclairage artificiel cyclique simulant la lumière du jour (16 h et 8 h d'obscurité) (Annexe I, 6, f).

2.4.4.- L'échantillonnage des larves

La taille de l'échantillon varie en fonction du nombre de larves trouvées (Almendt *et al.*, 2007), puisque le nombre de la population environ 160 larves donc 10% de la population a été sélectionnée pour l'échantillonnage en suivant un protocole d'échantillonnage indiqué dans les tableaux ci-dessous. L'échantillonnage a été effectué en enlevant des larves à partir de chaque dose à des périodes d'échantillonnage respectives (chaque 24h après l'incubation) et en les tuant par une immersion dans l'eau chaude à proximité (> 90 ° C) pendant 30 secondes (Duke, 2004), sans être remise en culture (Annexe I, 8). Après l'élimination de l'eau chaude, les larves de L2 ont été placées dans 80% d'éthanol (Annexe I, 2, b) et conservées à -20°c ; tandis que les larves de L3 ont été conservées par congélation à -20° C. (Annexe I, 3, e). La longueur et les stades larvaires ont été enregistrés pour chaque larve. Après la mesure, les larves échantillonnées ont été conservées à -20° C. jusqu'à l'analyse toxicologique a été effectuée. L'incubateur a été vérifié toutes les huit heures pour noter le temps de nymphose. Le comportement des larves (soit feeding ou post feeding) a été noté.

a.- Analyse du cycle de développement:

a.1.- Déterminer le stade larvaire : Après avoir tué les larves , le stade larvaire pour chaque larve de différentes doses a été déterminé par l'observation des spiracles postérieurs situé sur la région postérieure de la larve en utilisant un stéréo microscope et basée sur les clés d'identification décrite par (Szpila 2010) (Annexe III, 2). Les fentes des stigmates postérieurs permettent de déterminer rapidement le stade de l'individu : 2 fentes par stigmate au stade L2 (Fig. 18) et 3 au stade L3 (Fig. 19). Les résultats obtenus ont été noté sur les tableaux ci-dessus.

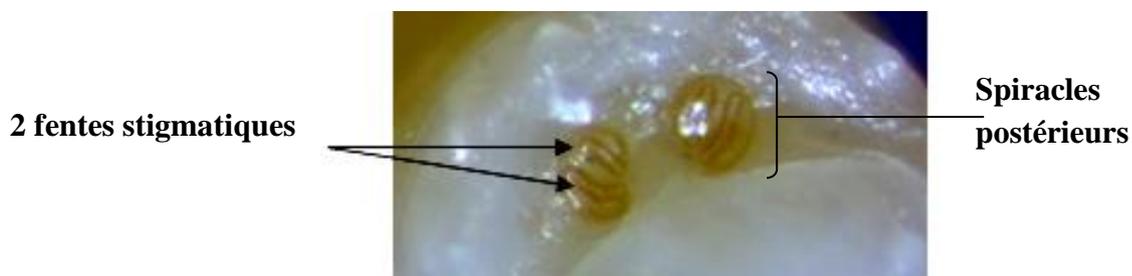


Figure 18 : Vue postérieure d'une larve de *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae) au stade L2 (originale).

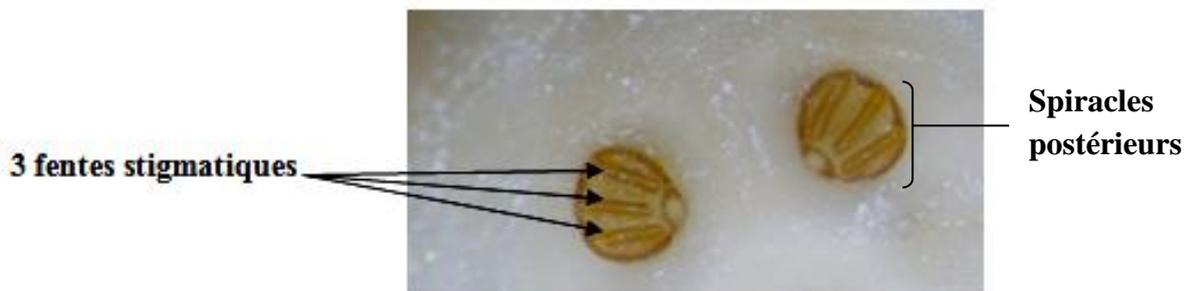


Figure 19 : Vue postérieure d'une larve de *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae) au stade L3 (originale).

a.1.1.- Protocole d'échantillonnage des larves de *Lucilia sericata*

✚ 1^{ère} répétition : Le Protocole d'échantillonnage des larves de *L. sericata* dans la 1^{ère} répétition (boîtes n°01) est présenté dans les tableaux 5, 6, 7 et 8..

Tableau 04 : Protocole d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 1^{ère} répétition:

Dose 00 (Témoin)					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	-
L'étape de comportement	F+	F++	F++	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 05 : Protocole d'échantillonnage Dose 01 de la 1^{ère} répétition:

Dose 01					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	-
L'étape de comportement	F+	F++	F++	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 06 : Protocole d'échantillonnage dose 02 de la 1^{ère} répétition:

Dose 02						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	-
Nb individus par dose	16	14	12	10	9	-
L'étape de comportement	F+	F++	F++	PF	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 07 : Protocole d'échantillonnage dose 03 de la 1^{ère} répétition:

Dose 03						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	9	-
comportement	F+	F++	F++	PF	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

✚ **2^{ème} répétition** : Le protocole d'échantillonnage des larves de *L. sericata* dans la 2^{ème} répétition est présenté dans les tableaux 5, 9, 10 et 11.

Tableau 08 : Protocole d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 2^{ème} répétition.

Dose 00 (Témoin)					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	-
comportement	F+	F++	F++	PF	/

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 09 : Protocole d'échantillonnage (Dose 01) de la 2^{ème} répétition :

Dose 01					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	-
L'étape de comportement	F+	F++	F++	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 10 : Protocole d'échantillonnage (Dose 02) de la 2^{ème} répétition :

Dose 02						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	9	-
comportement	F+	F++	F++	PF	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 11 : Plan d'échantillonnage (Dose 03) de la 2^{ème} répétition:

Dose 03						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	9	-
comportement	F+	F++	F++	PF	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

✚ **3^{ème} répétition** : Le Protocole d'échantillonnage des larves de *L. sericata* dans la 3^{ème} répétition est présenté dans les tableaux 12, 13, 14 et 15.

Tableau 12 : Protocole d'échantillonnage "Témoin" (Dose 00) de la 3^{ème} répétition.

Dose 00 (Témoin)					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	-
comportement	F+	F++	F++	PF	/

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 13 : Protocole d'échantillonnage (*Dose 01*) de la 3^{ème} répétition :

Dose 01					
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	/
NB individus par dose	16	14	12	10	/
comportement	F+	F++	F++	PF	/

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 14 : Protocole d'échantillonnage (*Dose 02*) de la 3^{ème} répétition

Dose 02						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	-
NB individus par dose	16	14	12	10	9	-
comportement	F+	F++	F++	PF	PF	-

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

Tableau 15 : Protocole d'échantillonnage (*Dose 03*) de la 3^{ème} répétition

Dose 03						
Temps (h)	24h	48h	72h	96h	120h	144h
Stade du développement	L2	L3	L3	L3	L3	pupe
Prise des mesures	+	+	+	+	+	/
NB individus par dose	16	14	12	10	9	/
comportement	F+	F++	F++	PF	PF	/

(-) : Echantillonnage non pris

(+) : Echantillonnage

F : Feeding (stade d'alimentation)

PF : Post feeding (stade post alimentation)

F+ : moins alimentation

F++ : vorace alimentation

a.2.- Mesure de la taille des larves : Les mesures ont été prise toutes les 24 heures depuis l'incubation et enregistrée (annexe), quatre mesure (24h, 48h, 96h, 120h) ont été prise avant que les larves entre dans la phase pupale.

La taille des larves du 2ème stade larvaire « L2 » ont été mesuré en utilisant un logiciel « ZEN 2012 » a l'aide le stéréo-microscope (Annexe I, 3, c). Tandis que les mesures du 3^{ème} stade larvaire (L3) ont été réalisées en utilisant le pied à coulisse digital (Annexe I, 4, e). Le logiciel ne permet pas la mesurer de la longueur des larves L3, en raison de leur grande taille.

b.- Analyse toxicologique

***. La préparation des échantillons pour l'analyse de GC/MS**

Les larves échantillonnées pour l'analyse de développement ont également été utilisés pour l'analyse toxicologique. L'échantillon utilisé est un mélange des larves de la même dose (pour les 3 répétitions) qui prise dans le temps 72 heures et correspond le stade 3, 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 ;

- 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 éliminer 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+ 500µL 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.

Tableau 16 : Paramètres de l'instrument GC-MS

Le programme du four	– 50° C pendant une minute – 280° C pendant 20 min
vitesse de chauffe	10° C /min
température de l'injecteur	240° C
température de la ligne de transfert	280° C
Mode d'injection	split (1/50)
le volume d'injection	1 µl
gaz vecteur	hélium
le débit	1 ml/min
mode de spectromètre de masse	impacte électronique (EI)
la température de la source	230° C.

Chapitre III

Dans ce chapitre seront présentés, les résultats sur l'effet de l'Amitriptyline et/ou son métabolite sur la taille des larves de *Lucilia sericata* par un test toxicologique, et son influence sur leur cycle de développement.

3.1.- Les résultats du taux de croissance des larves

3.1.1.- La taille larvaire de la 1^{ère} répétition

Les mesures de la taille des larves de *Lucilia sericata* obtenues après 24, 48, 72, 96 et 120 heure d'incubation sont données comme suite :

3.1.1.1.- Après « 24h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 1^{ère} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau suivant 17 :

Tableau 17 : Tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	7,12	9,79	8,18 ± 0,98
D1	6,08	8,44	7,57 ± 0,91
D2	6,67	7,88	7,49 ± 0,33
D3	5,9	7,93	6,98 ± 0,66

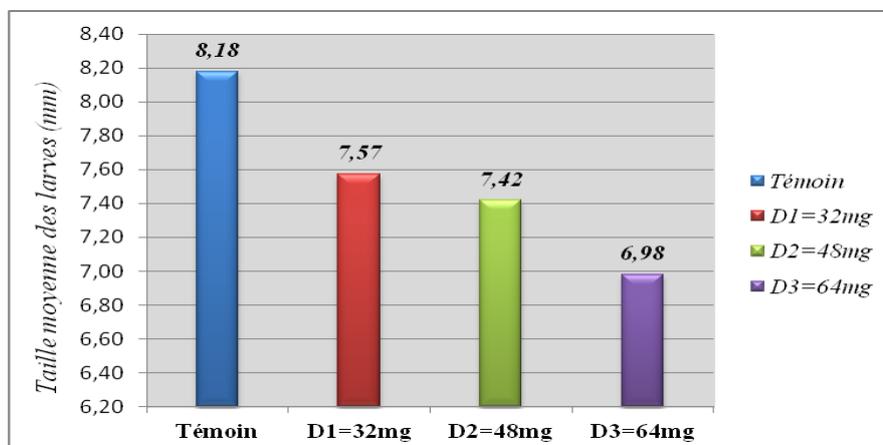


Figure 20 : Diagramme démontrant taille moyenne pour 16 larves prise après 24 heures d'incubation à fonction de différentes doses croissantes.

D'après les résultats obtenus (Tab. 17 ; Fig. 20), on remarque une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport au témoin. Il faut noter que la taille des larves nourries sur les tissus de lapin témoin varie entre 7,12 et 9,79 mm avec une taille moyenne égale 8,18 mm est plus élevé par rapport aux trois (03) différentes doses. Une légère différence observé entre le la taille moyenne du témoin et la taille moyenne des différents doses D₁, D₂ et D₃ qui était respectivement 7,54, 7,42 et 6,88 mm; où on observe une différence de 0,61 mm entre le témoin et la dose 02 et de 0,69 mm entre le témoin et la dose 02. Tandis que la différence entre le témoin et la dose 03 est 1,2 mm.

3.1.1.2. Après « 48h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 1^{ère} répétition après 48h d'incubation sont illustrées dans le tableau suivant:

Tableau 18 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 14 larves après 48h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	14,1	15,43	14,49 ± 0,37
D1	10,59	14,53	13,03 ± 1,21
D2	7,88	10,67	9,07 ± 0,91
D3	6,69	8,16	7,53 ± 0,40

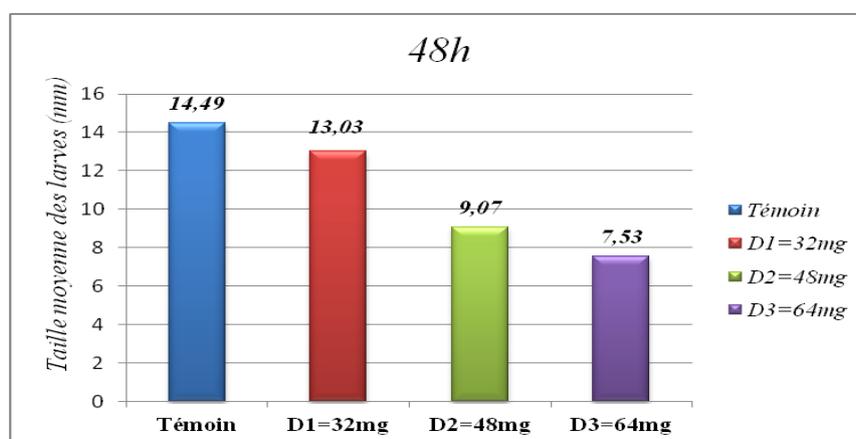


Figure 21 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 14 larves prise après 48 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes.

D'après les données mentionnés dans le tableau 18 (Fig. 21), on observe une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin où on observe que la taille moyenne des larves chez le témoin est supérieur aux tailles moyenne chez les 3 doses. Une différence légère de 1.46 mm a été observée entre le témoin et la dose 1; tandis qu'une grande différence a été observée entre le témoin et les doses 2 et 3 estimé par 5.42mm et 6.96mm respectivement.

3.1.1.3.- Après « 72h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 1^{ère} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	14,14	16,29	15,24 ± 0,70
D1	12	14,83	13,18 ± 0,84
D2	10,52	13,11	12,24 ± 0,71
D3	9,85	12,03	11,08 ± 0,80

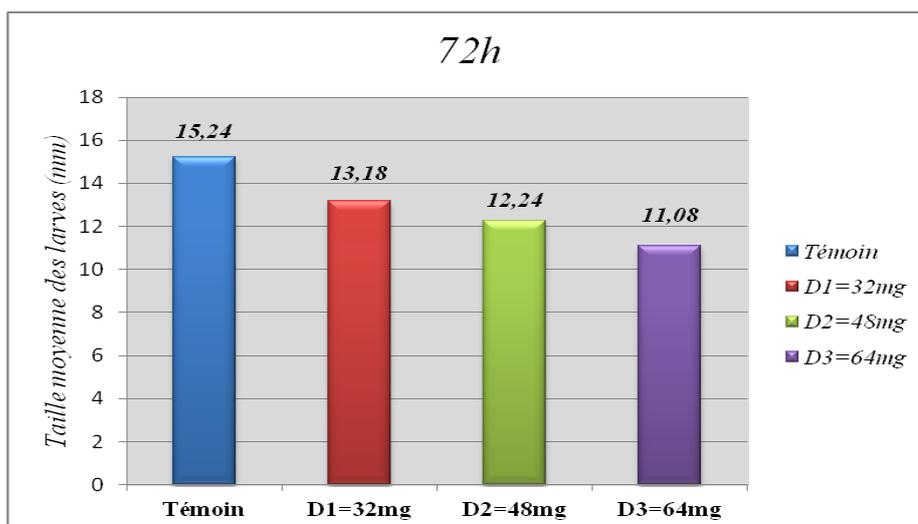


Figure 22 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 12 larves prise après 72 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

D'après les résultats obtenus (Tab. 19 ; Fig. 22), on observe une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport au témoin où il a marqué une différence de 2,06 entre la taille moyenne du témoin et la dose 01 et une différence de 3 mm entre la tailles moyenne des larves du témoin et la dose 02. Tandis qu'une grande différence entre la taille moyenne des larves du témoin et la dose 03 a été estimée à 4,16 mm.

3.1.1.4.- Après « 96 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 1^{ère} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau suivant:

Tableau 20 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 96h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	13,2	15,53	14,46 ± 0,77
D1	12,57	14,37	13,40 ± 0,50
D2	11,78	13,86	12,66 ± 0,65
D3	10,85	11,93	11,38 ± 0,45

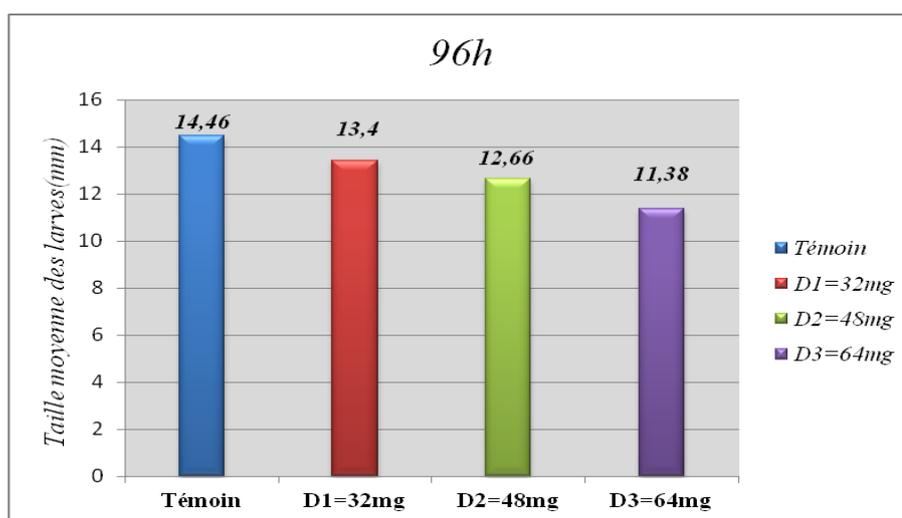


Figure 23 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 10 larves prise après 96 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats montrent (Tab. 20 ; Fig. 23) une faible diminution dans la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque une faible différence entre le témoin et la dose 01 a été estimée par 1,06 mm, et une différence de 1,8 mm entre le témoin et la dose 02. Tandis que une différence de 3,28 mm entre le témoin et la dose 03.

3.1.1.5.- Après « 120 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 1^{ère} répétition après 120h d'incubation sont illustrées dans le tableau 21.

Tableau 21 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 09 larves après 120h d'incubation

D2	12,19	12,74	12,56 ± 0,16
D3	9,9	11,76	10,96 ± 0,53

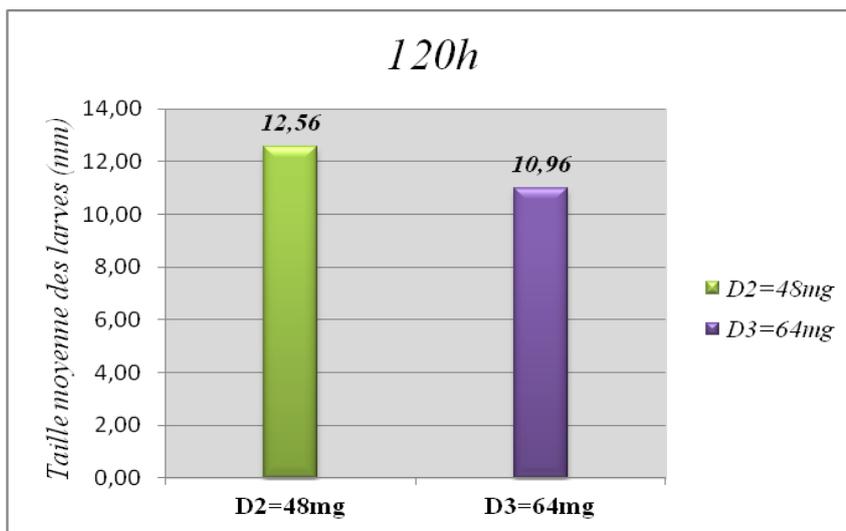


Figure 24 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 09 larves prise après 120 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les larves du témoin et la dose 02 sont entrées dans le stade pupale ; donc les mesures de tailles ont été effectuées sur la 2^{ème} et 3^{ème} dose seulement. La taille moyenne des larves de la dose 02 a été d'une moyenne 12.56 mm très proche à la taille moyenne des larves de la dose 03 qui était de 10.96 mm avec une très faible différence qui était 1.6 mm.

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

D'après les figures de 20 à 24, on voit clairement que la taille des larves n'a pas été la même dans les différents échantillons à l'intérieur de la même période. On voit qu'ainsi une diminution dans la taille des larves nourris sur les différents dose par rapport au témoin pendant la période d'expérimentation (Fig. ??). La taille moyenne des larves a été diminuée d'une manière dépendante de la dose. Plus la concentration d'amitriptyline dans le substrat nutritif ; le taux de croissance plus lent.

3.1.2.- Les mesures effectuées sur la 2^{ème} répétition

3.1.2.1. Après « 24h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 2^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 22.

Tableau 22 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	7,31	10,37	8,72 ± 0,9
D1	5,76	9,92	7,54 ± 1,44
D2	6,77	7,86	7,42 ± 0,37
D3	6,24	7,85	6,88 ± 0,41

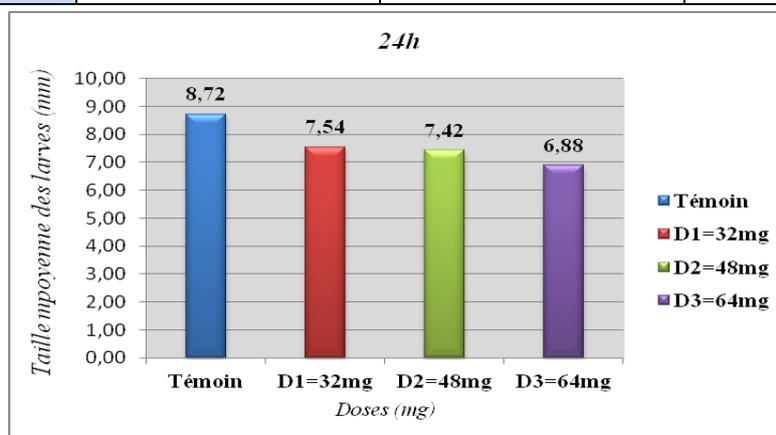


Figure 25 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 16 larves prise après 24 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats montrent (Tab. 22 ; Fig. 25) une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque que la taille des larves nourries sur les tissus de lapin témoin varie entre 7,31 et 10,37 mm avec une moyenne égale 8,81 mm est plus élevée par rapport les trois doses différents. Une légère différence observé entre la taille moyenne du témoin et la taille moyenne des différentes doses D₁, D₂ et D₃ qui ont été une moyenne 7.54, 7.42 et 6.88mm respectivement ; où on observe une différence de 1.27mm entre le témoin et la dose 2 et de 1.39 mm entre le témoin et la dose 02. Tandis que la différence entre le témoin et la dose 03 est 1.93mm.

3.1.2.2.- Après « 48h d'incubation »

Les mesures prises sur les larves de la 2^{ème} répétition après 48h d'incubation sont illustrées dans le tableau 23.

Tableau 23 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prises sur 14 larves après 48h d'incubation.

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	13,85	15,42	14,65 ± 0,48
D1	10,17	15,85	12,73 ± 2,12
D2	8,56	9,54	8,9 ± 0,32
D3	6,24	7,85	8,10 ± 0,90

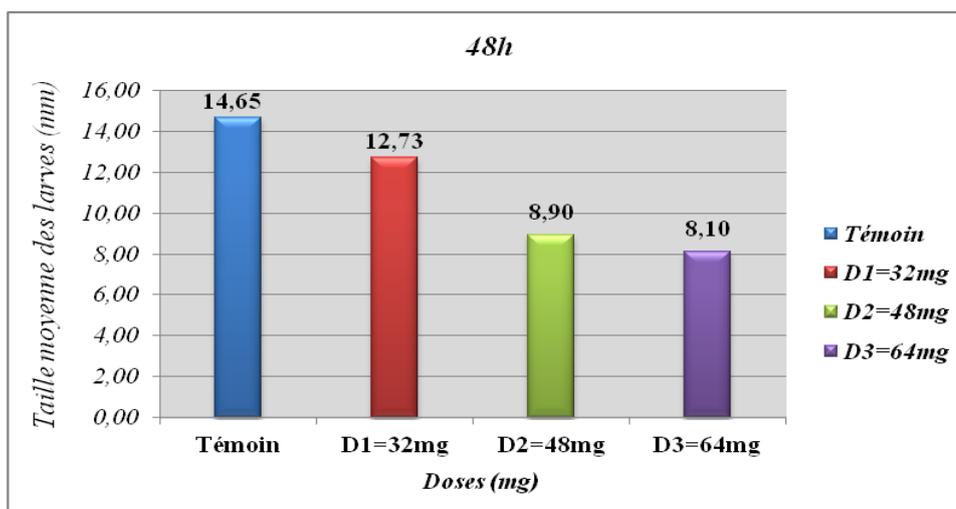


Figure 26 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 14 larves prise après 48 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats montrent (Tab. 23 ; Fig. 26) une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On observe une variation importante entre le témoin et les différentes doses, dont la longueur des larves du témoin varie entre 13,05 et 15,16mm. On remarque une grande différence entre la taille moyenne du témoin avec taille moyenne égale 14,65mm et la dose 02 avec la taille moyen est 12,73, la différence a été estimée à 1,92 mm ; et entre le témoin et la dose 3 avec moyenne 8,90 mm on remarque une grande différence est estimée à 5,75mm. Tandis que la différence entre le témoin et la dose 3 de moyenne 8,10 était 6,55 mm.

3.1.2.3. Après « 72h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 2^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation.

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	14,16	17,03	15,77 ± 0,75
D1	13,3	14,07	13,36 ± 0,51
D2	11,54	12,81	12,19 ± 0,40
D3	9,81	12,67	11,87 ± 0,86

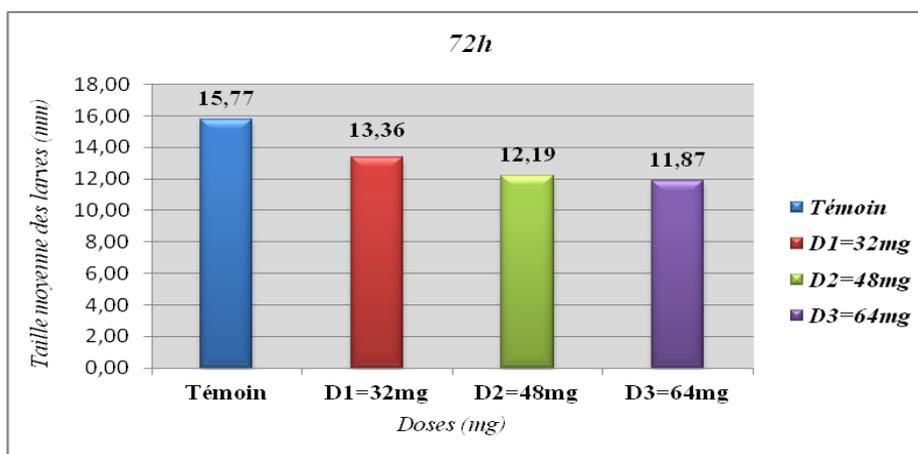


Figure 27 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 12 larves prise après 72 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats montrent (Tab. 24 ; Fig. 27) une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque une variation importante entre la taille moyenne du témoin et tailles moyenne des différents doses ; on observe que la taille des larves nourries sur le témoin compris entre 14,16 et 17,03 avec une moyenne égale 15,77.

Une différence de 2,41 entre la taille moyenne du témoin et la dose 01a été d'une moyenne de 13,36 mm et une différence de 3,58 mm entre la tailles moyenne des larves du témoin et la dose 2 qui était de moyenne 12,19mm. Tandis que une grand différence entre la taille moyenne des larves du témoin et la dose 03 (moy= 11,87 mm) a été estimé à 3,9mm.

3.1.2.4.- Après « 96 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 2^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 25.

Tableau 25 : les tailles moyennes avec les valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 10 larves après 96h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	12,58	15,53	14,43 ± 0,89
D1	12,92	13,99	13,46 ± 0,41
D2	11,99	13,04	12,51 ± 0,33
D3	10,36	11,99	11,33 ± 0,63

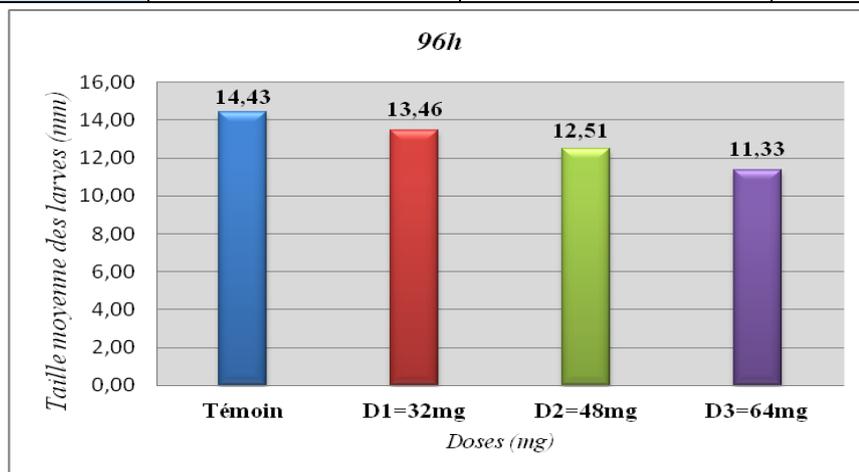


Figure 28 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 10 larves prise après 96 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats montrent (Tab. 25 ; Fig. 28) une faible diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque une faible différence entre le témoin qui était de moyenne 14,43 mm et la dose 01(moy=13,46mm). Cette différence a été estimée à 0,97mm, et de différence 2,44mm entre le témoin et la dose 02 (moy= 11,99mm). Tandis qu'une différence de 3,1mm entre le témoin et la dose 03 (moy=11,33mm).

3.1.2.5.- Après « 120 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 2^{ème} répétition après 120h d'incubation sont illustrées dans le tableau 26.

Tableau 26 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 09 larves après 120h d'incubation

	Min	Max	Moyenne ± ET
D2	12,19	12,74	12,56 ± 0,16
D3	9,9	11,76	10,96 ± 0,53

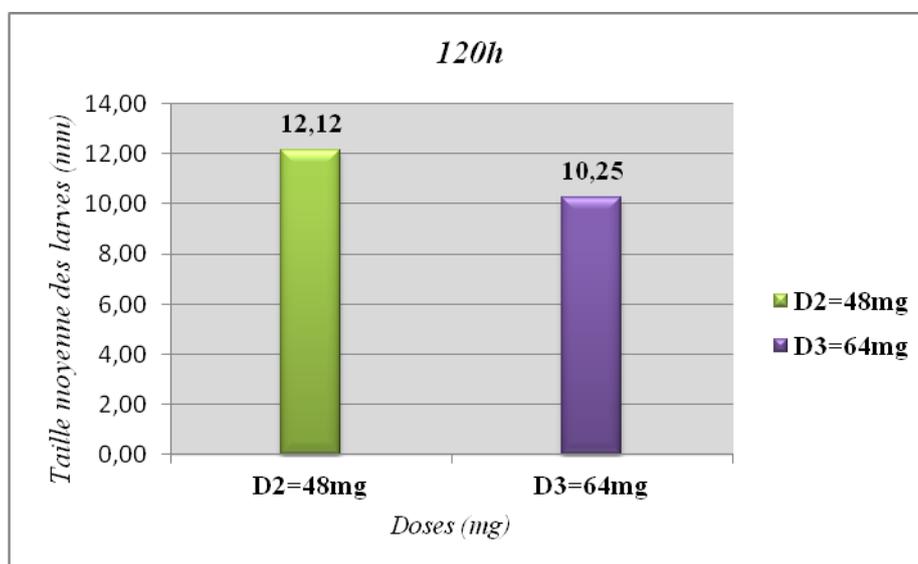


Figure 29 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 09 larves prise après 120 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les larves du témoin et la dose 02 sont entrées dans le stade pupale ; donc les mesures de tailles ont été effectuées sur la 2^{ème} et 3^{ème} dose seulement. La taille moyenne des larves de la dose 02 a été d'une moyenne 12,12 mm très proche à la taille moyenne des larves de la dose 03 qui était de 10,25 mm avec une très faible différence qui était 1,87 mm.

D'après les figures de 25 à 29, on voit clairement que la taille des larves n'a pas été le même dans les différents échantillons à l'intérieur de la même période. On voit qu'ainsi une diminution dans la taille des larves nourris sur les différents dose par rapport à témoin pendant la période d'expérimentation (Fig. ??). La taille moyenne des larves a été diminuée d'une manière dépendante de la dose.

3.1.3.- Les mesures effectuées sur la 3^{ème} répétition

3.1.3.1.- Après «24h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 3^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 27.

Tableau 27 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 16 larves après 24h d'incubation :

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	7,69	8,74	8,25 ± 0,88
D1	6,26	9,95	7,60 ± 1,12
D2	5,99	8,57	7,38 ± 0,97
D3	5,89	7,17	6,53 ± 0,36

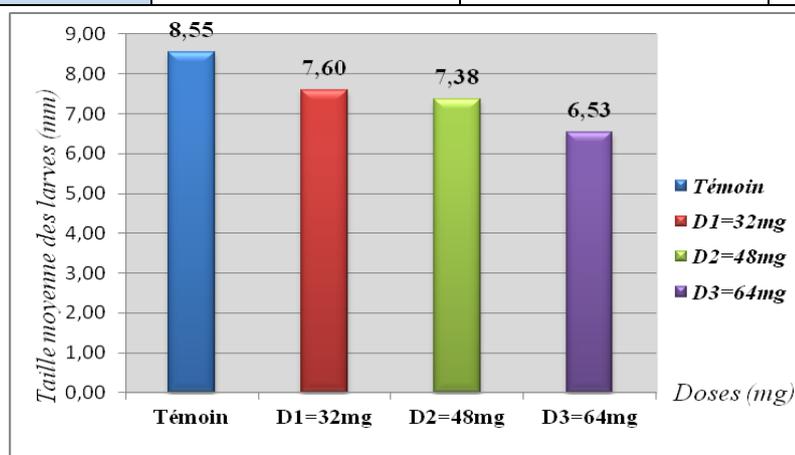


Figure 30 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 16 larves prise après 24 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

On voit clairement (Tab 27 ; Fig. 30), ainsi que la taille des larves n'a pas été la même dans les différents échantillons à l'intérieur de la même période. Les résultats de la mesure des larves de différentes doses montrent une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque que la taille des larves nourries sur la viande de lapin témoin varie entre 7,69 et 8,74 mm avec une moyenne égale à 8,25 mm est plus élevé par rapport les trois (03) doses différents. Une légère différence observé entre le la taille moyenne du témoin et la taille des larves élevés sur des tissus de lapin contenant des différents doses d'AMT sont dose 01 ; 02 et 03 qui correspond moyennes 7,60 ; 7,38 et 6,53 mm respectivement ; où on observe une très petites différence de 0.65 mm entre le témoin et la dose 2 et de 0.87 mm entre le témoin et la dose 02. Tandis que la différence entre le témoin et la dose 03 est 1.72 mm.

3.1.3.2.- Après « 48h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 3^{ème} répétition après 48h d'incubation sont illustrées dans le tableau 28.

Tableau 28 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 14 larves après 48h d'incubation.

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	13,05	15,16	14,50 ± 0,56
D1	8,89	15,29	12,11 ± 2,26
D2	8,45	9,6	9,12 ± 0,30
D3	7,06	9,92	7,99 ± 0,80

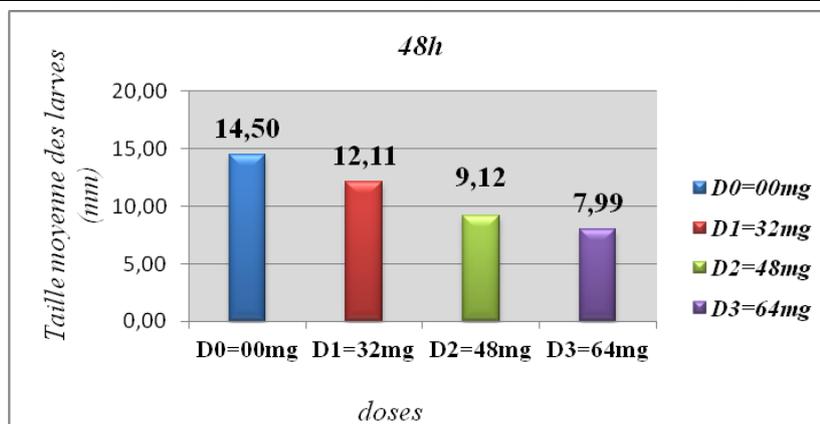


Figure 31 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 14 larves prise après 48 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats (Tab. 28 ; Fig. 31) montrent une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On observe une variation importante entre le témoin et les différentes doses, dont la longueur des larves du témoin varie entre 13,05 et 15,16 mm. On remarque une grande différence entre la taille moyenne du témoin avec taille moyenne égale 14,50 mm et la dose 02 avec la taille moyen est 12,11mm, la différence entre eux a été estimée à 1,92 mm ; et entre le témoin et la dose 2 avec moyenne 9,12 mm on remarque une grande différence a été estimée à 5,38 mm. Tandis que la différence entre le témoin et la dose 3 de moyenne 7,99 était 6,51 mm.

3.1.3.3.- « 72h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 3^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 29.

Tableau 29 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 12 larves après 72h d'incubation.

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	14,77	16,98	15,88 ± 0,76
D1	11,95	14,78	13,31 ± 0,94
D2	10,81	13,07	12,10 ± 0,57
D3	9,85	12,22	10,74 ± 0,70

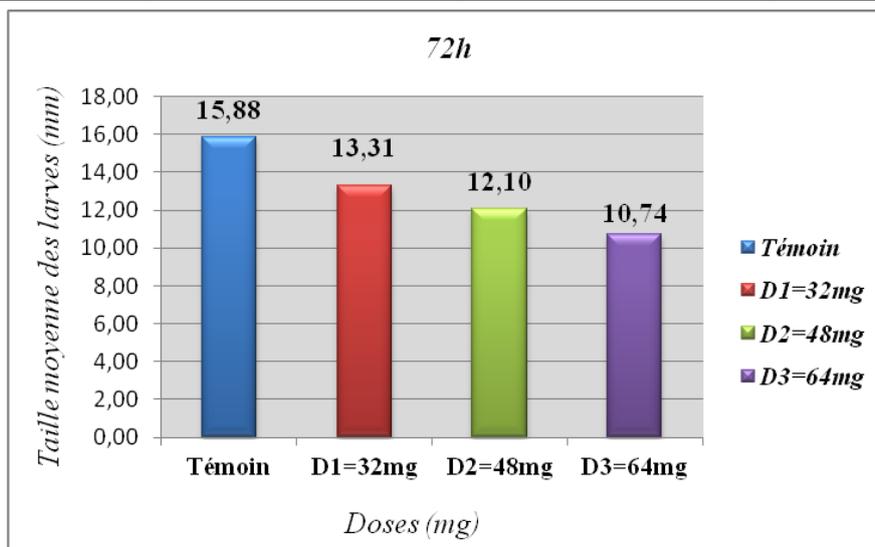


Figure 32 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 12 larves prise après 72 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats (Tab. 29 ; Fig. 32) montrent une diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque une variation importante entre la taille moyenne du témoin et tailles moyenne des différents doses ; on observe que la taille des larves nourries sur le témoin compris entre 14,77 et 16,98 avec une moyenne égale 15,88. Une différence de 2,41 entre la taille moyenne du témoin et la dose 01 a été d'une moyenne de 13,31mm et une différence de 3,53 mm entre la taille moyenne des larves du témoin et la dose 3 qui était de moyenne 12,35 mm. Tandis que une grand différence entre la taille moyenne des larves du témoin et la dose 03 (moy= 11,12mm) a été estimé à 4,76 mm.

3.1.3.3.- Après « 96 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 3^{ème} répétition après 24h d'incubation sont illustrées dans le tableau 30.

Tableau 30 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 10 larves après 96h d'incubation.

	Min	Max	Moyenne ± ET
Témoin	12,22	14,96	14,00 ± 0,75
D1	12,11	14,05	13,39 ± 0,63
D2	11,05	14,1	12,65 ± 0,91
D3	10,01	12,44	11,30 ± 1,00

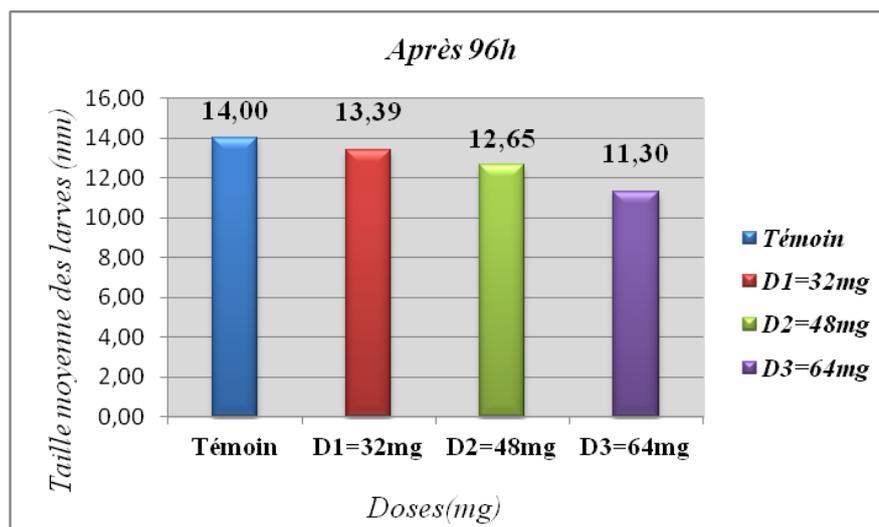


Figure 33 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 10 larves prise après 96 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les résultats (Tab. 30 ; Fig. 33) montrent une faible diminution de la taille moyenne des larves des trois doses par rapport le témoin. On remarque une faible différence entre le témoin qui était de moyenne 14 mm et la dose 01 (moy=13,39mm). Cette différence a été estimée à 0,61 mm, et de différence 1,35 mm entre le témoin et la dose 03 (moy= 12,65 mm). Tandis que une différence de 2,70 mm entre le témoin et la dose 03 (moy=11,30mm).

3.1.3.3.- Après « 120 h d'incubation »

Les mesures prise sur les larves de la 3^{ème} répétition après 120h d'incubation sont illustrées dans le tableau 31.

Tableau 31 : Tailles moyennes avec valeurs minimales et maximales des mesures prise sur 09 larves après 120h d'incubation

	Min	Max	Moyenne ± ET
D2	10,32	12,07	11,5 ± 0,56
D3	10,61	12,86	11,78 ± 0,7

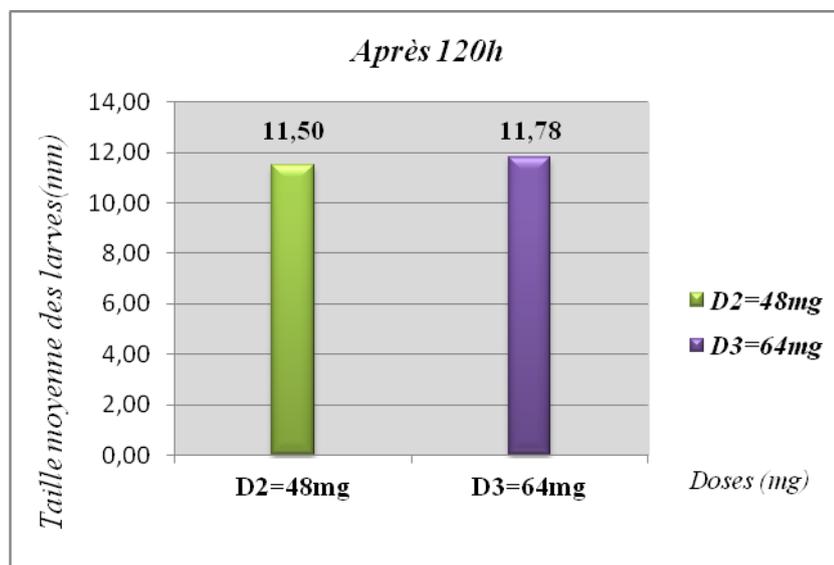


Figure 34 : Diagramme démontrant la taille moyenne pour 9 larves prise après 120 heures d'incubation en fonction de différentes doses croissantes

Les larves du témoin et la dose 02 sont entrées dans le stade pupale ; donc les mesures de tailles ont été effectuées sur la 2^{ème} et 3^{ème} dose seulement. La taille moyenne des larves de la dose 02 a été d'une moyenne 11,50 mm très proche à la taille moyenne des larves de la dose 03 qui était de 11,78mm avec une très faible différence qui était 0,28mm (Tab. 31 ; Fig. 34).

Lorsque des données la croissance des asticots dans différents échantillons a été analysée statistiquement les résultats ont montré que le taux de croissance des larves changeait seulement de façon dépendante de la dose amitriptyline.

3.2.- La taille moyenne des larves de différentes doses et du témoin de chaque répétition pendant la période d'expérimentation

✚ La 1^{ère} répétition :

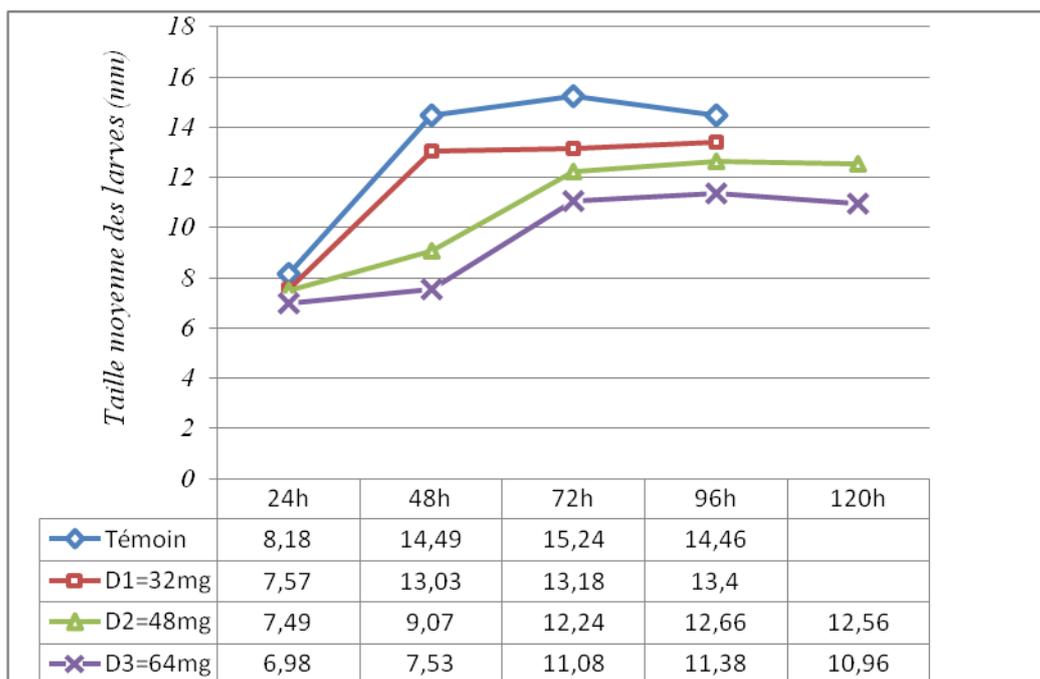


Figure 35 : Evolution de la taille moyenne de différente dose et témoin (1^{ère} répétition)

La courbe de développement concernant la longueur larvaire d'après le tableau 32 et la figure 35 augmente nettement jusqu'à atteindre à la longueur maximale. Ce qui signifie le 3^{ème} stade larvaire. La longueur maximale des larves, se nourrissant sur le témoin, était 15,24 mm et a été obtenu en 72 heures. La longueur maximale pour l'alimentation des larves sur la dose 1 ($D_1 : 32mg$) a été enregistrée à 96 heures. La longueur maximale a également été obtenue dans le même temps par les larves nourris sur les doses 2 et 3, si elle était seulement 12,66 mm et 11,38 mm ; respectivement. Une faible diminution de la longueur larvaire moyenne a été observée ensuite dans les doses : 2 ($D_2 : 48mg$), 3 ($D_3 : 62mg$) et le témoin ; Cela correspond à la fin de la croissance des larves et au début de la phase prénymphe.

On voit clairement que des larves nourris sur les tissus de lapins contenant des concentrations croissantes d'amitriptyline ont été toujours des tailles inférieures à celle du témoin.

Apparemment, ces différences de taille sont dues à la présence de l'amitriptyline dans la substance de nourriture. On remarque aussi que l'existence d'une corrélation entre la concentration de l'AMT dans les tissus de lapins et la longueur des larves qui se nourrissent de ces tissus. Plus la concentration d'amitriptyline dans le substrat nutritif ; la taille des larves plus diminuée et le développement des larves plus lent, ce qui a ralenti le cycle de développement pour les larves chez les doses 1, 2 et 3; donc l'amitriptyline a peut-être prolongé le cycle de vie.

✚ **La 2^{ème} répétition :**

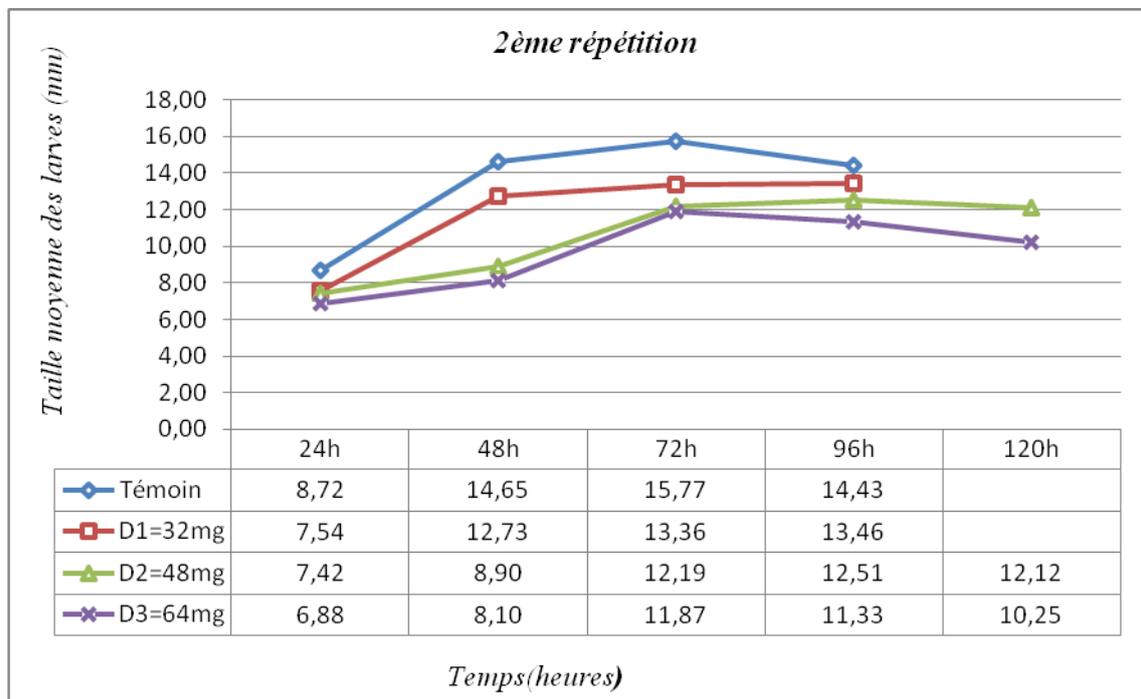


Figure 36 : Evolution de la taille moyenne de différentes doses et témoin (2^{ème} répétition)

La courbe de développement concernant la longueur larvaire d'après le tableau 33 et la figure 36 augmente nettement jusqu'à atteindre la longueur maximale qui signifie le 3^{ème} stade larvaire. La longueur maximale des larves, se nourrissant sur le témoin, était **15,77** mm et a été obtenue en 72 heures. La longueur maximale pour l'alimentation des larves sur la dose 1 (D_1 : 32mg) a été enregistrée à 96 heures. La longueur maximale a également été obtenue dans le même temps par les larves nourries sur les doses 2 et 3, si elle était seulement 12,51 mm et 11,33 mm ; respectivement. Une faible diminution de la longueur larvaire moyenne a été observée ensuite dans les doses : 2 (D_2 : 48mg), 3 (D_3 : 62mg) et le témoin ; Cela correspond à la fin de la croissance des larves et au début de la phase prénymphe.

On voit clairement que des larves nourries sur les tissus de lapins contenant des concentrations croissantes d'amitriptyline ont été toujours des tailles inférieures à celle du témoin. Apparemment, ces différences de taille sont dues à la présence de l'amitriptyline dans la substance de nourriture. On remarque aussi que l'existence une corrélation entre la concentration de l'AMT dans les tissus de lapins et la longueur des larves qui se nourrissent de ces tissus. Plus la concentration d'amitriptyline dans le substrat nutritif ; la taille des larves plus diminué et le développement des larves plus lent, ce qui a ralenti le cycle de développement pour les larves chez les doses 1, 2 et 3; donc l'amitriptyline a peut être prolongé le cycle de vie.

✚ **La 3^{ème} répétition :**

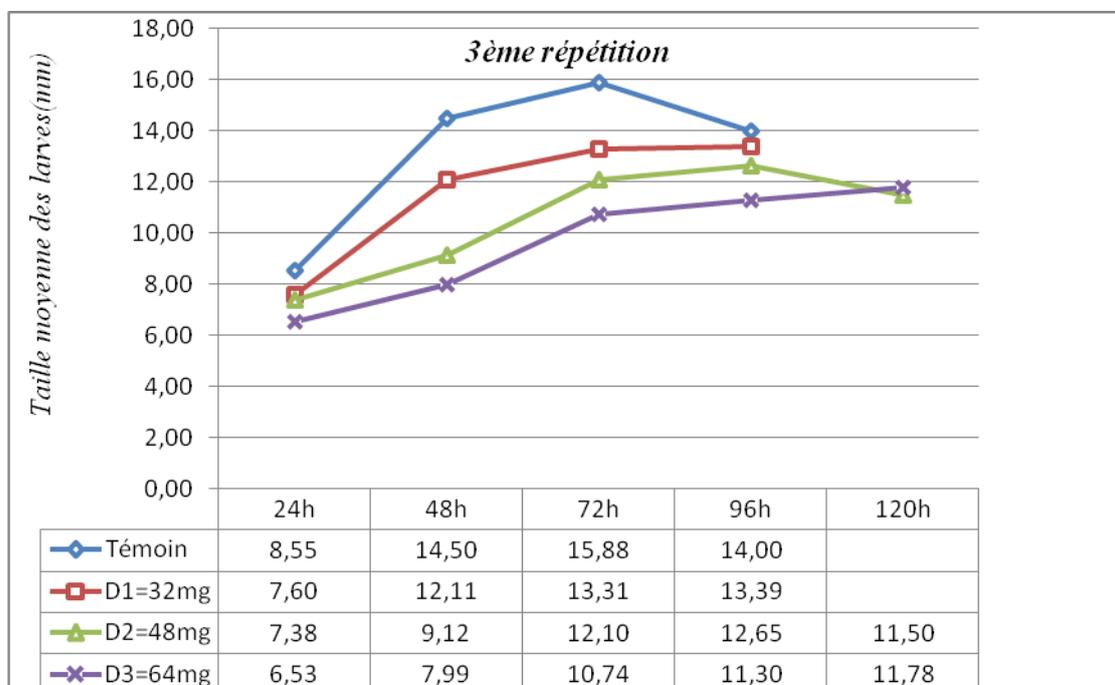


Figure 37 : Evolution de la taille moyenne de différente dose et témoin (3^{ème} répétition)

La courbe de développement concernant la longueur larvaire d'après le tableau 34 et la figure 37 augmente nettement jusqu'à atteindre à la longueur maximale qui signifie le troisième stade larvaire. La longueur maximale des larves, se nourrissant sur le témoin, était 15,88 mm et a été obtenu en 72 heures. La longueur maximale pour l'alimentation des larves sur la dose 1 (D_1 : 32mg) a été enregistrée à 96 heures. La longueur maximale a également été obtenue dans le même temps par les larves nourries sur la dose 3, si elle était seulement 12,65mm. Une faible diminution de la longueur larvaire moyenne a été observée ensuite dans la dose 2

(D_2 :48mg) et le témoin ; Cela correspond à la fin de la croissance des larves et au début de la phase prénymphe.

On voit clairement que des larves nourries sur les tissus de lapins contenant des concentrations croissantes d'amitriptyline ont été toujours des tailles inférieures à celle du témoin. Apparemment, ces différences de taille sont dues à la présence de l'amitriptyline dans la substance de nourriture. On remarque aussi que l'existence d'une corrélation entre la concentration de l'AMT dans les tissus de lapins et la longueur des larves qui se nourrissent de ces tissus, Plus la concentration d'amitriptyline dans le substrat nutritif ; la taille des larves plus diminuée et le développement des larves plus lent, ce qui a ralenti le cycle de développement pour les larves chez les doses 1, 2 et 3; donc l'amitriptyline a peut être prolongé le cycle de vie.

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

La limite inférieure de température est appelée température seuil minimum. Cette valeur est également propre à chaque espèce (Greenberg et Kunich 2002 ; Amendt *et al.*, 2004, 2007).

Tableau 35 : Données de base pour *L. sericata* pour le calcul de l'IPM

Paramètres	
Le seuil inférieur de croissance	La constante de chaleur (cumul)
9°C	207° C.

3.3.1.- Les résultats de calcul des degrés heures accumulées pour les 3 répétitions

3.3.1.1.- ADH de la 1^{ère} répétition

Dans le tableau 36 seront présentés les résultats du calcul de l'ADH concernant la première répétition.

Tableau 36 : Résultats de calcul de l'ADH de la 1^{ère} répétition

	<i>la ponte</i>		<i>émergence</i>		<i>ADH</i>
	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	
D00	18/05/2016	15:00	30/05/2016	17:00	211,00°C
D01	11/05/2016	15:00	24/05/2016	09:30	224,50°C
D02	10/05/2016	15:00	22/05/2016	14:00	218,88°C
D03	10/05/2016	13:00	23/05/2016	09:30	233,50°C

D'après les résultats obtenus (Tab. 36), on observe une variation importante entre ADHs des 3 doses et le témoin où on remarque que l'ADH des 3 doses toujours supérieur à celle du témoin. On observe une différence de 13,5° C. entre l'ADH de la dose 1 et le témoin, et une différence de 7,88° C. entre l'ADH de la dose 2 et le témoin. Tandis que la différence entre ADH de la dose 3 et le témoin était 22,5° C.

3.3.1.2.- ADH de la 2^{ème} répétition

Dans le tableau 37 seront présentés les résultats du calcul de l'ADH concernant la deuxième répétition.

Tableau 37 : Résultats de calcul de l'ADH de la 2^{ème} répétition

	<i>la ponte</i>		<i>émergence</i>		<i>ADH</i>
	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	
D00	12/05/2016	13:00	24/05/2016	11:00	208,75°C
D01	12/05/2016	13:00	24/05/2016	11:00	214,94°C
D02	10/05/2016	15:00	23/05/2016	09:30	231,25°C
D03	10/05/2016	13:00	23/05/2016	09:30	233,50°C

D'après les résultats obtenus (Tab. 37), on observe une variation importante entre ADHs des 3 doses et le témoin où on remarque que l'ADH des 3 doses toujours supérieur à celle du témoin. On observe une différence de 6,18° C. entre l'ADH de la dose 1 et le témoin, et une différence de 22,5° C. entre l'ADH de la dose 2 et le témoin. Tandis que la différence entre ADH de la dose 3 et le témoin était 24,75° C.

3.3.1.3.- ADH de la 3^{ème} répétition

Dans le tableau 38 seront présentés les résultats du calcul de l'ADH concernant la deuxième répétition.

Tableau 38 : Résultats de calcul de l'ADH de la 3^{ème} répétition

	<i>la ponte</i>		<i>émergence</i>		<i>ADH</i>
	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	<i>Date</i>	<i>Heure</i>	
D00	12/05/2016	13:00	24/05/2016	09:30	204,25° C
D01	12/05/2016	13:00	24/05/2016	11 :00	219,44° C
D02	10/05/2016	15:00	24/05/2016	09:30	249,81° C
D03	10/05/2016	15:00	24/05/2016	15:00	235,19° C

D'après les résultats obtenus (Tab. 38), on observe une variation importante entre ADHs des 3 doses et le témoin où on remarque que l'ADH des 3 doses toujours supérieur à celle du témoin. On observe une différence de 15,19° C. entre l'ADH de la dose 1 et le témoin, et une différence de 45,56° C. entre l'ADH de la dose 2 et le témoin. Tandis que la différence entre ADH de la dose 3 et le témoin était 30,94° C.

3.3.2.- Interprétation des résultats :

Dans le tableau 39, l'interprétation des résultats concernant le calcul de l'ADH des 3 répétitions seront abordés.

Tableau 39 : Moyenne générale des ADHs pour les 3 répétitions de chaque dose :

<i>Répétitions</i>	<i>Doses</i>	D00	D01	D02	D03
	R01	211,00°C	224,50°C	218,88°C	233,50°C
	R02	208,75°C	214,94°C	231,25°C	233,50°C
	R03	204,25°C	219,44°C	249,81°C	235,19°C
Moyenne ADHs des 3 répétitions de la même dose		208°C	219,63°C	233,31°C	234, 06°C

Les résultats de tableau 39, démontrant une augmentation légère d'ADH entre le témoin et différents dose. Pour le témoin l'ADH calculé est égale 208° C. Cela est cohérent avec les donnés du degré heures accumulées de base de l'espèce était 207°C., avec une légère différence estimé à 1° C. seulement. Par contre le calcul des ADHs pour les différents doses 01 ; 02 ; 03 a donnés les résultats de l'ADH égal 219,63° C. ; 233,31° C. et 234, 06° C. On remarque que la différence entre les doses augmente avec la dose où la différence de entre le témoin et la dose 01 a été 11,63° C. et entre le témoin et la dose 02 a été 25,31° C. Tandis que une différence de 26,06° C. entre le témoin et la dose 03. Cette différence entre les doses 01, 02,03 et le témoin s'explique par la prolongation du cycle de développement de *L. sericata*.

3.4.- L'effet de l'amitriptyline sur le taux de développement de *L.sericata*

Un autre domaine important d'entomotoxicologie est l'investigation des effets des médicaments et des toxines sur le développement des arthropodes (Goff et Lord, 1994). Des études montrent que l'utilisation d'antemortem de divers médicaments et de toxines peut influencer sur les taux de développement de la mouche, entraînant une mauvaise estimation de l'intervalle post-mortem (PMI) basée sur le développement des insectes (Goff *et al.*, 1992, Bourel *et al.*, 1999b). la longueur a été l'un des paramètres les plus fréquemment mesurés pour l'âge larvaire estimation réussie (Duke, 2004).

Lorsque la croissance des données des larves dans différents échantillons a été analysée statistiquement les résultats ont montré que le taux de croissance des larves changeait seulement de façon dépendante de la dose amitriptyline. Plus la concentration de l'amitriptyline dans la substance alimentaire ; le taux de croissance est plus faible (**Fig. 38, 39 et 40**). . Nos résultats s'accordent avec les travaux de *Djedouani B* (2008) effectuée sur l'impact de l'amitriptyline sur le taux de croissance des larves qui ont été nourrit de viande de

porc hachée homogénéisé avec différentes doses d'amitriptyline (échantillon de contrôle (00 ng / g), thérapeutique (100 ng / g), toxiques (300 ng / g), létale (500 ng / g), 05 x dose létale (2500 ng / g). Dans cette étude, il a été démontré que les larves nourries sur un produit alimentaire contenant la dose connue de amitriptyline ont affiché un taux de croissance plus lent que les larves nourries sur l'échantillon témoin (00ng / g). La variation du taux de croissance des larves de manière dépendante de la dose.

Toutefois, le résultat obtenu à partir de ce travail contredit une étude réalisée par Goff *et al.* (1993), cette étude a tenté de montrer l'effet de l'amitriptyline sur *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae).

Mais en général, les résultats ont montré une similarité avec les résultats obtenus par si les résultats indiquent que les larves élevées sur le produit alimentaire contenant la concentration la plus basse deviennent la plus grande larve.

Par conséquent, on conclut qu'il est de plus impossible de généraliser l'effet d'un même composé à différentes espèces de diptères nécrophages. L'effet des drogues sur le développement des différentes espèces d'insectes est donc très variable selon les substances, les stades et les espèces (Gosselin et Bourel, 2014). Par exemple Carvahlo *et al.* (2001) ont étudié les effets de diazépam (nordiazépam) (antidépresseur tricyclique) sur le développement de deux espèces de *Chrysomya albiceps* et *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). Les larves de ces deux espèces ont été élevées sur les tissus provenant de lapins administrés deux fois la dose létale. Les résultats ont montré que les larves se nourrissent de tissus contenant le médicament développé plus rapidement que les larves du témoin pour les deux espèces de mouches (Fig. 38, 39 et 40). Ces résultats sont à l'opposé de l'étude effectuée par Pien *et al.* (2004) qui étudie l'effet du nordiazépam sur le développement de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). Les larves ont été élevées sur un substrat nutritif contenant différentes concentrations de nordiazépam. Aucune différence notable n'a été observée entre les larves nourries sur le substrat contenant nordiazépam et le témoin.

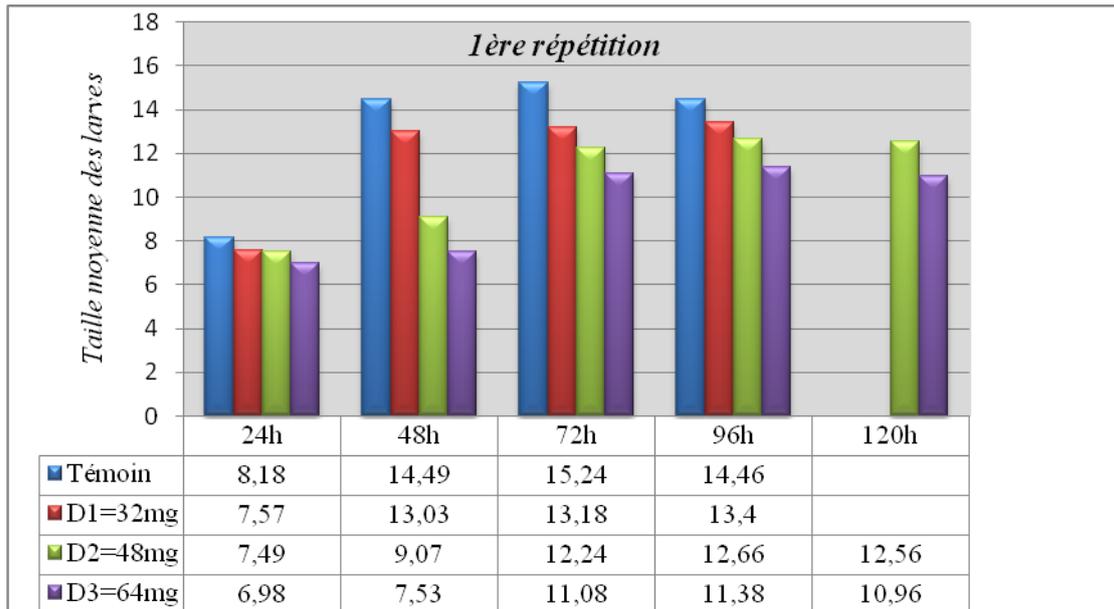


Figure 38 : Taille moyenne des différentes doses et du témoin de *L. sericata* pendant tout le cycle du développement (1^{ère} répétition).

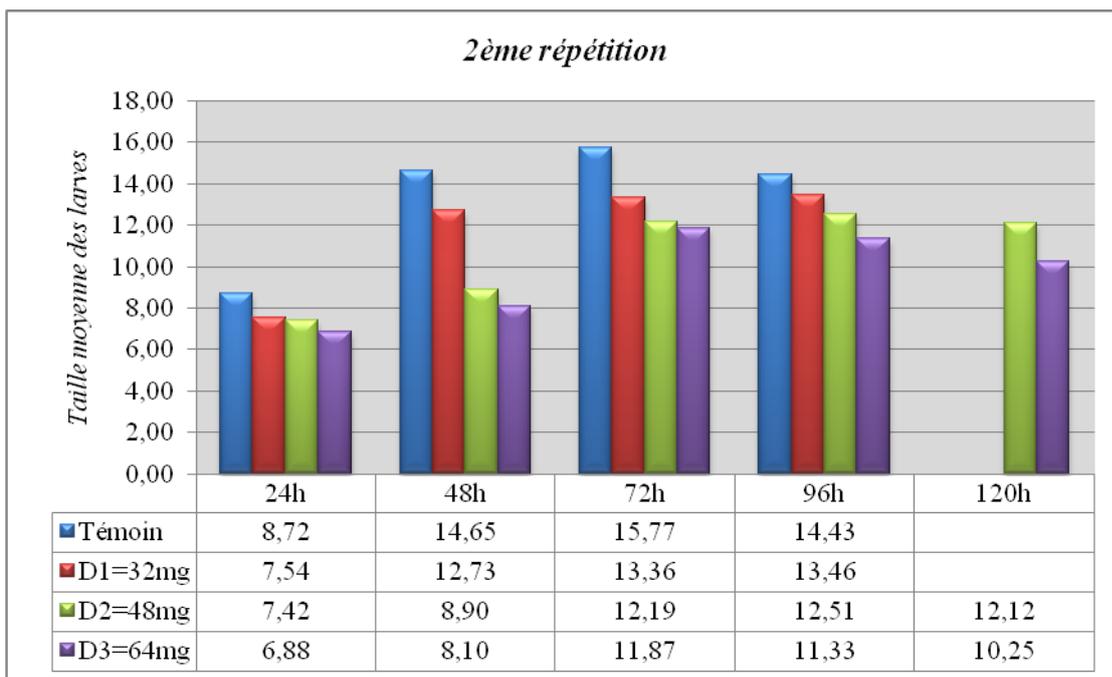


Figure 39 : Taille moyenne des différentes doses et du témoin de *L. sericata* pendant tout le cycle du développement (2^{ème} répétition).

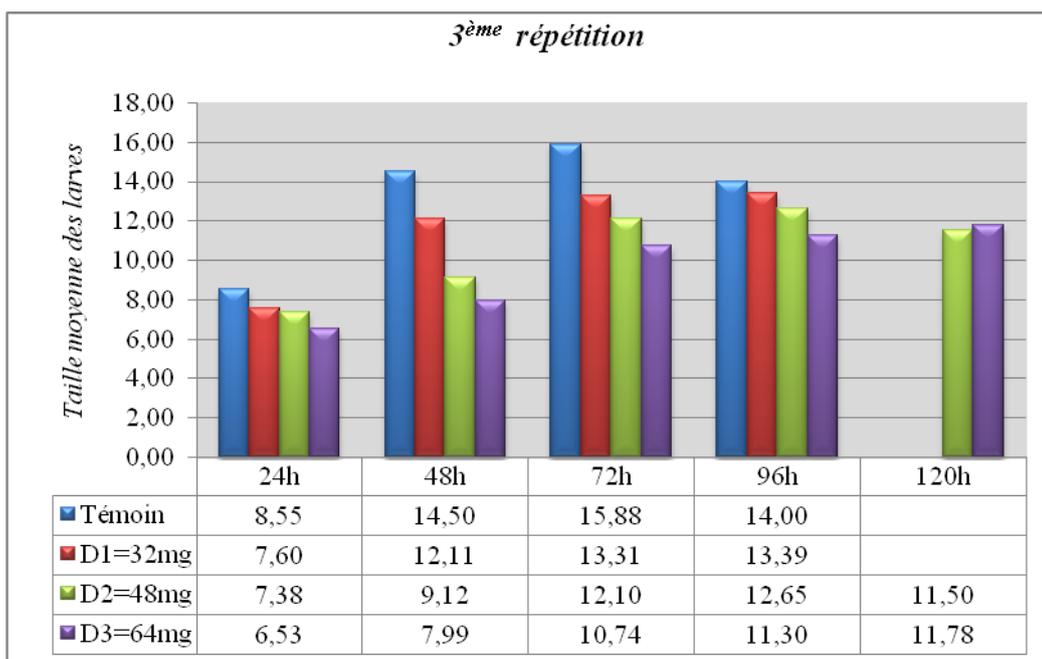


Figure 40 : Taille moyenne des différentes doses et du témoin de *L. sericata* pendant tout le cycle du développement (3^{ème} répétition).

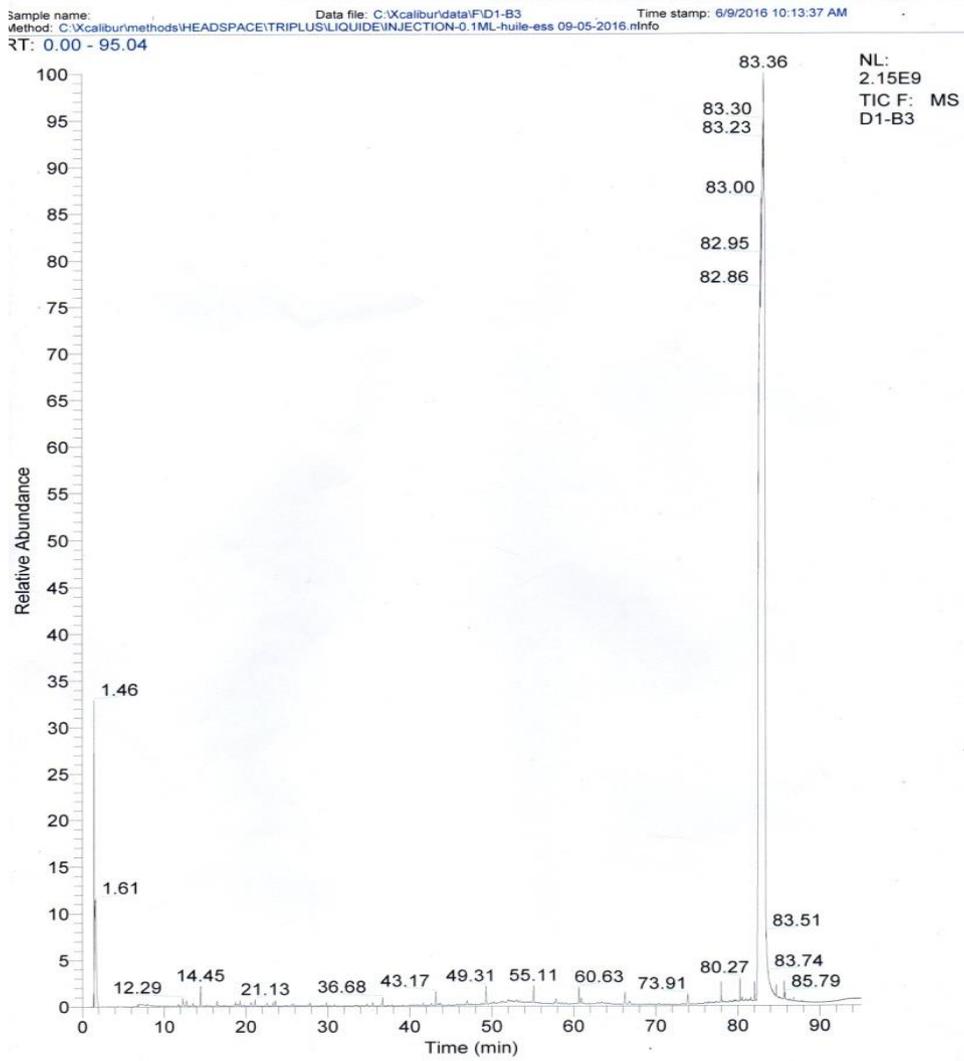
3.5.- L'analyse toxicologique

Pour la détection de l'amitriptyline dans les tissus des larves de *L. sericata*, les échantillons conservés dans le congélateur (-20°) pour l'analyse toxicologique ont été transférés au laboratoire de toxicologie de l'INCC et analysés en utilisant la technique d'analyse CG-MS. Le résultat de ce test est positif où l'amitriptyline a été détectée dans tous les échantillons contaminés par l'amitriptyline, sauf le témoin car il ne contient pas d'amitriptyline (Fig. 41).

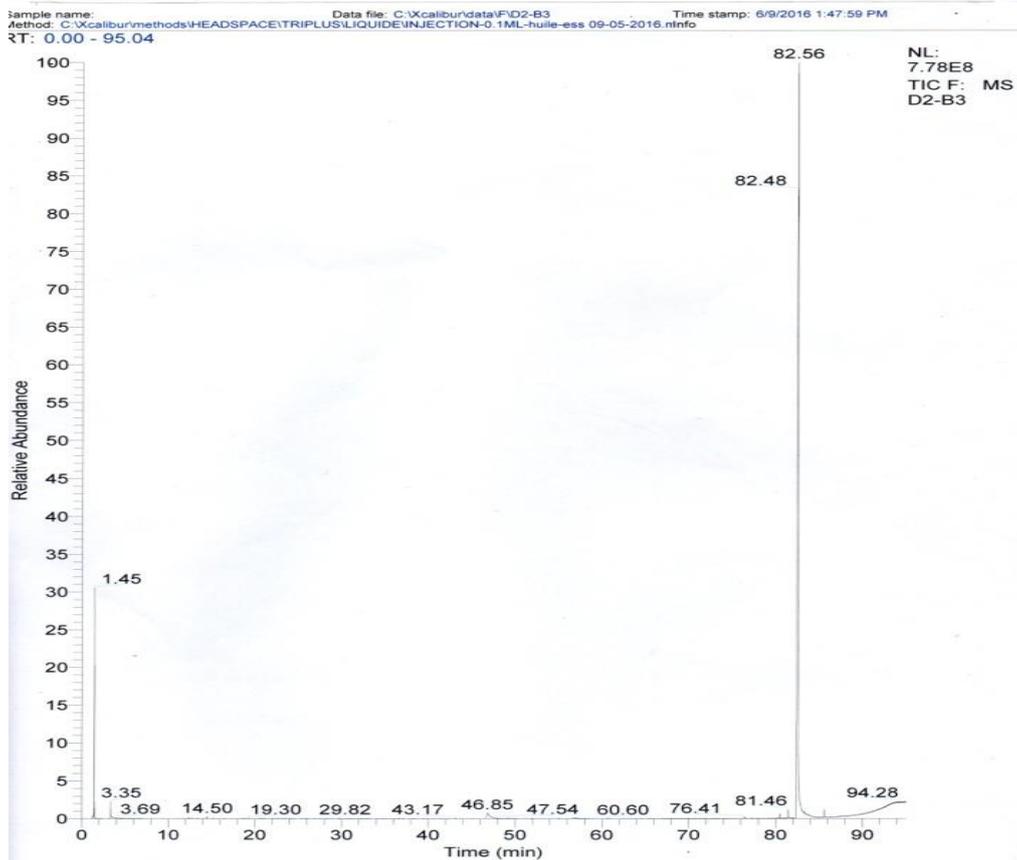
Plusieurs travaux ont été menés dans la littérature pour la détection de l'amitriptyline dans les larves de Diptères et en utilisant différentes méthodes (Sadler *et al.*, 1995 ; Wilson *et al.*, 1993 ; Miller *et al.*, 1994 ; Sadler *et al.*, 1997 ; Goff *et al.*, 1993).

Les médicaments et les toxines peuvent être détectés dans les larves chaque fois que leurs taux d'accumulation dépassent les taux d'excrétion. Il n'est pas entièrement compris exactement comment ces processus se produisent dans les asticots ni comment ils affectent leur développement (Maria et de Carvalho, 2010) ; cela explique la présence de l'amitriptyline dans tous les spécimens des stades larvaires (stades d'alimentation et de post-alimentation).

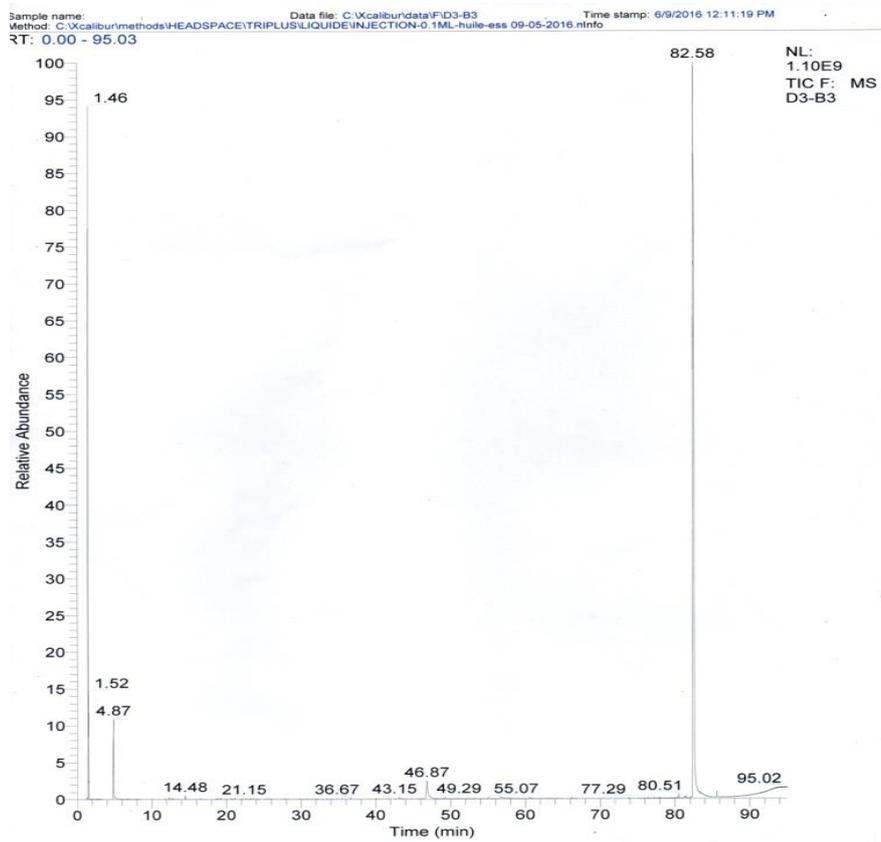
a)



b)



c)



d)

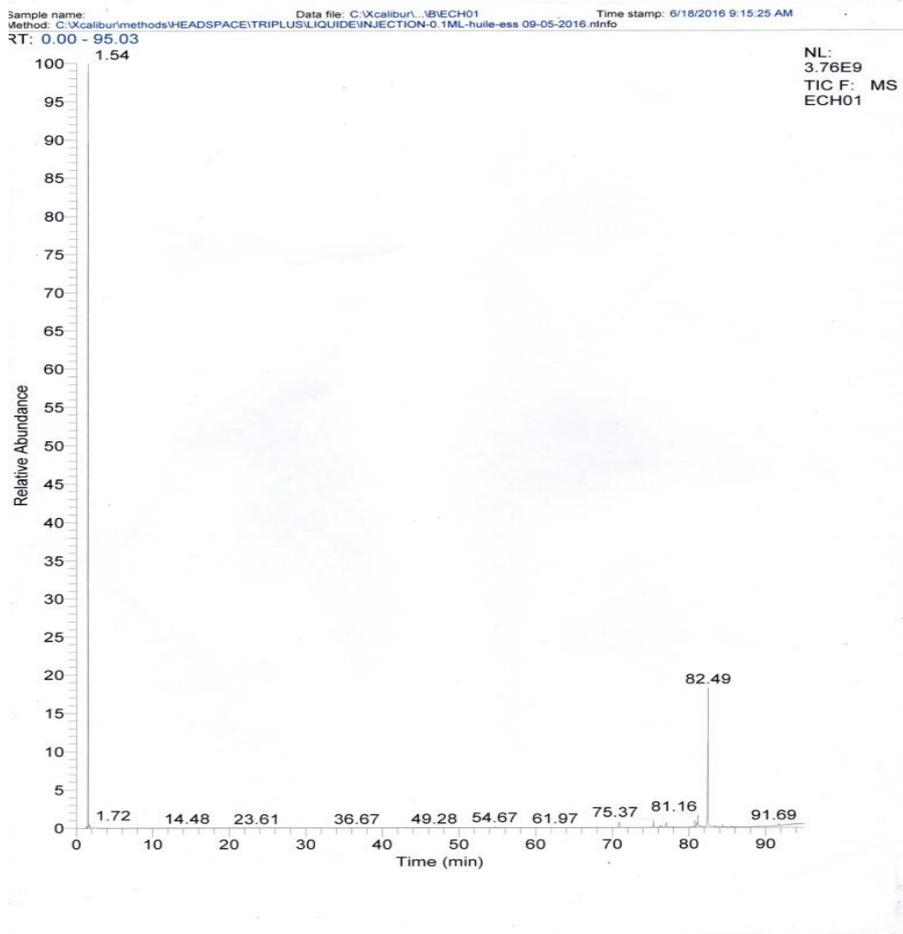


Figure 41 : Chromatogrammes de l'amitriptyline au 3^{ème} stade larvaire.

a : la dose 1 ; *b* : la dose 2 ; *c* : la dose 3 ; *d* : témoin

conclusion

Conclusion

Cette étude a été réalisée afin d'étudier l'impact de l'amitriptyline sur le taux de croissance des larves nourries de viande de lapin avec différentes doses du xénobiotique.

Les résultats de cette étude, a démontré que les larves nourries sur un substrat nutritif contenant des différentes doses de l'amitriptyline ($D_1=32mg$, $D_2=48mg$, $D_3= 64mg$) ont affiché un taux de croissance plus lent que les larves nourries sur l'échantillon témoin ($00mg$). Le taux de croissance des larves, en effet change de manière dépendante de la dose. Plus la concentration d'amitriptyline dans le substrat nutritif, le taux de croissance plus lent.

Dans cette étude qui consiste également à développer une méthode d'analyse pour détecter l'amitriptyline chez les larves en utilisant la technique de CG-MS. L'amitriptyline a été détectée dans toutes les larves cela est dû aux médicaments et les toxines peuvent être détectés dans les larves chaque fois que leurs taux d'accumulation dépassent les taux d'excrétion (Maria et de Carvalho,. 2010). Cette étude a démontré l'utilité de larves de *L. sericata* comme spécimens toxicologiques alternatives pour la détection de l'amitriptyline.

Les données issues de l'étude peut aider à établir des documents de référence en ce qui concerne l'influence de l'amitriptyline sur le taux de développement en Algérie. Cela peut se révéler précieuse comme un moyen d'estimer précisément le PMI, et d'aider ainsi les efforts d'application de la loi dans la résolution du crime.

Recommandations :

- Décongeler la viande (substrat nutritif) avant de procéder à l'expérience, soit dans l'eau ou le laisser perd de l'eau à la température ambiante avant le jour de leur utilisation dans l'expérience.
- Il faut mesurer la longueur totale de la larve en tenant compte du degré rétrécissement causé par le stockage dans l'éthanol.
- D'autres espèces de Caliphoridae peuvent être soumises au même protocole d'expérimentale.
- augmenter la population des larves pour augmente la taille de l'échantillon, et de commencer la mesure des larves dès le première stade larvaire.

Références

Références bibliographiques

- Aegtmeier H, Peterson MB, Ragavan VV, Ferguson AG, Lesch M; 1977. De novo alanine synthesis in isolated oxygen deprived rabbit myocardium. *J Biol Chem.* 252:5010-5018.
- Amendt J., Krettek R., Zehner R. (2004). Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51-65.
- Amendt, J, Richards C. S, Campobasso C. P, Zehner R, et Hall M.J.R. 2011. *Forensic entomology: applications and limitations. Forensic Sci. Med. Pathol.* 7(4):379-92
- Amendt, J., Goff, M.L., Campobasso, C.P., Grassberger, M.. 2010. Current Concepts in Forensic Entomology. London, New-York : Springer.
- Anderson, G.S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences.* 45(4): 824-832.
- Anonymous (1814) Instruction für die öffentlich angestellten Aerzte und Wundärzte in den k.k. oesterreichischen Staaten, wie sie sich bei gerichtlichen Leichenschauen zu benehmen haben. Schoenfeld, Prague
- Arnaldos, M.I., Garcia, M.D., Romera, E., Presa, J. J. and Luna, A. (2005). Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International.* 149 : 57-65.
- Bailey D.N. and R.F. (1980). Shaw. Interpretation of blood and tissue concentrations in fatal self-ingested overdose involving amitriptyline: an update (1978-1979). *J. Anal. Toxicol.* 4:232-236
- Baldessarini RJ. 2001 ; Antidepressants. In: Goodman LS, Gilman A, Hardman JG, eds. *The Pharmacological Basis of Therapeutics* . 10th edn. New York: McGraw-Hill, 451-67.
- Baselt RC. 2004, *Disposition of toxic drugs and chemicals in man* , 7th ed., Biomedical Publications, Foster City,: 55-59
- Benecke M. 2004. Arthropods and corpses. In Tsokos M. (ed.), *Forensic Pathology Reviews*, vol 2. Humana: Totowa, NJ; pp 207-240.
- Bergeret M (1855) Infanticide, momification naturelle du cadavre. *Ann Hyg Publique Med Leg* 4:442-452
- Beyer JC, Enos WF, Stajic M (1980) Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci* 25: 411-412
- Beyer, J.C., Enos, W.F., Stajic, M. (1980). Drug identification through analysis of maggots. *J. Forensic Sci* ; 25:411-412.
- Bourel B, Fleurisse L, Hédouin V, Cailliez JC, Creusy C, Gosset D, Goff ML (2001a)

- Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. *J Forensic Sci* 46:596–599.
- Bourel B, Hédouin V, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D (1999) Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 44:354 – 358
- Bourel B, Tournel G, Hédouin V, Deveaux M, Goff ML, Gosset D (2001b) Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Sci Int* 120:127–131
- Bynum ND, Poklis JL, Gaffney-Kraft M, Garside D, Roper-Miller JD. 2005, Postmortem distribution of tramadol, amitriptyline, and their metabolites in a suicidal overdose. *J Anal Toxicol*; 29 : 401–406.
- Byrd JH et Peace MR. 2011. *Entomotoxicology: Drugs, Toxins, and Insects*. (chap.14); p 483- 499. In: Kobilinsky L (ed). *Forensic Chemistry Handbook*. 1^{ère} édition, édition John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey. 504 pp
- Byrd JH, Castner JL (2010) *Insects of forensic importance*. In: Byrd JH, Castner JL, (Eds.). *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2^{ème} éd. 39 - 126, Florida: CRC Press.
- Campobasso CP, Di Vella G, Introna F (2001) Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int* 120:18–27
- Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F, 2004. Drug analysis in blowfly JPAFMAT 2008; 8(1). ISSN 0972 - 5687 33 larvae and in human tissues: a comparative study. *Int. J. Legal Medicine.*; 118 (4): 210 – 214
- Capinera, J. L. 2008. *Encyclopedia of Entomology*. London, New York : Springer.
- Cartier E, Combemale P. 2008. Maggot therapy with *Lucilia sericata* for debridement of chronic wounds. *Ann Dermatol Venereol* 135(10):685-688
- Carvalho LML, Linhares AX, Trigo JR (2001) Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Sci Int* 120:140 – 144
- Church JC, Courtenay M. 2002. Maggot debridement therapy for chronic wounds. *Int J Low Extrem Wounds* 2:129-134.
- Day DM, Wallman JF (2006) Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina*. *J Forensic Sci* 51(3):657 – 663
- 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 Bioingénieur en Nature, Eaux et Forêts, faculté universitaire des sciences agronomique de Gembloux ; 26p.*
- Derzsiova. K, Mydlik .M, Petrikova. V, Molcanyiova. A, (2006). *Haemoperfusion of amitriptyline and nortriptyline – an in vitro study, BANTAO J. 4 :1–4.*
- 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.
- Durakovic Z, Plavsic F, Ivanovic D, Gasparovic V, Gjurasin M. 1982 ; Resin hemoperfusion in the treatment of BANTAO Journal 2006: 4 (2): 4 tricyclic antidepressant overdose. *Artif Organs*; 6: 205-207
- Esrafil A, Yamini Y, Shariati S (2007) Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some antidepressant drugs in biological fluids. *Anal Chim Acta* 604:127–133
- Foulke GE. 1995, Identifying toxicity risk early after antidepressant overdose. *Am J Emerg Med*;13:123-6.
- Gagliano-Candela R, Aventaggiato L (2001) The detection of toxic substances in entomological specimens. *Int J Legal Med* 114:197–203
- Gennard, D. E. 2007. *Forensic entomology : an introduction.* Chichester : Wiley.
- George, K. A., Archer, M. S., Green, L. M., Conlan, X. A. and Toop, T. (2009). 'Effect of morphine on the growth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology', *Forensic Science International*, 193, 21–25.
- Goff ML, Brown WA, Hewadikaram KA, Omori AI (1991) Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. *J Forensic Sci* 36:537 – 542
- Goff ML, Brown WA, Omori AI (1992) Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *J Forensic Sci* 37:867 – 872
- Goff ML, Brown WA, Omori AI, LaPointe DA (1993) Preliminary observations of the effects

- of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. *J Forensic Sci* 38:316 – 322
- Goff ML, Lord WD (1994) Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. *Am J For Med Pathol* 15:51 – 57
- Goff ML, Lord WD (2001). *Entomotoxicology: insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development*. In: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC, Boca Raton, Fla., pp 331–340
- Goff ML, Omori AI, Goodbrod JR (1989) Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J Med Entomol* 26:91–93
- Goodbrod JR, ML Goff, 1990. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. *J Med Entomol* 27: 338-343.
- Gosselin M, Ramirez Fernandez Mdel M, Wille SM, Samyn N, De Boeck G, Bourel B. 2010. Quantification of methadone and its metabolite 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine in third instar larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 34(7):374-80.
- Gosselin M, Wille SM, Fernandez Mdel M, Di Fazio V, Samyn N, De Boeck G, Bourel B. (2011). Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic toxicologists. *Forensic Sci Int*. 208 :1-9.
- Gosselin M, Bourel B (2014). *Apports de l'entomotoxicologie à l'expertise judiciaire : état de l'art et perspectives. (chapitre 14) p195-207. In Charabidze. D, Gosselin.M.(eds), Insectes, Cadavres et Scènes de Crime. Principes et Applications de l'Entomologie Medico-Légale. éditeur De Boeck. 280 pp.*
- Grassberger M, Reiter C (2001) Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* 120:32–36
- Greenberg (1991) Greenberg B. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology*. 1991;28:565–577.
- Greenberg B (1971) *Flies and disease: Ecology, classification, and biotic associations*. Volume 1. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Greenberg, B. and Kunich, J.C. (2002). *Entomology and the law: Flies as forensic indicators*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Güloğlu C, Orak M, Ustündağ M, Altıncı YA. Analysis of amitriptyline overdose in emergency medicine. *Emerg Med J.* 2011;28:296–309.
- Gunatilake K, Goff ML (1989). Detection of Organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. *J Forensic Sci*; 34: 714 - 716.
- Gunn, J.A., Shelley, C., Lewis, S.W., Toop, T., Archer, M. (2006). The determination of morphine in the larvae of *Calliphora stygia* using flow injection analysis and HPLC with chemiluminescence detection. *J. Anal. Toxicol.*;30:519–523.
- Gupta, A. 2008. A review of the use of maggots in wound therapy. *Ann Plast Surg* 60:224–227.
- Hall DG (1948). The blowflies of North America. Lanham: Thomas Say Foundation, Entomological Society of America; 1948.
- Hanski I 1987. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol Entomol* 12: 257-266.
- Haskell, N.H., Hall, R.D., Cervenka, V.J. and Clark, M.A., (1997). “On the body: Insects' life stage presence and their postmortem artifacts” In Forensic taphonomy: The postmortem fate of human remains edited by Haglund, W.D. and Sorg, M.H., Boca Raton, FL: CRC Press Limited. pp. 415-448.
- Hédouin V, Bourel B, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Goff ML, Gosset D. 2001. Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera : Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. *Journal of Forensic Sciences*, 46(1) : 12-14.
- Introna F, Gagliano-Candela Jr., R, Vella G. Di, (1996). Opiate analysis on empty puparia — positive results, in: Proceedings of XX International Congress of Entomology, Firenze, Italy, 25–31, p. 755.
- Introna F, Lo Dico C, Caplan YH, Smialek JE (1990) Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *J Forensic Sci* 35:118 – 122
- Introna F., Campobasso C.P. & Lee Goff M. (2001). Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120, p. 42-47.
- Islek I, Degim T, Akay C, Turkey A, Akpolat T. Charcoal haemoperfusion in child with amitriptyline poisoning. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 3190-3191
- Kamal, A. S. 1958. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera). I. Bionomics. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 51: 261– 271.
- Kharbouche H, Augsburg M, Cherix D, Sporkert F., Giroud C., Wyss C., Champod C.,

- Mangin P, (2008) *Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly Lucilia sericata and effects on its development. Int J Legal Med* (2008) 122:205– 211
- Kintz P, Godelar B, Tracqui A, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ (1990a) Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. *J Forensic Sci* 35:204 – 207
- Kintz P, Tracqui A, Ludes B et al (1990c) Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. *Am J Forensic Med Pathol* 11:63 – 65
- Kintz P, Tracqui A, Mangin P (1990b) Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. *J Forensic Sci Soc* 30:243 – 246
- Kintz P, Tracqui A, Mangin P (1994) Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. *J Forensic Sci Soc* 34:95 – 97
- Kolsal. E, Ozel Tekin I, Piskin. E, Aydemir. C, 4 Akyuz M, Cabuk. H, Eldes. N, et Numanoglu. V. (2009). Treatment of Severe Amitriptyline Intoxication With Plasmapheresis. *Journal of Clinical Apheresis* 24:21–24.
- Koppel C, Wiegrefe A, Tenczer J. 1992. Clinical course, therapy, outcome and analytical data in amitriptyline and combined amitriptyline/chlordiazepoxide overdose. *Hum Exp Toxicol* ; 11:458-65.
- Krahmer FL (1857) *Handbuch der gerichtlichen Medizin*. 2. Aufl. Berlin
- Leclercq, M., Brahy, G. 1985, Entomologie et médecine légale: datation de la mort. *J. Med. Leg.*;28:271–278.
- Levine. B. 1999 ; *Principles of Forensic Toxicology*. American Association for Clinical Chemistry, Inc., Washington, D.C., p 203.
- Logan JA, Wollking DJ, Hoyt SC, Tanigoshi LK (1976) An analytic model for description of temperature dependent rate phenomena in arthropods. *Environ Entomol* 5:1133 – 1140
- Marchenko, M.I. (1988). Medico-legal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time since death. *Acta Medicinæ legalis et Socialis*. 38: 257-302.
- Marchenko, M.I. (2001). Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of time of death. *Forensic Science International*. 120: 89-109.
- McKnight BE (1981) *The washing away of wrongs: forensic medicine in thirteenth-century China*. University of Michigan, Ann Arbor
- McMaster M C (2008). *GC / MS: A Practical User's Guide*, 2ème édition, Wiley, Hoboken, New Jersey.

- Maria L et de Carvalho L. 2010. Toxicology and Forensic Entomology chapitre 9 In Amendt J, Goff M L, Campobasso C P et Grassberger M (Editors). Current Concepts in Forensic Entomology édition Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York
- Mégnin JP (1894). *La faune des cadavres: application de l'entomologie a la médecine légale*. Masson et Gauthiers-Villars, Paris
- Mello RS, Borja GEM, Queiroz MMC (2012) How photoperiods affect the immature development of forensically important blowfly species *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae). *Parasitol Res* 111:1067 – 1073
- Miller ML, Lord WD, Goff ML, Donnelly D, McDonough ET, Alexis JC (1994) Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly pupariae (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. *J Forensic Sci* 39:1305–1313
- Moffat, A. C., Osselton, M. D. and Widdop, B., (2004). *Clarke's Analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. Volume 2, 3^{ème} Ed.* Published by pharmaceutical press publication division of the royal pharmaceutical society Britain. Page 1130.
- Nassu MP, Thyssen PJ, Linhares AX (2014) Developmental rate of immatures of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitol Res* 113(1):217 – 222
- Ngoen-Klan R, Moophayak K, Klong-Klaew T, Irvine KN, Sukontason KL, Prangko C, Somboon P, Sukontason K (2011) Do climatic and physical factors affect populations of the blow fly *Chrysomya megacephala* and house fly *Musca domestica* ? *Parasitol Res* 109: 1279 – 1292
- Niederegger S, Pastuschek J, Mall G (2010) Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Sci Int* 199 (1– 3):72 –78.
- Niederegger S, Wartenberg N, Spiess R, Mall G (2013) Influence of food substrates on the development of the blowflies *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria* (Diptera, Calliphoridae). *Parasitol Res* 112:2847 – 2853
- Nolte KB, Pinder RD, Lord WD (1992) Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *J Forensic Sci* 37:1179 – 1185
- Nuorteva P (1977) Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi GC, Eckert WG, Tedeshi LG (eds) *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards, vol 2*, Saunders, Philadelphia, pp 1072–1095. London: W.B.Saunders Company.
- Nuorteva P, Isokoski M, Laiho K (1967) Studies on the possibilities of using blowflies (Dipt.)

- as medicolegal indicators in Finland. *Ann Entomol Fenn* 33:217–225
- Nuorteva, P., Nuorteva, S.L. 1982. The fate of mercury in Sarcosaprophagous flies and in insects eating them. *Ambio*; 11:34–37.
- O'Brien C, Turner B (2004) Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. *Int J Legal Med* 118:188 – 189
- Oregon State University (2012). *GC - MS: How does it Work?* Environmental Health Sciences Center Corvallis OR 97331
- Pedersen RS. 1980 ; Haemoperfusion in tricyclic antidepressant poisoning. *Lancet* ; 1: 154-155
- Pounder, D. J. (1991). *Forensic entomotoxicology. J. Forensic Sci., Society.* 31:469–472.
- Reibe S, Doetinchem PV, Madea B (2010) A new simulation-based model for calculating post-mortem intervals using developmental data for *Lucilia sericata* (Dipt.: Calliphoridae). *Parasitol Res* 107:9 – 16
- Richelson E. 1989. *Antidepressants: pharmacology and clinical use.* In: American Psychiatric Association Task Force on Treatments of Psychiatric Disorders. *Treatments of psychiatric disorders.* Vol. 3. Washington, D.C.: American Psychiatric Association, 1773-86.
- Rognes K. 1991. Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 24: 7–272.
- Sadler D. W., Fuke C., Court F. et Pounder D. J. 1995. *Drug accumulation in Calliphora vicina larvae. Forensic Science International* 71(3): 191-197.
- Sadler DW, Richardson J, Haigh S, Bruce G, Pounder DJ. 1997b ; Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae, *Am J Forensic Med Pathol.*; 18: 397 - 403
- Sadler DW, Robertson L, Brown G, Fuke C, Pounder DJ. 1997a ; Barbiturate and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. *J Forensic Sci.*; 42:481 - 485
- Seyffart G. 1997, *Poison index. The treatment of acute intoxication.* 4. Edition. Lengerich et al. Pabst Science Publishers; 671 s
- Singh D, Sharma. B.R (2008). *Forensic Entomology: A Supplement to Forensic death investigation. JPAFMAT*; 8(1) : 26-33
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR (2007). *Principles of Instrumental Analysis.* 6th Edition. Brooks/Cole Cengage Learning, Chapters 11, 20, 26, 27.
- Smith KGV (1986) *A manual of forensic entomology.* British Museum, London
- Sohal R.S, Lamb R.E, 1979. Storage excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*, *J. Insect. Physiol.* 25 :119-124.

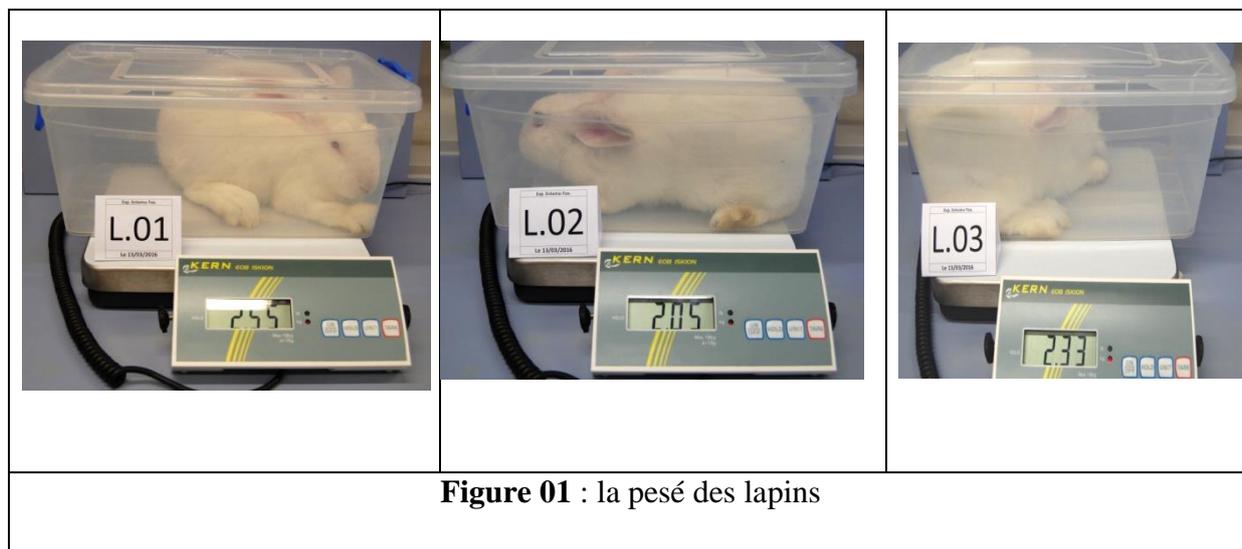
- Sohal, R.S., Lamb, R.E. 1977 ;Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. *J. Insect. Physiol*; 23:1349–1354.
- Sohal, R.S., Lamb, R.E. 1979 ; Storage excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. *J. Insect. Physiol.*;25:119–124.
- Souza CM, Thyssen PJ, Linhares AX (2011) Effect of nandrolone decanoate on the development of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), flies of forensic importance in Brazil. *J Med Entomol* 48(1):111 – 117
- Syed Zameer H et Khushnuma M, 2007. GC - MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *INT J CURR SCI*, 13: 116-126
- SZPILA, K. 2010. Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera, Calliphoridae) of forensic importance Adult flies.
- SZPILA, K. 2010. Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera, Calliphoridae) of forensic importance Adult flies.
- Tabor KL, Fell RD, Brewster CC, Pelzer K, Behonick GS. (2005). Effects of antemortem ingestion of ethanol on insect successional patterns and development of *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*. 42(3):481-489.
- Tarone, A.M., Foran, D.R. 2008 ; Generalized additive models and *Lucilia sericata* growth: assessing confidence intervals and error rates in forensic entomology. *J. Forensic Sci.*;53:942–948.
- Tracqui A, Keyser-Tracqui C, Kintz P, Ludes B (2004) Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *Int J Legal Med* 118:194–196
- Trafford A, Sharpstone P, O`Neal H. 1980 ; Haemoperfusion in tricyclic-antidepressant poisoning. *Lancet*; 1: 155
- ULLIYETT GC 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Phil Trans Roy Soc Lond B234*: 77-174.
- Utsumi, K. 1958, Studies on arthropods congregating to animal carcasses, with regard to the estimation of postmortem interval. *Ochanomizu Med. J* ; 7:202–223
- Valachová I., Bohová J., Kozánek M., Takáč P., Majtán J. 2013. *Lucilia sericata* medicinal maggots: a new source of antimicrobial compounds. In *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Vol. 3. - Formatex Research Center, p. 1745-1753.
- Von Zuben CJV, Stangenhuis G, Godoy WAC ; 2000. Competição larval em *Chrysomya*

- megacephala* (F) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Rev Bras Biol* 60: 195-203.
- Wells JD, Greenberg B 1992. Laboratory interaction between introduced *Chrysomya rufifacies* and native *Cochliomyia maceliaria* (Diptera: Calliphoridae). *Environ Entomol* 21: 640-645.
- Wilson, Z., Hubbard, S. and Pounder, D. J., 1993. Drug Analysis in Fly Larvae. *American Journal of Forensic Medicine & Pathology*. 14 (2), pp118-120.
- Wohlenberg. N, T. Lindsey, R. Backer, K.B. 1992. *Nolte, Isolation of nortriptyline from maggots, muscle, hair, skin and cancellous vertebral bone in skeletonized remains*, in: Proceedings of the 44th Annual Meeting of the American Academy of Forensic Sciences 17–22 February, New Orleans, LA, Vol. 1, 1992, p. 199.
- Wolff, M., Builes, A., Zapata, G., Morales, G., (2004). Benecke, M. Detection of parathion (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphorothioate) by HPLC in insects of forensic importance in Medellin, Colombia, Anil Aggrawal's Internet. *J. For. Med. Toxicol.*;5:6–11
- Wood M, Laloup M, Pien K, Samyn N, Morris M, Maes RA, De Bruijn EA, Maes V, De Boeck G. 2003. Development of a Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Amphetamines in Human Plasma and Oral Fluid by LC-MS-MS, *J Anal Toxicol.*;27(2):78-87.
- Wyss C., Chérix D. (2006). *Traité d'entomologie forensique: les insectes sur la scène de crime*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 317p.
- Yazdi. A.S ; Razavi. N, Yazdinejad. S.R, (2008) Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid– liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection, *Talanta* 75 : 1293–1299.
- Yovanovich P (1888) *Entomologie appliquée la Médecine légale*. Olliver-Henry, Paris
- Zuha RM, Razak TA, Ahmad NW, Omar B (2012) Interaction effects of temperature and food on the development of forensically important fly, *Megaselia scalaris* (Loew) (Diptera: Phoridae). *Parasitol Res* 111:2179 – 2187
- Zurawski, K.N., Benbow, M.E., Miller, J.R., Merritt, R.W. 2009, Examination of nocturnal blow fly (Diptera: Calliphoridae) oviposition on pig carcasses in Mid-Michigan. *Journal of Medical Entomology.*;46:671–679.

Annexes

Annexe I

1. La pesé des lapins



2. Les produits chimiques

a) Méthanol CH_3OH :



Figure 02 : Flacon 1L du méthanol absolu d'où une concentration de 70% a été préparée

b) L'éthanol C_2H_6O



Figure 03 : Flacon 1L d'éthanol absolue d'où une concentration de 80% a été préparée.

3. Equipement

- a) Balance électronique plateforme avec afficheur (KERN EOB 15KION) : pour le pesage des lapins. Un bac a été placé sur la plaque, en suite la balance remis à zéro, chaque lapin a été pesé individuellement.

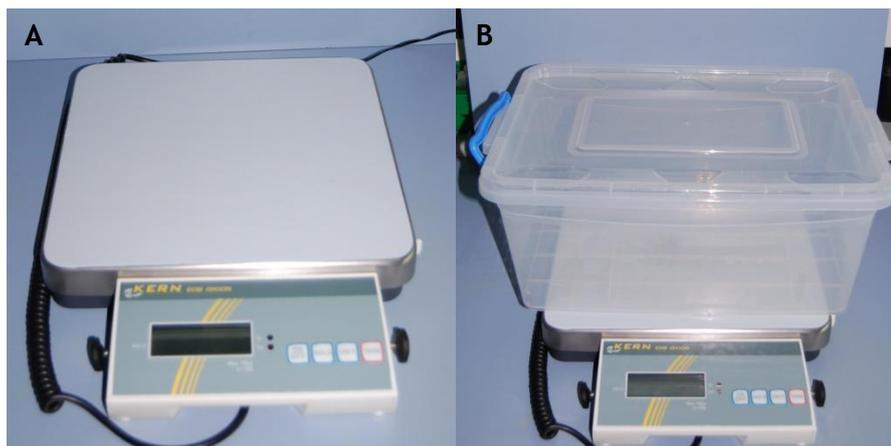


Figure 04: A : la balance, B : un bac de la tare a été mis sur le plateau de pesage

b) Enceinte climatique à température et humidité contrôlé (BINDER) : cet équipement est muni d'un système électronique de contrôle de la température, l'humidité et l'éclairage.



Figure 05 : L'enceinte climatique située dans la salle de macération.

c) Stéréo microscope Zeiss Stemi 2000-C : capacité de grossissement jusqu'à 100 fois avec caméra de haute définition (HD, 5 méga pixel) utilisée pour l'identification des insectes (adulte et immature)



Figure 06 : Le stéréo-microscope

d) Congélateur (Salle de la Morgue) : Utilisés pour la conservation de la viande (pour stimuler la ponte), du substrat nutritif (la viande des lapins) et pour assommer les mouches adultes afin de leur transfert et leur identification.



Figure 06: Les frigos réglés à -5°C .

e) Deux mini frigos: l'un réglé à -8° pour conserver les œufs collectés et l'autre à -20° pour conservé les échantillons (larves).



Figure 07 : deux mini- frigo l'un réglée à -20° à et l'autre -8°

f) **Plaque chauffante** : utiliser pour chauffer de l'eau pour tuer les larves



Figure 08 : la plaque chauffante

g) **CGMS**

Des déterminations analytiques pour la détection d'Amitriptyline ont été effectuées en utilisant 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 avec un D.S.Q.II THERMO.



Figure 09 : GC/MS au niveau du laboratoire de Toxicologie (originale)

4. Instruments

a) **Micropipette P100** : utiliser pour administrer le médicament par voie orale

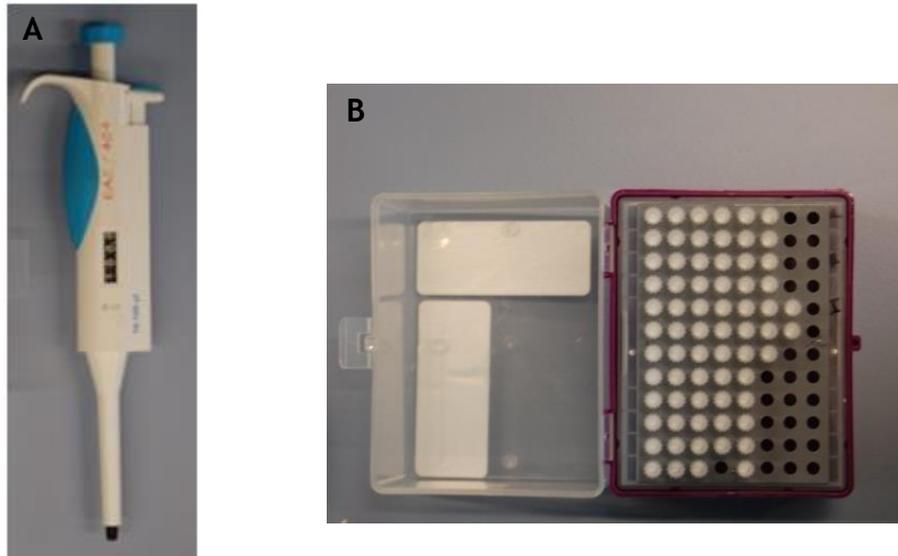


Figure 10 : A : Micropipette p100, B : boîte d'embouts (cônes)

b) **Les pincettes** : utiliser pour la récolte des œufs, des larves et des adultes



Figure 11: les pincettes

c) **Cage d'insectes** : utilisé pour élevage les mouches



Figure 12 : Cage d'insecte a dimension (60 X 34 X 53 cm)

d) **Piège pour la capture des insectes** : qui consistait en une boîte en plastique cubique grillagé avec un couvercle. Cette boîte a été couverte par un filet scellé, un appât a été mis dans le piège qui représenté dans un viande mise en boîte en plastique avec couvercle en filet scellé. Quatre entonnoirs ouverts vers l'extérieur permettent l'entrée des mouches, mais pas leur sortie. (Fabriqué par Mr Djedouani).

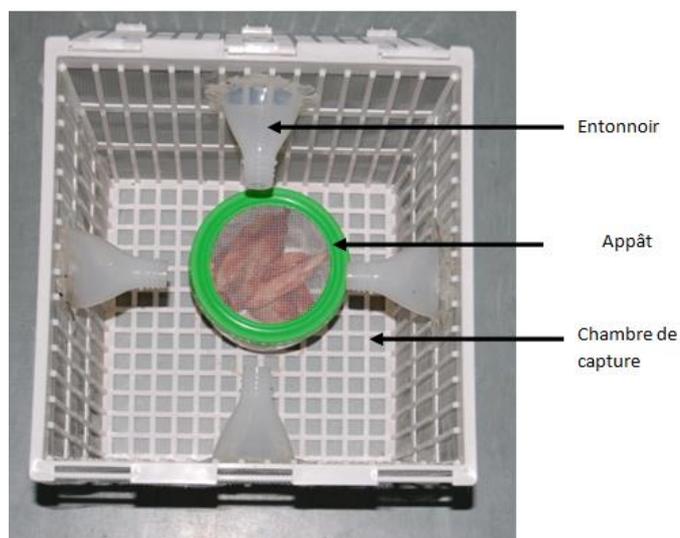


Figure 13 : Schéma du piège attractif utilisé pour la capture des diptères nécrophages (vue d'en haut).

- e) **Pied à coulisse digital (Mitutoyo absolute)** : Utiliser pour prendre des mesures de longueur des larves (L3)



Figure 14 : le pied à coulisse digitale utilisé pour les mesures des larves

- f) **Boîtes d'incubation** : boîte en plastique transparent de volume 0.5L répartie par couleur, utilisées pour l'incubation. Un trou a été découpé dans le couvercle de la boîte pour la ventilation puis a été recouvert le haut avec un filet à petites mailles pour éviter que les mouches ne s'enfuient.

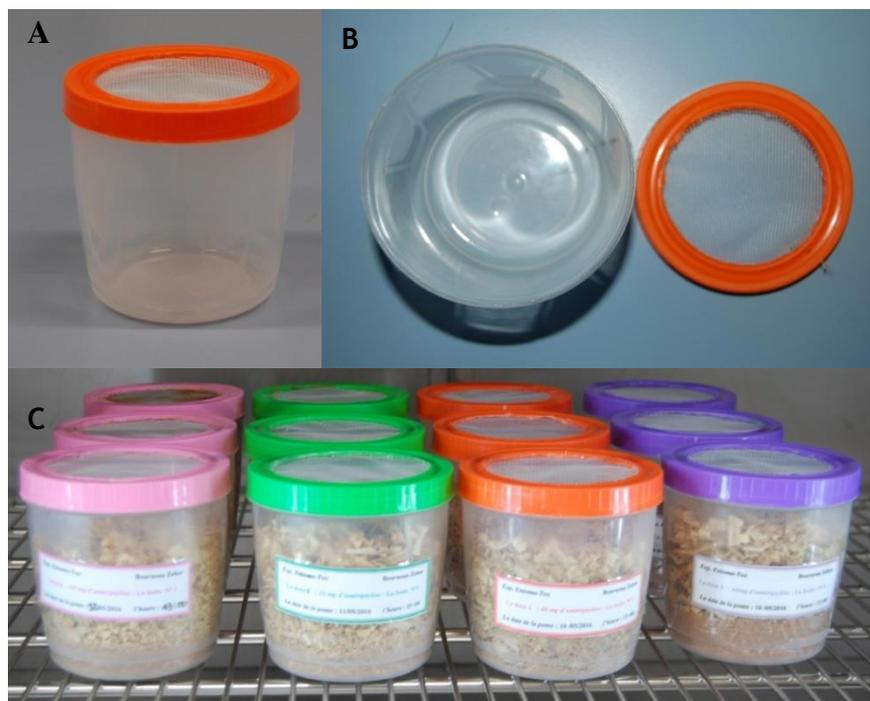


Figure 15 : **A**: la boîte fermé; **B**: la boîte avec son couvercle; **C**: les différentes boîtes pour chaque doses, répartis par couleur de gauche à droite comme suit (Témoins, Dose 01, Dose 02, Dose 03).

5. consommable

- a) **Papier essuie tout avec désinfectant** : utiliser pour nettoyer et désinfecter de la surface de travail.



Figure 16 : Papier essuie tout avec désinfectant

- b) **Boîtes de pétri** : utiliser pour différents usages (la récolte des œufs, le transport des adultes ; mettre la nourriture (par exemple l'eau, sucre....ect) et pour préparer les cachettes



Figure 17 : boîte de pétri

c) Gants nitriles jetables :



Figure 18: Gants nitriles jetables

6. Protocol expérimental

a) Le substrat nutritif :



Figure 19 : la viande des lapins découpés en petites morceaux contenant différentes doses
(exemple : Dose 01

b. la cage d'insectes



Figure 20 : la cage d'élevage de *Lucilia sericata* avec les sources d'alimentation.

c. La boîte d'accouplement :



Figure 21 : la boîte d'accouplement contenant de l'eau et la viande de bœuf pour stimuler la ponte.

d. Stimulation la ponte : faire des abris pour l'oviposition

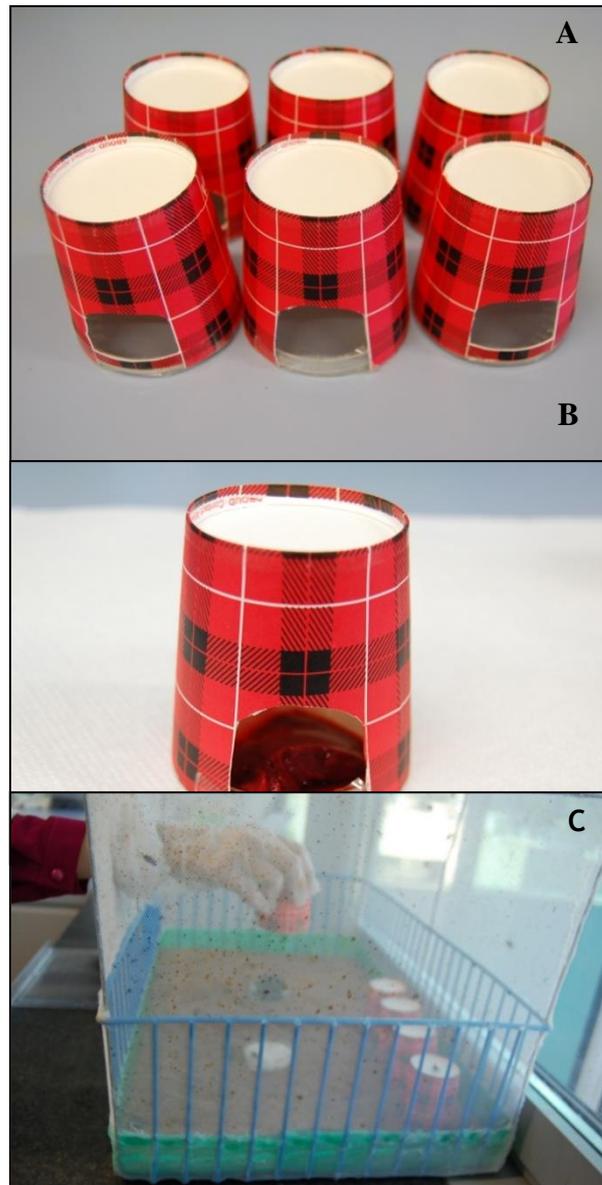


Figure 22: A : l'ouverture des pots ont été fixé sur les boites pétries petits et fait des fentes sur les gobelets jetable en carton pour l'entrée les mouches pour l'oviposition.

B : Des morceaux du foie ont été mis à l'intérieur des cachettes

C : les cachettes ont été placées dans la cage.

e. Préparation des boîtes d'incubation



Figure 23 : A : la sciure de bois a été mise dans le fond de la boîte puis en ajoutant du sable jusqu'à la moitié de la boîte. B : humidifiée avec de l'eau. C : dans chaque 3 boîte mise viande de la même dose (chaque rangé des boîte verticale représente la même dose)

f. Les boîtes d'incubations :



Figure 24 : Les larves ont été élevées dans un incubateur à 26°C, humidité relative de 70% avec une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

7. Transfert des larves sur le substrat nutritif :

Les larves collectées ont été déposés avec un pinceau fin sur 40 g de viande de lapin.



Larves de *Lucilia sericata*

Figure 25 : Les larves de *lucilia sericata* ont été déposées sur la partie inférieure du substrat nutritif à différentes doses

8. L'échantillonnage :

Le matériel utilisé pour l'échantillonnage

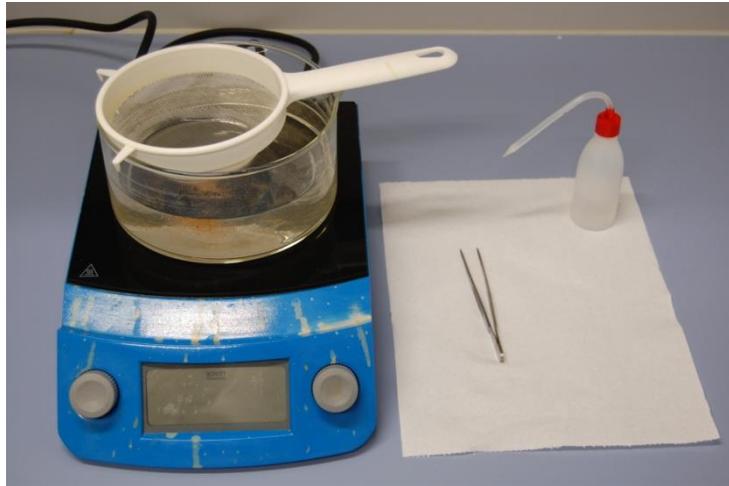


Figure 26 : l'eau chaude utiliser pour tuer les larves ; la passoire pour les retirer. Les larves sont prélevées à l'aide d'une pince et le papier pour les sécher.



Figure 27 : Tubes (BD falcon 15ml), Chaque tube est muni d'une étiquette portant le nombre de prélèvement, la dose, le nombre de la répétition, la date de prélèvement.



Figure 28: L'état de larve (exemple larve L3), Allongement de la larve après émergence dans l'eau chaude, ce qui permet de mesurer sa taille réelle.

Annexe II : Graphique

1. Les tableaux de différentes mesures de larves

1.1. Tableau : les mesures des tailles de larves de *L.sericata* de 1^{ère} répétition

Labo : Entomologie médicale (INCC)				
Expérience : En.tox				
Nom et prénom : Bouraoua Zehor				
<i>1^{ère} répétition</i>				
Tableau 01 : les mesures de taille de 16 larves <i>L.sericata</i> après 24h d'incubation de <i>RI</i>				
	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	7,12	8,09	7,02	7,65
2.	7,29	6,08	7,53	7,55
3.	7,31	7,89	7,58	7,65
4.	7,32	8,23	6,67	5,9
5.	7,47	6,20	6,96	7,73
6.	7,47	7,92	7,30	7,9
7.	7,5	8,25	7,55	7,04
8.	7,59	6,21	7,61	7,93
9.	7,6	7,95	7,63	6,24
10.	8,3	8,42	7,63	6,55
11.	8,52	6,46	7,63	6,71
12.	9,15	7,98	7,65	6,68
13.	9,2	8,44	7,68	6,8
14.	9,61	6,57	7,71	6,42
15.	9,63	8,22	7,73	6,27

16.	9,79	8,28	7,88	6,73
totale	130,87	121,19	119,76	111,75
moyenne	8.18±0.98	7,57±0.91	7,49±0.33	6,98±0.66
Min	7.12	6.08	6.67	5.9
Max	9.79	8.44	7.88	7.93

Tableau 01 : les mesures de taille de 14 larves *L.sericata* après 48h d'incubation de *RI*

	Témoïn	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	14,3	14,53	9,61	7,85
2.	14,1	14,38	9,64	7,40
3.	14,32	10,59	9,79	7,14
4.	15,18	13,18	9,85	7,81
5.	14,39	13,29	9,87	7,33
6.	14,26	11,08	9,9	7,97
7.	14,49	13,15	10,67	7,50
8.	14,56	14,13	8,2	6,69
9.	14,39	12,01	8,37	8,16
10.	15,43	12,99	8,38	7,28
11.	14,42	13,63	8,42	7,75
12.	14,21	13,06	8,45	7,85
13.	14,29	12,10	7,99	7,61
14.	14,53	14,26	7,88	7,13
totale	202,87	182,38	127,02	105,47
moyenne	14,49±0.37	13,03±1.21	9.07±0.91	7.53±0.40
Min	14. 1	10.59	7.88	6.69
Max	15.43	14.53	10.67	8.16

Tableau 01 : les mesures de taille de 12 larves *L.sericata* après 72 h d'incubation de *RI*

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	15,51	13	12,66	9,85
2.	16,21	13,2	13,02	10,08
3.	16,29	12,66	12,26	10,24
4.	15,57	12	12,34	10,5
5.	14,14	13,29	12,28	10,62
6.	14,37	13,4	12,59	11,11
7.	14,52	12,63	12,27	11,29
8.	14,85	12,67	12,51	11,7
9.	14,98	13,7	12,02	11,75
10.	15,17	12,31	10,52	11,85
11.	15,41	14,83	11,31	11,99
12.	15,91	14,51	13,11	12,03
totale	182,93	134,00	146,89	133,01
moyenne	15.24±0.70	13,18±0.84	12.24±0.71	11.08±0.80
Min	14.14	12	10.52	9.85
Max	16.29	14.83	13.11	12.03

Tableau 01 : les mesures de taille de 10 larves *L.sericata* après 96 h d'incubation de *RI*

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	13,2	13,74	13,86	11,93
2.	13,27	13,08	11,94	10,85
3.	13,79	13,28	11,78	11,17
4.	14,16	13,74	13,12	11,91
5.	14,53	13,10	13,05	10,97
6.	14,81	13,27	12,16	11,15
7.	15	12,57	12,9	11,13
8.	15,04	13,17	12,54	11,00
9.	15,22	13,68	12,23	11,83
10.	15,53	14,37	13,04	11,88
totale	144,55	158,20	126,62	113,82
moyenne	14,46±0.77	13,40±0.50	12,66±0.65	11,38±0.45
Min	13.2	12.57	11.78	10.85
Max	15.53	14.37	13.86	11.93

Tableau 01 : les mesures de taille de 09 larves *L.sericata* après 120h d'incubation de *R1*

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	pupe	pupe	12,19	11,11
2.	pupe	pupe	12,49	10,94
3.	pupe	pupe	12,52	11,46
4.	pupe	pupe	12,54	9,9
5.	pupe	pupe	12,58	11,12
6.	pupe	pupe	12,64	10,99
7.	pupe	pupe	12,65	10,58
8.	pupe	pupe	12,71	11,76
9.	pupe	pupe	12,74	10,82
totale	00,00	00,00	113,06	98,68
moyenne	00,00	00,00	12.56±0.16	10.96±0.53
Min	00,00	00,00	12.19	9.9
Max	00,00	00,00	12.74	11.76

1.2. Tableau : les mesures des tailles de larves de *L.sericata* de 2^{ème} répétition

Labo : Entomologie médicale (INCC)				
Expérience : En.tox				
Nom et prénom : Bouraoua Zehor				
2^{ème} répétition				
Tableau 01 : les mesures de taille de 16 larves <i>L.sericata</i> après 24h d'incubation de R2				
	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	7,31	7,27	6,77	7,85
2	7,47	5,76	6,81	6,81
3	7,5	5,78	6,92	6,67
4	8	5,97	7,06	6,75
5	8,1	6,02	7,26	6,63
6	8,72	6,56	7,36	6,94
7	10,37	6,64	7,41	6,96
8	9,15	7,49	7,43	7,81
9	9,22	7,52	7,44	6,9
10	9,59	7,55	7,47	6,79
11	9,65	7,75	7,72	6,91
12	9,77	7,78	7,74	6,88
13	9,94	9,22	7,75	6,58
14	10	9,62	7,82	6,58
15	7,96	9,85	7,85	6,24

16	8,2	9,92	7,86	6,8
totale	139,57	120,70	118,67	110,1
moyenne	8,81±1,00	7,54±1.44	7,42±0.37	6,88±0.41
Min	7,31	5,76	6,77	6,24
Max	10,37	9,92	7,86	7,85

Tableau 01 : les mesures de taille de 14 larves *L.sericata* après 48h d'incubation de R2

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	13,85	10,17	8,56	7,05
2.	14,06	10,25	8,61	8,99
3.	14,2	10,39	8,61	7,88
4.	14,36	10,39	8,64	7,70
5.	14,39	10,46	8,73	9,09
6.	14,39	12,39	8,74	7,25
7.	14,53	13,30	8,77	6,69
8.	14,61	13,35	8,77	8,66
9.	14,67	13,37	8,89	9,32
10.	15,06	13,43	8,98	7,33
11.	15,08	13,48	8,99	8,59
12.	15,1	15,62	9,34	8,66
13.	15,31	15,81	9,43	7,14
14.	15,42	15,85	9,54	9,04
totale	205,03	178,26	124,6	113,39
moyenne	14,65±0.48	12,73±2.12	8.9±0.32	8,10±0.90
Min	13,85	10,17	8.56	6.24
Max	15,42	15,85	9.54	7.85

Tableau 01 : les mesures de taille de 12 larves *L.sericata* après 72 h d'incubation de R2

	Témoïn	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	17,03	13,3	12,18	10,64
2.	16,03	12,5	11,61	11,45
3.	16,29	12,57	11,72	11,84
4.	15,16	12,85	12,15	11,96
5.	16,13	13,5	12,16	12,08
6.	16,11	13,5	12,59	12,17
7.	15,43	13,81	12,81	12,45
8.	15,27	14,07	12,42	12,54
9.	15,22	13,29	12,25	12,61
10.	16,14	14	12,53	12,67
11.	16,21	13,32	12,36	9,81
12.	14,16	13,65	11,54	12,22
totale	189,18	160,36	146,32	142,44
moyenne	15.77±0.75	13,36±0.51	12.19±0.40	11.87±0.86
Min	14,16	13.3	11.54	9.81
Max	17,03	14.07	12.81	12.67

Tableau 01 : les mesures de taille de 10 larves *L.sericata* après 96 h d'incubation de R2

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	14,22	13,51	11,99	11,61
2.	14,26	13,99	12,16	11,99
3.	14,28	12,92	12,28	10,36
4.	14,7	13,51	12,36	11,55
5.	14,76	13,99	12,43	11,98
6.	14,97	12,98	12,54	10,38
7.	15,5	13,37	12,62	11,47
8.	15,53	13,96	12,76	11,97
9.	13,51	13,08	12,92	10,81
10.	12,58	13,32	13,04	11,20
totale	144,31	134,63	125,1	113,32
moyenne	14.43±0.89	13,46±0.41	12,51±.33	11,33±0.63
Min	12,58	12,92	11,99	10,36
Max	15,53	13,99	13,04	11,99

Tableau 01 : les mesures de taille de 09 larves *L.sericata* après 120h d'incubation de R2

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1.	pupe	pupe	10,31	11,1
2.	pupe	pupe	11,63	10,4
3.	pupe	pupe	12,12	8,48
4.	pupe	pupe	12,18	10,38
5.	pupe	pupe	12,25	10,51
6.	pupe	pupe	12,49	10,62
7.	pupe	pupe	12,52	10,8
8.	pupe	pupe	12,64	9,91
9.	pupe	pupe	12,97	10,06
totale	00,00	00,00	109,11	92,26
moyenne	00,00	00,00	12.12±0.78	10.25±0.75
Min	00,00	00,00	10.33	8.48
Max	00,00	00,00	12.97	11.1

1.3. Tableau : les mesures des tailles de larves de *L.sericata* de la 3^{ème} répétition

Labo : Entomologie médicale (INCC)				
Expérience : En.tox				
Nom et prénom : Bouraoua Zehor				
3^{ème} répétition				
Tableau 01 : les mesures de taille de 16 larves <i>L.sericata</i> après 24h d'incubation de R3				
N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	7,69	6,26	5,99	6,3
2	7,73	6,31	6,07	7,17
3	7,84	6,55	6,11	6,42
4	10,27	6,68	6,13	6,02
5	7,59	6,82	6,27	6,14
6	8,02	6,94	6,9	7,11
7	8,03	6,99	7,67	6,61
8	8,14	7,14	7,68	6,27
9	8,42	7,19	7,68	6,43
10	8,48	7,46	7,71	6,63
11	8,49	8,28	7,72	5,89
12	8,55	8,37	8,29	6,78
13	8,58	8,70	8,3	6,64
14	8,6	8,94	8,42	6,78
15	8,74	8,99	8,49	6,74
16	10,81	9,95	8,57	6,5

totale	135,98	121.57	118	104,43
Moyenne	8.25±0.88	7.60±1.12	7.38±0.97	6.53±0.36
Min	7,69	6,26	5,99	5,89
Max	8,74	9,95	8,57	7,17

Tableau 01 : les mesures de taille de 14 larves *L.sericata* après 48h d'incubation de R3

N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	13,05	8,89	8,45	9,36
2	14	9,02	8,79	7,75
3	14,13	9,18	8,8	7,28
4	14,32	9,67	8,99	7,97
5	14,36	11,01	9,05	7,74
6	14,39	11,27	9,09	7,85
7	14,42	11,81	9,15	8,46
8	14,49	13,60	9,17	7,50
9	14,52	13,76	9,2	8,16
10	14,83	14,00	9,24	9,92
11	15	14,01	9,31	7,06
12	15,03	14,01	9,36	7,30
13	15,13	14,06	9,5	7,61
14	15,16	15,29	9,6	7,85
totale	202,83	169 ,58	127,7	111,81
moyenne	14,50±0.56	12,11±2.26	9.12±0.30	7,99±0.80
Min	13,05	8,89	8,45	7,06

Max	15,16	15,29	9,6	9,92
------------	-------	-------	-----	------

Tableau 01 : les mesures de taille de 12 larves *L.sericata* après 72h d'incubation de R3

D				
N°	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	15,25	13,1	10,81	12,22
2	16	14,78	11,68	9,85
3	16,94	14,73	11,8	9,87
4	14,77	14,05	11,82	9,88
5	15,28	13,78	11,9	10,45
6	15,88	11,95	12,11	10,54
7	16	12,29	12,3	10,6
8	16,17	13,52	12,33	10,63
9	15,1	12,5	12,37	10,83
10	16,85	12,4	12,38	11,03
11	16,98	13,75	12,64	11,3
12	15,28	12,85	13,07	11,63
totale	190,5	159,7	145,21	128,83
moyenne	15.88±0.76	13,31±0.94	12,10±0.57	10.74±0.70
Min	14,77	11,95	10,81	9,85
Max	16,98	14,78	13,07	12,22

Tableau 01 : les mesures de taille de 10 larves *L.sericata* après 96h d'incubation de *R3*

	Témoïn	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	14,96	14,05	11,05	10,01
2	14,16	13,55	11,48	11,83
3	13,68	13,55	12,18	12,44
4	13,51	12,11	12,49	10,05
5	14,72	13,53	12,62	11,78
6	14,75	13,99	12,88	12,28
7	14,19	12,82	12,92	10,27
8	12,22	13,53	13,35	11,75
9	14,07	13,99	13,4	12,25
10	13,72	12,82	14,1	10,34
totale	139,98	133,94	126,47	113
moyenne	14,00±0.75	13,39±0.63	12,65±0.91	11,30±1.00
Min	12,22	12,11	11,05	10,01
Max	14,96	14,05	14,1	12,44

Tableau 01 : les mesures de taille de 09 larves *L.sericata* après 120h d'incubation de R3

	Témoin	Dose 01	Dose 02	Dose 03
1	pupe	pupe	10,32	11,74
2	pupe	pupe	11	10,61
3	pupe	pupe	11,39	11,51
4	pupe	pupe	11,41	10,94
5	pupe	pupe	11,66	11,9
6	pupe	pupe	11,74	11,8
7	pupe	pupe	11,96	12,4
8	pupe	pupe	11,97	12,86
9	pupe	pupe	12,07	12,23
totale	00 ,00	00,00	103,52	105,99
moyenne	00.00	00.00	11,5±0.56	11,78±0.7
Min	-	-	10,32	10,61
Max	-	-	12,07	12,86

Annexe III: Démonstrative

1. Critères d'identification de *Lucilia sericata* :

1.1. L'identification des larves :

❖ Les larves de *Lucilia sericata* ont été identifiées selon les critères suivant :

- abdominal segments of the larva without such protuberances
- oral sclerite totally unsclerotised
- spines with serrated tips on thoracic segments rare or absent, all spines small of similar size
- distance between each P1 similar to distance between P1 and P2.

1.2. L'identification des adultes :

❖ Les adultes de *Lucilia sericata* ont été identifiées selon les critères suivant :

- stem-vein (Fig. 4) bare above
- thorax bright green metallic (Figs 100-104); lower calypter bare above (Figs 8, 13, 14)
- basicosta bright yellow (Figs 16, 21), male genitalia on figs 82-85

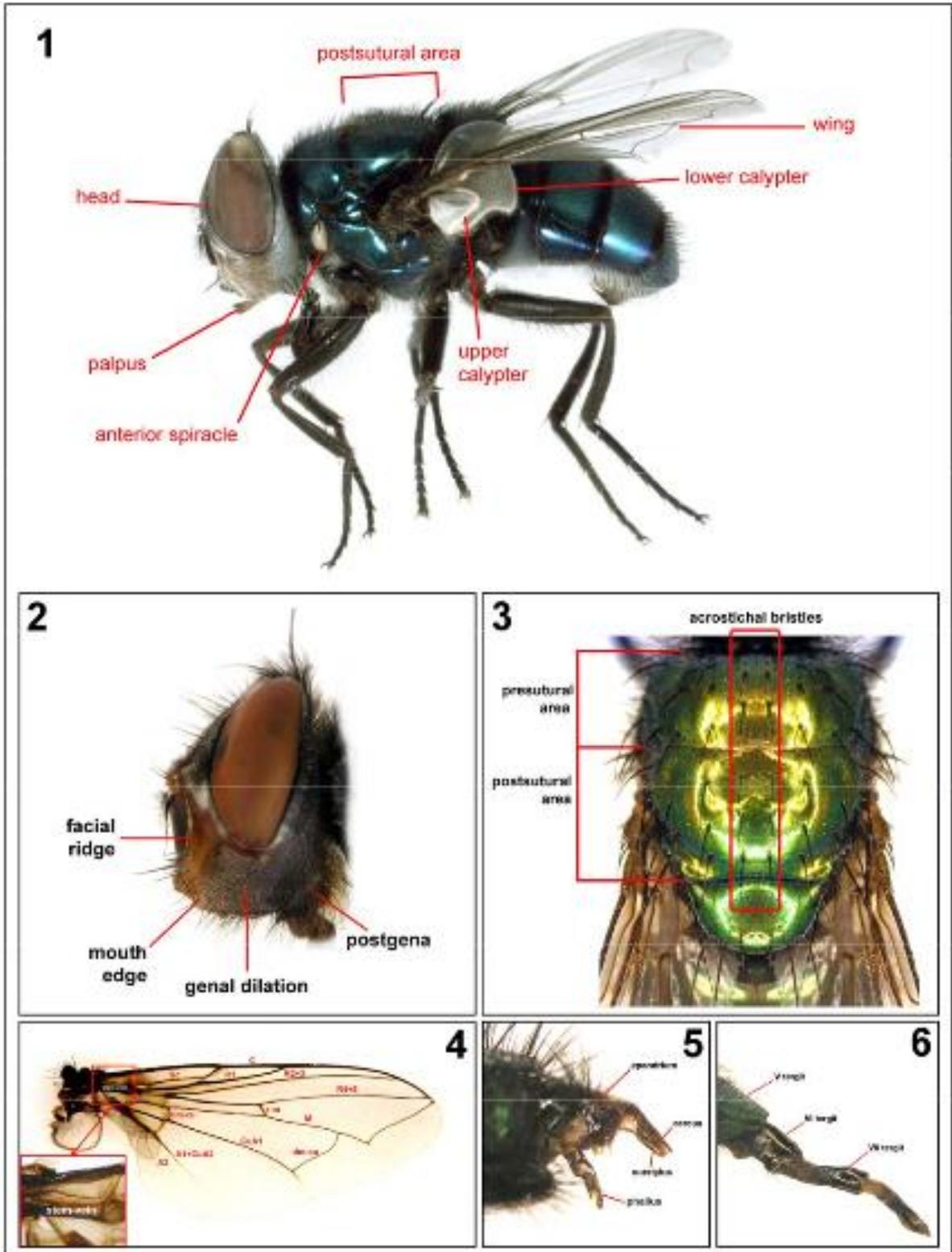


Figure 01 : Les critères d'identification pour déterminer les différents espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila , 2012)

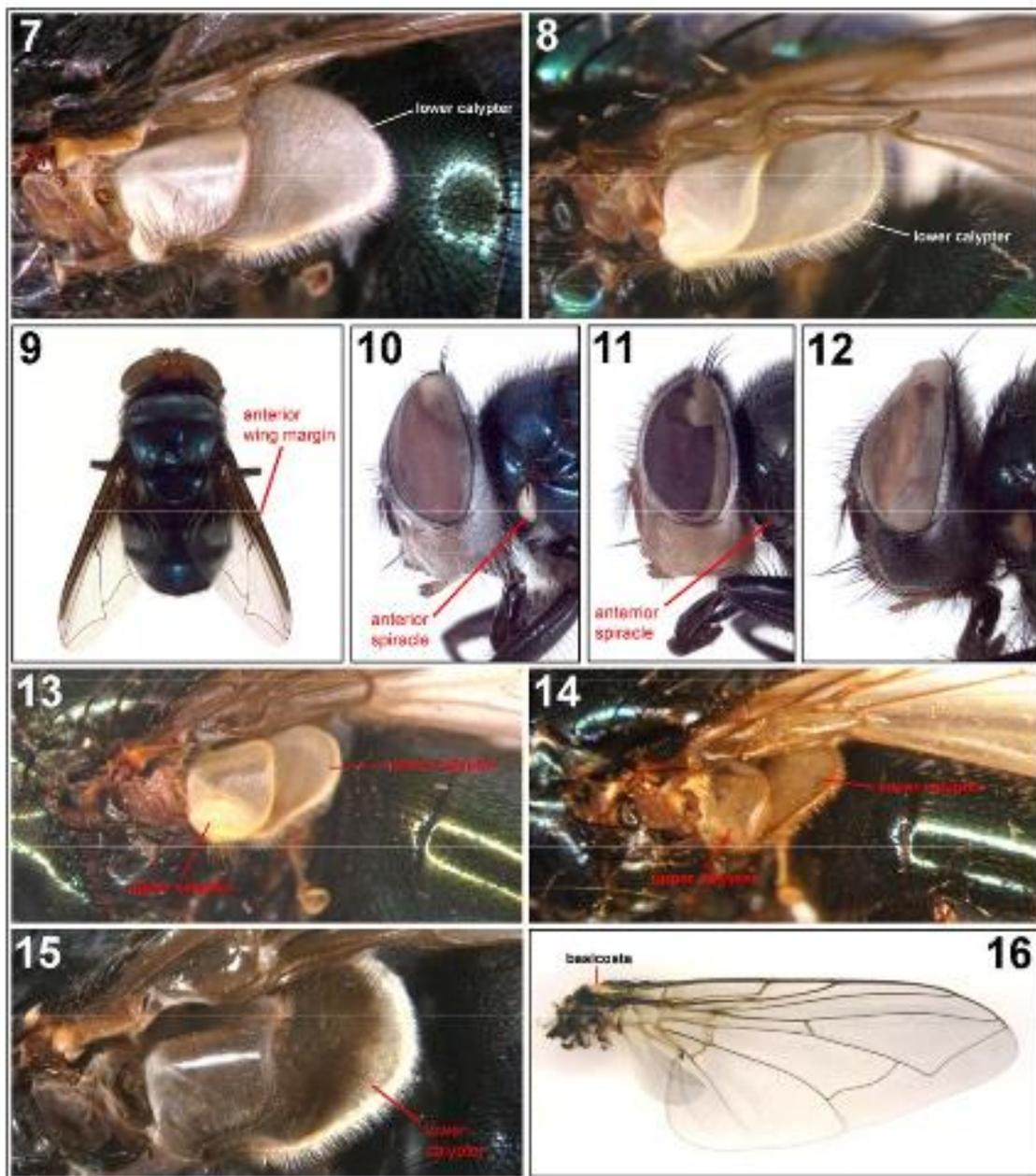


Figure 02 : Les critères d'identification pour déterminer les différents espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila , 2012)

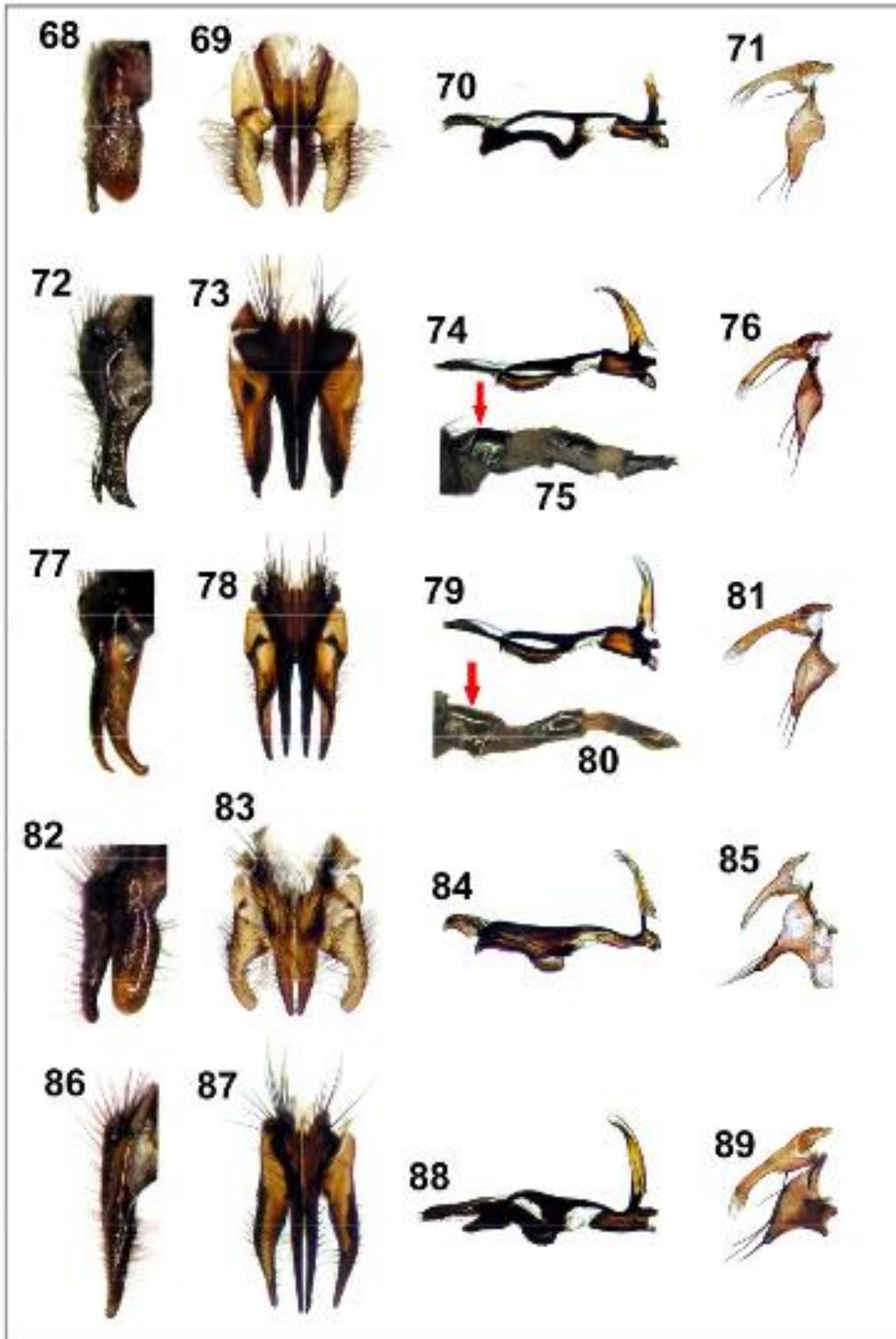


Figure 03 : Les critères d'identification pour déterminer les différents espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila , 2012).

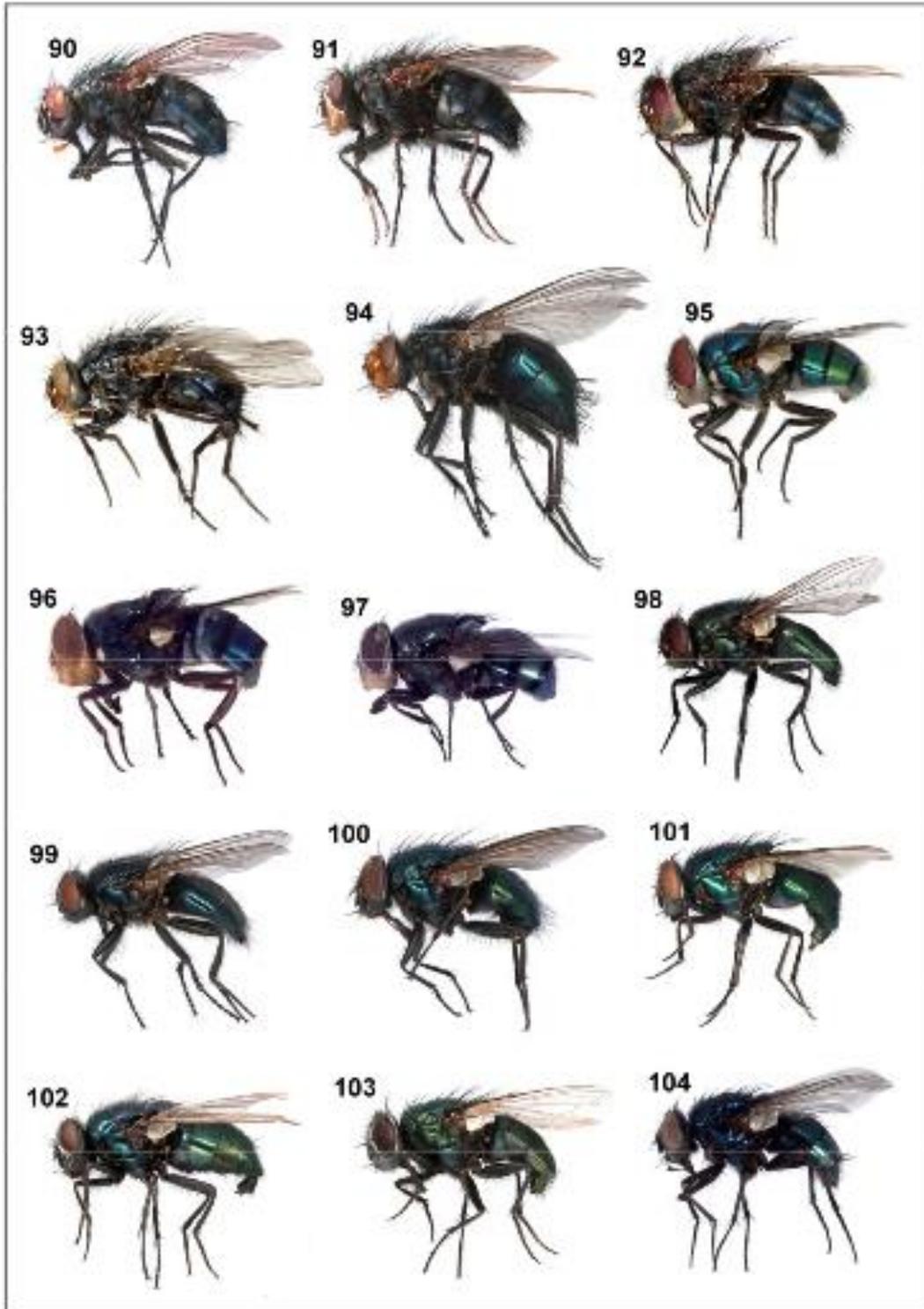
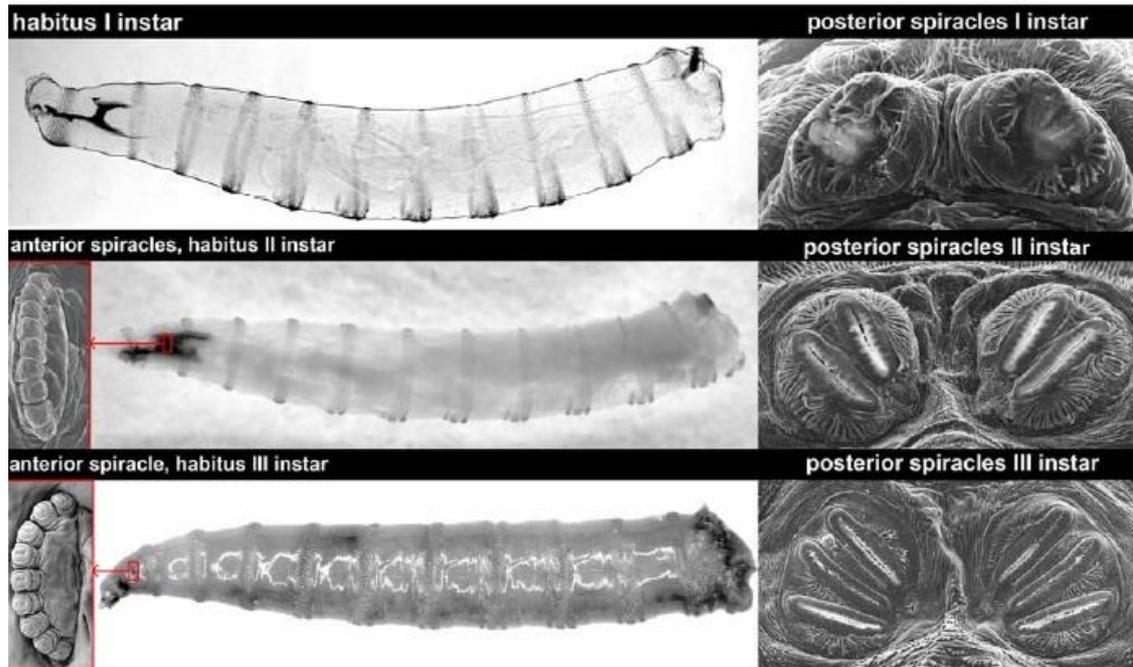


Figure 04 : Les critères d'identification pour déterminer les différents espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila , 2012)

2. l'identification des stades larvaires

- ❖ Pour déterminer les stades larvaires ; on va dans la région postérieure de la larve sous le stéréo-microscope. Les fentes des stigmates postérieurs permettent de déterminer rapidement le stade de l'individu : 1 fente par stigmate au stade L1, 2



au stade L2 et 3 au stade L3

Figure 05 : Comment reconnaître les stades larvaires ; I instar : première stade larvaire (L1), II instar : deuxième stade larvaire (L2), III instar : troisième stade larvaire (L3) (Szpila, 2012).