

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Mouloud Mammeri de TiziOuzou

Faculté des Sciences biologiques et des Sciences agronomiques

Département de Biologie Animales et Végétales



Mémoire

De fin d'Etude en vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Entomologie Appliquée à la Médecine, l'Agriculture et à la Foresterie

Thème

**Utilisations des Diptères Calliphoridae comme source alternative
pour la recherche d'un toxique dans un cadavre.**

Réalisé par : Mlle BOUDA CYLIA

Soutenu le :27/09/2017

Devant le jury composé de :

Présidente : Medjdoub - Benssad.F	Professeur	UMMTO
Promoteur : Boulassel Brahim	Professeur	UMMTO
Co-promoteur : Djedouanai Brahim		INCC/GN
Co-promotrice: Sadoudi-Ali Ahmed. D	Professeur	UMMTO
Examineur : Mouloua. AK	Maître de conférences classe B	UMMTO
Examinatrice : Kitous-Benoufella.K	Maître de conférences classe A	UMMTO

Promotion :2016 /2017

REMERCIEMENTS

Nous rendons grâce à Dieu, Le Tout Puissant.

Gloire à ALLAH, seigneur de l'Univers, le très Miséricordieux, le tout Miséricordieux. Que sa grandeur soit exaltée. Que la paix accompagne éternellement, l'Elu, le Meilleur des humains, le Prophète Mohamed (PSL).

Je remercie énormément mon promoteur Mr Brahim Boulassel, professeur au département de médecine de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et chef de service médecine légale de CHU de Tizi Ouzou pour son encadrement, son orientation judicieuse, pour ses valeureux conseils qui m'en guidés dans l'élaboration de ce mémoire de fin d'étude.

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

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mame Sadoudi Djamila, professeur au département de Biologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour ses conseils et ses orientations.

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

Mes vifs et sincères remerciements à Mr Boukarnafet Fouzi, Maître de conférences, classe A au département de Biologie à l'université de Skikda pour ses conseils et ses encouragements tout au long de ce travail.

Mes chaleureux remerciements à Dr Djenadi Cherif, Médecin vétérinaire pour son aide précieuse et sa disponibilité pour la réalisation d'une partie très importante de ce mémoire.

Je tiens à remercier Mr Doudjedid Arezki, étudiant à la faculté de médecine pour son soutien, ses encouragements et ses bons conseils.

Je tiens à remercier également

Le président de jury, Mame Medjdoub-Benssad F. Professeur au département de Biologie à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury.

Mon examinatrice, Mame Kitous-Benoufella K. Maître de Conférences A au département de Biologie d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner ce présent travail.

Mon examinateur, Meur Mouloua AK. Maître de Conférences B au département de Biologie.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à ;

Mes très chers parents ;

Ma famille ;

Tous mes amis (es) ;

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

****Cylia****

SOMMAIRE

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

1. L'entomologie médico-légale

1.1 -Définition	3
1.2 –Historique	3
1.3-Arthropodes associés aux cadavres	4
1.4- Cadavre comme un écosystème	5
1.5- Les Diptères nécrophages	6
1.6- Famille des Calliphoridae	6
1.7- Cycle biologique des Calliphoridae	9
2- Applications traditionnelles de l'entomologie médico-légale	10
2.1- Datation de la mort	10
2.2- Déterminations de lieu de la mort, déplacement et dissimulation du cadavre	11
3- Applications modernes de l'entomologie medico-légale (entomotxicologie)	12
3.1- Application de l'entomotxicologie et les différentes techniques utilisées	13
3.2- Fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologiques	14
4- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)	15

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1- Matériel	18
1.1 -Model animal	18
1.2-Espèces entomologiques	18
1.3-Substance utilisée (xénobiotique)	19
2- Méthodes	20
2.1-Origine des espèces choisies	20
2.2 Expérimentation entomo-toxicologique	23
2.2.1-Administration de xénobiotique dans le corps de l'animal	23
2.2.2 -Transfert des larves sur le substrat nutritif	24
3- L'échantillonnage des larves et des pupes	25
4- Détermination des stades larvaires	26
5- Analyse toxicologique	28
5.1-Choix de la méthode d'analyse	28
5.2- Paramètres de la GC/MS	29

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1- Résultats d'analyses des prélèvements entomologiques par CG/MS	30
2- Etude comparative du phénomène de bioaccumulation du diazépam	
chez les quatre espèces	36

3- Résultat de l'analyse toxicologique dans le sang et les tissus par la CG-MS	42
4- Comparaison de la concentration du diazépam détecté chez les larves et dans les tissus	42
5- Effet de diazépam sur le taux de développement des diptères calliphoridae	44
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	48
ANNEXES	
GLOSSAIRE	
RESUME	

Liste des figures

Figure	Titre	N° de page
Figure 01	<i>Calliphora vicina.</i>	07
Figure 02	<i>Chrysomya albiceps.</i>	08
Figure 03	<i>Lucilia sericata.</i>	08
Figure 04	<i>Calliphora vomitoria.</i>	09
Figure05	Cycle de développement d'un diptère Calliphoridae.	10
Figure06	Schéma représentant l'appareil de GC/MS.	16
Figure07	Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN).	17
Figure 08	Lapins « <i>Néo-zélandais/ le Californien</i> , Race albinos » dans une cage avec nourriture.	18
Figure09	Diazépam, ampoules de 10 ml.	19
Figure10	Structure chimique du valium.	19
Figure11	piège à appât pour la capture des insectes.	20
Figure12	Le dimorphisme sexuel au niveau des yeux, exemple de <i>L. sericata</i> et <i>C. vicina</i> .	21
Figure13	Boite d'accouplement.	22
Figure14	Boite d'incubation.	22
Figure15	La cage d'élevage des insectes (♂ et ♀ adultes) avec du sucre et de l'eau.	22

Figure16	Injection intraveineuse dans l'oreille et la cuisse du lapin.	23
Figure 17	Carcasse déposée sur le site expérimental.	25
Figure 18	La récolte des larves et des pupes sur les carcasses des lapins et leur immersion dans l'eau chaude.	26
Figure 19	Vue postérieure des larves de différents stades d'un diptère Calliphoridae (Originale, 2017).	27
Figure 20	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (04 ^{ème} prélèvement effectué le 28/05/2017).	32
Figure 21	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (05 ^{ème} prélèvement effectué le 29/05/2017).	33
Figure 22	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (06 ^{ème} prélèvement effectué le 30/05/2017).	34
Figure 23	Les concentrations de diazépam détectées dans les pupes des deux espèces de Calliphoridae (07 ^{ème} prélèvement effectué le 31/05/2017).	35
Figure 24	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 et les pupes de <i>Calliphora vicina</i> .	37
Figure 25	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 et les pupes de <i>Calliphora vomitoria</i> .	38
Figure 26	Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 de <i>Chrysomia albiceps</i> .	39
Figure 27	Récapitulatif des concentrations de diazépam dans les dans les larves des quatre espèces.	40

Liste des tableaux

Tableau	Titre	N ° de page
Tableau 01	Exemples des médicaments détectés à l'aide des insectes.	15
Tableau 02	Programme d'administration du valium au lapin.	23
Tableau 03	Paramètres de l'instrument GC/MS.	28
Tableau 04	Résultats de l'échantillonnage des larves et des pupes récoltées sur le lapin témoin durant les périodes de l'expérimentation.	27
Tableau 05	Résultats de l'échantillonnage des larves et des pupes récoltées sur le lapin intoxiqué durant les périodes de l'expérimentation.	27
Tableau 06	Résultats de l'examen du premier prélèvement (le 25/05/2017).	30
Tableau 07	Résultats de l'examen du deuxième prélèvement (le 26/05/2017).	31
Tableau 08	Résultats de l'examen du troisième prélèvement (le 27/05/2017)	31
Tableau 09	Les concentrations de diazépam dans les larves et les pupes de <i>C.vicina</i> .	36
Tableau 10	Les concentrations de diazépam dans les larves et les pupes de <i>C. vomitoria</i> .	37
Tableau 11	Les concentrations de diazépam dans les larves de <i>C.albiceps</i> .	38
Tableau 12	Les concentrations de diazépam dans les larves de <i>L.sericata</i> .	39
Tableau 13	Les concentrations de diazépam dans le sang et les tissus des lapins.	42
Tableau 14	Tableau comparatif des concentrations de diazépam détectées chez les larves et dans les tissus.	43
Tableau 15	Tableau comparatif des stades de développement des larves collectées sur les deux carcasses dans les mêmes périodes.	44

Liste des abréviations

Abréviations	Signification
INCC/GN	Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale.
IPMs	Intervalles Post-Mortem.
- PMI (anglais)	Post mortem interval
RIA (anglais-)	Radioimmuno assay (Dosage radio-immunologique).
GC (anglais)	Gas Chromatography.
GC / MS (anglais)	Gas chromatography–mass spectrometry.
CG/SM	Chromatographie en phase Gazeuse-Spectrométrie de Masse.
HPLC/MS (anglais)	High-performance liquid chromatography–mass spectrometry (Chromatographie de phase liquide à haute performance/la spectrophotométrie de masse).
CCM	Chromatographie sur couche mince.

Introduction générale

Les insectes et autres arthropodes peuvent se révéler être des outils précieux dans les investigations sur les homicides, les suicides et autres décès humains sans surveillance. Une analyse attentive de la communauté d'insectes rencontrée sur un corps en purification, combinée avec la connaissance de leur biologie et écologie, ainsi que les conditions environnementales locales, peuvent souvent fournir des indications précieuses aux médecins légistes. Celles-ci peuvent inclure l'estimation de délais post mortem ainsi que tout déplacement du corps (Goff *et al.*, 2001).

Les insectes peuvent également servir comme source de recherche fiables pour l'analyse toxicologique en l'absence de tissus et de fluides corporels normalement échantillonnés à de telles fins (Murthy *et al.*, 2001). L'utilisation des arthropodes nécrophages comme des indicateurs de la présence de toxines dans des cadavres ou comme source alternative d'échantillon pour la réalisation des analyses toxicologiques a fait l'objet de plusieurs études dans différents pays d'Europe et aux Etats Unis d'Amérique (USA). A nos jours, en Algérie, cette discipline n'est pas pratiquée par les scientifiques ni adoptée par le système juridique.

Notre projet consiste à mettre en valeur cette discipline par la mise en application d'un protocole d'analyse toxicologique à base d'échantillons entomologiques afin de tester la fiabilité de l'utilisation des insectes dans ce genre d'analyse. A cet effet, un protocole expérimental a été développé en collaboration avec les spécialistes du laboratoire d'entomologie de l'INCC/GN et est mis en application dans le but d'étudier la possibilité de détecter un xénobiotique (Diazépam) administré à un animal (lapin) dans les tissus de quatre espèces d'insectes nécrophages de Calliphoridae ; *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria* nourries de la carcasse de l'animal. Pour des raisons multiples notamment l'efficacité, la fiabilité et la disponibilité, la technique d'analyse choisie pour réaliser les analyses toxicologiques est la chromatographie en phase gazeuse couplée au spectrophotomètre de masse. Ces analyses ont été réalisées au niveau du département de toxicologie de l'Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale de Bouchaoui (INCC/GN) par des méthodes développées en interne.

Le protocole expérimental que nous avons adopté est constitué de deux (02) parties ; la première, extra laboratoire, consiste à administrer le xénobiotique à l'animal dont le corps est utilisé comme un substrat nutritif pour les espèces entomologiques préalablement choisies ;

des échantillons de larves ont été prélevés sur la carcasse à différentes périodes selon un plan d'échantillonnage. La deuxième partie est intra-laboratoire dont des analyses toxicologiques effectuées par la CG-SM sur des échantillons de larves collectées durant la première étape de ce projet.

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

1. L'entomologie médico-légale

1.1 Définition

L'entomologie forensique, l'entomologie criminelle, judiciaire, légale ou encore médico-légale, est une discipline qui s'intéresse à l'étude des insectes qui colonisent et se nourrissent des substrats organiques d'origine végétale ou animale en décomposition (Campobasso *et al.*, 2001). Cette discipline consiste à déterminer comment, où et quand un crime a été commis. Ceci par l'étude de la faune entomologique. Cette spécialité a pour but d'étudier le rôle et le développement des insectes sur un cadavre en décomposition. Elle permet de fournir des données en relation avec les circonstances de la mort facilitant les enquêtes médico-légales; le déplacement d'un corps d'un endroit à l'autre, la détermination des conditions environnementales auxquelles un corps a été exposé, l'identification des causes de la mort et le plus essentiel le temps écoulé depuis la mort afin de répondre à la question la plus fréquente lors d'une enquête menée en cas de découverte d'un cadavre dont la date de décès est inconnue. L'étude des insectes associés au cadavre peut également apporter des informations dans les cas d'abus et de négligences chez les enfants ou les personnes âgées, l'identité des victimes, etc. (Frederickx *et al.*, 2011).

1.2 Historique

L'utilisation de l'entomologie à des fins médico-légales n'est pas récente. La première utilisation des insectes nécrophages dans un contexte judiciaire documentée dans la littérature remonte au 13^{ème} siècle, en Chine ; un meurtrier a été identifié à l'aide des insectes nécrophages attirés par des traces invisibles de sang sur sa faucille (Benecke, 2001 ; Amendt *et al.*, 2004). Cependant en Europe, ce n'est qu'en 1850 que la première utilisation de l'entomologie forensique a pris place quand un corps d'un enfant a été découvert dans une cheminée lors des travaux de renouvellement d'une maison. L'année 1894 constitue l'année du lancement de cette discipline dans un contexte scientifique grâce aux études effectuées par Mégnin sur la faune des cadavres, il a tenté d'évaluer la succession des insectes sur les cadavres. En 1948, Leclercq, médecin Belge, a utilisé l'entomologie criminelle pour dater la mort dans des enquêtes criminelles (Amendt *et al.*, 2004). Durant la même année, la faune des Calliphoridae présente aux alentours d'un cadavre a été identifiée par Hall, dans son livre : *The Blowflies of North America* (Haskell *et al.*, 1997). Par contre, les connaissances sur les différentes espèces de

Sarcophagidae ne sont pas très avancées et ce n'est qu'à partir de 1983 que les entomologistes connaîtront, de manière plus précise, ces deux familles de Diptères (Wyss et Cherix, 2006).

Au cours des trois dernières décennies, l'utilité de l'entomologie médico légale dans les enquêtes de la mort a été largement documentée par plusieurs études dans les pays occidentaux principalement en Europe et les Etats- Unis (Singh et Sharma., 2008).

Malgré le nombre important des études sur la biologie des insectes d'intérêt forensique réalisées en Europe, il a fallu attendre 1985 pour que les premiers protocoles de prélèvements d'insectes sur les scènes de crimes soient établis et publiés par Leclercq et Brahy.

Au début du 21^{ème} siècle, l'entomologie médico-légale venait d'être acceptée comme un outil judiciaire important dans de nombreux pays (Goff, 1991 ; Campobasso *et al.*, 2001). La discipline a connu un véritable engouement et il en a résulté la parution de plusieurs ouvrages dédiés à l'entomologie forensique tels que les publications de Greenberg et Kunich (2002) ; Wyss et Cherix (2006), Gennard (2007) etc.

En Algérie, cette discipline reste toujours méconnue, elle est utilisée seulement dans le laboratoire d'entomologie à l'Institut National de Criminologie et de Criminalistique de la Gendarmerie Nationale depuis 2010.

1.3- Arthropodes associés aux cadavres

En fonction de leur régime trophique, on distingue quatre groupes d'arthropodes sur un organisme en décomposition. On y rencontre des espèces nécrophages, nécrophiles, omnivores et des opportunistes. Une cinquième catégorie est parfois citée, il s'agit des espèces dites accidentelles.

1.3.1- Les espèces nécrophages

Les espèces nécrophages sont les premières attirées par le cadavre. Elles se nourrissent aux dépens de l'organisme en décomposition et plus spécifiquement des liquides. On rencontre principalement des insectes appartenant aux ordres des Diptères et des Coléoptères (Leclercq, 1978 ; Campobasso *et al.*, 2001 ; Wyss et Cherix, 2006).

1.3.2- Les espèces nécrophiles

Les espèces nécrophiles sont prédatrices ou parasites des larves et des pupes des nécrophages. On y rencontre, régulièrement des Coléoptères (Silphidae, Histeridae, Staphylinidae), des Diptères (Calliphoridae et Stratiomyidae) ainsi que des Hyménoptères (Fourmicidae, Vespidae) (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* (Gaudry, 2002) et de certaines *Chrysomya*.

1.3.3- Les espèces omnivores

Ces espèces se nourrissent aussi bien des insectes nécrophages et nécrophiles présents sur le cadavre que du corps en décomposition. Les principales espèces omnivores sont généralement des Hyménoptères (fourmis et guêpes) ainsi que des Coléoptères. (Leclercq, 1996 ; Amendt *et al.*, 2004 ; Arnaldos *et al.*, 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

Ces espèces omnivores arrivent pratiquement en même temps que les nécrophiles.

1.3.4- Les espèces opportunistes

Les espèces opportunistes utilisent le cadavre comme une extension de leur habitat (comme une source de chaleur, pour l'hibernation et parfois même pour se nourrir). On y rencontre des collemboles, des araignées et des papillons. (Leclercq, 1996 ; Amendt *et al.*, 2004 ; Arnaldos *et al.*, 2005 ; Wyss et Cherix, 2006).

1.3.5- Les espèces accidentelles

La présence de certaines espèces sur le cadavre est parfois due au hasard. (Arnaldos *et al.*, 2005)

1.4- Le cadavre comme un écosystème

Lorsqu'une espèce animale meurt, elle est rapidement visitée et colonisée par de nombreux organismes tels que des bactéries, des champignons, des arthropodes dont les plus importants sont les insectes qui interviennent dans le processus de transformation de la matière organique jusqu'à la minéralisation. D'autres visiteurs, des vertébrés dont les carnivores et les rongeurs sont aussi observés (Carter *et al.*, 2007).

Pour les insectes non nécrophages, un cadavre peut également constituer un refuge ou encore un territoire idéal (Smith, 1986 ; Anderson, 2001). Cependant, pour les insectes nécrophages, un cadavre constitue une source nourricière importante et un milieu adéquat pour la ponte c'est pourquoi ce groupe d'insectes a acquis un rôle primordial dans les applications de l'entomologie forensique. Ce dernier comprend des espèces appartenant essentiellement à deux ordres qui sont les coléoptères (Silphidae, Dermestidae,...) et les diptères qui renferment les espèces les plus importantes appartenant à plusieurs familles notamment les Calliphoridae, les Sarcophagidae, etc (Leclercq, 1978 ; Anderson, 2001 ; Dekeirsschieter *et al.*, 2009).

1.5 - Les Diptères nécrophages

L'ordre des diptères est l'un des plus grands ordres d'insectes, avec plus de 86 000 espèces connues, dont plupart sont nécrophages. Ils se retrouvent dans presque tous les habitats terrestres et dans le milieu aquatique. Les diptères sont caractérisés par la présence d'une paire d'ailes membraneuses, la deuxième paire est réduite et se présente sous forme d'haltères (qui permet à la mouche de connaître précisément sa position en vol).

Les diptères sont principalement divisés en deux sous ordres : les Nématocères ; antennes fines multi segmentés) et les Brachycères ; antennes courtes moins de six (06) segments (dont les Orthorrhaphes et les Cyclorrhaphes). C'est principalement parmi les cyclorrhaphes qu'on retrouve les Diptères nécrophages (Chinery, 2005). Les Brachycères Cyclorrhaphes adultes présentent des antennes courtes et trapues à leur base et leurs larves sont hémicéphales ou acéphales (capsule céphalique très réduite). Les mandibules sont présentes sous forme de crochets mobiles ventraux insérés verticalement (Charabidzé, 2008).

Les Diptères sont holométaboles, c'est-à-dire qu'ils présentent des métamorphoses complètes. Les femelles pondent environ 150 à 200 œufs regroupés en agglomérat et qui donneront des larves de type vermiforme (Amendt *et al.*, 2004; Gennard, 2007 ; Bourbonnais, 2010).

La capacité des diptères à détecter un cadavre et à le coloniser le plus vite donne aux espèces nécrophages l'importance forensique. Parmi ces diptères, la famille des Calliphoridae qui est celle renferme un grand nombre d'espèces nécrophages de grande importance forensique.

1.6- Famille des Calliphoridae

La famille des Calliphoridae contient plus de 1 000 espèces qui se répartissent dans le monde entier, la majorité des espèces nécrophages de cette famille est active pendant les mois chauds de l'été. Leur taille varie de 04 à 16 mm. De nombreuses espèces de cette famille possèdent des reflets bleus ou verts métalliques, et parfois argentés. La tête et le corps possèdent de longues soies, avec un dimorphisme sexuel au niveau des yeux ; ceux des mâles sont très proches alors que ceux des femelles sont nettement séparés (Byrd et Castner, 2010). Ils sont pourvus de sens olfactifs (antennes et sensilles olfactives) très développés et des ailes.

Ces caractéristiques leur permettent de localiser et de parcourir des distances considérables à la recherche de la nourriture et d'assurer un milieu favorable pour la ponte et le développement de leurs progénitures.

Les larves sont des asticots de forme cylindro-conique. C'est des mouches assez rapides et ont un vol bruyant (Wyss et Cherix.,2006).Elles sont classiquement les premières à être attirées par un cadavre, dès le décès. 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 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). Elles se nourrissent de liquides variés, provenant de matière organique en décomposition (viande, fruits...) ou encore de fleurs (nectar) et de l'eau sucrée. Les femelles ont toujours besoin de nourriture protéinée nécessaire à la maturation des œufs (Lemonnier *et al.*,2012). Parmi les espèces nécrophages de cette famille qui présentent une grande importance forensique, citons ; *Calliphora vicina*, *Chrysomia albiceps*, *Lucilia sericata* et *Calliphora vomitoria*.

a- *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) : est une espèce nécrophage très commune à travers le monde et a été utilisée dans une diverses enquêtes criminelles (Smith, 1986). Elle est connue pour entrer dans les maisons, c'est pourquoi elle peut sembler plus courante dans les études de cas médico-légaux (**Figure 01**). Cette espèce est très utile pour la détermination des IPMs.



Figure 01: *Calliphora vicina* (Imago) (Rivers et Dahlem ,2014).

b-*Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) : est un insecte nécrophage, qui diffère des autres mouches nécrophages dans le comportement prédateur facultatif des deuxième et troisième stades larvaires. Les expériences au laboratoire et les observations sur le terrain montrent que les asticots de *C.albiceps* peuvent réduire de manière significative l'abondance des larves d'autres mouches quand ils se déposent sur le même cadavre (Grassberger *et al.*,2003). Les femelles de cette espèce préfèrent pondre entre les grappes d'œufs des autres Calliphoridae (Zumpt, 1965) (**Figure 02**).



Figure 02 : *Chrysomya albiceps* (Imago) (Szpila *et al.*, 2008).

c-*Lucilia sericata* (Meigen) : généralement appelée mouche verte, elle est l'une des espèces les plus répandues, partout dans le monde (Hall, 1948). Mouche nécrophage d'une très grande importance dans le domaine médico-légal car elle est utilisée comme un indicateur biologique dans l'estimation de l'intervalle post-mortem (Anderson, 2000). Elle a également un rôle important dans la médecine humaine vétérinaire et son utilisation en astico-thérapie peut aider à guérir des infections (**Figure 03**).



Figure 03 : *Lucilia sericata* (Imago) (Rivers et Dahlem ,2014).

d- *Calliphora vomitoria* (Linnaeus ,1758) : elle est aussi appelée mouche bleue ou mouche de la viande. C'est une mouche connue dans la plupart des régions du monde, et mesure entre 10 et 14mm de long (**Figure : 04**). La femelle pond ses œufs dans la viande en décomposition. Elle peut être l'origine de myiases humaine ou animale ; l'entomologie médico- légale la repère au cours des expertises notamment en cas d'autopsie d'enfants mal traités.



Figure 04 : *Calliphora vomitoria* (Imago) (Rivers et Dahlem ,2014).

1.7- Cycle biologique des Calliphoridae

Le développement de toutes les espèces de Calliphoridae est le même, il débute de l'œuf dont l'éclosion donne une larve de premier stade (L1) qui se développe en une larve de 2^{ème} stade (L2) pour finir en une larve de 3^{ème} stade (L3). Cette dernière entre dans un stade de nymphose durant lequel elle subit des transformations morphologiques pour donner un adulte (Greenberg et Kunich, 2002). (**Figure 05**).

- **Les œufs** : les œufs sont pondus en amas d'environ 150 à 200 œufs. Ils sont de couleur blanche et brillante, leur taille varie de 0.9 à 1.5mm. Les œufs sont pondus sur le cadavre dans des endroits humides qui leur assurant une protection et une nourriture. Ils donnent naissance à des larves de premier stade (L1) après l'éclosion (Rognes, 1991 ; Gennard., 2007).
- **Premier stade larvaire (L1)** : extrêmement petit, 02 à 04 mm, ce stade est caractérisé par une alimentation vorace et se termine par un processus appelé mue dont résulte des larves de 2^{ème} stade (L2) (Greenberg et Kunich, 2002).
- **Deuxième stade larvaire (L2)** : la larve mesure environ 8 mm de long (Greenberg et Kunich, 2002).A ce stade, l'alimentation est plus accomplie par rapport au premier, en

raison de l'augmentation de la taille des larves" (Haskell *et al.*, 1997). Cette étape se termine aussi par une autre mue pour donner une L3.

- **Le troisième stade (L3) :** selon Anderson (2000), cette étape peut être séparée en deux stades comportementaux distincts : une phase d'alimentation dont les larves se nourrissent voracement jusqu'à atteindre une taille maximale, et une phase post alimentaire durant laquelle elles arrêtent de s'alimenter et s'éloignent de la source de nourriture pour trouver un endroit pour la nymphose.
- **La Nymphose :** Cette phase comprend un certain nombre de transformations durant laquelle la structure de l'adulte est formée à l'intérieur de la puppe. Une fois complète, ces derniers émergent (Greenberg et Kunich, 2002).

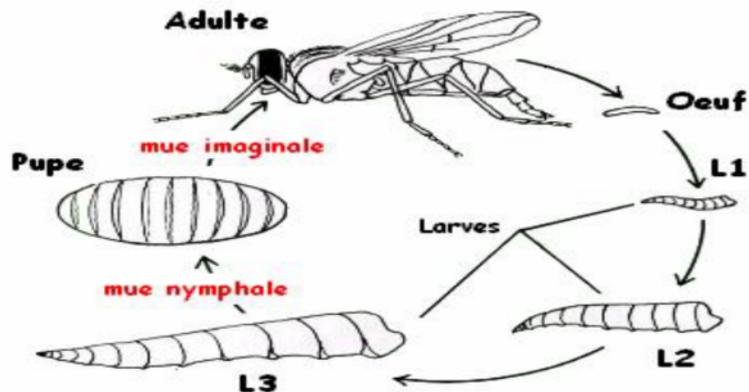


Figure 05 : Cycle de développement d'un diptère Calliphoridae (Charabidz, 2008).

2- Applications traditionnelles de l'entomologie médico-légale

Les « indices » entomologiques retrouvés sur une scène de crime peuvent avoir plusieurs utilités dont les plus importantes selon Haskell *et al.* (1997), est de pouvoir déterminer la date de la mort, le lieu et la cause de la mort.

2.1- Datation de la mort

Les détails entourant une mort suspecte ou un homicide ne sont pas évidents, un grand investissement de temps et de ressources sont nécessaires pour déchiffrer les événements menant jusqu'à la découverte du cadavre (Rivets et Dahlem, 2014). La détermination du temps écoulé depuis la mort, aussi appelé **Intervalle Post Mortem (IPM)** est primordiale, une tâche toujours confiée aux médecins légistes dont les évaluations deviennent moins précises 48 ou 72 heures après la mort vu la disparition des signes pathologiques sur lesquels ils se basent pour déterminer

la date de la mort. L'entomologie forensique offre des outils qui contribuent à la détermination de l'IPM (Tomberlin *et al.*, 2011). L'étude des insectes qui colonisent un cadavre, essentiellement les espèces des familles des Calliphoridae, des Sarcophagidae, des Muscidae et certaines familles de coléoptères (Silphidae et Dermestidae), fournit des informations très importantes sur les circonstances de la mort notamment l'IPM (Gennard, 2012). Il existe deux méthodes ayant pour but de déterminer l'IPM, en se basant sur les insectes (Wyss et Cherix, 2006).

2.1.1- Datation à court terme (mort récente)

Les premiers insectes à apparaître sur les lieux seront des diptères nécrophages, attirés par la chair fraîche. Certaines espèces de mouches sont capables de repérer l'odeur de la chair en décomposition à plus de 1 km. Les premiers insectes commencent à coloniser le corps dans les deux jours, voire même dans les heures qui suivent le décès. Le cycle de développement des insectes concernés étant généralement bien connu dans le domaine, il devient donc possible à l'entomologiste de déterminer le moment du décès grâce à la présence de certains stades de développement d'une espèce de diptère. Bien entendu, les conditions ambiantes (température, hygrométrie) influencent grandement le développement des insectes et la durée de chacun des stades, c'est pourquoi il existe des chartes de référence permettant un bon calcul. Dans les cas où le cycle est peu connu, il ne reste plus qu'à élever l'insecte dans des conditions semblables à celles où il a été trouvé (Mignault, 2004).

2.1.2- Datation à long terme (mort ancienne)

Lorsqu'un cadavre date de plus de quelques semaines à un an, l'entomologiste aura recours à l'étude de la succession des différentes espèces d'insectes. En partant du principe que différentes espèces d'insectes seront présentes à différents moments, selon le stade de décomposition du cadavre, il devient possible de déterminer « l'âge » du cadavre selon l'espèce observée. Cette méthode permet également de connaître la saison durant laquelle la mort a eu lieu. La faune des insectes présents au printemps n'est évidemment pas la même qu'à l'automne (Mignault, 2004).

2.2- Déterminations du lieu de la mort, déplacement et dissimulation du cadavre

Un autre mystère pouvant être résolu à l'aide de l'entomologie médico-légale, est de déterminer si le cadavre a été déplacé du lieu du décès. Les espèces d'insectes variant d'un milieu à l'autre, l'observation de la présence de certains insectes propres à un milieu peut trahir ce déplacement du cadavre (Mignault, 2004). Chaque espèce possède une aire de distribution qui traduit ses capacités d'adaptation au milieu ambiant. Par conséquent, la comparaison entre la

faune entomologique retrouvée sur le cadavre et la faune locale peut permettre d'indiquer si le corps a été déplacé durant la période écoulée entre le décès et la découverte du cadavre (Haskell *et al.*, 1997).

3- Applications modernes de l'entomologie medico-légale (entomotoxicologie)

L'entomotoxicologie est une discipline qui étudie le phénomène de la bioaccumulation des xénobiotiques chez les insectes et d'autres arthropodes et leur utilisation comme une source alternative d'échantillons pour l'analyse toxicologique afin de détecter la présence de ces mêmes xénobiotiques au niveau du cadavre (Introna *et al.*, 2001 ; Gagliano-Candela et Aventaggiato, 2001). En effet, l'extraction de xénobiotiques provenant des insectes devient nécessaire lorsque le corps est en état de décomposition avancée vu l'absence des sources traditionnelles classiques pour procéder à des analyses toxicologiques (sang, urines et tissu) (Benecke, 2007 ; Amendt *et al.*, 2010).

L'utilisation des insectes rencontrés sur un corps en décomposition en tant qu'indicateur toxicologique combinée à la connaissance de la biologie et l'écologie des insectes ainsi que les conditions environnementales locales, peut souvent offrir de précieux aperçus médico-légaux. Ceux-ci peuvent inclure l'estimation du temps écoulé depuis la mort (IPM), le déplacement du cadavre après la mort, l'indication de blessures ante-mortem et la présence de drogues ou de toxines (Nolte *et al.*, 1992 ; Goff et Lord, 1994 ; Goff et Lord, 2001).

L'utilisation de larves de mouches nécrophages comme spécimens toxicologiques alternatifs est bien citée dans la littérature (Miller *et al.*, 1994). Ainsi il a été démontré, dans plusieurs études, la possibilité d'utiliser les tissus des insectes ou leurs restes (pupes vides, excréments, etc.) pour révéler, qualitativement et quantitativement, l'éventuelle présence de médicaments et de toxines dans les tissus en décomposition qui peuvent être incriminés dans la cause et les circonstances du décès (Monthei, 2009).

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

Depuis, différentes drogues et diverses techniques ont été testées sur les larves de diptères dans le but de les utiliser comme des échantillons toxicologiques en vue de détecter des substances comme les benzodiazépines (Kintz, 1990 ; Sadler *et al.*, 1995), la morphine (Hedouinet *et al.*, 2001 ; Georges *et al.*, 2009), le paracetamol (O'Brien et Turner, 2004) ou encore la codéine (Kharbouche *et al.*, 2008).

Ces dernières années, de nombreuses recherches ont été faites sur l'entomotoxicologie. Les études réalisées peuvent être classées selon deux aspects ; études qui ont porté sur la fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologiques et des travaux effectués pour étudier les effets des drogues sur le développement des insectes médico-légaux d'une importance majeure (Djedouani, 2008).

3.1- Application de l'entomotoxicologie et les différentes techniques utilisées

Historiquement, il a été difficile d'obtenir des informations toxicologiques dans le cas de décomposition avancée de vu le manque de tissus analysables. Cependant, une variété d'insectes et leurs exuvies larvaires ainsi que leurs pupes sont couramment rencontrées sur les restes putréfiés, momifiés et sur les squelettes. Plusieurs études ont détaillé la présence de toxines et de substances contrôlées, à la fois dans les insectes et les restes chitinisés récupérés sur les victimes en état de décomposition (Singh et Sharma,2008). Dans ces rapports, les arthropodes ont généralement été récupérés homogénéisés et, ensuite, traités d'une manière similaire aux autres tissus et fluides traditionnels ou soumis à des techniques d'extraction mises au point pour l'analyse des tissus rigoureux tels que les cheveux et les ongles (Byrd et Castner, 2001). La détection réussie de substances a été définie par plusieurs méthodes d'extraction à partir des asticots, de nymphes et des adultes de diptères et même des excréments de coléoptères (Miller *et al.* 1994).

Les procédures analytiques telles que le dosage radio-immunologique (RIA), la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS), la chromatographie sur couche mince (CCM), ou la chromatographie liquide à haute performance / spectrométrie de masse (HPLC/MS) peuvent être effectuées après une macération des larves (Gagliano-Candela et Aventaggiato,2001 ; Goff et Lord,2001).Elles peuvent également, être appliquées aux insectes adultes ou même aux larvaires et aux pupes, qui sont souvent trouvées sur les lieux de la mort, même après plusieurs années (Miller *et al.*,1994 ;Bourel *et al.*,2001).

Au cours d'une étude comparative, Kintz *et al.* (1990) ont obtenu une plus grande sensibilité à l'aide des larves de mouches à la place de la matière en putréfaction. La préparation et l'extraction de substances toxiques à partir des tissus entomologiques présente certains avantages par rapport aux tissus humains : l'échantillonnage est rapide, facile et aucune émulsion a été noté lors de l'extraction contrairement à ce qui a été parfois observé avec les tissus humains. La capacité de quantifier les concentrations de médicaments dans les larves est

particulièrement utile dans les enquêtes relatives à l'effet des médicaments sur le développement des insectes (Wood *et al.*, 2005).

Les insectes peuvent également être des animaux modèles fiables pour des études immuno-histochimiques en vue de la détection et l'arpage du métabolisme de certaines substances (Amendt *et al.* 2010).

3.2- Fiabilité des insectes en tant que source d'échantillons d'analyse toxicologiques

Plusieurs études ont été réalisées pour étudier la fiabilité des insectes comme source d'échantillons d'analyse toxicologiques. Ainsi, l'utilisation des insectes dans l'analyse toxicologique a été démontrée pour la première fois par Sohal et Lamb en 1977 (Introna *et al.*, 2001) qui ont observé l'accumulation des métaux tels le cuivre, le calcium, le fer et le zinc chez les insectes. En 1982, Nuorteva et Nuorteva ont montré que le mercure a été détecté dans les larves de diverses espèces de mouches. Ces études ont prouvé la bioaccumulation de toxines et de métaux dans les organismes d'insectes qui se nourrissaient de sources de nutriment contaminées.

La science forensique constitue l'une des disciplines qui a bénéficié de cette nouvelle découverte. La plupart des études semblent être réalisées sur les insectes collectés à partir de cadavres humains chez lesquels la mort est survenue par la drogue et différentes toxines (Kintz *et al.*, 1990).

C'est en 1989 que Goff et des collaborateurs ont utilisé, avec succès, les larves de deux espèces entomologiques de diptères (*Chrysomya megacephala* et *Ch. rufifacies*) qui se sont alimentées sur un corps putréfié, pour détecter les drogues par GC.

En 1990, plusieurs analyses toxicologiques ont été réalisées sur un corps putréfié dont le PMI a été estimé à 67 jours. Kintz *et al.*, (1990) ont réalisé l'analyse toxicologique par HPLC sur des échantillons d'organes décomposés et de larves qui colonisaient le cadavre.

Dans ce travail, cinq différents médicaments prescrits ont été détectés et quantifiés dans les deux échantillons de larves et d'organes ; le phénobarbital, les benzodiazépines (triazolam, oxazépam) et deux antidépresseurs (alimémazine, clomipramine).

A travers ce travail, il a été confirmé que les échantillons entomologiques étaient plus faciles à analyser, et ont montré plus d'avantages que les échantillons putréfiés. Cependant, aucune corrélation n'a pu être établie entre la concentration détectée dans les tissus putréfiés et celle détectée dans les larves.

Nolte *et al* (1992) ont ramassé des pupes vides trouvés sur un cadavre d'un toxicomane et analysées par GC/MS, elles ont permis la détection de la cocaïne. Un an plus tard, en 1993, Wilson et des collaborateurs ont essayé de détecter trois antidépresseurs dans trois sources différentes d'échantillons ; les larves, les muscles et les tissus humains ainsi que les pupes vides de *Calliphora vicina* en utilisant la HPLC. Les trois antidépresseurs ; l'amitriptyline, la nortriptyline et la propoxyphène ont été détectés avec succès chez les larves et les tissus musculaires humains, mais aucun d'entre eux n'a été détecté dans les pupes. Ensuite, Miller *et al.* (1994) ont effectué une analyse sur les pupes de diptères récupérées sur les restes humains par GC/MS et ont détecté, avec succès, une intoxication à l'amitriptyline. Le tableau suivant représente quelques exemples de médicaments détectés à l'aide des insectes nécrophages.

Tableau 01 : Exemples de certains médicaments détectés à l'aide des insectes (Kapil et Reject, 2013).

Espèces d'insectes	Médicaments
<i>Parasarcophaga ruficornis</i>	Méthamphetamine
<i>Sarcophag atibialis</i>	Cortisol
<i>Lucilia sericata</i>	Méthadone
<i>Calliphora stygia</i>	Morphine
<i>Chrysomya albiceps</i>	Paracétamol, Diazépam
<i>Chrysomyamega cephal</i>	Malathion
<i>Calliphora vicina</i>	Temazepam, Méthadone

4- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) est la combinaison de deux techniques d'analyse (**Figure .06**).

Il s'agit d'un couplage entre une méthode de séparation des constituants d'un échantillon (CG) et une méthode de quantification (dosage) des molécules d'intérêt ainsi séparées (SM) constituant un instrument capable de séparer des mélanges en leurs composants individuels, d'identifier, puis de fournir des informations quantitatives sur la structure chimique de chaque composé (Marvin et Master, 2007).

La CG/SM est une technique d'analyse fréquemment utilisée dans les laboratoires de toxicologie. C'est l'une des principales techniques utilisées pour le dépistage, l'identification et

la quantification de nombreux groupes de substances toxiques alimentaires non polaires et/ ou semi-polaires (ou leurs produits de dérivation). La puissance élevée de séparation susceptible d'être atteinte en combinaison avec un large éventail de détecteurs utilisant différents principes de détection à laquelle il peut être couplé, fait de la GC un outil important souvent irremplaçable dans l'analyse des niveaux de toxicité des composants (Hajslova et Cajka, 2007).

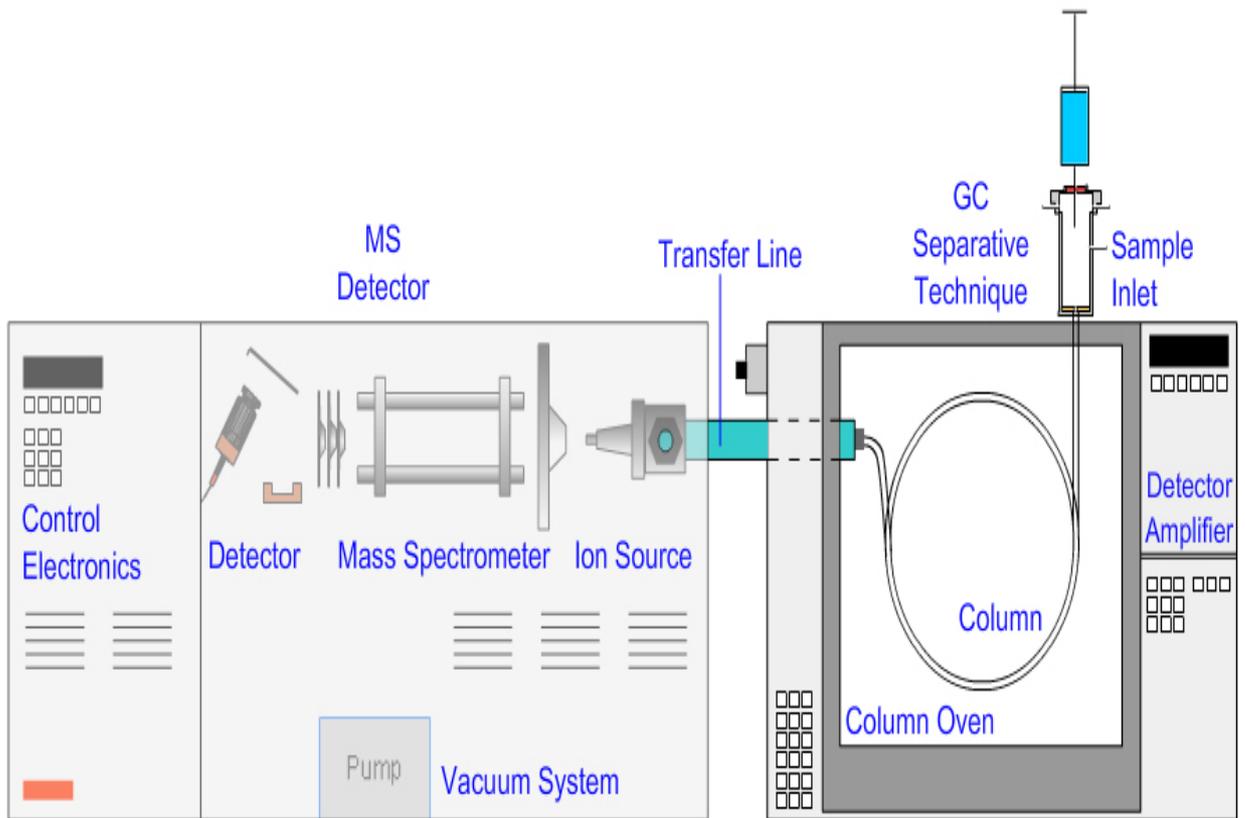


Figure 06 : Schéma représentant l'appareil de GC/MS (Sayed Zameer et Khushnuma, 2007).

Objectif de l'étude

Ce travail consiste à tester la fiabilité des larves de quatre espèces de diptères Caliphoridae ; *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria*, comme une source alternative d'échantillon pour une analyse toxicologique afin de détecter la présence du valium ou ses métabolites. Ceci dans un but purement médico-légal qui consiste en, la détermination de la cause de la mort.

Afin d'atteindre notre objectif, un protocole expérimental a été élaboré en collaboration avec les spécialistes du laboratoire d'entomologie du département de médecine légale de l'Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale de Bouchaoui (INCC/GN) (**Figure 07**). Les analyses toxicologiques ont été réalisées au laboratoire de toxicologie de la même institution par GC/ MS. A cet effet une liste de matériel a été préparée et des méthodes de travail ont été conçues.



Figure 07 : Institut Nationale de Criminalistique et de Criminologie de la Gendarmerie Nationale (INCC/GN), (Originale, 2017).

1- Matériel

1.1 –Model animal

Deux lapins de la race albinos « *Néo-zélandais/ le Californien* » récupérés d'une ferme à Bouzeguène ont été utilisés comme model animal. Les lapins ont été choisis pour cette expérience car leur métabolisme est proche de celui des humains (Beck *et al.*, .2002). Les lapins présentent des poids de 2.00 et 2.15 kg (**Figure 08**).

Le premier lapin a été sélectionné pour être l'origine du substrat nutritif contaminé par le valium et le deuxième a été dédié pour être l'origine du substrat non contaminé (témoin).



Figure 08 : Lapins « *Néo-zélandais/ le Californien*, Race albinos » dans une cage avec de la nourriture (Originale, 2017).

1.2-Espèces entomologiques

Quatre (04) espèces de diptères d'une grande importance forensique ont été choisies à savoir *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria*.

1.3-Substance utilisée (xénobiotique)

Le **valium (diazépam)** est le produit chimique utilisé lors de cette étude (des ampoules de 10mg/ 2ml (5mg/ml) (**Figure 09**).

- Le nom chimique : 7-chloro-1,3-dihydro-1-méthyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazépin-2-one.
- La formule moléculaire : C₁₆H₁₃ClN₂O
- Le poids moléculaire : 284.74.
- La structure chimique : (**Figure 10**)



Figure 09 : ampoules de Diazépam, (Originale, 2017).

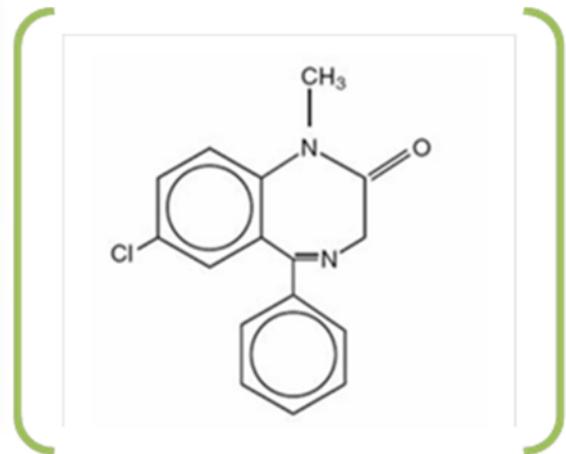


Figure 10 : Structure chimique de diazépam

- **Provenance et choix du médicament**

Il est obtenu de la pharmacie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de TiziOuzou sous une ordonnance médicale. La forme injectable a été sélectionnée vu la facilité de son administration.

L'équipement, les instruments et le consommable utilisés dans la présente étude est développé dans les annexes (I ; 1-2-3-4-5).

2- Méthodes

2.1-Origine des espèces choisies

Les quatre espèces entomologiques ont été obtenues de la nature à l'aide d'un dispositif expérimental constitué d'un piège attractif menu d'un appât (morceau de viande) (**Figure 11**).

Le piège a pour principe de capturer des insectes avant d'accéder à l'appât pour les empêcher de pondre sur les lieux.

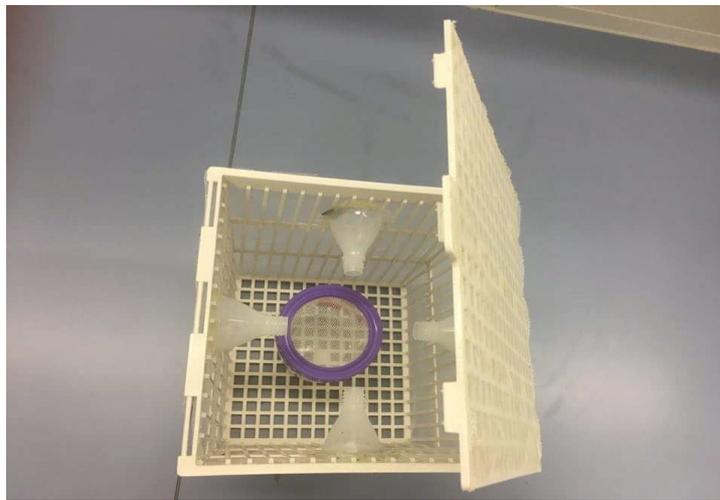


Figure11 : piège à appât pour la capture des insectes (Originale, 2017)

-En première étape : le piège a été déposé à l'extérieur dans l'espace vert situé au voisinage du laboratoire d'entomologie INCC/GN de Bouchaoui. Après environ une heure, des mouches ont été observées à l'intérieur du piège. Les insectes adultes récoltés ont été transférés au laboratoire et placés dans le congélateur à -5°C pendant 10 minutes environ afin de les assommer puis les identifier.

-En deuxième étape : les mouches sont récupérées et identifiées sous le stéréomicroscope par leurs caractères morphologiques à l'aide d'une clé d'identification décrite par Szpila, (2012). Seules les quatre espèces pré-ciblées par ce projet ont été gardées, en s'assurant que les deux sexes mâle et femelle sont présents par examen morphologique spécifique pour chaque sexe. En effet, un dimorphisme sexuel est remarquable au niveau des yeux : les yeux des mâles sont rapprochés alors que chez les femelles, ils sont très éloignés (Wyss et Cherix, 2006) (**Figure 12**). Les autres espèces ont été relâchées dans la nature. Cette étape a été répétée

jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de mâles et de femelles de chaque espèce (Environ dix femelles et trois mâles pour chaque espèce).

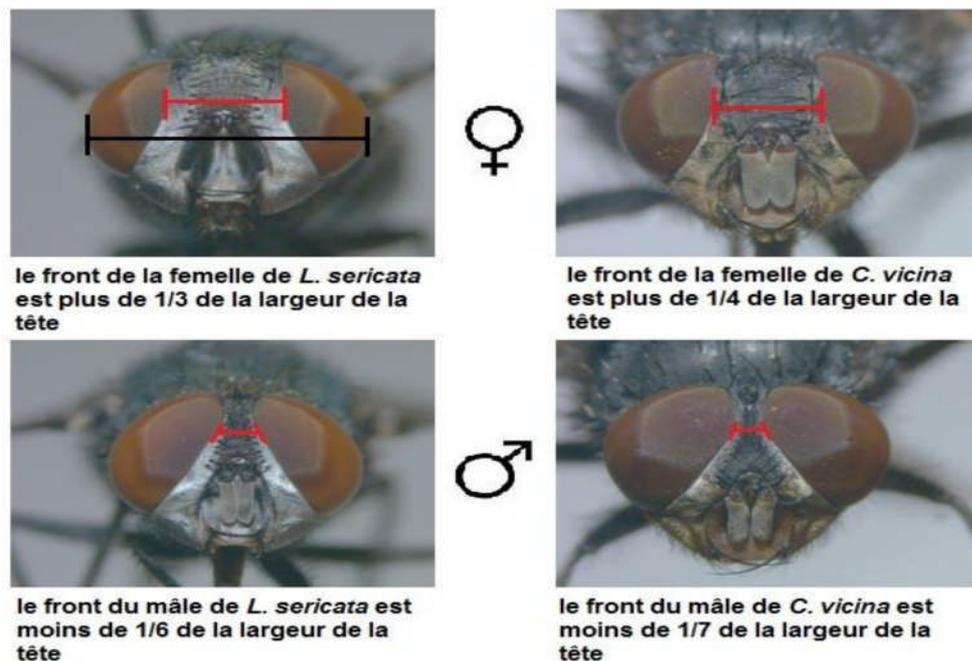
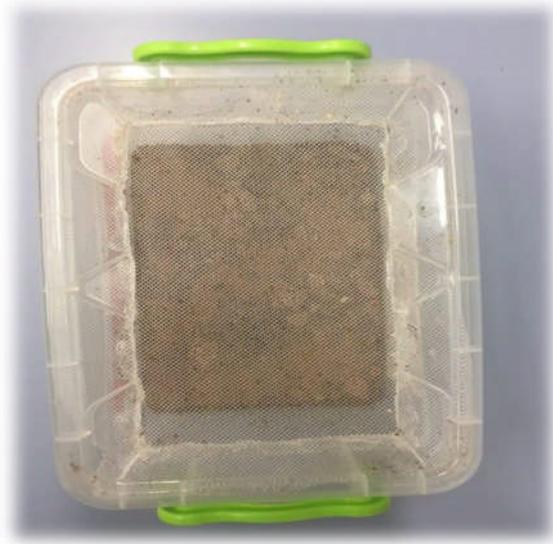


Figure 12 : Le dimorphisme sexuel au niveau des yeux, plus écartés chez la ♀ que chez le ♂ ; exemple de *L. sericata* et *C. vicina* (Originale, 2017).

-En troisième étape : cette étape est consacrée à la multiplication du nombre d'adultes des espèces capturées. Les mâles et les femelles capturés ont été mis dans des boîtes utilisées pour l'accouplement (36X 24X14 cm) contenant des morceaux de viande de bœuf d'environ 100g et de l'eau (**Figure 13**). Le lendemain, des œufs ont été observés sur le morceau de viande sous forme d'agglomérations de couleur blanche. La viande est récoltée et mise dans des boîtes d'élevage en plastique transparentes munies de couvercles dont la surface est remplacée par un filet à petites mailles, et mise en culture à 24°C et une humidité relative de 70% (**Figure 14**).

**Figure 13** : Boite d'accouplement**Figure 14** : Boite d'incubation (Originale, 2017).

(Originale, 2017)

Les adultes émergés ont été transférés dans une cage d'insecte de grande dimension (60X34X53cm) (**Figure 15**) et sont nourris pendant deux semaines de sucre et d'eau. Pendant la 2^{ème} semaine, le régime alimentaire a été renforcé par la poudre de lait et environ 2 ml de sang par jour pour permettre la maturation ovarienne (Gosselin *et al.*, 2011). A la fin de la 3^{ème} étape, la nourriture a été retirée pendant quatre (04) jours puis les insectes ont été stimulés pour pondre. Le jour de la ponte a été planifié pour être le même que celui de l'administration du Valium à l'animal (lapin). Les œufs de chaque espèce ont été collectés séparément et sont mis dans l'incubateur.

**Figure 15** : La cage d'élevage des insectes (♂ et ♀ adultes) avec du sucre et de l'eau (Originale, 2017).

2.2 Expérimentation Entomo-toxicologique

2-2.1- Administration du xénobiotique dans le corps de l'animal :

La solution du valium a été administrée au lapin qui sera utilisé comme substrat nutritif par les espèces nécrophages par voie intraveineuse (la veine de l'oreille et celle de la jambe) (**Figure16**). Il a été injecté par 03 doses identiques de valium (**Tableau 2**). Cette opération a été prise en charge par un personnel qualifié (médecin vétérinaire).



Figure 16 : Injection intraveineuse dans l'oreille (*photo à droite*) et la jambe (*photo à gauche*) du lapin (Originale, 2017).

Après 38 min de la dernière injection, le lapin est mort. Au même temps, le deuxième lapin a été tué par euthanasie en provoquant un coup violent sur la tête. Les deux lapins ont été mis au congélateur à -5°C , le temps de l'obtention des larves.

Tableau 02 : Programme d'administration du valium au lapin.

	Quantité du Valium (mg)	Heure de l'administration
1^{er}injection	10mg	11 :00
2^{ème}injection	10mg	12 :00
3^{ème}injection	10mg	13 :00

Afin de confirmer que la concentration de valium détectée dans les larves est celle que nous avons injectée, un prélèvement sanguin a été effectué sur le lapin intoxiqué avant sa mort.

Un autre prélèvement a été effectué sur le lapin témoin (non contaminé par le diazépam) afin de s'assurer de l'absence de toute substance similaire au valium qui peut induire de faux résultats. La procédure est aussi appliquée sur les prélèvements des larves ; des larves ont été prélevées sur le lapin témoin et analysées pour s'assurer qu'aucune substance similaire à celle de diazépam n'est présente.

Afin de connaître l'éventuelle relation quantitative qui existe entre les larves et les tissus utilisés comme source alimentaire et connaître l'étendue de la fiabilité des espèces de Calliphoridae pour la détection quantitative des médicaments dans les larves, un prélèvement de tissu a été effectué sur le lapin intoxiqué et cela en prélevant un morceau d'environ un (01) gramme de viande sur le muscle du lapin (la jambe).

2.2.2 - Transfert des larves sur le substrat nutritif

Cette étude a été effectuée dans une parcelle située dans la wilaya de Tizi-Ouzou, à l'université Mouloud Mammeri (faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques) (**figure 17**).

Les carcasses des deux lapins sont transportées sur le site de l'expérimentation et sont déposées sur terre à l'air libre. Une ouverture d'environ cinq (05) centimètres a été effectuée sur le ventre de chaque carcasse et cela dans le but de préparer un abri où une mixture de larves des quatre espèces a été déposée. Une fois l'opération terminée, les carcasses ont été protégées par une cage construite d'un squelette métallique couvert par un filet à mailles fines dont le diamètre ne permet pas l'accès au cadavre, à d'autres insectes. L'ensemble a été protégé par une cage métallique afin d'empêcher les carnivores et les rongeurs d'avoir accès aux carcasses. Les deux carcasses sont déposées séparément sur le site de l'expérimentation, entourées par deux cages pour chacune.

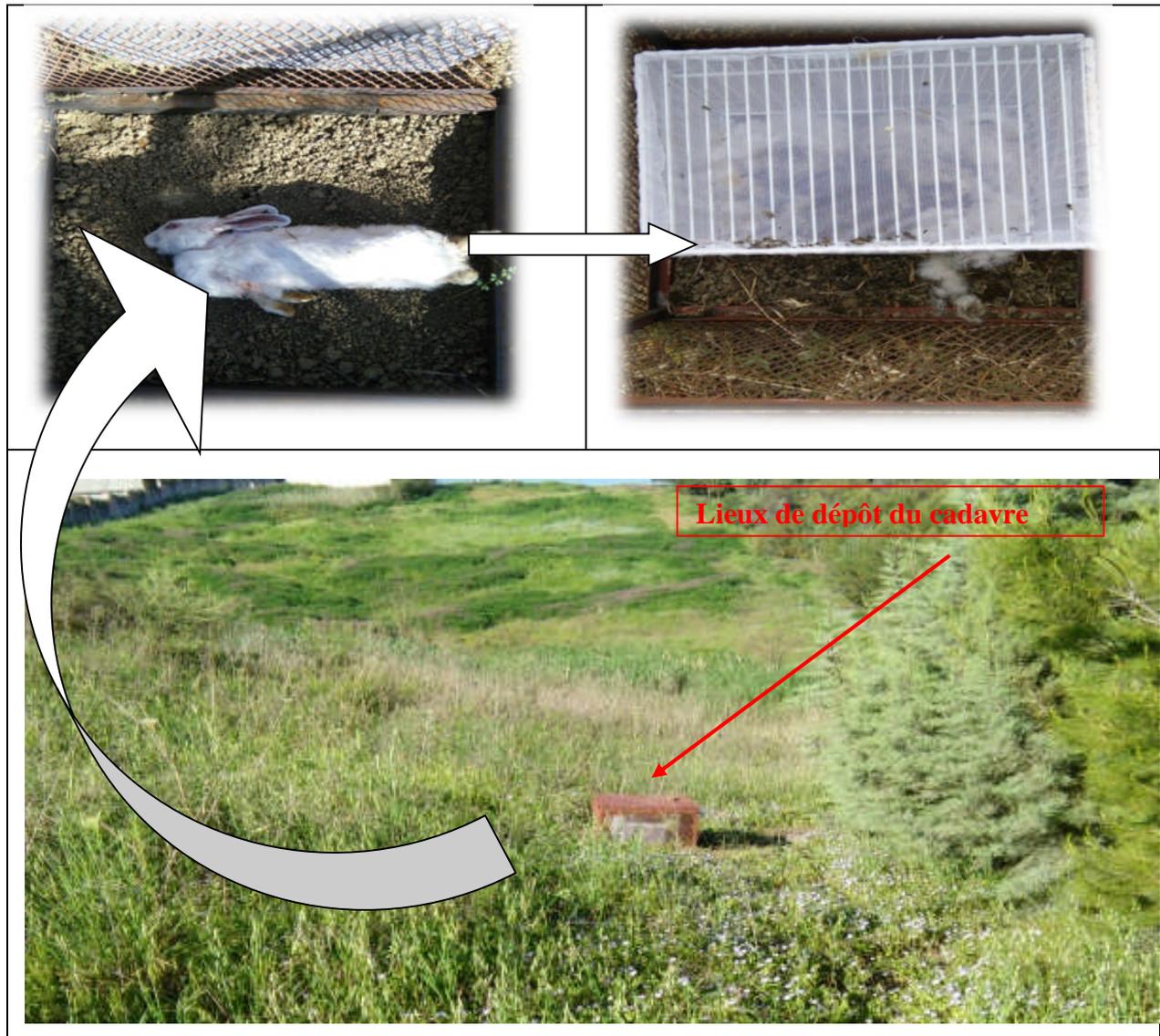


Figure 17 : Carcasse déposée sur le site expérimental (Originale, 2017).

3- Echantillonnage des larves et des pupes

Un plan d'échantillonnage préalablement établie a été mis en application afin d'obtenir des échantillons de larves qui seront utilisées dans les analyses toxicologiques.

La taille de l'échantillon varie selon le nombre de larves trouvées mais d'une taille minimale supérieure à dix (10) larves. Ce nombre est jugé suffisant pour procéder à des analyses toxicologiques en se basant sur les travaux précédents effectués par le laboratoire d'entomologie (INCC/GN). L'échantillonnage a consisté un prélèvement de larves et de pupes à partir de chaque carcasse à des périodes respectives (toutes les 24 heures) et en les tuant par une immersion dans l'eau chaude (80°C) pendant quelques secondes (l'eau chaude est la meilleure technique pour ne pas contaminer les larves par d'autres produits chimiques qui

peuvent conduire à des faux résultats). Après l'élimination de l'eau chaude, les échantillons sont mis dans des flacons et conservés par congélation à -20°C .



Figure 18 : La récolte des larves et des pupes sur les carcasses des lapins (*photo à gauche*) et leur immersion dans l'eau chaude (*photo à droite*).

Dans cette partie du travail, nous avons effectués sept (07) prélèvements et nous avons procédé par la suite à l'identification des stades larvaires et des espèces. Puis nous avons tentés de détecter le diazépam par la GC-MS.

4- Détermination des stades larvaires

Après avoir décongelé les échantillon à la température ambiante, le stade de développement de chaque larve prélevée sur les deux cadavres a été déterminé en utilisant le Stéréo-microscope par l'observation des spiracles postérieurs situés au niveau de la région postérieure de la larve en basant sur les clés d'identification décrites par Szpila, (2012)(annexes III ,2). Les fentes des stigmates postérieures permettent de déterminer rapidement le stade larvaire, une fente par stigmate pour le stade L1, deux fentes par stigmate au stade L2 et trois fentes par stigmate au stade L3. (**Figures 19**). Les résultats obtenus sont présentés sur les tableaux ci-dessus.

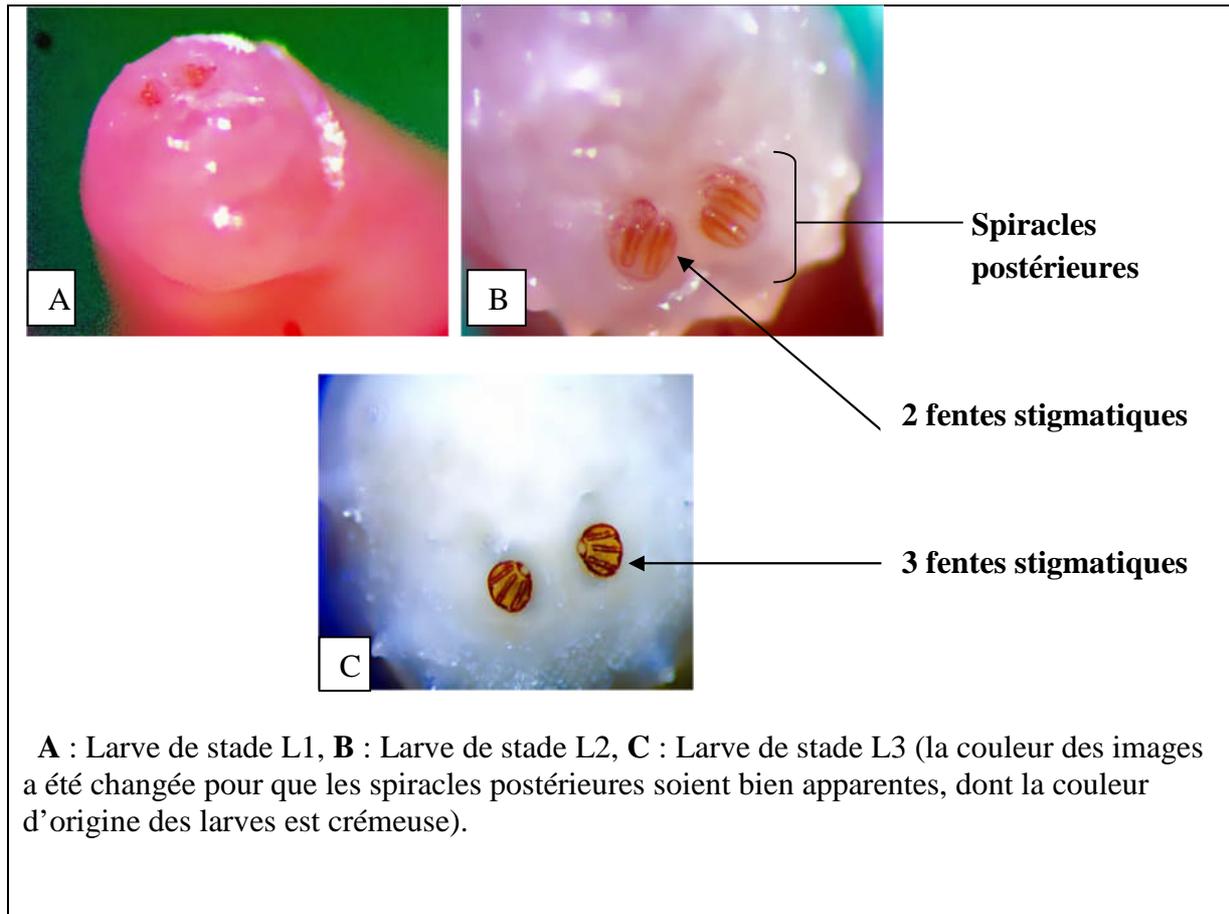


Figure 19 : Vue postérieure des larves de différents stades d'un diptère Calliphoridae (Originale, 2017).

Tableau 04 : Résultats de l'échantillonnage des larves et des pupes récoltées sur le lapin témoin durant les périodes de l'expérimentation.

Dose 00 (témoin)									
Temps	24h	48h		72h	96h	120h		144h	168h
Stade de développement de	L1	L1	L2	L3	L3	L3	Pupes	Pupes	Pupes
Nombre de larve/pupes collectés	50	41	28	33	42	52	11	15	26

Tableau 05 : Résultats de l'échantillonnage des larves et des pupes récoltées sur le lapin intoxiqué durant les périodes de l'expérimentation.

Dose 01(Intoxiqué)										
Temps	24h	48h	72h		96h		120h	144h		168h
Stade de développement	L1	L1	L1	L2	L2	L3	L3	L3	pupes	Pupes
Nombre de larves / pupes collectés	40	51	48	73	11	78	72	68	09	22

5- Analyse toxicologique

Puisque l'animal a été sacrifié par une injection létale de diazépam qui est une anesthésie locale, une méthode d'analyse est adoptée afin de détecter cette dernière dans les larves qui se nourrissent sur le substrat.

Pour des raisons de disponibilité et d'efficacité, la méthode de la Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-MS) a été choisie, (c'est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse ; pour la séparation des composés d'un échantillon et la spectrophotométrie de masse ; pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse/charge).

5.1-Choix de la méthode d'analyse

Les échantillons de larves sont décongelés à une température ambiante. Ensuite, un échantillon de dix (10) larves est broyé à l'aide d'une tige métallique propre dans son tube de prélèvement puis dilué dans l'eau distillée. L'extraction du médicament est faite en trois phases par trois solutions préparées comme suit :

- Préparation de la solution (R1) : faire dissoudre 20 g du sulfate de sodium pour analyse (Na_2SO_4) dans 50 ml de H_2O ultra pure ;
- Préparation du solvant d'extraction (R2) : Diéthyléther ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$) / acétal d'éthyle ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) (50/50) (v/v) ;
- Préparation de la solution NaOH1M (R3) : Peser 40mg de Na OH et dissoudre dans

40ml d' H_2O ultra pure ;

➤ L'extraction

- Extraction dans des tubes à centrifuger (15 ml) en polypropylène : 2.5 ml du milieu à analyser + 2 ml 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 (Lubitsch Labortechnik) à 60°C jusqu'à évaporation à moitié ;

- Eliminer la couche qui se trouve entre les deux phases, extraire la phase aqueuse une deuxième fois dans un tube à centrifuger (15 ml) en polypropylène, ajouter 2ml de R1+5 ml de R2+ 500 µl de R3 ;
- Mélanger les tubes pendant 15 min avec le mélangeur rotateur ;
- Centrifuger les tubes 10 min à 3000tr/min ;

Récupérer la phase organique dans le tube à hémolyse en verre, évaporé à moitié et continuer jusqu'à évaporation totale ;

- Reprendre le résidu à sec avec 100 µl de méthanol qualité HPLC ;
- Injecter 1ul dans le chromatographe et analyser selon la méthode appropriée.

5.2- Paramètres de la GC/MS

La programmation de l'instrument GC/MS a été faite comme le rapporte le tableau :

Tableau 03 : Paramètres de l'instrument GC/MS.

Le programme du four	- 50°C pendant une minute - 80°C pendant 20 minutes
Vitesse de chauffage	10°C /min
Température de l'injection	240°C
Température de la ligne de transfert	280°C
Mode d'injection	Split (1/50)
Le volume d'injection	1ul
Gaz vecteur	Hélium
Le débit	1ml/1min
Mode de spectromètre de masse	Impact électronique (EI)
La température de la source	230°C

Notre étude réalisée dans le but de tester la fiabilité des larves de quatre espèces de diptères Caliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria*.) comme source d'échantillon pour une analyse toxicologique a révélée les résultats qui seront présentés dans ce chapitre.

1-Analyse des prélèvements entomologiques par CG/MS

Pour la détection de diazépam dans les tissus des larves des quatre espèces de mouches ciblées par cette étude, avant d'être transférés au laboratoire de toxicologie de l'INCC/GN pour être analysés par GC-MS, les échantillons entomologiques (larves et pupes) prélevées durant la première phase (voir chapitre II ,page 25) ont été examiné afin d'identifier les spécimens collectés sur la carcasse de lapin intoxiqué et de définir leurs stade de développement. Les résultats de cette identification ainsi que ceux de l'analyse toxicologique sont illustrés ci-dessous :

1.1- Le premier prélèvement effectué le 25/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a révélé la présence de larves. Après observation, il s'est avéré qu'elles sont toutes de premier stade L1. Les caractères morphologiques n'étant pas très développés. Ce qui constitue un obstacle pour leur identification. Néanmoins, cet échantillon a été analysé par le CG/MS et les résultats ont été négatifs. Le tableau suivant résume ces résultats.

Tableau 06 : Résultats de l'examen du premier prélèvement (le 25/05/2017)

Stade larvaire	Poids (g)	Espèce	Concentration de Diazépam (µg/01g de larve)
L1	>01g	-	Non détecté (négatif)

(-) : Espèce non identifié.

1.2- Le deuxième prélèvement effectué le 26/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a aussi révélé la présence de larves de stade L1 et l'analyse par GC-MS a révélé des résultats négatifs. Le tableau 07 résume ces résultats.

Tableau 07 : Résultats de l'examen du deuxième prélèvement (le 26/05/2017).

Stade larvaire	Poids (g)	Espèce	Concentration de Diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L1	> 01g	-	Non détecté (négatif)

Les résultats négatifs obtenus de l'analyse toxicologique des échantillons peuvent être expliqués par l'une des raisons suivantes :

- La quantité insuffisante de larves prélevées dont leur poids est inférieure à un (01) gramme.
- Les larves au stade L1 possèdent une faible alimentation.
- Les larves au stade L1 n'accumulent pas le diazépam

1.3- Le troisième prélèvement effectué le 27/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a révélé la présence de larves de L1 et L2. Ces derniers ne sont pas identifiés vu l'insuffisance de caractères morphologiques qui permet la distinction des espèces. Le tableau suivant illustre les résultats de la GC/MS.

Tableau 08 : Résultats de l'examen du troisième prélèvement (le 27/05/2017)

Stade larvaire	Poids (g)	Espèce	Concentration du Diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L1	> 01g	-	Non détecté (négatif)
L2	<01g	-	0.0193

Les résultats de l'analyse d'un mélange de larves de 2^{ème} stade sont positifs, une concentration de diazépam de 0.0193 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve a été détectée. Cela la indique que les larves ont accumulé le produit dans leurs tissus.

Le chromatogramme de diazépam du mélange de larves de 2^{ème} stade larvaire est cité dans les annexes (II ,2-1).

1.4- Le quatrième prélèvement effectué le 28/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a montré la présence de larves troisième stade (L3) des quatre espèces testées (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria*).

Les larves de chaque espèce sont analysées séparément et les résultats obtenus sont illustrés dans la figure suivante :

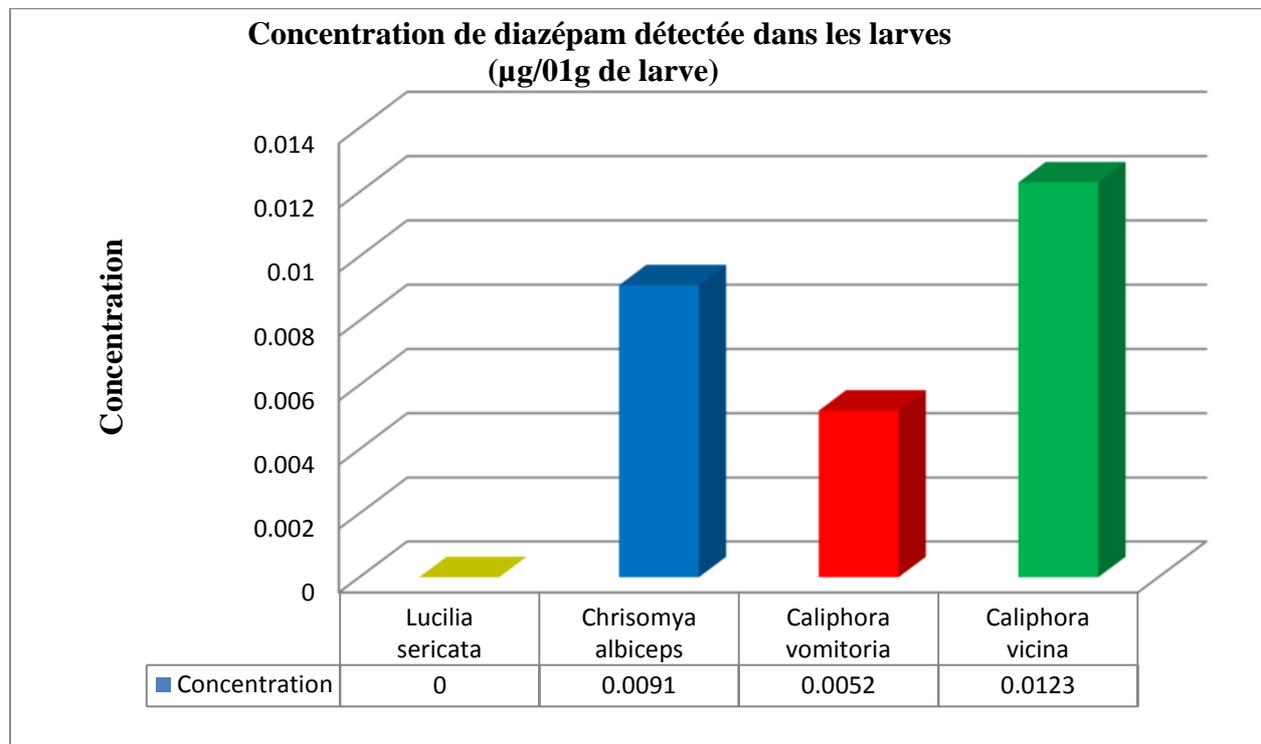


Figure 20 : Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (04^{ème} prélèvement effectué le 28/05/2017).

L'examen de l'analyse toxicologique a révélé des résultats négatifs pour les larves de l'espèce *Lucilia sericata* vu leur quantité insuffisante (>1g), tandis que les résultats sont positifs pour les trois autres espèces mais avec des concentrations différentes. La quantité de diazépam détectée chez les larves de *C. vicina* est plus importante (**0,0123 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve**). Cela signifie que cette dernière s'est nourrie voracement du substrat et par conséquent le taux d'accumulation du diazépam est plus important.

1.5- Le cinquième prélèvement effectué le 29/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a révélé la présence de larves de troisième stade (L3) des quatre espèces. Les larves de chaque espèce sont analysées séparément et les résultats obtenus sont illustrés par la figure suivante.

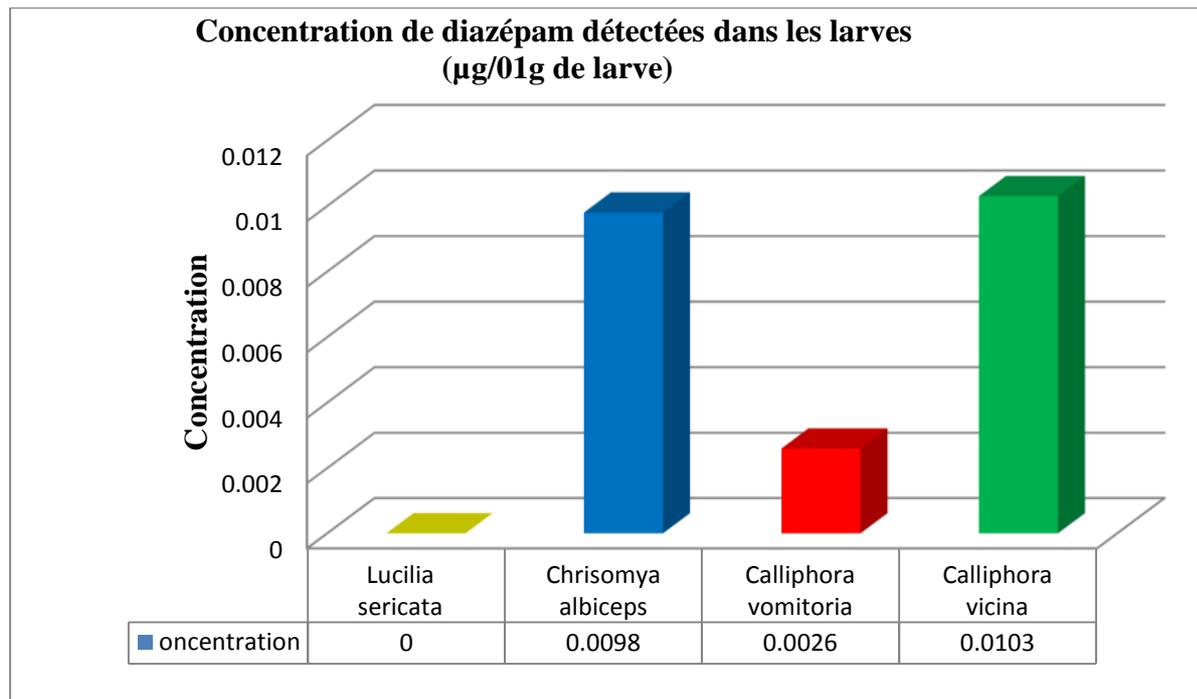


Figure 21 : Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (05^{ème} prélèvement effectué le 29/05/2017).

La concentration du produit détectée chez *C. vicina* est plus élevée de l'ordre de 0.0103 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve ; l'alimentation reste toujours vorace. Elle est moins importante chez *C. albiceps* (0.0098 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve) et très faible chez *C.vomitoria*. Ce qui signifie un taux d'accumulation du diazépam est plus important chez *C.vicina*. Par contre, les résultats sont négatif pour *L. sericata* en raison de la quantité réduite de larves récoltées (>1g).

1.6- Le sixième prélèvement effectué le 30/05/2017

L'examen des individus entomologiques contenus dans ce prélèvement a démontré la présence de larves de troisième stade (L3) des quatre espèces. Les échantillons de larves sont analysés par GC-MS et les résultats obtenus sont illustrés par la figure suivante :

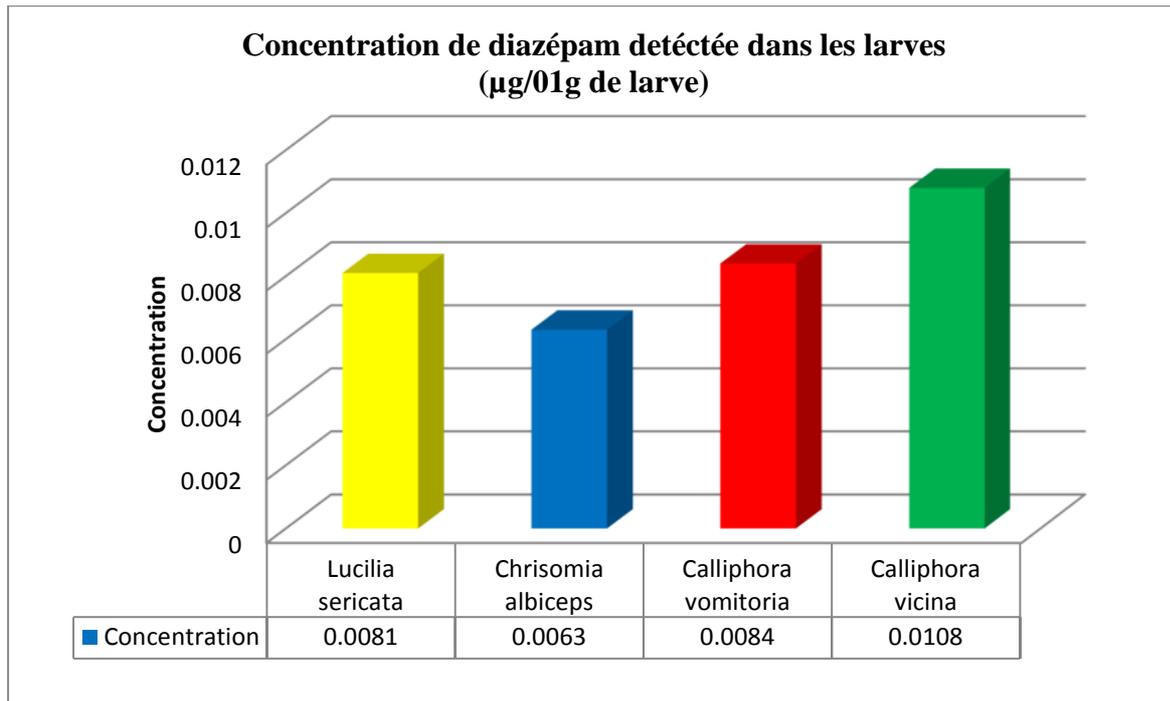


Figure 22: Les concentrations de diazépam détectées dans les larves L3 des quatre espèces (06^{ème} prélèvement effectué le 30/05/2017).

L'analyse toxicologique dans ce cas a révélé des résultats positifs pour les larves de toutes les espèces. La concentration de diazépam détectée reste plus élevée chez *C. vicina* avec 0.0108 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve. Des concentrations similaires sont détectées chez *C. vomitoria* et *L. sericata* de l'ordre de 0.0084 et 0.0081 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve. Cependant, la quantité détectée chez *C. albiceps* est moins importante (0.0063 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larves) ; les larves se sont nourries légèrement sur le substrat d'où un taux d'accumulation de diazépam e moins important chez les larves de cette espèce.

1.7- Le septième prélèvement effectué le 31/05/2017

Les individus entomologiques contenus dans ce prélèvement sont des pupes. Ces dernières sont identifiées. Il en est ressortie l'examen a démontré la présence des pupes de deux espèces uniquement ; *Calliphora vomitoria* et *Calliphora vicina*. Ces échantillons sont analysés par GC-MS et la figure suivante illustre les résultats obtenus.

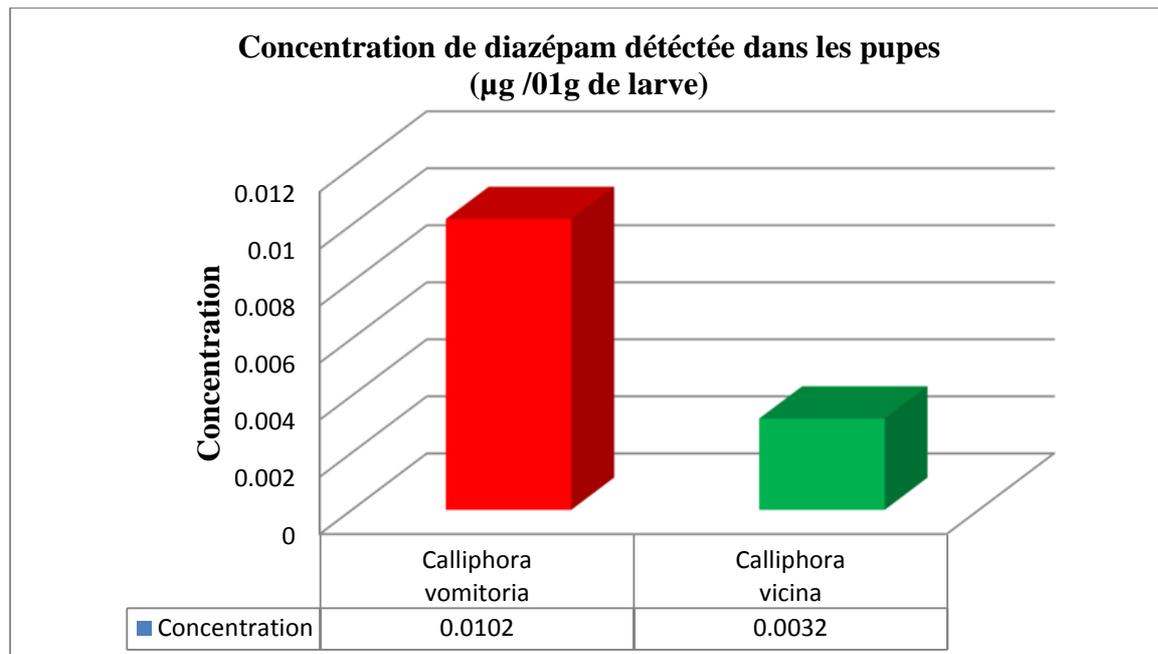


Figure 23 : Les concentrations de diazépam détectées dans les pupes des deux espèces de Calliphoridae (07^{ème} prélèvement effectué le 31/05/2017).

La concentration détectée dans les pupes de *C.vomitoria* (0.0102 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de pupes) est plus importante que celle détectée chez *C.vicina*, (0.0032 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de pupes). Cela indique que la quantité de diazépam accumulée dans les pupes *C.vomitoria* est plus élevée que celle accumulée par *C.vicina*.

Nos résultats révèlent que le diazépam est détecté dans tous les échantillons de larves nourries sur le lapin intoxiqué. Par contre, l'analyse des échantillons prélevés sur le lapin témoin a été négative, ce qui prouve l'absence de toute autre molécule similaire à celle de diazépam qui peut conduire à de faux résultats.

Les chromatogrammes de diazépam des pupes sont donnés dans les annexes (II, 3-a, b).

2- Etude comparative de la bioaccumulation du diazépam chez les stades immatures des quatre espèces de Calliphoridae

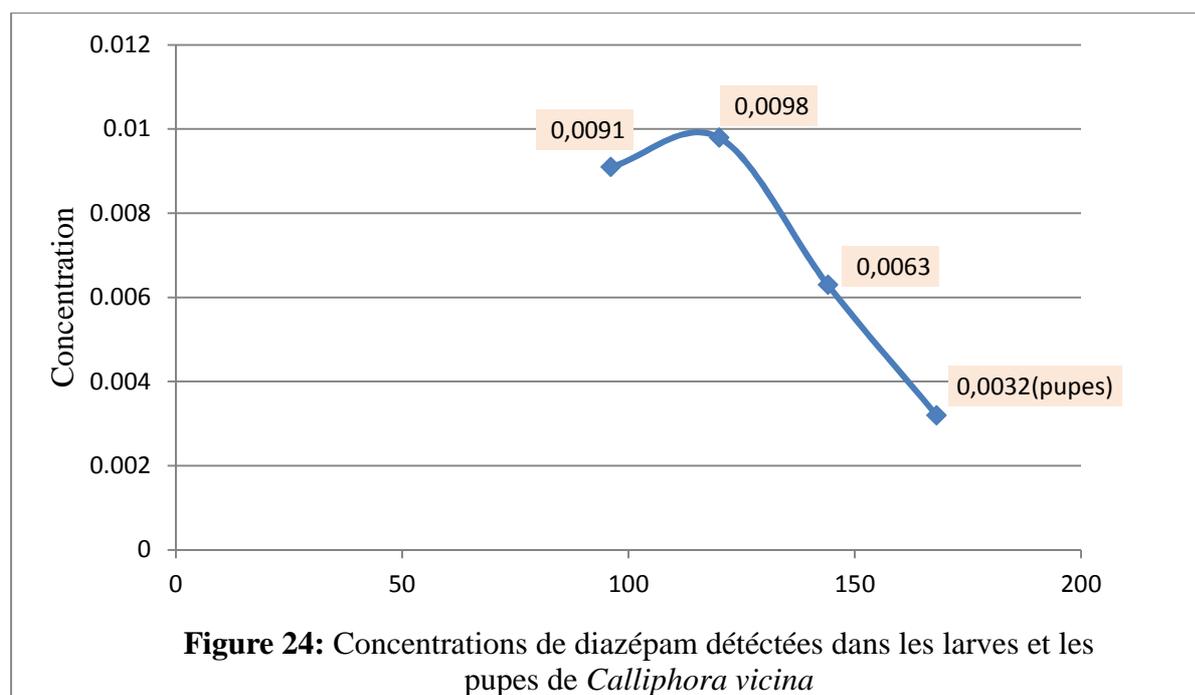
a- *Calliphora vicina*

L'analyse des stades immatures (larves de stade L3 et pupes) de *Calliphora vicina* durant les différentes périodes (allant de 96 heures jusqu'à 168 heures) par le CG/est positive. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 09 :

Tableau 09 : Les concentrations de diazépam dans les larves et les pupes de *C.vicina*.

Stade développement	Temps (heures)	Concentration ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L3	96	0.0091
	120	0.0098
	144	0.0063
Pupes	168	0.0032

Les concentrations détectés dans les larves (L3) sont différentes en fonction du temps. Nous avons enregistré un seuil minimal de **0.0091 $\mu\text{g}/01\text{g}$** , détecté chez les L3 après 96 heures d'alimentation sur le lapin intoxiqué. Un pic de diazépam est obtenu dans les tissus des larves âgées de 120 heures (**0.0098 $\mu\text{g}/01\text{g}$**) pour diminuer de presque un tiers (**0.0063 $\mu\text{g}/01\text{g}$**) après 24 heures (chez les larves âgées de 144heures). Cette diminution peut s'expliquer par l'arrêt de l'alimentation et la poursuite du métabolisme et l'excretion du diazépam ; un comportement qui caractérise la deuxième phase du stade L3 (Anderson, 2000). Dans les pupes, une concentration moins importante (**0.0032 $\mu\text{g}/01\text{g}$**) est détectée et signifie qu'une quantité de diazépam a été accumulée et fixée le tégument des larves qui s'est par suite endurci pour contenir les pupes, ce qui a empêché son élimination. Cette fluctuation est schématisée par la figure n° 24.



Les chromatogrammes de diazépam de l'analyse toxicologique des larves et pupes de *Calliphora vicina* sont donnés dans les annexes (II, 2.2-a)

b- *Calliphora vomitoria*

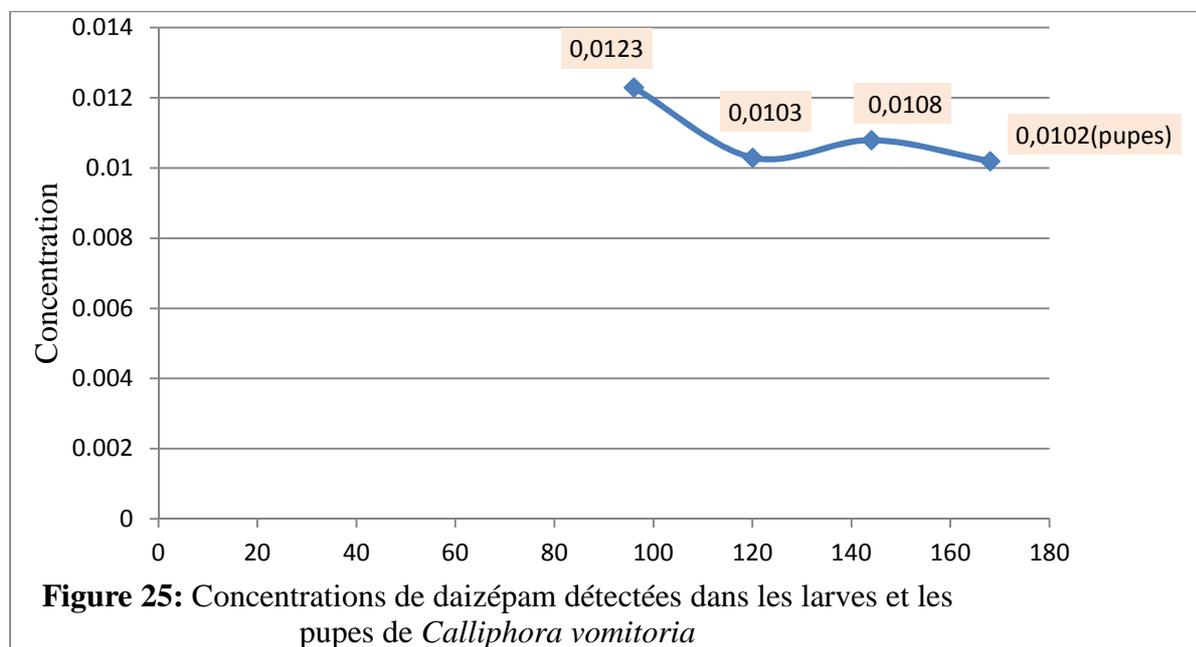
L'examen de l'analyse toxicologique des larves et des pupes de *Calliphora vomitoria* durant les différentes périodes est positif. Différentes concentrations de diazépam ont été détectées et les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Les concentrations de diazépam dans les larves et les pupes de *C. vomitoria*.

Stade développement	Temps (heures)	Concentration ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L3	96	0.0123
	120	0.0103
	144	0.0108
Pupes	168	0.0102

Les concentrations détectées dans les larves ainsi que dans les pupes sont presque identiques. Ceci signifie que la quantité de la nourriture consommée est très élevée durant les différentes périodes. La concentration la plus élevée est détectée dans les larves L3 âgées de 96 heures (**0.0123 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve**) pour qu'elle diminue après 120 heures (**0.0103 $\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve**) puis augmente à nouveau (**0.0108 $\mu\text{g}/$ de larve**) après 24 heures (larves âgées de 144 heures). Cela implique que les taux d'accumulation chez cette espèce

dépassent les taux d'excrétion, ce qui a été prouvé par la présence d'une quantité importante de ce produit dans les pupes aussi (**0.012 µg/01g de larve**). Les résultats sont représentés dans la figure suivante .



Les chromatogrammes de diazépam de l'analyse toxicologique des larves et pupes de *Calliphora vomitoria* sont donnés dans les annexes (II, 2,2-b).

c- *Chrysomia albiceps*

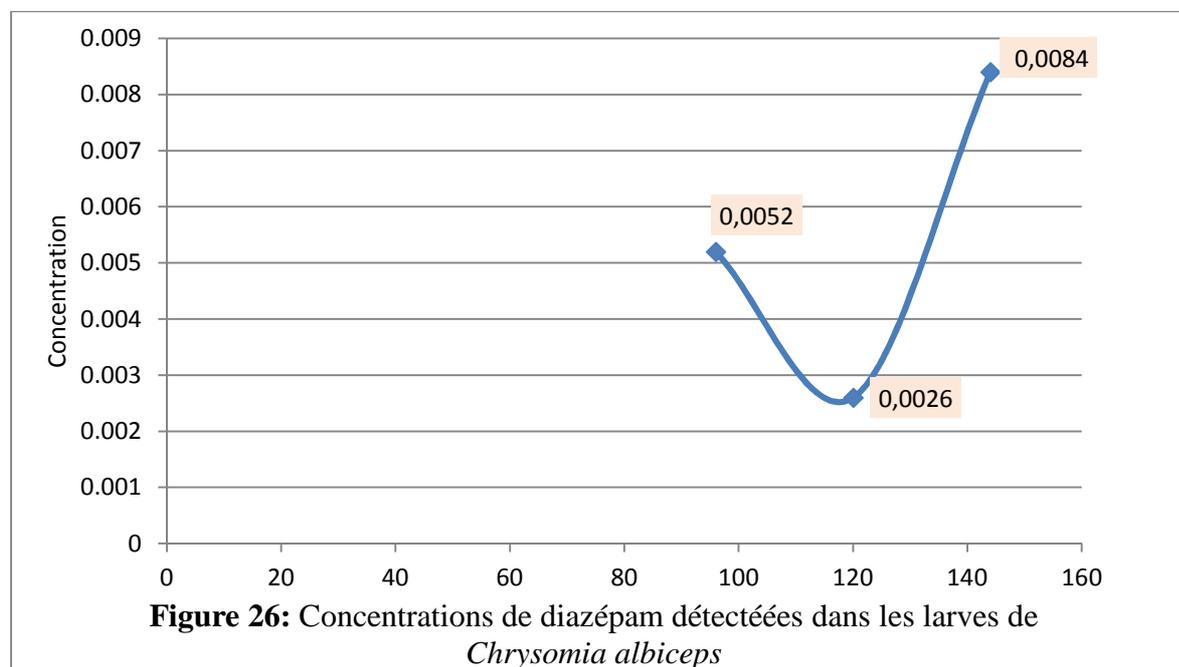
L'examen de l'analyse toxicologique des larves de *Chrysomia albiceps* durant des périodes différentes est positif. Différentes concentrations de diazépam sont détectées dans les larves de troisième stade (L3). Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Les concentrations de diazépam dans les larves de *C.albiceps*.

Stade développement	Temps (heures)	Concentration (µg/01g de larve)
L3	96	0.0052
	120	0.0026
	144	0.0084

Les concentrations détectées dans les larves (L3) sont différentes, nous enregistrons un seuil minimal de **0.0052 µg/01g**, pour diminuer de moitié (**0.0026 µg/01g**) après 24 heures (larves âgées de 120 heures). Cette diminution peut s'expliquer par la poursuite du métabolisme et l'excrétion du diazépam, Un pic de diazépam est détecté dans les tissus de

larves âgées de 144 heures (**0.0084 µg/01g**). Ceci signifie que l'alimentation est devenue importante et, par conséquent l'accumulation du produit est élevée. Cette fluctuation est schématisée par la figure n° 26.



Les chromatogrammes de diazépam de l'analyse toxicologique des larves de *Chrysomia albiceps* sont donnés dans les annexes (II, 2.2-c).

d- *Lucilia sericata*

L'examen de l'analyse toxicologique est positif. Une seule concentration de diazépam a été détectée dans les larves de troisième stade (L3), tandis que les résultats sont négatifs durant les périodes allant de 96 à 120 heures vu la quantité insuffisante de larves testées. Le tableau 12 illustre les résultats obtenus.

Tableau 12 : Les concentrations de diazépam dans les larves de *L.sericata*.

Stade de développement	Temps (heures)	Concentration (µg/01g de larve)
L3	96	Négatif (QI)
	120	Négatif (QI)
	144	0.0081

QI :Quantité insuffisante(>01g).

Une concentration de **0.0081 µg/01g** de larve est obtenue chez les larves âgées de 144 heures, ce qui indique que le produit est accumulé dans les larves durant cette période en s'alimentant du substrat.

Parfois, il est possible de détecter la présence des médicaments sur lesquels les larves se sont nourries même avec des quantités inférieures à celles exigées à la réalisation des analyses toxicologiques et cela lorsque les taux d'accumulation dépassent considérablement les taux d'excrétion.

Le chromatogramme de diazépam de l'analyse toxicologique des larves de *Lucilia sericata* sont donnés dans les annexes (II, 2.2-d).

Dans la figure 27, nous récapitulons les concentrations de diazépam dans les larves de stade L3 des quatre espèces.

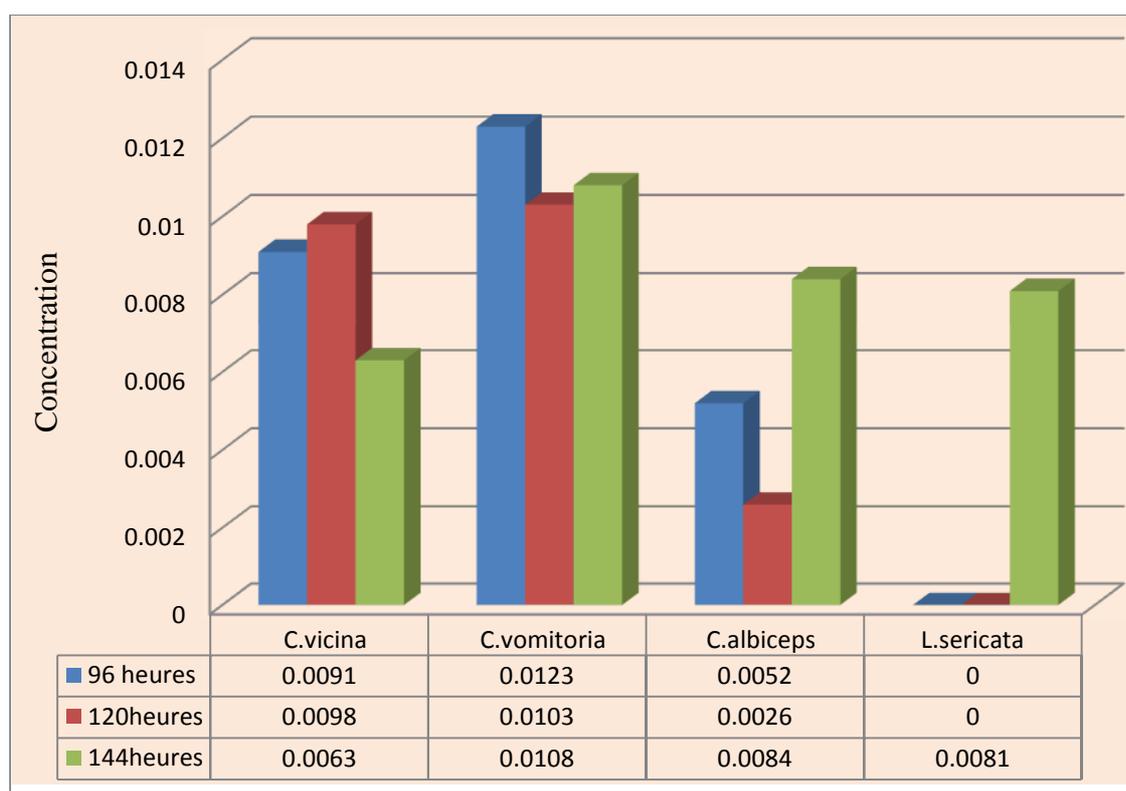


Figure 27 : Graphe récapitulatif des concentrations de diazépam dans les larves des quatre espèces.

D'après ce graphe, nous constatons que :

- Durant les trois périodes ; les larves de l'espèce *Clliphora vomitoria* présentent des concentrations plus élevées que les larves des autres espèces.

- Durant les périodes de 96 heures et 120 heures ; les concentrations détectées chez les larves de *Calliphora vicina* sont plus élevées que celles détectées chez les larves de *Chrysomia albiceps* . Par contre ,nous observons le contraire durant la période de 144 heures.
- Durant la période de 144 heures , la concentration de diazépam dans les larves de l'espèce *Lucilia sericata* est plus élevée que chez les larves de *Calliphora vicina* et elle est presque la même que celle détectée chez les larves de *Chrysomia albiceps*.

D'après ces résultats , nous pouvons conclure que :

- o Les taux d'accumulation dépassent les taux d'élimination (d'excrétion) chez les quatre espèces de Calliphoridae.
- o Les larves de 2^{ème} stade sont fiables pour la detection de diazépam dans les tissus entomologiques.
- o Les concentrations détectées dans les larves de stade L2 sont plus élevées que celles détectées dans les larves L3 ainsi que les pupes.
- o Les larves de 3^{ème} stade des quatre espèces sont fiables pour la detection de diazépam dans les tissus entomologiques.
- o Les pupes des deux especes (*Calliphora vicina* et *Calliphora vomitoria*) sont fiables pour la détection de diazépam dans les tissus entomologiques.
- o Le phénomène de la bioaccumulation des toxiques est plus accentué chez l'espèce *Calliphora vomitoria* dans les deux cas (larves et pupes).

Les médicaments et les toxiques peuvent être détectés dans les larves si leurs taux d'accumulations dépassent les taux d'éliminations. A ce jour, les explications données à ces processus restent incomplètes.il n'est compris ni comment ce phénomène se produit dans les asticots, ni comment ce dernier influence sur leur développement (Maria et de Carvalho, 2010). Cela explique la présence de diazépam dans tous les échantillons testés (larves et pupes).

3- Résultat de l'analyse toxicologique dans le sang par la CG-MS

Des analyses sont effectuées sur des échantillons du sang des deux lapins pour confirmer l'absence des substances similaires à celle de diazépam dans leur organisme. Le tableau 13 illustre les résultats obtenus.

Tableau 13: Les concentrations de diazépam dans le sang et les tissus des lapins.

Echantillon	Concentration
Sang du témoin	0mg/ml
Sang intoxiqué	0.0408 mg/ml (40.8 µg/ml)

Les chromatogrammes de diazépam de l'analyse toxicologique des tissus et de sang sont donnés dans les annexes (II 3- a, b et II-4).

Une concentration de **0.0408 mg/ml** est détectée dans le lapin intoxiqué contrairement au lapin témoin (0 mg). Cela implique qu'aucune substance similaire à celle de diazépam n'est présente dans le sang du lapin. Les concentrations de diazépam détectées dans les larves sont celles que nous avons injectées.

4- Comparaison de la concentration du diazépam détecté chez les larves et dans les tissus

Une analyse toxicologique est réalisée sur de tissus de lapin intoxiqué par la même technique d'analyse appliquée aux larves afin de la comparer aux doses détectées dans ces dernières pour déterminer l'éventuelle relation quantitative. Le tableau 14 illustre les résultats.

Tableau 14 : Tableau comparatif des concentrations détectées chez les larves et dans les tissus.

Concentration ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve-Tissu)					
Larves du 3 ^{ème} stade (L3)					Larves du 2 ^{ème} stade (L2)
Echantillons entomologiques	<i>Calliphora vicina</i>	0.0091	0.0098	0.0063	Mélange de larves
	<i>Calliphora vomitoria</i>	0.0123	0.0103	0.0108	
	<i>Lucilia sericata</i>	QI	QI	0.0081	
	<i>Chrysomia albiceps</i>	0.0052	0.0026	0.0084	
Tissus	7.5				0.0191

Dans cette étude, les concentrations de diazépam dans les tissus utilisés comme source alimentaire sont significativement plus élevées que celles de tous les asticots analysés. Ceci est corrélé avec le métabolisme et l'élimination des toxiques par les larves.

Comme l'ont noté plusieurs auteurs (Introna *et al.*, 1990; Sadler *et al.*, 1995; Hédouin *et al.*, 2001), les insectes métabolisent et éliminent les substances ingérées pendant leur développement.

○ **Résultat du teste statistique (Comparaison du plusieurs valeurs à un standard**

Comparaison de moyennes à un standard (constante) (Feuille de données1)								
Variable	Moyenne	Ec-Type	N	Erreur-T	Valeur de Référence	Valeur t	dl	p
Var1	0,006908	0,004154	12	0,001199	7,500000	-6248,37	11	0,00

Les résultats de l'ensemble montrent une différence significative dans la croissance larvaire en ce qui concerne la concentration de diazépam ingérée par les larves ($P < 0.05$).

Diverses études montrent que l'accumulation d'un médicament dans les larves est imprévisible et les extrapolations quantitatives sont peu fiables (Sadler *et al.*, 1995).

5- Effet de diazépam sur le taux de croissance larvaire des diptères calliphoridae

Dans cette étude, il a été démontré d'une manière générale que les larves nourries sur un produit alimentaire contenant le diazépam (30mg/kg) ont affichée un taux de croissance plus lent que les larves nourries sur l'échantillon témoin (0mg/kg). Les résultats sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : tableau comparatif des stades de développement des larves collectées sur les deux carcasses dans les mêmes périodes.

Temps (Heures)	Stade de développement	
	Lapin intoxiqué	Lapin témoin
24	L1	L1
48	L1	L1 + L2
72	L1 + L2	L3
96	L2 + L3	L3
120	L3	L3 + Pupes
144	L3 + Pupes	Pupes
168	Pupes	Pupes

D'après ce tableau, nous constatons que le taux de croissance larvaire diffère selon la présence ou l'absence de toxine dans les tissus entomologiques ; la croissance larvaire chez le lapin intoxiqué est plus lente que chez le lapin témoin. Ce qui est remarqué après 48 heures avec l'apparition du 2^{ème} stade larvaire pour le lapin témoin tandis que ce dernier n'est survenu qu'après 72 heures qui correspond chez le lapin témoin au stade L3.

Nous observons aussi que les pupes sont apparues après 120 heures chez le témoin, par contre ces dernières sont observées après 144 heures. Cela signifie que le diazépam a un effet sur le taux de croissance larvaire et dans ce cas il ya allongement du cycle de développement et par suite, cela peut induire à une mauvaise estimation de l'IPM.

Généralement, dans cette étude, le diazépam a un effet sur le taux de croissance larvaire, il a ralenti (retardé) le cycle de développement.

Un autre domaine important de l'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'ante-mortem de divers médicament et toxines peut avoir un impact sur le taux de développement de la mouche, entraînant une mauvaise estimation de l'intervalle post mortem (IPM) fondée sur le développement des insectes (Goff *et al.*, 1992, Bourel *et al.*, 1999).

Toutefois, le résultat obtenu à partir de ce travail contredit une étude réalisée par Carvalho *et al.* (2001) qui ont étudié l'effet de diazépam (nordiazépam) sur le développement de *Chrysomia putoria* (Diptère calliphoridae). Les larves de cette espèce sont élevées sur les tissus provenant de lapin administré de doses de diazépam et les résultats ont montré que les larves qui se sont nourries de tissu contenant le médicament se sont développées plus rapidement que les larves du témoin.

Par conséquent, on conclut qu'il est impossible de généraliser l'effet d'un même composé sur différentes espèces de la même famille de diptères nécrophages. L'effet des toxines sur le développement des différentes espèces d'insectes est donc très variable selon la substance, l'espèce et le stade de développement (Gosselin et Bourel, 2014).

Conclusion

Ce travail a été fait dans le but de déterminer la présence de diazépam dans les tissus de larves et de pupes de quatre espèces de diptères calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps* et *Calliphora vomitoria*) et de déterminer l'éventuelle relation quantitative entre la concentration du xénobiotique dans les larves et celle des tissus du lapin..

Cette étude consiste, également, à développer une méthode d'analyse pour détecter la présence de diazépam dans les tissus des insectes en utilisant la technique CG-MS.

La détection de diazépam est positive, les échantillons de larves et de pupes en contiennent bien différentes concentrations ; ce qui implique que le médicament s'accumule au cours de tout le cycle de vie des larves. Le diazépam peut être détecté dans les larves et les pupes des insectes à chaque fois que leurs taux d'accumulation dépassent le taux d'excrétion. Cette étude a démontré la fiabilité des larves et des pupes des espèces testées comme spécimens toxicologiques alternatifs pour la détection de diazépam. Cela conduit les entomologistes à proposer que les toxines sont accumulées dans les larves au fil du temps car ces dernières reçoivent une alimentation constante de toxique.

Les concentrations détectées dans les larves sont inférieures à la concentration détectée dans les tissus, les extrapolations quantitatives d'un médicament ou d'un toxique chez les larves sont peu fiables.

Par ailleurs, le diazépam semble affecter le développement larvaire, en particulier à partir du 2^{ème} jour (48 heures) de développement. La croissance des larves est en effet retardée par rapport au témoin. Ces résultats suggèrent que le diazépam et /ou son produit de dégradation influence le développement des larves de Calliphoridae. Ce qui peut constituer un moyen précieux comme un moyen pour l'estimation précise de l'IPM et aussi d'aider dans la résolution des crimes.

Perspectives :

- Refaire le travail en augmentant la population initiale de larves pour augmenter le volume de l'échantillon, et de commencer l'analyse toxicologique dès le 1^{er} stade larvaire.
- Multiplier le nombre de prélèvements des échantillons dans le temps inférieurs à 24 heures, voir toutes les 12 heures.
- D'autres espèces de Calliphoridae peuvent être soumises au protocole d'expérimentation.

-Refaire le travail en testant de différentes doses du xénobiotique.

- Refaire le travail en testant des différentes doses de xénobiotique sur chaque espèce à part et étudier son impact sur le cycle de développement de chaque espèce.

-Vu le volume de travail et la complexité du protocole, il est fortement recommandé de séparer les deux parties (effet du xénobiotique et l'analyse toxicologique) ou de mettre en place une équipe de deux groupes.

Références bibliographiques

- 1- **Amendt J; Krettek ; Zehner R.** (2004). Forensic entomology. *Natur wissens chaften* 91:51-65
- 2- **Amendt J; Goff ML; Campobasso CP; Grassberg M.** (2010). Current concepts in forensic entomology. *London, New-York: Springer.* 81-89.
- 3- **Anderson GS.** (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences.* 45 (4):824-832.
- 4- **Anderson GS.** (2001). Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. In *Forensic entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations* (ed. by J.H. Castner & J.L. Byrd). CRC Press, Boca Raton, FL. 143-169.
- 5- **Arnaldos MI ; Garcia MD ; Romera E ; Presa JJ and Luna A.** (2005). Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Science International.* 149: 57-65.
- 6- **Benecke M.** (2001). A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International.* 120:2-14.
- 7- **Benecke M.** (2007). Arthropods and corpses. *Forensic Pathology Reviews, Vol 2.* Totowa: Humana Press Inc. 207-240
- 8- **Bourbonnais G.** (2010). Cours sur les diptères du Cégep de Sainte Foy. 13-25
- 9- **Bourel B ; Hedouin VG ; Deveaux M ; Martin-Bouyer L ; Bécart A ; Tournel G ; Gosset D .** (1999). Effects of morphine in decomposition bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera :Calliphoridae). *Journal of Forensic Sciences* 44:354-358.
- 10- **Bourel B; Tournel G; Hedouin V; Goff ML & Gosset.D.** (2001). Determination of drug levels in two species of necrophagous coleoptera reared on substrates containing morphine. *Journal of Forensic Sciences,* 46, 600-603.

Références bibliographiques

- 11- Byrd JH; Castner JL.** (2001). Insects of Forensic Importance. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. *Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., CRC Press.* 43-79.
- 12- Byrd JH; Castner JL.** (2010). Insects of Forensic Importance. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2ème édition. 39-126, Florida: CRC Press.
- 13- Campobasso CP; Di Vella D and Introna F.** (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International.* 120:18-27.
- 14- Cartner DO; Yellewless D and Tibbet M.** (2007). Cadaver Decomposition in terrestrial ecosystems. *Natur wissens chaften.* 94:12-24.
- 15- 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 Science International.* 120:140-148
- 16- Charabidze D; Morvan G; Dupont D ; Gosset D et Bourel B.** (2008). ForenSeek: un programme de simulation du développement des insectes nécrophages dédié à l'entomologie médico-légale. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.),* (3): 385-392.
- 17- Dayananda R ; Kiran J.** (2013). Entomotoxicology. *International Journal of Medical Toxicology and Forensic Medicine,* 3 (2): 71-74.
- 18- Dekeirsschieter J.** (2007). Etude des odeurs émises par des carcasses de porc (*Sus domesticus* L.) en décomposition et suivi de la colonisation postmortem par les insectes nécrophages. *Mémoire Bio-ingénieur en Nature, Eaux et Forêts, faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux.* 26.
- 19- Dekeirsschieter J ; Verheggen F ; Frederickx C ; Marlet C ; Lognay G et Haubruge E.** (2009). Comment les insectes communiquent-ils au sein de l'écosystème –cadavre, L'écologie chimique des insectes nécrophages et nécrophiles. *Faunistic Entomology,* 65 : 3-13.

Références bibliographiques

- 20- 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. 3-13.
- 21- Frederickx C.; Dekeirsschieter J; Verheggen FJ et Haubruge .E.** (2011). L'entomologie forensique, les insectes résolvent les Crimes.*Faunistic Entomology*, 63 (4) : 237-249.
- 22- Gaudery E.** (2002).Eight squadrons for one target : the fauna of cadaver described by J.P.
- 23- Gangliano-Candela R. Aventaggiato L.** (2001). The detection of toxic substences in entomological specimens. *International Journal, Legal Medecine* 114:197-203.
- 24-Gennard D E.**(2007) .Forensic entomology: an introduction. Chichester: Wiley.
- 25-George KA; Archer MS; Green LM; Conlan XA and Toop T.**(2009). Effect of morphine on the groxth rate of *Calliphora stygia* (Fabricius) (Diptera Calliphoridae) and possible implications for forensic entomology .*Forensic Science International*,193:21-25.
- 26-Goff ML; Omori AI; Goodbrod JR.**(1989).Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisica peregrina* (Diptera:Sarcophagidae). *Journal Medical Entomology* 26:91-93.
- 27-Goff MI; 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. *Journal Forensic Science* 37:867-872.
- 28-Goff ML; Lord DL.**(1994). Entomotxicology,a new area for forensic investigation.*Journal for Med Pathology* 15:51-57.
- 29-Goff ML; Lord DL.** (2001). Entomotxicology: Insects as Toxicological Toxicological Indicators and the Impact of Drugs and Toxins on Insect Development. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. Edition: Jason .H.,Byrd, James. L, Castner, USA. 331- 340.

Références bibliographiques

- 30- Grassberger M; Friedrich E; Reiter C.** (2003). The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *Int J Legal Med*, 117: 75–81.
- 31-Gosselin M et Bourel B.** (2014). Apports à l'expertise judiciaire: état de l'art et perspectives. (Chapitre 14) p 195-207. *In* Charabide.D ; Gosselin.M.(eds), Insectes,cadavres, et scènes de crime .Principes applications de l'Entomologie Médico- Légale. Editeur de Boeck.280.
- 32-Greenberg B et Kunich JC.**(2002).Entomology and the law: Flies and forensic indicators.Cambridge: Cambridge university press.
- 33- Haskell NH; Hall RD ; Cervenca VJ and Clark.M A.**(1997).”on the body:Insects lifestage presence and their postmortemartifacts”In forensic taphonomy:the postmortem fate of human remains edited by Haglend,WD. and Sorg M H,Boca Raton,FL:CRC press limited.pp.415-448.
- 34- Hajslova J; Cajka T.** (2007). Gas chromatography–mass spectrometry (GC– MS).
- 35- Héduin V ; 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 science*,46 (1):12-14.
- 36-Introna F; Lo Dico C; Caplan YH ; Smialek JE.**(1990).Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *JForensic Sci* 35:118-122.
- 37- Introna F;Campobasso CP; Goff M.L.** (2001). Entomotoxicology.*Forensic Science International*, 120: 42-47.
- 38-Kapil V; Rejeet P.MP.** (2013). Assessment of Post Mortem Interval, (PMI) from Forensic Entomotoxicological Studies of Larvae and Flies. *Entomol Ornithol Herpetol*, 2: 104.

Références bibliographiques

- 39-Kharbouche H; Augsburger 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. International Journal of Legal Medicine(2008). 26-39
- 40-Kintz P; Traqui A and Mangin P.** (1990).Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. J. Forensic .Sci Soc 30:243,246.
- 41-Leclercq M.**(1978),Entomologie et médecine légale: datation de la mort:J.Med.Leg.;28 :271-278.
- 42-Maria L et de Carvalho L.** (2010).Toxicology and forensic entomology, chapitre 9 *In* Amendt J; Goff M L, Campobasso C P et Grassberg M(Editors).Current Concepts in Forensic Entomology edition Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York. 22-24
- 43-Mignault M P.** (2004).Bulletin de la société d'entomologie du Québec, Antennae, vol11 n° (3) :52-56
- 44-Miller M L; Lord W D ; Goff M L ;Donnelly D ; Donough M et Alex J C.**(1994).Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly pupariae (phoridae) and beetle exuviae(Dermistidae)associated with mummified human remains.J forensic sci 39:1305-1313.
- 45- Monthei DR.** (2009). Entomotoxicological and Thermal Factors Affecting the Development of Forensically Important Flies. A thesis for the degree of Doctor of Philosophy, the Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, p 14.
- 46-Moores C.F.A et Casale RS .**(1994).Age variation of Formation Stages for Ten permanent teeth.J.Dental Res.,42:1490-1502.
- 47- Nolte K B; Pinder R D; Lord W D.**(1992).Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. J forensic sci 37:1179-1185.

Références bibliographiques

- 48-Nuorteva S L .**(1982).The fate of mercury in Sarco saprophagous flies and in insects eating them.Ambio;11:34-37.
- 49- O'Brien C; Turner B.** (2004). Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. Int. J. Legal. Med., 118: 188-189.
- 50- Rognes K.** (1991).Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark.Fauna Entomologica Scandinavica 24:07-272.
- 51- Rivers DB; Dahlem GA.** (2014). The Science of Forensic Entomology, First Edition by John Wiley & Sons, Ltd, India, pp. 71- 78.
- 52-Salder D W; Fuke C; Court F et Pounder D J.** (1995).Drug accumulation in *Calliphora vicina* larvae.Forensic sciences International 71(3):191-197.
- 53- Singh D, Sharma B.R.**(200).F orensic entomology:A supplement to Forensic death investigation *JP AFMAT*; 8(1) :26-34.
- 54- Skoog D A; Holler F J; Crouch SR.**(2007).Principles of Instrumental Analysis.06th edition.Books/Cole Cengage Learning,Chapters 11,20,26,27.
- 55-Smith KGV.** (1986).Amanual of forensic entomology British Museum, Lodon.
- 56-Sohal R S; Lamb R E .**(1977).Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. J .Insect.Physiol;25:119-124.
- 57-Syed Zammer H et Khushnuma M,**(2007) GC-MS :Principle,technique and its application in Food Sciences.INT J CURR SCI ,13:116-126.
- 58- Szpila K; Matuszewski S; Bajerlein D; Konwerski S.** (2008). *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), a forensically important blowfly (Diptera: Calliphoridae) new for the Polish fauna. Polish journal of entomology, 77: 351-355.
- 59- Szpila K.** (2012). Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance Adult flies.*Forensic Science International*.46-53.

Références bibliographiques

- 60-Szpila K.** (2012). Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance third instars. *Forensic Science International*.24-29
- 61-Traqui A Keyser-Traqui C; Kintz P;Ludes B.**(2004). Entomotoxicolgy for the forensic Toxicologist : much about nothing, Int J Legal Med 118 :194-196.
- 62-Tomberlin JK;Mohr R; Benbow ME; Tarone AM & VanLaerhoven S.** (2011). A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. *AnnualReview of Entomology*, 56: 401–421
- 63-Wilson Z; Hubbard S and Pounder DG.**(1993).Drug analysis in fly Larvae . American Journal of Forensic Medecine & Pathology.14(2),pp 118-120.
- 64-Wood M ;Laloup M ; Pien K ;Samyn N ; Mouris M ; Maes RA ; De Bruijn EA ; Maes V ; De Boek G.**(2003). Developement of a Rapid and Sensitive Method for the Quantifacation of Amphetamines in Human Plsma and Oral Fluid by LC-MS-MS , Journal Analys Txicologic.,27 (2): 78-87.
- 65-Wyss C et Cherix D.**(2006).Traité d'entomologie forensique :les insectes sur la scène de crime, presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne,317p.
- 66-Zumpt F.** (1965) Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Text book for Physicians, Veterinarians and Zoologists. Butterworth, London.11-17.

Annexes

Annexe I : Photographique

1-Equipements

- a- **Cages** : des cages métalliques et protectrices ont été mises en place pour contenir les lapins. (deux cages pour chaque lapin).



Figure 01 : Cage métallique (60x40cm) Figure 02 : Cage protectrice (50x25cm)

Note : Les cages métalliques protègent les lapins des autres animaux carnivores et les rongeurs et les cages protectrices (construites avec un filet) empêchent le passage des insectes.

- b- **Stéréo-microscope Zeiss/Stemi 2000-C avec caméra** : Utilisée pour l'observation et l'identification des insectes (larves et des adultes) dont la capacité est de x100.

Annexes



Figure 03 : Le stéréo-microscope

- c- Enceinte climatique à température et humidité contrôlé(BINDER):** Une chambre utilisée pour l'incubation réglée à 24°C et humidité relative de 70%.



Figure04:L'enceinte climatique.

- d- Congélateur :** Utilisé pour la conservation de la viande (pour stimuler la ponte), et pour assommer les mouches adultes afin de leur transfert et leur identification.

Annexes

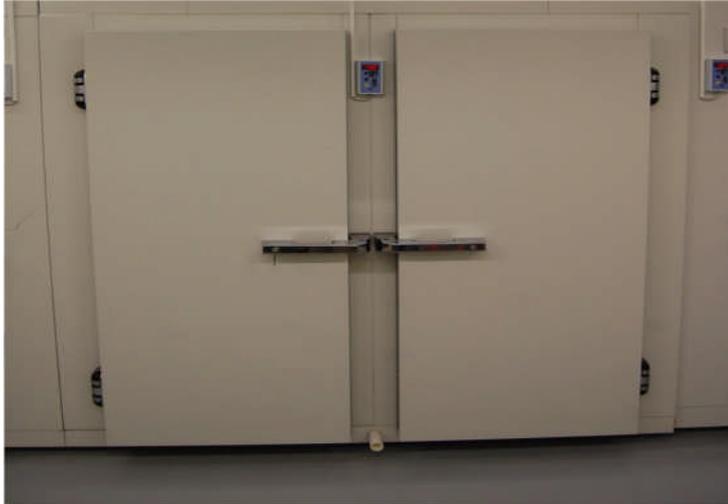


Figure05: Le minis frigo réglé à -20°C

e- **Un frigo** : Réglé à -5°C, utilisé pour la conservation des échantillons(les larves).



Figure 06 : Frigos réglé à -5°C.

Annexes

f- GC/MS : dispositif pour l'analyse toxicologique

Des déterminations analytiques pour la détection du valium 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 à spectromètre de masse D.S.Q.II THERMO.



Figure07 : GC/MS au niveau de laboratoire de toxicologie

2. Instruments

a- Piège pour la capture des insectes : c'est une boîte en plastique cubique grillagée avec un couvercle. Cette boîte a été couverte par un filet scellé, un appât a été mis à l'intérieur de piège (Des morceaux de viandes dans une boîte en plastique avec un couvercle en filet scellé).

Quatre entonnoirs ouverts vers l'extérieure permettent l'entrée des mouches, mais pas leur sortie.(Fabriqué par Mr Djedouani).

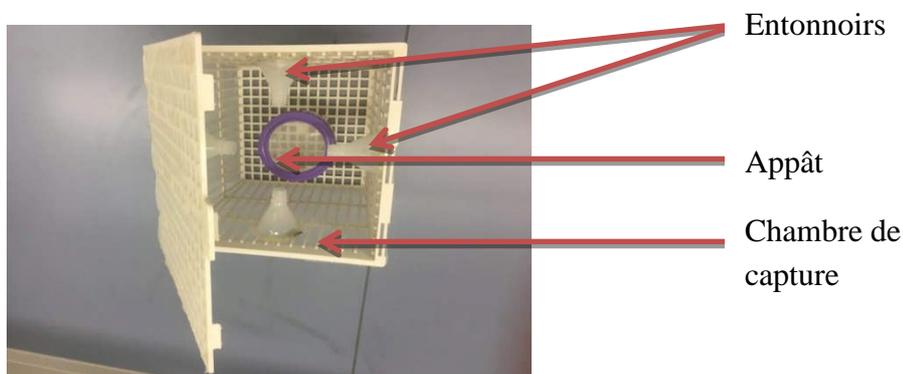


Figure08 : Schéma du piège attractif utilisé pour la capture des diptères nécrophages.

Annexes

b- Cages d'insectes : Utilisée pour l'élevage des mouches.



Figure09 : Cage de l'élevage des insectes avec les sources de l'alimentation

A dimension (60X34X53).

c- La boîte d'accouplement au moment de la stimulation de la ponte (Fabriqué par Djedouani,INCC).



Figure10 : La viande de bœuf déposée pour la stimulation de la ponte

d- Boîtes d'incubation : boîtes en plastique dont leur couvercle a été découpé pour la ventilation puis a été recouvert avec un filet à petites mailles pour éviter que les mouches ne s'enfuient.

Annexes

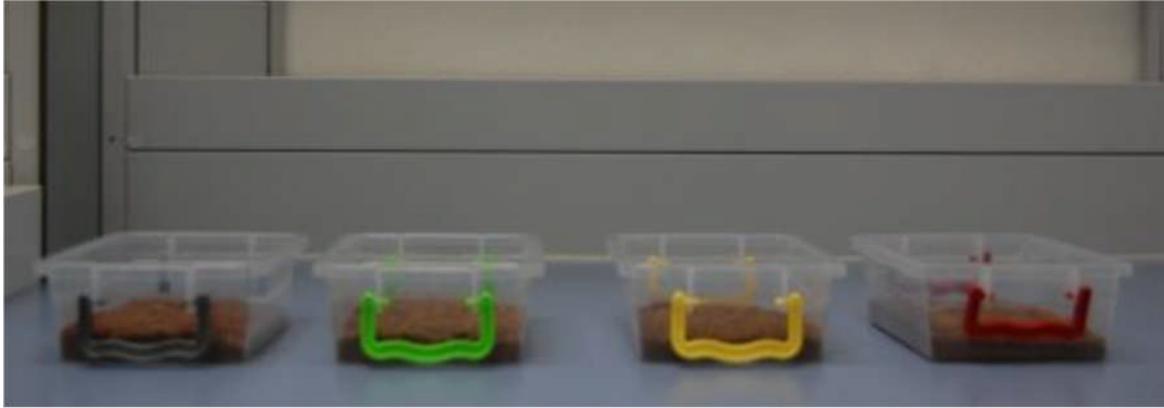


Figure 11 : les boites d'incubation.

e-**Le thermomètre** : Utilisé pour mesurer la température de l'eau.



Figure 12 : Le thermomètre

f- **Seringues** : Utilisées pour les injections intraveineuses 2,5 ml.



Figure13: Le matériel utilisé pour les injections (seringues, alcool, tubes de prélèvement sanguins).

3. Consommables

a- Pincettes jetables et flacons: Utilisées pour la récolte des larves et des pupes.



Figure14: Des pincettes jetables et des flacons.

b- Viande de bœuf : utilisée comme substrat nutritif alternatif pour l'attraction des mouches.



Figure15 : La viande de bœuf congelée.

c- Gants chirurgicaux, bavettes :



Figure16: Gants chirurgicaux et bavettes

4. L'échantillonnage

Le matériel de l'échantillonnage

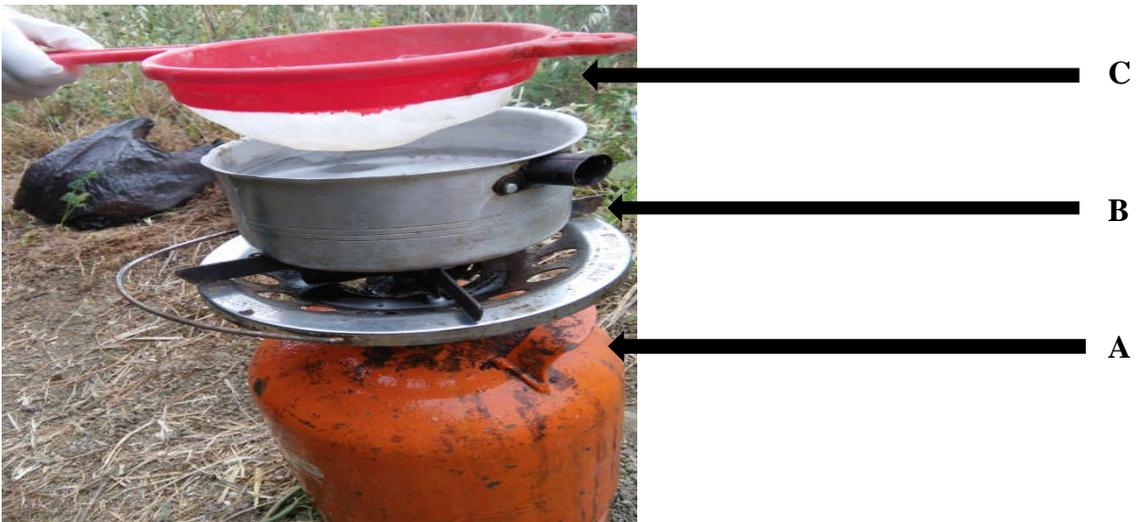


Figure17 : **A :** Une bouteille de gaz utilisée pour chauffer l'eau, **B :** Une casserole contenant de l'eau chaude pour tuer les larves, **C :** Une passoire ; utilisée pour retirer les larves. Les larves sont retirées à l'aide de pinces.

Annexes



Figure18: Tubes (flacons 13ml), chaque tube est muni d'une étiquette portant la date, l'heure et le nombre de prélèvement.

Annexes

Annexe II : Graphique

1-Les tableaux représentant les résultats des prélèvements

Tableau 01 : Résultats de quatrième prélèvement effectué le 28/05/2017

Stade larvaire	Poids (g)	Espèce	Concentration de diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L3	>1g	<i>Lucilia sericata</i>	Négatif
	<01g	<i>Chrisomya albiceps</i>	0,0091
	<01g	<i>Caliphora vomitoria</i>	0,0052
	<01g	<i>Caliphora vicina</i>	0,0123

Tableau 02 : Résultats de cinquième prélèvement effectué le 29/05/2017

Stade larvaire	Poids(g)	Espèce	Concentration de diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L3	<1g	<i>L. sericata</i>	Négatif
		<i>Chrisomya albiceps</i>	0,0098
		<i>C. vomitoria</i>	0,0026
		<i>C. vicina</i>	0,0103

Tableau03 : Résultats de sixième prélèvement effectué le 30/05/2017

Stade larvaire	Poids(g)	Espèce	Concentration de diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
L3	<1g	<i>L. sericata</i>	0,0081
		<i>Chrisomya albiceps</i>	0,0063
		<i>C. vomitoria</i>	0,0084
		<i>C. vicina</i>	0,0108

Annexes

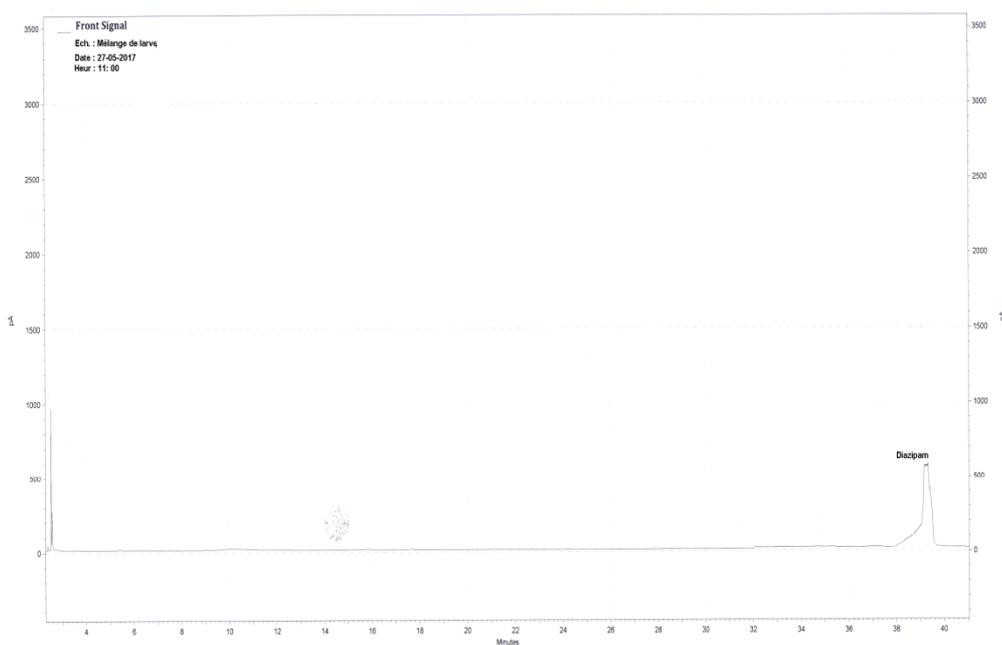
Tableau 0 4 : Résultats septième prélèvement effectué le 31/05/2017

Stade de développement	Poids(g)	Espèce	Concentration de Diazépam ($\mu\text{g}/01\text{g}$ de larve)
Pupes	<1g	<i>C. vomitoria</i>	0,0102
		<i>C. vicina</i>	0,0032

2- Les chromatogrammes de diazépam de l'analyse toxicologique des échantillons entomologiques

2.1- chromatogrammes de diazépam de mélange de larves de 2^{ème} stade larvaire

- Le 27-05-2017



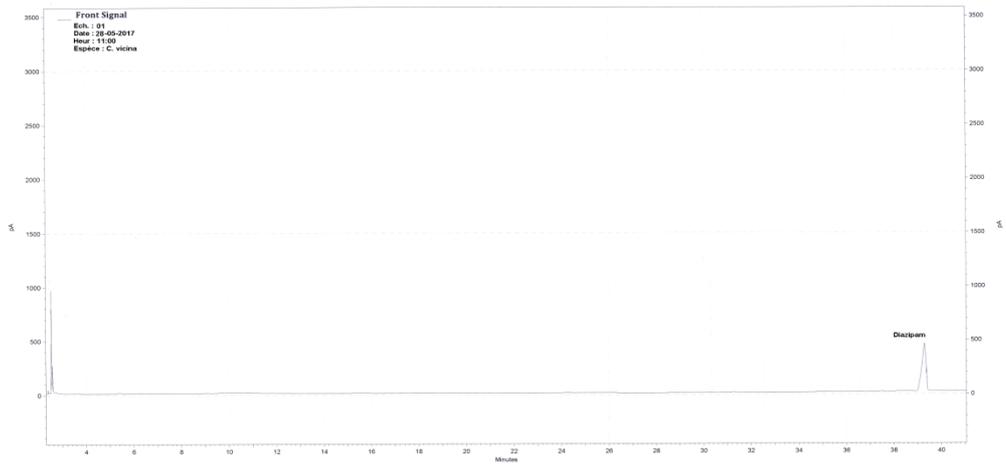
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

Annexes

2.2 - chromatogrammes de diazépam de larves de 3^{ème} stade larvaire

a - *Calliphora vicina*

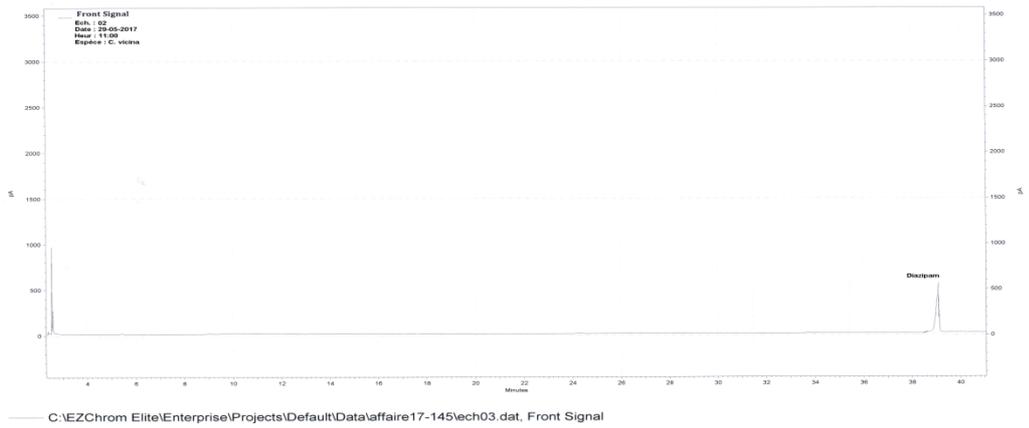
- Le 28-05-2017



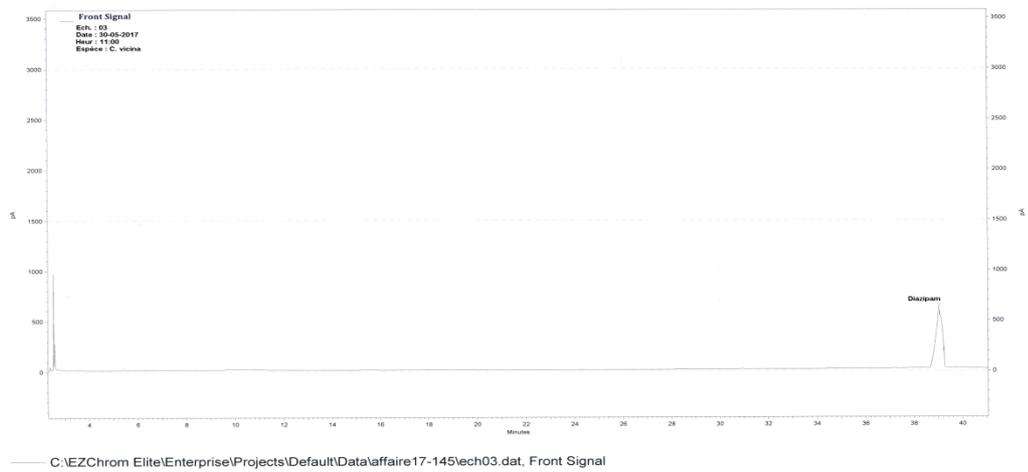
C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

- Le 29-05-2017

Annexes



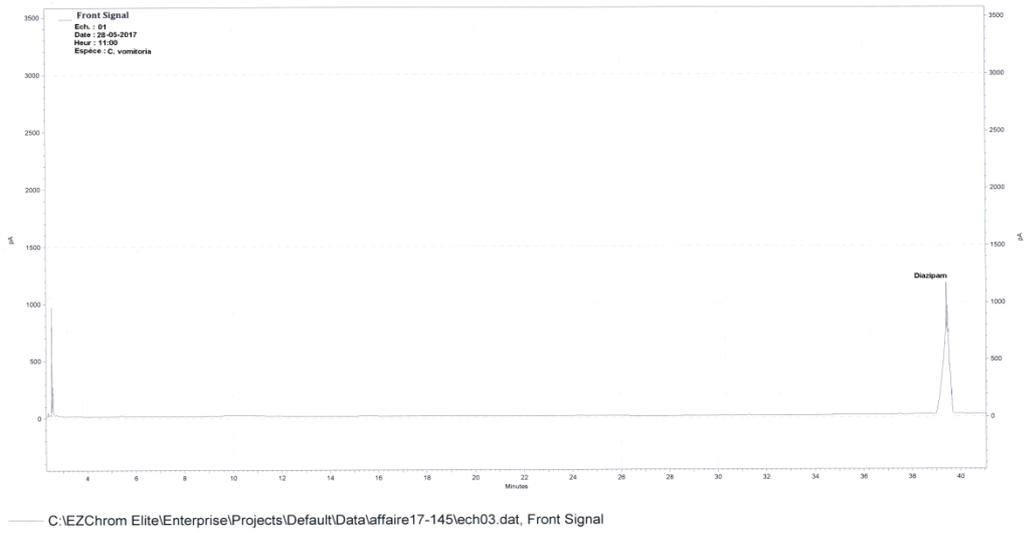
- Le 30-05-201



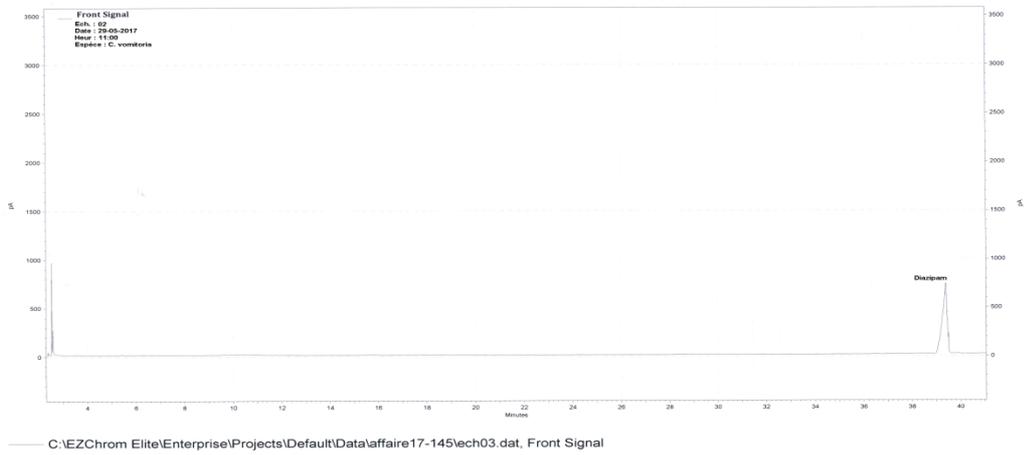
b- *Calliphora vomitoria*

- Le 28-05-2017

Annexes

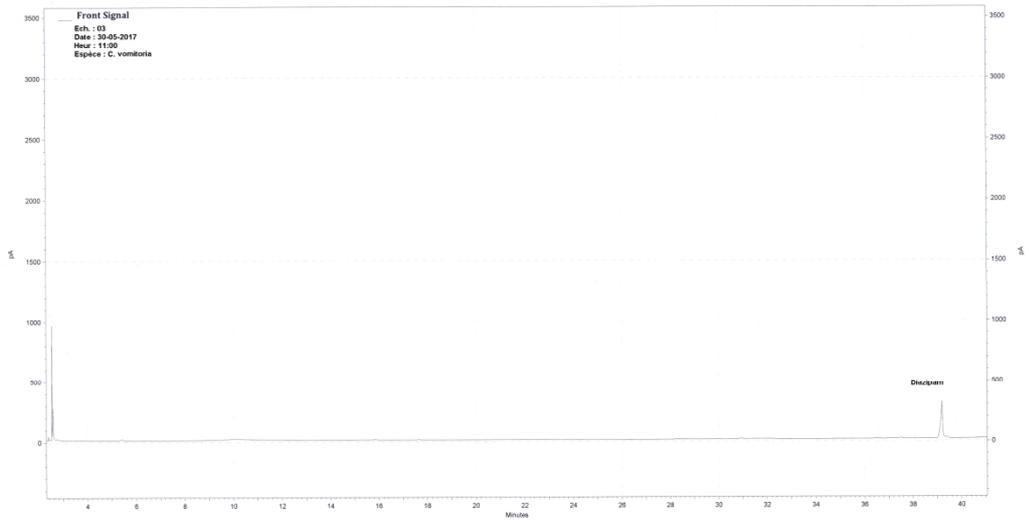


- Le 29-05-2017



- Le 30-05-2017

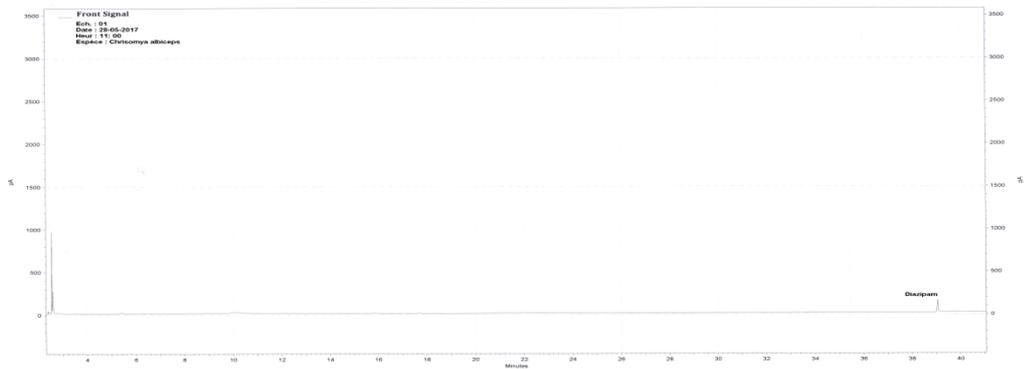
Annexes



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

c- Chrysomia albiceps

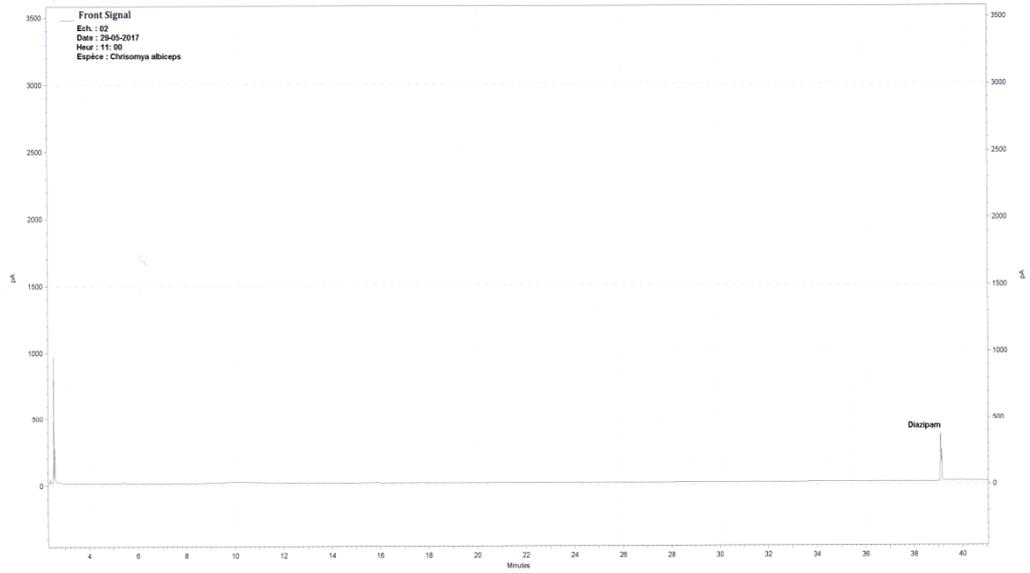
- Le 28-05-2017



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

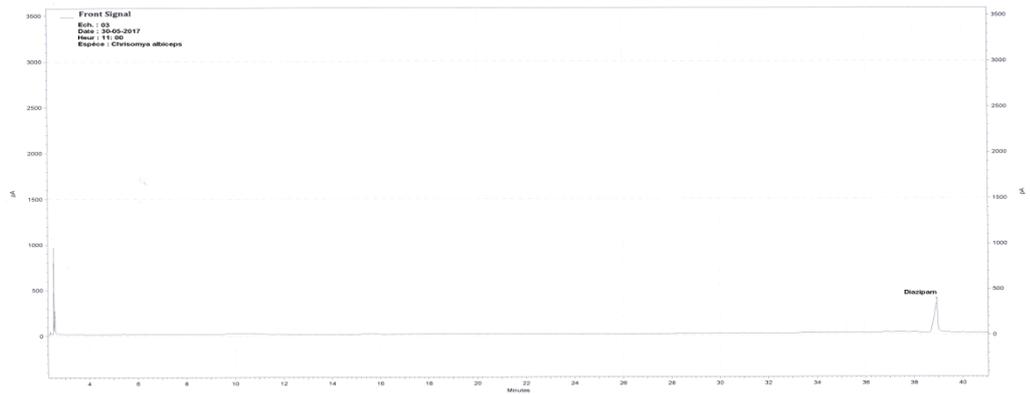
- Le 29-05-2017

Annexes



C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

- Le 30-05-2017

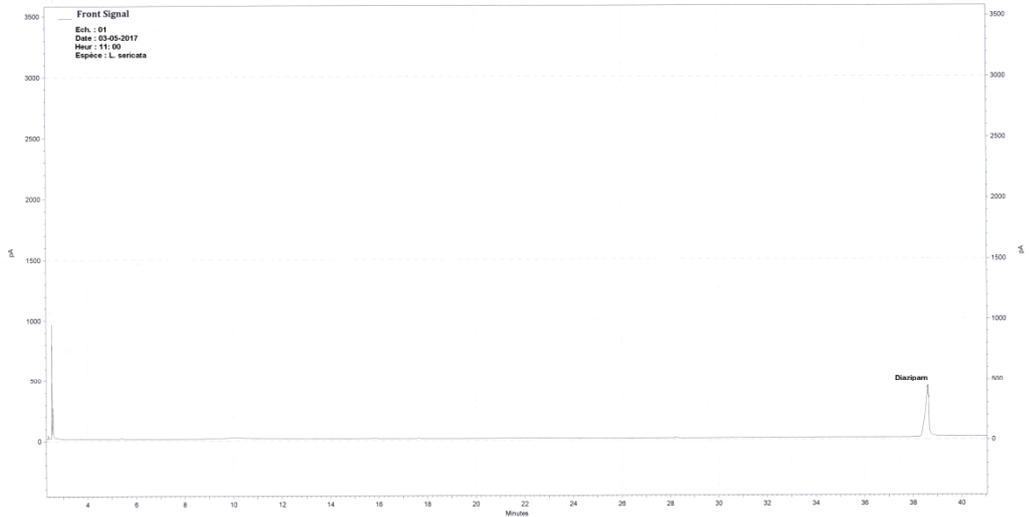


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Default\Data\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

d- *Lucilia sericata*

Annexes

- Le 30-05-2017

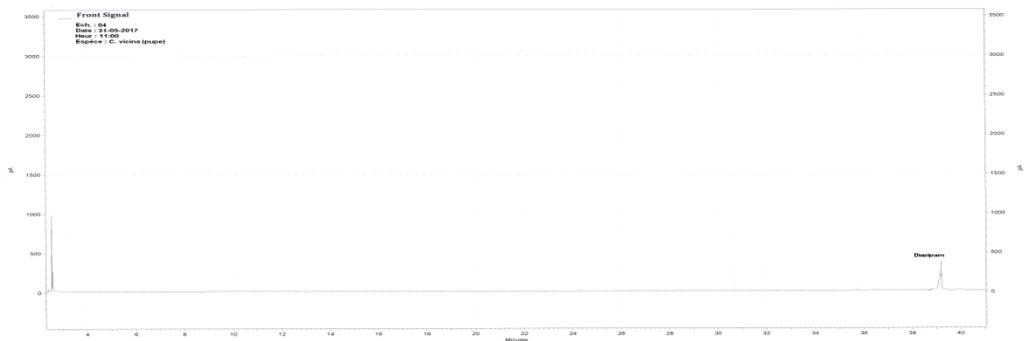


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\DefaultData\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

2.3- chromatogrammes de diazépam des pupes

a- *Calliphora vicina*

- Le 31-05-2017

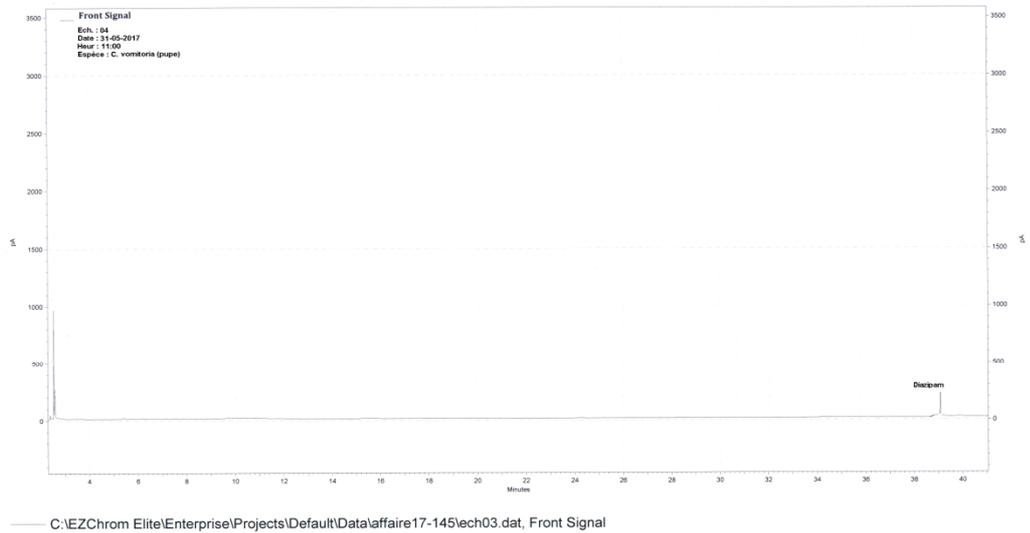


C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\DefaultData\affaire17-145\ech03.dat, Front Signal

Annexes

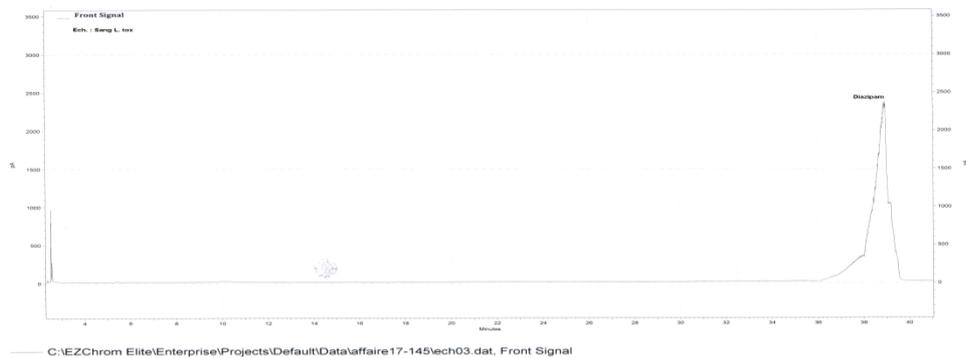
b- *Calliphora vomitoria*

- Le 31-05-2017



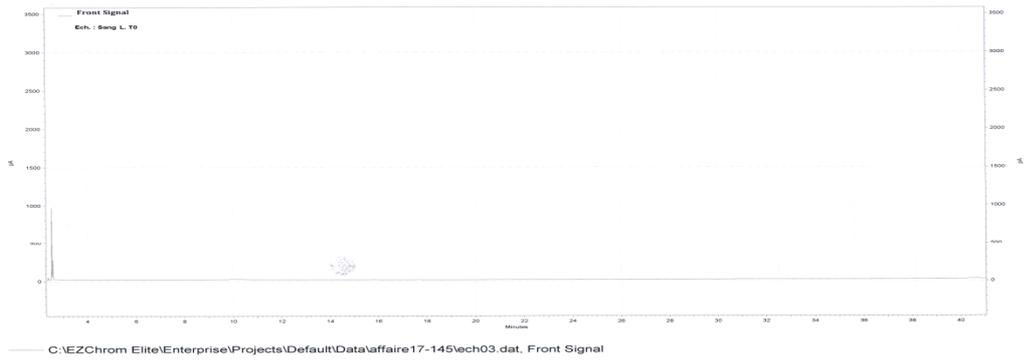
3- Chromatogramme de diazépam de l'analyse toxicologique du sang

a- Sang de lapin intoxiqué

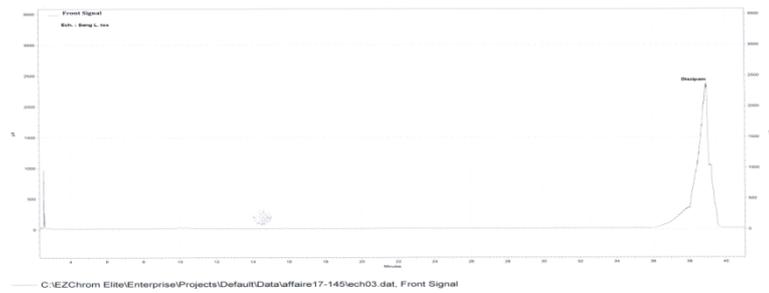


b- Sang de lapin témoin

Annexes



4- Chromatogramme de diazépam de l'analyse toxicologique des tissus



Annexes

Annexe III : Démonstrative

1. L'identification des espèces de Calliphoridae

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

Pour l'identification des larves, on a pris quelques-unes, tuées à l'eau chaude (>80°C). (Amendt *et al.*, 2007) puis observées au stéréo-microscope en utilisant les clés d'identification de Szpila ,2012».

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

- **L'identification des larves**

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

- **L'identification des adultes :**

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

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

- **L'identification des larves**

1. Abdominal segments of the larva without such protuberances 2

Annexes

2. Oral sclerite totally unsclerotised **10**
10. Spines with serrated tips on thoracic segments rare or absent, all spines small of similar size **12**
12. Distance between each P1 similar to distance between P1 and P2
. *Lucilia sericata*
- **L'identification des adultes :**
 1. Stem-vein without row of hairs above **2**
 2. Lower calypter without hairs on dorsal surface; thorax bright green metallic, rarely bluish or cuprous. . . . **15 (Luciliinae)**
 15. Katatergite bare or pubescent. . . . **16 (Lucilia spp.)**
 16. Basicosta bright yellow. **17**
 17. Posterior slope of humeral callus with 6–8 hairs surface of notopleuron between last notopleural seta and edge of notopleuron with 8–16 hairs ;central occipital area with 2–8 setulae (rarely 1) below each inner vertical seta. *Lucilia sericata* (Meigen, 1826)

 - La troisième espèce a été déterminée comme *Chrysomya albiceps* en suivant les critères si dessous :
 - **L'identification des larves :**
 1. Segments abdominaux de la larve avec de nombreuses protubérances charnues. *Chrysomya albiceps*
 - **L'identification des adultes :**
 1. Stem-vein with row of hairs above. **3 (Chrysomyinae)**
 3. Greater ampulla with stiff erect hairs dorsal surface of lower calypter with dense hairs. **4 (Chrysomya spp.)**
 4. Anterior spiracle bright, white-yellowish. . . . **8**
 8. Anterior wing margin transparent **9**
 9. Katepisternal setae 1+1 ;at least some hairs on lateral surfaces of tergite V white.
. **10**
 10. Dorsal part of thorax shiny, with little ;black transverse marginal abdominal bands on abdominal segments III and IV very narrow, up to about a quarter on segment III and usually not more than about one sixth in segment IV;posterior edge of tergite V of female with crevice/incision. **11**
 11. Third antennal segment wholly dark, blackish-brownish ; proepimeral seta absent (rarely present on one or both sides) *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819)

Annexes

- La quatrième espèce a été déterminée comme *Calliphora vomitoria* en suivant les critères si dessous :

- **L'identification des larves :**

- spines large, arranged separately (check on the thoracic segments).

- *Calliphora vomitoria*

- **L'identification des adultes:**

- postgena and lower part of genal dilation with orange hairs male genitalia on figs

- 40-43. *Calliphora vomitoria*.

Annexes

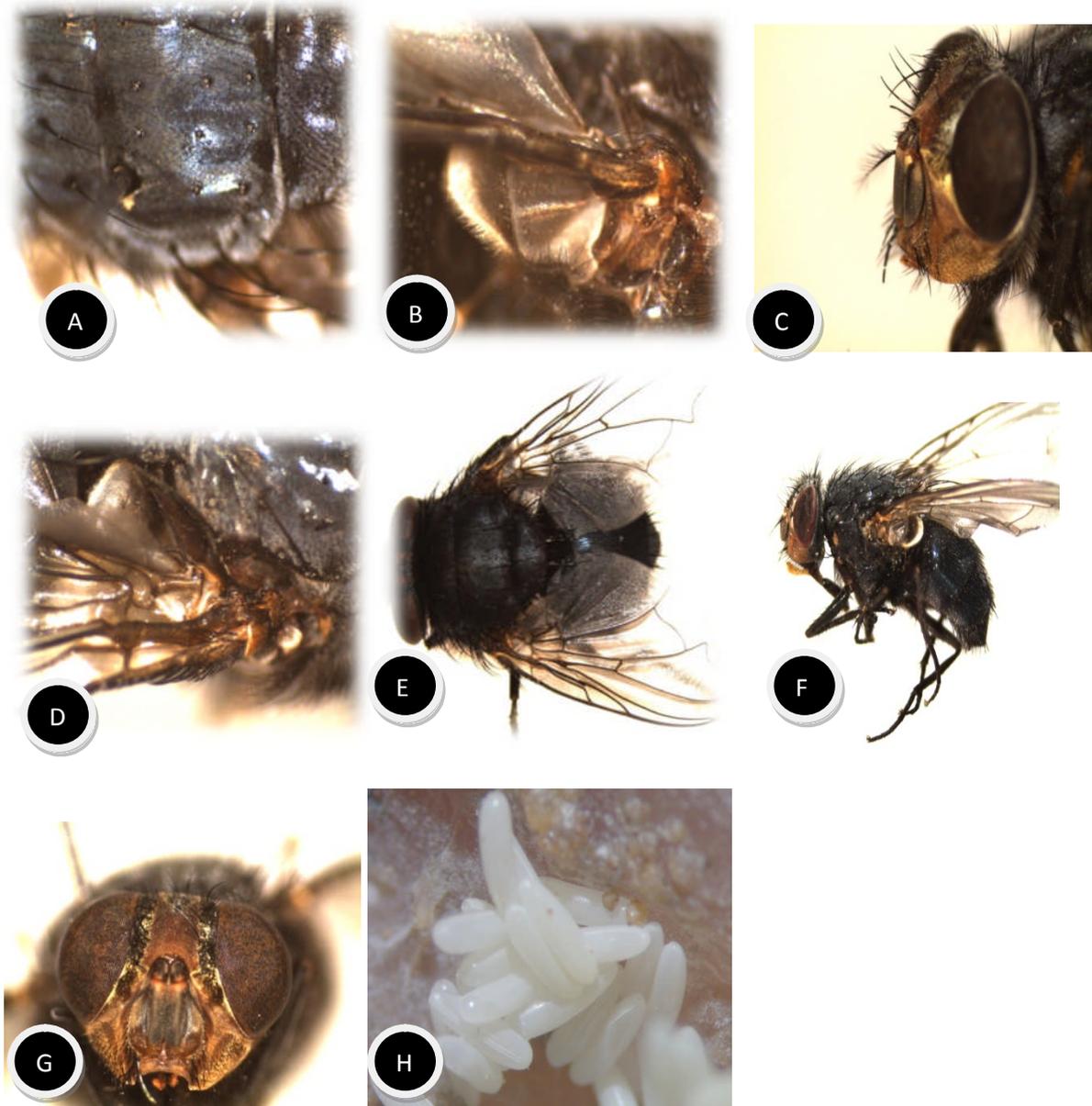


Figure 01 : Les critères d'identification pour la détermination des espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila, 2012).

A : Basicosta, B :Calyptères, C :Tête, D :Calyptères, E :*Calliphora Vicina* (Imago), F :Ailes, G :Yeux, H :œufs.

Annexes

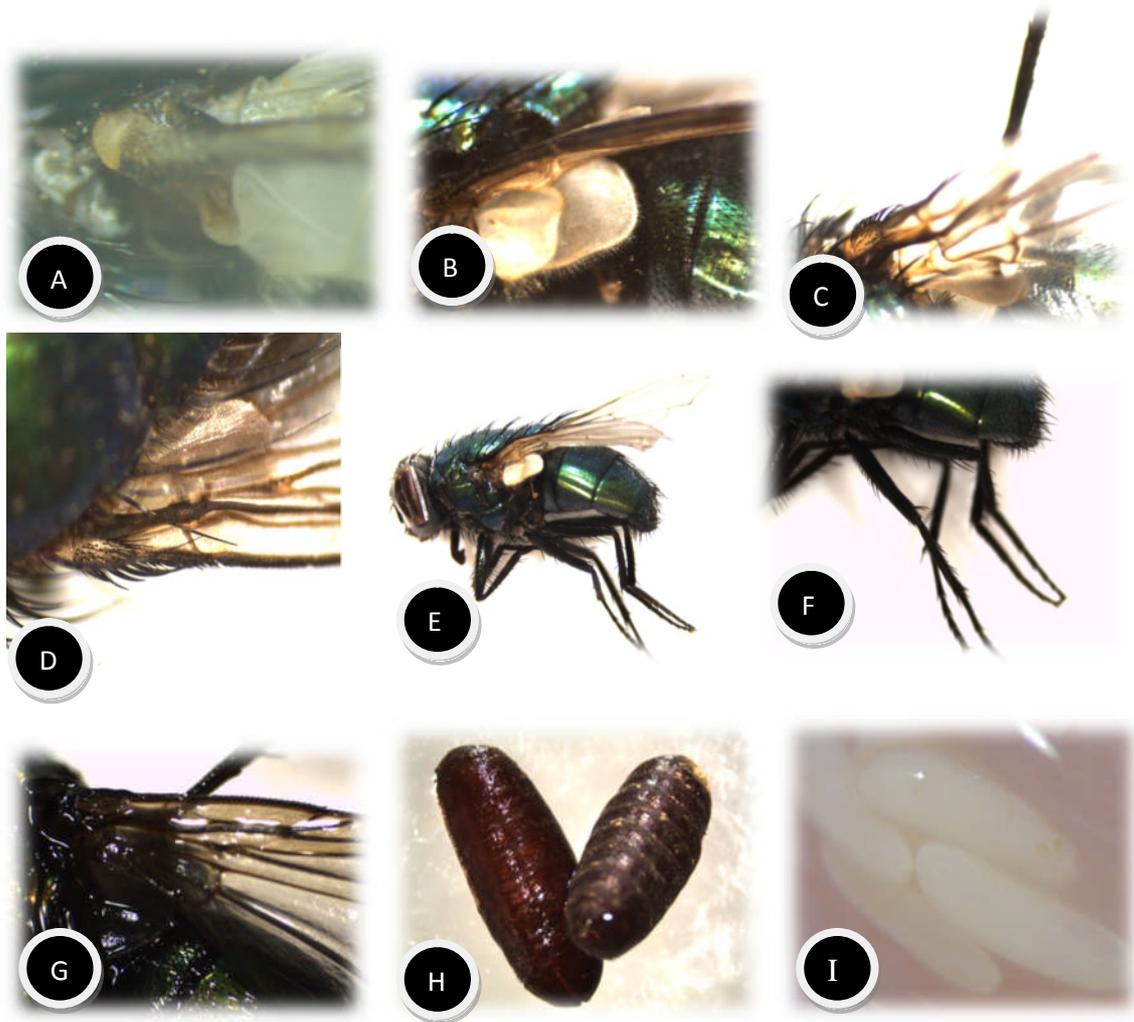


Figure02 : Les critères d'identification pour la détermination des espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila, 2012).

A : Basicosta , B :Calyptère ,C ,D : Steam vein ,E :*Lucilia sericata*(Imago) ,F : Pattes ,G : Steam vein ,H :Pupes ,I : Ouefs

Annexes

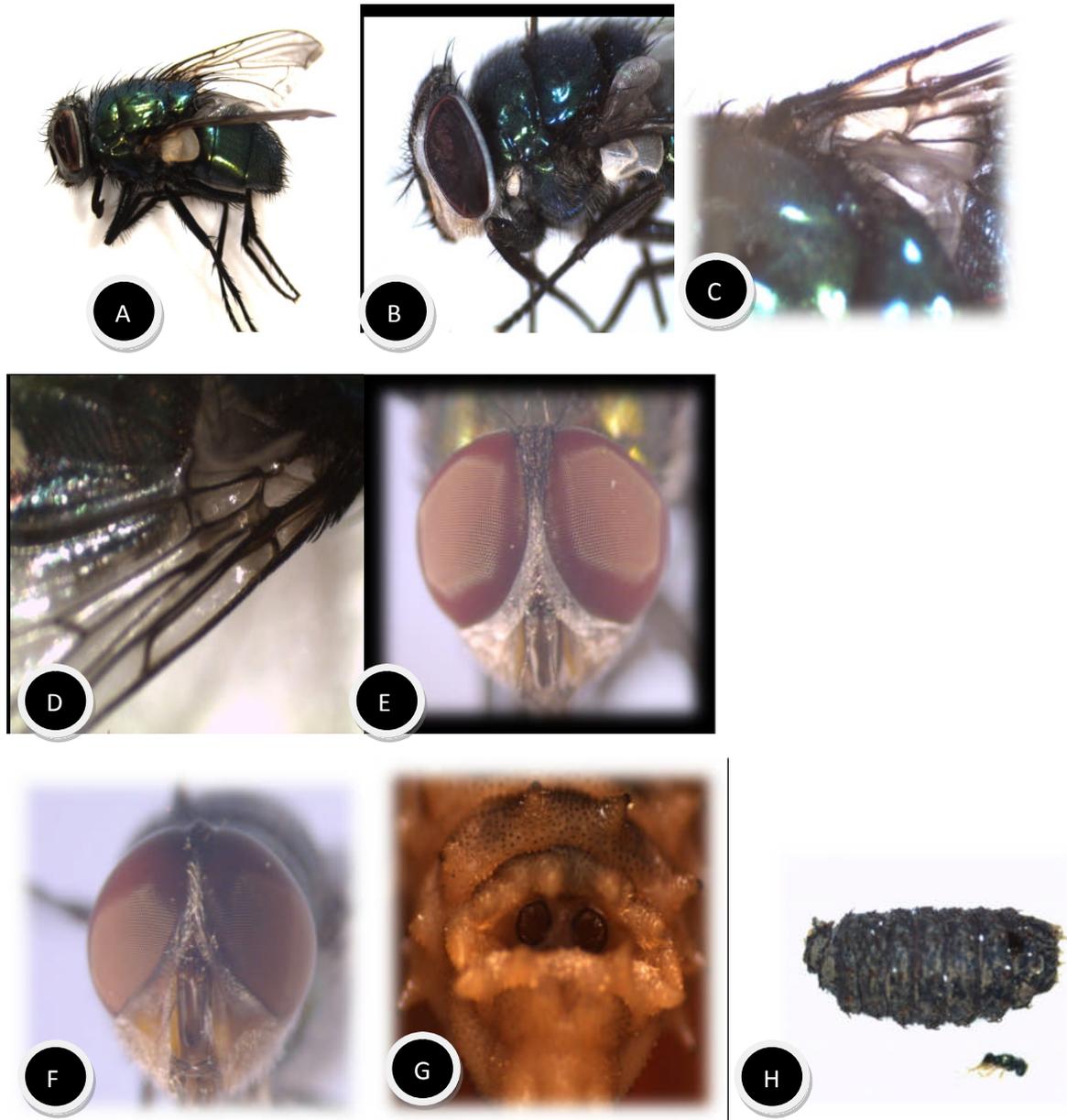


Figure03: Les critères d'identification pour la détermination des espèces de diptères d'importance médico-légale (Szpila, 2012).

A: *Chrysomya albiceps* (Imago), B :Spiracle thoracique, C,D: Steam vein, E,F:Yeux, G:Larve, H: Puppe.

Annexes

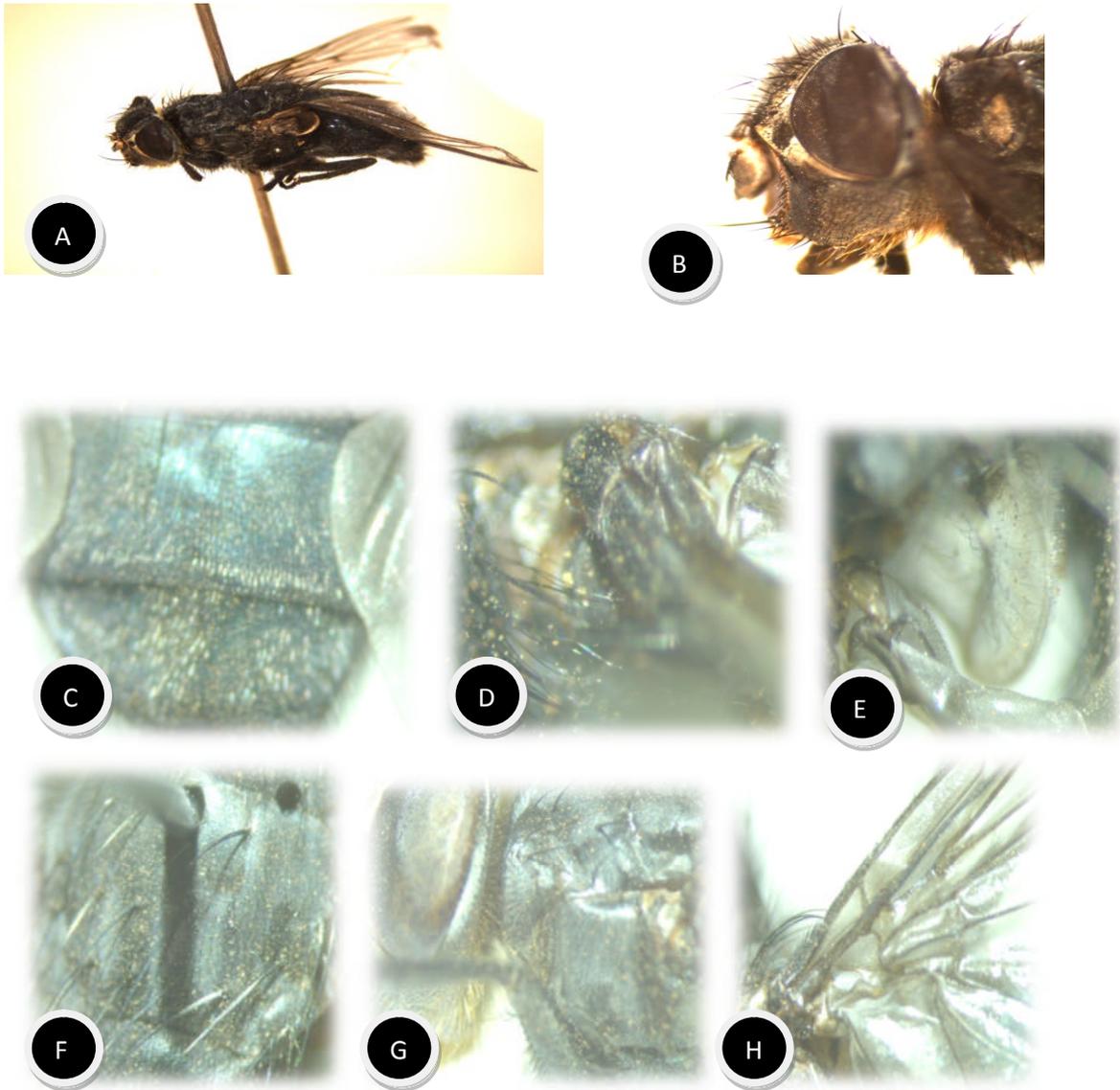


Figure04 : Les critères d'identification pour la détermination des espèces de Diptères de diptères d'importance médico-légale (Szpila, 2012).

A : *Calliphora vomitoria* (Imago), B :Yeux, C :Abdomen, D : Basicosta blak, E: Facial ridges moth edge and anterior part of genal dilation, F: Three pairs of achrostical bustles, G: Postgena and lower part genal dilation with orange hair, H: Steam vein.

Annexes

2. L'identification des stades larvaires

L'identification des différents stades larvaires a été faite par l'observation des spiracles postérieurs des larves sous le stéréo-microscope. Se sont les fentes de stigmates postérieurs qui permettent de déterminer le stade larvaire de l'individu : Une fente par stigmate pour le stade LI, deux pour LII et trois pour LIII.

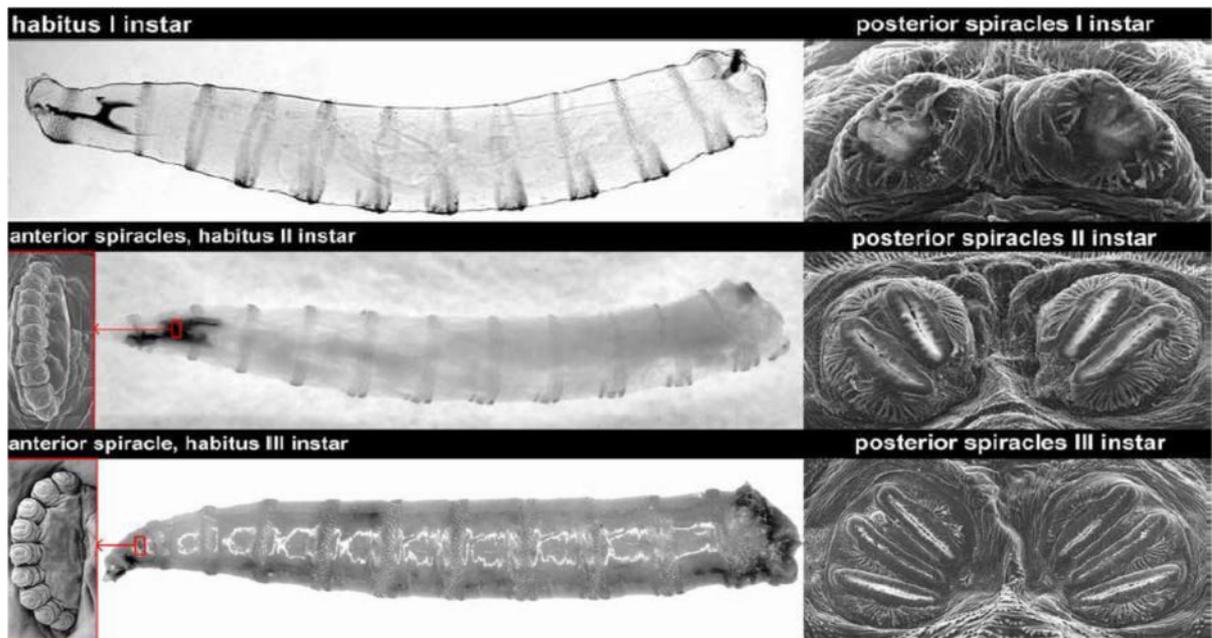


Figure 05: Critères de reconnaissance des différents stades larvaires ; I instar : L1, II instar : L2, III instar : L3 (Szpila 2012).

Glossaire

- **Ante-mortem** : avant la mort.
- **Astico-thérapie** : larvo-thérapie, désigne le soin apporté à une plaie des tissus mous par les asticots de diptères, principalement de la mouche verte (*Lucilia sericata*).
- **Analyte** : Substance chimique dont on cherche à connaître les propriétés.
- **Analgésique** : Les antalgiques ou analgésiques sont des médicaments utilisés en médecine dans le traitement de la douleur (antalgie ou analgésie) d'un patient.
- **Bioaccumulation** : désigne la capacité de certains organismes (végétaux, animaux, fongiques, microbiens) à absorber et concentrer dans tout ou une partie de leur organisme certaines substances chimiques, éventuellement rares dans l'environnement.
- **Cosmopolite** : trouvées dans tous les habitats.
- **Chitinisé** : constitué de chitine, comme pour la carapace des arthropodes.
- **Criminalistique** : Ensemble des techniques mises en oeuvre par la justice et les forces de police et de gendarmerie pour établir la preuve du crime et identifier son auteur (anthropométrie, médecine légale, toxicologie, etc.).
- **Diazépam (valium)**:Dérivé de la benzodiazépine utilisé pour son effet tranquillisant, myorelaxant et anticonvulsivant.
- **Euthanasie** : mort douce.
- **Exuvies** : Chez les arthropodes ou chez les vertébrés, l'exuvie est l'enveloppe (cuticule chitineuse ou peau) que le corps de l'animal a quittée lors de la mue ou de la métamorphose.
- **Forensique** (de l'anglais *forensic*) : terme désignant les sciences qui ont pour objet d'apporter des preuves objectives pour la justice.
- **Intervalle post-mortem** : le temps écoulé depuis la mort.
- **Nordiazépam** : est un métabolite de diazépam.
- **Pupaison** : Transformation d'une larve en nymphe, ou d'une nymphe en adulte à l'intérieur d'une puppe et le temps pendant lequel cette transformation s'effectue.
- **Poïkilothermes** : Les animaux à « sang froid » ou poïkilothermes, sont des animaux ayant une température corporelle qui varie avec celle de leur milieu (\neq homéothermes).
- **Toxicomane** : Qui souffre de la toxicomanie ; une habitude de consommer d'une façon régulière et importante des substances susceptibles d'engendrer un état de dépendance psychique et /ou physique.

-**Vermiformes** : qui a l'aspect de la forme d'un ver (**asticots**).

- **Voix intraveineuse** : Une injection intraveineuse est une injection d'un liquide dans une veine en général à l'aide d'une seringue et d'une aiguille.

- **Xénobiotique** : Le terme xénobiotique désigne une «substance étrangère», c'est-à-dire extérieure à l'organisme, par opposition aux composants endogènes. Les xénobiotiques comprennent les médicaments, les produits chimiques industriels, les poisons naturels et les polluants environnementaux.

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

Le résumé

Les décès par suite d'overdose étant en augmentation, les médecins légistes se trouvent, de plus en plus, face à des cadavres dans un état de décomposition avancée. Ceux-ci ont donc recours à des entomologistes forensiques afin de les aider dans la détermination de la cause du décès. La présente étude s'intéresse à ce même fait et s'articule autour de deux axes ; elle porte en premier lieu à tester la fiabilité des larves et des pupes de quatre espèces de diptères Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* et *Chrysomia albiceps*) comme sources alternative pour l'analyse toxicologique, et de déterminer en second lieu l'éventuelle relation quantitative entre les concentrations détectées dans les larves et celles détectées dans les tissus.

Les résultats de la détection de la présence de diazépam dans les larves et les pupes par le GC-MS révèlent que le diazépam a été détecté dans toutes les larves des quatre espèces testées (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* et *Chrysomia albiceps*), ainsi que dans les pupes de deux espèces testées (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*), ce qui confirme la fiabilité de ces échantillons pour l'analyse toxicologique. Les résultats ont montré aussi que la concentration détectée dans les tissus est plus élevée que les concentrations détectées dans les larves, ce qui confirme que les applications quantitatives sont peu fiables.

Mots clés : entomologie forensique, *Calliphora vicina*, *Lucilia sericata*, *Chrysomia albiceps*, *Calliphora vomitoria*, Diazépam, analyse toxicologique, CG-MS.

Abstract

The death from overdose is increasing; coroners are, increasingly, in the face of corpses in an advanced state of decomposition. They therefore resort to forensic entomologists to assist them in determining the cause of death. Henceforth this study focuses on this very fact, which revolves around two axes; it relates primarily to test the reliability of larvae and pupae of four species of Diptera Calliphoridae (*Calliphora vicina*, *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* and *Chrysomia albiceps*), as alternative sources for toxicological analysis, and know the possible quantitative relationship between concentrations detected in larvae and those detected in tissues. The results of the detection of the presence of diazepam in larvae and pupae by GC-MS revealed that diazepam was detected in all the larvae of the four species tested and in the pupae of both species tested, confirming the reliability of these samples for toxicological analysis. The results also showed that the concentration detected in the tissues is higher than the concentrations detected in the larvae, which confirms that the quantitative applications are unreliable.

Keywords: forensic entomology, *Calliphora vicina*, common green bottle fly, *Chrysomia albiceps*, *Calliphora vomitoria*, Diazepam, toxicological analysis, GC-MS.