

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة – الحراش - الجزائر  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL- HARRACH  
ALGER

## Thèse

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

## Thème

*Evaluation des effets du Téflubenzuron et de l'extrait méthanolique  
de la plante Haplophyllum tuberculatum (Rutacée) sur le  
développement et la reproduction du criquet migrateur : Locusta  
migratoria (Linné, 1758) (Orthoptera, Oedipodinae)*

Présentée par : ACHEUK Fatma

Devant le jury :

Président	: Mr Doumandji S.	Professeur, E.N.S.A.
Directeur de thèse	: M <sup>me</sup> Doumandji-Mitiche B.	Professeur, E.N.S.A.
Co-directeur de thèse	: Mr Cusson M.	Professeur, Université Laval, Québec, Canada
Examineurs	: M <sup>me</sup> Soltani-Mazouni N.	Professeur, Université de Annaba
	: M <sup>me</sup> Guendouz-Benrima A.	Professeur, Université de Blida
	: M <sup>me</sup> Mouhouche F.	Professeur, E.N.S.A.

Année Universitaire 2011-2012

## Remerciements

*A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout particulièrement à remercier Mme Doumandji-Mitiche Bahia, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach à Alger, pour ses qualités humaines, pour ses enseignements, ses précieux conseils, pour sa patiente aide, notamment pour les problèmes administratifs ainsi que sa disponibilité à tout moment.*

*Mes sincères remerciements vont également à Mr Michel Cusson, Professeur à l'Université Laval, Québec, Canada et Directeur du laboratoire de Physiologie et Biochimie des Insectes au Centre de Foresterie des Laurentides à Québec, pour avoir accepté de co-diriger avec beaucoup d'attention cette thèse et d'avoir bien accepté de financer une partie du travail de cette thèse.*

*Je lui suis très reconnaissante pour son aide précieuse lors des différentes étapes de rédaction et de correction de l'article, malgré ses lourdes tâches au sein du centre de recherche. Je lui dois beaucoup pour son professionnalisme, pour sa gentillesse et ses qualités humaines.*

*Qu'il me soit permis d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur Salaheddine Doumandji, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach à Alger pour ses précieux conseils et ses pertinentes orientations. Je lui rends hommage pour avoir accepté de présider mon jury.*

*Je remercie vivement Mme Soltani-Mazouni Nadia, Professeur à l'Université d'Annaba, Mme Guendouz-Benrima Atika, Professeur à l'Université de Blida, Mme Mouhouche Fazia, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach à Alger, qui ont consenti à faire partie du jury.*

*J'ai eu la chance d'être accueillie dans une équipe animée par un esprit d'amitié et d'enthousiasme au laboratoire de Mme Fazouane et au laboratoire de Mr Cusson. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Catherine Béliveau, Ait Kaci Karima et à la technicienne de labo PG Malika pour leur aide précieuse. Mes remerciements s'adressent également à Mrs Mohammedi Arezki de l'UMBB et Boufersaoui Abdel-Kader de l'USTHB de m'avoir ouvert généreusement les portes de leur laboratoire de recherche.*

*Je dis un très grand Merci à Aicha d'Adrar, à son mari et à Mohamed Kharsi de m'avoir chercher la plante *Haplophyllum tuberculatum* sur le terrain et de m'avoir assuré l'approvisionnement en cette plante tout au long de mes manipulations.*

*J'exprime ma profonde gratitude à Mme Halouane Ex Chef de département de Biologie de la faculté des Sciences de l'Université de Boumerdes pour toutes les facilités que j'ai eu tout au long de la réalisation de ma thèse dans les différents laboratoires du département.*

*Tous mes bien sincères remerciements vont aussi à tout le personnel technique du département de Biologie de Boumerdes pour leur aide et leur patience particulièrement, Hayet, Djaouida, ami Mahfoudh, Malika du labo PG, Faiza du labo Biomol et Fatima.*

*Je dis un très grand merci à tous mes collègues enseignants du département de Biologie de Boumerdes.*

*Je dirai merci à tous ceux qui au cours de ce travail; en maintes circonstances et sous différentes formes; m'ont témoigné leurs aide et sympathie.*

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Femelle mature de <i>Locusta migratoria</i> (A) et une tentative d'accouplement (B), photos originales.....	9
<b>Figure 2.</b> Larve de cinquième stade.....	9
<b>Figure 3.</b> Les œufs fraîchement pondus (A) et une oothèque (B), photos originales.....	9
<b>Figure 4.</b> Carte de répartition des différentes sous-espèces de <i>Locusta migratoria</i> dans le monde.....	11
<b>Figure 5.</b> Aspect de la plante <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	20
<b>Figure 6.</b> Les feuilles de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	20
<b>Figure 7.</b> La glande de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	20
<b>Figure 8.</b> Les fleurs de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	21
<b>Figure 9.</b> Les fruits de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	21
<b>Figure 10.</b> Rendements d'extraction des alcaloïdes totaux, de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions .....	44
<b>Figure 11.</b> Courbe standard de l'acide gallique.....	45
<b>Figure 12.</b> Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>H. tuberculatum</i> séparés par différents systèmes solvant et révélés sous uv à 254 nm.....	46
<b>Figure 13.</b> Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>H. tuberculatum</i> séparés par différents systèmes solvant et révélés sous uv à 365 nm.....	46
<b>Figure 14.</b> Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>H. tuberculatum</i> séparés par différents systèmes après révélation par le réactif de Dragendorff.....	47
<b>Figure 15.</b> Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>H. tuberculatum</i> séparés par le système solvant S8 : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et révélés sous uv à 365 nm (A) et à 245 nm (B).....	49
<b>Figure 16.</b> Chromatogramme des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de <i>H. tuberculatum</i> séparés par le système solvant S8 : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et révélés par le réactif de Dragendorff.....	49
<b>Figure 17.</b> Chromatogrammes de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions séparés par différents systèmes solvant révélés sous uv à 365 nm....	51

<b>Figure 18.</b> Chromatogrammes de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions séparés par le système solvant S2 (acétate d'éthyle, méthanol, eau : 100 : 13,5 : 10) et révélés sous uv à 365 nm, à 254 nm et après exposition aux vapeurs d'ammoniac.....	54
<b>Figure 19.</b> Chromatogramme GC-MS de l'échantillon acide phénolique.....	57
<b>Figure 20.</b> Chromatogramme GC-MS de la fraction éther diéthylique.....	58
<b>Figure 21.</b> Chromatogramme GC-MS de la fraction butanolique.....	59
<b>Figure 22.</b> Chromatogramme GC-MS de la fraction acétate d'éthyle.....	60
<b>Figure 23.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> traitées au TFB.....	61
<b>Figure 24.</b> Inhibition de la mue imaginale chez les larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> traitées au TFB.....	62
<b>Figure 25.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> traitées à l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> .....	63
<b>Figure 26.</b> Blocage de la mue imaginale chez les larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> traitées à l'EM-Ht.....	63
<b>Figure 27.</b> Perturbation de la mue imaginale chez les larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> traitées à l'EM-Ht.....	64
<b>Figure 28.</b> Atteintes morphogénétiques notées chez les imagos de <i>L. migratoria</i> suite à des difficultés d'exuviation à la mue imaginale après traitement à l'EM-HT.....	65
<b>Figure 29.</b> Coupes histologiques au niveau du mésenteron des larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	69
<b>Figure 30.</b> Coupes histologiques au niveau des caecums gastriques des larves de 5 <sup>e</sup> stade de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	72
<b>Figure 31.</b> Titre des ecdystéroïdes hémolymphatiques (pg 20E équivalents/µl) chez des larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB.....	73
<b>Figure 32.</b> Evolution de la quantité des protéines cuticulaire de la cuticule abdominale des larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB.....	74
<b>Figure 33.</b> Evolution de la quantité des protéines cuticulaire de la cuticule abdominale des larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB.....	75
<b>Figure 34.</b> Taux d'inhibition de l'AcHe par les alcaloïdes et l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> chez les larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> .....	75

<b>Figure 35.</b> Taux d'activation de la GST par les alcaloïdes et l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> chez les larves de cinquième stade de <i>L. migratoria</i> .....	76
<b>Figure 36.</b> Période de pré-oviposition chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	77
<b>Figure 37.</b> Intervalle de temps (en jours) séparant deux pontes successives chez les femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	78
<b>Figure 38.</b> Le nombre moyen d'oothèques pondues par des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	78
<b>Figure 39.</b> Evolution de la fécondité (nombre d'œufs/oothèque) des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	79
<b>Figure 40.</b> Taux d'éclosion des œufs chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	79
<b>Figure 41.</b> Longueur de l'ovocyte terminal (mm) chez les femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht durant le premier cycle gonadotrophique.....	80
<b>Figure 42.</b> Pourcentage d'ovarioles présentant des corps de régression chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht durant le premier cycle gonadotrophique.....	81
<b>Figure 43.</b> Profil électrophorétique des protéines hémolymphatiques au 8 <sup>e</sup> et au 12 <sup>e</sup> jour chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	82
<b>Figure 44.</b> Profil électrophorétique des protéines ovariennes au 8 <sup>e</sup> et au 12 <sup>e</sup> jour de femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.....	82
<b>Figure 45.</b> Ovaires des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins (A) et traitées au TFB (B) ou à l'EM-Ht (C) au jour 12.....	83
<b>Figure 46.</b> Titre des ecdystéroïdes hémolymphatiques (pg 20E équivalents/ $\mu$ l) chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht, durant le premier cycle gonadotrophique.....	84
<b>Figure 47.</b> Titre des ecdystéroïdes ovariens en ng 20E équivalents/mg chez des femelles de <i>L. migratoria</i> témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht durant le premier cycle gonadotrophique.....	85

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Résultat du screening phytochimique préliminaire de <i>H. tuberculatum</i> .....	43
<b>Tableau II.</b> Aspect et rendement d'extraction des alcaloïdes totaux, de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions .....	44
<b>Tableau III.</b> Fluorescence et Rf des bandes des alcaloïdes de <i>H. tuberculatum</i> , séparées par le système solvant S8 : toluène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et observées sous uv à 254 et 365 nm.....	48
<b>Tableau IV.</b> Bandes alcaloïdiques obtenues avec le système solvant S8 après révélation avec le réactif de Dragendorff.....	50
<b>Tableau V.</b> Visualisation du chromatogramme de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions sous uv à 365 et 254 nm.....	52
<b>Tableau VI.</b> Bandes obtenues après révélation du chromatogramme de l'extrait méthanolique brut de <i>H. tuberculatum</i> et ses différentes fractions avec les vapeurs d'ammoniaque.....	55
<b>Tableau VII.</b> Résultats d'analyse par GC-MS de l'échantillon acide phénolique.....	56
<b>Tableau VIII.</b> Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction éther diéthylique.....	57
<b>Tableau IX.</b> Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction butanolique.....	58
<b>Tableau X.</b> Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction acétate d'éthyle.....	59

# Sommaire

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	2
<b>Chapitre 1 : Synthèse bibliographique</b> .....	8
<b>I -Données bibliographiques sur le criquet migrateur : <i>Locusta migratoria</i></b> .....	8
1- Position systématique.....	8
2 Morphologie.....	8
3- Biologie.....	10
4- Répartition géographique.....	10
4-1 Dans le monde.....	10
4-2 En Algérie.....	11
5- Processus de transformation phasaire.....	12
6- Dégâts .....	12
7- Lutte antiacridienne.....	13
7-1 Lutte préventive.....	13
7-2 Lutte chimique .....	13
7-2-1 Les régulateurs de croissance d'insectes.....	14
7-2-1-1 Les régulateurs de croissance d'insectes perturbant l'action des hormones de développement.....	14
7-2-1-2 Les régulateurs de croissance d'insectes perturbant la synthèse de la chitine .....	15
7-2-2 Les bio-insecticides à base d'extraits de plantes.....	15
7-2-2-1 L'utilisation des huiles essentielles dans la lutte contre les insectes...	15
7-2-2-2 L'utilisation des composés phénoliques dans la lutte contre les insectes.....	16
7-2-2-3 L'utilisation des alcaloïdes dans la lutte contre les insectes.....	17
7-2-2-4 L'utilisation de l'azadirachtine.....	18
<b>II - Données bibliographiques sur <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forssk)</b> .....	19
1- Classification.....	19
2- Description botanique.....	19
3- Distribution géographique.....	19
4- Utilisations traditionnelles.....	21
5- Travaux phytochimiques antérieurs sur <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	22

<b>Chapitre II : Matériel et méthodes</b> .....	24
<b>I- Matériel</b> .....	24
<b>1- Matériel biologique</b> .....	24
1-1 Les insectes : <i>Locusta migratoria cinerascens</i> .....	24
1-2 La plante : <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	24
<b>2- Matériel non biologique</b> .....	24
2-1 Le téflubenzuron « TFB ».....	24
<b>II- Méthodologie</b> .....	24
<b>1- Caractérisation phytochimique de la plante <i>Haplophyllum tuberculatum</i> (Forssk)</b> .....	24
<b>1-1 Screening phytochimique préliminaire de la plante</b> .....	24
1-1-1 Préparation de l'infusée à 20 %.....	25
1-1-2 Préparation de décocté à 1 %.....	25
1-1-3 Recherche des alcaloïdes.....	25
1-1-4 Recherche des tannins.....	25
1-1-5 Recherche des saponosides.....	25
1-1-6 Recherche des coumarines.....	26
1-1-7 Recherche des anthocyanes.....	26
1-1-8 Recherche des iridoïdes.....	26
1-1-9 Recherche des flavonoïdes.....	26
<b>1-2 Préparation et analyse quantitative et qualitative de l'extrait méthanolique brut et des alcaloïdes bruts de <i>Haplophyllum tuberculatum</i></b> .....	26
1-2-1 Préparation de l'extrait méthanolique brut : EM-Ht.....	26
1-2-2 Fractionnement de l'extrait méthanolique brut.....	27
1-2-3 Extraction des alcaloïdes bruts.....	28
1-2-4 Analyse quantitative des extraits bruts : l'EM-Ht et les alcaloïdes totaux..	28
1-2-4-1 Le rendement.....	28
1-2-4-2 Teneur de l'EM-Ht en composés phénoliques.....	28
1-2-5 Analyse qualitative des extraits bruts par chromatographie sur couche mince «CCM».....	29
-Systèmes solvants utilisés pour la séparation des différentes fractions de l'EM-Ht.....	29

-Systèmes solvants utilisés pour la séparation des alcaloïdes bruts.....	30
1-2-6 Analyse qualitative des extraits par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse « GC-MS ».....	30
-Conditions GC-MS.....	31
<b>2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques paramètres physiologiques et endocriniens chez les larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>2-1 Evaluation de l'activité insecticide.....</b>	<b>31</b>
2-1-1 Traitement des larves.....	31
2-1-2 Evaluation de l'activité insecticide.....	31
<b>2-2 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du TFB sur l'histologie du tube digestif des larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>32</b>
2-2-1 Prélèvement et fixation des tubes digestifs.....	32
2-2-2 Lavage, déshydratation et imprégnation à la paraffine.....	32
2-2-3 Inclusion dans la paraffine et confection des blocs.....	32
2-2-4 Microtomisation et étalement des coupes.....	33
2-2-5 Colorations des coupes.....	33
<b>2-3 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du TFB sur les titres des ecdystéroïdes hémolympatiques des larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>34</b>
2-3-1 Traitement des larves.....	34
2-3-2 Prélèvement de l'hémolymphe.....	34
2-3-3 Extraction des ecdystéroïdes hémolympatiques.....	34
2-3-4 Mesure des titres des ecdystéroïdes par radioimmunoessai .....	34
2-3-5 Analyse des données.....	35
<b>2-4 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du TFB sur la composition biochimique de la cuticule des larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>36</b>
2-4-1 Prélèvement de la cuticule des larves.....	36
2-4-2 Dosage des protéines et de la chitine cuticulaire.....	36

<b>2-5 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht et de l'extrait alcaloïdiques brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> sur l'activité enzymatiques de l'acétylcholinestérase et de la glutathion S-transférase des larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i></b> .....	36
2-5-1 Traitement.....	36
2-5-2 Prélèvement des organes.....	37
2-5-3 Dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase « AChE ».....	37
2-5-4 Dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase « GST »....	38
<b>3- Etude de l'effet de l'EM-Ht de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du TFB sur la reproduction et les titres d'ecdystéroïdes chez les femelles de <i>Locusta migratoria</i></b> .....	38
3-1 Traitement des imagos femelles.....	38
3-2 Effet sur la reproduction.....	39
3-3 Effet sur le développement ovarien.....	39
3-4 Effet sur la vitellogénèse.....	39
3-4-1 Electrophorèse des protéines hémolympatiques et ovariennes.....	39
3-5 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolympatiques et ovariens.....	40
3-5-1 Prélèvement des échantillons et extraction des ecdystéroïdes.....	40
- Hémolymphe.....	40
- Ovaires.....	40
3-5-2 Radioimmunoessai des ecdystéroïdes.....	41
<b>4- Analyse statistique</b> .....	41
 <b>Chapitre III : Résultats</b> .....	43
<b>1 - Caractérisation phytochimique de la plante <i>Haplophyllum tuberculatum</i></b> .....	43
1-1 Screening phytochimique préliminaire de la plante.....	43
1-2 Analyse quantitative et qualitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts.....	43
1-2-1 Analyse quantitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts...	43
1-2-1-1 Rendement.....	43
1-2-1-2 Teneur de l'EM-Ht en composés phénoliques.....	45
1-2-2 Analyse qualitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts....	45

1-2-2-1 Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince «CCM».	45
-Alcaloïdes.....	45
-L'EM-Ht et ses différentes fractions.....	50
1-2-2-2 Analyse des différentes fractions de l'EM-Ht par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse « GC-MS ».....	56
<b>2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques paramètres physiologiques et endocriniens chez les larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>61</b>
2-1 Activité insecticide et atteintes morphogénétiques.....	61
2-2 Effet sur l'anatomie et l'histologie du tube digestif.....	66
2-2-1 L'anatomie du tube digestif des larves témoins et traitées.....	66
2-2-2 L'histologie du tube digestif des larves témoins et traitées.....	66
2-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques.....	73
2-4 Effet sur la composition biochimique de la cuticule : taux de chitine et de protéines cuticulaires.....	74
2-5 Effet sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et la glutathion S-Transférase.....	75
2-5-1 Effet sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase.....	75
2-5-2 Effet sur l'activité spécifique de la glutathion S-transférase.....	76
<b>3- Etude de l'effet de l'extrait méthanolique brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du téflubenzuron sur la reproduction et les titres des ecdystéroïdes chez les femelles de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>76</b>
3-1 Effet sur la reproduction.....	76
3-2 Effet sur le développement ovarien.....	79
3-3 Effet sur la vitellogénèse.....	81
3-4 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et Ovariens.....	84
<b>Chapitre IV : Discussion .....</b>	<b>87</b>
<b>1-Caractérisation phytochimique de la plante <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et analyse quantitative et qualitative de ces différents extraits.....</b>	<b>87</b>
1-1 Caractérisation phytochimique de la plante <i>Haplophyllum tuberculatum</i> .....	87

1-2 Analyse qualitative des différentes fractions de l'extrait méthanolique brut....	89
<b>2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques paramètres physiologiques et endocriniens chez les larves de cinquième stade de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>90</b>
2-1 Activité insecticide et atteintes morphogénétiques.....	90
2-2 Effet sur l'histologie du tube digestif.....	94
2-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes.....	96
2-4 Effet sur la composition biochimique de la cuticule.....	98
2-5 Effet sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et la glutathion S- Transférase.....	102
<b>3- Etude de l'effet de l'extrait méthanolique brut de <i>Haplophyllum tuberculatum</i> et du Téflubenzuron sur la reproduction et les titres des ecdystéroïdes chez les femelles de <i>Locusta migratoria</i>.....</b>	<b>106</b>
3-1 Effet sur la reproduction.....	106
3-2 Effet sur le développement ovarien et la vitellogénèse.....	108
3-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens.....	110
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>114</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>118</b>

# Introduction générale

## Introduction générale

Les dégâts causés par les insectes en général constituent certes un lourd préjudice pour l'agriculture. La végétation et les cultures céréalières n'échappent pas à ces préjudices et se trouvent en permanence confrontées à l'activité déprédatrice de divers ravageurs, dont les sauterelles et les criquets. Ceux-ci ont la capacité de former des essaims migrateurs incroyablement denses, contenant de 40 à 80 millions d'individus (Steedman, 1988).

Les acridiens tels que *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) et *Locusta migratoria* (Linné, 1758) revêtent une importance particulière de par l'ampleur des dégâts qu'ils peuvent occasionner aux cultures des zones arides.

Le criquet migrateur *L. migratoria* est l'acridien qui a la plasticité écologique et la distribution géographique les plus grandes (Launois-Luong et Lecoq, 1993). Les dégâts et les ravages imputés à ces insectes résultent autant de l'activité des larves que de celle des adultes.

La lutte antiacridienne demeure l'une des préoccupations majeures dans les stratégies de protection des cultures des régions arides et semi-arides déjà soumises aux aléas du climat. Pour minimiser les dégâts causés par les acridiens, plusieurs méthodes de lutte ont été utilisées. Parmi celles-ci, la lutte chimique a été la plus exploitée pendant plusieurs décennies. Les insecticides utilisés en lutte antiacridienne sont généralement neurotoxiques, et appartiennent aux groupes des organophosphorés, des pyréthrinoïdes et des carbamates, ou sont constitués de mélanges de molécules appartenant à plus d'un de ces groupes (FAO, 1997).

Malheureusement, ce moyen de lutte n'est pas sans avoir d'effets nocifs pour l'environnement et à la santé humaine. Notons par ailleurs que plusieurs des pesticides disponibles ne sont pas sélectifs à l'égard des acridiens et éliminent des insectes non cibles, dont certains sont bénéfiques.

Pour pallier aux insuffisances de la lutte chimique, les recherches récentes ont mis l'accent sur la mise au point d'alternatives de lutte ayant peu d'incidence néfaste sur l'environnement, tout en apportant une solution durable au problème acridien (Zakaria et Sagnia, 2003).

Les interactions insecte-plante hôte constituent un important domaine d'investigation en écologie chimique et en lutte intégrée, en raison de ses intéressantes perspectives pour le développement de nouveaux biopesticides d'origine végétale. Ces interactions impliquent les métabolites secondaires des plantes, lesquels peuvent interférer avec le comportement, la métamorphose, la croissance, le développement et la reproduction des insectes (Rharrabe *et*

*al.*, 2009). Les travaux de Cespeds *et al.* (2005) ont montré que les métabolites secondaires des plantes ont différents sites d'action et différentes cibles moléculaires lorsqu'ils interfèrent avec les enzymes et le processus de métamorphose. Plus de 2000 espèces de plantes, provenant des quatre coins du monde, possèdent des propriétés insecticides (Klocke, 1989 in Tewary *et al.*, 2005).

L'endocrinologie des insectes est également un autre domaine auquel les biologistes et les protectionnistes se sont beaucoup intéressés. Les criquets comme toutes les espèces d'arthropodes se développent par des mues. Le cycle de mue est contrôlé par trois types d'hormones : les hormones cérébrales, l'hormone juvénile JH et les ecdystéroïdes. Chaque mue est déclenchée en réponse à l'élévation des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques, et la présence de l'hormone juvénile pendant cette période du cycle sera responsable du maintien des caractères larvaires lors de la mue suivante (Riddiford, 1994). En revanche, la disparition de la JH crée un nouveau contexte hormonal qui induira, en présence des ecdystéroïdes seuls, un engagement des tissus vers des programmes de type imaginal (Truman et Riddiford, 2002). Dans ces conditions, les ecdystéroïdes sont définis comme des déclencheurs de la mue alors que l'hormone juvénile détermine par sa présence ou absence la nature de la mue (Riddiford, 1996).

La vitellogénèse est également sous l'étroit contrôle de l'hormone juvénile (Dhadialla et Wyatt, 1983 ; Wyatt, 1988) et/ou des ecdystéroïdes et de neurohormones (Girardie *et al.*, 1998). Le rôle gonadotrope de l'hormone juvénile dans la régulation de la vitellogénèse est bien documenté chez les insectes (Dhadialla et Wyatt, 1983 ; Wyatt *et al.*, 1987). Cette hormone stimule la production des vitellogénines, principalement dans le corps gras mais aussi dans les cellules folliculaires chez les femelles adultes, par l'activation de la transcription des gènes de vitellogénine (Hartfelder, 2000). L'hormone juvénile a été longtemps considérée comme étant l'unique (majeure) hormone contrôlant la vitellogénèse chez les Orthoptères, jusqu'à la caractérisation d'une neurohormone gonadotropique, la Ovary Maturing Parsin (Lom-OMP) chez *L. migratoria*, laquelle aurait un effet stimulant sur la production de la vitellogénine et la vitellogénèse chez les femelles adultes de *L. migratoria*, indépendamment de l'hormone juvénile (Girardie et Girardie, 1996 ; Girardie *et al.*, 1998). Il a été suggéré que Lom-OMP stimule la vitellogénèse chez *L. migratoria* via un effet ecdystéroïdogénique (Girardie *et al.*, 1998).

Les cellules folliculaires sont le site de production de ces ecdystéroïdes chez les femelles adultes de plusieurs espèces d'orthoptères. Ceux-ci sont incorporés dans les oeufs à

95 % sous forme de conjugués (Lagueux *et al.*, 1977, 1981), polaires ou apolaires (Gande et Morgan, 1979 ; Hagedorn, 1985), pouvant même être liés à des protéines telles les vitellines (Hoffmann, 1980 ; Hagedorn 1985 ; Tawfik *et al.*, 1999). Ces conjugués représentent une source d'ecdystéroïdes durant l'embryogenèse (Lagueux *et al.*, 1977). Leur hydrolyse dans les œufs est responsable des pics d'ecdysone libre observés durant le développement embryonnaire (Lagueux *et al.*, 1981), où ils seraient impliqués dans l'initiation des mouvements morphogénétiques et l'induction de la cuticulogenèse (Lagueux *et al.*, 1979). L'implication et le rôle des ecdystéroïdes dans la vitellogénèse et le développement ovarien chez *L. migratoria* n'ont été considérés qu'après la découverte de la neurohormone Lom-OMP (Girardie et Girardie, 1996). Girardie *et al.* (1998) suggèrent que les ecdystéroïdes exercent un « priming effect » préparant l'induction de l'expression des gènes de la vitellogénine (Vg) par l'hormone juvénile. La 20 hydroxyecdysone (20E) n'est pas nécessaire pour la production de Vg chez les adultes. Toutefois, elle semble potentialiser la transcription des gènes de Vg par l'hormone juvénile.

Le développement, la reproduction et leur régulation hormonale constituent des cibles potentielles pour les insecticides et représentent des perspectives intéressantes pour une lutte bio-rationnelle. Au cours des dernières années, des connaissances considérables ont été accumulées sur la physiologie et l'endocrinologie des insectes ; celles-ci ont permis de mettre au point des procédures visant à sélectionner des molécules qui interfèrent avec le développement des insectes, et ciblant les mécanismes endocriniens qui en assurent la régulation (Dhadialla *et al.*, 2005). La recherche agrochimique a mené au développement d'une catégorie d'insecticides connue sous le nom de « régulateurs de croissance d'insectes » (insect growth regulators ou IGRs), lesquels interfèrent avec le développement et la croissance des insectes en perturbant les titres de médiateurs endocriniens ou la synthèse de chitine. Parmi ces molécules, on compte les analogues de l'hormone juvénile, les agonistes et les antagonistes de l'ecdysone et les inhibiteurs de la synthèse de chitine (Dhadialla *et al.*, 1998 ; Dhadialla *et al.*, 2005).

Les benzoyl phenyl urées (BPUs) perturbent le développement normal des insectes et réduisent leur viabilité à chaque mue, en agissant comme inhibiteurs de la biosynthèse de chitine (Cohen, 1987 ; Graf, 1993). Les études menées sur le diflubenzuron, le premier représentant des BPUs, ont montré que cette molécule affecte également la reproduction chez les femelles adultes, des réductions de fécondité et de fertilité ayant été décrites par de nombreux auteurs (Lim et Lee, 1982 ; Soltani, 1987 ; Soltani et Soltani-Mazouni, 1992).

Toutefois, le mécanisme par lequel ces molécules agissent sur la reproduction n'a pas encore été complètement élucidé. L'hypothèse de l'interférence de ces molécules avec la vitellogénèse et l'endocrinologie a été formulée par Soltani *et al.* (1989), mais des travaux récents suggèrent que les BPU peuvent aussi inhiber la croissance ovarienne en bloquant la synthèse de chitine au sein même des ovocytes (Mansur *et al.* 2010).

Des effets comparables à ceux des régulateurs de croissance synthétiques ont été observés pour les métabolites secondaires de diverses plantes sur de nombreuses espèces d'insectes. La recherche des sites et des mécanismes d'action de ces métabolites secondaires a montré que ces derniers sont impliqués dans des activités insecticides et des effets régulateurs de croissance par leur effet antiappétant (Feng *et al.*, 1995) et leur puissant effet inhibiteur enzymatique et métabolique (Kubo et Kloche, 1983 ; Céspedes *et al.*, 2000, 2001).

En Algérie, la région aride est caractérisée par sa richesse en plantes aromatiques, médicinales et autres possédant des propriétés biologiques très intéressantes, lesquelles trouvent application dans divers domaines. Nos investigations sur le terrain dans la région d'Adrar, située au sud Ouest de l'Algérie, nous ont permis de constater que le revêtement végétal des biotopes des locustes dans cette région est très riche en espèces végétales présentant des propriétés antiappétantes, répulsives et même toxiques. *Haplophyllum tuberculatum* (la rue) (Rutaceae) est une des espèces très abondantes dans la région qui résiste aux attaques d'insectes, y compris celles des locustes. Cette plante a déjà fait preuve d'activité insecticide (Mohsen *et al.*, 1989), nématocide (Onifade *et al.*, 2008), fongicide et bactéricide (Sheriha *et al.*, 1985; Al-Burtamani *et al.*, 2005). Sa composition phytochimique a démontré sa richesse en alcaloïdes, liganes, flavonoïdes et en huiles essentielles (Khalid et Waterman, 1981; Sheriha et Abouamer 1984; Sheriha *et al.*, 1985; Al-Yahya *et al.*, 1992; Al-Rehaily *et al.*, 2001; Al Yousuf *et al.*, 2005; Al-Burtamani *et al.*, 2005; Javidnia *et al.*, 2006).

Dans le présent travail, nous avons évalué l'effet d'un extrait méthanolique de la partie aérienne de la plante *H. tuberculatum* (Rutaceae) sur diverses variables physiologiques chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria cinerascens* (Orthoptera : Oedipodinae). L'efficacité de cet extrait a été mesurée chez des larves de cinquième stade. Ses effets sur la structure du mésentéron et les cæcums gastriques ont été également étudiés. Dans le but de comprendre les causes des différentes atteintes morphogénétiques constatées sur les larves, des dosages des ecdystéroïdes hémolymphatiques et des dosages de chitine et des protéines cuticulaires ont été réalisés. La variabilité des effets obtenus selon les doses de l'extrait testées nous ont poussé également à chercher et à comprendre les mécanismes d'actions de cet extrait

à travers le dosage de deux biomarqueurs : l'acétylcholinestérase « AChE » et la glutathion S-transférase la « GST ».

Sur les femelles adultes nous avons mesuré diverses variables reproductives et évalué la possible interférence de l'extrait avec la production d'ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens. Sur la base des travaux préliminaires qui ont révélé des similitudes entre les effets de cet extrait sur les variables mesurées et ceux documentés pour le diflubenzuron chez le criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* (Tail *et al.*, 2008, 2010), nous avons aussi comparé les effets de l'extrait de la plante à ceux du téflubenzuron, régulateur de croissance de la famille des BPUs.

Afin de comprendre les mécanismes d'actions de l'extrait testé, la connaissance de la composition phytochimique de l'extrait brut de la plante étudiée s'est avérée nécessaire. Un criblage phytochimique a été réalisé en premier afin d'identifier la présence ou l'absence de grands groupes des métabolites secondaires. Une analyse quantitative et qualitative par chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase gazeuse de l'extrait méthanolique brut a été effectuée dans un deuxième temps.

# Chapitre I

## Synthèse bibliographique

## Synthèse bibliographique

### I -Données bibliographiques sur le criquet migrateur : *Locusta migratoria*

#### 1- Position systématique

*Locusta migratoria* est une espèce redoutable, qui occupe une place incontestable parmi les insectes nuisibles à l'agriculture.

Selon Louveaux et Ben Halima (1987), *Locusta migratoria* se range de la manière suivante :

- Classe : Insectes.
- Sous-classe : Ptérygotes
- Super-ordre : Orthoptéroïdes
- Ordre : Orthoptères
- Sous-ordre : Caelifères
- Super-famille : Acridoïdea
- Famille : Acrididae
- Sous-famille : Oedipodinea
- Genre : *Locusta*
- Espèce : *Locusta migratoria* (Linné, 1758)

#### 2- Morphologie du criquet

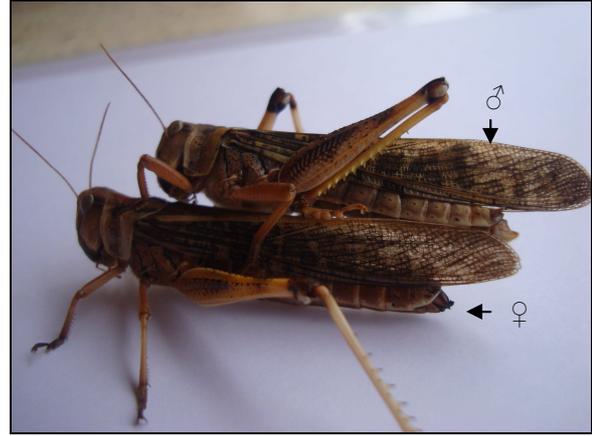
*L. migratoria* est un acridien relativement petit. Sa longueur et sa couleur se trouvent variables selon l'état phasaire des individus. Sous sa forme grégaire c'est un criquet de même taille que le criquet pèlerin, mesurant 40 à 50 mm chez les mâles et 46 à 56 mm chez les femelles. La couleur générale du corps est brune. La forme solitaire présente une taille plus irrégulière variant de 34 à 60 mm chez les femelles (Fig.1A) et de 29 à 46 mm chez les mâles (Fig.1B), la couleur verte domine souvent chez les femelles et le brun chez les mâles (Balachowsky et Mesnil, 1936).

La forme des larves rappelle celle des ailés (Duranton *et al.*, 1982). A sa sortie de l'œuf, la larve vermiforme est enfermée dans un étui transparent et devient, après une mue intermédiaire, une larve du premier stade (Albrecht, 1967). Les larves de *L. migratoria* sont souvent de couleur brune ou verte (Fig.2), mais elles peuvent aussi avoir des couleurs différentes selon le milieu ambiant et l'état de groupement des individus.

L'œuf de *L. migratoria* est allongé, légèrement courbé, avec des extrémités arrondies, de couleur jaune clair parfois brun clair (Fig.3A) (Popov *et al.*, 1990). Sa taille varie entre 5 et 7 mm selon les sous espèces. L'œuf est déposé selon une orientation bilatérale dans



**A**



**B**

**Figure 1.** Femelle mature de *Locusta migratoria* (A) et une tentative d'accouplement (B), (Photos originales).



**Figure 2.** Larve de cinquième stade (Outtar, 2009).



**A**



**B**

**Figure 3.** Les œufs fraîchement pondus (A) et une oothèque (B), (Photos originales).

l'oothèque (Fig.3B) (Balachowsky et Mesnil, 1936). La masse d'œufs ou masse ovigère est toujours surmontée d'un bouchon spumeux qui, grâce à ces propriétés hygroscopiques, assure l'hydratation et l'aération des œufs (Popov *et al.*, 1990).

### **3- Biologie du criquet migrateur**

La recherche d'un site de ponte constitue pour la femelle de *L. migratoria* un important préalable : une alternance des plages de sol nu et des touffes de végétation, un bon ensoleillement et une humidité superficielle du sol suffisante sont autant de paramètres pris en compte par la reproductrice (Popov *et al.*, 1990).

Les œufs sont expulsés avec une matière spumeuse qui forme, en se solidifiant, une oothèque (Bonnemaison, 1961). Dans les cinq premiers jours après la ponte, les œufs doivent absorber environ leur propre masse d'eau, cela étant suffisant pour leur permettre de se développer correctement (Duranton *et al.*, 1982). Le développement embryonnaire dure une dizaine de jours en saison sèche, et un mois en saison fraîche (Launois-Luong et Lecoq, 1989).

De l'éclosion à l'état imaginal, les larves passent par plusieurs stades larvaires. Leur nombre dépend de l'état phasaire. Les larves de *Locusta* se développent en cinq stades (Launois- Luong et Lecoq, 1989). La durée de développement larvaire est de trois semaines sous des conditions propices (Duranton *et al.*, 1982).

À la mue imaginale, les individus de *L. migratoria* présentent une coloration crémeuse qui vire à l'approche de la maturité sexuelle au jaune vif chez les mâles, et au brun foncé chez les femelles (Hunter-Jones, 1961). La première partie de la vie imaginale est surtout consacrée à la recherche d'un biotope favorable à l'alimentation. Mâles et femelles augmentent leur poids dans des proportions notables et accumulent du corps gras. La prise du poids progressive permet aux femelles de préparer leur future première ponte (Lecoq, 1975).

### **4- Répartition géographique du criquet migrateur**

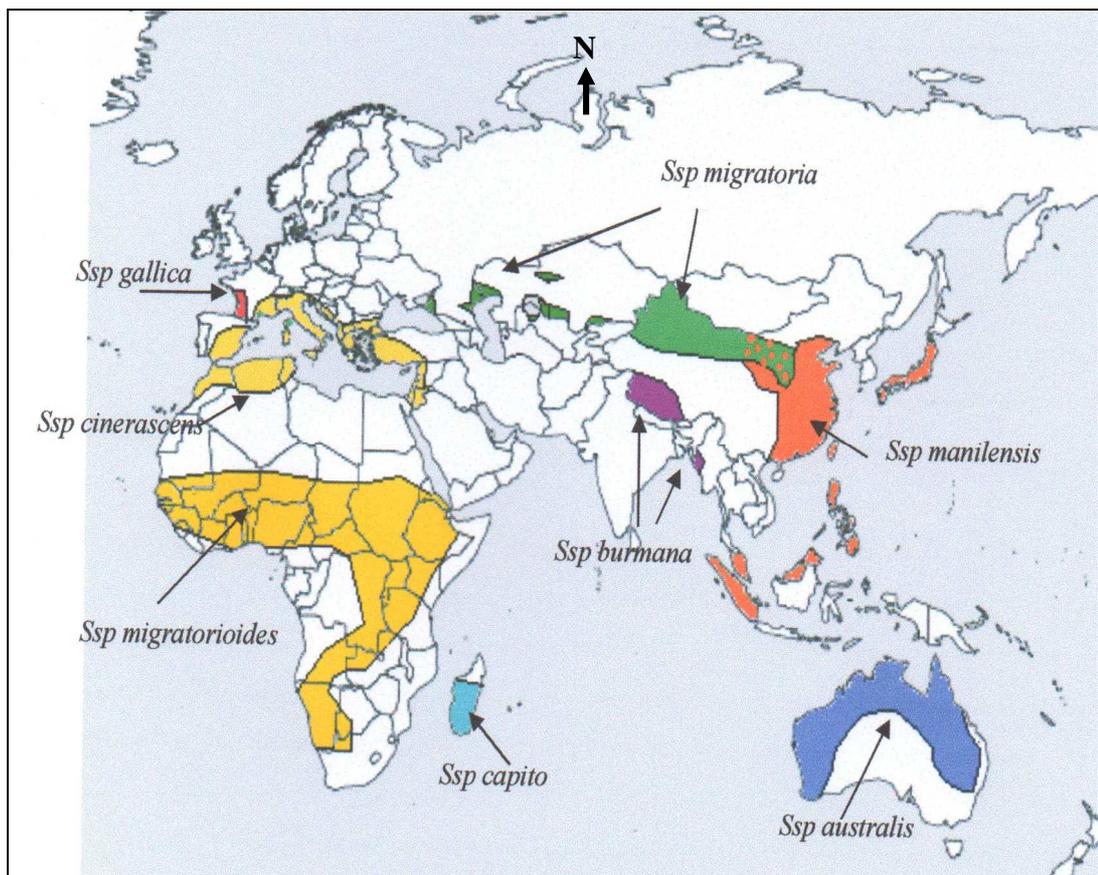
#### **4-1- Dans le monde**

*L. migratoria* est l'acridien qui a l'extension géographique et la plasticité écologique les plus grandes. Plusieurs sous espèces de *L. migratoria* ont réussi à coloniser non seulement l'ancien monde, représenté par l'Afrique et Madagascar, mais aussi l'Europe jusque dans les vallées Alpines, l'Asie jusqu'en Chine et l'Australie (Fig. 4). Chacune de ces sous-espèces possède des particularités bioécologiques liées aux caractéristiques écoclimatiques de leur domaine d'existence (Launois-luong et Lecoq, 1993).

#### 4-2- En Algérie

*L. migratoria cinerascens* est la sous espèce nord africaine signalée par Chopard (1943) en Algérie dans le littoral et les oasis. Selon le même auteur, cette sous-espèce ne peut se manifester sous sa forme grégaire puisque les conditions écoclimatiques favorisant sa grégarisation ne se trouvent pas rassemblées dans notre pays.

Au sud, l'espèce vit à l'état endémique dans les zones anthropiques du Sahara centro-septentrional, en particulier au niveau des périmètres irrigués cultivés en céréales (Benfekih *et al.*, 1996). Elle est signalée dans la région d'Adrar par plusieurs auteurs (Seddik, 1994 ; Khaldi, 1996 et Kara, 1997). Une autre sous-espèce, *L. m. migratorioides*, considérée comme typique de l'Afrique de l'ouest, a été capturée par Ould el hadj (1994) près de Tamanrasset et à El-Goléa.



**Figure 4.** Distribution géographique des différentes sous-espèces de *Locusta migratoria* d'après Grichanov et Sauliche (2003), site australien : [//www.affa.gov.au/index.cfm](http://www.affa.gov.au/index.cfm) in Allal-Benfekih (2006). Dans la partie centre-eurasiatique, seuls les foyers grégarigènes de la *spp migratoria* sont mentionnés.

## **5- Processus de transformation phasaire**

*L. migratoria* est un locuste très sensible, pouvant passer de la forme solitaire à la forme grégaire dès que la densité dépasse un seuil critique, seuil estimé à 2000 ailés par hectare. Le polymorphisme phasaire s'exprime par des modifications morphologiques, anatomiques, physiologiques, écologiques et comportementales (Rasolomandimby, 1996).

*L. migratoria migratorioides* vit à l'état solitaire dans tous les pays de l'Afrique au sud du Sahara. La zone d'inondation du Niger est connue comme étant la principale aire de grégarisation de cette espèce. En saison sèche, les phénomènes de crue et surtout de décrue sont les principaux facteurs déclenchant la grégarisation. En effet les décrues mettent à jour des biotopes refuges pour l'espèce à une période de l'année où elle est en grande difficulté du fait de l'assèchement du milieu. Les zones découvertes par le retrait des eaux bénéficient d'une humidité résiduelle et d'une végétation turgescence qui sédentarise les populations acridiennes. L'amorce de la grégarisation s'effectue lorsque la vitesse de retrait des eaux découvre de grandes surfaces qui s'assèchent rapidement et contraignent les criquets à se regrouper sur des aires de plus en plus restreintes. L'élévation densitaire augmente les contacts interindividuels et déclenche ainsi le processus de transformation phasaire (Launois-Luong et Lecoq, 1989 ; Popov, 1996).

Les grégaires se distinguent des solitaires par une plus grande résistance aux conditions fraîches et sèches.

## **6- Dégâts du criquet migrateur**

Les ravages dont sont responsable les acridiens migrants à la surface du globe peuvent être comparés aux grands fléaux de l'humanité, aux inondations, aux tremblements de terre et aux épidémies.

Le criquet migrateur sous ses différentes formes grégaires est de tous les acridiens celui qui cause le plus de dégâts, puisque ses invasions s'étendent à toutes les zones steppiques d'Europe, d'Asie ainsi qu'aux régions tropicales de l'Afrique et le Madagascar (Balachowsky et Mesnil, 1936). De très nombreuses plantes sont susceptibles d'être attaquées en période d'invasion, qu'elles soient ligneuses ou graminées (Kabassina, 1990).

## **7- Lutte antiacridienne**

### **7-1 Lutte préventive**

Dans le cas des locustes, la lutte préventive reste la stratégie de lutte la plus efficace, son objectif principal étant d'altérer la tendance évolutive d'une situation acridienne avant d'en subir les effets néfastes. Il est évident que la lutte préventive est moins dangereuse, moins polluante et économiquement moins coûteuse que la curative (Launois-Luong *et al.*, 1988).

La lutte préventive est fondée essentiellement sur une surveillance intensive des aires grégarigènes, situées hors des zones des cultures, afin d'intervenir efficacement et précocement sur les premières concentrations de criquets et éviter par conséquent le déclenchement d'une invasion généralisée (Launois et Lecoq, 1990).

Dans le cas du criquet migrateur, cette tâche était assumée par l'OICMA (l'Organisation Internationale Contre le Criquet Migrateur Africain), implantée en Afrique et à Madagascar. Depuis sa création en 1948, l'organisation a dû faire face à plus de 17.000 bandes larvaires. Face à des difficultés financières chroniques l'OICMA a été dissoute en 1986. Désormais, la lutte préventive contre le criquet migrateur est assurée par les services de la protection des végétaux des pays concernés (Popov, 1996).

Pour mieux prémunir contre les dégâts causés par *L. migratoria*, et les locustes de manière générale, l'amélioration des techniques et des méthodes de lutte préventive se pose comme une nécessité obligatoire. En effet, les réseaux de surveillance existants doivent être renforcés par de nouveaux moyens tels que :

- l'utilisation des satellites écologiques et météorologiques pour le repérage des sites potentiellement favorables à la multiplication de ravageur ;
- la biomodélisation, qui consiste à établir une table de correspondance entre les différents types d'environnement et les réponses caractéristiques de l'espèce.

### **7-2 Lutte chimique**

Bien que, ces dernières années, les efforts des protectionnistes et des biologistes se soient tournés vers les autres moyens biologiques, physiques, préventifs ou écologiques, la lutte chimique constitue le moyen auquel on a encore le plus abondamment recours pour combattre le fléau acridien.

L'arsenal chimique contre les acridiens nuisibles est diversifié tant dans sa présentation ainsi que par les moyens d'épandage (Duranton *et al.*, 1982).

Selon Rachadi (1991) la lutte chimique antiacridienne s'est développée sur deux axes :  
L'amélioration de la qualité des insecticides et l'amélioration des techniques d'épandage.

### **7-2-1 Les régulateurs de croissance d'insectes**

Les régulateurs de croissance des insectes sont des insecticides bio-rationnels avec un mode d'action nouveau. Ils exercent leurs effets insecticides à travers leurs actions sur le développement, la métamorphose et la reproduction des insectes en perturbant l'activité normale du système endocrinien ou d'autres fonctions physiologiques. Leurs actions sont beaucoup plus lentes que celles des insecticides chimiques conventionnels (Hoffmann et Lorenz, 1998).

Ces produits tendent à être sélectifs et sont généralement peu toxiques pour les organismes non cibles par rapport aux insecticides conventionnels (Biddinger et Hull, 1995).

Les régulateurs de croissance des insectes sont classés en deux catégories (Gordon *et al.*, 1989)

- les régulateurs de croissance d'insectes perturbant l'action des hormones de développement : hormones juvéniles et ecdystéroïdes.
- les régulateurs de croissance d'insectes agissant sur la mise en place de la cuticule.

#### **7-2-1-1 Les régulateurs de croissance d'insectes perturbant l'action des hormones de développement**

Les régulateurs de croissance d'insectes, développés au cours de ces quarante dernières années, sont des produits de synthèse simulant l'action de l'hormone juvénile ou de l'ecdysone, les deux hormones dont les rôles principaux sont de contrôler la croissance et le développement chez les insectes (Dhadialla *et al.*, 1998). A la fin des années 60, Williams (1967) lança l'idée de développer des agents de contrôle imitant l'action de l'hormone juvénile afin de perturber le développement normal de l'insecte visé. Par la suite, des analogues de l'hormone de mue ont été développés et commercialisés. Les analogues de l'hormone juvénile ont pour principaux effets de produire, chez les individus traités, un stade surnuméraire, des larves permanentes ou des intermédiaires larve-pupe (Muyle et Gordon, 1989 ; Gadenne *et al.*, 1990). Quant aux produits simulant l'ecdysone, leur principale activité réside dans leur capacité à induire une mue prématurée incomplète et létale (Smagghe *et al.*, 1996 ; Dallaire *et al.*, 2004).

Les analogues de l'hormone juvénile testés sur les larves du dernier stade du criquet pèlerin ont provoqué d'une part des altérations morphologiques au cours de la mue et d'autre part la solitarisation des grégaires en modifiant la couleur. L'usage de ces nouveaux produits en lutte antiacridienne nécessite d'autre expérimentation pour réduire les doses d'application et préciser le mode d'action de la molécule sur le phénomène de solitarisation des criquets en phase grégaire ou le maintien des locustes en phase solitaire (Dorn *et al.*, 1997).

#### **7-2-1-2 Les régulateurs de croissance des insectes perturbant la synthèse de la cuticule**

Les inhibiteurs de synthèse de la chitine sont des régulateurs de croissance d'insectes qui perturbent le processus de mue chez les insectes immatures, la mue étant perturbée de différentes manières : soit la mue est empêchée et l'insecte meurt à l'intérieur de son ancienne cuticule, soit elle est initiée mais n'est pas achevée et l'ancienne capsule céphalique reste attachée à la région mandibulaire de la nouvelle capsule céphalique, empêchant ainsi les larves de se nourrir (Berry *et al.*, 1993), ces produits sont des dérivés de benzoyle urées (Hajjar, 1985 in Demark et Bennett, 1989).

#### **7-2-2 Bioinsecticides à base d'extraits de plantes**

Actuellement la lutte phytosanitaire se dirige de plus en plus vers l'utilisation de moyens naturels pour combattre les ravageurs des cultures. Cette tendance est dictée par un souci majeur d'actualité qui vise à réduire le plus possible le recours aux pesticides qui polluent l'environnement. Parmi ces moyens naturels figure l'utilisation des extraits végétaux comme bioinsecticides (Grethead *et al.*, 1994).

Les biomolécules appartenant au métabolisme secondaire des plantes telles que: les terpènes, les alcaloïdes, les glucosides, les polyphénols et les huiles essentielles, sont facilement biodégradables par voie enzymatique, aucun phénomène de bioamplification n'ayant été décrit (Isman, 2002). Ces métabolites secondaires ne développent que peu de toxicité pour les vertébrés et sont régulièrement consommés dans l'alimentation (Regnault-Roger *et al.*, 2002).

##### **7-2-2-1 L'utilisation des huiles essentielles dans la lutte contre les insectes**

Les huiles essentielles sont des mélanges très complexes de monoterpénoïdes, de sesquiterpénoïdes et des phénols (Isman, 2002). Ce sont des produits obtenus à partir des végétaux dans lesquels les caractéristiques odoriférantes et aromatiques sont concentrées

(Pruthi, 1980). Les huiles essentielles peuvent être extraites par hydrodistillation, distillation par vapeur d'eau et hydrodiffusion (Tuley de Silva, 1995).

Les propriétés insecticides des huiles essentielles se manifestent sur de nombreux modèles, leurs toxicités s'exerçant de plusieurs manières : une toxicité inhalatoire sur les insectes adultes, une action larvicide, ovicide, stérilisante, antiappétente et répulsive. Ces actions ont fait l'objet de plusieurs études (Hamraoui et Regnault-Roger, 1997 ; Regnault-Roger *et al.*, 2002). La sensibilité d'un insecte pour une huile essentielle évolue en fonction de son cycle biologique. La cible d'action de ces huiles au niveau des insectes est absente chez l'humain ce, ce qui fait qu'aucune toxicité directe sur l'homme n'a été, pour le moment, mise en évidence. En effet, les récepteurs chimiques de ces huiles chez les insectes n'existent pas dans le système nerveux des mammifères (Isman, 2000).

Ainsi, il a été montré que plusieurs composés des huiles essentielles (thymol, eugenol) sont des neurotoxines qui interfèrent avec le neurotransmetteur octopamine unique aux arthropodes (Isman, 2002). A cause de leur faible persistance, les huiles essentielles des plantes aromatiques ne présentent pas de risques pour l'environnement. Leur activité peut varier en fonction des stades du cycle de vie d'un insecte (Regnault-Roger, 2002).

#### **7-2-2-2 L'utilisation des composés phénoliques dans la lutte contre les insectes**

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules largement répandues dans la nature. On les trouve dans les plantes depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols naturels sont des métabolites secondaires, constitués d'un ou plusieurs cycle benzoïques portant un ou plusieurs groupement hydroxyles (Bruneton, 1993 ; Guignard, 2000).

Ces molécules complexes sont représentées par plusieurs familles : dérivés des acides benzoïques, et cinnamiques, coumarines, flavonols, flavones, flavanes, flavonones, chalcones, anthocyanes, stilbènes. Les composés phénoliques jouent un rôle très important dans la protection des végétaux. Certains polyphénols ont une action insecticide, d'autres ont un effet attractif. La composition de certains insecticides comprend à la fois une substance insecticide autre qu'un polyphénol et un polyphénol présentant un effet de synergie. Les polyphénols attirent les insectes et les immobilisent à proximité de l'autre insecticide à action rapide. L'effet attractif des polyphénols permet de masquer l'effet répulsif des substances insecticides. Au niveau enzymatique, ils exercent une action inhibitrice de l'activité des enzymes hydrolytiques parasitaires telles que les pectinases, les cellulases et les protéases. Ils peuvent

également inhiber la production des enzymes hydrolytiques et la biosynthèse de toxines parasitaires. D'autres part, ils entraînent des altérations membranaires et des inhibitions au niveau de la chaîne de transport des électrons ou de biosynthèse d'ARN et d'ADN (El-Modafar et El-Boustani, 2002).

Sur l'état général des insectes, les polyphénols provoquent une perturbation de la motricité naturelle de l'insecte. Celle-ci peut être rapide : dès le premier jour pour la quercétine, ou plus tardive, le quatrième jour, pour la naringine. Elle s'accompagne dans certains cas d'un effet « knock down ». Au bout de huit jours, tous les insectes sont dans un état comateux ou morts (Regnault-Roger, 2002 in Regnault-Roger *et al.*, 2002).

A ces effets s'ajoute une inhibition de la reproduction par diminution de fécondité et un effet ovicide et larvicide limitant le renouvellement des générations. L'ensemble des effets se conjuguent pour amoindrir le flux des insectes et améliorer leur contrôle (Regnault-Roger, 2002 in Regnault-Roger *et al.*, 2002).

### **7-2-2-3 L'utilisation des alcaloïdes dans la lutte contre les insectes**

Il a été supposé pendant longtemps que les alcaloïdes étaient essentiellement des molécules d'excrétion et de stockage de métabolisme azoté voire de régulation de croissance. Il est admis maintenant que ces alcaloïdes jouent sans aucun doute un rôle primordial de défense chez les plantes contre les pathogènes et prédateurs (Guignard, 2000). Les alcaloïdes sont des composés insecticides aux faibles concentrations et également toxiques pour les vertébrés. Chez les plantes ils sont sous forme minérale oxydée non toxique. Dans le tube digestif de certains insectes herbivores, en milieu alcalin, ces alcaloïdes sont réduits en molécules organiques non chargées et toxiques traversant facilement les membranes biologiques et tuant irrémédiablement leurs prédateurs. De plus ces insectes deviennent, comme les plantes qu'ils ont ingérées, des formes redoutables pour leurs propres prédateurs (Taiz et Zeiger, 2006).

. Leur mode d'action est très variable mais la plupart affecte les récepteurs du système nerveux (Rattan, 2010). Les alcaloïdes sont trouvés en quantités considérables chez plusieurs espèces appartenant aux Annonaceae, Apocynaceae, Fumariaceae, Lauraceae, Rutaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Papaveraceae et Fabaceae (Bruneton, 1993). Ils s'accumulent dans la totalité de la partie aérienne (graines, tige et feuille) (Taiz et Zeiger, 2006). Les plantes alcaloïfères sont répulsives pour les insectes (Rattan, 2010). La nicotine fut le premier alcaloïde isolé et utilisé contre les insectes piqueurs suceurs des cultures vivrières. Les

propriétés insecticides d'autres alcaloïdes végétaux ont été mises en évidence : l'anabasine et la vératrine, qui sont des dérivés de la nicotine. Ces alcaloïdes développent la même activité neurotoxique que les pyrèthres en ralentissant la fermeture des canaux Na<sup>+</sup> dépendants : en conséquence ces molécules perturbent la dépolarisation membranaire, provoquant ainsi une paralysie avant la mort.

#### **7-2-2-4 L'utilisation de l'azadirachtine**

Le neem, *Azadirachta indica*, connu, vénéré, et utilisé dans le sous-continent indien depuis plus de 4000 ans contre les insectes, doit son activité insecticide principalement à des composés limonoïdes, principalement l'azadirachtine, la salanine et la nimbine et leurs analogues, l'azadirachtine ayant une activité prédominante. Plus de 100 composés ont été identifiés. Tous ces composés ne présentent pas la même activité : les salanines et les nimbines sont des antiappétents. Les azadirachtines sont des inhibiteurs de croissance. Cette dernière activité est le résultat d'une intervention sur la synthèse des ecdystéroïdes par inhibition de la libération de l'hormone prothoracicotrope (PTTH) produite par les cellules neurosécrétrices. Les mues ne peuvent plus se produire normalement, interrompant le cycle reproductif de l'insecte (Regnault-Roger, 2002 in Regnault-Roger *et al.*, 2002).

Les propriétés antiacridiennes du neem semblent être très intéressantes. Les extraits de fruits, de feuillages ou d'écorces de cette espèce protègent efficacement les cultures des attaques acridiennes. Appliqués directement sur les larves et sur des imagos de criquet, ces extraits retardent la croissance et la maturation sexuelle, engendrant de nombreuses malformations et provoquant une mortalité élevée au bout de deux semaines (Lecoq *et al.*, 2001).

## II - Données bibliographiques sur *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk)

### 1- Classification

Selon Angiosperm Phylogeny Group « APG » (1998), la plante *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) est classée dans le règne végétal comme suit :

- Règne : Plantae
- Embranchement : Spermatophyta
- Sous embranchement : Angiospermae
- Classe : Eudicotyledonae
- Sub-classe : Rosidae
- Ordre : Sapindales
- Famille : Rutaceae
- Sous Famille : Rutoïdeae
- Tribu : Ruteae
- Genre: *Haplophyllum*
- Espèce: *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk).

L'ancien nom de *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) est *Ruta tuberculatum*, alors que son nom français est la rue du désert. La plante est connue au Sahara algérien sous le nom de Dafraa, Maska, ou Mesika. Dans le Sultanat d'Oman, elle est appelée Shagarat al baootha, qui signifie « plante du moustiqu » (Miller *et al.*, 1988).

### 2- Description botanique

*H. tuberculatum* est une plante vivace atteignant 30 à 60 cm de hauteur (Fig.5) à tiges ramifiées dès la base, à port évasé. Ses feuilles sont petites (Figs.6 et 7), mais dans certains cas peuvent être grandes selon la présence d'eau. Elles sont recouvertes de pustules sur leur face inférieure. Les fleurs sont jaunes (Fig.8), elles donnent un fruit formé de 5 carpelles (Fig.9), chacune contenant une ou deux graines noires (Fig.9). C'est une plante malodorante, ce qui explique peut-être pourquoi elle n'est pas consommée par les herbivores (Paris et Nothis, 1978).

### 3- Distribution géographique

*H. tuberculatum* est une plante saharo-arabique qui se développe dans les dépressions sablonneuses. En Afrique, on la rencontre en Algérie, en Egypte, en Libye, au Maroc, en Tunisie et au Soudan (Bruneton, 1993). Elle est aussi présente en Iraq, au Pakistan (Nasir et

Ali, 1980), dans le Sultanat d'Oman (Miller *et al.*, 1988), en Arabie Saoudite (Al-Yahya *et al.*, 1992) et à l'Emirat Arabies Unies (Al-Yousuf *et al.*, 2005).



**Figure 5.** Aspect de la plante *Haplophyllum tuberculatum* ([www.sahara-nature.com](http://www.sahara-nature.com))



**Figure 6.** Les feuilles de *Haplophyllum tuberculatum* ([www.sahara-nature.com](http://www.sahara-nature.com))



**Figure 7.** La glande de *Haplophyllum tuberculatum* ([www.sahara-nature.com](http://www.sahara-nature.com))



**Figure 8.** Les fleurs de *Haplophyllum tuberculatum* (www.sahara-nature.com)



**Figure 9.** Les fruits de *Haplophyllum tuberculatum* (www.sahara-nature.com)

#### **4- Utilisations traditionnelles**

*H. tuberculatum* est utilisée en médecine populaire pour traiter certaines affections telles que le malaria, la polyarthrite rhumatoïde et les troubles gynécologiques (Al-Yahya *et al.*, 1992) et pour la protection contre les morsures des scorpions et les piqûres d'insectes (Miller *et al.*, 1988).

Le jus des feuilles de cette plante est utilisé comme remédiant des maux de tête ainsi que pour le traitement de l'irritation et la décoloration dermique. Il est également utilisé pour le traitement de certaines infections et maladies parasitaires (Mossa *et al.*, 1987).

Dans le nord d'Oman, *H. tuberculatum* est utilisée pour protéger le bétail contre les insectes et les mouches (Miller *et al.*, 1988). Il a été également trouvé que l'extrait éthanolique de la partie aérienne de cette plante possède une bonne activité insecticide contre *Culex quinquefasciatus* (Mohsen *et al.*, 1989).

A faible dose, elle est utilisée pour parfumer le thé et le beurre de chèvre (Paris et Nothis, 1978).

## 5- Travaux phytochimiques antérieurs sur *Haplophyllum tuberculatum*

L'analyse phytochimique des différentes parties de la plante a fait l'objet de plusieurs études, beaucoup de travaux ayant été consacrés à l'étude de la composition des huiles essentielles : En Emirat Arabies Unies, l'analyse par GC-MS des huiles essentielles de *H. tuberculatum* a montré qu'au sein de la même espèce, la composition varie considérablement en fonction des régions et des saisons de récoltes (Al-Yousuf *et al.*, 2005). D'autre part, des investigations antimicrobiennes et antifongiques des huiles essentielles de *H. tuberculatum* ont été réalisées. L'activité antimicrobienne et la présence de composés insecticides comme le limonène dans les huiles essentielles de *H. tuberculatum* sont la conséquence des utilisations traditionnelles de cette plante dans les traitements des infections de la peau et la protection du bétail contre les insectes (Al-Burtamani *et al.*, 2005).

Les alcaloïdes de la plante ont également fait l'objet de nombreuses études : *H. tuberculatum* est considérée comme plante alcaloïfère par Sheriha *et al.* (1985), Al-Yahya *et al.* (1992) et Al-Shamma *et al.* (1979) ont pu isoler plusieurs alcaloïdes tels que : la dictamine, l'haplophine, la roubustine, la fagorine et l'evoxine.

D'autres nouveaux alcaloïdes ont été isolés à partir de la partie aérienne : la tubérine par Mc-Phail *et al.* (1990), l'haplotubinone et l'haplotubine par Al-Rehaily *et al.* (2001) et finalement la tubacétine et la tubasénécine par Al-Yahya *et al.* (1992).

D'autres études phytochimiques ont révélées la présence de substances naturelles biologiquement actives autres que les alcaloïdes et les huiles essentielles. Les liganes constituent le deuxième grand groupe après les alcaloïdes chez le genre *Haplophyllum* (Al-Abed *et al.*, 1998 ; Razakova *et al.*, 1972). Les coumarines et les flavonoïdes ont été trouvés également (Ulubelem *et al.*, 1993 ; Philippini *et al.*, 1998).

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

## Matériel et méthodes

### I-Matériel

#### 1-Matériel biologique

##### 1-1 Les insectes : *Locusta migratoria cinerascens*

Nos essais ont été conduits sur une souche de criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* originaire de la région d'Adrar. Un élevage de masse a été réalisé au laboratoire selon la méthode décrite par Pener *et al.* (1989 b) à partir des adultes récoltés sur le terrain. Larves et adultes ont été élevés dans des cages en bois de dimensions 45 x 50 x 50 cm à une température comprise entre 30 et 32°C, une humidité relative comprise entre 50 et 70 % et une photopériode de 12 h d'éclairement et de 12 h d'obscurité. La nourriture distribuée était à base de graminées (*Avena sterilis*) et un complément de son de blé.

##### 1-2 La plante : *Haplophyllum tuberculatum*

La plante a été récoltée dans le même biotope que le criquet migrateur, dans la région d'Adrar, au stade végétatif, au printemps 2008. La partie aérienne de la plante récoltée (feuilles et tiges) a été soigneusement nettoyée, séchée à l'ombre et à l'air libre puis réduite finement en poudre par broyage.

#### 2- Matériel non biologique

##### 2-1 Le téflubenzuron « TFB »

Commercialisé sous le nom de Nomolt®, le téflubenzuron nous a été fourni aimablement par le service de la lutte antiacridienne de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV) d'Alger, Algérie. Le produit se présente sous forme de concentré émulsionnable dosé à 50 g de matière active/l.

### II- Méthodologie

#### 1- Caractérisation phytochimique de la plante *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk)

##### 1-1 Criblage phytochimique préliminaire de la plante

Les tests phytochimiques réalisés sur *H. tuberculatum* ont porté sur quelques substances du métabolisme secondaire. Les tests ont été effectués soit avec la poudre de la plante, soit avec l'infusée ou le décocté et ce, suivant les méthodes décrites par Paris et Nothis (1978).

### **1-1-1 Préparation de l'infusée à 20 %**

La poudre de plante étudiée (10 g) a été transférée dans 50 ml d'eau distillée bouillante. Après 30 min d'infusion, la préparation a été filtrée et le filtrat ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée.

### **1-1-2 Préparation de décocté à 1 %**

La poudre de plante étudiée (0,5 g) a été portée à ébullition dans 50 ml d'eau distillée pendant 15 min, le filtrat a été ajusté ensuite à 50 ml avec de l'eau distillée.

### **1-1-3 Recherche des Alcaloïdes**

La poudre de la plante séchée et broyée a été macérée dans une solution d'HCl 1N sous agitation magnétique pendant deux heures. Après filtration, l'extrait aqueux acide obtenu a été traité par deux réactifs:

- Réactif de Mayer : réaction positive (en tube à essais) → formation de précipité blanc crème.
- Réactif de Dragendorff : réaction positive (sur gel de silice) → traces oranges à rouges.

### **1-1-4 Recherche des tannins**

Dans un tube à essai, quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  à 5 % ont été ajoutées à 5 ml de l'infusée à 20 %.

Réaction positive : apparition d'une coloration bleu noir.

### **1-1-5 Recherche des saponosides**

La recherche des saponosides repose sur un paramètre important : l'indice de mousse. Des dilutions de (1/10 jusqu'à  $10^{-10}$ ) de décocté à 10 % ont été préparées dans une série de tubes à essais (16 cm × 1 cm). Après une forte agitation dans le sens de la longueur des tubes suivie d'un repos de 15 min, la hauteur de la mousse a été mesurée :

Réaction positive : si la hauteur de mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice de mousse est inférieur à 100, c'est-à-dire présence de saponosides, la réaction est négative dans le cas contraire.

### **1-1-6 Recherche des coumarines**

Dans un tube à essai, 1 g de poudre de plante étudiée a été humidifié avec quelques gouttes d'eau distillée, puis placé dans un bain-marie (à 100°C), couvert d'un papier filtre mouillé avec une solution de soude diluée.

Réaction positive : le papier filtre examiné sous lumière UV à 365 nm présente une fluorescence jaune.

### **1-1-7 Recherche des anthocyanes**

La poudre de plante (10 g) a été dissoute dans 10 ml d'eau distillée préalablement portés à ébullition. Après 30 min de contact, l'infusion a été soumise à une filtration sous vide et le filtrat obtenu fut ajusté à 100 ml d'eau distillée ou d'ammoniaque à 5 ml d'infusée (10 %).

Réaction positive : coloration rouge en milieu acide, bleu en milieu alcalin.

### **1-1-8 Recherche des iridoïdes**

2 ml de l'infusée a été chauffé en présence de quelques gouttes d'HCl concentré.

Réaction positive : coloration bleue.

### **1-1-9 Recherche des flavanoïdes**

20 g de plante préalablement broyée a été mis dans 100 ml de méthanol absolu bouillon, puis l'ébullition a été maintenue sous réfrigérant à reflux pendant 30 min. Après filtration et séchage, le marc a été épuisé à nouveau dans les mêmes conditions, mais avec du méthanol 80 %. Les solutions méthanoliques furent alors mises en commun après filtration puis concentrées sous pression réduite.

L'extrait précédemment préparé a été dilué avec de l'eau jusqu'à décoloration presque complète, puis cinq gouttes de soude concentré (NaOH) ont été additionnées à la fin.

Réaction positive : coloration jaune en présence des flavanoïdes.

## **1-2- Préparation et analyse quantitative et qualitative de extrait méthanolique brut et des alcaloïdes bruts de *Haplophyllum tuberculatum***

### **1-2-1 Préparation de l'extrait méthanolique brut : EM-Ht**

L'extrait méthanolique brut de la partie aérienne de la plante a été préparé à partir des feuilles et des tiges séchées à l'ombre et à l'air libre et finement réduites en poudre afin

d'augmenter la surface de contact solvant-échantillon. L'extraction a été faite selon la méthode de Owen et Johns (1999) modifiée, qui utilise le méthanol comme solvant d'extraction : c'est un procédé d'extraction solide-liquide discontinu qui repose sur une extraction par macération de 50 g de poudre dans 250 ml de méthanol sous agitation magnétique pendant trois jours, le filtrat est alors récupéré. L'extraction du résidu dans 100 ml de méthanol fut répétée pendant 24 à 48h. Les deux filtrats furent récupérés et soumis à une évaporation à basse pression à 40°C. L'extrait sec fut alors récupéré dans des piluliers en verre avec un petit volume de méthanol, puis laissés à évaporer à sec dans une étuve réglée à 40°C. Cet extrait a servi aux différents traitements biologiques effectués sur les larves et femelles de *L. migratoria*.

### **1-2-2 Fractionnement de l'extrait méthanolique brut**

Le principe de fractionnement des différents composés de l'extrait méthanolique brut repose sur leur degré de solubilité dans des solvants organiques, certains étant solubles dans l'eau et l'alcool alors que d'autres ont une hydrosolubilité extrêmement faible. La procédure suivie a été la même que celle suivie pour la préparation de l'extrait brut sauf que le solvant d'extraction était un mélange méthanol/eau (70 : 30 V / V). Après filtration et évaporation à basse pression à 40°C, la phase aqueuse ainsi obtenue fut dégraissée et dépigmentée avec trois lavages successifs à l'hexane. Afin de séparer les fractions aglycones et glycosilées, la phase aqueuse a été extraite à l'éther diéthylique à volume égal pour obtenir une phase organique contenant les composés aglycones et les aglycones méthoxylés. La phase aqueuse restante a subi une série d'extractions à l'acétate d'éthyle afin de récupérer les fractions monosides. L'extraction de la phase aqueuse restante contenant les composés glycosilés plus polaires comme les di-tri et tétra glycosidiques a été faite avec le butanol. Les extraits ainsi obtenus furent alors dénommés selon le solvant qui a permis leur séparation : extrait d'éther diéthylique, extrait d'acétate d'éthyle et extrait butanolique.

Les trois fractions obtenues ont été soumises à une concentration à basse pression à 40°C, puis pesées pour déterminer les rendements d'extractions exprimés par rapport à 100 g de matière sèche. Ces extraits ont été par la suite caractérisés par analyse chromatographique sur couche mince « CCM » et analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse « GC-MS ».

### **1-2-3 Extraction des alcaloïdes bruts**

L'extraction des alcaloïdes bruts a été faite selon la méthode de Bruneton (1999) qui consiste à faire une macération dans un milieu acide suivi d'une extraction liquide-liquide. 50 g de la poudre de *H. tuberculatum* a été macérée dans 400 ml HCl 1N, suivi d'une filtration et d'une délipidation à l'hexane. Le passage des alcaloïdes de la forme sel à la forme organique a été fait par alcalinisation du milieu. La solution basique a été extraite avec le chloroforme jusqu'à réaction Mayer négative. Les solutions organiques obtenues ont ensuite été réunies, lavées à l'eau distillée puis séchées sur sulfate anhydre de sodium et enfin évaporées à basse pression à l'aide d'un évaporateur rotatif Heidolph, Laborota 4001- effecint. L'extrait sec obtenu représente les alcaloïdes bruts.

### **1-2-4 Analyse quantitative des extraits bruts : l' EM-Ht et les alcaloïdes totaux**

#### **1-2-4-1 Le rendement**

Le rendement des différents extraits obtenus a été déterminé en calculant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = (P1-P0) 100 / P$$

Avec ;

P = Poids initial de l'échantillon (g)

P0 = Poids du pilulier vide (g)

P1 = Poids du pilulier après évaporation totale (g)

#### **1-2-4-2 Teneur de l'EM-Ht en composés phénoliques**

Le dosage des composés phénoliques a été effectué selon la méthode citée par Wong *et al.* (2006), avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu. Celle-ci repose sur l'oxydation des hydroxyles libres des composés phénoliques par le mélange d'acide phosphomolybdique et phosphotungstique qui compose le réactif de Folin-Ciocalteu (de couleur jaune), la réduction de ces acides donnant naissance à des oxydes de tungstène et de molybdène colorés en bleu. Cette coloration dont l'absorbance mesurée à 760 nm est proportionnelle au taux de composés phénoliques (Riberau-Gayon, 1968).

Une courbe standard a été générée à partir de solutions d'acide gallique de différentes concentrations préparées à partir d'une solution mère de 2 mg d'acide gallique/ml d'éthanol. 1 ml de chaque solution a été introduit dans des tubes à essais contenant 5 ml d'eau distillée.

Un volume de 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau) a été additionné dans chaque tube.

Après 3 minutes, 2 ml de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à 20% (m/v) ont été ajoutés. Ces solutions furent maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance de chaque solution a été effectuée à une longueur d'onde de 760 nm contre un blanc qui contenait de l'éthanol à la place d'acide gallique. Le dosage des composés phénoliques de l'EM-Ht a été effectué en suivant la même procédure, toutes les mesures ayant été faites en triplicata. La concentration des composés phénoliques a été déduite à partir de la courbe étalon. Le résultat a été exprimé en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g).

### **1-2-5 Analyse qualitative des extraits bruts par chromatographie sur couche mince « CCM »**

L'analyse qualitative des extraits bruts : l'EM-Ht et ses différentes fractions ainsi que l'extrait alcaloïdique brut a été faite par chromatographie sur couche mince. La phase stationnaire est le gel de silice (Merck) à 0,25 mm d'épaisseur coulé sur support en aluminium. Le chromatogramme a été développé sur une seule direction, sur une ligne de dépôt située à 1,5 cm du bord de la plaque. Les échantillons des divers extraits (alcaloïdes bruts et les différentes fractions de l'EM-Ht) ont été déposés sous forme de spots à l'aide d'une pipette Pasteur, de façon qu'ils soient séparés d'au moins 1,5 cm pour éviter l'interaction des taches lors de leur migration.

La plaque fut introduite ensuite dans la cuve de chromatographie saturée au préalable avec le système solvant. Après développement, la plaque fut retirée de la cuve (lorsque la phase mobile atteint le front de migration à environ 0,5 cm du bord supérieur) puis séchée à l'air libre.

Dans le but de déterminer le système solvant permettant une bonne séparation des extraits analysés, plusieurs minis CCM ont été réalisées avec plusieurs systèmes solvant :

#### **Systèmes solvants utilisés pour la séparation des différentes fractions de l'EM-Ht**

-Système1 : Acétate d'éthyle : acide formique : acide formique glaciale : eau distillée - (100 :11 :11 :27).

-Système2 : Acétate d'éthyle : méthanol : eau (100 :13,5 :10)

-Système3 : Butanol : acide acétique : eau (4 :1 : 5)

- Système 4 : Chloroforme : méthanol : eau (1 : 1 : 0,5)
- Système 5 : Ether de pétrole : acétate : acide formique (35 : 10 : 5)
- Système 6 : Chloroforme : méthanol : acide formique (44 : 35 : 25)

### **Systèmes solvants utilisés pour la séparation des alcaloïdes bruts**

- Système 1 : Chloroforme : méthanol (9 : 1)
- Système 2 : Chloroforme : acétone (9 : 1)
- Système 3 : Hexane : acétate d'éthyle (8 : 2)
- Système 4 : Chloroforme : acétate d'éthyle : acétone (5 : 4 : 1)
- Système 5 : Acétate d'éthyle : méthanol : eau (77 : 13 : 10)
- Système 6 : Chloroforme : méthanol : ammoniacque concentré (90 : 9 : 1)
- Système 7 : Etherdiéthylique : méthanol : ammoniacque concentré (44 : 5 : 1)
- Système 8 : Toluène : acétone : éthanol ammoniacque concentré (40 : 4 : 8 : 3).

Les plaques ont été observées au préalable sous lampe UV à 254 et 366 nm. Les couleurs et les RF des spots ont été alors déterminés avant et après révélation par les réactifs appropriés. La révélation des alcaloïdes a été faite par pulvérisation des chromatogrammes par le réactif de Dragendorff qui permet l'apparition des taches de couleur orange caractérisant les alcaloïdes.

La révélation des différentes fractions de l'EM-Ht a été faite par le passage des chromatogrammes sur les vapeurs d'ammoniacque permettant l'apparition des taches de couleurs jaunâtres caractéristiques des polyphénols.

### **1-2-6 Analyse qualitative des extraits par chromatographie phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse « GC-MS »**

Les fractions : acides phénoliques, acétate d'éthyle, éther diéthylique et la fraction butanolique ont été analysées par GC-MS en utilisant un chromatographe Hewlett Packard GC 5890 série II, couplé à un spectromètre de masse Hewlett Packard 5972. Le système avait aussi un injecteur automatique Hewlett Packard 7673.

Pour chaque fraction, environ 1 mg de chaque échantillon a été déposé dans un tube en verre et 500 µl de diméthyleformamide (DMF) a été ajouté. Par la suite, 20 µl de N,O-bis[triméthylsilyl] acetamide (BSA) a été ajouté. Les échantillons ont été brassés au vortex durant 30 secondes et analysés par GC-MS.

## Conditions GC-MS

- La colonne qui a été utilisée est de type DB-17MS (30 m x 0,25 µm)
- La température initiale du four était à 120°C et maintenue durant 2 minutes.
- L'augmentation de la température se fait à un taux de 5 °C/min jusqu'à 290°C et maintenu 7 minutes.
- Les températures d'injecteur et de détecteur étaient de 240°C et de 290°C respectivement
- Le gaz porteur était l'hélium circulant à un débit de 1 ml/min.
- L'échantillon a été injecté automatiquement en mode splitless avec un volume de 1,0 µl.

## 2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques variables physiologiques et endocriniennes chez les larves de cinquième stade de *Locusta migratoria*

### 2-1 Evaluation de l'activité insecticide

#### 2-1-1 Traitement des larves

L'évaluation de l'activité larvicide de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et du téflubenzuron a été faite sur des larves de cinquième stade nouvellement écloses et synchronisées. Le traitement a été fait par ingestion forcée d'une solution éthanolique (50 µl d'éthanol contenant soit l'EM-Ht soit le TFB) au niveau de l'œsophage à l'aide d'une micropipette. Le lot témoin a reçu de l'éthanol seul.

Les gammes de doses choisies pour les traitements étaient de : 350, 500, 1000, 1250, et 1500 µg/larve pour EM-Ht de *H. tuberculatum* et de 2.5, 5, 10, 15, 20 et 25 µg/larve pour le TFB. Pour chaque dose, 50 larves, réparties en cinq lots comportant chacun 10 larves, ont été traitées. Parallèlement aux lots traités, un lot de larves traitées avec de l'éthanol seul est présenté comme témoin.

#### 2-1-2 Evaluation de l'activité insecticide

L'évaluation de l'efficacité du TFB et de EM-Ht de *H. tuberculatum* a été faite en calculant le pourcentage de mortalité observée, qui a été corrigée par la formule d'Abbot (1925).

Le pourcentage de mortalité observée fut calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ de mortalité observée} = \text{Nombre de morts} \times 100 / \text{Nombre total des individus.}$$

Les pourcentages de mortalité observée ont été corrigés par la formule d'Abbot (1925)

$$\% \text{ de mortalité corrigée} = \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100 \quad \text{avec,}$$

M1 : % de mortalité dans le lot témoin.

M2 : % de mortalité dans le lot traité.

## **2-2 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht de *Haplophyllum tuberculatum* et du TFB sur l'histologie du tube digestif des larves de cinquième stade de *Locusta migratoria***

La méthodologie suivie a été celle de Martoja et Martoja (1967), qui comporte plusieurs étapes :

### **2-2-1 Prélèvement et fixation des tubes digestifs**

Le sacrifice des larves traitées à l'EM-Ht ou au TFB aux doses les plus élevées a été fait après observation des premiers signes de l'intoxication pour les traitées à l'EM-Ht et à l'approche de la mue imaginale pour les traitées au TFB. Chaque larve a été fixée par des épingles entomologiques sur sa face dorsale, puis disséquée de la tête jusqu'à l'extrémité abdominale. La totalité du tube digestif a été prélevée, puis placée dans un pilulier étiqueté et rempli d'un liquide fixateur : le Bouin Hollande. La période de fixation était de 8 jours.

### **2-2-2 Lavage, déshydratation et imprégnation à la paraffine**

Les tubes digestifs ont été lavés à l'eau courante afin d'éliminer l'excès du liquide fixateur puis déshydratés en effectuant des passages successifs des tubes digestifs dans des bains d'alcool d'ordre croissant, soit :

- Deux bains d'alcool 70° pendant 30 min chacun ;
- Deux bains d'alcool 90° pendant 30 min chacun ;
- Deux bains d'alcool 100° pendant 30 min chacun ;
- Deux bains de toluène pendant 15 min chacun.

Les pièces provenant du dernier bain de toluène ont été mises directement dans un bain mélange homogène moitié butanol moitié paraffine en fusion dans une étuve réglée à 60°C pendant 1 heure.

Les pièces furent alors passées dans un 1<sup>e</sup> bain de paraffine pure pendant une heure puis un 2<sup>e</sup> bain pendant une heure et demi.

### **2-2-3 Inclusion dans la paraffine et confection des blocs**

L'inclusion ou la mise en blocs de l'ensemble des pièces, consiste à faire sortir les pièces du dernier bain de paraffine pure et à les déposer dans un moule (barre de Leuckart) contenant la paraffine pure fondue en les orientant selon le type de coupe qu'on veut obtenir.

#### **2-2-4 Microtomisation et étalement des coupes**

Les coupes de 7  $\mu\text{m}$  ont été confectionnées grâce à un microtome (Bright 5040). Puis déposées sur des lames, leur collage se faisant avec de l'eau gélatinée sur une platine chauffante à une température inférieure de celle de fusion de la paraffine. Après étalement, l'eau en surplus a été éliminée. Le séchage des coupes a été effectué dans une étuve réglée à 40°C pendant 12 heures.

#### **2-2-5 Coloration des coupes**

La coloration topographique de Mallory a été choisie. Plusieurs manipulations intermédiaires étaient nécessaires pour passer de la coupe sèche collée sur lame à l'observation au microscope.

Les lames ont été chauffées au préalable pendant 30 secondes à une minute afin de faire fondre la paraffine. Le déparaffinage complet et la réhydratation ont été réalisés grâce au passage des lames par :

- un bain de toluène de 1 minute ;
- un bain d'alcool absolu de 30 s ;
- un bain d'alcool 90° de 30 s ;
- un bain d'alcool 70° de 30 s ;
- un bain d'eau distillée de 1 min pour la réhydratation des pièces.

Les coupes ont été colorées en premier lieu à la fuschine acide pendant 5 min et rincées à l'eau distillée, suivi d'une autre coloration au mélange de Mallory pendant 5 min. Les coupes ont été rincées également puis déshydratées.

Le montage des coupes entre lames et lamelles a été fait à l'aide de baume du Canada.

## **2-3 Evaluation de l'effet de l' EM-Ht de *Haplophyllum tuberculatum* et du TFB sur les titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques des larves de cinquième stade de *Locusta migratoria***

### **2-3-1 Traitement des larves**

L'effet de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et du TFB sur l'évolution des titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques a été étudié chez des larves de cinquième stade nouvellement éxuvées, synchronisées et traitées par ingestion aux doses sublétales : 350 µg/larve pour l'EM-Ht et 5 µg/larve pour le TFB. L'étude a été faite parallèlement à un lot témoin.

### **2-3-2 Prélèvement de l'hémolymph**

Le prélèvement de 5 µl d'hémolymph/larve a été fait quotidiennement sur 5 larves par lot (témoin et traités), du premier jour après l'émergence des L5 jusqu'à la mue imaginale à l'aide d'une pipette graduée au niveau de la patte méthathoracique. Chaque échantillon d'hémolymph fut ajouté à 300 µl de méthanol puis conservé à -20°C pour le dosage ultérieur des ecdystéroïdes.

### **2-3-3 Extraction d'ecdystéroïdes hémolymphatiques**

L'hémolymph prélevée fut homogénéisée puis centrifugée à 5000 rpm pendant 10 min, suivi de la collecte du surnageant dans un autre tube Eppendorf et de la resuspension du culot dans 50 µl de méthanol pour une seconde extraction. Les deux surnageants ont été mis en commun puis évaporés sous vide dans un concentrateur SpeedVac® (Savant).

### **2-3-4 Mesure des titres d'ecdystéroïdes par radioimmunoessai**

Les titres d'ecdystéroïdes ont été mesurés par la technique de radioimmunoessai « RIA » selon la méthode de Borst et O'Connor (1972) telle que modifiée par Chang et O'Connor (1979), utilisant le <sup>3</sup>H-ecdysone comme traceur et 20-hydroxyecdysone (20E) comme standard. L'antisérum utilisé (« antiecdysone B ») a été produit par le Dr Walter E. Bollenbacher (Université of North Carolina, Chapel Hill) et distribué par le Prof Ernest S. Chang (Bodega Marine Laboratory, Bodega, Bay, CA). Cet anticorps est très efficace pour la détection de l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone (50 % de compétition à 250 pg de 25-déoxyecdysone, 325 pg d'ecdysone, 600pg de 20-hydroxyecdysone et > 10 000 pg de 3-déhydroecdysone).

Des tubes de cultures jetables de 6 × 50 mm (Fischer Scientific) ont été utilisés tout au long de ces analyses. Une courbe standard a été générée à chaque essai, en ajoutant à une série de tubes des quantités connues de 20E (Sigma). Les concentrations utilisées étaient : 0, 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 2000, et 4000 pg. Ces concentrations ont été obtenues par dilutions d'une solution stock de 50 ng/ml de 20E. Les solvants des tubes standards ont été évaporés par centrifugation sous vide dans un concentrateur SpeedVac® (Savant). Un blanc, ne contenant pas de 20E, a été ajouté à la série. Toutes les mesures ont été faites en triplicata.

Les tubes contenant les quantités connues de 20E, les témoins et les échantillons expérimentaux ont ensuite reçu 100µl de tampon borate contenant approximativement 24000 dpm de <sup>3</sup>H-ecdysone, puis 100 µl d'une solution d'antisérum à 0,05 % dans le tampon borate a été ajouté aux tubes pour l'obtention d'une concentration finale de 0,025 % d'antisérum. Tous les tubes témoins ont reçu alors 100 µl d'une solution de sérum prè-immun 6 % dans le tampon borate (facilitant la formation d'un culot). Les contenus des tubes ont été bien vortexés avant d'être incubés à 4°C durant une nuit.

Après incubation, les tubes ont été placés sur glace et gardés ainsi durant toutes les étapes subséquentes. L'incubation a été terminée par l'ajout de 200 µl de sulfate d'ammonium saturé à froid suivi d'une incubation de 20 minutes pour favoriser la précipitation du complexe. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 20 minutes à 4000 rpm, à 4°C. Le surnageant a été éliminé par aspiration sous vide. Les culots ont été lavés avec 400 µl de sulfate d'ammonium saturé à 50 % et centrifugés pendant 30 minutes à 4000 rpm à 4°C. Les surnageants ont aussi été éliminés par aspiration vacuum. Les culots ont finalement été resuspendus dans 25 µl d'eau distillée, suivi d'un ajout de 500 µl de liquide de scintillation. Les tubes ont été placés dans des tubes à scintillation en plastique de 7 ml (Fisher) pour permettre le comptage dans un compteur à scintillation liquide (Beckman LS 6000SC).

### **2-3-5 Analyse des données**

Les données de chacune des courbes standards ont été traitées par un logiciel : RIA SOLVE développé par le Centre de Foresterie des Laurentides, Service canadien des forêts, Québec. Le modèle de régression non linéaire du logiciel a permis d'ajuster les résultats prédits aux résultats observés. Une fois le modèle ajusté aux données de la courbe standard, il a été possible de connaître les valeurs en pg de 20E contenu dans les échantillons testés. Les titres ont été exprimés alors en pg de 20E/µl d'hémolymphe.

## **2-4 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht de *Haplophyllum tuberculatum* et du TFB sur la composition biochimique de la cuticule des larves du cinquième stade de *Locusta migratoria***

Les mêmes lots de larves de cinquième stade témoins et traitées aux doses sublétales : (5 µg/larve pour le TFB et 350 µg/larve pour l'EM-Ht) ayant été utilisés pour les mesures des titres des ecdystéroïdes hémolympatiques ont également servi pour l'étude de l'effet de l'EM-Ht et du TFB sur l'évolution des taux de chitine et des protéines cuticulaires.

### **2-4-1 Prélèvement de la cuticule des larves**

Les abdomens des larves témoins et traitées ont été prélevés quotidiennement du premier jour après traitement jusqu'à la mue imaginale à raison de 5 prélèvements par jour et par lot. Les téguments isolés ont été débarrassés des masses musculaires et de tissus adipeux.

### **2-4-2 Dosage des protéines et de la chitine cuticulaire**

L'extraction de la chitine et des protéines cuticulaires a été faite selon le protocole de Vincent et Clarke (1985). Chaque échantillon a été lavé dans un mélange éther/chloroforme (V/ V : 1/ 1) pendant 24 heures. Après rinçage à l'alcool 96°, la cuticule fut séchée à 60°C jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant P1. La chitine a été estimée par une hydrolyse dans une solution de NaOH 2N pendant 6 heures à 100°C. Le résidu obtenu correspondant à la chitine a été lavé à l'eau puis à l'alcool absolu et finalement à l'éther. Il fut ensuite séché jusqu'à obtention d'un poids sec constant P2. La différence de poids entre P1 et P2 représente le contenu en protéines de l'échantillon.

## **2-5 Evaluation de l'effet de l'EM-Ht et de l'extrait alcaloïdique brut de *Haplophyllum tuberculatum* sur l'activité enzymatiques de l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase des larves de cinquième stade de *Locusta migratoria***

### **2-5-1 Traitement**

L'évaluation de l'effet de EM-Ht et des alcaloïdes bruts sur l'activité de l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase, a été faite sur un lot de larves de cinquième stade nouvellement émergées traitées à la dose de 1500 µg/larve pour l'EM-Ht et pour l'extrait alcaloïdique brut, l'étude ayant été faite comparativement à un lot témoin.

### **2-5-2 Prélèvement des organes**

Les têtes des larves L5 des séries témoins et traitées à l'EM-Ht brut ou à l'extrait alcaloïdique brut de *H. tuberculatum* ont fait l'objet d'un dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase « AChE ». Les tubes digestifs ont servi aux dosages des activités spécifiques de la glutathion S-transférase « GST ». En parallèle, et pour les dosages enzymatiques, la concentration en protéines totales des échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de Bradford.

### **2-5-3 Dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase AChE**

Le dosage de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été réalisé selon la méthode d'Ellman et *al.* (1961) qui consiste à fournir à l'enzyme « AChE » un substrat artificiel, l'acétylthiocholine dont l'hydrolyse libérera de l'acide acétique et de la thiocholine. Cette dernière, en présence de DTNB (acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque), donne un produit jaune: le TNB (acide 5-thio-2- nitrobenzoïque) que l'on dose à une longueur d'onde de 412 nm.

Les têtes des larves L5 des groupes témoins et traitées ont été homogénéisées dans 1 ml de solution détergente. L'homogénat a été centrifugé (5000 tours/min. pendant 5 minutes) et le surnageant récupéré a servi comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité de l'AChE a été réalisé sur une fraction aliquote de 50 µl de surnageant à laquelle ont été ajoutés 10 µl de DTNB et 930 µl de tampon Tris (0,1 M ; pH 7). 10 µl de solution substrat acétylthiocholine ont été rajoutés. La lecture des absorbances a été faite à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc de gamme.

### **2-5-4 Dosage de l'activité spécifique de la glutathion S-transférase**

Le dosage de l'activité de la GST a été réalisé selon la méthode de Habig et *al.* (1974) basée sur la mesure photométrique de la cinétique de conjugaison du produit formé avec un substrat : le 1-chloro-2,4 dinitrobenzène « CDNB » en présence d'un co-facteur: le glutathion « GSH ». Les tubes digestifs ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate de sodium (0,1M ; pH 6). L'homogénat a été centrifugé à 14000 tours/min. pendant 30 minutes et le surnageant récupéré a servi de source d'enzyme. Une fraction aliquote du surnageant de 50 µl a été ajoutée à 850 µl de tampon phosphate (100 mM ; pH 7 à 25°C), 50 µl de CDNB (20 mM dans l'éthanol) et 50 µl de GSH (20 mM). La cuve était agitée 3 à 4 fois avant la lecture. La lecture des absorbances a été effectuée à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 900µl de tampon phosphate, 50 µl de CDNB et 50 µl de GSH.

### **3- Etude de l'effet de l'EM-Ht de *Haplophyllum tuberculatum* et du TFB sur la reproduction et les titres d'ecdystéroïdes chez les femelles de *Locusta migratoria***

#### **3-1 Traitement des imagos femelles**

Au cours des différents essais réalisés, les jeunes imagos femelles nouvellement émergés âgés de 0-12 heures suivant l'émergence ont été traités en recevant soit l'EM-Ht de *H. tuberculatum* à la dose de 1500 µg/femelle, soit le TFB à la dose de 10 µg/femelle par ingestion forcée au niveau de l'oesophage. Le lot témoin a reçu le solvant utilisé pour la dissolution des molécules testées : l'éthanol.

#### **3-2 Effet sur la reproduction**

Chacune des jeunes femelles témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB fut individuellement mise en couple dans une cage expérimentale individuelle en bois (25 x 25 x 30 cm), un mâle d'un même âge étant introduit au début de l'essai. L'élevage de ces différents couples fut réalisé dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'élevage de masse.

Les oothèques ont été recueillies dans des pondoires remplis de sable stérilisé et humidifié. Le ramassage des oothèques a été fait chaque matin.

Le moment de la première oviposition, l'intervalle séparant deux pontes successives, le nombre d'oothèques, le nombre d'œufs par oothèques ainsi que le taux d'éclosion (incubation des œufs à 30°C) ont été déterminés pour chaque couple témoin et traité.

#### **3-3 Effet sur le développement ovarien**

Pour évaluer l'effet de l'EM-Ht et du TFB sur la croissance ovocytaire, cinq femelles témoins et traitées de chaque groupe d'âge ont été disséquées (à partir du 7<sup>e</sup> jour après traitement jusqu'à la première ponte) pour y mesurer la longueur des ovocytes terminaux à l'aide d'un micromètre adapté à une loupe binoculaire. Pour chaque femelle disséquée, la longueur de 10 ovocytes terminaux dans chaque ovaire fut mesurée, soit un total de 20 ovocytes par femelle. Les ovarioles présentant des corps de résorption ont été également comptés et le taux de résorption ovocytaire ou le pourcentage d'échec à la ponte a été également calculé par le rapport du nombre d'ovarioles présentant des corps de régression sur le nombre total d'ovarioles examinés par femelle.

### **3-4 Effet sur la vitellogénèse**

#### **3-4-1 Electrophorèse des protéines hémolymphatiques et ovariennes.**

L'hémolymph et les ovaires des femelles témoins et traitées âgées de 8 et 12 jours conservés à -20°C ont été analysés par SDS-PAGE Laemmli (1970) sur un gel de 10 %. L'analyse a été effectuée avec une cuve de marque BIO RAD.

L'hémolymph et les ovaires ont été homogénéisés puis centrifugés à 10.000 rpm pendant 10 min. Les surnageants furent alors récupérés pour analyse. Les protéines à analyser ont été mises dans le bleu d'échantillons 2X, elles ont subi une dénaturation par chauffage dans une PCR à 99°C pendant 4 à 5 min., et les protéines standard BenchMark Pre-Stained Ladder ont été chauffées à 40°C pendant une minute. 15 µg de protéines ovariennes a été déposé dans chaque puits. Pour l'hémolymph, un volume de 15 µl a été déposé dans chaque puits, et la séparation des fractions protéiques fut effectuée par migration à 200 voltes dans un tampon Laemmli 10X. La migration a été arrêtée lorsque le front de migration atteint l'extrémité inférieure de la plaque.

A l'issue de la migration, les gels ont été colorés au bleu de Coomassie pendant 20 minutes sous agitation, puis décolorés jusqu'à bonne visualisation des bandes. Le séchage fut effectué sur un dry gel. La migration des différentes bandes a été déterminée par le calcul des Rf (mobilité relative) de chacune d'elles.

Les bandes de vitellogenines ont été déterminées en se basant sur les travaux de Wyatt (1988).

### **3-5 Effet sur les titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens**

#### **3-5-1 Prélèvement des échantillons et extraction des ecdystéroïdes**

##### **-Hémolymph**

Des échantillons d'hémolymph (10 µl) ont été prélevés au niveau de la patte métathoracique de femelles témoins et traitées à l'aide d'une pipette capillaire graduée. Chaque prélèvement fut ajouté à 300 µl de méthanol, puis conservé à -20°C. Pour l'extraction, chaque échantillon fut centrifugé à 5000 rpm pendant 10 min., suivi de la collecte du surnageant et de la resuspension du culot dans 50 µl de méthanol pour une seconde extraction. Les deux surnageants ont été mis en commun puis évaporés sous vide dans un concentrateur SpeedVac® (Savant).

## **-Ovaires**

Les ovaires des séries témoins et traitées ont été prélevés, rapidement pesés, puis conservés dans 500 µl de méthanol à -20°C. Juste avant le dosage, chaque échantillon d'ovaire fut homogénéisé dans le méthanol et la température de l'homogénat fut portée à 60°C pendant 10 min, suivi d'une centrifugation à 10 000 rpm pendant 10 min. Après prélèvement du surnageant, l'extraction du culot dans 200 µl de méthanol fut répétée deux fois. Les surnageants furent alors mis en commun puis évaporés sous vide. L'extrait fut subséquemment resuspendu dans du méthanol et partitionné contre de l'hexane pour en éliminer les lipides (Dinan et Rees, 1981), l'opération ayant été répétée deux fois. La phase méthanolique contenant les ecdystéroïdes fut récupérée puis évaporée sous vide dans un concentrateur SpeedVac®.

### **3-5-2 Radioimmunoessai des ecdystéroïdes**

La quantification des ecdystéroïdes des extraits hémolymphatiques et ovariens a été réalisée par la technique de radioimmunoessai « RIA » en suivant la même procédure que celle décrite pour les larves.

## **4 Analyse statistique**

Les résultats sont représentés par les moyennes  $\pm$  écart type pour les n répétitions, l'âge et le nombre des animaux testés par série sont donnés avec les résultats. La comparaison des moyennes entre les différents groupes de valeurs a été faite par une ANOVA à 5 % en utilisant le logiciel XLSTAT 7.5.2.

# Chapitre III Résultats

## Résultats

### 1 - Caractérisation phytochimique de la plante *Haplophylum tuberculatum*

#### 1-1 Screening phytochimique préliminaire de la plante

**Tableau I** : Résultat du screening phytochimique préliminaire de *H. tuberculatum*.

Alcaloïdes		Anthocyanes	Coumarines	Tannins	Saponosides	Iridoïdes	Flavonoïdes
RM	RD						
++	++	+	-	++	-	-	+++

RM : réactif de Mayer

RD : réactif de Gragendorff

+++ : réaction très importante

++ : réaction importante

- : absence de réaction

Le screening phytochimique réalisé pour *H. tuberculatum* a permis de mettre en évidence l'absence totale des saponosides, des iridoïdes, et des coumarines, et ont montré une présence notable des alcaloïdes, des tanins totaux et des anthocyanes.

La richesse de *H. tuberculatum* en flavonoïdes a été marquée par une réaction fortement positive.

#### 1-2 Analyse quantitative et qualitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts

##### 1-2-1 Analyse quantitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts

###### 1-2-1-1 Rendement

Les extraits récupérés après évaporation à sec sous pression réduite et séchage à l'air libre ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, et le rendement a été calculé pour 100 g de matériel végétal sec.

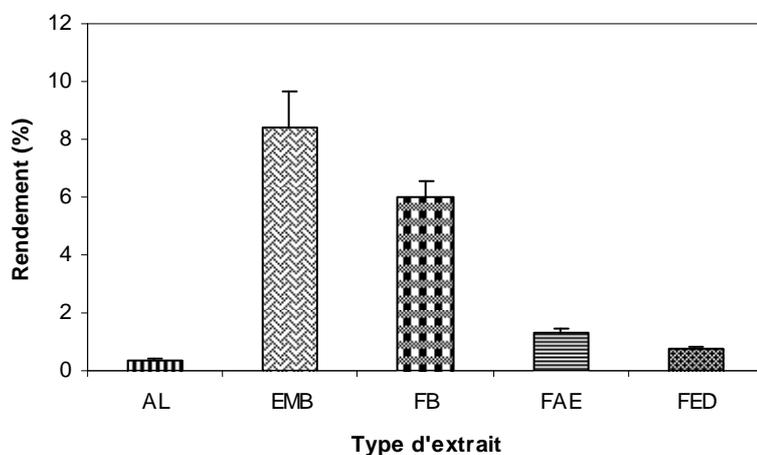
Les rendements et les différents aspects des extraits alcaloïdiques et méthanoliques de *H. tuberculatum* sont rapportés dans le tableau II.

**Tableau II** : Aspect et rendement d'extraction des alcaloïdes totaux, de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions.

Type d'extrait		Aspect	Couleur	Rendement (%)
Extrait alcaloïdique		Sec	Noire -verdâtre	$0,37 \pm 0,07$
Extrait méthanolique brut		Visqueux	Vert	$8,4 \pm 1,3$
Les différentes fractions de l'EM-Ht	Fraction butanolique	Gélatineux	Marron foncé	$6,0 \pm 0,6$
	Fraction d'acétate d'éthyle	Sec	Marron	$1,3 \pm 0,1$
	Fraction d'éther diéthylique	Sec	Vert	$0,8 \pm 0,05$

L'extrait chloroformique représentant les alcaloïdes totaux était de couleur vert sombre et d'aspect sec. L'extrait méthanolique brut de la plante renfermant les composés phénoliques totaux et autres composés polaires s'est présenté sous forme visqueuse et de couleur vert foncé.

Les rendements d'extraction sont représentés par la figure 10.



**Figure 10.** Rendements d'extraction des alcaloïdes totaux, de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions. AL : alcaloïdes totaux ; EMB : extrait méthanolique brut ; FB : fraction butanolique ; FAE : fraction acétate d'éthyle ; FED : fraction éther diéthylique.

*H. tuberculatum* est nettement plus riche en composés phénoliques et autres composés polaires qu'en composés alcaloïdiques. Le rendement des composés phénoliques totaux obtenu est de  $8,39 \pm 1,27$  % contre seulement  $0,37 \pm 0,07$  % pour les alcaloïdes.

Les composés phénoliques di et tri holosidiques sont mieux représentés dans l'extrait méthanolique brut ( $6 \pm 0,57 \%$ ) comparativement aux composés phénoliques monosidiques et aglycones, pour lesquels des rendements de l'ordre de  $1,34 \pm 0,14 \%$  et de  $0,79 \pm 0,05 \%$  ont été respectivement obtenus.

Des résultats obtenus apparaît que les composés phénoliques extraits de *H. tuberculatum* sont beaucoup plus polaires qu'apolaires.

### 1-2-1-2 Teneur de l'EM-Ht en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques a été déterminée à partir de l'équation de la courbe standard et exprimée en milligrammes par gramme de matière sèche équivalent en acide gallique. La teneur en composés phénoliques de l'EM-Ht a été estimée à  $74,5 \pm 1,4$  mg Equivalent Acide Gallique/g.

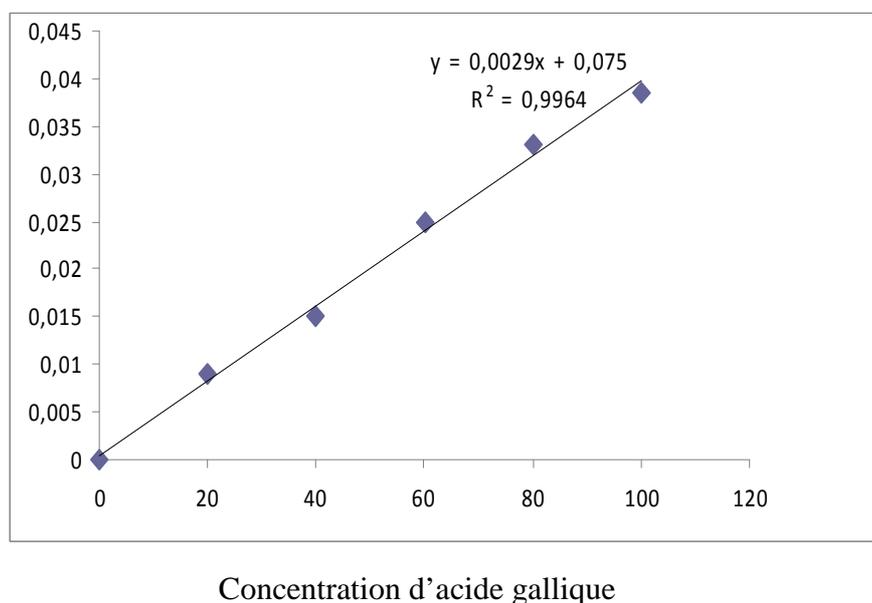


Figure 11. Courbe standard de l'acide gallique

### 1-2-2 Analyse qualitative des alcaloïdes et des extraits méthanoliques bruts

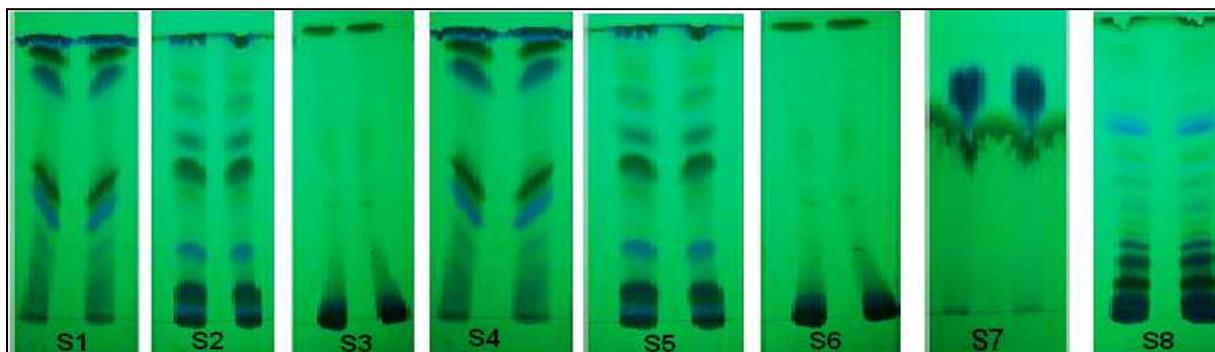
#### 1-2-2-1 Analyse des extraits par chromatographie sur couche mince « CCM »

##### -Alcaloïdes

##### - Analyse des alcaloïdes par CCM

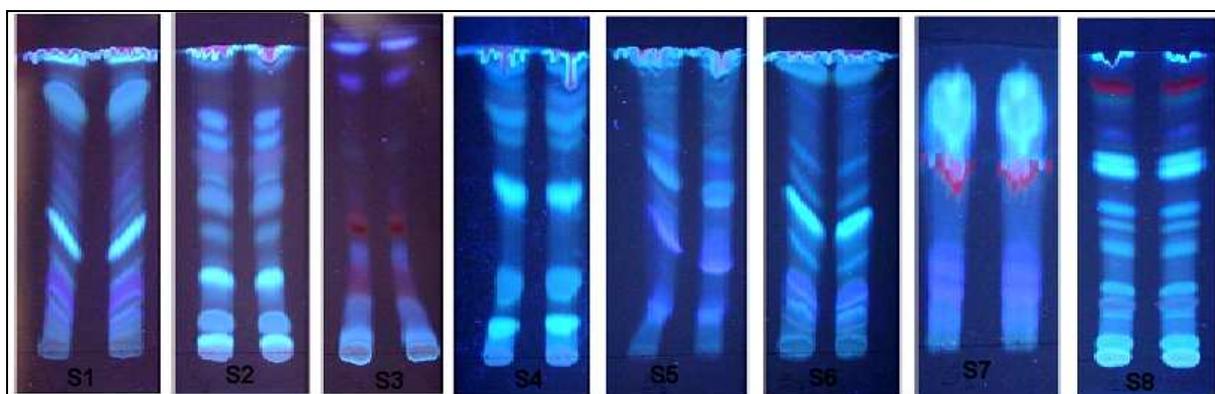
La visualisation des minis CCM sous uv à 365 et 254 nm, après migration des spots en utilisant différents systèmes solvants, a montré un certain nombre de taches dont la fluorescence est différente d'un système à un autre. Aussi, les systèmes qui ont donné le nombre le plus important de tâches sur les chromatogrammes sont : le S1, le S2, le S4, le S5

et le S8 tandis que les systèmes : le S3, le S6 et le S7 n'ont pas permis une bonne séparation des alcaloïdes de *H. tuberculatum* (Figs. 12 et 13).



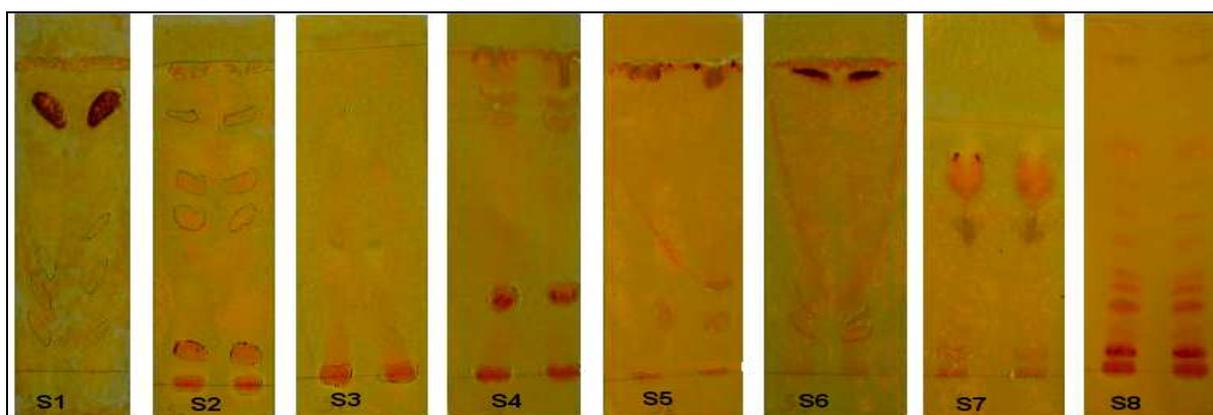
**Figure 12.** Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *H. tuberculatum* séparés par différents systèmes solvant et révélés sous uv à 254 nm.

**S1** : chloroforme-méthanol (9 : 1) ; **S2** : chloroforme-acétone (9 : 1) ; **S3** : hexane-acétate d'éthyle (8 : 2) ; **S4** : chloroforme-acétate d'éthyle-Acétone (5 : 4 : 1) ; **S5** : acétate d'éthyl-méthanol-eau distillée (77 : 13 : 10) ; **S6** : chloroforme-méthanol-ammoniaque concentré ( 90 : 9 : 1) ; **S7** : diethyl éther-ammoniaque concentré (44 : 5 : 1) ; **S8** : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3).



**Figure 13.** Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *H. tuberculatum* séparés par différents systèmes solvant et revélés sous uv à 365 nm.

**S1** : chloroforme-méthanol (9 : 1) ; **S2** : chloroforme-acétone (9 : 1) ; **S3** : hexane-acétate d'éthyle (8 : 2) ; **S4** : chloroforme-acétate d'éthyle-Acétone (5 : 4 : 1) ; **S5** : acétate d'éthyl-méthanol-eau distillée (77 : 13 : 10) ; **S6** : chloroforme-méthanol-ammoniaque concentré ( 90 : 9 : 1) ; **S7** : diethyl éther-ammoniaque concentré (44 : 5 : 1) ; **S8** : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3).



**Figure 14.** Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *H. tuberculatum* séparés par différents systèmes après révélation par le réactif de Dragendorff.

**S1** : chloroforme-méthanol (9 : 1) ; **S2** : chloroforme-acétone (9 : 1) ; **S3** : hexane-acétate d'éthyle (8 : 2) ; **S4** : chloroforme-acétate d'éthyle-acétone (5 : 4 : 1) ; **S5** : acétate d'éthyl-méthanol-eau distillée (77 : 13 : 10) ; **S6** : chloroforme-méthanol-ammoniaque concentré (90 : 9 : 1) ; **S7** : diethyl éther-ammoniaque concentré (44 : 5 : 1) ; **S8** : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3).

En outre, après, la révélation des chromatogrammes avec le réactif de Dragendorff, (Fig. 14), le système S8 : toluène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) s'est révélé le système le plus approprié pour la séparation des alcaloïdes totaux de *H. tuberculatum*. Il a permis l'obtention du plus grand nombre de bande orange indicatrice de la présence des alcaloïdes.

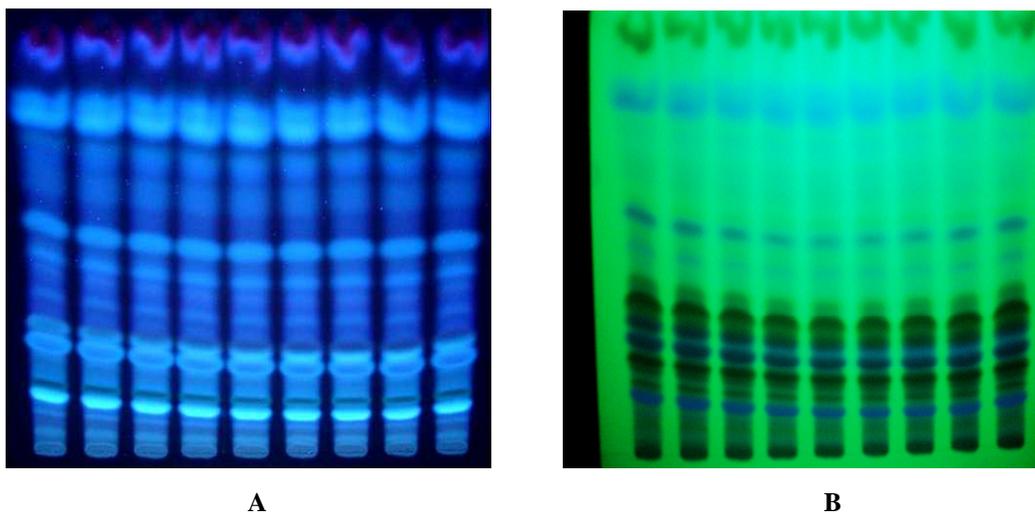
#### **-Séparation des alcaloïdes de *H. tuberculatum* avec le système solvant S8**

La visualisation du chromatogramme des alcaloïdes de *H. tuberculatum* avec le système solvant S8 : toluène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) sous uv à 254 nm et à 365 nm, a donné différentes bandes dont la fluorescence et les Rf sont représentés dans le tableau III et les figures 15 A et B.

**Tableau III** : Fluorescence et Rf des bandes des alcaloïdes de *H. tuberculatum*, séparées par le système solvant S8 : toluène-acétate d'éthyle-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et observées sous uv à 254 et 365 nm.

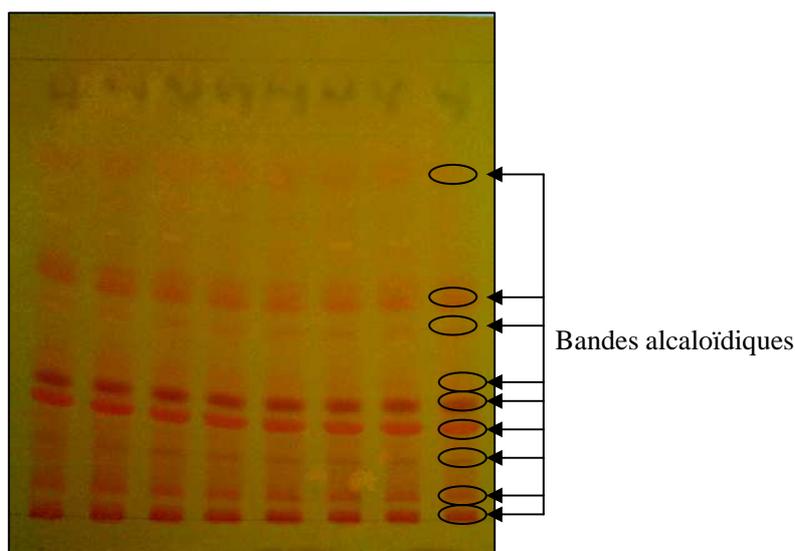
N°de la bande	Visualisation à 254 nm		Visualisation à 365 nm	
	Couleur	RF	Couleur	RF
1	Marron foncé	0	Marron	0
2	Marron	0.03	Bleu vif	0.03
3	Marron	0.04	Bleu vif	0.03
4	Bleu sombre	0.09	Bleu	0.09
5	Marron	0.1	Marron	0.1
6	Marron foncé	0.13	Marron	0.1
7	Bleu sombre	0.26	Bleu	0.26
8	Marron foncé	0.33	Vert	0.33
9	Marron foncé	0.4	Marron	0.4
10	Trace marron	0.52	Trace bleue	0.52
11	Bleu clair	0.61	Bleu	0.61
12	Bleu sombre	0.66	Bleu	0.66
13	Bleu	0.9	Bleu	0.9
14	vert	0.93	rouge	0.93

Le nombre de bandes bleu sous uv à 365 nm est plus élevé qu'à 254 nm. Ces tâches correspondraient aux acides phénols (Diallo, 2005), alors que la tâche rouge apparue à 365 nm correspondrait aux anthocyanidine-3-glycoside ou à la chlorophylle (Diallo, 2005).



**Figure 15.** Chromatogrammes des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *H. tuberculatum* séparés par le système solvant S8 : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et révélés sous uv à 365 nm (A) et à 245 nm (B).

Après révélation du chromatogramme par pulvérisation avec le réactif de Dragendorff, neuf taches de couleur orange ont été observées (Fig. 16).



**Figure 16.** Chromatogramme des alcaloïdes totaux de la partie aérienne de *H. tuberculatum* séparés par le système solvant S8 : toluène-acétone-éthanol-ammoniaque concentré (40 : 4 : 8 : 3) et révélés par le réactif de Dragendorff.

Les Rf des différentes bandes alcaloïdiques sont rapportés dans le tableau IV .

**Tableau IV** : Bandes alcaloïdiques obtenues avec le système solvant S8 après révélation avec le réactif de Dragendorff.

Tache	Largeur	Couleur	Rf
01	Large	Rouge	0 (pas de migration)
02	Trace	Orange	0.09
03	Etroite	Orange	0.22
04	Large	Orange	0.26
05	Large	Rouge foncé	0.33
06	Large	Orange	0.61
07	Trace	Orange	0.66
08	Trace	Orange	0.78

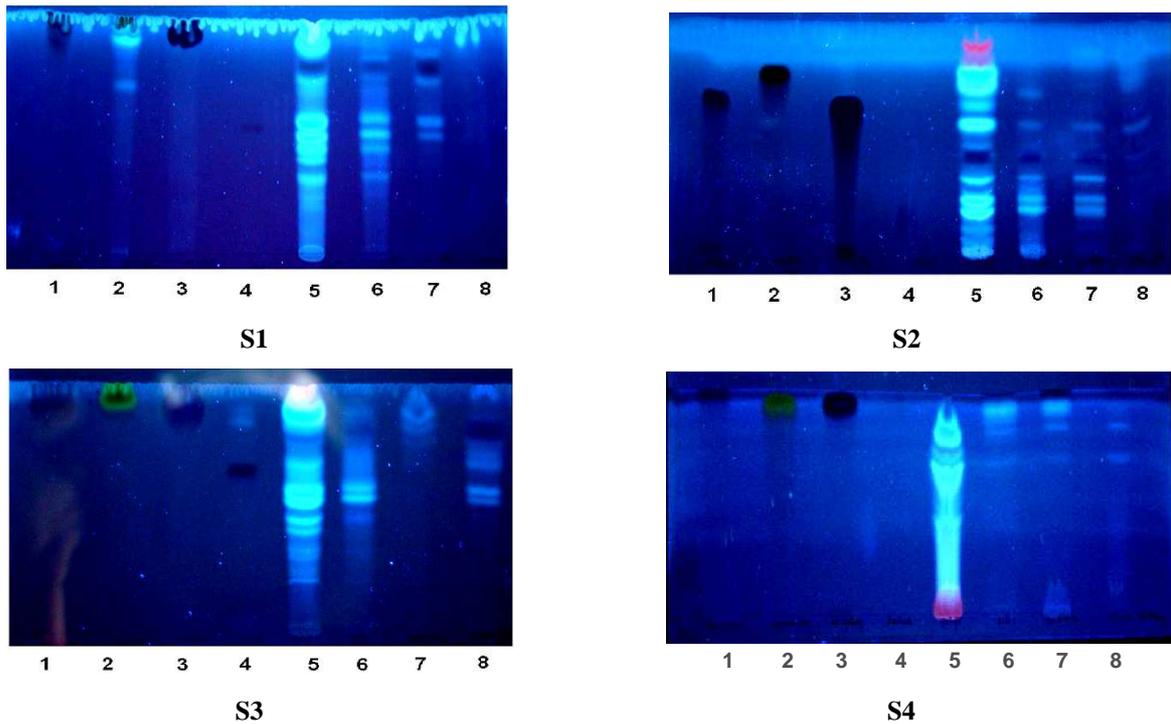
Le profil chromatographique de la figure 29 a permis de constater que *H. tuberculatum* est assez riche en composés alcaloïdiques. L'identification de ces composés ne peut être faite qu'après analyse avec des techniques plus précises telles que la GC-MS et HPLC.

#### **-L'EM-Ht et ses différentes fractions**

##### **- Analyse de l' EM-Ht et ses différentes fractions par CCM**

L'analyse chromatographique par CCM sur mini plaque de gel de silice sur support d'aluminium, a révélé une différence remarquable dans les profils chromatographiques obtenus avec les différents systèmes solvants testés. En effet, la visualisation des plaques sous uv à 365 nm (Fig.17) a révélé une bonne séparation des constituants de l'extrait brut, des différentes fractions, ainsi qu'une bonne migration des standards par les systèmes solvant S1, S2 et S3. De ces trois systèmes solvants testés, le S2 s'est montré le plus approprié pour la séparation des constituants des différents extraits analysés. Les différents extraits de *H. tuberculatum* ont été marqués par la présence d'acides phénols de fluorescence bleue (Benazir *et al.*, 1972).

Le système solvant S<sub>4</sub> contenant le chloroforme, le méthanol, l'eau distillée (1 : 1 : 0.5), n'a pas permis une bonne séparation des extraits analysés.



**Figure 17.** Chromatogrammes de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions séparés par différents systèmes solvant révélés sous uv à 365 nm.

**S<sub>1</sub>** : l'acétate d'éthyle, l'acide formique, l'acide acétique glacial et l'eau distillée (100 : 11 : 11 : 27) ; **S<sub>2</sub>** : l'acétate d'éthyle, le méthanol et l'eau distillée (100 : 13,5 : 10) ; **S<sub>3</sub>** : butanol, acide acétique, eau distillée (4 : 1 : 5) ; **S<sub>4</sub>** : chloroforme, méthanol et eau distillée (1 : 1 : 0.5).

**1** : catéchine ; **2** : quercitine ; **3** : acide gallique ; **4** : rutine ; **5** : extrait méthanolique brut, ; **6** : fraction butanolique ; **7** : fraction acétate d'éthyle ; **8** : fraction d'éther diéthylique.

Catéchine, quercitine, acide gallique : standards

### -Séparation de l'EM-Ht et de ses différentes fractions avec le système solvant S2

Afin de bien identifier les différentes bandes ainsi que leur couleur et leur rapport frontal Rf avec le système solvant S2, une nouvelle séparation a été faite sur une plaque de 20 x 20 cm. Les résultats sont présentés dans le tableau V et par la figure 18.

**Tableau V** : Visualisation du chromatogramme de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions sous uv à 365 et 254 nm.

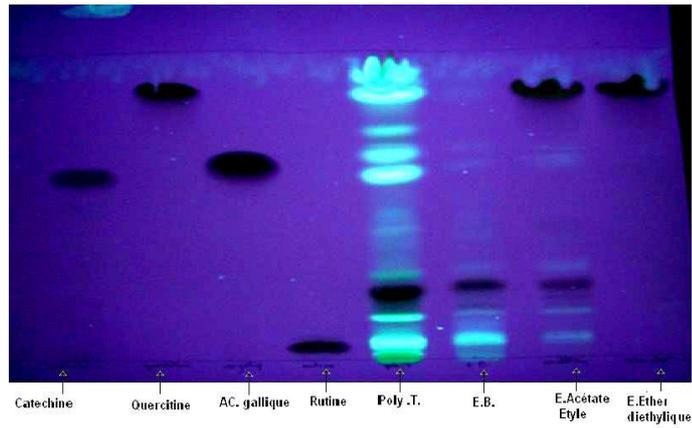
Type d'extrait	N° de la bande	Couleur de la bande à 365 nm	Couleur de la bande à 254 nm	Le rapport frontal : Rf
<b>Extrait méthanolique brut</b>	1	Bleue	Bleue	0,05
	2	Bleue	Bleue	0,12
	3	Marron foncé	Brune	0,20
	4	Verdâtre	Brune	0,25
	5	Bleue	Absente	0,40
	6	Bleue	Bleue	0,45
	7	Bleue	Bleue foncé	0,57
	8	Bleue	Trace	0,64
	8	Bleue	Trace	0,72
	10	Bleue	Bleue	0,84
<b>Fraction butanolique</b>	1	Bleue	Trace	0.05
	2	Bleue	Trace	0.12
	3	Marron	Marron	0,20
	4	Verdâtre	Trace	0,25
<b>Fraction d'acétate d'éthyle</b>	1	Bleue	Trace	0.05
	2	Bleue	Trace	0.12
	3	Marron	Marron	0,20
	4	Verdâtre	Trace	0,25
	5	Brune	Brune	0.86
<b>Fraction d'ether diéthylique</b>	1	Brune	Brune	0.86
<b>Standards</b>	Rutine	Brune	Brune	0.04
	Ac-galique	Brune	Brune	0.62
	Quercetine	Brune	Brune	0.86
	Catéchine	Brune	Brune	0.57

L'extrait méthanolique brut révélé sous uv à 365 et à 254 nm a présenté 10 bandes de fluorescence bleue ou brune. Les bandes de fluorescence bleue correspondraient aux acides

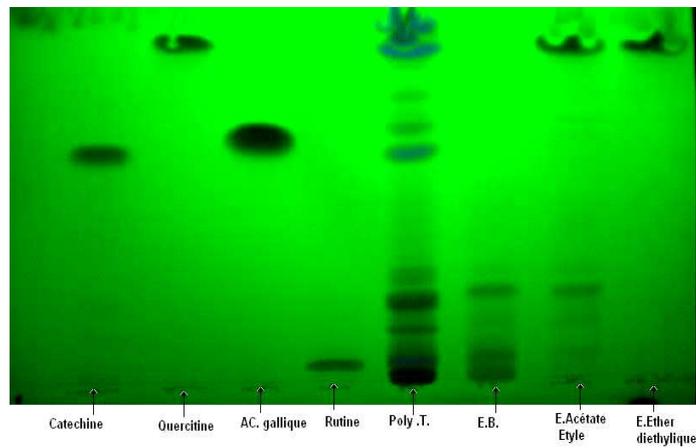
phénols (Diallo, 2005), tandis que celles colorées en brun correspondraient aux flavonoles et flavones (Dohou *et al.*, 2003).

La fraction butanolique a présenté quatre bandes colorées soit en marron soit en bleu. Le même nombre de bandes a été révélé pour la fraction acétate d'éthyle mais les bandes sont sous forme de traces, une bande très large de couleur marron foncé (brune) présentant le même Rf que la quercitine a été révélée pour cette fraction.

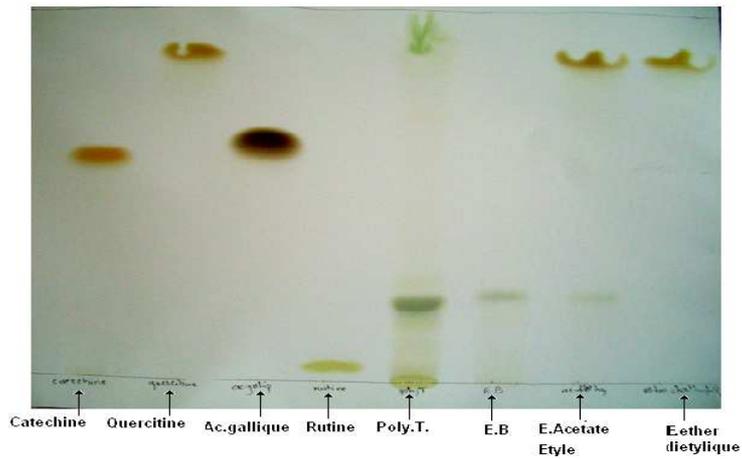
Une seule bande de couleur marron foncé, de même Rf que la quercitine a été révélée également pour la fraction éther diéthylique.



A



B



C

**Figure 18.** Chromatogrammes de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions séparés par le système solvant S2 (acétate d'éthyle, méthanol, eau : 100 : 13,5 : 10) et révélés sous uv à 365 nm (A), à 254 nm (B) et après exposition aux vapeurs d'ammoniac (C).

L'exposition de la plaque CCM aux vapeurs d'ammoniaque a permis de mettre en évidence plusieurs bandes, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** Bandes obtenues après révélation du chromatogramme de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses différentes fractions avec les vapeurs d'ammoniaque.

Type d'extrait	Fluorescence	Rapport frontal (Rf)
Standards	Rutine (jaunâtre)	0,04
	Acide gallique (noire)	0,62
	Quercetine(marron)	0,86
	Catechine (marron)	0,57
Extrait méthanolique brut	Jaune-brune	0,0
	Jaune	0,04
	Verdâtre	0,20
	Jaune	0,25
	Jaune	0,57
	Jaune	0,84
Fraction butanolique	Verdâtre	0,20
Fraction d'acétate d'éthyle	Marron (trace)	0,20
	Marron foncé	0,86
Fraction d'éther diéthylique	Marron foncé	0,86

L'exposition du chromatogramme aux vapeurs d'ammoniaque a mis en évidence six taches visibles à l'œil nu, dont une grosse de couleur jaune brune qui n'a pas migré avec ce système solvant, une tache de couleur jaune avec un Rf de 0,04 correspondrait probablement à la rutine (car elle a migré au même Rf que ce standard), une tache de couleur violette à verdâtre de Rf 0,20 et trois bandes de couleur jaune brune, sous forme de traces avec des Rf respectivement 0,25; 0,57 et 0,86 en faveur de la présence de flavonols et flavones (Dohou *et al.*, 2003).

Ces métabolites sont par ailleurs repartis différemment dans les fractions. En effet, dans l'extrait butanolique, uniquement une tache verdâtre de Rf 0,20 a été observée, cette dernière se trouvant sous forme de trace dans l'extrait d'acétate d'éthyle alors qu'elle est complètement absente dans l'extrait d'éther diéthylique.

Les vapeurs d'ammoniaque ont également mis en évidence une bande brune dans la fraction acétate d'éthyle et éther diéthylique avec un Rf de 0,86. Cette bande est présente dans l'extrait méthanolique brut, sous forme de trace, tandis qu'elle est complètement absente dans l'extrait butanolique; elle correspondrait donc probablement à la quercitine.

L'acide gallique et la catéchine sont absents dans l'extrait méthanolique total de *H. tuberculatum* tandis que des composés dont les Rf correspondent à la quercitine et la rutine sont présentes sous forme de traces.

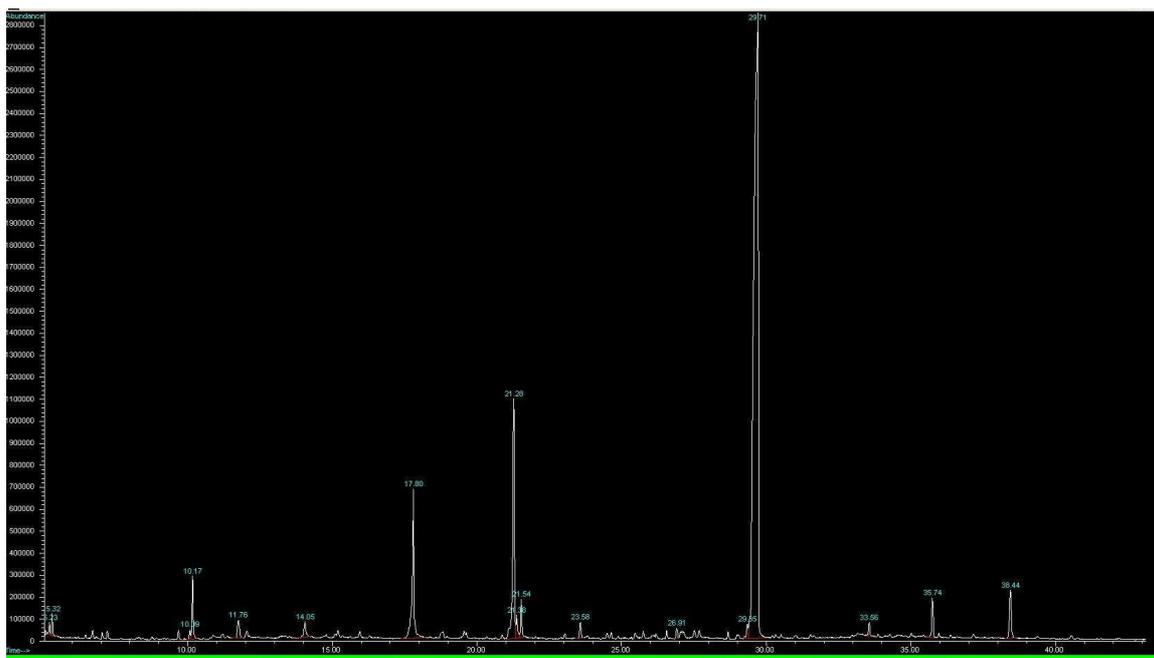
La quercitine est majoritairement présente dans les fractions acétate d'éthyle et éther diéthylique. Ceci peut être expliqué par le fait que la quercitine est plus soluble dans les solvants apolaire que polaires.

### 1-2-2-2 Analyse des différentes fractions de l'EM-Ht par chromatographie phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse « GC-MS »

Les résultats des différentes analyses sont portés sur les tableaux VII, VIII, IX et X et sont illustrés par les chromatogrammes représentés par les figures 19, 20, 21 et 22.

**Tableau VII** : Résultats d'analyse par GC-MS de l'échantillon acide phénolique

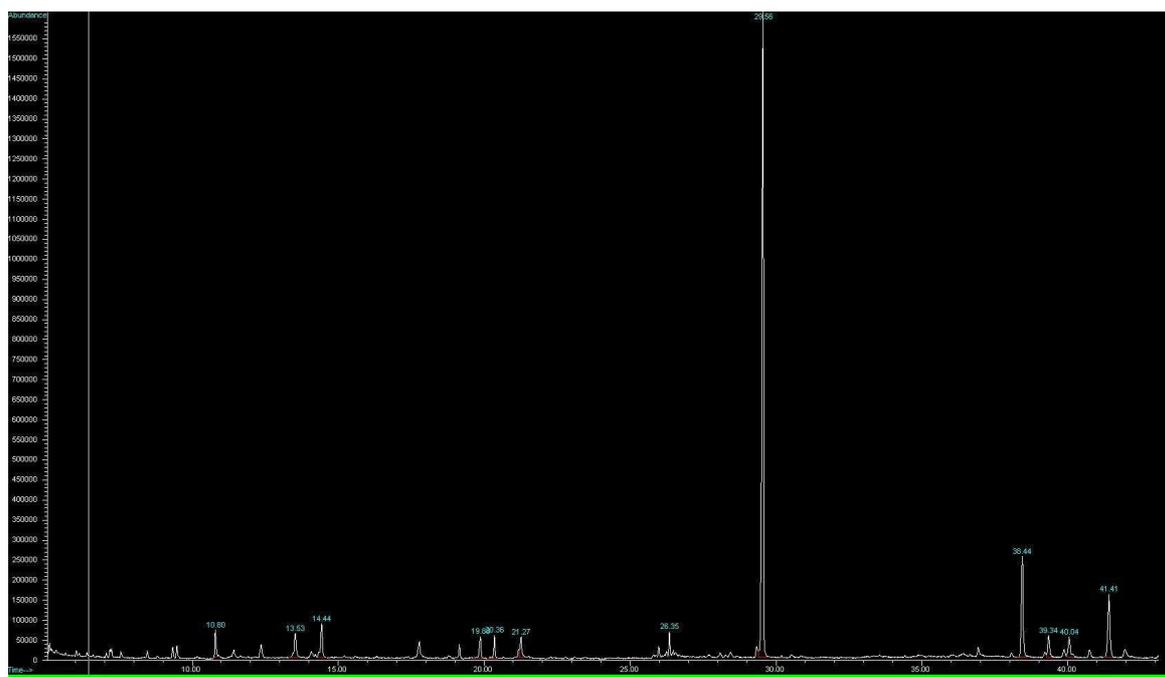
Temps de rétention (secondes)	Molécules
5.226	2-Decenal, (E)- aldéhyde
5.314	Acide nonanoïque : acide pélargonique
10.079	Nonadécane : alcane linéaire
10.166	Acide dodécanoïque : acide laurique
11.743	Dodécane, 2,6,10-triméthyl : alcane
14.055	Acide tétradécanoïque : acide myristique
17.800	Acide hexadécanoïque : acide palmitrique
21.272	Acide oléique
21.535	Acide-9,12-octadécadiénoïque (Z,Z) : acide stéarique
26.902	Galactopyranose, 1,2,3,4,6- pentakis β-D-
29.700	<b>Acide 1,2-benzenedicarboxylique, mono(2-ethylhexyl) ester</b>
33.551	1-Méthoxy-3-(2-oxyethyl) nonane



**Figure 19.** Chromatogramme GC-MS de l'échantillon acide phénolique.

**Tableau VIII :** Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction éther diéthylique

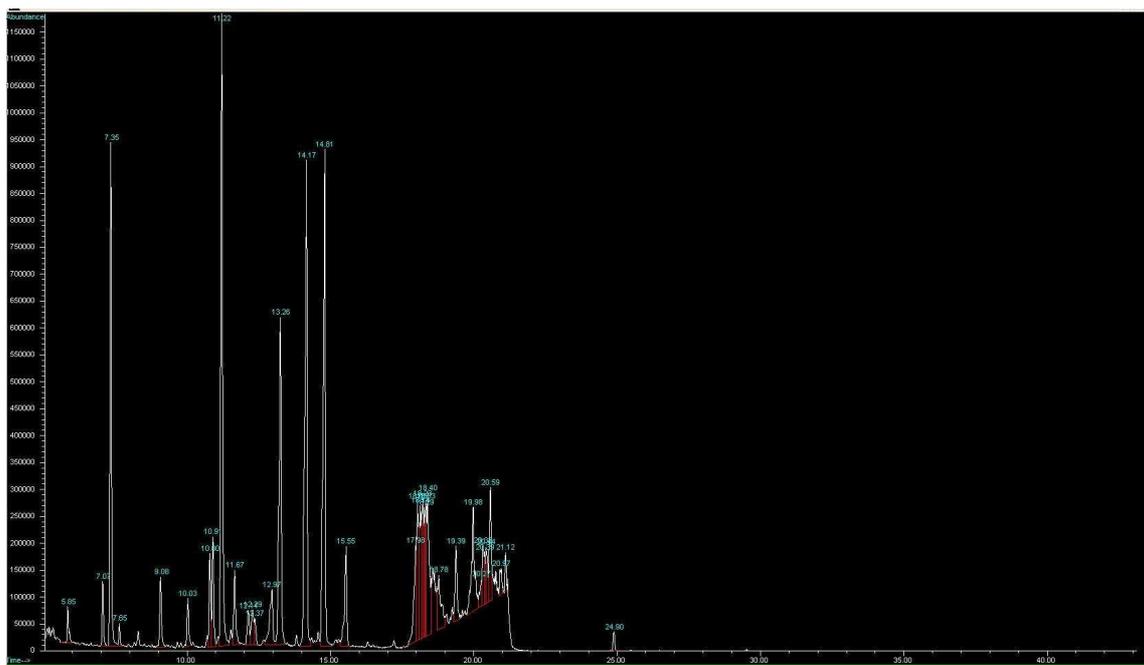
Temps de rétention (secondes)	Molécules
10.794	<b>Acide benzoïque, 4-[oxy]- ester</b>
13.532	<b>Acide m-anisique, 4-(oxy)-, methyl ester</b>
14.441	<b>Bis Isovanillate</b>
19.863	3-Buten-2-one, 3-oxy-
29.534	<b>Acide 1,2-benzenedicarboxylique, diisooctyl ester</b>
41.407	<b>Acide benzoïque, 2-[oxy]-</b>



**Figure 20.** Chromatogramme GC-MS de la fraction éther diéthylique.

**Tableau IX :** Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction butanolique

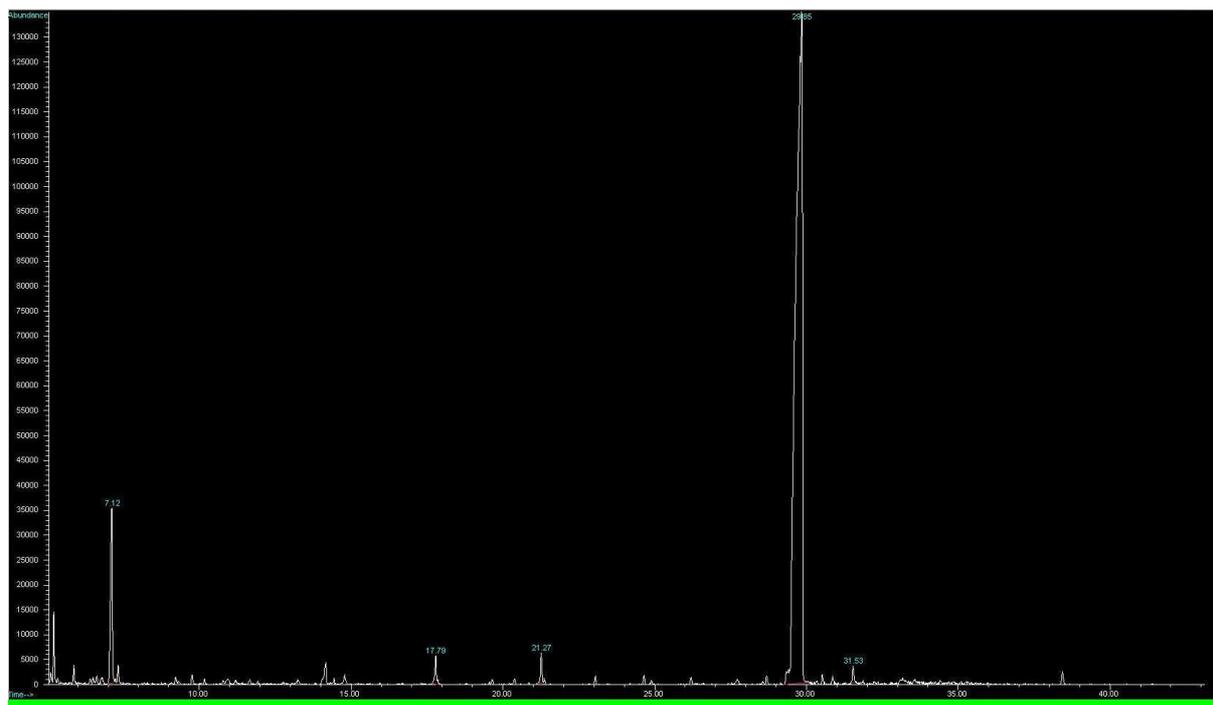
Temps de rétention (secondes)	Molécules
5.843	3,8-Dioxa-2,9-disiladecane, 2,2,9,9-tetraméthyl-5,6-bis[oxy]-, (R*,S*)-
7.059	2(3H)-Furanone, dihydro-3,4-bis[oxy]-, cis-
7.333	Glycerol
7.640	Acide 2,3,4-trihydroxybutyrique
9.075	Ribitol, 1,2,3,4,5-pentakis-O-
10.027	L-Proline, 5-oxo-
10.794	D-Xylopyranose, 1,2,3,4-tetrakis-O-
10.904	D-Ribofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O-
11.221	D-Ribofuranose, 1,2,3,5-tetrakis-O- isomère
11.670	Fructofuranoside, méthyl, 1,3,4,6-tetrakis-O- $\alpha$ -D-
12.141	$\beta$ -L-Mannofuranose, 6-desoxy-1,2,3,5-tetrakis-O-
12.284	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-
12.382	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-o-méthoxy, (1Z)-
12.963	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-scylo-
13.248	Glucopyranose, pentakis-O-
14.135	Glycoside, $\alpha$ -méthyl-O-
14.792	Glucopyranose, pentakis-O-
15.548	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O- (isomère)



**Figure 21.** Chromatogramme GC-MS de la fraction butanolique.

**Tableau X :** Résultats d'analyse par GC-MS de la fraction acétate d'éthyle

Temps de rétention (secondes)	Molécules
7.110	Acide 2-ketohexanoïque
17.778	3-Pentanol, 2,4-diméthyl-
21.261	3-Pentanol, 2,4-diméthyl-, isomère
29.837	Pentane, 2,2,3,3-tétraméthyl-
31.535	3,4-Diméthyl-5-hexen-3-ol
38.435	Silane, tétraméthyl-



**Figure 22.** Chromatogramme GC-MS de la fraction acétate d'éthyle.

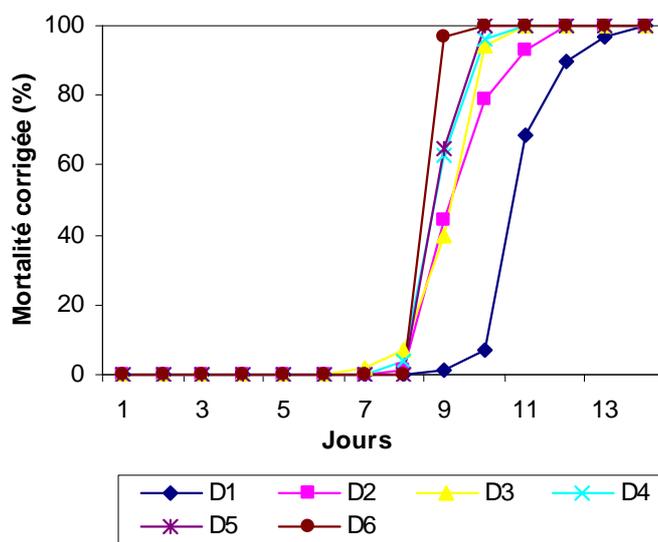
Les résultats de l'analyse des différents échantillons ont montré la présence d'acides phénoliques dans les fractions éther diéthylique et acide phénolique semi-purifiée. Des sucres liés à des structures cycliques tetra, penta et hexakis dans la fraction butanolique et d'alcools, alcanes et acides carboxyliques dans la fraction acétate d'éthyle. Quarante trois composés ont été identifiés par GC-MS dans les différentes fractions de l'extrait méthanolique de *Haplophyllum tuberculatum*. Ces résultats ont montré que la fraction butanolique était la plus riche en composés (Fig. 21), les plus importants étant le D-ribofuranos-1,2,3,5 tetrakis le glucopyranose-pentakis et le glycerol. L'échantillon acide phénolique est composée essentiellement d'[acide 1,2-benzenedicarboxylique, mono(2-ethylhexyl) ester] (acide benzoïque), d'acide oléique, d'acide hexadecanoïque et d'acide dodecanoïque (acides gras). Les fractions éther diéthylique et acétate d'éthyle (Figs. 20 et 22) sont les moins riches en composés, la deuxième étant essentiellement constituée de [pentane, 2,2,3,3-tetramethyl-] et d'acide 2-cétohexanoïque. Le composant majoritaire de la fraction éther diéthylique est l'acide 1,2-benzenedicarboxylique, diisooctyl ester.

## 2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques variables physiologiques et endocriniennes chez les larves de cinquième stade de *Locusta migratoria*

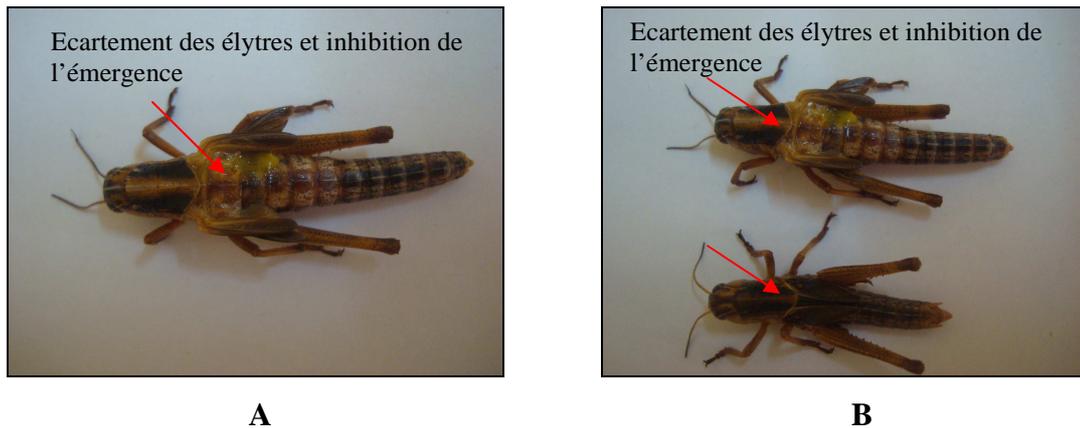
### 2-1 Activité insecticide et atteintes morphogénétiques

La mortalité est le premier critère de jugement de l'efficacité d'un traitement. L'objectif de cet essai était de vérifier si l'EM-Ht et le TFB pouvaient avoir une action insecticide sur les larves du cinquième stade de *L. migratoria* traitées. Les résultats de la toxicité du TFB présentés à la figure 23 ont montré que les mortalités pour l'ensemble des doses testées ont débuté à l'approche de la mue, aucune mortalité n'ayant été observée durant les huit premiers jours suivant le traitement. Les 100 % de mortalité ont été obtenus au 10<sup>e</sup> jour pour les fortes doses D5 et D6 et au 11<sup>e</sup> jour pour la D4 et la D3. Toutefois, les faibles doses D1 et D2 ont retardé la mue imaginale en prolongeant le cycle de mue; les 100 % de mortalité pour ces dernières doses ont été obtenus tardivement au 12<sup>e</sup> jour pour la D2 et au 14<sup>e</sup> jour pour la D1 (Fig. 23).

La mort des larves pour l'ensemble des doses est survenue au moment de l'exuviation. En effet, le produit a perturbé le processus de mue, les larves traitées semblant être incapable de rompre les lignes exuviales. Seules les élytres ont été écartées, le corps entier de l'insecte s'est retrouvé doublé par l'ancienne cuticule et les larves étaient mortes emprisonnées dans leur ancienne cuticule (Figs. 24 A et B).



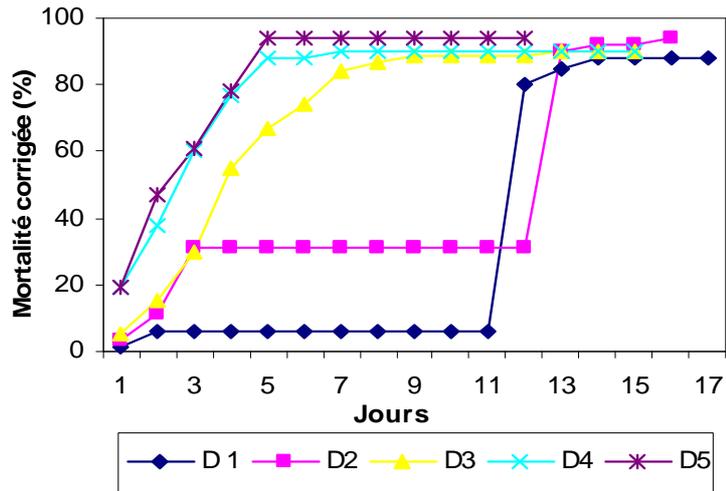
**Figure 23.** Cinétique de mortalité corrigée des larves de 5<sup>e</sup> stade de *L. migratoria* traitées au TFB, n= 10/répétition. Différence significative  $p < 0,0001$  (Anova à 5 %). Te : témoin ; D1, D2, D3, D4, D5 et D6 : différentes doses de TFB.



**Figure 24.** inhibition de la mue imaginale chez les larves de 5<sup>e</sup> stade de *L. migratoria* traitées au TFB.  
 → : A et B émergence incomplète.

L'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* administré par ingestion forcée aux larves du cinquième stade de *L. migratoria* aux doses 350, 500, 1000, 1250, et 1500 µg/larve a présenté des effets différents selon la dose administrée (Fig. 25). L'effet des deux premières faibles doses : 350 et 500 µg/larve était comparable à celui du régulateur de croissance testé, «le TFB». Des faibles mortalités ont été enregistrées durant les premiers jours pour ces doses. Cependant, les mortalités les plus élevées ont été enregistrées au moment de la mue : 80 % et 89,9 % de mortalité ont été obtenues le 12<sup>e</sup> et le 13<sup>e</sup> jour respectivement pour la D1 et la D2. Cette toxicité qui s'est manifestée au moment de l'exuviation et qui a inhibé le développement et a perturbé le processus de mue des larves s'est terminée soit par la mort de celles-ci à la fin du stade larvaire suite à un blocage complet de la mue (Fig. 26), soit à une mue incomplète suite à l'émergence incomplète d'imagos avec des malformations parfois sévères, Les malformations ont touché le corps entier pour certaines larves (Fig.27 A,B,C,D,E et F), ou certaines parties du corps pour d'autres larves (Fig.28 A,B,C et D).

Les fortes doses D3, D4 et D5 ont présenté une activité insecticide très intéressante avec une relation dose-réponse; l'action de ces doses était précoce comparativement aux deux premières, les mortalités corrigées obtenues étaient de l'ordre de 89 %, 90 % et 94 % respectivement pour ces doses au 9<sup>e</sup>, au 7<sup>e</sup> et au 5<sup>e</sup> jour après traitement. L'action de ces doses s'est manifestée par des symptômes nerveux rapides responsables de la mortalité précoce des larves.



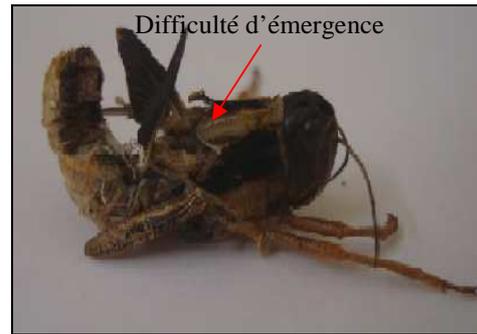
**Figure 25.** Cinétique de mortalité corrigée des larves de cinquième stade de *L. migratoria* traitées à l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum*, n = 10/répétition. Te : témoin ; D1, D2, D3, D4 et D5 : différentes doses de l'EM-Ht. Différence significative  $p < 0,05$  (Anova à 5 %).



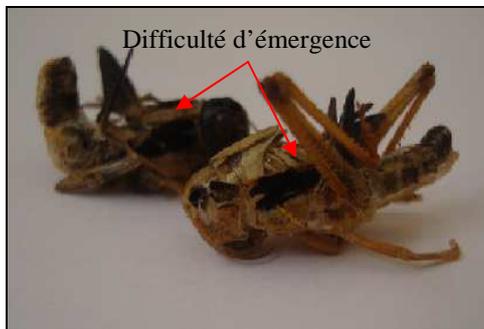
**Figure 26.** Blocage de la mue imaginale chez les larves de 5<sup>e</sup> stade de *L. migratoria* traitées à l'EM-Ht.



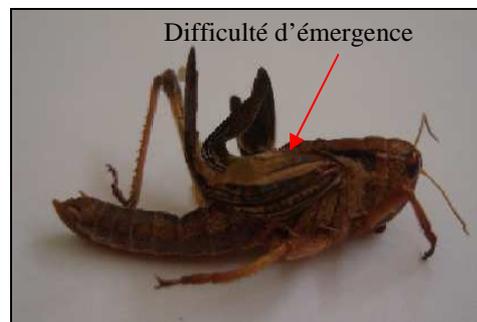
**A**



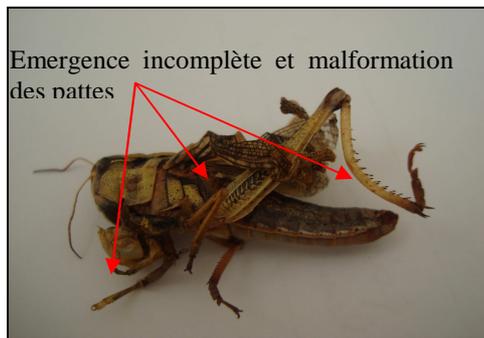
**B**



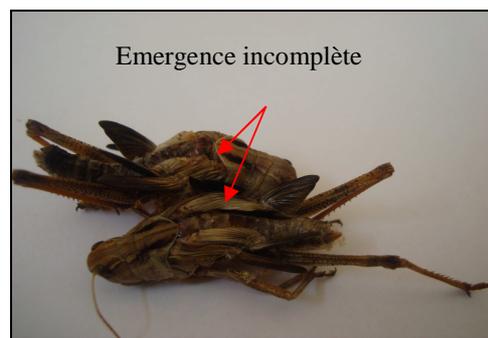
**C**



**D**



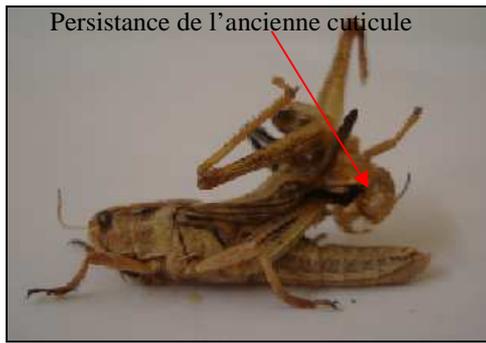
**E**



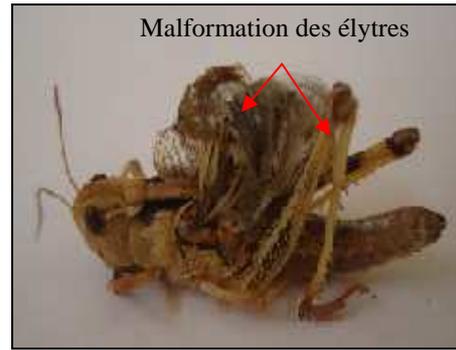
**F**

**Figure 27.** Perturbation de la mue imaginale chez les larves de 5<sup>e</sup> stade de *L. migratoria* traitées à l'EM-Ht.

→ :A ; B ; C ; D ; E et F émergence incomplète.



**A**



**B**



**C**



**D**

**Figure 28.** Atteintes morphogénétiques notées chez les imagos de *L. migratoria* suite à des difficultés d'exuviation à la mue imaginale après traitement à l'EM-Ht.

→ : A ; B ; C et D malformation des ailes.

## **2-2 Effet sur l'anatomie et l'histologie du tube digestif**

### **2-2-1 L'anatomie du tube digestif des larves témoins et traitées**

L'observation sous loupe binoculaire du tube digestif des larves témoins de *L. migratoria* après dissection montre que ce dernier s'étend du fond de la cavité orale jusqu'à l'anus. Son diamètre est variable, et sa longueur totale est de 25 à 30 mm en moyenne chez les larves de cinquième stade.

Comme chez toutes les espèces d'insectes, le tube digestif des orthoptères comporte trois parties : le stomodeum, le mésentéron et le proctodeum.

**-Le stomodeum** : comporte :

- un pharynx : très court
- un œsophage : court et étroit et se poursuit par un jabot.
- un jabot : beaucoup plus volumineux et qui se continue en arrière par un gésier.
- un gésier : de même taille que le jabot mais à paroi plus épaisse. La partie antérieure du gésier est marquée par un léger étranglement plus ou moins prononcé qui le sépare du jabot.

**-Le mésentéron** : appelé également intestin moyen, il est de couleur blanchâtre ou peu brunâtre. Il est toujours plus court que le stomodeum. L'intestin moyen comporte six cæcums gastriques qui s'ouvrent entre le mésentéron et le gésier. Chaque cæcum comprend un segment antérieur plus développé que la partie postérieure.

L'insertion de nombreux tubes de Malpighi très grêle marque le passage entre le mésentéron et le proctodeum.

**-Le proctodeum** : Il débute par l'intestin postérieur proprement dit et se poursuit pour former le rectum, qui est très rétréci. Ce dernier s'élargit de nouveau pour donner l'ampoule rectale.

Le tube digestif des larves traitées au TFB était flasque et atrophié, sa couleur étant légèrement plus foncée que celle des témoins. Toutefois aucune anomalie décelable à l'échelle macroscopique n'a été observée au niveau des tubes digestifs des larves traitées à l'EM-Ht.

### **2-2-2 L'histologie du tube digestif des larves témoins et traitées**

#### **- L'intestin moyen proprement dit**

Il se présente sous une forme arrondie avec une lumière importante (Fig. 29 A). L'intima cuticulaire est absente à ce niveau. La paroi est dépourvue de villosités typiques et

constituée d'un épithélium soutenu par un tissu conjonctif et une musculature très réduite. L'épithélium mésentérique est pseudostratifié, constitué de cellules palissadiques hautes et très abondantes. Ces dernières possèdent à leurs surface apicale un plateau strié ou une bordure en brosse (Fig. 29B), leur noyau est volumineux, allongé suivant la longueur de la cellule, de position parabasale, para-apicale ou médiane. Un autre type de cellules dites de régénération, disposées en amas de 4 à 7, est observé le long de la lame basale.

Le bol alimentaire est limité par une matrice pérित्रophique qui est ouverte dans certains endroits.

La musculature de l'intestin moyen est très réduite, elle se limite à une couche de muscles circulaires interne et une couche de muscles longitudinaux externe, sous forme d'îlots éparpillés régulièrement autour de l'organe.

Le mésentéron des larves de cinquième stade de *L. migratoria* traitées à l'EM-Ht a présenté des différences structurales notables comparativement aux individus témoins. Des lésions histologiques ont été remarquées. Une lyse apicale des cellules épithéliales avec rejet de leur matériel cytoplasmique dans la lumière mésentérique a été observée (Figs. 29 C et D). De même, les cellules épithéliales ont montré de nombreuses plages de lyse intracellulaire avec une intense activité mitotique des nids de régénération. Le traitement a également entraîné un élargissement des espaces intercellulaires, ce qui a désorganisé la structure de l'épithélium.

Les individus traités au TFB ont présenté un mésentéron avec une large lumière résultant probablement d'un relâchement des assises musculaires, l'épithélium mésentérique a montré une désagrégation de ces cellules (Fig. 29 E).

**Figure 29.** Coupes histologiques au niveau du mésentéron des larves de 5<sup>e</sup> stade de *Locusta migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB.

**Photo A :** Portion du mésentéron d'un individu témoin.

**Photo B :** Détail d'une portion du mésentéron d'un individu témoin.

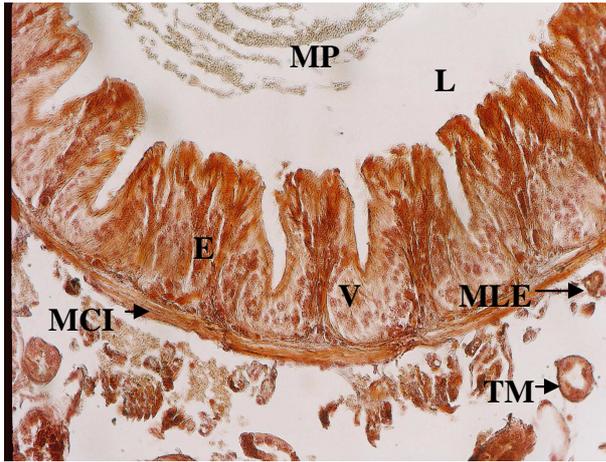
**Photo C :** Portion du mésentéron d'un individu traité à l'EM-Ht.

**Photo D :** Détail d'une portion du mésentéron d'un individu traité à l'EM-Ht.

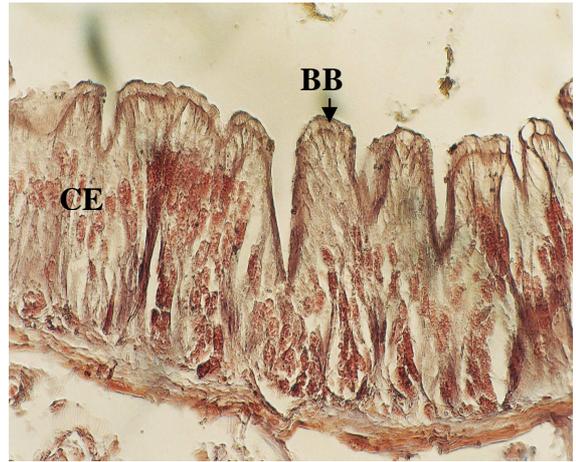
**Photo E :** Portion du mésentéron d'un individu traité au TFB.

#### **Coloration de Mallory**

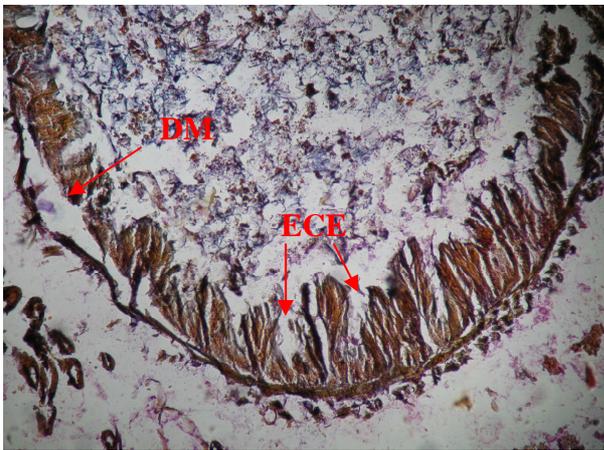
**L :** lumière intestinale; **E :** Epithélium intestinale; **CE :** Cellules épithéliales ; **BB :** Bordure en brosse; **V :** Villosités; **MCI :** Muscles circulaires internes; **MLE :** Muscles longitudinaux externes ; **MP :** membrane péritrophique; **TM :** Tubes de Malpighi  
**ECE :** Ecartement des cellules épithéliales; **MC-L :** Sortie du matériel cytoplasmique dans la lumière intestinale; **DM :** Décollement musculaire.



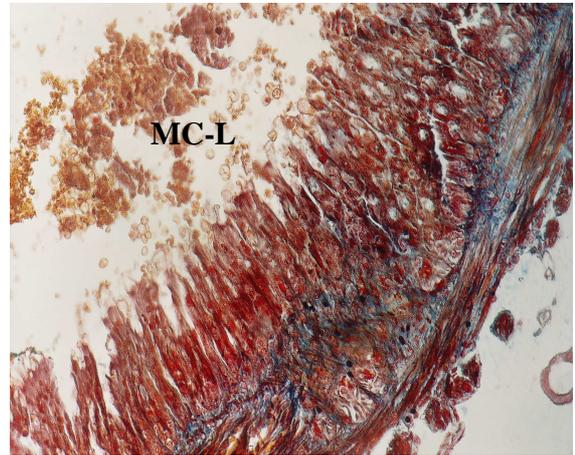
A



B



C



D



E

### **- Les caecums gastriques**

Les caecums gastriques, au nombre de six, sont également dépourvus d'intima cuticulaire (Fig. 30 A).

L'épithélium de la paroi est unistratifié, formant des grandes villosités qui s'alternent avec d'autres plus petites représentant les cryptes de régénération. Les cellules de l'épithélium sont prismatiques à plateau strié avec un noyau ovoïde médian ou para-basal. Les cellules basales de régénération sont regroupées en nids. La musculature est très réduite et composée d'une seule couche de muscles circulaires très fine.

L'action de l'EM-Ht sur les caecums gastriques était moins intense comparativement à celle observée sur le mésenteron. Elle s'est traduite par la destruction de quelques cellules épithéliales et une légère hypertrophie de ces dernières, ce qui a réduit considérablement l'espace luminal. Le décollement de l'épithélium du tissu conjonctif a été noté aussi (Fig. 30 B).

L'effet du TFB sur les caecums gastriques s'est limité à une destruction de quelques amas de cellules épithéliales apicales et une dilatation de l'organe (Fig. 30 C).

**Figure 30.** Coupes histologiques au niveau des caecums gastriques des larves de 5<sup>e</sup> stade de *Locusta migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB.

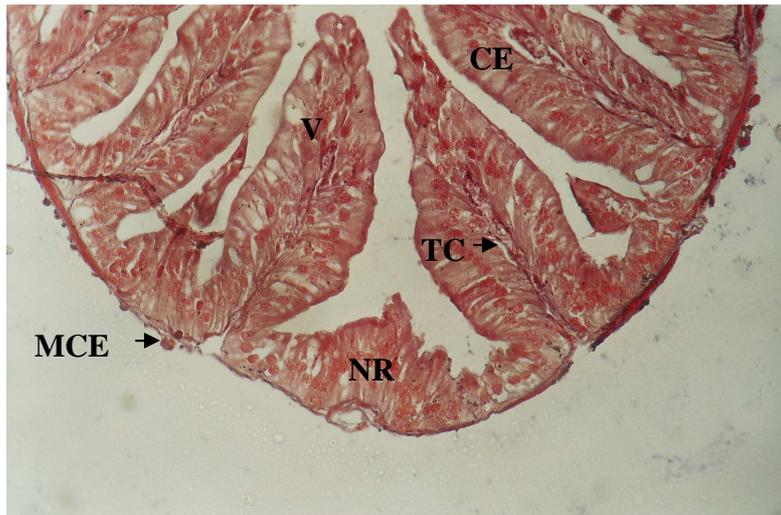
**Photo A :** Portion d'un caecum gastrique d'un individu témoin

**Photo B :** Portion d'un caecum gastrique d'un individu traité à l'EM-Ht

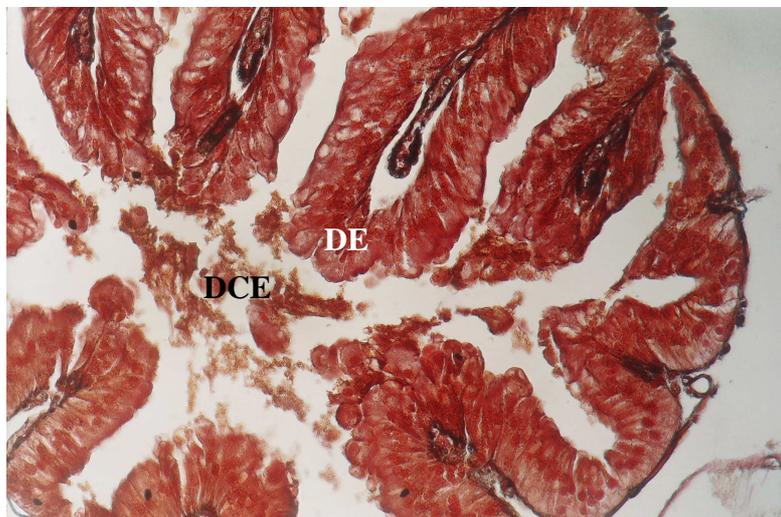
**Photo C :** Portion d'un caecum gastrique d'un individu traité au TFB

#### **Coloration de Mallory**

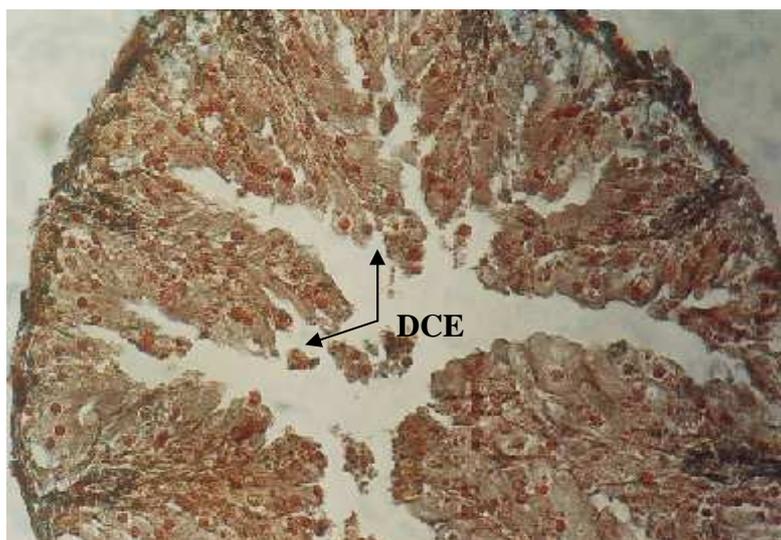
**CE :** Cellules épithéliales; **V :** Villosités; **TC :** Tissus conjonctif; **DR :** Nid de régénération;  
**MCE :** Muscles circulaires externes; **DE :** Décollement de l'épithélium; **DCE :** Destruction des cellules épithéliales.



A



B

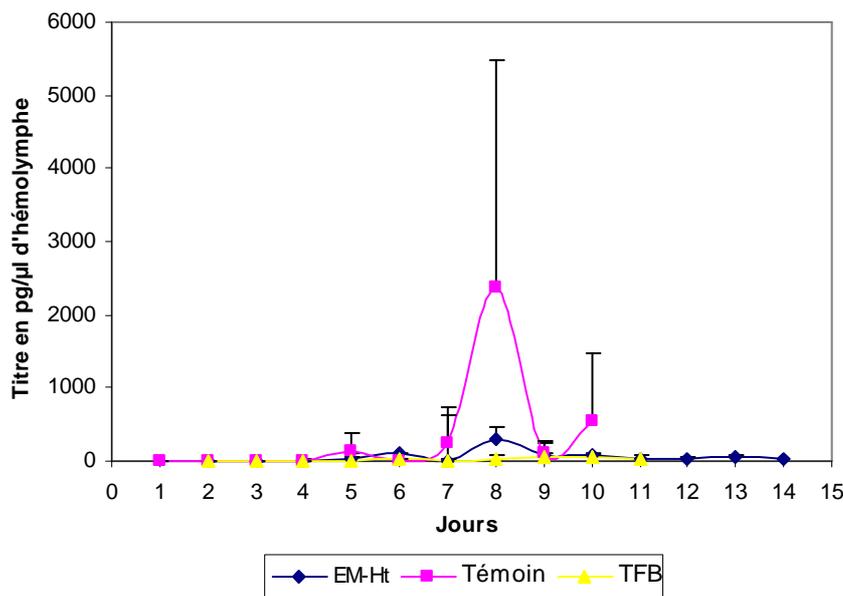


C

### 2-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques

La régulation de la synthèse et la dégradation de la cuticule chez les insectes est dépendante de l'hormone de mue. Les titres des ecdystéroïdes mesurés chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* témoins étaient faible au cours des quatre premiers jours de la vie larvaire, des titres variants entre  $4,27 \pm 3,2$  et  $1,1 \pm 1,9$  pg/ $\mu$ l ayant été enregistrés. Une augmentation des titres fut observée par la suite, une première hausse à  $130,5 \pm 254,1$  pg/ $\mu$ l ayant été enregistrée au 5<sup>e</sup> jour, suivi d'une autre plus sélevée à  $2373,5 \pm 3097,6$  pg/ $\mu$ l au 8<sup>e</sup> jour (Fig. 31), les titres ont baissé par la suite au cours des deux jours précédant la mue imaginale (10<sup>e</sup> jours).

Chez les larves traitées aussi bien à l'extrait brut de *H. tuberculatum* qu'au TFB, les titres des ecdystéroïdes enregistrés étaient nettement inférieurs à ceux des témoins, avec une prolongation du stade larvaire. Une faible hausse à  $308,5 \pm 725,8$  pg/ $\mu$ l fut observée au 8<sup>e</sup> jour uniquement chez les larves traitées à l'extrait de *H. tuberculatum*. Aucune des larves traitées n'a réussi sa mue imaginale.

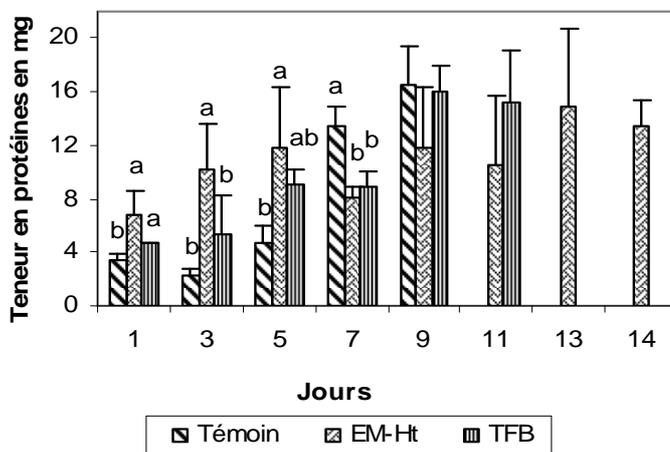


**Figure 31.** Titre des ecdystéroïdes hémolymphatiques (pg 20E équivalents/ $\mu$ l) chez des larves de cinquième stade de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht (350  $\mu$ g) ou au TFB (5  $\mu$ g) (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 5-7). ( $p > 0,05$ , différence non significative, ANOVA).

## 2-4 Effet sur la composition biochimique de la cuticule : taux de chitine et de protéines cuticulaires

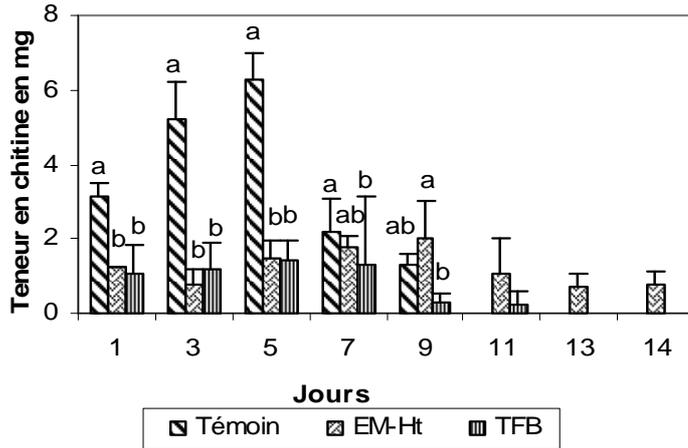
Durant les cinq premiers jours suivants le traitement des larves de 5<sup>e</sup> stade nouvellement émergées, les teneurs en protéines cuticulaires obtenues chez les larves traitées au TFB ou à l'EM-Ht étaient supérieures à celles des témoins (Fig. 32). Des teneurs variant entre  $6,9 \pm 1,7$  et  $11,8 \pm 4,6$  pour les traitées à l'EM-Ht durant les cinq premiers jours et entre  $4,8 \pm 3$  et  $9 \pm 1,10$  mg pour les traitées au TFB ont été enregistrées. Ces teneurs se sont maintenues élevées jusqu'à la fin du cycle larvaire.

Chez les larves témoins, la quantité moyenne des protéines cuticulaires est restée faible durant les cinq premiers jours du stade larvaire comparativement aux traitées mais une augmentation vers la fin du cycle a été observée.



**Figure 32.** Evolution de la quantité des protéines cuticulaires de la cuticule abdominale des larves de cinquième stade de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht (350  $\mu$ g) ou au TFB (5  $\mu$ g) (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 5 larves). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Inversement aux protéines, la chitine cuticulaire des cuticules abdominales chez les larves témoins a connu une élévation progressive de sa teneur au cours des cinq premiers jours, une valeur maximale de  $6,28 \pm 0,72$  mg ayant été observée au 5<sup>e</sup> jour, suivi d'une chute progressive de ses teneurs vers la fin du stade, suite à une dégradation graduelle de la chitine pour la préparation de la mue suivante (Fig. 33). Les traitements à l'EM-Ht ou au TFB ont réduit significativement les quantités moyennes de chitine cuticulaire durant tout le cycle larvaire chez les larves de 5<sup>e</sup> stade et ont inhibé le dépôt de chitine dans l'endocuticule nouvellement formée. Cette réduction fut très marquée à la fin du stade larvaire.

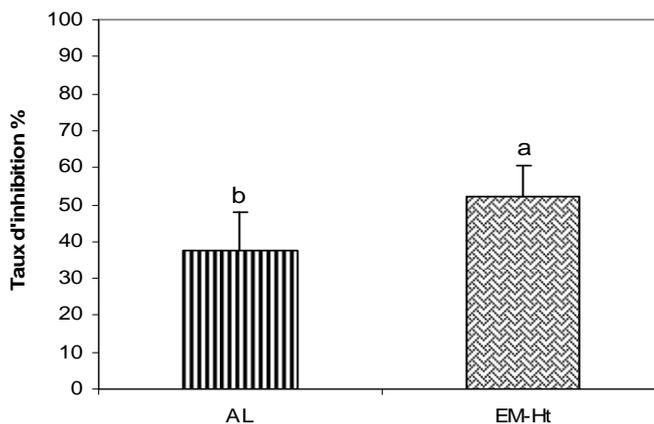


**Figure 33.** Evolution de la quantité de chitine de la cuticule abdominale des larves de cinquième stade de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht (350 µg) ou au TFB (5 µg) (moyenne ± écart-type, n = 5 larves). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 2-5 Effet sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et de la glutathion S-transférase

### 2-5-1 Effet sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase AChE

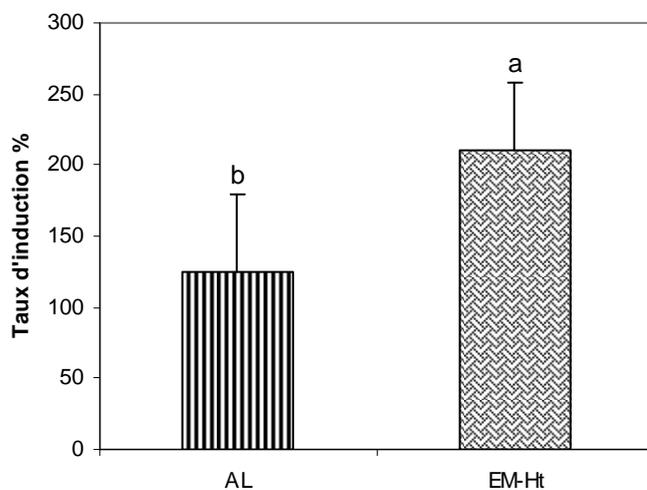
Les alcaloïdes et l'extrait méthanolique brut ont réduit l'activité moyenne de l'acétylcholinestérase chez les larves traitées. Des taux d'inhibition de l'ordre de  $38 \pm 10\%$  et de  $52 \pm 9\%$  ayant été obtenus respectivement pour les alcaloïdes et l'extrait méthanolique brut (figure 34).



**Figure 34.** Taux d'inhibition de l'AChE par les alcaloïdes (1500 µg) ou l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* (1500 µg) chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* (moyenne ± écart-type, n = 10 larves). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ). AL : alcaloïdes.

### 2-5-2 Effet sur l'activité spécifique de la glutathion S-transférase GST

L'activité de la GST mesurée dans les extraits d'insectes obtenus de larves de cinquième stade de *L. migratoria* après traitement aux alcaloïdes et à l'extrait méthanolique a montré une remarquable activation de cet enzyme chez les lots traités comparativement aux témoins (Fig. 35). En effet, l'induction la plus élevée a été obtenue avec l'extrait méthanolique brut où un taux de  $211 \pm 47$  % a été enregistré. Pour les alcaloïdes, il semble que cette voie de biotransformation ait été également activée puisque une induction (activation) de  $124 \pm 55$  % a été obtenue.



**Figure 35.** Taux d'activation de la GST par les alcaloïdes (1500  $\mu$ g) ou l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* (1500  $\mu$ g) chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* (moyenne  $\pm$  écart-type, n = 10 larves). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ). AL : alcaloïdes.

### 3- Etude de l'effet de l'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* et du téflubenzuron sur la reproduction et les titres des ecdystéroïdes chez les femelles de *Locusta migratoria*.

#### 3-1 Effet sur la reproduction

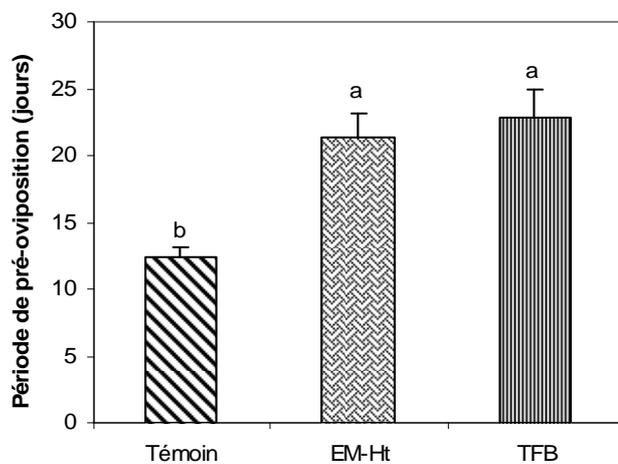
Le traitement à l'émergence d'imagos femelles à l'EM-Ht ou au TFB a causé une augmentation significative de la période de pré-oviposition, passant de 12,4 jours chez les témoins à 21,3 et 22,9 jours chez les femelles traitées à l'EM-Ht et au TFB, respectivement (Fig. 36).

L'intervalle de temps séparant deux pontes successives chez les femelles a été affecté par les traitements. En effet, ces derniers ont augmenté significativement ce délai chez les

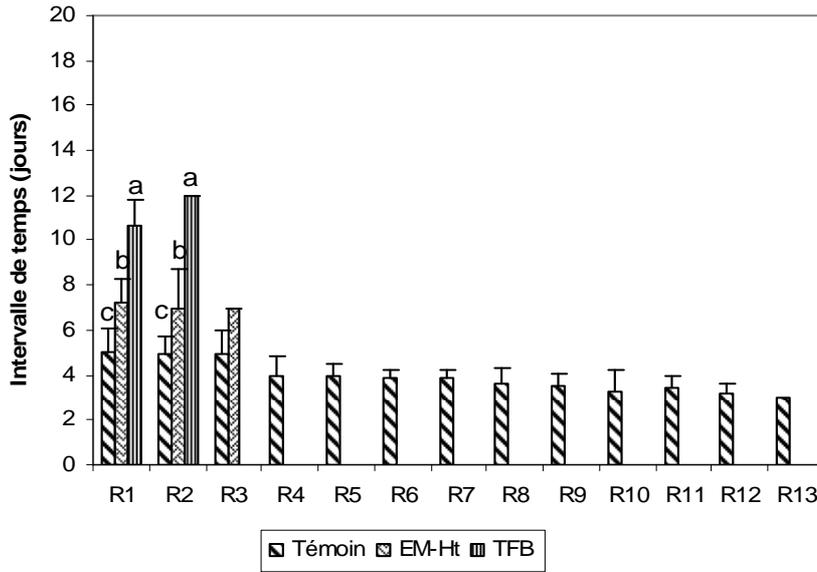
séries traitées. Le 2<sup>e</sup> rythme était de  $7 \pm 1,73$  jours chez les traitées à l'extrait méthanolique de *H. tuberculatum* et de  $12 \pm 0$  jours chez les femelles traitées au TFB. Aussi une diminution de cet intervalle avec le rang de la ponte a été notée (Fig. 37).

L'EM-Ht et le TFB ont également entraîné une diminution hautement significative du nombre d'oothèques produites par femelle, passant de 12 chez les témoins à 2,8 et 1,5 oothèques/femelles, chez les individus traités à l'EM-Ht et au TFB, respectivement (Fig. 38). Une diminution significative du nombre d'œufs par oothèque a également été observée chez les femelles traitées à l'EM-Ht ou au TFB ; on note aussi une légère diminution du nombre d'œufs par oothèque en fonction du rang de la ponte (Fig. 39).

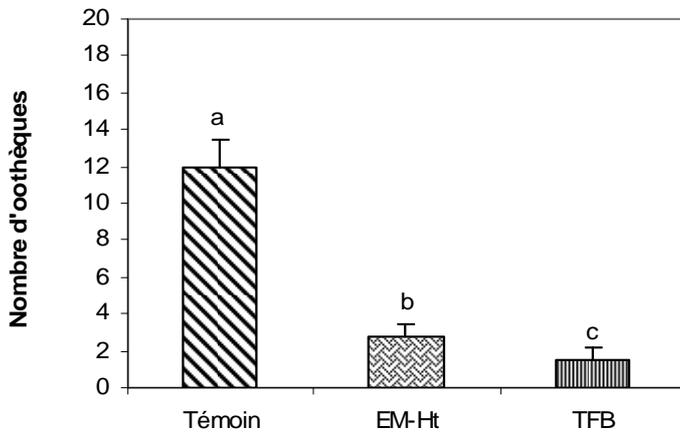
Les traitements ont de plus significativement réduit la fertilité, particulièrement dans le cas de femelles traitées au TFB, pour lesquelles aucune éclosion n'a été observée (Fig. 40), même après prolongation de la période d'incubation. Chez les témoins, l'éclosion a été observée après 15 jours d'incubation. Le taux d'émergence obtenu était de 86,37 %. Il est à noter que l'éclosion des œufs pondus par les femelles traitées à l'EM-Ht a débuté avec un retard de 8 jours comparativement aux témoins, et les larves de premier stade issues de ces œufs étaient naines.



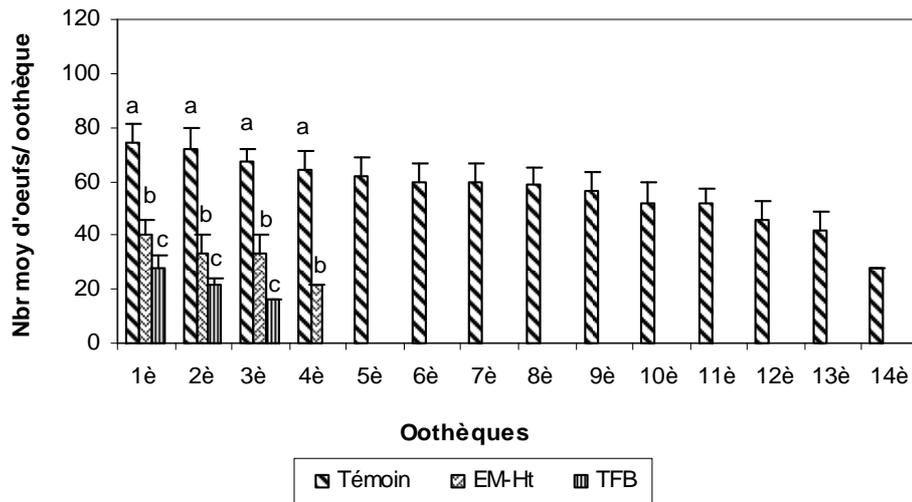
**Figure 36.** Période de pré-oviposition chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB (moyenne  $\pm$  écart-type, n=10). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).



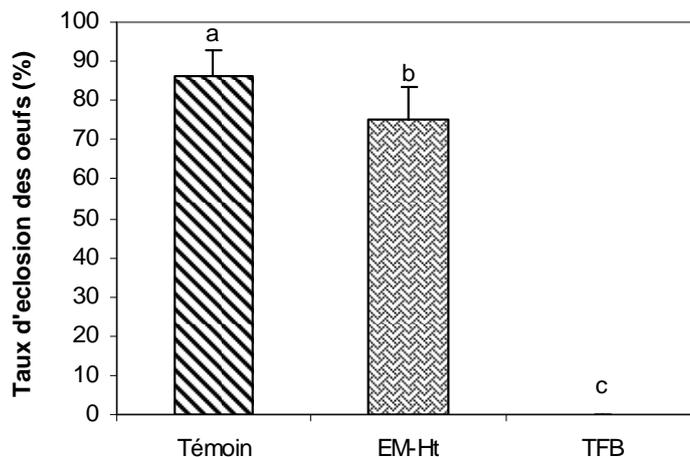
**Figure 37.** Intervalle de temps (en jours) séparant deux pontes successives chez les femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=10$ ). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ) R : rythme de ponte.



**Figure 38.** Le nombre moyen d'oothèques pondues par des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=10$ ). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).



**Figure 39.** Evolution de la fécondité (nombre d'œufs/oothèque) des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n=10$ ) au cours de pontes successives. a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p<0,05$ ).

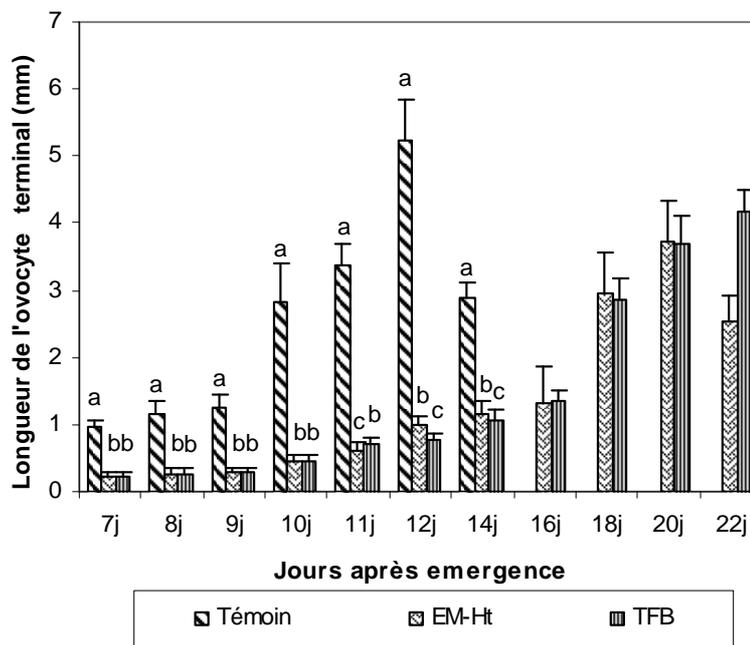


**Figure 40.** Taux d'éclosion des œufs chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 380-7175$  œufs). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p<0,05$ ).

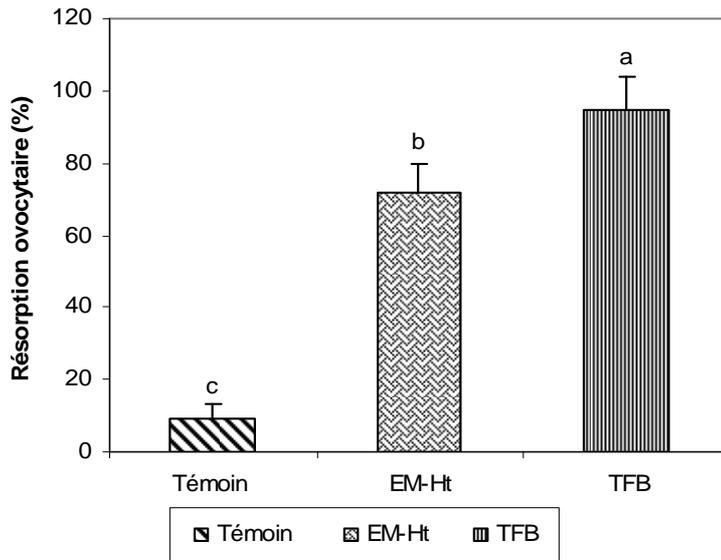
### 3-2 Effet sur le développement ovarien

Une différence claire a été observée pour le développement des ovocytes terminaux entre les femelles témoins et traitées durant le premier cycle ganadotrophique (Fig. 41). Une augmentation rapide de la longueur de l'ovocyte terminal a été observée chez les témoins

entre le 9<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour après l'émergence, passant de  $2,8 \pm 0,6$  à  $5,2 \pm 0,6$  mm. Chez les traitées à l'extrait ou au TFB, la croissance des ovocytes s'est avérée très lente et très graduelle comparativement aux témoins. Au 12<sup>e</sup> jour, les ovarioles des traitées présentaient des ovocytes de taille très réduite, par comparaison aux témoins, avec des longueurs de  $1,0 \pm 0,1$  mm et de  $0,8 \pm 0,1$  pour les traitées à l'extrait et au TFB, respectivement. Ce retard de l'ovogenèse fut accompagné d'une dégénérescence des ovocytes terminaux. La proportion des ovarioles présentant des corps de régression atteignait  $72 \pm 8$  % chez les traitées à l'extrait et  $95 \pm 9$  % chez les traitées au TFB, contre  $9 \pm 4$  % chez les témoins (Fig. 42).



**Figure 41.** Longueur de l'ovocyte terminal (mm) chez les femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB durant le premier cycle gonadotrophique (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 100$  ovocytes). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

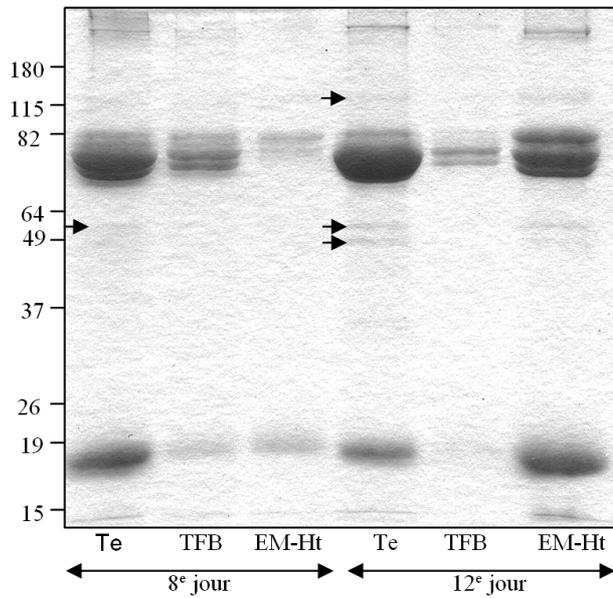


**Figure 42.** Pourcentage d’ovarioles présentant des corps de régression chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l’EM-Ht ou au TFB durant le premier cycle gonadotrophique (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 100$  ovarioles). a b et c : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

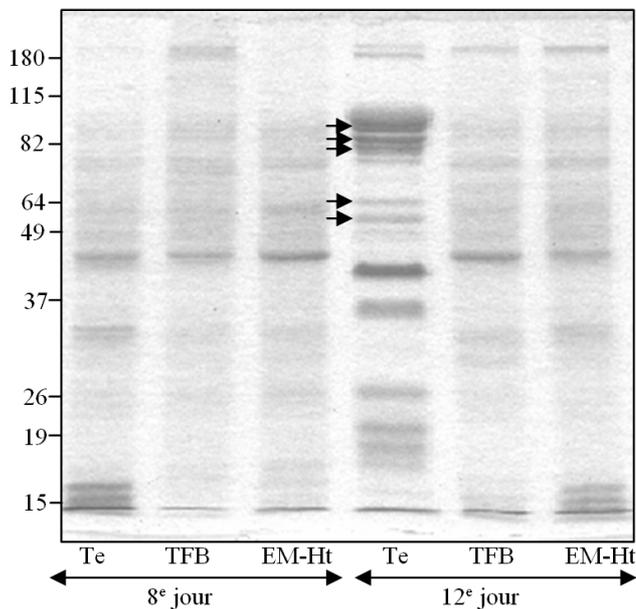
### 3-3 Effet sur la vitellogenèse

La vitellogénèse est une phase d’accroissement ovocytaire résultant de l’accumulation de réserves sous forme de protéines (dont la vitellogénine), de globules lipidiques et de glycogène, ces substances étant soit synthétisées par l’ovocyte lui-même, soit captées de l’hémolymphe (Racchaud-Scholler, 1980). La comparaison des protéinogrammes de l’hémolymphe de femelles témoins et traitées âgées de 8 et de 12 jours a montré une inhibition de la biosynthèse des protéines hémolympatiques par le TFB. L’extrait méthanolique de *H. tuberculatum* a retardé la biosynthèse des protéines sans toutefois l’inhiber complètement. En effet, les protéines chez cette série sont apparues tardivement entre le 8<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour. Au 12<sup>e</sup> jour, le profil des traitées à l’extrait était semblable à celui des témoins (Fig. 43).

Pour les protéines ovariennes, les traitements au TFB ou à l’extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* ont entraîné une perturbation de l’incorporation des protéines dans les ovocytes, laquelle s’est traduite par une très faible accumulation de celles-ci chez les traitées. Le protéinogramme des femelles témoins de 12 jours coïncidant avec la pleine vitellogénèse a montré une très forte accumulation des protéines (Fig. 44). Cinq bandes dont les poids moléculaires sont proches des valeurs publiées par Wyatt (1988), pour les six bandes de vitellogénines (56 à 120 kDa), correspondent vraisemblablement aux vitellogénines.



**Figure 43.** Profil électrophorétique des protéines hémolympatiques au 8<sup>e</sup> et au 12<sup>e</sup> jour chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht. ST, protéines standard ; Te, témoins ; TFB, téflubenzuron ; EM-Ht, extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum*. Les chiffres à gauche indiquent le poids moléculaire (en kDa) des standards. ➔: bandes de protéines présentes chez les témoins mais absentes chez les traitées au TFB (jours 8 et 12) et à l'EM-Ht (jour 8).

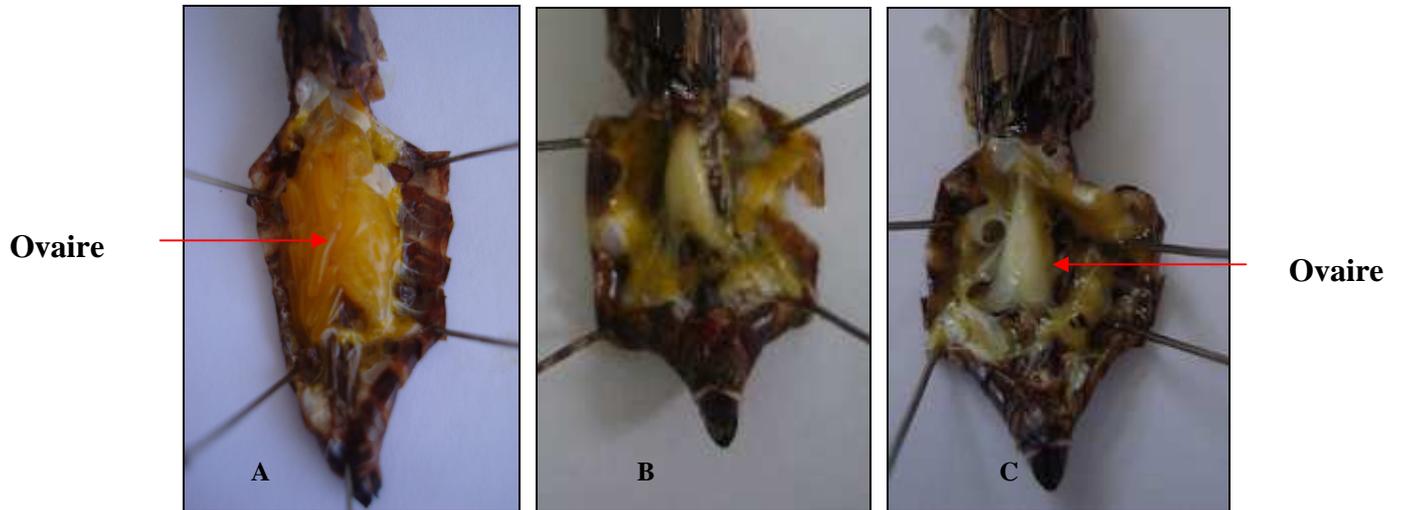


**Figure 44.** Profil électrophorétique des protéines ovariennes au 8<sup>e</sup> et au 12<sup>e</sup> jour de femelles de *L. migratoria* témoins et traitées au TFB ou à l'EM-Ht.

ST, protéines standard ; Te, témoins ; TFB, téflubenzuron ; EM-Ht, extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum*. Les chiffres à gauche indiquent le poids moléculaire (en kDa) des standards.

➔ : bandes dont les tailles correspondent aux polypeptides constituant la vitellogénine chez *L. migratoria* ; ces bandes sont présentes chez le témoin au 12<sup>e</sup> jour mais absentes chez les traitées.

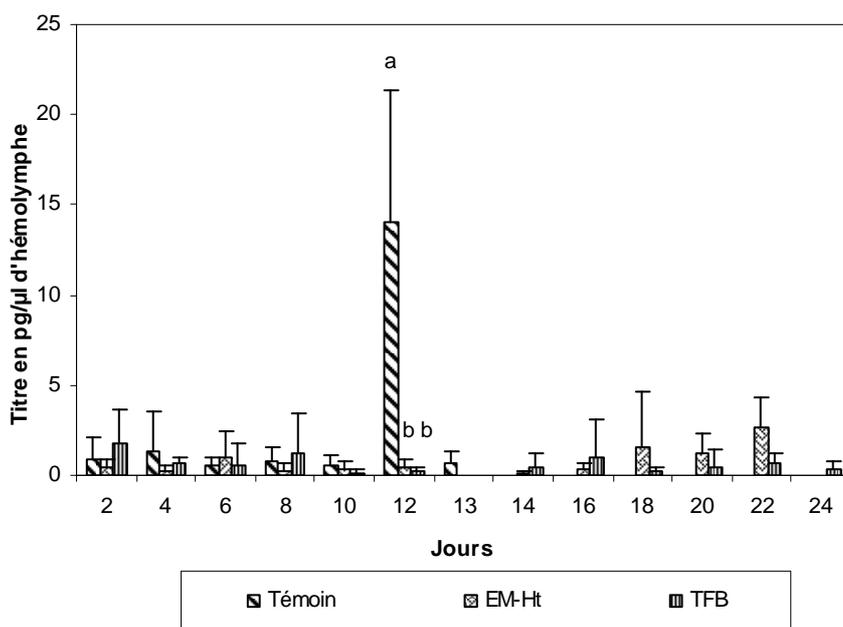
Au 12<sup>e</sup> jour après traitement les femelles traitées présentaient des ovaires juvéniles (Figs. 45 B et C) tandis que les témoins présentaient des ovaires en phase finale de vitellogenèse (Fig.45 A)



**Figure 45.** Ovaires des femelles de *L. migratoria* témoins (A) et traitées à l'EM-Ht (B) ou au TFB (C) au jour 12.

### 3-4 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens

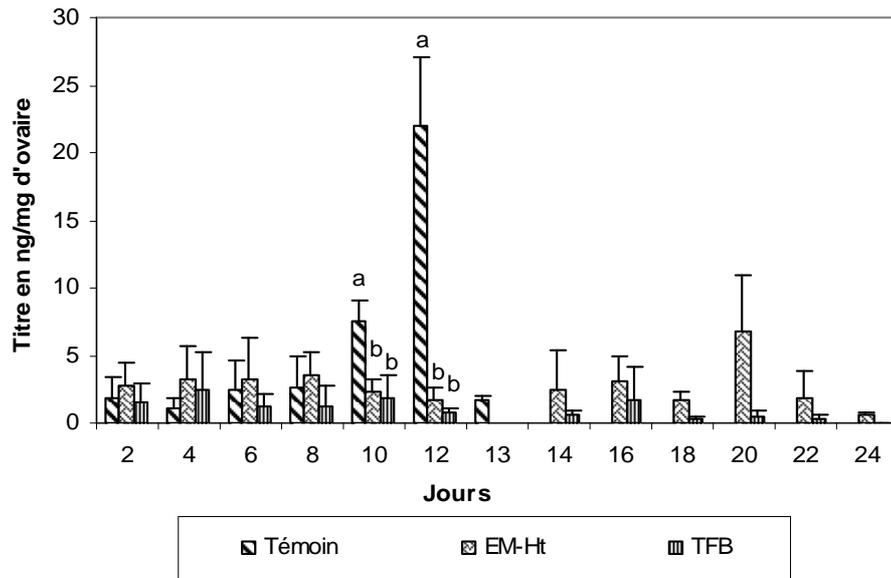
L'hémolymphe des femelles témoins affichait des quantités faibles d'ecdystéroïdes durant les onze premiers jours qui suivent l'émergence, période qui correspond à la phase de prévitellogénèse et de vitellogénèse. Un pic de  $14,0 \pm 7,3$  pg/ $\mu$ l a été enregistré à la fin de la phase de vitellogénèse (jour 12 ; Fig. 46) suivi d'une chute subite après la première ponte. Chez les femelles traitées à l'EM-Ht ou au TFB, les titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques sont demeurés faibles pendant toute la période de prélèvement (Fig. 46).



**Figure 46.** Titre des ecdystéroïdes hémolymphatiques (pg équivalents de 20E/ $\mu$ l) chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB, durant le premier cycle gonadotrophique (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 5$ ). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Dans les ovaires, les titres d'ecdystéroïdes étaient très faibles chez les séries témoins et traitées au cours de la période de prévitellogénèse, où les ovaires sont encore au stade juvénile et les ovocytes terminaux sont translucides. Une première augmentation fut observée entre le 8<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> jour après l'émergence chez les témoins, et un pic de  $22,1 \pm 5,1$  ng/mg fut enregistré au 12<sup>e</sup> jour, suivi d'une chute brusque des titres au 13<sup>e</sup> jour suite à la première ponte (Fig. 47).

Pour les séries traitées, le contenu des ovaires en ecdystéroïdes est resté faible durant toute la période d'échantillonnage. Toutefois, un faible pic a été observé avant l'ovulation chez les traités à l'EM-Ht (Fig. 47).



**Figure 47.** Titre des ecdystéroïdes ovariens en ng équivalents de 20E /mg chez des femelles de *L. migratoria* témoins et traitées à l'EM-Ht ou au TFB durant le premier cycle gonadotrophique (moyenne  $\pm$  écart-type,  $n = 4-7$ ). a et b : moyennes significativement différentes (test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

# Chapitre IV Discussion

## Discussion

### 1-Caractérisation phytochimique de la plante *Haplophyllum tuberculatum* et analyse quantitative et qualitative de ses différents extraits

#### 1-1 Caractérisation phytochimique de la plante *Haplophyllum tuberculatum*

Le screening phytochimique de *H. tuberculatum* a montré la présence notable des flavonoïdes, des tanins totaux, des anthocyanes et des alcaloïdes et l'absence totale des saponosides, des iridoïdes et des coumarines. Bruneton (1987) a également signalé la richesse de *H. tuberculatum* en huiles essentielles. Benazir *et al.* (2011) ont rapporté que *Ruta graveolens* présente des alcaloïdes, des flavonoïdes, des tannins et des coumarines.

Le rendement en composés phénoliques totaux de *H. tuberculatum* obtenu était de 8,39 %, ce qui est inférieur à celui obtenu pour *Nitraria Retusa* (19 %), extrait par le même solvant (Hadj Salem, 2009). Il est par contre supérieur à celui obtenu par Cvetnić et Vladimir-Knezević (2004) lors d'une extraction éthanolique des composés phénoliques de la Rutaceae *Citrus paradisi* (3,92 %). Toutefois, Chaaib-kouri (2004) a obtenu durant une extraction par le méthanol un rendement, proche de celui cité ici pour la plante *Zanthoxylum Zanthoxyloides* (Rutaceae) (6,19 %).

Les rendements des différentes fractions flavanoïdiques restent bas pour *H. tuberculatum* en les comparant à ceux des autres espèces de Rutaceae. Pour *Fagara zanthoxyloides* (Rutaceae) Igor-Passi (2002) a obtenu 24 % pour l'extrait d'acétate d'éthyle et 8 % pour l'extrait butanolique au cours d'une extraction méthanolique liquide-liquide. Les travaux de Benhammou *et al.* (2009) ont montré une grande différence dans les rendements en composés phénoliques de la plante *Atriplex Halinus*, ils ont rapporté 24 % pour l'extrait méthanolique et uniquement 2,66 % pour la fraction d'acétate d'éthyle et 1 % pour la fraction butanolique.

Les alcaloïdes sont des constituants communs de toutes les espèces de Rutaceae, leur taux chez *H. tuberculatum* a été évalué à 0,37 %. Certaines espèces de Rutaceae montrent une plus grande richesse en alcaloïdes que *H. tuberculatum*; c'est le cas de *Araliopsis soyauxii* pour laquelle un rendement de 1,47 % a été obtenu (Vaquette *et al.*, 1976), et la plante *Medicosma subsessili* qui présente 1,31 % d'alcaloïdes (Nguyen, 2002). D'autres espèces, par contre, présentent des faibles rendements en alcaloïdes, c'est le cas de la plante *Atriplex halimus* pour laquelle Benhammou *et al.* (2009) ont obtenu 0,25 %.

Cette différence dans les rendements d'extraction des substances secondaires chez les différentes espèces de plantes s'expliquerait selon certains auteurs par les conditions pédoclimatiques, le stade de croissance de la plante, le solvant et la méthode d'extraction

utilisés (Benazir *et al.*, 2011). Ils dépendent aussi de la partie de la plante utilisée. Pour *Harnamdia*, les rendements en alcaloïdes obtenus étaient de 0,9 % pour les écorces de tiges, 2 % pour les écorces de racines et 0,21 % pour les feuilles. Pour *Ruta graveolens* Benazir *et al.* (2011) ont trouvé que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les acides gras sont très représentés dans les feuilles, les terpénoïdes sont très abondants dans les racines. Cependant, les racines sont très riches en quinones et en stéroïdes.

La teneur en composés phénoliques de l'EM-Ht a été estimée à  $74,45 \pm 1,4$  mg EAG/g, cette teneur étant supérieure à celle de *Ruta montana* (Rutaceae) récoltée dans la région de Laghouat pour laquelle le taux en composés phénoliques a été estimé à 3,13 mg EAG/g (Djeridane *et al.*, 2005). Aussi, elle est supérieure à celle trouvée pour la plante *Atriplex halimus* dont la teneur varie entre 3,77 mg EAG/g pour les tiges et 10,12 mg EAG/g pour les feuilles (Benhammou *et al.*, 2009). Elle se trouve comparable à celle trouvée par Sadek et Makris (2009) pour *Fortunella margarita* qui ont rapporté une teneur variant entre  $77,4 \pm 0,2$  mg EAG/g et  $106 \pm 0,5$  mg EAG/g.

La teneur en composés phénoliques d'une plante dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques (génétique) et extrinsèques (conditions climatiques, la maturité à la récolte et les conditions de stockage) (Falleh *et al.*, 2008). La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures, particulièrement la température élevée, l'exposition solaire, la sécheresse et la salinité qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (Falleh *et al.*, 2008). Ceci a été d'ailleurs confirmé par les travaux de Perez *et al.* (2007) qui ont montré l'effet du traitement de pré-extraction (irradiation ionisante) et du solvant d'extraction, sur la concentration en composés phénoliques totaux dans les extraits du romarin.

Le criblage phytochimique de l'extrait méthanolique brut et de ces différentes fractions sur plaque CCM a mis en évidence la présence d'acides phénols qui sont apparus sous forme de bandes de fluorescence bleue sous uv à 254 nm et de flavonoïdes : flavonols et flavones sous forme de bandes de couleur brune à 254 nm selon Dohou *et al.* (2003). Parmi les flavonoïdes révélés figurent la quercitine et la rutine. La quercitine était majoritairement présente dans les phases d'acétate d'éthyle et d'éther diéthylique. Chez *Ruta graveolens*, Benazir *et al.* (2011) ont révélé la présence de flavonoïdes et de tanins dans l'extrait métanolique brut. Les acides phénols sont apparus sous forme de tâches bleues sous uv.

Le profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique brut a permis de constater que *H. tuberculatum* est assez riche en alcaloïdes. Leur identification ne peut être faite qu'après

analyse avec des techniques plus poussées telle que la CPG-SM ou l'HPLC. Par ailleurs, les travaux de Al Yahia *et al.* (1992), de Al Shamma *et al.* (1979), de Seriha et Abou Amer (1984), de Sheriha *et al.* (1987) et de Al- Rehaily *et al.* (2001) sur la même plante récoltée de l'Arabie Saoudite et de l'Iraq ont montré sa richesse en alcaloïdes suivants : l'aplotubinone, l'haplotubine, la tubérine, la tubacétine, la tubasenicine, les quinolines, les quinoldiones, les fluidrisines, les skimianine et l'evoxine.

## **1-2 Analyse qualitative des différentes fractions de l'extrait méthanolique brut**

Les plantes sont une très riche source en métabolites secondaires : alcaloïdes, flavonoïdes, saponines, phénols, huiles essentielles avec de très intéressantes activités biologiques. La concentration en ces composés est très variable durant la croissance des plantes. Hamrouni-Sellami *et al.* (2009) ont démontré l'influence du stade végétatif et des facteurs climatiques sur la production et la libération de ces métabolites. Quarante trois composés ont été identifiés par GC-MS dans les différentes fractions de l'extrait méthanolique de *H. tuberculatum*. La fraction butanolique, composée essentiellement de sucres liés à des formations cycliques, était la plus riche en composés. La fraction acide phénolique semi purifiée est composée essentiellement d'[acide 1,2-benzenedicarboxylique, mono(2-ethylhexyl) ester] (acide benzoïque), d'acide oléique, d'acide hexadécanoïque et d'acide dodécanoïque (acides gras). Le 2-Decénal (E) identifié dans cette fraction, a été également trouvé dans l'extrait méthanolique du bois de *Ailanthus altissima* par Caboni *et al.* (2012). Ces auteurs ont démontré que cette molécule était à l'origine d'une puissante activité nématocide contre les juvéniles de *Meloidoyne javanica*.

Les fractions éther diéthylique et acétate d'éthyle (Figs. 20 et 22) sont les moins riches en composés, la deuxième étant essentiellement constituée de [pentane, 2,2,3,3-tetraméthyl-] et d'acide 2-cétohexanoïque. Ces alcanes, alcools et acides carboxyliques sont des constituants majeurs des cires couvrants les parties aériennes des plantes et assurant leur protection contre les insectes et les maladies (Kunst et Samuels, 2003).

Le composant majoritaire de la fraction éther diéthylique est l'acide 1,2-benzenedicarboxylique, diisooctylester. Ce dernier composé ainsi que l'éthyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, l'[acide hexadécanoïque, ethyl ester] et l'[acide oléique, méthyl ester] ont été rapporté par Hema *et al.* (2011) lors de l'analyse par GC-MS de l'extrait éthanolique de *Murraya koenigii* (Rutaceae) et pour laquelle trente composés ont été identifiés. Ces mêmes auteurs signalent que l'acide hexadécanoïque- ethyl ester et l'acide oléique-méthyl ester sont dotés de

propriétés pesticides, nématicides et insectifuges. Sheriha et Abou-Amer (1984) ont identifié quatre lignanes de l'extrait chloroformique de la partie aérienne fleurie de *H. tuberculatum* et qui sont : la diphylline, la justicidine A, la justicidine B et une nouvelle lignane nommée la tuberculatine.

Benazir *et al.* (2011) ont quant à eux démontré que l'extrait méthanolique des feuilles de *Ruta graveolens* (Rutaceae) était très riche en acides gras. L'acide férulique et l'acide caféique sont les majeurs acides phénoliques détectés chez cette espèce par Proestos *et al.* (2006), pour les falvonoïdes, la quercitine et la rutine restent les composés les plus abondants.

Cano *et al.* (2006) ont pu isoler quatre flavones de la partie aérienne de la rutacée *Esenbeckia berlandieri ssp acapulcensis*.

## **2- Evaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* et du téflubenzuron et de leurs effets sur quelques variables physiologiques et endocriniennes chez les larves de cinquième stade de *Locusta migratoria***

### **2-1 Activité insecticide et atteintes morphogénétiques**

Il est admis que les régulateurs de croissance sont caractérisés par le fait qu'ils ne tuent pas directement l'insecte cible mais interfèrent avec certaines voies de son processus de croissance et de développement. Ils agissent sur d'autres organes cibles autres que le système nerveux (Graf, 1993), ce qui apparaît clairement à travers les résultats des tests de toxicité du TFB qui n'ont montré aucune mortalité durant la première semaine suivant le traitement. Les mortalités ont débuté à l'approche de la mue, les 100 % de mortalité ont été obtenus entre le 10<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour pour l'ensemble des doses testées à l'exception de la plus faible, pour laquelle les 100 % ont été obtenu au 14<sup>e</sup> jour. La mort des larves est survenue au moment de l'exuviation.

Les résultats obtenus sont comparables à ceux trouvés par de nombreux auteurs ayant testé différents composés appartenant au groupe des benzoylphenylurée (BPU). Le diflubenzuron (DFB), un autre inhibiteur de croissance de la même famille chimique que le TFB perturbe le développement des pupes de *Tenebrio molitor* lorsqu'il est administré par injection, par trempage ou par application topique, la mort survenant avant ou au moment de l'exuviation ou durant les premiers jours après l'émergence suite à une exuviation anormale. Il a été remarqué également que l'efficacité de ce composé diminue avec l'avancement dans l'âge de la puce, 90 % de mortalité ayant été enregistrés avec une concentration de 10 g de DFB/l (Soltani *et al.*, 1983).

Les résultats des essais réalisés par les BPU montrent que ces derniers peuvent remplacer les insecticides classiques pour le « traitement en barrières » en lutte contre les locustes à cause de leur effet rémanent suffisamment long. Les tests sous cages ont montré que l'efficacité du traitement par le DFB et le triflumuron dans le sud ouest de Madagascar sur parcelles après 0, 14 et 28 jours est respectivement 100, 70 et 80 % (Scherer et Célestin, 1992).

Les essais menés sur terrain par Dorn *et al.* (1997) en utilisant le fenoxycarbe à très faibles doses ont montré un grand nombre d'altérations morphogéniques chez les bandes larvaires du dernier stade de *L. migratoria*, gênant le saut et le vol; les insectes traités étaient dans une très mauvaise forme physique et étaient devenus une proie facile pour de nombreux prédateurs.

Nasseh *et al.* (1992) ont démontré que le triflumuron et le TFB ont permis d'obtenir une mortalité de 100 % sur les populations du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* issues d'un élevage de laboratoire au bout de quatre jours de traitement.

En plus des locustes, le TFB s'est révélé très toxique vis-à-vis d'autres espèces d'insectes. En effet, les travaux de Chui *et al.* (1993 et 1995) ont montré que le TFB est très efficace contre les larves de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Il agit en inhibant le développement normal des larves de moustiques à très faibles doses. Le produit a montré également une activité résiduelle de haut niveau.

Les plantes représentent une source riche de molécules bioactives ou métabolites secondaires qui peuvent affecter la croissance, le développement, le comportement et agissent comme antiappétants, toxines ou régulateurs de croissance. Ces molécules naturelles peuvent remplacer des insecticides classiques et semblent être capables de résoudre les problèmes de l'environnement causés par les pesticides de synthèse (Campagne *et al.*, 1992 in Kim *et al.*, 2005).

L'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* administré par ingestion forcée aux larves du dernier stade de *L. migratoria* aux doses 350, 500, 1000, 1250, et 1500 µg/larve a présenté des effets différents selon la dose administrée. En effet, les deux premières doses 350 et 500 µg/larve ont présenté un effet régulateur de croissance analogue à celui du TFB, mises à part quelques faibles mortalités qui ont été enregistrées durant les premiers jours pour ces doses. Les mortalités les plus élevées ont été enregistrées au moment de la mue, 80 % ont été obtenus le 12<sup>e</sup> jour pour la D1 et 89,89 % au 13<sup>e</sup> jour pour la D2. Les larves traitées meurent

soit suite à un blocage de la mue soit elles ne parviennent pas à effectuer leur mue complète, elles présentent plusieurs malformations et finissent par mourir quelques jours après.

Les fortes doses D3, D4 et D5 ont présenté une activité insecticide très intéressante avec une relation dose-réponse. L'action de ces doses était précoce comparativement aux deux premières. Des mortalités corrigées de l'ordre de 89 %, 90 % et 94 % ont été obtenues respectivement au 9<sup>e</sup>, 7<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> jour après traitement.

L'effet régulateur de croissance de l'extrait éthanolique de *H. tuberculatum* a été signalé par Mohsen *et al.* (1989) sur *Culex quinquefasciatus* à des concentrations comprise entre 50-2000 mg/l, cet extrait ayant entraîné également des aberrations morphogénétiques. Cette action régulateur de croissance pourrait être due à la présence chez les plantes de phytoécdysones, des phytojuvénoïdes et des antihormones juvéniles (Varma et Dubey, 1998). Ce profil d'effet selon les doses a été également signalé par Céspedes *et al.* (2004 et 2005).

En effet, l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Roldana barbar johannis* (Asteraceae) contenant : le sargochromenol, l'acide sargahydroquinoïque et l'acide sargaquinoïque montre une activité régulateur de croissance vis-à-vis des larves de *Spodoptera frugiperda* entre 5 et 20 ppm et une activité insecticide (létale) entre 20 et 35 ppm. La recherche des sites et de mécanisme d'action de ces métabolites secondaires responsables de l'activité insecticide ou de l'activité régulateur de croissance indique que plusieurs composés phénoliques de cette plante étaient impliqués (Céspedes *et al.*, 2004).

L'extrait méthanolique des racines et de la partie aérienne de *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) a présenté également une activité régulateur de croissance en inhibant complètement le développement des larves de *Spodoptera frugiperda* et *Tribolium castaneum* entre 5 et 50 ppm et une activité insecticide aigue entre 50 et 300 ppm (Céspedes *et al.*, 2005).

Sur criquets, des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus par de nombreux auteurs qui ont travaillé sur diverses espèces végétales. En effet, l'action insecticide de l'extrait brut des feuilles de *Calotropis procera* sur les larves du dernier stade de *S. gregaria* s'est manifestée avec un taux de mortalité de 100 % au bout de 15 jours après le traitement (Abbassi *et al.*, 2004). Les alcaloïdes extrait de la même plante ainsi que de *Zygophyllum gaetulum* et de *Peganum harmala* ont causé une mortalité significative des jeunes imagos de *S. gregaria* (Abbassi *et al.*, 2003a). Il a été trouvé également que l'extrait des graines de *Peganum harmala* retarde la mue imaginale de 8 jours chez les larves de cinquième stade de *S. gregaria* et les 100 % de mortalité ont été atteints le 16<sup>e</sup> jour après traitement. Une réduction

de l'activité physique et une diminution du poids ont été également constatées chez les larves traitées (Abbassi *et al.*, 2003b). Sur cette même espèce de criquet, une excellente action insecticide a été trouvée par Barbouche *et al.* (2001) en utilisant l'extrait méthanolique des feuilles de *Cestrum parqui* où les 100 % de mortalité ont été obtenus dans un délai de 2 à 4 jours sur les larves de dernier stade larvaire.

L'efficacité des extraits de plantes contre les insectes dépend de l'espèce de la plante, de la partie de la plante et du solvant utilisé (Vanichpakorn *et al.*, 2010). Les extraits botaniques bruts sont un mélange d'un grand nombre de composés qui agissent sur les insectes par une cascade de mécanismes complexes. Il est très difficile de spécifier la relation de sensibilité entre les extraits bruts et le mécanisme d'action de ces extraits qui représentent un mélange complexe de composés phénoliques, flavonoïdes, furanocoumarines ....etc. Ces composés sont capables de générer même des radicaux libres d'O<sub>2</sub> qui peuvent avoir une influence sur la biologie de l'insecte (Leszczyński *et al.*, 1999 in Tewary *et al.*, 2005).

Des fractions purifiées d'extraits de plantes peuvent engendrer une toxicité plus élevée que celle de l'extrait brut. Pour *Hybanthus parviflorus* (Violaceae), il a été constaté que tous les extraits éthanoliques induisent une forte mortalité. Cependant la mortalité provoquée par la fraction butanolique purifiée à partir des tannins libres de l'extrait éthanolique est beaucoup plus élevée (90 %) que celle de la fraction aqueuse (65 %). Ce résultat est en relation avec le taux élevé des polypeptides macrocycliques présents dans cette fraction butanolique. Ces cyclopeptides sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes contre les bioagresseurs et qui sont responsables de l'activité insecticide de cette plante (Broussalis *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes partiellement purifiés obtenus à partir de *Caloptropis procera* (Ait) se sont avérés plus toxiques que les 6 flavonoïdes standards (tel que la quercétine, la rutine et la quercetrine) sur les adultes et les œufs de *Callosobrochus chinensis* (L.); une exposition de 48 heures à ces flavonoïdes a engendré 100 % de mortalité. Une réduction significative de l'oviposition a été observée pour les doses allant de 5 à 10 mg/ml (Salunke *et al.*, 2005). Les flavonoïdes ont un rôle clé dans les réponses aux mécanismes du stress des plantes; ils altèrent la mue chez les insectes et causent la mort (Stamp et yang 1996 in Salunke *et al.*, 2005).

Autre le groupe des Orthoptères, l'efficacité insecticide des extraits méthanoliques ou éthanoliques bruts de diverses espèces de plante a été rapportée par de nombreux auteurs contre différentes espèces d'insectes. Tewary *et al.* (2005) précisent que les extraits

botaniques de cinq plantes de l'ouest de l'Himalaya (*Berberis lycium* L., *Hedera nephalens* L., *Acorus calamus* L., *Zanthoxylum armatum* L., *Valeriana jatamansi* L.) présentent une activité insecticide vis-à-vis d'*Aphis craccivora*.

Sur *Myzus persicae* et *Aphis gossypii*, les extraits méthanoliques des feuilles de *Ficus carica*, des fruits de *Fastia japonica* et de *Gardenia jasmonoides* présentent une puissante activité insecticide (Kim *et al.*, 2005).

L'activité insecticide des différents extraits de *Chenopodium ficifolium* a été évaluée par Le-Dang *et al.* (2010) vis-à-vis d'*Aphis gossypii*. L'extrait méthanolique et éthanolique à 5000 µg/ml ont donné l'activité la plus élevée, 80%; deux phospholipides étaient à l'origine de cette activité.

## **2-2 Effet sur l'histologie du tube digestif**

Le traitement des larves du dernier stade de *L. migratoria* à l'EM-Ht ou au TFB a montré des effets différents selon la molécule utilisée. Avec l'EM-Ht, les larves ont présenté des symptômes typiques d'un empoisonnement gastrique : des diarrhées et les larves n'ont pas été récupérées. Lü *et al.* (2010) ont observé en plus de ces symptômes des régurgitations chez les larves de *Mythimna separata* traitées avec la fraxinellone extraite des racines de *Dictamnus dasycarpus* (Rutacée). Aucun symptôme n'a été observé chez les traitées au TFB, les larves ont survécu jusqu'à la fin du stade larvaire. Les observations histologiques au niveau du tube digestif ont montré que ces larves ont été susceptibles aux molécules testées et que les deux traitements ont eu des effets toxiques certains sur les épithéliums du mésentéron et des caecums gastriques. Les traités au TFB ont présenté un mésentéron avec une large lumière résultant probablement d'un relâchement des assises musculaires. L'épithélium mésentéral a montré une désagrégation de ces cellules et la matrice péritrophique a été également détériorée. L'action du TFB sur les caecums gastriques était comparable à celle du mésentéron, une destruction des cellules épithéliales et une dilatation de l'organe ont été notées. La matrice péritrophique formée de chitine et de protéines (Hagedus *et al.*, 2009) et séparant les aliments de l'épithélium intestinal joue un rôle clé dans la biologie intestinale de l'insecte : elle protège l'épithélium intestinal des dommages mécaniques et la prolifération des pathogènes et elle joue le rôle d'une membrane semiperméable régulant le passage de molécules entre les différents compartiments de l'insecte (Lü *et al.*, 2010). Des perturbations des fonctions de la matrice péritrophique protégeant l'épithélium de l'intestin moyen, suite à

l'inhibition de la synthèse de chitine induite par le DFB chez *Oxya japonica* (Orthoptera) ont été rapportées par Lim et Lee (1982).

Les effets causés par l'EM-Ht sur le mésentéron et les cæcums étaient comparables à ceux exercés par de nombreux extraits végétaux et des fractions d'extraits sur des criquets. Sur *L. migratoria* et *S. gregaria*, Nasiruddin et Mordue (1993) rapportent que l'azadirachtine cause des nécroses aux cellules épithéliales associées à un blocage des mitoses et qu'il en résulte une réduction du nombre de cellules de régénération dans les nids de régénération. Ces nécroses étaient accompagnées d'un vieillissement de l'épithélium et d'une destruction de la musculature. Ces effets ont produit un tube digestif fragile incapable de fonctionner normalement en terme de capacité et d'efficacité digestive. Des signes typiques de nécroses cellulaires ont été également notés par Idrissi-Hassani et Hermas (2008) au niveau du mésentéron de *S. gregaria* suite à une alimentation de *Peganum harmala*. Chaib (2005) a montré que le tube digestif des imagos de *S. gregaria* ayant subi une ingestion forcée de l'extrait saponique brut de *Cestrum parquii* devenait ramolli, et l'étude histologique réalisée sur le tractus digestif de ces individus a mis en évidence une dilatation des cæcums gastriques qui montre une lumière bien visible accompagnée d'une baisse de la hauteur des plis épithéliaux après six heures de traitement. Des perturbations cellulaires et des éclatements épithéliaux ont été également repérés après 24 heures. L'auteur suggère que toutes ces perturbations notées semblent être dûes à une complexation des saponines avec le cholestérol membranaire qui aurait pour conséquence l'ouverture de brèches au niveau des membranes cellulaires ce qui accentue les échanges avec le milieu extracellulaire. Ces brèches finiront par aboutir à une perte de l'intégrité de la membrane et le mort de la cellule.

Des effets comparables à ceux rapportés ici ont été observés sur d'autres espèces d'insectes avec des alcaloïdes et des extraits végétaux bruts. Sur le tube digestif de *Culex quinquefasciatus*, l'extrait méthanolique brut de *Melia azedarach* a entraîné de sévères dommages. Les effets se sont caractérisés par des lésions dramatiques qui ont affectées les cellules de l'épithélium. Les cellules ont présenté au départ une vacuolisation abondante, une destruction apicale avec passage de leur contenu cellulaire dans la lumière intestinale suivi à la fin par une mort cellulaire (Al-Mehmadi et Al-khalaf, 2010).

Une sévère cytotoxicité avec une intense vacuolisation du cytoplasme et l'apparition importante de lysosomes ont été observés au niveau de l'intestin moyen de *Plodia interpunctella* suite à un traitement à l'harmaline ou à l'harmine, deux alcaloïdes extraits de la Zygophyllaceae *Peganum harmala* (Rharrabe *et al.*, 2009 ; Bouayad *et al.*, 2012). Les

vacuoles autophages et les lysosomes sont rarement présents chez les sujets témoins, leur présence étant souvent associée au stress, au vieillissement ou à la mort cellulaire (Nasiruddin et Mordue, 1993 ; Lü *et al.*, 2010). L'exposition à ces deux alcaloïdes a entraîné également une chute de poids des larves, une perturbation notable de développement, une sévère réduction en protéines, en glycogène et en lipides et une réduction de l'activité de l' $\alpha$  amylase. L'épuisement de ces réserves énergétiques pourrait être dû selon ces auteurs à la forte mobilisation de ces métabolites pour compenser l'insuffisance en nutriments entraîné par le stress causé par ces alcaloïdes et qui s'est traduit par une action cytotoxique sur les cellules épithéliales. Ils suggèrent également que la réduction de l'activité enzymatique de  $\alpha$  amylase n'est pas due à une interaction entre les alcaloïdes et l'enzyme mais à leur effet cytotoxique sur les cellules épithéliales qui a entraîné une sévère désorganisation des organites impliqués dans la protéosynthèse.

Malgré la diversité des substances d'origine végétale à effet histo- et cytotoxique vis-à-vis des insectes, en l'occurrence au niveau des cellules des épithéliums digestifs, il n'y a pas de réponse claire et parfaite en ce qui concerne le mode d'action de ces substances au niveau cellulaire et les mécanismes d'action sont encore imparfaitement compris. Il est possible que les effets induits par l'EM-Ht sur le mésenteron et les cæcums gastriques résulte d'une fixation de l'un de ces constituants aux membranes cellulaires via une interaction récepteur-métabolite ou bien d'un processus purement intracellulaire.

Nicolas (1995) s'est référé aux études toxicologiques effectuées sur les mammifères pour comprendre le mode d'action de la concanavaline A (lectine) sur la structure du tube digestif du puceron *Acyrtosiphon pisum*. En effet, cette lectine provoque la rupture puis la désintégration de la bordure striée de la surface apicale des cellules épithéliales entraînant une altération du cytosquelette suivie d'une lyse cellulaire.

### **2-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes**

La glande prothoracique secrète exclusivement l'ecdysone, l'hydroxylation de l'ecdysone en sa forme active faisant dans les tissus périphériques (Chino *et al.*, 1974 ; King *et al.*, 1974). Chez *L. migratoria* cette conversion est faible au début de chaque stade et augmente au moment des pics d'hormone et chute brusquement au moment des mues (Feyerinsen *et al.*, 1976).

Chez les larves témoins, les titres des ecdystéroïdes sont restés très faibles durant les deux premiers tiers du stade larvaire, un pic de  $2373,51 \pm 3097,63$  pg/ $\mu$ l a été observé au 8<sup>e</sup> jour

suivi d'une chute brusque des titres avant la mue imaginaire. Ce profil des titres obtenu est similaire à ceux trouvés par Baehr *et al.* (1979) ; Gande *et al.* (1979) ; Cassier *et al.* (1980) et Sieber et Rembold (1983) pour *L. migratoria* et *S. gregaria* et qui ont signalé des taux en ecdystéroïdes peu élevés pendant le premier tiers du dernier stade larvaire. Ces taux s'élèvent au cours des jours suivants et atteignent une valeur maximale 48 heures avant l'exuviation. Cette élévation se synchronise avec le dépôt de la nouvelle cuticule.

Le cycle de mue chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* se déroule en trois phases selon Sieber et Rembold (1983). La première phase se déroule en présence de faibles titres d'ecdystéroïdes et elle correspond au dépôt des couches post exuviales de l'endocuticule. La deuxième correspond à l'apolyse et elle débute avec une légère élévation des titres d'ecdystéroïdes. Au cours de la troisième phase, le dépôt des nouvelles couches de l'epicuticule et de procuticule est accompagné d'une grande élévation des titres de la 20 hydroxyecdysone. Le profil des ecdystéroïdes des larves de 5<sup>e</sup> stade témoins qu'on a obtenu au cours de leur dernier cycle de mue est conforme à la description faite par ces auteurs.

Les travaux de Feyereisen et Hoffmann (1977) sur *L. migratoria* ont montré que l'augmentation des titres de l'hormone de mue durant la première moitié de la vie larvaire des larves du 5<sup>e</sup> stade induit l'activité de la 20 ecdysone monooxygénase, laquelle est responsable de la conversion de l'ecdysone en 20-hydroxyecdysone au moment des pics hormonaux. Une augmentation de l'hydroxylation de l'ecdysone a été observée au 7<sup>e</sup> jour par ces auteurs. La présence de la 20-hydroxyecdysone augmente la synthèse de chitine *in vitro* chez les larves de *L. migratoria* tandis que la présence de l'ecdysone reste sans aucun effet (Cassier *et al.*, 1988). Les titres les plus élevés en ecdystéroïdes sont atteints quelques jours avant l'exuviation au moment de la digestion de l'ancienne cuticule et la mise en place de la nouvelle cuticule. L'exuviation se déroule en présence de faibles niveaux d'ecdystéroïdes (Cassier *et al.*, 1980) Chez les larves témoins, une chute brusque des titres a été signalée au 9<sup>e</sup> jour et des mues imaginaires réussies ont été notées à partir du 10<sup>e</sup> jour.

Les traitements à l'EM-Ht et au TFB ont inhibé le pic d'ecdystéroïdes observé au 8<sup>e</sup> jour chez les témoins. En effet, les titres enregistrés durant toute la période du développement larvaire sont demeurés très faibles. Seules les larves traitées à l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* ont présenté une faible hausse de  $308,42 \pm 725,76$  pg/ $\mu$ l au 8<sup>e</sup> jour. Une inhibition et un blocage de l'exuviation ont été observés chez les lots de larves traitées, ce qui confirme l'interférence de ces molécules avec les hormones contrôlant la mue.

Les travaux de Cassier *et al.* (1988) ont mis en évidence la complexité de la relation entre les ecdystéroïdes et la biosynthèse de la chitine au cours d'un cycle de mue. En effet, la 20-hydroxyecdysone stimule la biosynthèse de chitine et s'implique au cours de l'association de la chitine avec les protéines cuticulaires. Ces auteurs ont démontré *in vitro* que l'effet inhibiteur de la biosynthèse de la chitine par le diflubenzuron s'exerce en absence et même en présence de la 20-hydroxyecdysone.

Les larves traitées à l'EM-Ht et dont l'exuviation a été bloquée ont présenté une petite hausse des niveaux d'ecdystéroïdes au 8<sup>e</sup> jour. Celle-ci reste toutefois faible et insuffisante pour l'induction des changements morphologiques des cellules épidermiques et le contrôle de la cuticulogénèse (Wielgus *et al.*, 1979). Les effets obtenus avec l'EM-Ht sont similaires à ceux observés avec l'azadirachtine. En effet, l'azadirachtine réduit les titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et retarde l'apparition des pics (Redfern *et al.*, 1982 ; Dorn *et al.*, 1986 ; Garcia *et al.*, 1986 ; Koolman *et al.*, 1988 et Pener *et al.*, 1989a). Mordue *et al.* (1986) ont démontré que l'injection de l'azadirachtine au cours du dernier stade larvaire peut engendrer des effets morphologiques différents chez *L. migratoria* en fonction du moment d'injection. Les titres se trouvent spectaculairement réduits si l'injection est faite au début du stade larvaire.

Les larves traitées au TFB n'ont présenté aucun signe de mue, les titres enregistrés étant insuffisants pour l'induction de la cuticulogénèse. Wutting *et al.* (1991) ont rapporté que les traitements à base de diflubenzuron prolongent la durée du dernier stade larvaire de *Periplaneta americana* et réduisent les titres du 2<sup>e</sup> pic des ecdystéroïdes hémolymphatiques.

Les faibles titres en ecdystéroïdes obtenus après traitement au TFB et à l'extrait méthanolique ont affecté la synthèse de la chitine et par conséquent la sécrétion cuticulaire et l'exuviation normale chez les traitées.

L'exuviation qui inclut la résorption du liquide exuvial, la digestion de l'ancienne cuticule et la mise en place de la nouvelle cuticule est régie par un nouveau groupe d'hormone dont l'hormone d'éclosion (Sieber et Rembold 1983). Ces deux auteurs ont rapporté que l'inhibition de l'exuviation chez les larves du cinquième stade de *L. migratoria* traitées à l'azadirachtine n'est pas due uniquement au blocage des ecdystéroïdes intervenants dans la mue mais également aux hormones d'éclosion.

#### **2-4 Effet sur la composition biochimique de la cuticule**

La chitine est un polymère de N acetyl- $\beta$ -glucosamine, elle est le composé majoritaire de la cuticule (Merzendorfer et Zimoch, 2003), elle a une importance vitale dans le cycle de

vie des arthropodes (Londershusen *et al.*, 1989), et représente jusqu'à 85% de la masse totale de la cuticule (Spindler et Spindler-Barth, 1996).

Nøhr et Anderson (1993) signalent que le poids sec des échantillons de cuticule : fémur et ailes des larves de 5<sup>e</sup> stade de *L. migratoria* est maximal entre le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour après la mue. Il décroît par la suite, suite à une dégradation des protéines et de la chitine en préparation de la prochaine mue. Le milieu du stade larvaire est également la période où de grandes quantités de protéines sont extraites, ce qui indique que la grande partie des protéines endocuticulaires n'est pas stabilisée par des liaisons covalentes. Le profil des teneurs de chitine cuticulaire observé chez les larves témoins de *L. migratoria* était semblable à celui décrit par Nøhr et Anderson (1993). En effet, la chitine cuticulaire chez les larves témoins a connu une évolution progressive de sa teneur au cours des cinq premiers jours, où elle a atteint un maximum de  $6,28 \pm 0,72$  mg. Une chute a été observée par la suite vers la fin du stade suite à une dégradation graduelle de la chitine pour la préparation de la mue suivante.

La chitine est une cible idéale pour les pesticides à cause de son rôle critique à chaque stade de la morphogenèse. Tout excès ou déficit de chitine durant les cycles morphogénétiques peut produire des effets létales (Kramer *et al.*, 1985). Les traitements à l'EM-Ht ou au TFB ont réduit significativement les quantités moyennes de chitine cuticulaire durant tout le cycle larvaire chez les larves traitées et ont inhibé le dépôt de chitine dans l'endocuticule nouvellement formée, cette réduction ayant été très marquée à la fin du stade larvaire.

Il est possible que l'EM-Ht ait agit sur la cuticule des larves de *L. migratoria* par des mécanismes analogues à ceux de *Cestrum parquii*. En effet, la toxicité des feuilles de *C. parquii* s'est manifestée vis-à-vis des larves de *S. gregaria* par une difficulté de mue entraînant la mort de l'insecte qui succombe au cours de l'exuviation (Barbouche, 2001). L'étude de l'ultrastructure du tégument réalisée par Ammar *et al.* (1997) a montré que les saponines isolés des feuilles de *C. parquii* agissaient sur la structure de la cuticule et provoquaient des perturbations chez les larves de *S. gregaria*. Le liquide exuvial chez les larves traitées apparaît très tardivement par rapport à la période de pré exuviation; la nouvelle cuticule ne se forme pas et l'ancienne ne se résorbe pas et la mue est ainsi empêchée.

Les benzoylphenylurées (BPUs) interfèrent avec le métabolisme de la chitine et ces produits sont plus efficaces par ingestion que par contact ou application topique (Smagge *et al.*, 1997). Le diflubenzuron est le produit le plus investigué des BPUs (Kramer *et al.*, 1985). Le TFB a réduit significativement les quantités moyennes de chitine cuticulaire durant tout le cycle larvaire. Des effets similaires a ceux rapportés ici ont été obtenus par Vincent et Clarke (1985)

sur les larves de cinquième stade de *L. migratoria* en utilisant le diflubenzuron et par Salokhe *et al.* (2006) sur *Tribolium castaneum* en utilisant le flufenoxuron, ces auteurs signalent une réduction de la teneur en chitine cuticulaire durant tout le cycle larvaire, cette réduction étant très marquée à la fin de stade. Vincent et Clarke (1985) ont noté également une inhibition complète du dépôt de la chitine au niveau de la membrane intersegmentaire, avec une réduction du taux de chitine de même degré au niveau du fémur et du tergite.

Parallèlement à ces effets sur la biochimie de la cuticule, des études histologiques ont montré une diversité de changements structuraux après l'administration des BPU's incluant l'incapacité de l'insecte d'incorporer le [<sup>3</sup>H] glucose dans l'endocuticule et l'absence du dépôt de l'endocuticule (Kramer *et al.*, 1985).

L'effet destructeur de tébufenozide sur la formation de la cuticule a été étudié au niveau ultrastructural chez *Spodoptera exigua* et chez *Choristoneura fumiferana* par Dhadialla *et al.* (1998). Ces auteurs ont noté chez les larves intoxiquées, une formation incomplète de la nouvelle cuticule à cause de l'absence de la nouvelle procuticule ou du faible nombre de lamelles endocuticulaires. Des signes élevés de dégénérescence des cellules épidermiques ont été notés également.

Une séquence de changements ultra-structuraux ont été générés par l'ingestion d'une dose sub-létale d'un composé benzoyl-phényl-urée : le chlorfluazuron, chez les larves de sixième stade de la tordeuse des bourgeons de l'épinette : *C. fumiferana*, la nouvelle endo-cuticule ne possède pas de lamelles, ce qui indique qu'il ne se forme pas de micro-fibrilles de chitine. Dans les régions où se trouvent normalement les fibrilles, il y'a plutôt des zones fibreuses et vacuolées qui contiennent un matériau amorphe. Il a été suggéré que ce composé a inhibé la jonction entre le glucide aminé et la protéine qui forme les microfibrilles de chitine (Cunningham *et al.*, 1987).

Les travaux effectués par Fogal (1977) sur le [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6difluorobenzoyl)-urée], un autre composé de la famille des phenyl-benzoylurées, montrent qu'il entrave la mue chez *Diprion similis* en empêchant l'exuviation à une la concentration de 0,1 %.

Les micro-fibrilles de chitine sont incluses dans une matrice protéique (Reynolds, 1987). Cette structure complexée confère à l'exosquelette des propriétés de rigidité et de souplesse (Merzendorfer, 2006).

La teneur en protéines des cuticules varie selon les espèces, cette teneur s'élevant à 63,3% dans la cuticule des larves de *Tenebrio molitor* (Andersen, 2002). Hillerton et Purslow (1981)

ont noté des teneurs en protéines de l'ordre de 72 % et de 71,4 % respectivement pour *Rhodnius prolixus* et *Triatoma phyllosoma*.

Chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* témoins, la quantité moyenne des protéines cuticulaires est restée plus faible chez les témoins durant les six premiers jours que chez les traitées mais une augmentation vers la fin du cycle a été observée.

L'effet le plus apparent des benzoylphenylurées est naturellement d'empêcher l'accumulation de la chitine dans la cuticule (Vincent et Clarke, 1985 et Reynolds, 1987). Les travaux consacrés aux protéines cuticulaires ont démontré qu'elles ne sont pas affectées par le diflubenzuron ou ses analogues (Retnakaran et al., 1985). Cependant un effet secondaire du diflubenzuron sur la teneur en protéines cuticulaires chez *L. migratoria* a été noté par Vincent et Clarke (1985). Ces auteurs précisent que ce produit affecte la quantité et la nature des protéines déposées.

Chez les larves traitées à l'EM-Ht ou au TFB, les teneurs en protéines cuticulaires étaient supérieures à celles des témoins, ces teneurs se sont maintenues élevées jusqu'à la fin du cycle larvaire, ces résultats sont similaires à ceux trouvés par Tail (2009) qui signale une augmentation de la teneur en protéines cuticulaires chez les larves de quatrième et de cinquième stade de *S. gregaria* traitées au diflubenzuron durant les quatre premiers jours de la vie larvaire. Salokhe et al. (2005) signalent également une augmentation du taux des protéines chez les larves de *Tribolium castaneum* traitées à la DL 40 du flufenoxuron.

Les perturbations du processus de mue entraînées par l'EM-Ht pourraient être dûes en partie à l'absence du liquide exuvial qui remplit l'espace engendré par le décollement de la cuticule des cellules épidermiques, comme l'a rapporté Abdellaoui (2009) pour l'acide gibbérellique sur les larves de *L. migratoria*. Ce liquide comprend diverses enzymes surtout des protéases, dont une grande partie provient des protéases digestives et qui interviennent dans la digestion de l'ancienne cuticule. Ces effets seraient dûs à des effets cytotoxiques au niveau de l'intestin qui ont inhibé la biosynthèse des protéases digestives.

Le mode d'action des benzoylphenylurées (BPUs) n'est pas encore très clair, bien que la synthèse de la chitine et sa dégradation soient affectées chez les insectes par ces BPUs (Kramer et al., 1985).

Les investigations faites pour élucider le mode d'action du DFB tendent à montrer qu'il est probable que le DFB agit au dernier stade de la biosynthèse de la chitine en inhibant peut être la chitine synthétase (CS) elle-même; cependant les résultats des études *in vitro* n'ont pas confirmé cette hypothèse. Il est possible que le DFB inhibe le transport transmembranaire des

précurseurs de la chitine de leur site de production à leur site final de polysynchronisation (Reynolds, 1987). Kotze et Reynolds (1991) ont démontré pour un autre benzoylphenylurée, la cryomazine, qu'elle n'a aucun effet sur le taux d'incorporation de la N-acetyl-D-[1-<sup>14</sup>glucosamine] dans la chitine *in vivo* et *in vitro*.

Le mode d'action de des BPU's reste très discuté et un grand nombre d'hypothèses concernant leur mode d'action sont avancées, incluant leur interférence avec les membranes, les enzymes chitinolytiques et les hormones de mue comme cibles possibles. Les liaisons préférentielles et non spécifiques des PBU's aux membranes indiquent que ces substances hautement lipophiles peuvent interférer avec un grand nombre de fonctions cellulaires rendant plus difficile la compréhension du mode d'action de ces PBU's, à savoir son effet sur la synthèse de la chitine (Londershausen *et al.*, 1989).

## **2-5 Effet sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase et la glutathion S-transférase**

### **2-5-1 Effet sur l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase**

L'inhibition de l'AChE constitue un marqueur fiable de la toxicité chez les insectes, quand ces derniers sont amenés à être en contact avec des substances neurotoxiques. Une relation entre le taux d'inhibition de l'AChE cérébrale et la nature et l'ampleur des effets toxiques a été établie (Barillet, 2008). L'importance des conséquences neurotoxiques est liée à l'étendue de l'inhibition de l'AChE dans différentes parties du système nerveux (Grue *et al.*, 1991 in Barillet, 2008). Les alcaloïdes et l'EM-Ht de *H. tuberculatum* testés se sont révélés neurotoxiques vis-à-vis des larves de cinquième stade de *L. migratoria*. Les taux d'inhibition enregistrés étaient de  $37,72 \pm 10 \%$  et de  $51,97 \pm 8,7 \%$  respectivement pour les alcaloïdes et l'EM-Ht, l'EM-Ht s'étant révélé plus neurotoxique que les alcaloïdes seuls.

Plusieurs métabolites secondaires issues des plantes ont une activité insecticide analogue à celle des insecticides organophosphorés et carbamates. Les monoterpénoïdes sont les premiers inhibiteurs extraits des plantes dotés d'une action anticholinestérasique (Houghton *et al.*, 2006 in Lopez et Pascual-Villalobos, 2010). Ces auteurs indiquent que le fenchone, le S-carvone, et le linalole qui font parti des monoterpénoïdes produisent une forte inhibition de L'AChE *in vitro*. Ils ont constaté également que les alcaloïdes tel que les phytostigmines, neostigmines et les coronaridines sont de fort inhibiteurs de l'AChE.

Une symptomatologie identique à celle des insecticides neurotoxiques a été observée par Abbassi *et al.* (2003a, 2003b, et 2004) chez les adultes et les larves du cinquième stade de *S.*

*gregaria* (Orthoptera) suite à un traitement aux alcaloïdes de *Calotropis procera*, *Zygophyllum gaetulum* et *Peganum harmala* : ils notent : une hyperexcitabilité, des troubles d'équilibre, des tremblements d'appendices qui se termine par la mort des individus, ils suggèrent alors une interférence de ces molécules avec le système nerveux des criquets. Le mécanisme par lequel ces métabolites secondaires des plantes agissent sur la neurotransmission reste encore mal expliqué. Shafeek *et al.* (2004) ont décrit des symptômes d'excitabilité chez *Periplaneta americana* suite à l'application d'une dose sublétales d'azadirachtine sans toutefois enregistrer une inhibition de l'activité de l'AChE. Ils attribuent cet effet à une interférence de l'azadirachtine avec les chaînes d'ions localisés sur la membrane des nerfs.

Cette inhibition de l'activité de l'AChE obtenue par les alcaloïdes et l'EM-Ht de *H. tuberculatum* est similaire à celle trouvée par de nombreux auteurs ayant travaillé avec des insecticides organophosphorés et carbamates sur différentes espèces d'invertébrés. En effet, ces groupes d'insecticides ont une structure analogue à celle de l'acétylcholine et c'est pourquoi l'AChE est la première cible de ce groupe d'insecticides. Au cours de la liaison de ces insecticides à l'enzyme, l'AChE des insectes est inactivée par phosphorylation ou carbamylation, laissant une accumulation de l'acétylcholine, la membrane post-synaptique reste dépolarisée et la transmission synaptique est bloquée conduisant ainsi à une paralysée et la mort (Habig et Digiutio, 1991 in Crane *et al.*, 2002 ; Matsumura, 1985 in Habes 2006).

Sur l'abeille *Apis mellifera mellifera*, Bendahou *et al.* (1999) ont rapporté une inhibition de l'activité de l'AChE dépassant 60 % avec le fenitrothion (OP), les abeilles intoxiquées ayant présenté des signes d'affaiblissement et des symptômes de tremblements.

Un essai similaire a été réalisé par Massa *et al.* (2008) sur *Helicoverpa zea*. Ces auteurs ont constaté une altération significative de l'activité de l'AChE suite à une exposition mixte au diazinon (OP) et au nicosulfuron (herbicide). Le pirimiphos methyl à 10 ng/g a réduit l'activité de AChE chez les larves de *Chironomus riparius* après 48 heures d'exposition. Cette réduction a été associée à une réduction du poids des larves et de fécondité après plusieurs jours (Crane *et al.*, 2002).

Les travaux de Rao et Kavitha (2004) sur le ver de terre *Eisenia faetida* ont montré que l'inhibition de l'AChE par l'azodrin (OP) augmente de manière dose dépendante et une inhibition de 90 % a été atteinte avec les fortes doses. Ce résultat suggère que la toxicité est associée au phénomène d'accumulation. Sur la même espèce, le chlorperyphos à la DL50 a

entraîné une inhibition de l'AChE de l'ordre de 91 %, les vers étant devenus très mous et lents (Rao *et al.*, 2003).

La diminution de la sensibilité de l'acétylcholinestérase à l'inhibition par les insecticides organophosphorés ou carbamates implique une résistance aux insecticides (Moore *et al.*, 1994 et Guedes *et al.*, 1997 in Yang *et al.*, 2008). Ce phénomène est très étudié chez les insectes y compris chez les criquets. Les résultats obtenus par Yang *et al.* (2008) montrent que l'activité catalytique de AChE envers l'acétylcholine chez une population de *L. migratoria* issue de la province de Huangliu en Chine est cinq fois plus élevée que celle provenant de la province de Wudi. L'acétylcholinestérase de la population issue de Huangliu est 9,8 ; 2,4 ; 8,0 ; et 7,7 fois moins sensible à l'inhibition respectivement pour le Paraxon, le Malaoxon, le Chlorperiphos axon et le Demeton -S- methyl que celle de Wudi.

### **2-5-2 Effet sur l'activité enzymatique de la glutathion S transférase**

La GST est un groupe d'enzymes multifonctionnels de détoxification qui catalyse la conjugaison du glutathion réduit avec divers xénobiotiques et des composés endogènes possédant un centre électrophile (Yamamoto, 2008 ; Kostaraboulos *et al.*, 1996 in Wu *et al.*, 2008), augmentant ainsi leur solubilité et facilitant leur élimination par l'insecte (Despres *et al.*, 2007). Ces enzymes forment une partie intégrante du système de détoxification de la phase II (Kostaraboulos *et al.*, 1996 in Wu *et al.*, 2008).

Les mesures de l'activité enzymatique de la GST des tubes digestifs des larves de cinquième stade de *L. migratoria* traitées aux alcaloïdes et à l'EM-Ht de *H. tuberculatum* ont révélé une remarquable activation de cette enzyme. Des inductions de 209,32 % et de 92,91 % ont été enregistrées respectivement pour l'extrait méthanolique et les alcaloïdes. Ces taux élevés indiquent l'importante implication de ces enzymes de la phase II dans la biotransformation des molécules bioactives de cette plante.

L'induction de la GST par les métabolites secondaires des plantes chez les insectes phytophages a été signalée par de nombreux auteurs : Yu (1984) ; Hayes et Pulford (1995) in Wei *et al.* (2001) et Francis *et al.* (2000) in Wu *et al.* (2008).

La biotransformation des toxines des plantes est une des principales armes que les insectes ont développée au cours de leur co-évolution avec les espèces végétales de leur biotope. La résistance métabolique est souvent le résultat d'une surproduction d'enzymes capables de métaboliser les xénobiotiques (Desprès *et al.*, 2007) qui résulte d'une surexpression des gènes codant pour ces enzymes, ou de l'augmentation du taux de transcription plutôt qu'un

changement qualitatif des enzymes individuelles (Ranson et Hemingway, 2004 in Hemingway *et al.*, 2004).

Les taux d'induction élevés enregistrés, notamment celui obtenu avec l'EM-Ht, pourraient être attribué au rôle principal que joue l'intestin moyen (mésenteron) dans la détoxification des xénobiotiques. De nombreuses études signalent l'implication de cette partie du tube digestif dans la biotransformation des xénobiotiques. En effet, chez *Oxya chinensis* (*Orthoptera, Acrididae*), la GST est principalement distribuée dans le corps gras et l'intestin moyen par rapport aux autres tissus de l'organisme, ce qui suggère que la GST dans ces deux types de tissus joue un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques, incluant les insecticides et les substances allelochimiques des plantes (Wu *et al.*, 2008).

Les travaux de Yu (2004) sur *Spodoptera frugiperda* ont montré que les herbicides du groupe triazine induisent les enzymes de détoxification, particulièrement la GST du corps gras et de l'intestin moyen chez les larves de cette espèce. L'induction est de 1,4 à 4 fois plus importante par rapport au témoin au niveau du corps gras et de 1,3 à 2,4 fois au niveau de l'intestin moyen. Cette induction par l'atrazine était accompagnée d'une réduction de la toxicité du Carbaryl, de Permethrine et de l'Indoxacarb, qui ont été détoxifiés par la GST.

Les résultats obtenus par Wang *et al.* (2010) ont montré que l'activité spécifique de la GST a dépassé 50 % chez *Helicoverpa assulta* (*Lepidoptera*) lorsqu'elle se nourrissait des feuilles de tabac. Ils ont suggéré que la production des enzymes de détoxification était généralement induite par la présence de xénobiotiques dans la nourriture des insectes ravageurs.

Le rôle de la GST dans la résistance aux toxines d'origine végétale, aux insecticides et à divers xénobiotiques a été étudié chez de nombreux insectes. Des résultats similaires aux nôtres ont été obtenus par de nombreux auteurs. Chez *Myzus persicae*, la surproduction de GST était probablement responsable de l'adaptation de l'insecte aux glucosinolates et aux isothiocyanates contenant dans les *Brassicaceae*. Cette induction enzymatique a été également étudiée chez le prédateur *Episyrphus balteatus* qui se nourrissait des pucerons du genre *Myzus*. Il a été suggéré que l'accumulation des toxines des plantes dans les pucerons a induit les mécanismes de résistance métabolique chez le prédateur spécifique de cette espèce (Desprès *et al.*, 2007).

La résistance de *Tribolium castaneum* au Cyfluthrin est accompagnée d'une activation de la GST qui se trouve 4 à 6 fois plus élevée chez la race résistante comparativement au témoin. Cette élévation de la GST est associée à une élévation du GSH (glutathion) (Reidy *et al.*, 1990).

La résistance aux pesticides associée à une augmentation de l'activité spécifique de la GST a aussi été observée chez les vertébrés. En effet, l'exposition du poisson téléostéen Tilapia : *Oreochromis mossambicus* à une dose sub létale de l'insecticide organophosphorés (RPR II) pendant 30 jours a entraîné l'épuisement du glutathion dans tous les tissus. Une induction de la GST de l'ordre de 79 % a été trouvée (Rao, 2006a). Sur le même poisson, le RPR V a entraîné une induction de la GST hépatique de l'ordre de 81 % (Rao, 2006b). Les résultats trouvés par Monteiro *et al.* (2006) pour une autre espèce de poisson : *Brycon cephalus* (*Teleostei, Characidae*), ont montré une augmentation de la GST dans tous les tissus prélevés : branchies, foie et muscle blanc, après l'exposition au méthyle parathion (OP). Cette élévation de la GST était concomitante à celle du glutathion . Cette augmentation de l'activité de la GST dans les différents tissus indique le développement des mécanismes de défense pour contrecarrer les effets des pesticides et reflète l'efficacité de la protection à l'égard des pesticides. Des inductions très élevées de l'ordre de 366 % et de 393 % ont été obtenues chez *Bufo regularis*, suite à une exposition au diazinon et à l'endosulfane (Ezemonye et Tongo, 2010).

La GST peut également catalyser le métabolisme secondaire d'un vaste groupe de composés oxydés par la famille des cytochrome P450 (Ranson et Hemingway, 2004 in Hemingway *et al.*, 2004). Les résultats de Lee (1991) montrent que des phototoxines tels que la xanthotoxine et l'harmine induisent l'activité de la GST. La xanthotoxine n'est pas directement détoxifiée par la GST mais elle est impliquée en phase II après l'action des monooxygénases liés au Cyt P450.

### **3- Etude de l'effet de l'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* et du téflubenzuron sur la reproduction et les titres des ecdystéroïdes chez les femelles de *Locusta migratoria***

#### **3-1 Effet sur la reproduction**

Les métabolites secondaires tels les phytoecdystéroïdes, les phytojuvénoïdes, les antihormones juvéniles, les polyphénols, et les alcaloïdes présents chez certaines plantes peuvent conférer à ces dernières des activités analogues à celles des IGRs de synthèse (Varma et Dubey, 1998 ; Céspedes *et al.*, 2005). Les extraits de ces plantes peuvent avoir des effets très prononcés sur la fécondité, la fertilité, l'émergence des adultes ainsi que sur le

développement larvaire (Shalan *et al.*, 2005). Pour plusieurs des variables mesurées, l'EM-Ht et le TFB ont eu des effets semblables chez les femelles de *L. migratoria* traitées à l'émergence : les deux traitements ont entraîné une prolongation significative de la période de pré-oviposition ainsi qu'une réduction significative de la fécondité. Des réductions de fécondité similaires à celles rapportées ici ont été enregistrées pour d'autres extraits de plantes et régulateurs de croissance chez les criquets et d'autres groupes d'insectes (Abbassi *et al.*, 2003a, 2003b ; Amrani *et al.*, 2004 ; Tail *et al.*, 2008 ; Abdellaoui *et al.*, 2009).

Les nombreuses similitudes entre l'effet du TFB et l'EM-Ht sur les variables de reproduction mesurées laissent supposer que les deux traitements partagent les mêmes cibles chez les femelles de *L. migratoria* et ont agi par des mécanismes analogues. L'action indirecte reste la plus fortement suggérée pour les deux traitements. En effet, il est probable que le TFB ait agi sur les variables reproductives de *L. migratoria* par des mécanismes comparables à ceux rapportés pour le diflubenzuron (DFB). Lim et Lee (1982) suggèrent que la réduction de fécondité chez *Oxya japonica* (Orthoptera), suite à un traitement au DFB, est attribuable à l'effet indirect de ce traitement sur la prise de nourriture chez les femelles traitées. Aussi, la perturbation des fonctions de la matrice péritrophique protégeant l'épithélium de l'intestin moyen, suite à l'inhibition de la synthèse de chitine induite par le DFB, pourrait être responsable, du moins en partie, des effets obtenus. En effet, la fragilisation de la matrice péritrophique, formée de chitine et de protéines (Hagedus *et al.*, 2009) augmente les possibilités d'infections chez les traités et réduit les fonctions d'absorption et d'assimilation du mésentéron.

L'effet régulateur de croissance de l'extrait éthanolique de *H. tuberculatum* a été mis en évidence par Mohsen *et al.* (1989) sur *Culex quinquefasciatus*. Il est fort probable que la réduction du potentiel reproducteur observée chez *L. migratoria* soit due à un effet antiappétant exercé par les composés phénoliques de l'EM-Ht. Les travaux axés sur la recherche du site et du mécanisme d'action des composés phénoliques révèlent que ces substances sont d'importants inhibiteurs enzymatiques et métaboliques (Kubo et Kloche, 1983 ; Kloche *et al.*, 1989 ; Hammond et Kubo, 1999 ; Céspedes *et al.*, 2000). Plusieurs de ces métabolites polyphénoliques et stéroïdes ont un effet antiappétant à l'égard des insectes, inhibant les protéases, les hydrolases digestives et les polyphénols oxydases (Céspedes *et al.*, 2004) et réduisant la digestibilité des protéines nutritionnelles (Feeny, 1976 ; Rhoades, 1979). Pour de nombreuses espèces d'insectes, l'effet inhibiteur de ces extraits sur les enzymes digestives est combiné à une action cytotoxique produisant des destructions de l'épithélium

du mésentéron (Jbilou *et al.*, 2008). Des destructions de l'épithélium du mésentéron et des coecums gastriques ont été observées chez les larves de cinquième stade de *L. migratoria* traitées à l'EM-Ht. Des altérations histopathologiques comparables à celles rapportées ici ont déjà été signalées également par d'autres auteurs, dont des signes typiques de nécrose cellulaire observés au niveau de l'épithélium mésentéral après ingestion de *Peganum harmala* (Rutaceae) chez *Schistocerca gregaria* (Idrissi-Hassani et Hermas, 2008) et ingestion de *Azadirachta indica* chez *L. migratoria* et *S. gregaria*, induisant ainsi une inhibition presque certaine de l'assimilation (Nassiruddin et Mordue, 1993 ; Adote, 1994). La même cytotoxicité a été observée sur d'autres organes comme le corps gras (Sayah *et al.*, 1996 ) et les *corpora allata* (Sayah *et al.*, 1998).

L'effet des deux traitements sur le taux d'éclosion était complètement différent, le TFB ayant présenté une activité ovicide absolue tandis que l'extrait méthanolique n'a entraîné une diminution du taux d'éclosion que d'environ 10 %. L'inhibition du dépôt de chitine chez l'embryon pourrait expliquer, selon Grosscurt (1978) et Medina *et al.* (2002), l'action ovicide du TFB. Le déficit en chitine affaiblit le squelette et l'attachement des muscles chez l'embryon et le rend incapable de supporter les fortes pressions nécessaires à l'éclosion des œufs. Cette perturbation réduit considérablement les taux d'éclosion des œufs traités ou issus de femelles traitées (Lim et Lee 1982). L'effet non ovicide des extraits *H. tuberculatum* rapporté ici a été également signalé par Mohsen *et al.* (1989) sur *Culex quinquefasciatus*. Toutefois, la survie des larves du premier stade de cette espèce a été considérablement affectée, le pourcentage de survie étant uniquement de 6 % chez les larves issues des œufs traités contre 99 % chez les témoins.

### **3-2 Effet sur le développement ovarien et la vitellogenèse**

La vitellogenèse est un processus par lequel les macromolécules spécifiques des femelles : les glycolipoprotéines qui représentent le vitellus sont synthétisées, transportées et incorporées dans les ovocytes (Peel et Akam, 2007). La maturation des ovocytes dépend entre autre des métabolites prélevés de l'hémolymphe et du matériel synthétisé *in situ* par l'ovaire (Raikhel et Dhadialla, 1992).

Le processus de vitellogénèse a également été affecté durant le premier cycle gonadotrophique par les deux traitements de façon différente. Le TFB a inhibé de façon importante et stable la biosynthèse des protéines hémolympatiques durant les douze premiers

jours suivant l'émergence alors que l'EM-Ht semble plutôt avoir retardé l'apparition dans l'hémolymphe et empêcher leur incorporation dans les ovocytes. Cinq fragments protéiques, correspondant aux vitellogénines, d'après les travaux de Wyatt (1988), étaient présents dans les ovaires des femelles témoins et complètement absents chez les traitées. Ces perturbations de la vitellogénèse ont eu des effets directs sur l'ovogénèse. L'EM-Ht et le TFB ont affecté de façon comparable le développement et la maturation des ovocytes terminaux chez *L. migratoria* : la croissance de l'ovocyte terminal était très lente chez les séries traitées, et ce retard de croissance a été accompagné d'une dégénérescence précoce des ovocytes terminaux, donnant lieu à des corps de régression.

L'absence de l'accumulation des protéines « vitellogénines » et l'inhibition de la croissance ovarienne pourrait être attribuée à un effet commun indirect des deux traitements sur l'alimentation et l'absorption, bien que l'hypothèse d'une action directe des deux produits sur l'incorporation de la Vg par les ovocytes en développement et/ou sur la production de l'hormone juvénile ne peut être écartée également. Il est possible donc que les deux traitements aient inhibé partiellement la biosynthèse de l'hormone juvénile ou aient réduit son action sur la maturation ovarienne. Une telle explication est en accord avec les résultats obtenus par Chiang *et al.* (2002), Tobe et Pratt (1975) et Wyatt *et al.* (1987), qui ont mis en évidence la relation entre le développement ovarien et l'activité des corps allates.

L'interférence des inhibiteurs de la synthèse de chitine avec la vitellogénèse et l'ovogénèse a été mise en évidence par de nombreux auteurs. Les mécanismes responsables de cette interférence restent encore mal compris. L'action indirecte reste le mécanisme le plus souvent retenu. Chez *Tenebrio molitor*, Soltani *et al.* (1996) rapportent que le DFB affecte le développement ovarien en réduisant l'incorporation ovarienne de la leucine et de la thymidine dans l'ADN ovarien (Soltani-Mazouni et Soltani, 1994). Ces auteurs suggèrent également une interférence du DFB avec la choriogénèse. Chez *Cydia pomonella*, une réduction significative du contenu des ovaires en protéines et de l'épaisseur de l'épithélium de l'ovocyte terminal ont été rapportées par Soltani et Solani-Mazouni (1992).

L'action directe des inhibiteurs de synthèse de chitine sur l'ovogénèse reste possible, particulièrement à la lumière des travaux récents sur l'effet du lufénuron, un autre BPU, sur la vitellogénèse chez *Aedes aegypti* (Moreira *et al.*, 2007) et *Rhodnius prolixus* (Mansur *et al.*, 2010). Chez ces espèces, la chitine est une composante importante des œufs, et le traitement des femelles au lufénuron bloque l'incorporation du *N*-acetylglucosamine dans la chitine des œufs, réduisant ainsi la taille des œufs et le nombre d'œufs chorionés. De plus, il est assez

clair que les BPU n'ont pas un effet inhibiteur direct sur les enzymes impliqués dans la biosynthèse de chitine mais qu'ils semblent plutôt intervenir au niveau d'un récepteur sulfonylurée (Abo-Elghar *et al.*, 2004). On ne peut donc exclure la possibilité qu'une interaction avec ce récepteur ait des effets autres que l'inhibition de la synthèse de chitine.

Londershausen *et al.* (1989) précisent que les liaisons préférentielles et non spécifiques des inhibiteurs de synthèse de chitine, dont le DFB et le TFB, avec les membranes indique que ces substances hautement lipophiles peuvent interférer avec un grand nombre de fonctions cellulaires, rendant plus difficile l'élucidation de leur mode d'action.

Il serait difficile d'établir le rapport de sensibilité entre l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et ses mécanismes d'actions spécifique sur le développement ovarien et la vitellogénèse car, à la différence des insecticides, l'extrait brut représente une mixture complexe de composés potentiellement biologiquement actifs (alcaloïdes, composés phénoliques, flavonoïdes, furanocoumarines, phytoecdystéroïdes, phytojuvénoïdes) et agit sur l'insecte par une cascade de mécanismes complexes. Dans ce contexte, de nombreuses recherches suggèrent l'effet de synergie ou la combinaison d'effets, amplifiant ainsi l'activité biologique totale de l'extrait brut (Kubo *et al.*, 2000 ; Kubo et Kinst-Hori, 1999 ; Pavela, 2004). Par exemple, il apparaît possible que l'EM-Ht ait agit sur les variables reproductives mesurées par une combinaison d'effets : un effet antiappétant et une possible interférence avec les hormones, comme cela a été rapporté par de nombreux auteurs pour divers composés naturels et même des régulateurs de croissance. Une réduction du potentiel reproducteur comparable à celle rapportée ici a été notée par Abbassi *et al.* (2003b) chez *S. gregaria* au cours du premier cycle ovarien sous l'effet des alcaloïdes indoliques de *Peganum harmala* : les effets ont été attribués à l'action antiappétante de ces alcaloïdes et leur possible interférence avec le processus de vitellogénèse (Abbassi *et al.*, 2003b). L'effet de synergie a été également signalé par Adel et Sehna (2000) qui ont noté une réduction sévère de la fécondité associée à une faible éclosion chez *Spodoptera littoralis* avec 100 ppm d'huile de neem. Ils ont expliqué l'échec de la maturation des ovocytes par une réduction de l'incorporation de la vitellogénine. L'effet stérilisant de l'azadirachtine a été attribué par ces auteurs à une perturbation de la régulation neuroendocrine de la reproduction.

La complexité de la régulation de la vitellogénèse et de la maturation ovarienne chez les orthoptères rend l'identification des causes de blocage et de l'inhibition de ces processus difficile. Plusieurs autres facteurs sont impliqués à différents niveaux. Par exemple, les travaux de Fei *et al.* (2005) ont montré que le jeûne chez *Romalea microptera* (orthoptère) a

entraîné une chute des titres de l'hormone juvénile ainsi qu'une baisse importante des titres de Vg suite à une inhibition de la traduction des transcrits de la Vg. Le traitement à l'hormone juvénile synthétique de femelles soumises au jeûne n'ayant pas rétabli les titres de Vg, ces auteurs ont suggéré que la traduction était contrôlée par d'autres facteurs et qu'une carence en certains nutriments pourrait être à l'origine de cette inhibition.

### **3-3 Effet sur l'évolution des titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens**

La vitellogénèse chez les insectes en général peut aussi être sous l'influence des ecdystéroïdes (De Loof et Huybrechts, 1998). Chez *L. migratoria*, bien que la production de vitellogénine soit clairement sous le contrôle de l'hormone juvénile (Chinzei et Wyatt, 1985 ; Girardie *et al.*, 1996), la possibilité que les ecdystéroïdes jouent un rôle complémentaire ne peut être écartée (Girardie et Girardie, 1996). En plus de l'hormone juvénile et des neurohormones, les ecdystéroïdes sont impliqués dans la régulation de la reproduction chez les adultes de criquets (Girardie *et al.*, 1998 ; Tawfik *et al.*, 2002 ; Verlindern *et al.*, 2009).

Les locustes comme les autres insectes ptérygotes gardent leurs glandes prothoraciques pour quelques temps après l'émergence, cette glande n'étant pas la source des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens chez les adultes (Tawfik *et al.*, 1999). Les cellules folliculaires des ovaires sont le site de la biosynthèse des ecdystéroïdes qui sont impliqués à plusieurs niveaux dans le contrôle de la reproduction (Glass *et al.*, 1978 ; Jarvis *et al.*, 1994 in Abdellaoui, 2009).

Le profil des titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens était assez comparable chez les femelles témoins tout au long du premier cycle de l'ovogenèse. Les titres ont resté faibles et peu variables durant les deux premières phases du cycle gonadotrophique : la prévitellogénèse et la vitellogénèse. Un pic a été enregistré au 12<sup>e</sup> jour caractérisant la fin de la vitellogénèse et coïncidant avec la taille maximale des ovocytes terminaux ( $5,22 \pm 0,62$  mm). La ponte des œufs caractérisant la post vitellogénèse était accompagnée d'une chute brusque des titres due au transfert actif unidirectionnel des ecdystéroïdes conjugués vers les ovocytes mûres (Dinan, 1997). Ces ecdystéroïdes conjugués se lient au vitellus et représente une source d'ecdystéroïdes au cours de l'embryogenèse (Verlindern *et al.*, 2009).

L'inhibition du pic des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens s'est avérée presque identique pour les deux traitements. Toutefois, une tendance de différence a été

observée entre l'EM-Ht et le TFB à la fin du cycle gonadotrophique où une légère hausse des titres a été enregistrée pour les traitées à l'EM-Ht. Les troubles de vitellogénèse et du développement ovarien entraînés par le TFB et l'EM-Ht pourraient être à l'origine de cette inhibition de la synthèse des ecdystéroïdes : les ovocytes terminaux restent à l'état juvénile et n'atteindraient jamais ou tardivement l'état de maturation nécessaire à la biosynthèse des ecdystéroïdes. Chez *L. migratoria*, la biosynthèse de quantités considérables d'ecdystéroïdes a été observée par Lagueux *et al.* (1977) à la fin de la maturation des ovocytes terminaux durant chaque cycle gonadotrophique, au moment où la vitellogénèse est achevée. Aucune synthèse n'a été observée par ces auteurs en absence du développement ovarien.

Tawfik *et al.* (2002) ont démontré également que la suppression du développement ovarien chez *L. migratoria* est fermement associée aux faibles titres de l'hormone juvénile ainsi que des ecdystéroïdes et que cette suppression persiste tant que leurs titres restent bas. Outre ces mécanismes indirects, l'action de ces deux traitements peut être primaire en agissant sur les centres nerveux, interférant donc avec la sécrétion des neurohormones ecdystériogènes (Schluter *et al.*, 1985) ou en entraînant des dégénérescences des cellules folliculaires : le site de la production des ecdystéroïdes. Cette cytotoxicité directe a été notée par Sayah *et al.* (1996) chez des femelles de *Labidura riparia* traitées à l'azadirachtine.

La persistance de l'effet inhibiteur du TFB sur les titres d'ecdystéroïdes et sur l'accumulation des protéines hémolympatiques laisse à penser que les effets indirects sont plus importants pour l'extrait que pour le TFB. Soltani *et al.* (1989) rapportent que le DFB inhibe sélectivement la sécrétion des ecdystéroïdes : il ne semble pas agir sur les ecdystéroïdes lorsque la glande prothoracique est la source d'hormone mais il inhibe la sécrétion des ecdystéroïdes par d'autres organes, particulièrement l'épiderme et les ovaires. Chez *Cydia pomonella*, le DFB a inhibé complètement le 2<sup>e</sup> pic d'ecdystéroïdes lié à la maturation ovocytaire (Soltani *et al.*, 1989). Les travaux de Lorenz *et al.* (1995) ont montré également que le DFB pouvait inhiber la production d'ecdystéroïdes chez les ovaires de *Gryllus bimaculatus in vitro*, la perturbation de la synthèse de DNA dans les ovaires étant à l'origine de cette inhibition.

# Conclusion générale et perspectives

## Conclusion générale et perspectives

La recherche de l'activité acridicide de l'extrait méthanolique brut de la plante *Haplophyllum tuberculatum*, sa caractérisation phytochimique et la compréhension de ses mécanismes d'action, étudiées et développer dans le cadre de ce travail de recherche, nous ont permis de tirer des conclusions intéressantes et d'émettre plusieurs hypothèses sur ses modes et mécanismes d'action.

Le screening phytochimique de *H. tuberculatum* a montré la présence notable des flavonoïdes, des tanins totaux, des anthocyanes et des alcaloïdes et l'absence totale des saponosides, des iridoïdes et des coumarines.

Le rendement en composés phénoliques totaux de *H. tuberculatum* obtenu était de 8,39 %, les rendements des différentes fractions flavanoïdiques restent bas pour *H. tuberculatum* en les comparant à ceux des autres espèces de Rutaceae. La teneur en composés phénoliques de l'EM-Ht était estimée à  $74,45 \pm 1,4$  mg EAG/g.

Le criblage phytochimique de l'extrait méthanolique brut et de ces différentes fractions sur plaque CCM a mis en évidence la présence d'acides phénols et de flavonoïdes : flavonols et flavones. Parmi les flavonoïdes révélés figurent la quercitine et la rutine, la quercitine est majoritairement présente dans les phases d'acétate d'éthyle et d'éther diéthylique.

Le profil chromatographique de l'extrait alcaloïdique brut a permis de constater que *H. tuberculatum* est assez riche en alcaloïdes. Leur identification ne peut être faite qu'après analyse avec des techniques plus poussées telle que la CPG-SM ou l'HPLC.

L'analyse des différentes fractions de l'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* par GC-MS a montré la présence d'acides phénols dans la fraction éther diéthylique, de sucres dans la fraction butanolique et d'alcools, alcanes et acides carboxyliques dans la fraction acétate d'éthyle. Quarante trois composés au total ont été identifiés dans les différentes fractions de l'extrait méthanolique de *H. tuberculatum*. La fraction butanolique était la plus riche en composés.

L'extrait méthanolique brut de *H. tuberculatum* et le téflubenzuron administrés par ingestion forcée aux larves du dernier stade de *Locusta migratoria* à différentes doses ont présenté une bonne activité insecticide selon les doses administrées. Cette activité larvicide a été accompagnée d'atteintes morphogénétiques qui ont touchés différentes parties du corps des larves.

Les observations histologiques au niveau du tube digestif ont montré que les larves traitées étaient susceptibles aux molécules testées et que les deux traitements au TFB et à l'EM-Ht ont eu des effets toxiques certains sur les épithéliums du mésentéron et des caecums gastriques.

L'activité des deux traitements sur les paramètres structuraux de la cuticule chez les larves du 5<sup>e</sup> stade a mis en évidence une réduction significative des quantités moyennes de chitine cuticulaire et une augmentation des protéines cuticulaires chez les séries traitées durant tout le cycle larvaire. Ces deux traitements ont réduit également les titres des ecdystéroïdes hémolymphatiques et ont allongé la durée du stade larvaire.

En plus de son effet sur la cuticule, l'EM-Ht et une autre fraction : les alcaloïdes, se sont révélés neurotoxiques vis-à-vis des larves de cinquième stade de *L. migratoria*, les taux d'inhibition enregistrés étaient de  $37,72 \pm 10 \%$  et de  $51,97 \pm 8,7 \%$  respectivement pour les alcaloïdes et l'EM-Ht, l'EM-Ht s'est révélé plus neurotoxique que les alcaloïdes. Ces deux fractions ont montré également une remarquable activation de la GST.

Sur la reproduction, l'EM-Ht et le TFB ont eu des effets comparables sur plusieurs des variables mesurées. Les deux produits ont significativement retardé la première oviposition et réduit la fécondité et la fertilité des femelles traitées. Le TFB et l'EM-Ht ont également eu des effets semblables sur la croissance ovarienne, la vitellogénèse et les titres d'ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens. Les deux traitements ont entraîné une réduction des niveaux des protéines dans l'hémolymphe ainsi qu'une réduction de l'incorporation de vitellogénine dans les ovocytes et la croissance des ovocytes terminaux s'en est trouvée significativement réduite comparativement aux témoins. Ce retard de l'ovogenèse a également été accompagné d'une dégénérescence des ovocytes terminaux. Toutefois, bien que le TFB ait complètement bloqué l'éclosion des œufs pondus, l'EM-Ht n'a eu qu'un effet inhibiteur sur cette variable.

Les ecdystéroïdes hémolymphatiques et ovariens tels que mesurés par RIA étaient semblables chez les insectes témoins et traités, sauf pour un pic observé seulement chez les témoins en fin de vitellogénèse. Nous discutons de la signification fonctionnelle de cette différence dans le contexte des modes d'action du TFB et de l'EM-Ht.

Les résultats préliminaires de la présente étude montrent que l'extrait méthanolique des feuilles et des tiges de *H. tuberculatum* et le téflubenzuron ont affecté de façon presque semblable le développement des larves et la reproduction chez les femelles de *L. migratoria*. Bien que les connaissances sur les mécanismes d'action des inhibiteurs de synthèse de chitine de la famille des BPU aient progressé au cours des dernières années, leur action sur les

mécanismes physiologiques associés à l'activité reproductrice reste mal comprise et nécessite de plus amples études.

L'extrait méthanolique brut de *Haplophyllum tuberculatum* représente une mixture de composés actifs, qui ont agit probablement par une action synergique. La recherche des biomolécules actives de cette plante, de leur site et mécanisme d'action nécessite un fractionnement poussé, des isolements et des purifications de chacune des molécules bio actives. D'autres études *in vivo* et *in vitro* restent nécessaires pour identifier la ou les molécules responsables de ces effets comparables à ceux des régulateurs de croissance.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- 1- Abbassi K., Atay-Kadiri Z. et Ghaout S., 2003a. Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan areas on the desert locust. *Physiological Entomology*, 28, 232-236.
- 2- Abbassi K., Atay- Kadiri Z. et Ghaout S., 2004. Activité biologique des feuilles de *Calotropis procera* (Ait. R. Br) sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*, Forskal, 1775). *Zoologica Baetica*, 15, 153-166.
- 3- Abbassi K., Mergaoui L., Atay-Kadiri Z., Stembouli A. et Ghaout S., 2003b. Effets des extraits de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) sur le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*, Forskål, 1775). *Zoologica Baetica*, 13/14, 203-217.
- 4- Abbott W.B., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18, 265-267.
- 5- Abdellaoui K. 2009. *Contribution à l'étude des effets de l'acide gibbérellique, hormone végétale de croissance sur la physiologie du développement et la reproduction du criquet migrateur Locusta migratoria migratoria (Linné, 1758)*. Thèse de Doctorat en Protection des Plantes et Environnement, Institut Supérieur Agronomique de Chott-Mariam, Tunis, 270 p.
- 6- Abdellaoui K., Ben Halima-Kamel M. et Ben Hamouda M.H., 2009. Physiological effects of gibberelic acid on reproductive potential of *Locusta migratoria*. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 4, 67-75.
- 7- Abo-Elghar G.E., Fujiyoshi P. et Matsumura F., 2004. Significance of the sulfonylurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 743-752.
- 8- Adel M.M. et Sehnal F., 2000. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology*, 46, 267-274.
- 9- Adote A.K., 1994. *Etude des propriétés insecticides de l'extrait de graines de neem Azadirachta indica*. Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II, 116 p.
- 10- Al-Abed Y., Abu- Zarga M., Sabri S., Rahman A.U. et Voelter W., 1998. Arylnaphthalene lignan from *Haplophyllum buxbaumii*. *Phytochemistry*, 49, 1779-1781.
- 11- Albrecht F.O., 1967. *Polymorphisme phasaire et biologie des acridiens migrants*. Ed. Masson, Paris, 194 p.

- 12- Al-Burtamani S.K.S., Fatope M.O., Marwah R.G., Onifade A.K. et Al-Saidi S.H., 2005. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 107-112.
- 13- Allal-Benfekih L., 2006. *Recherches quantitatives sur le croquet migrateur Locusta migratoria (Orthoptera-Oedipodinae) dans le Sahara algérien. Perspectives de lutte biologique à l'aide de microorganismes pathogènes et de peptides synthétiques*. Thèse de Doctorat, Ecole Doctorale Sciences-Technologie-Santé, Université de Limoges et Institut National Agronomique, El- Harrach, Alger, 140 p.
- 14- Al-Mehmadi R.M. et Al-Khalaf A.A., 2010. Larvicidal and histological effects of *Melia azedarach* extract on *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Journal of King Saud University Science*, 22, 77-85.
- 15- Al-Rehaily A.J., Al-Howiriny T.A., Ahmad M.S., Al-Yahya M.A., El-Feraly F.S., Hufford C.D. et McPhail A.T., 2001. Alkaloids from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 57, 597-602.
- 16- Al-Shamma A., Al-Douri N.A. et Phillipson J.D., 1979. Alkaloids of *Haplophyllum tuberculatum* from Iraq. *Phytochemistry*, 18, 1417-1419.
- 17- Al-Yahya M.A., Al-Rehaily A.J., Ahmad M.S., Al-Said M.S. et El-Feraly F.S., 1992. New alkaloids from *Haplophyllum tuberculatum*. *Journal of Natural Products*, 55, 899-903.
- 18- Al-Yousuf M.H., Bashir A.K., Veres K., Dobos A., Nagy G., Máthé I., Blunden G. et Vera J.R., 2005. Essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. From the United Arab Emirates. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 519-521.
- 19- Ammar M., Barbouche N. et Ben Hamouda M.H., 1997. Cuticule altération and death of *Schistocerca gregaria* by difficulty in molting under food effect of *Cestrum parquii* and *Olea europea*. *Sixth Arab Congress of Plant Protection, Beirut, Lebanon*, 27-31.
- 20- Amrani L., Zerguine K., Farine J.P., Smaghe G. et Soltani-Mazouni N., 2004. Imidazole derivative KK-42 reduces ecdysteroid titers and interferes with reproductive processes in adult females of *Tenebrio molitor*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80, 163-172.
- 21- Andersen S.O., 2002. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of mealworm *Tenebrio molitor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1077-1087.
- 22- Angiosperm Phylogeny Group APG, 1998. An Ordianl classification for the families of flowering plants. *Annals of Missouri Botanical Garden*, 85, 531-553.
- 23- Baehr J.C., Porcheron P., Papillon M. et Dray F., 1979. Haemolymph levels of the juvenile hormone, ecdysteroids and protein during the last two larval instars of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 415-421.

- 24- Balachowsky A.S. et Mesnil L., 1936. *Les insectes nuisibles aux plantes cultivées, leurs mœurs, leur destruction*. Ed. Etablissement Busson, Paris, T. II, Vol. 3, 1141-1921.
- 25- Barbouche N., 2001. *La physiologie du développement et de la reproduction de Schistocerca gregaria (Forsk , 1775) (Orthoptera : Acrididae) et les modalités de leurs perturbations sous l'action de différents régimes alimentaires*. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques, INAT, Tunis, 175 p.
- 26- Barbouche N., Ammar M., Hajjam B. et Lognay G., 2001. Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parquii* l'Herit (Solanacée) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 5(2), 85-90.
- 27- Barillet S., 2008. *Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre Danio rerio*. Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine, Metz, 181 p.
- 28- Benazir J.F., Suganthi R., Renjini-Devi M.R., Suganya K., Monisha K., Nizar-Ahmed K.P. et Santhi R., 2011. Phytochemical profiling, antimicrobial and cytotoxicity studies of methanolic extracts from *Ruta graveolens*. *Journal of Pharmacy Research*, 45(5), 1407-1409.
- 29- Bendahou N., Bounias M. et Fleche C., 1999. Toxicity of Cypermethrin and Fenitrothion on the haemolymph carbohydrates, head acetylcholinesterase and thoracic muscle, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase of emerging honeybees (*Apis mellifera mellifera* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 44, 139-146.
- 30- Benfekih L., Doumandji-Mitiche B. et Ahmed E., 1996. Premières observations sur la présence et l'activité de *Locusta migratoria* (Orthoptera, Oedipodinae) au Sahara septentrional dans la région d'Adrar. *Med. Fac. Landbouwn, Uni. Gent*, 61/3a, pp. 781-789.
- 31- Benhammou N., Atik Bekkara F. et Kadifkova Panovska T., 2009. Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus*. *Comptes Rendus de Chimie*, 12, 1259-1266.
- 32- Berry R.E., Moldenke A.F., Miller J.C. et Wernz J.C., 1993. Toxicity of diflubenzuron in larvae of gypsy moth (Lepidoptera : Lymantridae) : Effects of host plant. *Journal of Economic Entomology*, 86(3), 809-814.
- 33- Biddinger D.J. et Hull L.A., 1995. Effects of several types of insecticides on the mite predator, *Stethorus punctum* (Coleoptera, Coccinellidae), including insect growth regulators and abamectin. *Journal of Economic Entomology*, 88, 358-366.
- 34- Bonnemaïson L., 1961. *Les ennemis des plantes cultivées et des forêts*. Ed. Sep., Paris, T. I, 605 p.
- 35- Borst D.W. et O'Connor J.D., 1972. Arthropod molting hormone : Radioimmune assay. *Science*, 178, 418-419.

- 36- Bouayad N., Rharrabe K., Lamhandi M., Ghailani-Nourouti N. et Sayah F., 2012. Dietary effects of harmine,  $\alpha$   $\beta$ - carboline alkaloid, on development, energy reserves and  $\alpha$  amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera : Pyralidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19, 73-80.
- 37- Broussalis A.M., Clemente S. et Ferraro G.E., 2010. *Hybanthus parviflorus* (Violaceae) : Insecticidal activity of south american plant. *Crop Protection*, 29, 953-956.
- 38- Bruneton J., 1999. *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 925 p.
- 39- Caboni P., Ntalli N.G., Aissani N., Cayoski I. et Angioni A., 2012. Nematicidal activity of (E., E) -2,4decadienal and (E) 2-decenal from *Ailanthus altissima* against *Meloidogyne javanica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 60(4), 1146-1151.
- 40- Cano A., Espinosa M., Samos C.H. et Delegado G., 2006. New prenylated flavanones from *Esenbeckia berlandieri* ssp. *acapulcensis*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 50(2), 71-75.
- 41- Cassier P., Porcheron P., Papillon M. et Lensky Y., 1980. Contribution à l'étude des protéines cuticulaires du criquet migrateur, *Locusta migratoria migratoroides* (R et F) données quantitatives. *Annales de Sciences Naturelles-Zoologie*, 2, 51-65.
- 42- Cassier P., Baghdassarian-Chalaye D., Debesse N., Papillon M., Baldaia L. et Porcheron P., 1988. Ecdysteroids and activation of epidermal cells in the locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 34(7), 669-677.
- 43- Céspedes C.L., Calderon J.S., Lina L. et Arando E., 2000. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoïds isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1903-1908.
- 44- Céspedes C.L., Salazar J.R., Martinez M. et Aranda E., 2005. Insect growth regulatory effects of some extracts and sterols from *Myrtillocactus geometrizans* (Cactaceae) against *Spodoptera frugiperda* and *Tenebrio molitor*. *Phytochemistry*, 66, 2481-2493.
- 45- Céspedes C.L., Martinez-Vazquez M., Calderon J.S., Salazar J.R. et Aranda E., 2001. Insect growth regulary activity of some extracts and compounds from *Parthenium argentatum* on fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *Zeitschrift für Naturforschung, C* 56, 95-105.
- 46- Céspedes C.L., Torres P., Marin J.C., Arciniegas A., De Viar A.R., Pérez-Castorena A.L. et Aranda, E., 2004. Insect growth inhibitor by tocotrienols and hydroquinones from *Roldana barba johannis*. *Phytochemistry*, 65, 1963-1975.
- 47- Chaaib Kouri F., 2004. *Investigation phytochimique d'une brosse à dents africaines Zanthoxylum zanthoxyloides (Lam.) Zepernick et Timler (Syn. Fagara zanthoxyloides L.)(Rutaceae)*. Thèse de Doctorat, Université de Lausanne, 200 p.

- 48- Chaieb I., 2005. *Les saponines du Cestrum parquii (l'Herit) (Solanaceae): nature chimique, implication physiologiques et potentiel biopesticide*. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Ecole Supérieure d'Horticulture et d'élevage de Chott-Mariam, Tunis, 154 p.
- 49- Chang E.S. et O'Connor J.D., 1979. *Arthropod moulting hormones*, in: Jaffe, B.M., Behrman, H.R. (Eds.), *Methods of hormone radioimmunoassay*. Academic Press, New York, pp. 797-814.
- 50- Chiang A.S., Lin W.Y., Liu H.P., Pszczolkowski A.M., Fu T.F., Chiu S.L. et Holbrook G. L., 2002. Insect NMDA receptors mediate juvenile hormone biosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 37-42.
- 51- Chino H., Sakurai S., Ohtaki T., Ikekawa N., Miyazaki H., Ishibashi M. et Abuki H., 1974. Biosynthesis of  $\alpha$  ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. *Science*, 183, 529-530.
- 52- Chinzei Y. et Wyatt G.R., 1985. Vitellogenin titre in haemolymph of *Locusta migratoria* in normal adults, after ovariectomy, and in response to methoprene. *Journal of Insect Physiology*, 31(6), 441-445.
- 53- Chopard L., 1943- *Orthoptéroïdes de l'Afrique du nord*. Ed. Librairie Larose, Paris, T. I, 450 p.
- 54- Chui V.W.D., Koo C.W. et Lo W.M., 1993. Laboratory evaluation of vectobac<sup>R</sup> – 12AS and teflubenzuron against *Culex* and *Aedes mosquito* larvae under different physical conditions. *Environment International*, 9, 193-202.
- 55- Chui V.W.D., Wong K.W. et Tsoi K.W., 1995. Control of mosquito larvae (Diptera: Culicidae) using BTI and teflubenzuron: laboratory evaluation and semi- field test. *Environment International*, 21, 433-440.
- 56- Cohen E., 1987. Chitin biochemistry synthesis and inhibition. *Annual Review of Entomology*, 32, 71-93.
- 57- Crane M., Sildanchandra W., Kheir R. et Callaghan A., 2002. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(2002), 361-369.
- 58- Cunningham J.-P., Nicholson D. et Retnakaran A., 1987. The effect of the ingested benzoylphenylurea on the ultrastructure of the cuticle deposited during the last larval instar of *Choristoneura fumiferana* Clem (Lepidoptera : Tortricidae). *Canadian Journal of Zoology*, 65, 2715-2723.
- 59- Cvetnić Z. et Vladimir-Knezević S., 2004. Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharmaceutica*, 54(3), 243-250.

- 60- Dallaire R., Labrecque A., Marcotte M., Bauce E. et Delisle J., 2004. The sublethal effects of tebufenozidz on the precopulatory and copulatory activities of *Choristoneura fumiferana* and *C. rosaceana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 112, 169-181.
- 61- De Loof A. et Huybrechts R., 1998. Review: Insect do not have sex hormones, a myth? *General and Comparative Endocrinology*, 111, 245-260.
- 62- Demark J.J. et Bennett G.W., 1989. Efficacy of chitin synthesis inhibitors on nymphal cockroaches (Dictyoptera : Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 82(6), 1633-1637.
- 63- Desprès L., David J.P. et Gallet C., 2007. *The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals*, TRENDS in Ecology and Evolution, Vol. 22, n° 6, pp. 298-307.
- 64- Dhadialla T.S. et Wyatt G.R., 1983. Juvenile hormone dependent vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body : inducibility related to sex and stage. *Developmental Biology*, 96, 436-444.
- 65- Dhadialla T.S., Carlson G.R. et Le D.P., 1998. New insecticide with ecdysteroidal and juvenil hormone activity. *Annual Review of Entomology*, 43, 545-569.
- 66- Dhadialla T.S., Retnakaran A. et Smagghe G., 2005. *Insect growth and development disrupting insecticides*, in: Gilbert, L.I., Iatrou, K.S.S.G. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Oxford, pp. 55-115.
- 67- Diallo A. M., 2005. *Etude de plantes médicinales de Niafunke phytochimie et pharmacologie de Maerua crassifolia*. Thèse de Doctorat, Université de Bamako, 125 p.
- 68- Dinan L., 1997. Ecdysteroids in adults and eggs of the house cricket, *Acheta domesticus* (Orthoptera : Gryllidae). *Comprehensive Biochemistry and Physiology*, 116B(2), 129-135.
- 69- Dinan L. et Rees H., 1981. The identification and titres of conjugated and free ecdyteroids in developing ovaries and newly laid eggs of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 27, 51-58.
- 70- Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P. et Vidal N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660.
- 71- Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani L.M., Badoc A. et Gmira N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymalaea lythroides*. *Bulletin de la Société de Pharmacie de Bordeaux*, 142, 61-78.
- 72- Dorn A., Rademacher J.M. et Sahn E., 1986. Effects of azadirachtin on the moulting cycle, endocrine system and ovaries in last instar larvae of the mikweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Journal of Insect Physiology*, 32, 231-238.

- 73- Dorn A., Scheider M., Botens F.F.W., Holtmann M. et Petzak I., 1997. *Field application of the juvenile hormone analogue fenoxycarb against hopper bands of Locusta migratoria capito in Madagascar* in Krall S., Peveling R. et Ba Dallio D., 1997- New strategies in locust control, Ed. Birhauser Verlag Basel/ Switzerland, 522 p.
- 74- Duranton J.F., Launois M., Launois-Luong M.H. et Lecoq M., 1982. *Manuel de prospection acridienne en zone tropicale sèche*. Ed. GERDAT, Montpellier, T. I, 695 p.
- 75- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. et Featherstone A., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- 76- El-Modafar C. et El-Boustani E.S., 2002. *Contribution des polyphénols aux mécanismes de défense des plantes* in Regnault- Roger C., Philogène et Vincent C. 2002. Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 169-185.
- 77- Ezemonye L. et Tongo I., 2010. Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere*, 81, 214-217.
- 78- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C. , 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331, 372-379.
- 79- FAO, 1997. *Evaluation des données d'essais de terrain relatifs à l'efficacité des insecticides sur les criquets et sauteriaux*. Rapport FAO, groupe consultatif sur les pesticides, Rome, 10-12 décembre 1996, Ed. ONU pour l'alimentation et l'agriculture. 18 p.
- 80- Feeny P.P., 1976. *Plant apparency and chemical defense*, in: Wallace, J.W., Mansell, R.L. (Eds.), *Biochemical interactions between plants and insects*. Plenum Press, New York, pp. 1-40.
- 81- Fei H., Martin T.R., Jaskowiak K.M., Hatle J.D., Whitman D.W. et Borst D.W., 2005. Starvation affects vitellogenin production but not vitellogenin mRNA levels in the Lubber grasshopper, *Romalea microptera*. *Journal of Insect Physiology*, 51, 435- 443.
- 82- Feng R.Y., Chen W. et Isman M.B., 1995. Synergism of malathion and inhibition of midgut esterase activities by an extract from *Melia toosendan* (Meliaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 53, 34-41.
- 83- Feyerneisen R. et Hoffmann J.A., 1977. Regulation of ecdysone hydroxylation in *Locusta migratoria* : Role of the hormone level. *Journal of Insect Physiology*, 23, 1175-1181.
- 84- Feyerneisen R., Joly R. et Hoffmann J.A., 1976. Régulation de la conversion de l'ecdysone chez *Locusta migratoria* L. rôle des corpora allata. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 282, 901-904.

- 85- Filippini R., Piovan A., Innocenti G., Caniato R. et Cappelletti E.M., 1998. Production of coumarin compounds by *Haplophyllum potavinum* in vivo. *Phytochemistry*, 49, 2337-2340.
- 86- Fogal W.-H., 1977. Effect of phenyl-benzoylurea [1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6difluorobenzoyl)-urea] on *Diprion similis* (Hymenoptera: Diprionidae). *The Canadian Entomologist*, 109, 981-986.
- 87- Gadenne C., Grenier S., Mauchamp B. et Plantevin G., 1990. Effects of a juvenile hormone mimetic, fenoxycarp, on post-embryonic development of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. *Experientia*, 46, 744-747.
- 88- Gande, R.A. et Morgan, E.D., 1979. Ecdysteroids in the developing eggs of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 289-293.
- 89- Gande R.A., Morgan E.D. et Wilson I.D., 1979. Ecdysteroids levels throughout the life cycle of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 665-675.
- 90- Garcia E.S., Uhl M. et Rembold H. 1986. Azadirachtin a chemical probe for the study of the moulting processes in *Rhodnius prolixus*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 41, 771-775.
- 91- Girardie J. et Girardie A., 1996. Lom OMP, a putative ecdysiotropic factor for the ovary in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 42, 215-221.
- 92- Girardie J., Richard O. et Girardie A., 1996. Detection of the vitelogenin in the hemolymph of larval female locust (*Locusta migratoria*) treated with neurohormone Lom OMP. *Journal of Insect Physiology*, 42(3), 215-221.
- 93- Girardie J., Geoffre S., Delbecque J.P. et Girardie A., 1998. Argument for two distinct gonadotropic activities triggered by different domains of the ovary maturing pars in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 44, 1063-1071.
- 94- Glass H., Emmerich H. et Spindler K.A., 1978. Immunohistochemical localization of ecdysteroids in follicular epithelium of locust ovaries. *Cell and Tissue Research*, 194, 237-244.
- 95- Gordan R., Yong T.L., Cornect M. et Hong D.K., 1989. Effects of two insect growth regulators on the larval and pupal stages of the cabbage maggot (Diptera, Anthomyiidae). *Journal of Economic Entomology*, 82(4), 1040-1045.
- 96- Graf J.F., 1993. The role of insect growth regulators in arthropod control. *Parasitology Today*, 9, 471-474.
- 97- Greathead P.J., Kooyman C., Launois-Luong M.H. et Popov G.B., 1994. *Les ennemis naturels des criquets du Sahel*. Collection Acridologie Opérationnelle, n° 8, Ed. CIRAD-GERDAT-PRIFAS, Montpellier, 147 p.

- 98- Grosscurt A.C., 1978. Diflubenzuron: some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and evaluation of its practical possibilities. *Pesticide Science*, 9, 373-386.
- 99- Guignard J.L., 2000. *Biochimie végétale*. Ed. Masson, Paris, 274 p.
- 100- Habes D., 2006. *Evaluation d'un insecticide inorganique, l'acide borique à l'égard d'un modèle à intérêt médical (Blattella germanica), inventaire, toxicité, analyse des résidus, structure de l'intestin et activité enzymatique*. Thèse de Doctorat en Sciences, Université Badji Mokhtar, Annaba, 121 p.
- 101- Habig W.H., Pabst M.J. et Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130-7139.
- 102- Hadj Salem J., 2009. *Extraction, identification, caractérisation des activités biologique des flavonoïdes de Nitraria rutusa et synthèse de dérivées acycliques de ces molécules par voie enzymatique*. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Lorraine, 251 p.
- 103- Hagedorn H.H., 1985. *The role of ecdysteroids in reproduction*, in: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press, New York, pp.165-203.
- 104- Hagedorn D., Erlandson M., Gillott C. et Toprak U., 2009. New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture and function. *Annual Review of Entomology*, 54, 285-302.
- 105- Hammond D.G. et Kubo I., 1999. Structure activity relationship of alkanols as mosquito larvicides with novel finding regarding their mode of action. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 271-278.
- 106- Hamraoui A. et Regnault-Roger C., 1997. Comparaison des activités insecticides des monoterpènes sur deux espèces d'insectes ravageurs des cultures *Ceratitidis capitata* et *Rhopalosiphum padi*. *Acta Botanica Gallica*, 144, 413-417.
- 107- Hamrouni-Sellami I., Mamourri E., Chahed T., Aidi-Wannes W., Elyeskchouk M. et Marzouk B., 2009. Effects of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet majoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crop and Products*, 30, 395-402.
- 108- Hartfelder K., 2000. Insect juvenile hormone : from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33, 157-177.
- 109- Hema R., Kumaravel S. et Alagusundaram K., 2011. GC/MS determination of bioactive components of *Murraya koenigii*. *Journal of American Science*, 7(1), 80-83.
- 110- Hemingway J., Hawks N.J., Mc Carroll L. et Ranson H., 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34, 653-665.

- 111- Hillerton J.E. et Purslow P.P., 1981. An investigation of some matrix protein components critical to the extensible properties of insect cuticle. *Journal of Materials Science*, 16, 1673-1679.
- 112- Hoffmann J.A., 1980. Ecdysone et reproduction chez les femelles adultes d'insectes. *Reproduction Nutrition Développement*, 20, 443-456.
- 113- Hoffmann K.H. et Lorenz M.W., 1998. Recent advances in hormones in insect pest control. *Phytoparasitica*, 26(4), 323-330.
- 114- Hunter-Jones P., 1961. *Elevage et reproduction des criquets au laboratoire*. Ed. Anti Locust Research Center, Londres, 23 p.
- 115- Idrissi-Hassani L.M. et Hermas J., 2008. Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk (Orthoptera : Acrididae). *Zoologica Baetica*, 19, 71-84.
- 116- Igor-Passi L. B., 2002. *Etude des activités biologiques de Fagara zanthoxyloides Lam.* (Rutacée). Thèse Pharmacie, Bamako, 133 p.
- 117- Isman M. B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19, 603-608.
- 118- Isman M.B., 2002. *Problèmes et perspectives de commercialisation des insecticides d'origine botanique* in Regnault- Roger C., Philogène B.J. et Vincent C. 2002- Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 301-311.
- 119- Jarvis T.D., Earley F.G.P. et Rees H.H., 1994. Inhibition of the ecdysteroids biosynthetic pathway in ovarian follicle cells of *Locusta migratoria*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 48, 153-162.
- 120- Javidnia K., Miri R. et Banani A., 2006. Volatile oil constituents of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. (Rutaceae) from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 355-356.
- 121- Jbilou R., Amri H., Bouayad N., Ghailani N., Ennabili A. et Sayah, F., 2008. Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development,  $\alpha$ - amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta : Coleoptera : Tenebrionidae). *Bioresource Technology*, 99, 959-964.
- 122- Kabassina B.T., 1990. *Comparaison faunistique des caelifères de la station de Gaid Gasem en Mitidja et de divers étages bioclimatiques du Togo*. Thèse Ingénieur Agronome, Institut National Agronomique, El Harrach, 109 p.
- 123- Kara F.Z., 1997. *Etude de quelques aspects écologiques et régime alimentaire de Schistocerca gregaria (Forsk., 1779) (Orthoptera, Cyrtacanthacridinae) dans la région d'Adrar et en conditions contrôlées*. Thèse Magister, Institut National Agronomique, El Harrach, 182 p.

- 124- Khaldi M., 1996. *Cycle biologique, respiration et biométrie chez Schistocerca gregaria (Forskal, 1775) et Locusta migratoria cinerascens (Bonnet et Finot, 1883)*. Mémoire Ingénieur Agronome, Institut National Agronomique, El Harrach, 160 p.
- 125- Khalid S.A. et Waterman P.G., 1981. Alkaloid, lignan and flavonoid constituents of *Haplophyllum tuberculatum* from Sudan. *Journal of Medicinal Plant Research*, 43, 148-152.
- 126- Kim D.I., Park J.D., Kim S.G., Kuk H., Jang M.S. et Kim S.S., 2005. Screening of some crude plant extracts for their acaricidal and insecticidal efficacies. *Journal Asia-Pacific Entomology*, 8(1), 93-100.
- 127- King D.S., Bollenbacher W.E., Bort D.W., Vedeckis W.V., O'Connor J.D., Ittycheriah P.I. et Gilbert L.T., 1974. The secretion of  $\alpha$  ecdysone by prothoracic glands of *Manduca sexta* in vitro. *Proceedings of the National Academy Sciences, USA*, 71, 793-796.
- 128- Kloche J.A., Balandrin M.F., Barnby M.A. et Yamasaki, R.B., 1989. *Limonoids, phenolics and furanocoumarines as insect antifeedants, repellents and growth inhibitory compounds*, in: Arnason, J.T., Philogène, B.J.R., Morand, P. (Eds.), *Insecticides of plant origin*. American Chemical Society Symposium series, Washington, Vol. 387, pp. 136-149.
- 129- Koolman J., Bidmon H.J., Lehman M. et Kauser G., 1988. On the mode of action of azadirachtin in blowfly larvae and pupae. *Physiological Insect Ecology*, 1, 55-67.
- 130- Kotze A.C. et Reynolds S.E., 1991. An examination of cuticle chitin and protein in Cyromazine-affected *Manduca sexta* larvae. *Pesticide Biochemistry and physiology*, 41, 14-20.
- 131- Kramer K.-J., Turner C.-D. et Koga D., 1985. *Chitin metabolism in insect*. In : Kerkut G.-A., Gilbert L.-I. *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, Ed. Pergamon, Oxford, 3, 75-97.
- 132- Kubo I. et Kloche J.A., 1983. *Isolation of phytoecdysones as insect ecdysis inhibitors and feeding deterrents*, in: Hedin, P.A. (Eds.), *Plant resistance to insects*. American Chemical Society Symposium series, Washington, Vol. 208, pp. 329-346.
- 133- Kubo I. et Kinst-Hori I., 1999. Flavonols from saffron flowers: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4121-4125.
- 134- Kubo I., Kinst-Hori I., Chaudhuri S.K., Kubo Y., Sanchez Y. et Ogura T., 2000. Flavonols from *Heterotheca inuloides* : tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8, 1749-1755.
- 135- Kunst L et Samuels A.L., 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Progress in Lipid Research*, 42, 51-80.

- 136- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 137- Lagueux M., Hirn M. et Hoffmann J.A., 1977. Ecdysone during ovarian development in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 23, 109-119.
- 138- Lagueux M., Harry P. et Hoffmann J.A., 1981. Ecdysteroids are bound to vitellin in newly laid eggs of *Locusta*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 24, 325-338.
- 139- Lagueux M., Hetru C., Goltzené F., Kappler C. et Hoffmann J.A., 1979. Ecdysone titre and metabolism in relation to cuticulogenesis in embryos of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 709-723.
- 140- Launois M. et Lecoq M., 1990. *Biomodélisation et stratégies de lutte antiacridienne en Afrique et à Madagascar*. Med. Fac. Landbouww. Rijks Univ. Gent 55 (2a), pp. 225-234.
- 141- Launois-Luong M.H. et Lecoq M., 1993. *Manuel explicatif du code O.M.M. de transmission des informations sur les criquets ravageurs*. Ed. OMMISESCO, Genève, 30 p.
- 142- Launois-Luong M.H., Launois M. et Rachadi T., 1988. *La lutte chimique contre les criquets du Sahel*. Collection Acridologie Opérationnelle n°3, CIRAD-PRIFAS, Montpellier, 83 p.
- 143- Lecoq M., 1975. *Les déplacements par vol du criquet migrateur malgache en phase solitaire, leur importance sur la dynamique des populations et la grégarisation*. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Université Paris XI, Orsay, 272 p.
- 144- Lecoq M., Bálança G., Foucart A., Gay P.E., Magalhães B.P., Scamidt F.G., Frazão H., Silva J.B.T., De Faria M.D., Tigano M.S., Alves R.T., Dias Guerra W. et Freitas V., 2001. *Développement de bio-insecticides pour le contrôle des criquets ravageurs au Brésil*. Projet de coopération ABC, accord Embraca/CIRAD 2000-2003 in CIRAD 2000- Le CIRAD au Brésil. Rapport d'activité 2000, CIRAD, pp. 20-21.
- 145- Le Dang G., Yong Lee G., H Choi Y., Jachoi G., Soo Jang K., Soo Park M., Seob Soh H., Hee HanY., Hwan Lim C. et Kim J.C., 2010. Insecticidal activities of crude extracts and phospholipids from *Chenopodium ficifolium* against melon and cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Crop Protection*, 29(10), 1124-1129.
- 146- Lee K., 1991. Glutathione S-transferase activity in phytophagous insects: induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochemistry*, 21(4), 353- 361.
- 147- Lim S.J. et Lee S.S., 1882. Toxicity of diflubenzuron to the grasshopper *Oxya japonica* : effects on reproduction. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, 31, 154-158.

- 148- Londershausen M., Spindler-Barth M. et Spindler K.D., 1989. *Influence of the insect growth regulator SIR 8514 on chitin synthesis, chitin degradation and ecdysteroid titres*, in: Skjak-Baek, G., Antohonsen, T., Sandford, P. (Eds.), *Chitin and Chitosan*. Elsevier Applied Science, London, pp. 233-242.
- 149- Lopez M.D. et Pascual-Villalobos M. J., 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implication for pest control. *Industrial Crops Products*, 31, 284-288.
- 150- Lorenz J., Lenz M. et Hoffmann K.H., 1995. Effects of pharmacological agents on ecdysteroid synthesis *in vitro* in ovaries and abdominal integument from female adult crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 50C, 286-293.
- 151- Louveaux A. et Benhalima T., 1986. Catalogue des orthoptères Acridoidea d'Afrique du Nord-Ouest. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 91 (3-4), 73-87.
- 152- Lü M., Wu W. et Liu H., 2010. Effects of fraxinellone on the midgut ultrastructural changes of *Mythimna separata* Walker. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 263-268.
- 153- Mansur J.F., Figueira-Mansur J., Sandos A.S., Sandos-Junior H., Ramos I. B., Neves de Medeiros M., Machado E.A., Kaiser C.R., Muthukrishnan S., Masuda, H., Vasconcellos A.M.H., Melo A.C.A. et Moreira M.F., 2010. The effect of lufenuron, a chitin synthesis inhibitor, on oogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98, 59-67.
- 154- Martoja R. et Martoja M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Ed. Masson et Cie, Paris, 339 p.
- 155- Massa R., Blevins S. et Chao Sh. L., 2008. Role of acetyl cholinesterase and glutathione S- transferase following exposure to nicosulfuron and diazinon in *Helicoverpa zea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 230- 235.
- 156- Mc Phail A.T., Mc Phail D.R., Al-Said M.S., El-Domiaty M.M. et El Feraly F.S., 1990. Revision of the stereochemistry of (+)- tuberine, a alkaloid from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 29(9), 3055-3057.
- 157- Medina P., Smagghe G., Buda F., Del Estal P., Tirry L. et Vinuela E., 2002. Significance of penetration, excretion, and transvarial uptake to three insect growth regulators in predatory lacewing adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 51, 91-101.
- 158- Merzendorfer H., 2006. Insect chitin synthases : a review. *Journal of Comparative Physiology*, B, 176, 1-15.
- 159- Merzendorfer H. et Zimoch L., 2003. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 4393-4412.

- 160- Miller A., Morris M. et Stuarts S., 1988. *Plants of Dhofar the southern region of Oman : traditional, economic and medical uses*. Ed. Office of the Adviser for Conservation of the Environment, Diwan of Royal court, Sultanate of Oman, 237 p.
- 161- Mohsen, Z.H., Jaffer, H.J., Al-Saad, M. et Ali Z.S., 1989. Insecticidal effects of *Haplophyllum tuberculatum* against *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Crude Drug Research*, 27, 17-21.
- 162- Monteiro D.A., Almeida J.A., Rantin F.T. et Kalinin A. L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *Brycon cephalus* exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, C143, 141-149.
- 163- Mordue A.J., Evans K.A. et Charlet M., 1986. Azadirachtin, ecdysteroids and ecdysis in *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85C (2), 297-301.
- 164- Moreira M.F., Dos Santos A.S., Marotta H.R., Mansur J.F., Ramos I.B., Machado E.A., Souza G.H.M.F., Eberlin M.N., Kaiser C.R., Kramer K.J., Muthukrishnan S. et Vasconcellos A.M.H., 2007. A chitin-like component in *Aedes aegypti* eggshells, eggs and ovaries. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 1249-1261.
- 165- Mossa J.S., Al-Yahya M.A. et Al-Meshal I.A., 1987. *Medical plants of Saudi Arabia*. Ed. King Saud University Libraries, Riyadh, 182 p.
- 166- Muyle H. et Gordon R., 1989. Effects of selected juvenile hormone analogs on sixth-instar larvae of the eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens (Lepidoptera : Tortricidae). *Canadian Entomologist*, 121, 1271- 1272.
- 167- Nasir E. et Ali S.I., 1980- *Flora of Pakistan*, Ed. Agricultural Research Council, Pakistan, 132, 1-29.
- 168- Nasiruddin M. et Mordue A.J., 1993. The effect of azadirachtin on the midgut histology of the locusts *Schistocerca gregaria* and *Locusta migratoria*. *Tissue and Cell*, 25, 875-884.
- 169- Nasseh H.S., Krall H., Wilps H. et Salissou G.-B., 1992. Les effets des inhibiteurs de croissance et de biocides végétaux sur les laves de *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Forsk.). *Bulletin de Information sur la Protection des Végétaux UCTR/PV*, 45, 5- 9.
- 170- Nguyen T. M., 2002. *Etude des alcaloïdes de Medicosma subsessilis* T. G. Hartley (Rutaceae). Université René Descartes - Paris V, 33 p.
- 171- Nicolas S., 1995. *Effets et modes d'action de deux lectines à mannose sur le puceron du pois. Acyrthosiphon pisum. Potentiel d'utilisation des lectines végétales dans une stratégie de création de plantes transgéniques résistantes aux pucerons*. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 193 p.

- 172- Nøhr C. et Anderson S.O., 1993. Cuticular proteins from fifth instar nymphs of the migratory locust *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23(4), 521-531.
- 173- Onifade A.K., Fatope M.O., Deadman M.L. et Al-Kindy S.M.Z., 2008. Nematicidal activity of *Haplophyllum tuberculatum* and *Plectranthus cylindraceus* oils against *Meloidogyne javanica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36, 679-683.
- 174- Ould El Hadj D., 1991. *Bioécologie des sautrelles et des sautériaux dans trois zones d'études au Sahara*. Thèse Magister Sciences Agronomiques, Institut National Agronomique, El Harrach, 85 p.
- 175- Outtar F., 2009. *Utilisation de quelques biopesticides sur le criquet migrateur Locusta migratoria (Oedipodinae, Acrididae)*. Thèse Magister Sciences Agronomiques, Institut National agronomique, El Harrach, 276 p.
- 176- Owen P. et Johens T., 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 149-160.
- 177- Paris R. et Nothis A., 1978. *Plantes médicinales, phytothérapie*. Ed. Masson, Paris, 318 p.
- 178- Pavela, R., 2004. The effect of ethanol extract from plants of family Lamiaceae on colorado potato beetle adults (*Laptinotarsa decemlineata* Say). *National Academy Science Letters*, 27, 195-203.
- 179- Peel A.D. et Akam M., 2007. Dynamics of yolk deposition in the desert locust *Shistocerca gregaria*. *Journal of Insect Physiology*, 53, 436-443.
- 180- Pener M.P., Van Den Broek A.Th.M., Van Marrewijk W.J.A., Van Der Horst D.J. et Beenackers A.M.Th., 1989a. Development of imaginal competence to adipokinetic hormone in *Locusta* : Lipid and carbohydrate levels and glycogen phosphorylase activity in azadirachtin induced over-aged nymphs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94B, 293-298.
- 181- Pener M.P., Van den Broek A.Th.M., Van Doorn J.M., Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A. et Beenackers A.A.M.Th., 1989b. Development of imaginal competence to adipokinetic hormone in *Locusta* : lipid and carbohydrate levels and glycogen phosphorylase activity in precocene- induced adultiforms. *Physiological Entomology*, 14, 67-76.
- 182- Perez M.B., Calderon N.L. et Croci C.A., 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Chemistry*, 104, 585-592.
- 183- Popov G.B., 1996. Quelques effets de la sécheresse sahélienne sur la dynamique des populations acridiennes. *Sécheresse*, 7(2), 91-97.

- 184- Popov G.B., Launois- Luong M.H. et Vander Weel J.J., 1990. *Les oothèques des criquets du Sahel*. Ed. Collection Acridologie Opérationnelle n°7, CIRAD-PRIFAS, Montpellier, 153 p.
- 185- Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E. et Komaitis M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants : Investigation of their antioxydant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, 664-671.
- 186- Pruthi J.S., 1980. *Spices and condiments: chemistry, microbiology and technology*. Advances in Food Research Supplement 4, Academic Press, New-York (USA), 449 p.
- 187- Raccaud-schoeller J., 1980. *Les insectes : physiologie et développement*. Ed. Masson, Paris, 296 p.
- 188- Rachadi T., 1991. *Précis de lutte antiacridienne. Les pulvérisations d'insecticides*. Ed. CIRAD-PRIFAS, Montpellier, 312 p.
- 189- Raikhel A.S. et Dhadialla T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of entomology*, 37, 217-251.
- 190- Rao J. V., 2006a. Sublethal effects of an organophosphorus insecticide (RPR-II) on Toxic biochemical parameters of Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C143*, 492-498.
- 191- Rao J. V., 2006b. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86, 78-84.
- 192- Rao J.V., et Kavitha P., 2004. Toxicity of Azodrin on the morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia faetida*. *Environmental Research*, 96, 323-327.
- 193- Rao J.V., Surya Pavan Y. et Madhavendra S.S., 2003. Toxic effects of the Clorpyriphos on morphology and acetylcholinesterase activity of the earthworm *Eisenia faetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 296-301.
- 194- Rasolomandimby J., 1996. La sécheresse de 1992 au sud de Madagascar et ses conséquences sur l'évolution acridienne. *Sécheresse*, 7(2), 155-156.
- 195- Redfern R.E., Kelly T.J., Borkovec A.B. et Hayes D.K., 1982. Ecdysteroid titers and moulting aberrations in last stage oncopeltus nymphs treated with insect growth regulators. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 18, 351-356.
- 196- Regnault-Roger C., 2002. *De nouveaux phyto-insecticides pour le troisième millénaire?* in Regnault- Roger C., Philogène B.J. et Vincent C. 2002- Biopesticides d'origine végétale. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 19-39.
- 197- Regnault-Roger C., Philogène B.J. et Vincent C. 2002. *Biopesticides d'origine végétale*. Ed. Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 311 p.

- 198- Reidy G.F., Rose H.A., Visetson S. et Murray M., 1990. Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide. Resistant stain of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36, 269- 276.
- 199- Retnakaran A., Granett J. et Ennis T., 1985. *Insect growth regulators*. In : Kerkut G.L.G, *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*, Ed. Pergamon, Oxford, 529-601.
- 200- Reynolds S.E., 1987. The cuticle, growth and moulting in Insects : the essential background to the action of acylurea insecticides. *Pesticides Science*, 20, 131-146.
- 201- Rharrabe K., Bouayad N. et Sayah F., 2009. Effects of ingested 20-hydroxyecdysone on development and midgut epithelial cells of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 39, 112-119.
- 202- Rhoades D.F., 1979. *Evolution of plant chemical defence against herbivores*, in: Rhosenthal, G.A., Janzen, D.H. (Eds.), *Herbivores : their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, pp. 3-54.
- 203- Riberau-Gayan P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Duand, Paris, 243 p.
- 204- Riddiford L.M., 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions. *Advances in Insect Physiology*, 24, 213-274.
- 205- Riddiford L.M., 1996. *Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis*. In: Gilbert Lit J. and Atkinson B., Editor. *Metamorphosis: Post-Embryonic Reprogramming of gene expression in amphibian and insect cell*. Academic Press, Inc., San Diego, 223- 251.
- 206- Sadek E.S. et Makris D.P., 2009. Polyphenolic composition and antioxidant characteristics of kumquat (*Fortunella margarita*) peel fractions. *Plants Foods Human Nutrition*, 64, 297-302.
- 207- Salokhe S., Sarkar A., Kulkarni A., Mukherjee S. et Pal J.K., 2006. Flufenoxuron, an acylurea insect growth regulator, alters development of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera : Tenebrionidae) by modulating levels of chitin, soluble protein content and HSP70 and p34cdc2 in the larval tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85, 84-90.
- 208- Salunke B.K., Kotkar H.M., Mendki P.S., Upasani S.M. et Maheshwari V.L., 2005. Efficacy of kavonoids in controlling *Collosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera : Bruchidae) a post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection*, 24, 888-893.
- 209- Sayah F., Fayet C., Idaomar M. et Karlinsky A., 1996. Effect of azadirachtin on vitellogenesis of *Labridura riparia* (Insect : Dermaptera). *Tissue & cell*, 28(6), 741-749.

- 210- Sayah F., Idaomar M., Sorenzo L. et Karlinsky A., 1998. Endocrine and neuroendocrine effect of azadirachtin in adult females of *Labidura riparia*. *Tissue & Cell*, 30, 86-94.
- 211- Scheren R. et Célestin H., 1992. *Persistence of benzoylphenylureas in the control of the migratory locust *Locusta migratoria capito* (Sauss.) in Madagascar*. In : Krall S., Peveling R., Ba Dallio D., 1997 - *New strategies in locust control*. Edition Birhauser Verlag Basel/ Switzerland, 129-136.
- 212- Schluter U., Bidmon H.J. et Grewe S., 1985. Azadirachtin affects growth and endocrine events in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 31, 773-777.
- 213- Seddik A., 1994- *Développement ovarien et charge alaire du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forskal,1775) (Orthoptera, acrididae) et du criquet migrateur *Locusta migratoria cinerascens* (B. et F., 1889) (Orthoptera, Oedipodinae) à Adrar. Cycle biologique du criquet pèlerin au laboratoire*. Mémoire Ingénieur Agronome, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger, 154 p.
- 214- Shaalan E.A.S., Canyon D., Younes M.W.F., Abdel-Wahab H. et Mansour A.H., 2005. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environment International*, 31, 1149-1166.
- 215- Shafeek A., Prasanthi R.P.J., Reddy G. H., Chetty C. S. et Reddy G. R. 2004. Alterations in acetylcholinesterase and electrical activity in the nervous system of cockroach exposed to the neem derivate, azadirachtin. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 205-208.
- 216- Sheriha G.M. et Abou Amer K.M., 1984. Lignans of *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 23, 151-153.
- 217- Sheriha G.M., Abouamer K. et Elshtaiwi B.Z., 1985. An alkaloid from *Haplophyllum tuberculatum*. *Phytochemistry*, 24, 884-886.
- 218- Sieber K.P. et Rembold H., 1983. The effects of azadirachtin on the endocrine control of moulting in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 29, 523-527.
- 219- Smagghe G., Salem H., Tirry L. et Degheele D., 1996. Action of a novel insect growth regulator tebufenozide against different developmental stages of four stored product insects. *Parasitica*, 52, 61-69.
- 220- Smagghe G., Auda M., Van Laecke K. V. et Degheele D., 1997. Significance of penetration and metabolism on topical toxicity of diflubenzuron in *Spodoptera littoralis* and *Spodoptera exigua*. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, 82, 255-260.
- 221- Soltani N., 1987. Effets du diflubenzuron sur la reproduction chez *Tenebrio molitor*. *Annales de l'Association Nationale de la Protection des Plantes*, 3, 471-475.

- 222- Soltani N. et Soltani-Mazouni N., 1992. Diflubenzuron and oogenesis in codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *Pesticide Science*, 32, 257-261.
- 223- Soltani N., Delbecque J.P. et Delachambre J., 1983. Penetration and insecticidal activity of Diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pesticide Science*, 14, 615-622.
- 224- Soltani N., Soltani N., Mauchamp B. et Delbeque J.P., 1989. Effects of diflubenzuron on the ecdysteroid titers in two insects species. Tag. Ber. Akad. Landwirtsch- Wiss- DRD, Berlin, 274 S, 171-177.
- 225- Soltani N., Soltani-Mazouni N., Quennedey B. et Delachambre J., 1996. Protein synthesis in developing ovaries of mealworm under *in vivo* and *in vitro* conditions: effects of diflubenzuron. *Journal of Stored Products Research*, 32(3), 205-212.
- 226- Soltani-Mazouni N. et Soltani N., 1994. Diflubenzuron affected DNA synthesis in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 25, 19-21.
- 227- Spindler K.D. et Spindler-Barth M., 1996. *Chitin degradation and synthesis in arthropods*. In : Giraud-guile M.-M. *Chitin in life science*. Ed. André J., Paris, 41-52
- 228- Steedman A., 1988. *Locust handbook*. Ed. Development Natural Resources Institute, Overseas, London, 180p.
- 229- Tail G., 2009. *Action de Diflubenzuron sur la croissance, la reproduction et l'évolution des ecdystérides hémolympatiques, ovariens et embryonnaires chez le criquet pèlerin Schistocerca gregaria (Forskål, 1775)*. Thèse de Doctorat en Sciences, Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger, 115 p.
- 230- Tail G., Porcheron P. et Doumandji-Mitiche B., 2010. Diflubenzuron et évolution des taux des ecdystéroïdes dans les ovaires et dans les œufs du criquet pèlerin, *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera : Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 17, 89-95.
- 231- Tail G., Porcheron P., Doumandji-Mitiche B. et Blais C., 2008. Diflubenzuron effects on reproduction and hemolymph ecdysteroid levels in female locusts *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Acrididae). *Journal of Orthoptera Research*, 19, 363-370.
- 232- Taiz L. et Zeiger E., 2006. *Plant physiology*. Ed. Sinauer associates, Sunderland , USA, 764 p.
- 233- Tawfik A.I., Vedrovà A. et Sehnal F., 1999. Ecdysteroids during ovarian development and embryogenesis in solitary and gregarious *Schistocerca gregaria*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 41, 134-143.

- 234- Tawfik A.I., Yanaka Y. et Tanaka S., 2002. Possible involvement of ecdysteroids in photoperiodically induced suppression of ovarian development in Japanese strain of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 48, 411-418.
- 235- Tewary D.K., Bhardwaj A. et Shanker A., 2005. Pesticidal activities in five medicinal plants collected from mid hills of western Himalayas. *Industrial Crops and Products*, 22, 241-247.
- 236- Tobe S.S. et Pratt G.E., 1975. Corpus allatum activity *in vitro* during ovarian maturation in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Journal of Experimental Biology*, 62, 611-627.
- 237- Truman J.W. et Riddifort L.M., 2002. Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects. *Annual Review of Entomology*, 47, 467-500.
- 238- Tuley De Sylva K., 1995. *A manual on the essential oil industry*. Ed. United Nations Industrial Development Organisation, Vienna, 232 p.
- 239- Ulubelen A. et Öztürk M., 2008. Alkaloids, coumarins and lignans from *Haplophyllum* species. *Records of Natural Products*, 2(3), 54-69.
- 240- Vanichpakoru P., Ding W. et Cen X.X., 2010. Insecticidal activity of five Chinese medicinal plants against *Plutella xylostella* L. larvae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13, 169-173.
- 241- Vaquette J.M., Hifnawy S. J., Pousset L.A., Fournat B. et Cavé A., 1976. Alcaloïdes d'*Araliopsis soyauxii*: Isolement d'un nouvel alcaloïde, l'araliopsine. *Phytochemistry*, 15, 743-745.
- 242- Verlindern H., Badisco L., Marchal E., Van Wielendaele P. et Broeck J.V., 2009. Endocrinology of reproduction and phase transition in locusts. *General and Comparative Endocrinology*, 162, 79-92.
- 243- Vincent J.F.V. et Clarke L., 1985. Effects of diflubenzuron on the stabilisation of protein within the cuticular matrix of the locust (Ensifera: Locustidae). *Entomologia Generalis*, 11(1/2), 15-24.
- 244- Wang K.Y., Zhang Y., Wang H.Y., Xia X.M. et Liu T.X., 2010. Influence of three diets on susceptibility of selected insecticide and activities of detoxification esterase of *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96, 51-55.
- 245- Wei S.H., Clark A.G. et Syvanen M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (Md GST- 6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the house fly *Musca domestica*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 1145-1153.
- 246- Weilgus J.J., Bollenbacher W.E. et Gilbert L.I., 1979. Correlations between epidermal DNA synthesis and haemolymph ecdysteroid titers during the last larval instar of tobacco hornworm. *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 9-16.

- 247- Williams C.M., 1967. The juvenile hormone II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the cecropia silkworm. *Biological Bulletin Woods Hole*, 121, 572-585.
- 248- Wong C.C., Li H.B., Cheng K.W. et Chen F., 2006- A systematic survey of antioxidant activity of 30 chinese medicinal plants using ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, 705-711.
- 249- Wu H.H., Zhu K.Y., Guo Y.P., Zhang X.M. et MA E.B., 2008. Comparative studies of substrate and inhibitor specificity of glutathione S-transferase in six tissues of *Oxya chinensis* (Thunberg) (Orthoptera : Acrididae). *Agricultural Sciences in China*, 7(4), 462-468.
- 250- Wutting U., Baier U. et Penzlin H., 1991. The effect of diflubenzuron (Dimilin) on the ecdysteroid titer and neuronal activity of *Periplaneta americana* (L.). *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 39, 8-19.
- 251- Wyatt G.R., 1988. Vitellogenin synthesis and the analysis of juvenile hormone action in locust fat body. *Canadian Journal of Zoology*, 66, 2600-2610.
- 252- Wyatt G.R., Cook K.E., Firco H. et Dhadialla T.S., 1987. Juvenile hormone action on locust fat body. *Insect Biochemistry*, 17, 1071-1074.
- 253- Yang. M., Zhang J., Zhu K.Y., Xuan T., Liu X., Guo Y. et Ma E., 2008. Increased activity and reduced sensitivity of acetylcholinesterase associated with malathion resistance in a field population of the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 91, 32-38.
- 254- Yu S.J., 2004. Induction of detoxification enzymes by triazine herbicides in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80, 113-122.
- 255- Zakaria O. et Sagnia S. B., 2003. *Lutte intégrée contre les sauteriaux et les locustes : importance du biopesticide Green Muscle*. Vol. 5(3), Ed. Centre Régional Agrehymet, 15 p.
- 256- Varma J. et Dubey N.K., 1998. Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of tomorrow. *Current Science online*. 75 : [http://www.iisc.ernet.in/currensci/jan25/articles 22.htm](http://www.iisc.ernet.in/currensci/jan25/articles%2022.htm).

### الملخص:

أظهرت دراسة الفعالية المضادة للحشرات للمستخلص الكحولي *Haplophyllum tuberculatum* ضد الجراد المهاجر بالمقارنة مع المبيد الانتقائي Téflubenzuron أن هذان العلاجان أثرا على تطور و تكاثر هذا الجراد بصفة متشابهة و قد كانت المكونات البيولوجية للمستخلص النباتي وراء هذه النتائج.

### الكلمات المفتاح :

*Haplophyllum tuberculatum*, Téflubenzuron, *Locusta migratoria*, المستخلص الكحولي, التكاثر, التطور.

### Résumé :

L'évaluation de l'activité insecticide de l'extrait méthanolique de la plante *Haplophyllum tuberculatum* vis-à-vis du criquet *migrateur Locusta migratoria* a été faite en comparaison avec un insecticide sélectif le téflubenzuron, les résultats obtenus ont montré que les deux traitements ont présenté de nombreuses similitudes d'effets, les deux traitements ont perturbé le développement et la reproduction de ce criquet, les métabolites secondaires présentes chez cette plante étaient à l'origine de ces perturbations.

### Mots clés:

*Haplophyllum tuberculatum*, téflubenzuron, *Locusta migratoria*, extrait méthanolique, développement larvaire, reproduction

### Abstract:

The evaluation of the insecticidal activity of the methanol extract of the plant *Haplophyllum tuberculatum* against the migratory locust *Locusta migratoria* was made in comparison with a selective insecticide teflubenzuron, the results showed that both treatments presented many similarities of effects, both treatments affected the development and reproduction of this grasshopper, secondary metabolites present in this plant was the source of these disturbances.

### Keywords:

*Haplophyllum tuberculatum*, teflubenzuron, *Locusta migratoria*, methanol extract, larval development, reproduction.