

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش الجزائر

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE
EL HARRACH ALGER

THESE

**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT
EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

Spécialité : Zoologie Agricole et Forestière
Option : Ecologie des Communautés Biologiques.

Présentée par :

KARBACHE Fatima

Thème

**Activite entomotoxique des extraits de quelques variétés
Phaseolus vulgaris contre *Callosobruchus maculatus* F.
(*Coleoptera : Bruchidae*). Identification des substances à l'origine
de la toxicité.**

Soutenue le 10/09/2018

Membre de jury :

Présidente : Mme DOUMANDJI-MITICHE B.	Professeur	ENSA
Directeur de thèse: Mme MOUHOUCHE F.	Professeur	ENSA
Examineur: Mme SAHIR-HALOUANE F.	Professeur	UMBB
Examineur: Mme MILLA A.	Professeur	ENSV

Année universitaire : 2017-2018.

« Tant qu'il apprend, l'homme ne cesse d'être savant.

Il devient ignorant lorsqu'il prétend savoir »

Mohammed

صَلَّى
عَلَيْهِ وَسَلَّمَ

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements et gratitude à ma Promotrice Mme Mouhouche Fazia, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach, pour ses conseils, sa patience et son attitude encourageante tout au long de ce travail.

Qu'il me soit permis de remercier Madame Doumandji B., Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique El Harrach, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Je tiens à remercier Madame Sahir-Halouane F. Professeur à l'université M'Hamed Bouguera, Faculté des sciences, Boumerdes, pour avoir accepté d'examiner ce travail et de bien vouloir honorer par sa présence, la constitution du jury.

Mes remerciements vont à Mademoiselle Milla A., professeur à l'Ecole Nationale Supérieure vétérinaire El Harrach, pour avoir accepté d'examiner ce travail et honorer le jury.

J'exprime mes remerciements à Madame Mechaty Meriem Directrice du labo de protéomie à l'université libre de Bruxelles pour m'avoir aidé et conseillé et pour tous les bons moments que nous avons passé ensemble.

Pour terminer, un grand merci à toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

LISTE DES BREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE..... 1

PARTIE I : RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

Introduction..... 5

I. Evolution des relations plantes-phytophages..... 5

II. Effets des composés secondaires des plantes sur les organismes et implication des systèmes de défense..... 7

III. Spécialisation et stratégies de résistances développées par les insectes face aux composés secondaires 7

IV. Systèmes de défense directe et indirecte induite par l'attaque des phytophages..... 8

CHAPITRE II

I. Origine et historique 10

II. Importance économique du haricot 11

II.1. ans le monde..... 11

II.2. Algérie..... 12

III. Variabilité génétique..... 14

IV. Composition biochimique globale des graines de haricot..... 14

IV.2. . Composition en acides aminés indispensables..... 15

IV.3. . Principales protéines de réserve de la graine de *Phaseolus vulgaris* 16

IV.3.1. La phaséoline 16

IV.3.2. Les phytohemagglutinines..... 16

V. Intérêt médical 19

**CHAPITRE III : La protéine de défense des graines des légumineuses
entreposée ARCELINE**

I. Introduction	20
II. Aperçu général sur les arcelines	20
III. Présentation des variantes arcelines.....	23
IV. Les domaines fonctionnels des arcelines.....	31

CHAPITRE VI : Aperçu bioécologique sur *Callosobruchus maculatus* F.

I. Caractères généraux de la famille des bruchidae.....	33
I.1. Origine et répartition géographique	33
I.2. Position systématique	34
I.3. Description.....	34
I.3.1. Les œufs	34
I.3.2. Les larves	35
I.3.3. Les nymphes	35
I.3.4. Les adultes.....	35
I.4. Biologie.....	37
I.5. Génétique.....	39
I.6. Dégâts	40
II. Stratégies et moyens de lutte contre <i>Callosobruchus maculatus</i> F	42
II.1. éthode préventive.....	42
II.1.1. Les mesures d'hygiènes	42
II.1.2. Lutte génétique	43
II.1.3. Lutte par dépistage.....	43
II.2. Lutte curative.....	44
II.2.1. Lutte physique	44
II.2.2. Lutte biologique	49
II.3. L'utilisation des végétaux.....	50
II.3.1. .1. Utilisation sous forme de poudre.....	51
II.3.2. .2. Utilisation sous forme d'extraits organiques	51
II.3.3. .3. Utilisation sous forme d'extraits aqueux	51
II.3.4. .4. Utilisation sous forme d'huiles essentielles	52
II.4. roches biotechnologiques	53

PARTIE II : Partie expérimentale

CHAPITRE I : Matériels et méthodes

Matériel et méthode	55
I. Sensibilité des variétés de haricot aux attaques de <i>Callosobruchus maculatus</i> F.	55
I.1. Matériel biologique	55
I.1.1. Matériel animal	55
I.1.2. Le matériel végétal	55
I.2. Détermination des paramètres biologiques	57
I.2.1. Fécondité et longévité	57
I.2.2. Fertilité et durée de développement	57
I.3. Conditions expérimentales	58
I.4. Calcul de l'indice de sensibilité variétal 'IS'	58
II. Effet entomotoxique des variétés de haricot sur <i>Callosobruchus maculatus</i> F.	58
II.1. ais sur graines entières de haricot	58
II.2. ffet entomotoxiques des graines reconstituées de pois chiche	59
II.2.1. .1. Préparation des graines reconstituées de pois chiche	59
III. Caractérisation de la substance toxique des graines de haricot	61
III.1. xtraction et purification de l'arcéline, la protéine à activité insecticide à partir des graines de haricot	61
III.2. des protéines	62
III.3. Détermination du poids moléculaire de la substance toxique arcéline	63
III.3.1. ectrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)	63
III.3.2. éparation du gel	64
III.3.3. de l'électrophorèse	65
III.4. Immunoblotting (Western Blot)	65
IV. Effet entomotoxique de l'arcéline sur les paramètres biologiques de <i>Callosobruchus maculatus</i>	66
V. Expression des résultats	67

CHAPITRE II : Résultats et discussions

I. Etude des paramètres biologiques de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur graines entières de haricot et sur graines reconstituées de pois chiche	68
I.1. Etude sur graines entières	68
I.1.1. La fécondité	68
I.1.2. La fertilité	72
I.1.3. La longévité	72
I.1.4. La mortalité	74

I.2. Etude sur graines reconstituées.....	76
I.2.1. La fécondité.....	76
I.2.2. La fertilité.....	80
I.2.3. Effet des six variétés de haricot sur la mortalité des adultes.....	82
I.2.4. Durée de développement.....	85
I.2.5. Calcul de l'indice de sensibilité variétal 'IS'	88
II. Purification et identification de la protéine insecticide arcéline des graines de haricot.....	90
II.1. de l'arcéline et des protéines contenues dans les différentes fractions extraites à partir des farines de haricot.....	90
II.2. électrophorèse SDS-PAGE des protéines totales extraites à partir des six variétés de haricot.	92
II.3. capture immunologique d'arcelines par Western blot.....	93
III. Effet de la protéine entomotoxique arcéline de la variété sauvage sur les paramètres biologiques de C. maculatus	95
III.1. Effet de l'arcéline sur la fécondité	96
III.2. Effet de l'arcéline purifiée sur la mortalité	100
CONCLUSION GENERALE	110
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	114

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1: La production mondiale des légumineuses durant l'année 2015.....	11
Figure 2: La production mondiale des haricots secs durant l'année 2015	12
Figure 3: Evolution des superficies de la culture de haricot en Algérie entre 2006 et 2015	13
Figure 4: Evolution de la production et des rendements de la culture de haricot en Algérie entre 2006 et 2015	13
Figure 5: les différents types de boucles au niveau des léctines.....	22
Figure 6: Attachement des métaux pour la stabilité structurale de PHA et d'arcéline	25
Figure 7: Structure quaternaire de l'arcéline1 et 5.....	27
Figure 8: Alignement multiple des séquences.	31
Figure 9: Œuf de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. (Gr.40 x 0.8)	36
Figure 10: Adulte femelle de <i>Callosobruchus maculatus</i> F., vue dorsale. (Gr. 10 x 8).....	36
Figure 11: Adulte mâle de <i>Callosobruchus maculatus</i> F., vue dorsale. (Gr. 10 x 8)	36
Figure 12: Cycle de développement de l'espèce <i>Callosobruchus maculatus</i> (F.) à une température de 30°C et une hygrométrie de 70 % \pm 5 %.....	38
Figure 13: Caryotypes du coléoptère <i>C. maculatus</i> F.....	39
Figure 14: Phylogénie moléculaire pour <i>C. maculatus</i>	40
Figure 15: Dégâts occasionnés par <i>Callosobruchus maculatus</i> F. sur grains de pois chiche commercial (Gr. 10 x 4).....	41
Figure 16: Les variétés de haricot utilisées dans nos expérimentations.....	56
Figure 17: Schéma représentatif des étapes de confection des graines artificielles.....	60
Figure 18: Récapitulatif des étapes d'extraction d'arcéline	62
Figure 19: Microplaque 96 puits pour quantification des protéines.	63
Figure 20: Etapes de réalisation de l'électrophorèse SDS-PAGE	65
Figure 21: la fécondité de <i>C. maculatus</i> sur les graines entières des six variétés testées de haricot.	71
Figure 22: Longévité moyenne des mâles de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les graines entières des six variétés de haricot.....	74
Figure 23: Longévité moyenne des femelles de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les graines entières des six variétés de haricot.....	74
Figure 24: Evolution de la mortalité des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les graines entières des six variétés de haricot.	76

Figure 25: Effet dose des six variétés de haricot sur la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. étudiée sur graines reconstituées de pois chiche	77
Figure 26: Pourcentage moyen d'émergence de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les six variétés de haricot testées aux différentes doses étudiées sur graines reconstituées de pois chiche.....	81
Figure 27: Activité entomotoxique de <i>Phaseolus caracalla</i> sur les adultes de <i>C. maculatus</i>	83
Figure 28: Activité entomotoxique de S102 sur les adultes de <i>C. maculatus</i>	84
Figure 29: Activité entomotoxique de Pinto sur les adultes de <i>C. maculatus</i> F.....	84
Figure 30: Effet doses des six variétés de haricot sur la durée moyenne de développement de <i>Callosobruchus maculatus</i> étudiée sur graines reconstituées de pois chiche	87
Figure 31: Teneurs comparatives en protéines totales et arcelines purifiée des six variétés de haricot.	91
Figure 32: Electrophorèse SDS-PAGE des protéines des six variétés de haricot.....	92
Figure 33: Western blot pour la détection d'arcelines présentes dans les six variétés de haricot.	93
Figure 34: Mode d'expression génétique des différentes arcelines chez l'espèce <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	94
Figure 35: Effet de l'arceline semi purifiée de la variété sauvage <i>Phaseolus caracalla</i> sur l'évolution temporelle de la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i>	97
Figure 36: Efficacité de l'arceline semi purifiée de la variété sauvage <i>P. caracalla</i> sur <i>C. maculatus</i>	100
Figure 37: Effet des différentes doses de l'arceline semi purifiée de <i>P. caracalla</i> sur la mortalité des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i>	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Composition biochimique (g/100g de graines) et valeur énergétique (Calories / 100g) des graines de <i>Phaseolus vulgaris</i>	15
Tableau 2: Composition (mg/g) en acides aminés essentiels des protéines de haricot.....	15
Tableau 3: Pourcentage de similarité au niveau des AA des arcélines clonées.....	29
Tableau 4: Influence des graines entières des six variétés de haricot sur la fécondité des femelles de <i>Callosobruchus maculatus</i> F	70
Tableau 5: Analyse de la variance des résultats de l'évolution de la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. sur graines entières des variétés de Haricot.	71
Tableau 6: longévité moyenne des mâles et des femelles de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les graines entières des six variétés de haricot et sur <i>Cicer arietinum</i>	73
Tableau 7: Influence des graines entières des six variétés de haricot sur la mortalité de <i>Callosobruchus maculatus</i> au 3 ^{ème} jour	75
Tableau 8: Influence des six variétés de haricot étudiées sur graines reconstituées de pois chiche sur la fécondité moyenne par femelle de <i>Callosobruchus maculatus</i> F.....	77
Tableau 9: Analyse de la variance des résultats de l'évolution de la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i> F. sur les six variétés de haricot à graines reconstituées	78
Tableau 10: Effet des doses des six variétés de haricot sur le pourcentage moyen d'émergence de <i>Callosobruchus maculatus</i> étudié sur graines reconstituée de pois chiche.	80
Tableau 11: Toxicité de la farine des six variétés de haricot vis-à-vis des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> après trois jours d'exposition.....	83
Tableau 12: Effet des doses des six variétés de haricot sur la durée moyenne de développement en jours de <i>Callosobruchus maculatus</i> étudiée sur graines reconstituées de pois chiche	86
Tableau 13: Les indices de sensibilité des six variétés de haricot étudiées à différentes doses sur graines reconstituées de pois chiche.....	89
Tableau 14: Teneur en protéines totales et d'arcélines purifiées pour les six variétés de haricot.	90
Tableau 15: Effet dose de la protéine purifiée arcéline caractéristique des graines de haricot sauvage de la variété <i>Phaseolus caracalla</i> sur la fécondité cumulée par femelle de <i>Callosobruchus maculatus</i> F	96

Tableau 16: Analyse de variance des résultats de l'évolution de la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i> sur les graines artificielles à base d'arcéline issu de <i>Phaseolus caracalla</i>	98
Tableau 17: Efficacité de l'arcéline purifiée à partir de <i>P. caracalla</i> sur la mortalité de <i>Callosobruchus maculatus</i> F	101
Tableau 18: Analyse de la variance des résultats de l'efficacité de l'arcéline de la variété sauvage sur la mortalité des individus de <i>Callosobruchus maculatus</i> F.....	102

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Dès le XIX^e siècle, les molécules végétales ont été identifiées pour leurs propriétés insecticides. En effet, au cours de leur évolution, toutes les plantes ont élaboré un véritable système immunitaire capable de déceler un danger biotique « insectes ravageurs, microorganismes pathogènes » ou abiotique « pluie, grêle, vent ». Ce système phytoimmunitaire se distingue par la variété de molécules de défense qu'il produit en réponse à un stress.

Par ailleurs, après avoir été longtemps dépendante des pesticides, l'agriculture mondiale doit favoriser des pratiques plus respectueuses envers l'environnement par l'exploitation des ressources naturelles des végétaux qui constituent une nouvelle stratégie de lutte contre les ennemis des cultures. En effet, une molécule de défense naturelle des végétaux est un éliciteur susceptible de déclencher une série d'événements biochimiques menant à l'expression de la résistance chez la plante.

Actuellement, l'utilisation des variétés résistantes apparaît comme l'une des composantes majeures de la stratégie de lutte contre les insectes. Dans ce même contexte, la génie génétique offre la possibilité d'incorporer des gènes « étranger » dans le génome de certaines espèces végétales, tel qu'un gène codant pour une protéine entomotoxique. Cette nouvelle approche dans la défense des végétaux est avantageuse car elle est considérée comme une méthode de lutte non polluante envers l'environnement.

Notre recherche est menée sur les légumineuses. Elles constituent une source protéique intéressante en complément des céréales pour l'alimentation humaine, soit sous forme de graines, soit sous forme de produits fractionnés enrichis en protéines (Schneider et *al.*, 1995 ; Boutin et *al.*, 2006).

Ces légumineuses en l'occurrence le pois chiche *Cicer arietinum* est exposé aux nombreux problèmes phytosanitaires dont les plus dommageables sont provoqués par les coléoptères des denrées stockées (Multon, 1982). Les dégâts provoqués par ces insectes possèdent un pouvoir de multiplication élevé. En effet, chaque année, les légumineuses à grosses graines subissent des pertes considérables de l'ordre de 800g/kg de graines en quelques mois (Ishimoto et Chrispeels, 1996 ;

Ouedraogo et *al.*, 1996). Ces dégâts sont estimés à 30% en Afrique (Rodrigues Macedo et *al.* 2000) et de 3 à 10% dans les pays développés (Bulot, 1990).

Pour pallier à ce fléau mondial, l'utilisation des molécules allélochimiques suscitent de nombreux espoirs et de nombreuses familles de plantes en l'occurrence celle des légumineuses sont susceptibles de receler des composés présentant des propriétés utiles dans le control phytosanitaire (Schmutterer, 1992; Jacobson, 1995 ; Schultz, 1997, Gusmao et *al.*, 2013). Ces composés de structures et de natures variées peuvent avoir des effets répulsifs, anti appétant ou toxiques pour les insectes (Louis, 2004).

Depuis quelques années, plusieurs travaux ont été réalisés afin de démontrer l'activité entomotoxique des substances allélochimiques élaborées par les légumineuses. Les travaux de Mouhouche (2005) sur l'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de pois chiches ; De La Fuente (2012), Sakthivelkumar et *al.* (2014) et Mishra et *al.* (2017), ont prouvé l'effet anti-appétant des arcélines, des légumines et des phaséolines dans la défense des légumineuses contre *Callosobruchus maculatus* (F.)

Parmi les composés défensifs généraux des légumineuses en l'occurrence celles du haricot commun *Phaseolus vulgaris* (L.) qui fait l'objet de notre recherche, on a les lectines, les hémilectines et les arcelines. Ces molécules à activité insecticide présentent un rôle physiologique important et leur rôle dans le mécanisme de défense des plantes a été rapporté par plusieurs auteurs entre autre, Chrispeels et Raikhel (1991), Peumans et VanDamme (1995) et Mishra et *al.* (2017).

Dans ce contexte, l'utilisation de génotypes résistants offre des caractéristiques souhaitables telles que l'action sur les générations successives des insectes, la spécificité de contrôler un ou plusieurs insectes à la fois, l'absence de couts supplémentaires et la compatibilité avec d'autres techniques de lutte utilisées dans la lutte intégrée (Smith, 2005).

La résistance des plantes renferme l'antixénose, l'antibiose et la tolérance (Panda et Khush 1995). L'antixénose est caractérisée par des facteurs morphologiques ou chimiques qui affectent négativement le comportement des insectes qui tendent à coloniser une plante.

L'expression de l'antibiose affecte la biologie des insectes qui tentent

d'utiliser la plante comme hôte (Smith et Clement, 2012). Certaines accessions sauvages et variétés améliorées de haricot renfermant des composés défensifs généraux tels que les phytohemagglutinines, les inhibiteurs de protéase, des inhibiteurs de l'alpha amylases et des variantes de protéines d'arcéline associées à la résistance du haricot face aux bruches, expriment une résistance de type antibiose face aux attaques de *Callosobruchus maculatus* F. (Sathe et al., 1984 ; Kuroda et al., 1996, Chrispeels et Raikhel, 1991 ; Kasahara et al., 1996 ; Grossi de Sa et Chrispeels, 1997 ; Franco et al., 1999; Carlini et Grossi de Sa 2002 et Velten et al., 2007).

Dans ce même contexte, des études ont montré la capacité de certaines phytohemagglutinines à se fixer sur la muqueuse intestinale, empêchant le développement normal des microvillosités. Il s'en suit des difficultés d'absorption des nutriments qui se traduisent par une perte de poids, un retard de croissance et de développement (Grant, 1991 ; Louis, 2004 et Karbache, 2009).

Le travail décrit dans cette thèse est axé sur la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* (F.). Cependant, notre étude vise à trouver une molécule à activité entomotoxique de type Albumine au niveau des graines de certaines variétés de haricot à l'égard de cet insecte qui constitue le modèle support de nos recherches.

La première partie de cette thèse est une approche bibliographique qui comporte quatre chapitres bien distincts. Dans le premier chapitre, on aborde les défenses chimiques des plantes face aux insectes. Le deuxième chapitre est consacré à une synthèse des données sur le haricot commun *Phaseolus vulgaris* (L.). Au cours du troisième chapitre, nous insistons sur le potentiel d'utilisation des arcélines végétales pour lutter contre les ravageurs phytophages en particulier les coléoptères représentés essentiellement par la bruche du pois chiche. Enfin le dernier chapitre donne un aperçu bioécologique de l'espèce *Callosobruchus maculatus* (F.)

Après situation du contexte de l'étude, la deuxième partie relative à l'expérimentation qui vise à mettre en évidence l'effet entomotoxique des

Arcélines sur la biologie de *Callosobruchus maculatus* (F.), pour cela notre démarche consiste à :

1. Etudier la sensibilité variétale du haricot aux attaques de *Callosobruchus maculatus* (F.) sur graines entières et reconstituées à base de farine de pois chiche.
2. Identifier la molécule entomotoxique arcéline intervenant dans la défense chimique des graines de haricot à l'égard de *Callosobruchus maculatus* (F.) par électrophorèse SDS-PAGE et par Western Blot.
3. Etudier par des essais biologiques, l'effet entomotoxique de l'extrait d'arcélinesemi purifiée de la variété algérienne du haricot la moins sensible à l'attaque de cet insecte.

En conclusion, nous évoquons les perspectives découlant de notre travail, mais également l'avenir des plantes transgéniques.

*PARTIE I : RECHERCHE
BIBLIOGRAPHIQUE*

CHAPITRE I
Intéraction
plantes - phytophages

Introduction

Les relations plantes-insectes font l'objet d'importantes études. Si certains insectes sont particulièrement utiles aux plantes en assurant, par exemple, la pollinisation nécessaire à la reproduction du végétal, nombreux sont les nuisibles qui s'alimentent de la plante, provoquant parfois des dégâts irréparables.

Les végétaux constituent le taxon le plus important en termes de biomasse sur terre. Ils possèdent un efficace système de résistance, basé sur des caractères physiques, chimiques, et développementaires vis à vis des insectes ravageurs. La résistance des plantes face aux insectes, définit la capacité de celle-ci à éviter ou réduire les dommages causés par ces derniers (Kogan, 1975).

I. Evolution des relations plantes-phytophages

Selon la théorie classique énoncée par Ehrlich et Raven en 1964, les organismes phytophages, notamment les insectes, en consommant les différentes parties d'une plante influencent la croissance ou la reproduction du végétal et exercent aussi une forte pression de sélection sur celui-ci.

En réponse à ces pressions, des génotypes existants dans la population végétale, possédant des caractères permettant aux plantes d'être moins consommées par les phytophages sont favorisés par la sélection naturelle. De même, chez les phytophages les gènes codant pour des mécanismes permettant à l'individu de se développer au dépend de tels végétaux auraient été à leur tour sélectionnés. Ainsi, la sélection réciproque entre les plantes et les insectes phytophages aurait agi pendant plusieurs millions d'années comme un véritable moteur évolutif conduisant à la diversification des espèces d'insectes et des espèces végétales (Regnault-Ranger, 2011).

La moitié des espèces vivantes décrites appartiennent à la classe des insectes (Schultz, 2002), ou au règne végétal qui est représenté par 240 000 espèces connues (Futuyama, 2000 ; ZAUGG et *al.*, 2012).

Ehrlich et Raven (1964) affirment que l'influence des insectes phytophages sur les végétaux serait au partie responsable de la formidable biodiversité terrestre.

Les plantes, pour lutter contre les espèces phytophages, ont développé au cours de leur évolution un arsenal de composés défensifs de nature diverses. Ces défenses peuvent être physiques par l'élaboration de structures perturbant la prise alimentaire pour les phytophages. Ainsi, les épines, les poils urticants ou la présence d'épais téguments sont fréquemment rencontrés chez un grand nombre de familles végétales. Ces défenses de nature physique et en particulier les épines sont souvent efficaces vis-à-vis des phytophages de grande taille tels que les vertébrés mais n'ont aucune efficacité sur les phytophages de taille moins importante tels que les insectes (Karban et Baldwin, 1997). En revanche, les défenses de nature chimique vont avoir de nombreux effets sur l'ensemble des phytophages quelles que soient leurs tailles.

Depuis de nombreuses années, la mise en évidence des substances de défenses chimiques et physiques dans les populations végétales par la sélection naturelle, sont le sujet d'un grand nombre d'études et de débats. Sachs (1873) cité par Hartmann (1996) un des pionniers de la physiologie végétale, a le premier rapporté l'existence de composés chimiques produits par les plantes. Errera (1886 ; 1904 cité par Hartmann, 1996) et Stahl (1888 ; cité par Rausher, 1992) ont ensuite proposé l'hypothèse que les composés des plantes pouvaient avoir un rôle de défense pour les plantes qui les produisaient. Finalement, le rôle fonctionnel de ces composés issus de métabolisme secondaire des plantes, fut ignoré jusqu'à ce que Fraenkel (1959) expose dans un article célèbre l'importance écologique ou « la raison d'être » du métabolisme secondaire des plantes dans le processus de défense contre les phytophage. L'idée que ces composés se sont développés et ont été maintenus au cours de l'évolution en raison de leur rôle définitif chez les végétaux vis-à-vis des phytophages à été reprise par un certain nombre d'auteurs (Ehrlich et Raven, 1964 ; Janzen, 1969 ; Felny, 1975 ; Rausher, 1987 ; Rhoades, 1983).

Dans ce contexte, il semble être certain que les caractères défensifs des plantes ont influencé l'évolution des insectes phytophages. En revanche, le fait que les insectes phytophages soient responsables de la mise en place des processus de défense chez les plantes est toujours sujet à controverse. Toutefois, de récentes expériences de terrain dans lesquelles les patterns de sélection des caractères défensifs des plantes ont été analysés en présence ou en absence d'ennemis naturels

des végétaux, montrent que ces organismes peuvent potentiellement provoquer l'évolution des systèmes de défense des plantes (Rausher, 1996 ; Mauricio et Rausher, 1997 ; Schonle et Bergelson, 200 ; Hawkes et Sullivan, 2001).

Les relations entre les végétaux et l'ensemble de leurs ennemis naturels (co-évolution diffuse, Futuyama, 1983) provoqueraient donc une évolution réciproque des différents protagonistes (Rausher, 2001).

II. Effets des composés secondaires des plantes sur les organismes et implication des systèmes de défense

Les composés secondaires des plantes sont des substances allélochimiques susceptibles d'agir comme des systèmes de défenses constitutives directes, permettant aux plantes de réduire les dégâts occasionnés par leurs ennemis naturels. Les structures chimiques de certains composés secondaires de plantes particulièrement toxiques ont été isolées et des études ont été menées pour rechercher leurs mécanismes d'action sur les organismes.

Enfin, d'une manière générale, la majorité des composés défensifs généraux vont agir sur le comportement d'un grand nombre d'insectes phytophages par des processus de répulsion ou d'anti appétence et vont ainsi limiter la colonisation de ces plantes par des insectes (Bernays et Chapman 1994). De ce fait les composés seraient semblent avoir un rôle particulièrement important de le processus de défense et permettent ainsi aux végétaux de minimiser d'une manière générale les dégâts occasionnés par leur ennemis naturels tels que les insectes phytophages.

III. Spécialisation et stratégies de résistances développées par les insectes face aux composés secondaires

Il Ya quelques années, près de 100 000 structures chimiques appartenant aux métabolismes secondaires des plantes étaient identifiées, chaque espèce végétale ayant un assemblage unique de composés secondaire (Hartmann, 1996). Ces composés sont généralement très semblables au sein d'une même famille végétale mais leurs proportions peuvent différer selon les espèces. Cette incroyable diversité de structures chimiques a conduit à l'adaptation et la spécialisation alimentaire des insectes phytophages sur des plantes généralement proches phylogénétiquement les

unes des autres, appartenant à une même famille, un même genre et possédant des composés secondaires de structures chimiques proches (Janzen, 1980).

Selon Bernays et Graham (1988), moins de 10% des espèces d'insectes phytophages se nourrissent aux dépens de plus de trois familles de plantes et plus de 80% se nourrissent sur une seule famille végétale (Van Loon et al, 200). Enfin, le mode de résistance le plus rencontré chez les insectes phytophages est de nature biochimiques, les molécules toxiques étant rendus inefficaces par des transformations enzymatiques nécessitant la mise en place de système de détoxification (Krieger et al, 1971 ; Brattsten, 1992).

IV. Systèmes de défense directe et indirecte induite par l'attaque des phytophages

Les plantes ont été amenées au cours de l'évolution à répondre activement à l'attaque d'un phytophage. Green et Ryan (1972) ont été les premiers à mettre en évidence ce phénomène en montrant que la contamination des familles de tomates *Lycopersicon esculentum* ou de pomme de terre *Solanum tuberosom* par les larves du *Doryphore leptinotarsa*, induit une rapide accumulation d'inhibiteurs de protéases dans la feuilles de la plante. Ces protéines permettent de retarder la croissance des phytophages qui en ingurgitent (Johnon et al , 1989 ; Royo et al, 1999) et de manière plus générale, d'améliorer la résistance de la plante vis-à-vis des ravageurs (Hilder et al, 1987 ; Orozco-cardenas et al, 1993). Ce système de résistance induite, démontré dans plus de 110 associations plantes-herbivores (Karban et Baldwin, 1997) est maintenu par la sélection naturelle car il permet aux plantes de minimiser les couts énergétiques liés aux défenses en absence de phytophages.

L'induction des systèmes de défenses est systémique chez de nombreux végétaux, c'est-à-dire que la production des substances défensives va augmenter non seulement au niveau de site d'attaque mais également dans toute la plante. Toutefois, l'intensité de l'augmentation des métabolites secondaires n'est pas toujours identique dans les différents tissus de la plante. En effet selon la théorie de l'optimal défense (Mckey, 1979 ; Rhoades, 1979 ; Zangerl et Bazzaz, 1992), la concentration des composés secondaires est plus forte au niveau des parties

importantes pour la plante et au niveau des zones présentant de fortes probabilités d'attaques (Benhamou et Ray, 2012).

Ainsi chez *Phaseolus vulgaris*, les concentrations sont plus importantes au niveau des graines. Ces mécanismes décrits peuvent être qualifié de système de défense induits directes.

CHAPITRE II
Synthèse des données sur
Le haricot commun
Phaseolus vulgaris (L.)

I. Origine et historique

L'origine américaine du haricot n'est plus contestée (Hopquin, 1994, Anonyme, 2005). Le pro géniteur de l'espèce *Phaseolus vulgaris* serait une forme de *Phaseolus aboriginus*, une liane tropicale (Hopquin, 1997), autogame, à gousses déhiscentes et à petites graines non dormantes.

Le haricot était déjà domestiqué au Pérou et au Mexique il y a environ 8000 ans (Hopquin, 1997, Kaplan et Lynch, 1999). Aussi, le premier calendrier renfermant les caractères identifiables en cours de sélection des plantes domestiques a été établi y a environ 10 000 ans (Gepts, 2014).

Sa domestication fournit un modèle expérimental intéressant pour l'étude de son évolution et l'existence de populations ancestrales (Rendon-Anaya et al., 2017, Larson et al., 2014).

Les espèces *Phaseolus* présentent un intérêt particulier en raison des multiples domestications qui ont eu lieu dans ce genre. En effet, parmi les 70 à 80 espèces sauvages décrites, pas moins de cinq espèces qui ont été domestiquées dans des contextes écogéographiques à savoir, *Phaseolus vulgaris* L. (Haricot commun) ; *Phaseolus lunatus* (haricot de lima), *Phaseolus coccineus* (haricot à rames) ; *Phaseolus acutifolius* A.Gray (haricot Tepary) et *Phaseolus dumosus* Macbrady (haricot year bean). Les deux premières espèces ont été domestiquées indépendamment au moins deux fois en Més-Amérique et dans les Andes.

Bien que l'origine du genre *Phaseolus* est établie dans le nouveau monde par des études phylogénétiques (Delgado-Salinas et al., 2006) l'origine géographique de *Phaseolus vulgaris* a été fortement débattu. Le premier lieu suggéré, le Péruvien (région équatorienne) en tant que centre d'origine car les accessions collectées là-bas ont une forme ancienne de la protéine de stockage des graines Phaseoline Kami et al., 1995 ; Kwak et Gepts, 2009).

Cependant, sur la base de l'analyse des locus, Bitocchi et ces collaborateurs (2012), ont proposé que le haricot commun soit originaire du Mexique puis a colonisé l'hémisphère sud, donnant naissance séparément aux populations

péruviennes-équatoriennes. Les français découvrent ce mode d'utilisation en Algérie (Hopquin, 1998).

Au cours des dix dernières années, la production mondiale de haricots secs a fluctué, mais la tendance est légèrement à la hausse. Pendant cette période, la production a varié d'un creux de 16 millions de tonnes (Mt) en 2002-2003 à un sommet de 19,2 Mt en 2005-2006.

II. Importance économique du haricot

II.1. Dans le monde

La production mondiale de haricots est estimée à 77,6 millions de tonnes (F.A.O, 2016).

En effet, cette dernière a augmenté de 31% entre 1990 et 2015. Ainsi pour Canada, La production des grandes familles de légumineuses (pois, lentilles, haricots et pois chiches) a augmenté d'environ de 586,6 milliers de tonnes au début des années 90 pour atteindre 5,8 millions de tonnes en 2015. La production s'est multipliée par plus de dix en 25 ans. Au Etats unis, la production du haricot sec est estimée à 55% et à 98% au Brésil.

Soixante-quinze pour cent de la production mondiale de haricots secs est attribuable aux dix principaux pays producteurs, soit l'Inde, le Brésil, les Etats-Unis, la Chine, Myanmar, le Mexique, l'Indonésie, l'Argentine, l'Ouganda et le Canada (Figure 2).

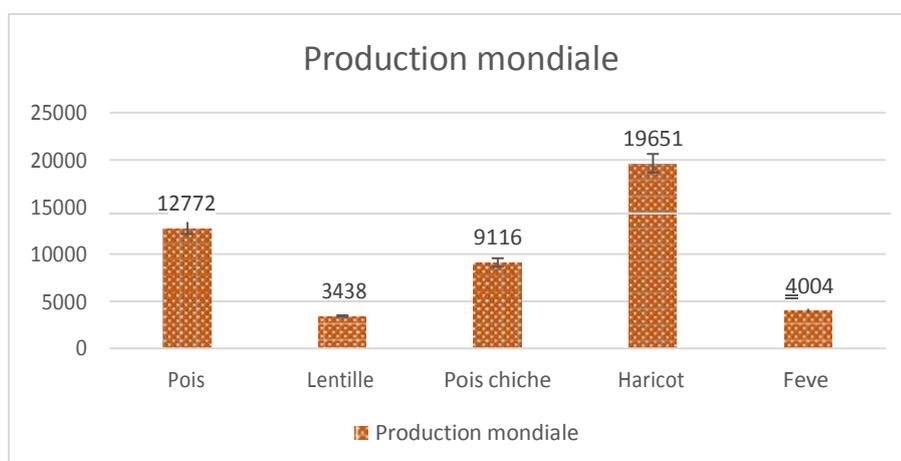


Figure 1: La production mondiale des légumineuses durant l'année 2015 (FAO, 2016).

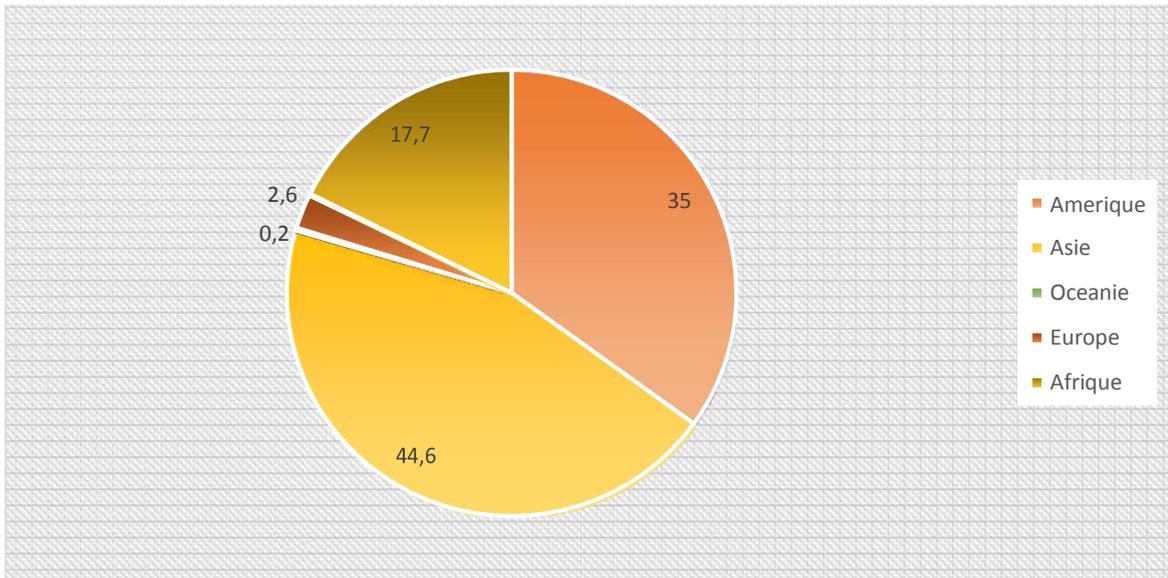


Figure 2: La production mondiale des haricots secs durant l'année 2015 (FAO, 2016).

Le haricot sec constitue aussi est une denrée régulièrement consommée en Afrique avec les plus fortes consommations enregistrées au niveau de l'Afrique de l'Est. En Algérie 57g/personne/jour de haricots secs ont été consommés en 2014 et 58 g/personne/jour en 2016. Il est important de souligner que l'Asie est la plus grande consommatrice de haricot sec avec un taux de 71 g/personne/ jour, contre 69 g/personne/ jour en Afrique selon les données de la FAO (2016).

II.2. En Algérie

Au cours de la dernière décennie, La production algérienne du haricot est concentrée au niveau des hauts plateaux. Cette première a connu beaucoup de fluctuations malgré les programmes subventionnés par l'Etat. En effet, on enregistre une hausse prononcée en 2009, atteignant 11588 qx par rapport à l'année 2006 où on a enregistré une production de 9145qx. Cette production a connu un sommet au cours de l'année 2015 avec une production de 12473qx (Figure 3)

Le rendement a considérablement augmenté atteignant ainsi 7,2 qx / ha sont enregistrés en 2009 en raison d'une augmentation de la superficie ensemencée (Fig). Par la suite, ce rendement a connu des fluctuations entre 2010 et 2012 pour se stabiliser en 2013 avec 7,3qx/ha et atteindre son maximum 7,7qx/ha. « MAP : Ministère de l'agriculture et de la pêche, 2016 ».

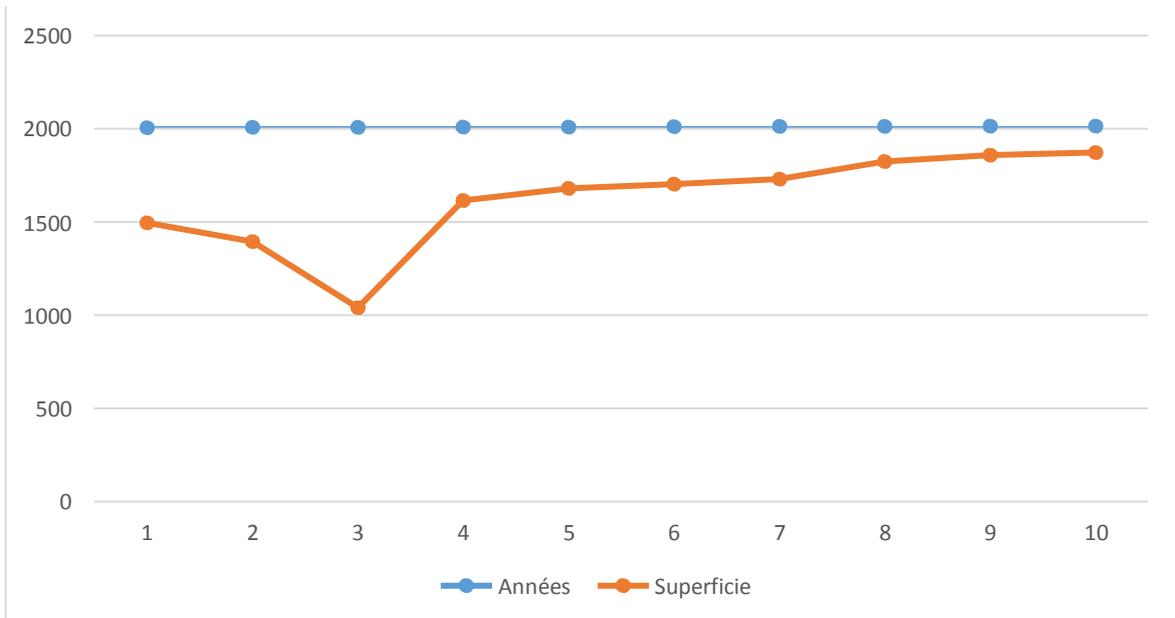


Figure 3: Evolution des superficies de la culture de haricot en Algérie entre 2006 et 2015MAP (2016).

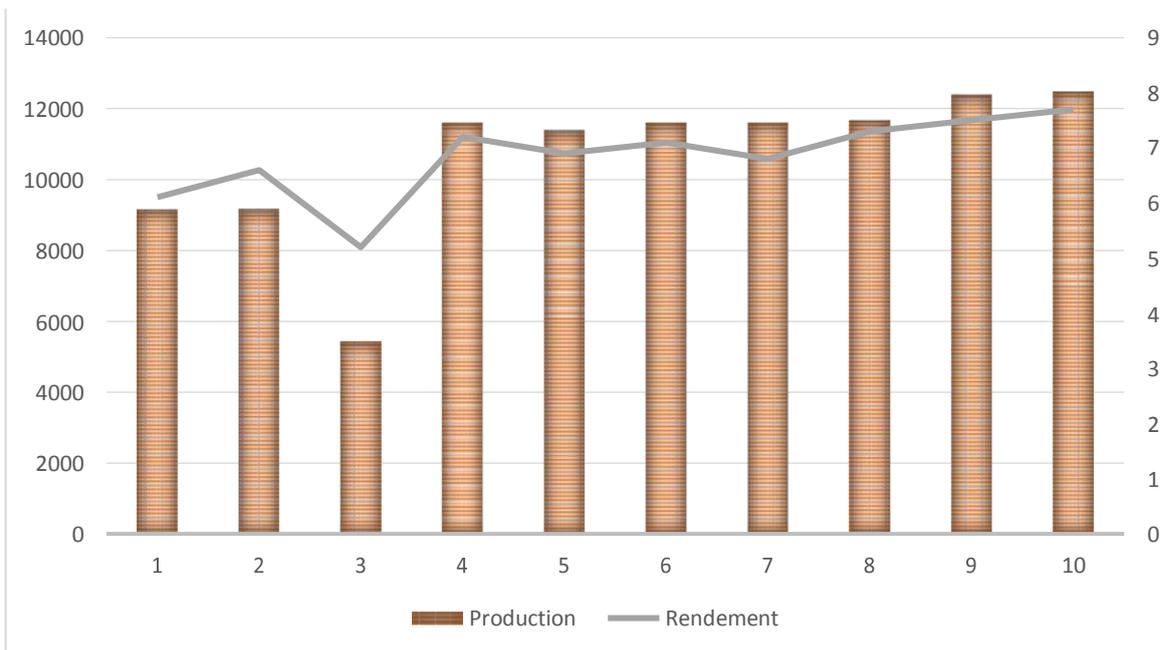


Figure 4: Evolution de la production et des rendements de la culture de haricot en Algérie entre 2006 et 2015 (MAP, 2016).

III. Variabilité génétique

Le haricot commun *P. vulgaris* L. est une légumineuse appartenant à la tribu des *Phaseolae* comme *Vigna* ou *Glycine*.

Deboucq (1988), recense 56 espèces dans le genre *Phaseolus*. Dans toute la tribu, le nombre chromosomique est de $2n = 22$, sauf une espèce à $2n = 20$ (Hopquin, 1997, Pan durangan et al., 2016).

Chez *Phaseolus vulgaris*, la variabilité génétique est extrêmement importante. Elle se caractérise par le port des plantes, la forme, la taille, la couleur des graines, des fleurs et des gousses et bien d'autres traits morphologiques ou physiologiques.

IV. Composition biochimique globale des graines de haricot

Le haricot est la légumineuse que l'on trouve le plus dans les régimes alimentaires à travers le monde. Il fournit des protéines, des glucides complexes, et de micronutriments précieux pour plus de 4% de la population globale. Dans de nombreuses régions du monde, le haricot commun est la deuxième plus importante source de calories après le maïs (FAO, 2016).

Soltner (1990), estime que les protéines végétales coûtent deux fois moins chères que les protéines animales.

De ce fait, ce sont les légumineuses qui sont les plus prometteuses pour produire l'immense complément de protéines végétales dont le monde a besoin dans le futur immédiat (Labeyrie, 2005).

La composition biochimique globale des graines de haricot (Tab. 1) montre que cette légumineuse constitue une excellente source de protéines alimentaires (20 – 30 %) ; en plus d'être riche en fibres et en glucides complexes pour les pays en développement.

Tableau 1: Composition biochimique (g/100g de graines) et valeur énergétique (Calories / 100g) des graines de *Phaseolus vulgaris* (Iserin, 1997).

<i>Légumineuses</i>	Protéines	<i>Matière</i>					
		<i>lipides</i>	<i>glucides</i>	<i>fibres</i>	<i>minérale</i>	<i>eau</i>	<i>calorie</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	20-27	1-2	60-65	4-5	4-5	11	341

Compte tenu de la teneur protéique et de la qualité des protéines des haricots. Ces derniers peuvent servir d'allongeur ou de substituts pour la viande.

IV.2. Composition en acides aminés indispensables

En plus de leur forte teneur en protéines, les graines de haricot renferment les 24 acides aminés indispensables à l'alimentation humaine (Tab.2). Ceci rend les légumineuses indispensables pour équilibrer l'alimentation céréalière (Appert, 1992 ; Mourey, 2004).

Tableau 2: Composition (mg/g) en acides aminés essentiels des protéines de haricot (Hojjati, 1976).

<i>Acides aminés</i>	<i>Arg</i>	<i>Cys</i>	<i>Iso</i>	<i>Leu</i>	<i>Lys</i>	<i>Met</i>	<i>Phe</i>	<i>Thr</i>	<i>Try</i>	<i>Val</i>
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,0	1,9	4,2	7,6	7,2	0,0	7,7	4,0	0,5	4,6

L'ensemble des valeurs résumées dans le tableau ci-dessus, montrent que le haricot commun *Phaseolus vulgaris* est riche en Phe, Leu et en Lys avec des valeurs respectives de 7,7 ; 7,6 et 7,2 mg/ g . Aussi, on remarque l'absence de la méthionine et de l'arginine

IV.3. Principales protéines de réserve de la graine de *Phaseolus vulgaris*

Les plantes ont su au cours de leur évolution s'équiper de tout un arsenal leur permettant de se défendre contre les pathogènes environnants. En cas de stress d'ordre physique, chimique ou biologique ; les plantes synthétisent un certain nombre de protéines au niveau du péricarpe regroupées sous le nom générique de « Pathogenesis- Related » ou PR. (Catala, 1998 ; Goossens & al., 2000 ; Singh, 2001; Rougé & al., 2004).

Plusieurs auteurs soulignent que les protéines de défense typiques aux graines de haricot commun *Phaseolus vulgaris* sont essentiellement représentées par : phytohemagglutinine, la phaseoline, les arcélines (Hamelryck et al., 1996 ; Lioi et al., 2003) et les alpha amylases inhibiteurs (Rougé et al., 2004).

IV.3.1. La phaséoline

La phaseoline est une globuline de stockage et constitue la fraction protéique la plus importante du haricot. Cette fraction correspond à la protéine majeur 7S par son coefficient de sédimentation (Rougé et al., 2004).

Cette protéine est à chaîne unique, dépourvue de ponts disulfure (Mosse et Pernollet, 1982 ; Rougé et al., 2004).

Par ailleurs, l'agrégation des phaséolines forme des trimères de sous unités dont la masse moléculaire varie entre 45 et 53 daltons (Shewry et al., 1995). Ces trimères peuvent être identiques ou non, plus ou moins modifiés par des protéolyses post- traductionnelles et/ ou des glycosylations (Crevieu, 1999).

La phaséoline est codée par un grand nombre de gènes (Shewry et al., 1995).

IV.3.2. Les phytohemagglutinines :

La phytohemagglutinine est la première protéine pour laquelle on a attribué des propriétés insecticides (Rougé et al. 2004).

Cette leuco agglutinine des graines de *Phaseolus vulgaris* (Hamelryck et al., 1996) se lie aux glycanes de la muqueuse intestinale des mammifères et agit comme un mitogène (Higgins et al., 1998). Cette protéine comprend deux formes différentes

a. Les vraies lectines

Les lectines de défense sont des antinutritionnels de nature protéique propres aux graines de légumineuses, en l'occurrence celles du haricot commun. Ces lectines sont élaborées au cours de la germination (Prabu et *al.*, 1998) et jouent un rôle important dans la protection des graines contre les ravageurs, en contribution avec les lectines tronquées (Stamopoulos et Huignard, 1980).

Selon Kigel, (1999), cette protéine entomotoxique représente 10% de la teneur en protéines. Elle semble être fortement liée aux membranes des corps protéiques (Pusztai et *al.*, 1979).

Cette lectine a la faculté de se fixer sur la muqueuse intestinale de nombreuses espèces et empêche ainsi le développement normal des microvillosités. Il s'en suit des difficultés d'absorption des nutriments qui se traduisent par une perte de poids, un retard de croissance et de développement (Grant, 1991, Pandurangan et *al.*, 2016).

- **Phytohemagglutinine – L** : La phytohemagglutinine –L est une lectine leuco agglutinine propre aux graines de *Phaseolus vulgaris* L. dont le poids moléculaire est de 34.000 Da. (Hamelryck et *al.*, 1996).
- **Phytohemagglutinine- E** : La phytohemagglutinine comme son nom l'indique, est une lectine de poids moléculaire de 36.000 Da pouvant agglutiner les érythrocytes du sang (Loris, 1999).

b. Les lectines tronquées

Dans les formes tronquées s de phytohemagglutinine, nous retrouvons l'arcéline et l'inhibiteur de l'alpha amylase ou respectivement, une et deux boucles jouant un rôle obligatoire dans la liaison des sucres sont absentes.

- **Inhibiteur d'alpha amylase** : Les polypeptides de l'inhibiteur de l'alpha amylase sont constitués de 244 acides aminés. Ces derniers sont identiques à 43 % aux lectines du haricot nain et à 55 % à l'arcéline du haricot sauvage (Lee et *al.*, 2002).

Selon Wato et *al.* (2000), il existe deux types d'inhibiteurs d'alpha amylase, le premier est un complexe tetramérique formé de deux sous unités α et β appelé inhibiteur alpha amylase à chaleur stable ' α AI-s' alors que le second est constitué de trois sous unités α , β et λ appelé inhibiteur alpha amylase à chaleur labile ' α AI-u'. Ce dernier correspond à une sous unité de la protéine arcéline.

Chez *Phaseolus vulgaris*, ces inhibiteurs de l'alpha amylase empêchent le développement des larves de *Callosobruchus maculatus* F. (Shih- chieh et *al.*, 2002 ; Santimone et *al.*, 2004).

- **Arceline** : des comparaisons de séquences de plusieurs légumineuses montrent que les arcélines du haricot commun appartiennent à la famille des protéines « type lectine » qui comporte les deux types de sous unités des phytohémagglutinines PHA- L et PHA- E et les inhibiteurs d'alpha amylases (Chrispeels et Raikhel, 1991).

Les arcelines sont des protéines de réserve assez abondantes au niveau des génotypes de *Phaseolus vulgaris* L. (Zambre et *al.*, 2005). Ce sont des isolectines caractérisées par une faible propriété agglutinante (Hamelryck et *al.*, 1996). En revanche, leur stabilité biochimique est élevée (Goossens et *al.*, 2000).

L'arcéline présente une forme intermédiaire de l'inhibiteur alpha amylase (Sparvoli et *al.*, 2001). Auparavant, ces glycoprotéines étaient considérées comme des protéines typiques aux variétés sauvages du haricot.

Actuellement, il s'est avéré que ces protéines sont présentes au niveau de plusieurs variétés du genre *Phaseolus* (Mirkov et *al.*, 1994) et constituent des formes tronquées de phytohemagglutinines (Loris, 1999 ; Shih- chieh et *al.*, 2002).

Smartt (1970), a cité plusieurs exemples de croisements interspécifiques dans le genre *Phaseolus*. Les croisements interspécifiques entre *P. vulgaris* et les autres espèces sont difficiles à réaliser et n'ont été que peu utilisées en sélection (Higgins et *al.*, 1998).

IV. Intérêt médical

Des recherches médicales montrent que les haricots secs offrent des aliments riches en éléments nutritifs. En effet, une portion de 1/3 de tasse de haricots secs cuits fournit environ 80 calories et beaucoup de glucides complexes ; les haricots offrent toutefois une valeur d'indice glycémique faible. Autrement dit, les glucides des haricots ne provoquent pas une augmentation aussi rapide du taux de sucre dans le sang que plusieurs autres aliments riches en glucides.

Les haricots sont également une bonne source de vitamines B, y compris l'acide folique. Les haricots fournissent aussi les minéraux suivants : le fer, le potassium, le sélénium, le magnésium et même un peu de calcium. Les haricots secs sont aussi de bonnes sources de fibres insolubles, ce qui favorise la santé de l'appareil digestif et soulage la constipation. Les haricots fournissent également des fibres solubles, ce qui peut contribuer à réduire le niveau de lipides dans le sang.

Les haricots ne contiennent que de très peu de gras et pas de cholestérol du tout. Cependant, les haricots insuffisamment cuits sont toxiques pour l'homme du à la présence de certains facteurs antinutritionnels (Loris, 1999).

*CHAPITRE III : La protéine de
défense des graines des
légumineuses entreposées*
ARCELINE

I. Introduction

Les graines stockées, particulièrement celles des légumineuses comprennent de multiples protéines de stockage métaboliquement inactives.

Ces substances protéiques à effets insecticides, sont toxiques envers les bruches appartenant à l'ordre des coléoptères qui occasionnent des dommages irréversibles au niveau des denrées entreposées.

Le haricot commun présente une grande résistance face aux attaques des bruchidae (Goossens et *al.*, 2000 , Osborn et *al.*1988, Mourey et *al.*, 1998). Cette haute resistance est conférée par la présence de multiples protéines de défense en l'occurrence l'Arceline.

Selon Higgins et *al.*1998, l'Arceline présente la troisième fraction importante des protéines formants les graines en plus de la phaseoline et la phytohemagglutinine.

II. Aperçu général sur les arcelines

Les protéines de stockage sont des globulines insolubles dans l'eau et sont présentes dans les grains de légumineuses (Chewry et *al.*1995). Les grains de haricot contiennent en plus de phytohemagglutinine et des alpha amylases inhibiteurs, des isolectines telle que, l'Arceline, une protéine de défense (Hamelryck et *al.* ,1996, Romero andreas et *al.*,1986 ; Hart week et *al.*, 1991 ;Goossens et *al.*, 1994).

Les Arcélines sont des protéines propres aux graines de *Phaseolus vulgaris* (Goossens et *al.*, 2000) qui représentent jusqu'à 50% des protéines totales des graines dans certaines variétés sauvages. Aussi, en plus de leur fonction de stockage, elles sont reconnues comme des agents de protection pour les semences, en l'occurrence contre les infestations d'insectes ravageurs des denrées stockées (Chrispeels et *al.*, 1991).

Ces arcélines sont caractérisées par de faible propriété agglutinante (Hamelryck et *al.*, 1996). En revanche, une stabilité biochimique élevée est démontrée (Goossens et *al.*2000).

Auparavant, ces glycoprotéines étaient considérées comme des protéines typiques aux variétés sauvages du haricot. Actuellement, il s'est avéré que ces protéines sont présentes au niveau de plusieurs espèces de *Phaseolus* (Mirkov et al., 1994) seulement abondantes au niveau des variétés sauvage de haricot (Sparvoli et al., 1998).

Les Arcélines sont des formes tronquées de phytohemagglutinine (Remy loris, 1999). En effet, à leur niveau, la boucle obligatoire pour l'attache des ions en métal est supprimée (Mourey et al., 1998 ;Hamelryck et al. 1996).

En effet, contrairement aux arcélines, les léctines de légumineuses peuvent être subdivisées en cinq groupes selon la spécificité du récepteur de saccharide représenté par Glc / Man specific, Gal / Gal Nac specific, Fuc specific, Glu Nac specific ou encore une spécificité complexe ne liant aucun monosaccharide.

Au niveau du récepteur de monosaccharide, quatre régions bien distinctes sont toujours impliquées dans l'attache du monosaccharide (figure 5) :

- ❖ Le lien cis peptide aile du nez – Asp. (Bleu).
- ❖ La boucle de spécificité (rouge)
- ❖ La boucle obligatoire en métal (jaune).
- ❖ une grande boucle oméga (orange).

Chez les léctines, La boucle obligatoire en métal comprend deux résidus conservés « un résidu hydrophobe et un résidu d'Asn. ». Cette dernière est absente au niveau de la structure des arcélines.

Par conséquent, ces protéines de défense ne lient pas les sucres simples (Remy loris, 1999) mais on relève la présence de chaînes complexes d'oligosaccharides au niveau du N-Terminal liant les glycanes (Young et al., 1999).

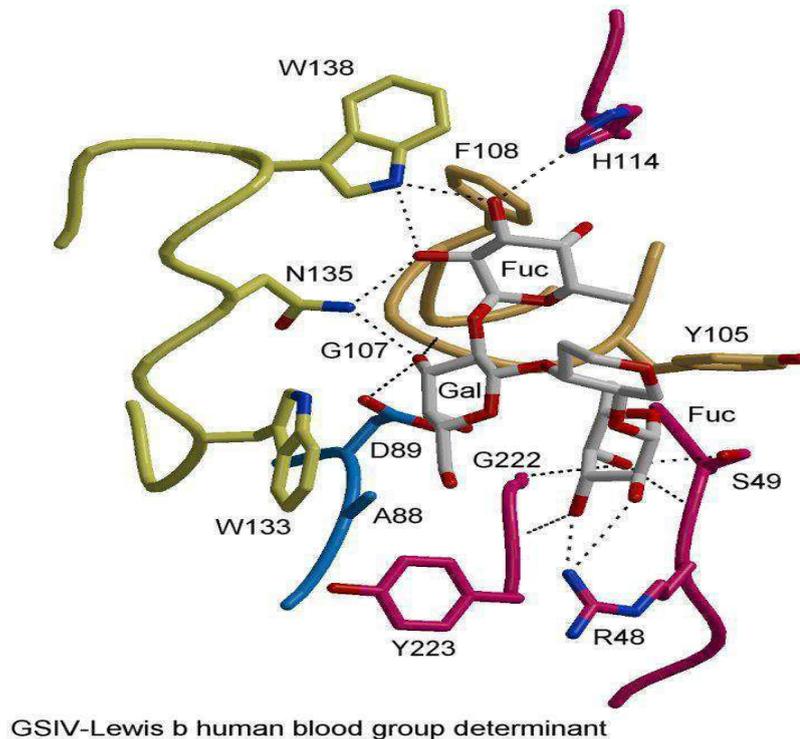


Figure 5: les différents types de boucles au niveau des lécitines.

Jaune : Boucle obligatoire en métal .Bleu : Lien cis peptide .Orange : Boucle oméga .Rouge : Boucle de spécificité par rapport au sucre lié.

Selon plusieurs auteurs, le mécanisme de la toxicité des arcélines envers les insectes reste inconnu. Osborne et ses associés (1988) et Louis (2004), les estiment toxiques alors que Minney et ses collaborateurs (1990) les considèrent comme inhibiteurs de la digestion, ce qui entraînerait la mort des larves de *C. maculatus* par inanition. Toutefois, les propriétés insecticides des arcélines pourraient être liées à leur interaction avec les glycoprotéines ou autres composants du tube digestif (Cordeiro et *al.*, 2000).

Jusqu'ici sept variantes alléliques ont été identifiées (Osborn et *al.*, 1986 ; Lioi et Bollini , 1989 ; Santino et *al.*,1991 ; Acostagallegos et *al.*, 1998). Les masses moléculaires de ces dernières varient de 30 à 45 KD (Acostagallegos et *al.*, 1998). Parmi ces sept variantes, six ont été décrites et seulement quatre entre eux ont été déterminées (Rendon- Anaya et *al.*2017).

Les variantes arceline1 et arceline5 semblent être les plus prometteuses pour fournir la résistance contre les bruches (Cardona et *al.*, 1990, Kornegay et *al.*, 1993,

Remy Loris, 1999b, Goossens et *al.*, 1994) . Les niveaux de résistances sont maintenus dans les lignées issues des croisements avec les parents Arceline1 ou Arceline5 (Maliyakal et *al.*, 1990 et Rendon- Anaya et *al.*2017).

Toutefois, Les membres de cette famille ont une structure tertiaire semblable, mais leurs propriétés biologiques, leur structure quaternaire et leur spécificité sont différentes. Elles existent sous forme de dimères 'Arc 2', tétramère 'Arc3 et 4'. les deux 'Arc1'. Arc5 se présentent sous forme de dimère en solution et de monomère en cristal.

III. Présentation des variantes arcelines

La plupart des cultivars de Haricot commun *Phaseolus vulgaris* contiennent deux protéines majoritaires au niveau des graines stockées, la phaséoline et la phytohemagglutinine PHA. Les variantes électrophorétiques de la phaséoline sont représentées par des masses moléculaires allant de 47 à 51 KDa (Brown et *al.*, 1981a) alors que les variantes de PHA qui existent sous deux formes à savoir PHA L. et PHA E., présentent des polypeptides dont le poids moléculaire varie entre 33 et 41 KDa (Brown et *al.*, 1981).

Parallèlement, au niveau des variétés sauvages de haricot commun *Phaseolus vulgaris*, une troisième fraction de protéine de stockage est retrouvée au niveau des graines entreposée. Cette fraction est l'arcéline (Romero Andreas et *al.*, 1986). Elle est représentée par sept variantes alléliques présentant différents niveaux de mobilité électrophorétiques par rapport à la phaseoline et à la PHA.

Les PHA sont reconnues pour leur propriétés d'agglutiner les cellules sanguines et à se lier aux carbohydrates au niveau de l'épithélium intestinal des insectes tandis que les arcélines sont difficilement digestibles et peuvent provoquer une altération de la structure intestinale des insectes (Minney et *al.*, 1990 ; Gerhardt et *al.*, 2000 ; Paes et *al.*,2000 ; Karbache, 2009 ; Karbache et al ., 2011 ; Gerhard et *al.*,2000 ; Goorsens, 2000).

Ces protéines colectines sont codées par un seul locus, c'est le APA (Arcéline / PHA/Amylase inibiteur) chez *Phaseolus vulgaris* L (Gepts, 1999).

Ainsi, les différences de fonctionnalité entre les membres de l'APA sont principalement dérivés des variations de séquences qui provoquent des changements structuraux par l'élimination d'une, de deux ou trois boucles dans la structure tertiaire de la protéine (Sakthivelkumar et al., 2014).

Arceline1 est une glycoprotéine des haricots nains *Phaseolus vulgaris*. Cette lectine ne lie pas les monosaccharides et appartient à la famille des phytohemagglutinine PHA (Mourey et al., 1998, Kolandaivel et al., 2005). Elle joue un rôle important dans l'identification moléculaire grâce à son interaction avec les glycoprotéines ou les glycolipides membranaires des cellules (Rimi, 1995). Ses interactions spécifiques sont conférées par la présence d'un emplacement oligosaccharide sur cette protéine (Fabre et al., 1998).

Par ailleurs, La structure globale de l'Arceline1 déterminée au rayon X à une résolution de 1,9Å et un facteur cristallographique R de 0,208 est résolue à partir des isomorphes (Mourey et al., 1998).

L'étude cristalline et l'analyse au rayon X d'Arceline1 sont décrites par Mourey et al., 1998 ; Fabre et al., 1998). Sa structure tridimensionnelle montre qu'arcéline1 est formée de dimères qui correspondent à l'état fonctionnel de la protéine en solution.

Selon Kabsh et Sander (1983), 130 résidus contribuent à la formation de deux principales feuilles et un B mineur formé de deux rives qui sont respectivement représentés par S3 et S4. Ce B mineur est inséré entre les deux rives S2 et S5 de la feuille avant afin de stabiliser la partie incurvée de la rive S15 de la feuille arrière (kabsh et Sander, 1983).

Par conséquent, en dépit des structures tertiaires semblables, les protéines appartenant à la famille des phytohemagglutinine PHA montrent de différentes structures quaternaires. Ceci représente un facteur fondamental influençant leurs propriétés biochimiques (Mourey et al. 1998). Chaque monomère d'Arceline1 comprend 10% d'hydrate de carbone et montre trois emplacements glycosylés au niveau des résidus Asn12, Asn 68 et Asn 107.

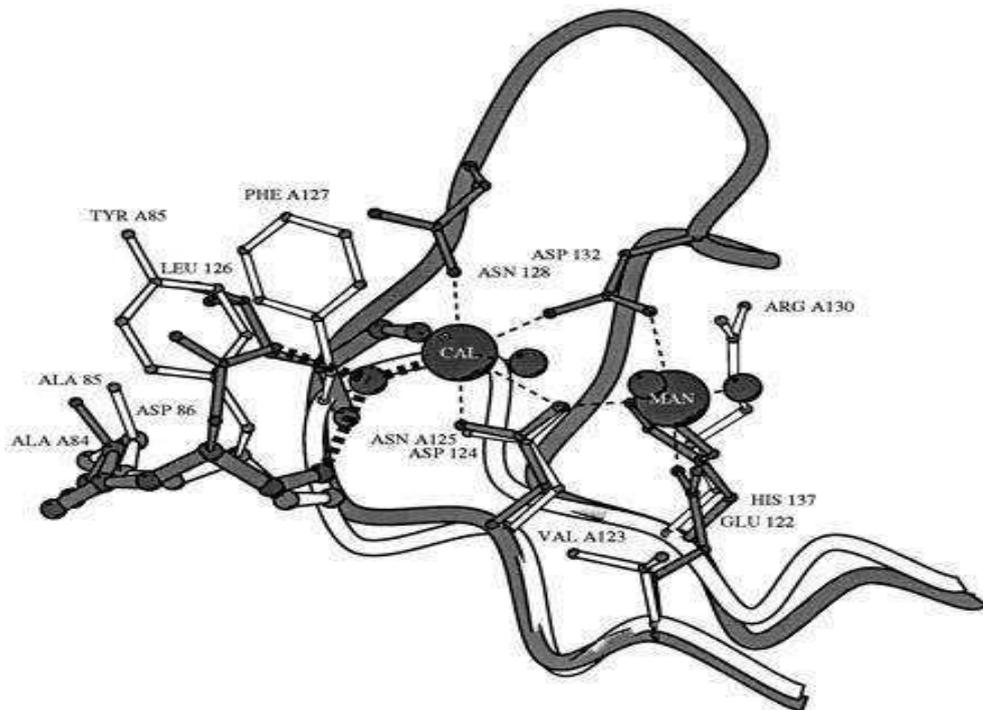


Figure 6: Attachement des métaux pour la stabilité structurale de PHA et d'arcéline

Les résidus Asn12 lie un disaccharide formé de deux molécules de glycane dont le symbole biochimique est 2(GlcNac). Pour les deux autres emplacements, on observe le GlcNac du noyau.

Les deux glycanes attachés à Asn12 contribuent à la stabilité du dimère grâce aux atomes d'hydrogènes et les molécules d'eau liées aux résidus 53, 55, 194 et 195 du monomère (Mourey et *al.*, 1998).

Arcelin1 diffère des lectines par la substitution et /ou la suppression d'un acide aminé essentiel impliqué dans l'identification moléculaire (Fabre et *al.*, 1998). Selon Mourey et ces collaborateurs (1998), l'arceline1 diffère des autres lectines par :

- La suppression des deux résidus Asn 125 et Asp129 qui lient les monosaccharides.
- Les deux résidus Glu119 et His136 sont respectivement substitués par Val 121 et Arg 128.
- L'absence des ions en métal Mn^{++} et Ca^{++} qui maintiennent le lien Cis peptide.

Par ailleurs, malgré l'absence des ions en métal, le lien Cis peptide est présent entre les résidus Ala 82 et Tyr 83. Ce lien est maintenu par les liaisons entre l'atome d'azote du résidu Tyr 83 et l'atome d'oxygène du résidu Ala84 ainsi que l'atome d'azote du résidu Gly205 (Miaoli et *al.*, 2017).

Une troisième interaction est observée entre le groupe phénolique du résidu Tyr 83 et le groupe hydroxyle du résidu Ser206 (Hamelryck et *al.*, 1996 ; John et Long, 1990).

La variante arceline5 est une protéine de défense rencontrée dans les grains de certaines variétés sauvages de haricot (Goossens et *al.*, 1999). Cette substance entomotoxique appartient à la classe des lectines de légumineuses (Hamelryck et *al.*, 1996) et représente 30% à 40% de la teneur totale en protéine de la graine (Goossens et *al.*, 1994). L'activité insecticide de la variante arceline5 a été profondément étudiée sur le génotype *Phaseolus vulgaris* et par conséquent sa résistance est démontrée face aux attaques des bruches (Goossens et *al.*, 1994).

La structure cristalline de la protéine arceline5 obtenue à une résolution de 2,7Å en utilisant un facteur de raffinage R de 20,6% et un facteur libre R de 27,1% montre que cette variante se cristallise comme monomère (Hamelryck et *al.*, 1996).

La première structure cristalline obtenue était celle d'Arceline5 (Hamelryck et *al.*, 1996). Au rayon X, sa structure ne montre pas la présence d'un résidu inséré dans la boucle 10 -15. Ceci implique que cette protéine de défense se cristallise en monomère et en oligomère (Fuenet et *al.*, 2012).

Les deux monomères d'arceline5 sont pratiquement identiques, exception faite pour la région entre Val36 et Pro42 (Hamelryck et *al.*, 1996). L'obtention d'arceline5 en dimère est possible à condition d'utiliser des fractions de protéine rceline5 non lyophilisée (Goossens et *al.*, 1994).

L'identité entre Arceline5 et PHA est haute et avoisine les 55% (Peitsch, 1996). La structure tridimensionnelle de la variante arceline5 comprend 228 des 240 acides aminés de la protéine mûre (Hamelryck et *al.*, 1996). Cette structure est semblable à celle obtenue chez les lectines de légumineuses (Sakthivelkumar et *al.*, 2014).

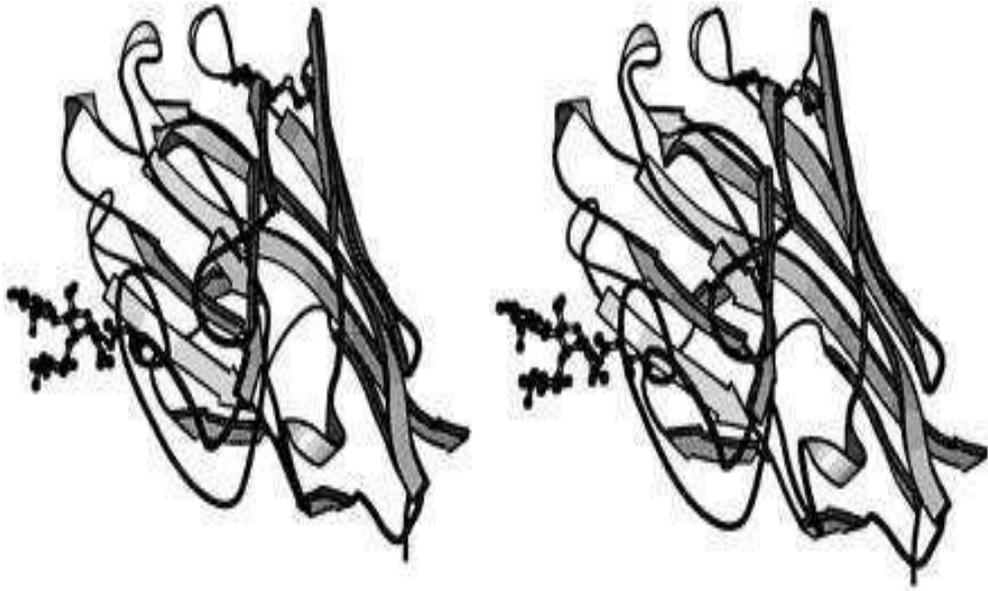


Figure 7: Structure quaternaire de l'arcéline1 et 5.

Le monomère d'Arceline5 contient un pont bisulfure entre les deux résidus 146 et 182. Ces derniers (Hamelryck et *al.*, 1996, Pandurangan et *al.*, 2016).

La structure quaternaire montre que les monomères ou multimères d'arceline5 obtenus après cristallisation (Hamelryck et *al.*, 1996) se compose d'un mélange de deux fractions principales de protéine, nommées Arc5a avec une masse moléculaire de 32,2 kda et Arc5b dont la masse moléculaire est de 31,5 kda et une troisième fraction mineure nommée Arc5c avec une masse moléculaire de 30,8 kda (Goossens et *al.*, 1994 ; Sparvoli et Ballini, 1998).

La spectrométrie de masse montre qu'arceline5 présente de différents degrés de glycosylation. En effet,

- Arc5a contient deux glycanes.
- Arc5b comprend un seul glycane
- Arc5c n'est pas glycosylé

La présence des emplacements de glycosylations sont directement responsables de l'oligomérisation et la glycosylation des protéines arceline5. Ceci n'exclut pas la possibilité de formation de dimères.

Les trois polypeptides d'arceline5 étroitement liés (Goossens et *al.*, 1999) montrent un pont isoélectrique similaire et sont identiques pour leurs neuf premiers acides aminés (Goossens et *al.*, 1994 ; Blair et *al.*, 2010 ; Sundaram et *al.*, 2012).

L'analyse basée sur les ordres d'acides aminés et les techniques PCR, montrent que la protéine de défense arceline5 est codée par deux ordres différents d'ADN, Arc5I et Arc5II. Ces derniers codent des protéines de 261 acides aminés avec un peptide initial de 21 acides aminés (Goossens et *al.*, 1994). Les masses moléculaires respectives d'Arc5I et d'Arc5II sont de 26,8Kda et 27Kda (Hamelryck et *al.*, 1996 ; Sparoli et *al.*, 2003).

L'identité entre Arc5I et Arc5II est de 99% au niveau d'ADN et 97% au niveau des ordres d'acides aminés (Goossens et *al.*, 1994). En effet, on note une différence de huit acides aminés au niveau du N-Terminal de la chaîne (Hamelryck et *al.*, 1996 ; Shudong et *al.*, 2015).

Dans Arc5a, sept résidus sont coupés de leur C-terminal (Young et *al.*, 1999). Ces deux gènes Arc5I et Arc5II codent respectivement les deux peptides Arc5a et Arc5b (Gerhardt et *al.*, 2000 ; Goossens et *al.*, 1994).

Selon Sparvoli et Bollini (1998), le séquençage d'ADNc rapporté pour arceline1 et arceline2 présente respectivement des masses moléculaires majeures de 37 et de 35KDa sous forme de dimères. L'arceline 1 peut présenter une forme mineure tétraédrique (Hartweck et *al.*, 1991). Les séquences d'acides aminés de leur clones d'ADNc sont identiques à 98,5% (Goossens et *al.*, 1994).

Par ailleurs, l'arceline 3 et 4 sont des tétramères dont la masse moléculaire varie de 40 à 45KDa pour arceline3 et comprise entre 40 et 45KDa pour l'arceline4 (Hartweck, 1991 ; Osborn et *al.*, 1985 ; Osborn et *al.*, 1986).

L'arceline 6 est trouvée étroitement liée à l'arceline1 et 2 en comparant le N-Terminal de la séquence d'acide aminé, la masse moléculaire et le niveau de l'oligomérisation de ses sous unités (Santino et *al.*, 1991). Aussi, le séquençage du

clone d'ADNc codant pour arceline6 démontre qu'elle est assez proche et homologue à l'arceline1 et l'arceline2. Ces résultats sont confirmés par l'analyse immunochimique qui montre que le polypeptide de l'arceline6 présente une masse moléculaire intermédiaire entre arceline 1 et arceline2 (Ngamo et Hance., 2007).

Tableau 3: Pourcentage de similarité au niveau des AA des arcélines clonées

	Arc2	Arc6	Arc4	Arc5I	Arc5II
Arc1	98,49	97,73	74,43	75,59	75,1
Arc2		97,74	75,19	7,51	74,71
Arc6			74,14	74,32	73,93
Arc4				76,06	74,23
Arc5I					97,7

L'alignement multiple des différentes variantes alléliques est représenté dans la figure 8. (Osborn *et al.*, 1988, John et Long, 1990, Goossens *et al.*, 1994, Mirkov *et al.*, 1995).

Le dendrogramme du Cluster obtenu à partir de l'alignement multiple des arcélines dont leur séquençage est connu indique la présence de trois classes de gènes (Sparvoli *et al.*, 1998). La première classe est représentée par arceline 1,2 et 6. Ensuite la deuxième classe regroupant arceline 3 et 4 et en fin la troisième classe l'arceline5.

La séquence du gène montre que les polypeptides de l'arceline1 et l'arceline2 sont hautement homologues (John et Long, 1990 ; Osborn *et al.*, 1988). Les séquences diffèrent dans le nombre de sites de glycosylation qui sont représentés par le tri peptide Asn-Xaa-Thr /Ser. Arceline1 possède trois de ces sites alors qu'arceline 2 seulement deux. De ce fait, la différence dans les masses moléculaires des deux polypeptides est due au degré de glycosylation. Aussi, la

masse moléculaire intermédiaire de l'arceline6 comparée avec arceline1 et 2 pourrait être due à une teneur différente en sucres ou à une séquence différente d'acides aminés (Kusolwa et Myers, 2011 ; Sakthivelkumar et *al.*, 2014).

Selon Sparvoli et Bollini (1998), la séquence d'acide aminé de l'arceline6 est hautement homologue à celle de arceline1 et 2 et les trois protéines (arcelines1,2 et6) contiennent 244 AA sans tenir compte du peptide signal. Arceline6 possède deux sites potentiels de glycosylation Asn12 et Asn68. Ces deux sites sont conservés chez arceline 1 et 2. Le troisième site de glycosylation d'arceline1 est absent chez arceline 2 et 6.

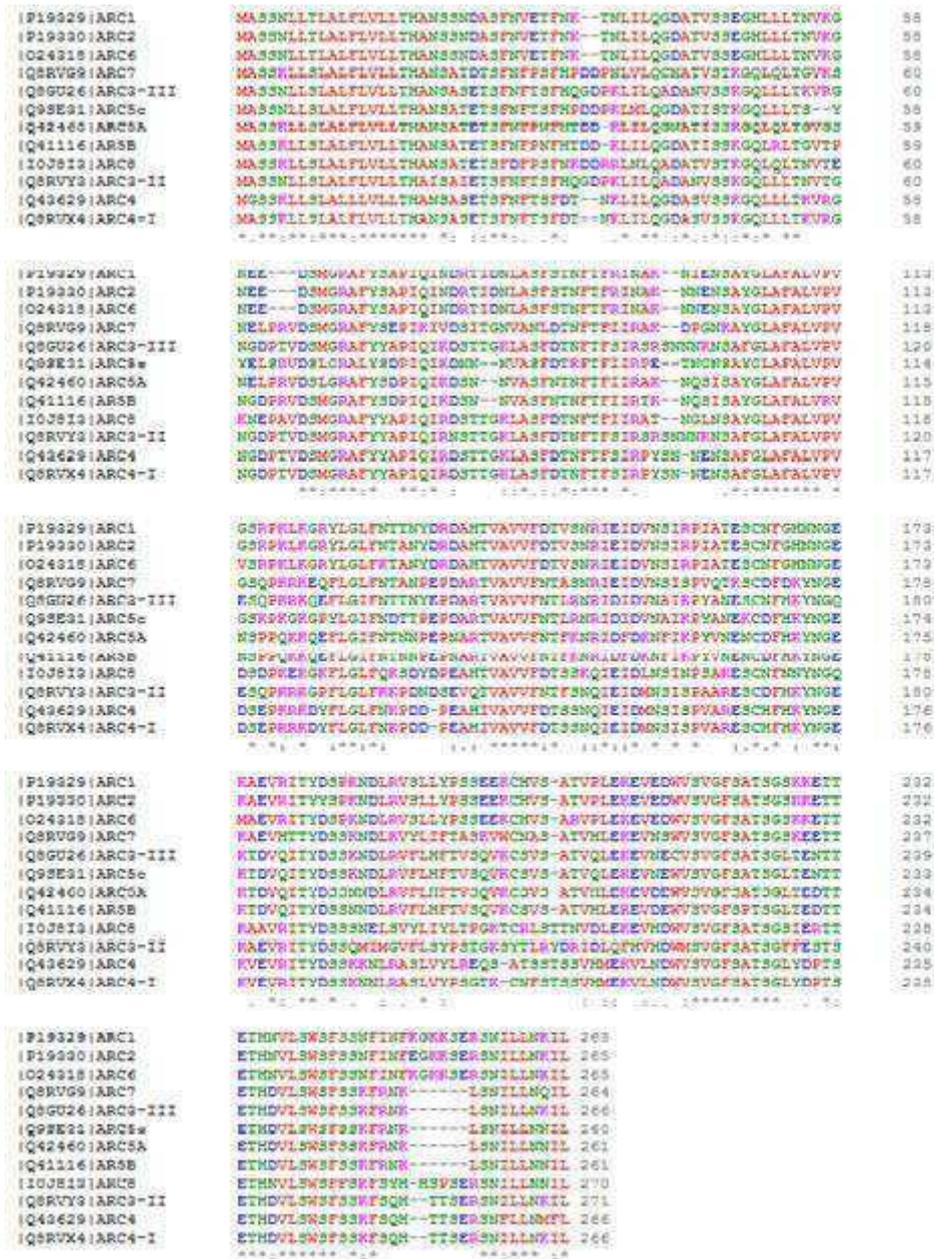


Figure 8: Alignement multiple des secances.

IV. Les domaines fonctionnels des arcélines

L'analyse fonctionnelle des séquences de sucres d'acides aminés de *Phaseolus vulgaris* révèle l'existence d'un domaine fonctionnel important à savoir, la présence d'une séquence composée de 7 à 10 AA au niveau de toutes les variétés de haricot. Les sites de N-glycosylation plus la présence d'un autre domaine au niveau du groupe des PHAs représenté essentiellement par les arcelines ayant deux sites de

glycosylation et quatre acides aminés. Ceci révèle la présence d'une importante fonction biologique de ces protéines (Sakthivelkumar et *al.*, 2014).

L'alignement multiple des différentes variantes alléliques sont représentée dans la figure 8. Par ailleurs, bien que la fonctionnalité des molécules d'arcélines soit la même, leur rôle reste important à cerner dans la lutte contre les insectes des denrées stockées car ces protéines sont connues pour leur force motrice pour la protection des semences contre les infestations d'insectes en l'occurrence les bruches des denrées stockées.

Cardona et ses collaborateurs (1990) ont caractérisé la résistance des différentes arcélines face aux attaques de *Callosobruchus maculatus* F. et on déduit qu'en fonction de leur toxicité face à ce ravageur de stock, l'arcéline5 s'est montrée la plus résistante par antibiose suivie par arcéline4 puis arcéline1, arcéline 2 et enfin arcéline 3 s'est montrée la moins résistante face à *C. maculatus*.

Dans ce même contexte, cet auteur souligne que des lignées issues de croisement avec des lignées sauvages contenant de l'arcéline1 sont fortement résistantes face aux attaques de *C. maculatus* alors qu'un croisement avec des lignées sauvages contenant de l'arcéline 2 présentent une résistance intermédiaire. Enfin, les lignées issues du croisement avec les lignées sauvages contenant arcéline 3 ou arcéline 4 sont sensibles à *Callosobruchus maculatus* F.

*CHAPITRE VI : Aperçu
bioécologique sur Callosobruchus
maculatus F.*

I. Caractères généraux de la famille des bruchidae

Les bruchidae forment une famille assez homogène parmi les phytophaga. Ces derniers sont de forme ovale légèrement tronquée aux deux extrémités, leur taille varie entre 1.3 et 5 mm. (Balachowsky, 1962 ; Southgate, 1983)

cependant, les coléoptères bruchidae, dont les larves ne consomment et ne se développent que dans les graines (Caswell, 1961), ont été l'une des très rare familles à avoir coloniser les graines mures des légumineuses.

Par suite de la spécificité des lectines des différentes espèces de légumineuses, les larves d'une espèce de bruches ne consomment généralement que les graines d'une espèce déterminée d'une plante (Janzen, 1977 ; Sales et *al.*, 2000). Ainsi l'éthologie de nombreuses espèces de bruchidae est différente et leur comportement permet de les classer en deux groupes (Delobel & Tran, 1993).

Le premier renferme les bruches univoltines se développant au champ dans les graines vertes tels que la bruche du pois *Bruchus pisorum*, la bruche de la fève *Bruchus rufimanus* ou la bruche de la lentille *Bruchus lentis*. Le deuxième groupe renferme les espèces de bruches polyvoltines qui évoluent à l'intérieur des entrepôts de stockage, dans les graines murs ou sèches, c'est le cas de *Callosobruchus maculatus* (la bruche du pois chiche), *C. chinensis* (la bruche chinoise) ; *Acanthoscelides obtectus* (la bruche du hricot) ; *Caryedon serratus* (la bruche de l'arachide).

I.1. Origine et répartition géographique

L'espèce *Callosobruchus maculatus* est originaire d'Asie et d'Afrique (Southgate, 1978); à affinité climatique tropicale et subtropicale (Lepesme, 1944 ; Fleurat lessard, 1980).

Cette espèce est devenue un ravageur cosmopolite avec l'accroissement du trafic international (Ridet, 1992) des graines de légumineuses dans de nombreuses régions subsahariennes de l'Afrique de l'ouest (Fleurat lessard, 1980 ; Caswell, 1981)

I.2. Position systématique

L'espèce *Callosobruchus maculatus* fait partie des Chrysoméloïdæ selon le nouveau emplacement systématique de l'espèce (Kergoat et al., 2007). Appelée communément la bruche de pois chiche est un déprédateur des grains de légumineuses appartenant à :

- **Embranchement** : Arthropodes.
- **Sous embranchement** : pterygotes.
- **Classe** : Insectes.
- **Section** : Néoptères.
- **Sous section** : Néoptères endoptérygogènes.
- **Ordre** : Coléoptères.
- **Sous ordre** : *Phytophaga*.
- **Super famille** : *Phytophagoidæ*.
- **Famille** : *Bruchidæ*.
- **Sous famille** : *Bruchinae*.
- **Genre** : *Callosobruchus*.
- **Espèce** : *Callosobruchus maculatus*.

(Balaschowvsky, 1962)

I.3. Description

I.3.1. Les œufs

Les œufs de *Callosobruchus maculatus* F. sont asymétriques, arrondis à la base, sub-conique à l'extrémité. Fraîchement pondus, ces œufs sont de couleur jaunâtre et translucide ; ils deviennent ensuite blanc opaque à maturité. Ils mesurent $0,4 \times 0,7$ mm de long sur $0,3 \times 0,45$ mm de large. Ils adhèrent aux graines par un liquide adhésif qui se solidifie au contact de l'air (Figure 9)

I.3.2. Les larves

Les larves néonates sont de type chrysomélien. Elles sont visibles par transparence à travers le chorion de l'œuf. Le développement larvaire se déroule entièrement à l'intérieur du grain des légumineuses (*Fabaceae*) (Beck et Blumer, 2014).

Pour pénétrer dans la graine, la larve s'appuie sur la face interne du chorion puis creuse sa galerie. Au moment de la pénétration, elle rejette en arrière de la poudre de grain qui s'accumule sous le chorion de l'œuf qui devient opaque (Kellouche, 2005).

Southgate (1983), démontre que les larves de *Callosobruchus* F. n'ingèrent pas les matériaux enlevés pour pénétrer l'enveloppe de la graine, mais les râpent et les poussent de côté sans les faire passer par leur tube digestif.

I.3.3. Les nymphes

La nymphose a lieu le plus souvent à l'intérieur même des graines attaquées, dans une petite loge aménagée sous l'épiderme de la graine. Avant de se nymphoser, la larve découpe avec ses mandibules, d'une manière circulaire l'épiderme de la graine. L'adulte soulève cet opercule pour se libérer.

I.3.4. Les adultes

L'adulte de *Callosobruchus maculatus* mesure 2.8 à 3.5 mm de long et est de forme courte ; ramassée et globuleuse.

La tête est noire, les antennes et le pronotum sont de couleur rouge clair ou brun. Le corps est de coloration rougeâtre.

Les mâles ont des antennes noires avec les quatre premiers articles roux, chez les femelles ; ils sont entièrement rouges (Balachowsky, 1962) (Figure 10 et 11).



Figure 9: Œuf de *Callosobruchus maculatus* F. (Gr.40 x 0.8)

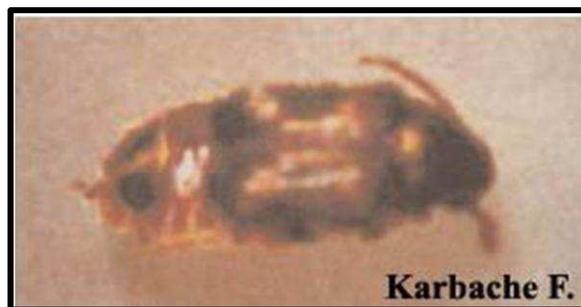


Figure 10: Adulte femelle de *Callosobruchus maculatus* F., vue dorsale. (Gr. 10 x 8)

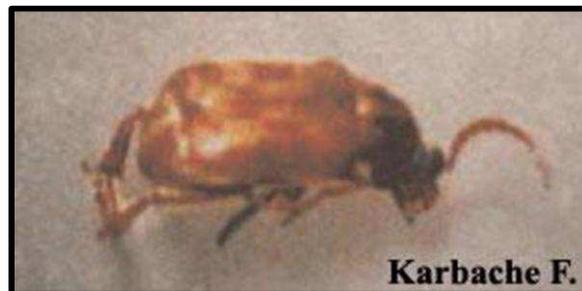


Figure 11: Adulte mâle de *Callosobruchus maculatus* F., vue dorsale. (Gr. 10 x 8)

Chez la femelle, on observe la présence de deux formes ; une apte au vol appelée 'femelle de la phase bonne volière' ; caractérisée par une faible fécondité et une dense pilosité. La seconde forme, inapte au vol 'femelle de la phase non volière' dont les femelles sont caractérisées par un abdomen partiellement recouvert. Elles sont rencontrées dans les magasins de stockage (Utida, 1954).

Recouverts d'une pilosité fine, les élytres sont fortement sclérifiés et ne sont utilisés que lors du vol. Ils protègent ainsi les ailes membraneuse et la plus grande partie de

L'abdomen, sauf chez la femelle dont le dernier tergite abdominal reste découvert (Gaitan, 1990).

Delobel et Tran (1993), soulignent que les individus qui viennent juste d'émerger présentent des soies dorées et blanches. Leurs élytres sont noirs avec des zones rousses revêtues d'une pubescence blanche et dorée. Cependant, leur durée de vie est limitée de une à deux semaines (Beck et Blumer, 2014).

L'espèce *Callosobruchus maculatus* forme un groupe monophylétique avec *C. analis*, *C. rhodesianus* et *C. subinnotatus*. En effet, toutes ces espèces utilisent graines sec de légumineuses appartenant au genre vigna et leur hôtes naturels (Tuda et al. , 2006).

I.4. BIOLOGIE

Callosobruchus maculatus F. contamine les graines au champ et une fois introduite dans les entrepôts, elle continue à se multiplier (Singh & Taylor, 1978 ; Sales & al., 2000).

La ponte a lieu deux heures après l'accouplement qui se produit de jour ou de nuit

Il peut exister 5 à 6 générations successives par an au niveau des entrepôts chauffés (Fleurat lessard, 1980).

Selon Lepesme (1944), Multon (1982) et Khalfi (1983). Les œufs peuvent être déposés hors des graines sur les supports, les planches de bois, les vitres etc.

Chez la femelle gravide, la ponte est déclenchée par un stimulus de nature chimique présent dans les téguments de la graine (Delobel, 1999).

En règle générale, le développement de l'œuf dure de 5 à 10 jours à partir du moment de la ponte. La première nécessité pour la larve à l'éclosion est d'accéder à la graine (Southgate, 1983).

Après l'éclosion, la larve pénètre invariablement au point d'adhésion de l'œuf en s'arc-boutant dans la partie convexe. Les œufs mal placés avortent (Multon, 1982).

La larve néonate de type chrysomélien pénètre dans la graine et passe au deuxième stade apode. La nymphose a lieu soit dans la graine elle-même, soit à sa proximité (Balachowsky et *al.*, 1962).

Le développement larvaire est en fonction de la température ambiante. Il peut être très rapide autour de son optimum de 15 à 20 jours à une température de 32°C si l'insecte se développe dans des graines qui constituent son habitat préférentiel. Au contraire, il se prolonge pendant plusieurs mois si les conditions sont défavorables (Delobel, 1999). Selon Hoffman et Labeyrie (1962) ; le nombre de mue est de deux à quatre.

Khalfi (1983) et Karbache et *al.*, (2011), confirme qu'à une température de 30° C et une humidité relative de 40 %, *Callosobruchus maculatus* F. passe par trois stades larvaires. Selon ce même auteur et sous les mêmes conditions d'expérimentation, la durée de développement est de 29 jours. Cette durée varie dans les limites assez larges avec l'espèce de la graine hôte, son état d'hydratation et la température (Multon, 1982).

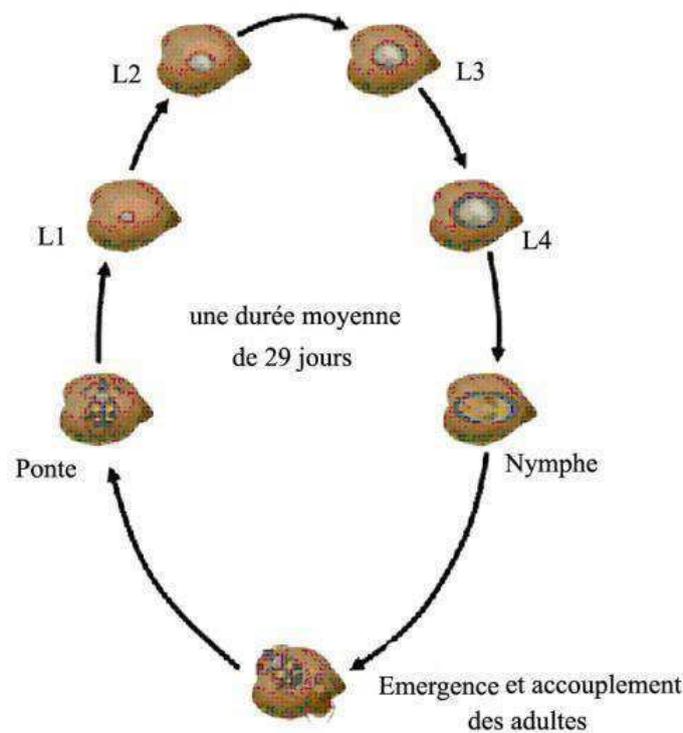


Figure 12: Cycle de développement de l'espèce *Callosobruchus maculatus* (F.) à une température de 30°C et une hygrométrie de 70 % ± 5 % (Mouhouche, 2005).

I.5. Génétique

L'espèce *Callosobruchus maculatus* F. présente un caryotype de dix paires de chromosomes (Yadav, 1971). Le chromosome 10 est un chromosome sexuel ainsi les males de cette espèce sont hétérosexuels (figure. 13). Un trait mendélien a été décrit pour les coléoptères des légumineuses, la couleur du corps est autosomique et renferme des allèles à dominance incomplète (Eady, 1991).

La variation héréditaire de la taille corporelle est bien décrite (Fox et *al.*, 2004) ainsi que les traits de vie et de comportement tels que la longévité et la durée de développement (Brown et *al.*, 2009). Dans ce contexte, certains gènes ont été isolés et caractérisés, tels que ceux responsables de la régulation et la transcription dans l'environnement (Moura et *al.*, 2007 ; Chi et *al.*, 2011).

Selon Beck et Blumer, 2014, la base de données des nucléotides dans le NCBI Gen Bank présente plus de 80 entrées pour *C. maculatus*



Figure 13: Caryotypes du coléoptère *C. maculatus* F. (Beck et Blumer, 2014)

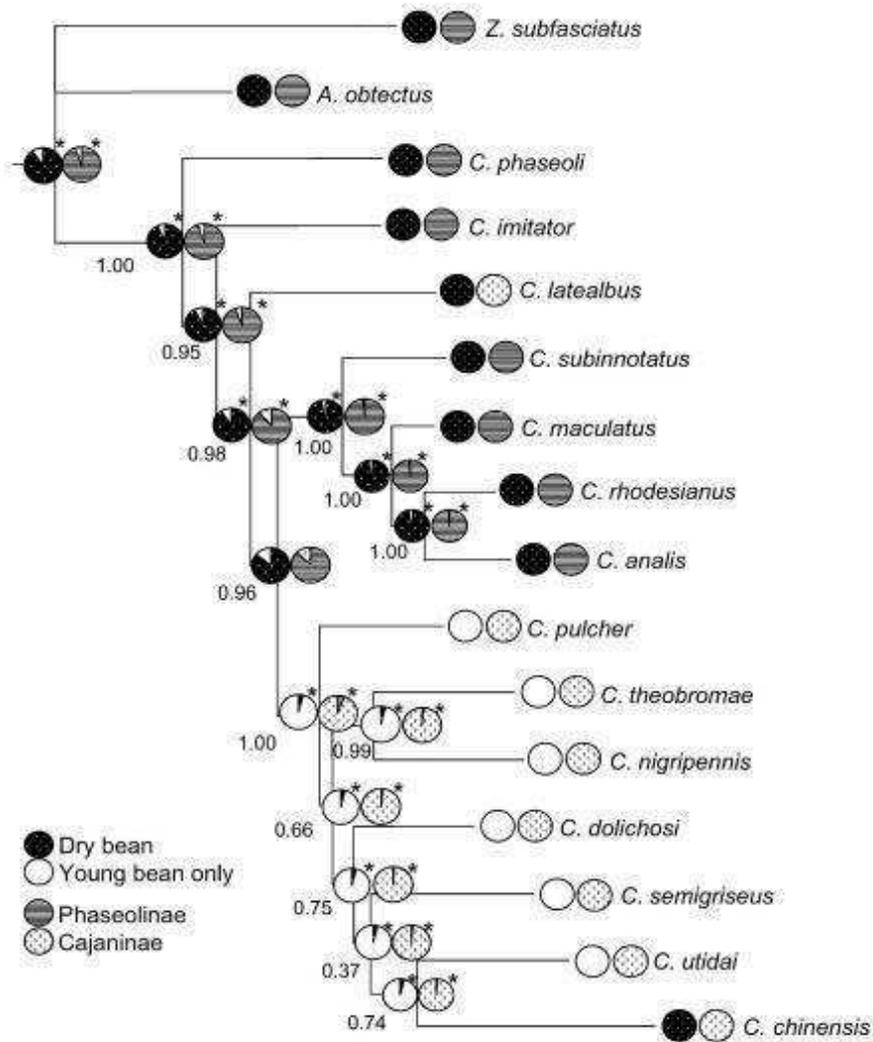


Figure 14: Phylogénie moléculaire pour *C. maculatus* (Beck et Blumer, 2014)

I.6. Dégâts

Bien que la dureté et l'épaisseur du tégument des graines mures soient des barrières efficaces contre la pénétration des larves, sa composition chimique joue un rôle important (Janzen, 1977).

Les graines de légumineuses sont fortement attaquées pendant le stockage par *Callosobruchus maculatus* (Singh & Emden, 1979 ; Shih-chieh & *al.*, 2002) affectant ainsi le poids des graines, leur faculté germinative et leur valeur marchande (Kumar et *al.*, 1993 ; Umeozor, 2005)

Les pertes subies par les graines de légumineuses suite aux attaques de ce ravageur sont de l'ordre de 80 % en quelques mois atteignant souvent 100 % à des taux de consommation initiaux de 1 % à 2 % (Caswell, 1961 ; Labeyrie, 1981).

Les dégâts provoqués par *Callosobruchus maculatus* sont dus essentiellement aux larves qui dévorent les graines (Kellouche, 2005).

L'infestation par les insectes engendre l'apparition des facteurs antinutritionnels comme l'acide phytique et l'inhibition de l'activité trypsique (Xavier- Filho, 1993) ; de l'acide urique (Ali et Muzquiz, 1998) mais aussi une perte de poids des graines (Gueguen et Cerletti, 1994).

Par ailleurs, on observe une modification de la composition en vitamine (Huis et Rooy, 1998) et une augmentation en cellulose (Martin-Cabrejas et *al.*, 1995).

D'autre part, la qualité des protéines subit une diminution de la composition en méthionine et une augmentation de l'acide urique et de l'azote non protéique ; ce qui rend les graines impropres à la consommation humaine (Keita et *al.*, 2001).



Figure 15: Dégâts occasionnés par *Callosobruchus maculatus* F. sur grains de pois chiche commercial (Original). (Gr. 10 x 4).

II. Stratégies et moyens de lutte contre *Callosobruchus maculatus* F.

Les insectes sont les ravageurs les plus redoutables, car leur seule présence est nuisible et déprécie le stock tout entier quel que soit leur nombre (Multon, 1982).

De ce fait, la protection des graines entreposées a toujours été une polémique, puisqu'elle peut survenir quand les récoltes sont encore sur pied (Ali Muzquiz, 1998).

Ainsi, pour lutter contre le ravageur des graines stockées *Callosobruchus maculatus* F., deux méthodes sont préconisées ; l'une est préventive qui consiste en une hygiène rigoureuse des différents moyens depuis la récolte des graines jusqu'à leur entreposage ; elle se pratique avant l'installation du ravageur. La deuxième méthode est curative utilisée quand les entrepôts sont déjà infestés.

II.1. Méthode préventive

Les moyens prophylactiques sont un élément primordial de lutte. Cette prévention peut être envisagée de plusieurs façons.

II.1.1. Les mesures d'hygiènes

Parmi les moyens prophylactiques élémentaires, la mise en application régulière des mesures d'hygiènes constitue le moyen le plus important et le plus efficace pour contrôler *Callosobruchus maculatus* pour cela, Ducom (1982), préconise plusieurs méthodes à savoir :

- Un nettoyage convenable des locaux de conservation et du matériel destiné à l'emmagasiner, par un badigeonnage ou une pulvérisation d'insecticides.
- Une incinération des déchets de nettoyage.
- Une vérification des locaux, des crevasses et des recoins qui peuvent abriter des insectes ou des grains inaccessibles aux insecticides de contact.
- Un tri soigné éliminant ainsi les impuretés, les grains cassés et la poussière de farine.

- Respecter la rotation des stocks en réduisant au minimum les causes de contamination (Fields, 2001).

II.1.2. Lutte génétique

L'utilisation de variétés résistantes présente actuellement une méthode de contrôle efficace à l'égard de *Callosobruchus maculatus*.

Selon Gwinner et *al.*, (1996), certaines variétés de pois chiche cultivées présentent une faible sensibilité vis-à-vis de *Sitophilus oryzae* et *Callosobruchus maculatus* tels que Flip 82150C et ILC 3279 (Mouhouche & Fleurat lessard, 2003).

Dans ce contexte, l'objectif des programmes d'amélioration de la résistance des graines de légumineuses est de combiner dans un même cultivar la résistance de la gousse et celle de la graine, ce qui permet d'assurer une protection efficace sur champ et lors des entreposages (Boutin et *al.*, 2006).

Selon Surech et *al.* (2006) ; plusieurs produits naturels révèlent un effet insecticide, à titre d'exemple *Pisum sativum* (pois) qui a été particulièrement efficace contre *Sitophilus oryzae* L. (*Coleoptera : Curculionidae*).

II.1.3. Lutte par dépistage

II.1.3.1. Dépistage ordinaire

Cette méthode est très utilisée, elle consiste à surveiller l'état du grain par la mesure de la température et d'humidité du grain dans la masse, au moyen de détecteurs électriques installés à demeure (Mills, 1990). Cependant, cette méthode aléatoire reste insuffisante pour déceler les formes cachées qui provoquent des dégâts considérables au cours de leur développement.

II.1.3.2. Dépistage par infrarouge

Ce procédé permet de détecter les protéines animales des insectes et même les formes cachées, il consiste à réaliser une résonance magnétique nucléaire (RMN) pour déceler la présence des acariens et éventuellement les fragments d'insectes (Wilkin et Chambers, 1987).

II.1.3.3. Dépistage électroacoustique

Le principe de cette opération, est de pouvoir détecter l'activité des insectes et de surveiller le niveau de population présente dans la denrée, par des microphones sensibles. Cette technique permet de réduire le coût de l'inspection et les traitements (Mankin *et al.*, 1998).

Le son des insectes, peut être décelé par la méthode de simulation par ordinateur sans pour cela réaliser des prélèvements au niveau du stock. Un logiciel informatique permet la détermination de l'insecte et son niveau d'infestation (Hagstrum *et al.*, 1990).

II.1.3.4. Méthode immuno-enzymatique

C'est une analyse minutieuse, qui donne une estimation de l'infestation des grains et de la farine (Fields, 2001).

L'extrait obtenu après broyage est soumis à un dosage par le Test ELYSA du type sandwich. La coloration de l'extrait obtenu est mesurée par spectrophotométrie qui nous

permet de calculer la concentration en protéine d'insectes, cette quantité de protéines nous renseigne sur l'infestation des grains (Wirsta *et al.*, 1996).

II.2. Lutte curative

Elle intervient directement contre les insectes en place. Parmi les moyens utilisés nous citons la lutte physique, biologique et chimique.

II.2.1. Lutte physique

Cette méthode repose sur le traitement des graines et le control des insectes par l'utilisation des agents physiques comme la température, la chaleur, hygrométrie et la pression (Sahadia et Aziz, 2011) aux radiations ionisantes et aux ondes électromagnétiques.

Les moyens préventifs sont obligatoires mais elles restent insuffisantes, dans ce cas le recours aux procédés curatifs est indispensable

II.2.1.1. L'atmosphère modifiée

L'entreposage en atmosphère modifié, ne laisse aux insectes aucune chance de survie.

Plusieurs auteurs affirment qu'à une concentration en gaz carbonique supérieure à 60% et une concentration en nitrogène qui varie entre 97 et 99 % en raison de la raréfaction de l'oxygène 'inférieur à 1%, les insectes meurent par asphyxie (Mc Gaughey et Akins, 1989 ; While et Jayas, 1991 ; Gwinner et *al.*, 1996).

Cependant, le dioxyde de carbone est plus efficace que le nitrogène dans la modification de l'atmosphère. Il provoque généralement la déshydratation des insectes.

Parallèlement, la création d'une atmosphère à faible teneur en oxygène tue les insectes des denrées entreposées (Mishra et *al.*, 2018). Ainsi, une combinaison de basses pressions et de grandes températures est plus efficace contre les œufs et les larves de *Callosobruchus maculatus* F. (Mbata et *al.*, 2005).

II.2.1.2. La chaleur

Toutes les formes des ravageurs des denrées stockées, se trouvant dans une masse de grains ; sont éliminées après quelques minutes d'exposition à une température allant de 60°C à 65°C ; sans aucune conséquence sur le pouvoir germinatif ni sur la qualité des grains (Fleurat lessard, 1989 ; Sahadia et Aziz, 2011 ; Upadhyay et Ahmad, 2011).

Théoriquement, c'est le moyen le plus sûr pour lutter contre les insectes des denrées, à condition de respecter quelques principes simples : le choc thermique doit se faire le plus rapidement possible et être suivi impérativement d'un refroidissement jusqu'à la température normale de conservation.

D'après Shahein (1991) ; les individus de *Callosobruchus maculatus* sont éliminés après 3 minutes d'exposition à une température de 50°C.

II.2.1.3. Le froid

Ce procédé peut être employé pour la conservation des récoltes et consiste à faire passer un courant d'air frais dans la masse des grains.

D'après Sinha et Watters (1985) ; les denrées ne sont généralement pas infestées si la température de conservation est inférieure à 12°C. Ceci est confirmé par Sahadia et Aziz, (2011) ; et Upadhyay et Ahmad (2011), car cette température affecte sérieusement les bruches des denrées entreposées.

Aussi, exposés à une température de 5°C (Ducom et Bourges, 1987) ; les insectes présentent des perturbations physiologiques suivies d'une mort certaine (Lee & al., 1993).

Par ailleurs, si on abaisse l'hygrométrie à 9%, cette dernière affecte sérieusement la reproduction et le développement larvaire des insectes de denrées stockées.

Cette méthode est souvent coûteuse en énergie électrique (Fields, 1992), elle exige des cellules bien isolées et un puissant circuit de ventilation associé au générateur d'air frais.

II.2.1.4. Destruction par les ondes électromagnétiques non ionisantes

L'utilisation de rayonnement du type micro-onde ou haute fréquence est susceptible d'assurer une bonne désinsectisation, il détruit totalement les formes cachées des insectes après irradiation de courte durée et ne laisse pas de résidus.

Le traitement consiste à chauffer les produits à une température létale pour toutes les espèces de ravageurs et aux différents stades par l'infrarouge (Sinha et Watters, 1985).

De ce fait, les insectes sont tués par l'élévation de la température de leur corps (Fleurat lessard, 1998).

L'avantage de ce procédé est lié à la nature du rayonnement. Néanmoins, il est onéreux et consommateur d'énergie.

II.2.1.5. Les radiations ionisantes

L'irradiation des denrées par des rayons gamma et beta est une technique utilisée dans de nombreux pays pour lutter contre plusieurs insectes ravageurs des graines stockées (Arthur et Puterka, 2002 ; Ghasemzadeh et *al.*, 2011). Les doses élevées éliminent les insectes alors que les faibles doses les stérilisent (Dongre et *al.*, 1997).

Selon Higland, (1991) ; l'exposition à de faibles doses allant de 4,8 à 7,2 KGy pendant 10 à 15 minutes, inactive les œufs et les adultes de *T. castaneum* et de *C. chinensis*.

Par ailleurs, des résultats montrent qu'une dose de 20 Gy permet une inhibition efficace du développement des bruches à l'état larvaire et une dose de 1500 Gy est nécessaire pendant une période de trois jours pour détruire les adultes (Dongre et *al.*, 1997).

Selon Mishra et ses collaborateurs (2018), même le rayonnement par micro-onde peut être utilisé en stockage au froid afin de gérer les espèces nuisibles aux denrées stockées. Ces traitements sont écologiquement efficaces dans les programmes de lutte contre les insectes nuisibles aux denrées.

II.2.1.6. L'utilisation des pesticides

La plupart des pesticides appartiennent à quatre groupes chimiques bien distincts, les organochlorés, organophosphates, carbamates et les pyrethrénoïdes. Ils ont été utilisés dans les champs et le stockage depuis plus de cinq décennies pour la gestion des insectes nuisibles en l'occurrence les bruchidae (Dent, 1991, Megerssa, 2010).

L'utilisation de spinosa, un composant naturel de bio pesticide semble être efficace pour la gestion de ces ravageurs de stock au laboratoire et sur terrain (Sanon et *al.*, 2010). En effet, l'application du spinosa réduit d'une manière considérable l'émergence des adultes de *C. maculatus* et la perforation des graines après six mois de stockage.

Dans ce contexte, plusieurs recherches rapportent l'efficacité des poussières des pesticides, des fumigants et des pulvérisation de nature chimique et les recommandent contre les bruches (Harberd, 2004).

a. La pulvérisation

Les insecticides de contact pénètrent dans les tissus de l'insecte après avoir traversé la cuticule (Champ et Dyte, 1978), parmi ce groupe d'insecticides nous citons :

- Les pyréthrinoides de synthèse agissent par contact et ingestion, en provoquant souvent un effet choc sur les insectes comme *Callosobruchus maculatus* F. et *Tribolium castaneum* (Collins, 1990 ; Shakoori et al., 1993 ; Tufail et al., 1994).

b. Les fumigants

Les fumigants sont des gaz toxiques utilisés pour désinsectiser une denrée dans un espace clos. De toute évidence, les enceintes de fumigation, doivent être suffisamment étanches pour que le gaz pénètre et puisse diffuser entre les grains et dans les grains assez de temps, pour tuer les insectes présents, ceci quel que soit leur stade de développement.

Selon Lienard et Seck (1994), ces fumigants réduisent les pertes occasionnées par les bruches au niveau des entrepôts du fait qu'ils peuvent atteindre les formes cachées par leur diffusion à l'intérieur des graines. Seulement, plusieurs espèces ont montré certaines résistances face aux fumigants dans le monde, dont certains pays africains (Liener, 1982)..

Au cours de ces dernières années, l'emploi des fumigènes a été de plus en plus remis en question. Ceci s'applique en particulier au bromure de méthyle mais également à la phosphine. Les problèmes sont principalement liés aux effets négatifs sur l'environnement, à un éventuel caractère cancérigène et au développement de résistance chez les ravageurs cibles. Le bromure de méthyle est un produit susceptible de détruire l'ozone (Muller et al., 1997 ; Kostyukovsky et al., 2002). Il a été retiré et n'est plus commercialisé.

L'utilisation de pesticides pendant plusieurs années a entraîné de nombreux problèmes, entre autre la présence de résidus sur les denrées stockées et le développement du phénomène de résistance chez les insectes (Mishra et al. 2018, Talukder, 2009).

II.2.2. Lutte biologique

Tout organisme vivant, possède des ennemis naturels ou maladies qui régulent ses populations (Altieri et al., 2005 ; Mahr et al., 2008). Ce sont ces antagonistes naturels des ravageurs, que les méthodes biologiques de lutte mettent à contribution. Le contrôle biologique est une stratégie viable et acceptable où des agents biologiques bénéfiques en tant que produits formulés sont appliqués aux grains infestés par les ravageurs des denrées stockées (Mishra et al., 2018) et active potentiellement contre les populations de bruches (Soundararajan et al., 2012).

Les avantages offerts par ces procédés biologiques résident surtout dans l'absence presque totale de risques toxicologiques.

II.2.2.1. Utilisation des parasitoïdes

Les parasitoïdes sont des insectes qui se développent au dépend des insectes nuisibles, en règle générale ; se sont exclusivement les larves qui parasitent l'hôte.

Arbogost & Mullen (1990), affirment que le parasite *Anisopteromalus calandrae* (hymenoptera, pteromalidae), est un agent de contrôle efficace contre *Callosobruchus maculatus*, il induit un taux de parasitisme de 15 à 20 % qui peut atteindre 40% si le parasite, est introduit en grand nombre et très tôt en période de stockage (Smith, 1993).

Par ailleurs, le parasite hymenoptera, *Dinarmus* spp est communément utilisé dans la suppression des populations de *Callosobruchus maculatus* au niveau des graines stockées (Kananji, 2007)

II.2.2.2. Utilisation des prédateurs

Les prédateurs sont des organismes vivants qui tuent d'autres êtres vivants pour s'en nourrir, contrairement aux parasitoïdes, les prédateurs dévorent plusieurs proies au cours de leur vie.

Il existe des acariens prédateurs d'œufs, des larves et adultes d'insectes ravageurs des grains stockés, comme le Cheylète cannibale *Cheyletus eruditus* (Schranck.) contre *C. maculatus* (Mills, 1990).

II.2.2.3. Lutte par les agents pathogènes

Sur le plan de la lutte biologique contre les ravageurs des stocks, l'utilisation des agents pathogènes (bactéries, virus, champignons) et les parasitoides sont réunis sous le concept de biopesticides.

L'agent pathogène *Bacillus thuringiensis*, est commercialement disponible sous différentes formulations. Ce biopesticide donne des résultats satisfaisants contre les insectes des denrées entreposées (Gwinner et al., 1996).

D'autres agents pathogènes, comme *Beauveria bassiana* utilisé à la dose 0,5g /q s'est montrée efficace vis-à-vis de *Tribolium castaneum* (Herbst.), les mortalités ont dépassé les 50 % après 14 jours de traitement (Padin et al., 1997).

Selon Lee et al. (1993), le traitement avec une concentration de 100 ppm de *Pseudomonas syringae*, décroît la capacité de résistance et de survie des insectes pendant une exposition de 24 heures à 5°C. Dans tous les cas, l'augmentation de la dose de traitement de 100 à 1000 ppm, donne un taux de mortalité allant de 25 à 50 % sur la majorité des insectes des denrées stockées *Callosobruchus maculatus* (F.), *Plodia interpunctella* (Hübner.), *Cryptolestes pusillus* (Schonher.), *Rhyzopertha dominica* (F.), *Gibbium psylloides* (Genpinski.), *Tenebrio molitor* (L.) et *Sitophilus granarius* (L.).

II.3. L'utilisation des végétaux

Le développement de résistance par des insectes aux insecticides sa permis de développer d'autres matières actives à base d'extraits végétaux pouvant avoir des modes d'actions différents à ceux des insecticides déjà utilisés.

Le contrôle phytochimique englobe l'utilisation de produits dérivés des plantes à activités insecticides et les inhibiteurs contre les bruches (Mishra et *al.*, 2018 ; Kestenholz et *al.*, 2007 ; Raja et Ignacimuthu, 2000).

Les végétaux produisent des composés secondaires tel que les lectines, les composés soufrés, les alcools etc. ; leur utilisation en tant que biopesticides dans la protection des graines de légumineuses contre les insectes a fait l'objet de nombreuses études notamment en zone tropicale (Arthur, 1996). En effet, les plantes sont naturellement dotées de médiateurs chimiques permettant la communication entre les espèces et présentent divers effets. Beaucoup de molécules dans ces composés interviennent dans la défense du végétal contre les ravageurs. Ainsi, plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides sont identifiées (Ngamo et Hance, 2007 ; Sales et *al.*, 2018).

II.3.1. Utilisation sous forme de poudre

Plusieurs tests de laboratoire ont été réalisés sur les extraits de diverses plantes, pour connaître l'efficacité de leur action anti-appétante ou toxique vis-à-vis de nombreux insectes des denrées stockées. Ainsi les graines de margousier, réduites en poudre et mélangées au maïs, ont un effet très efficace sur les adultes de *Sitophilus oryzae* L, *Sitophilus zéamais* L. et *Callosobruchus maculatus* F. les feuilles de cette plante réduisent également la fécondité des adultes de tous ces insectes et perturbent leur développement larvaire (Pereira et Wohlegmuth, 1982).

II.3.2. Utilisation sous forme d'extraits organiques

Talukder & *al.* (1998), montrent que les extraits des graines de *Thévilia péruviana*, *Curissa caravida*, *Arachlis hypogae* et de *Ricinus communis* extraites par l'éther de pétrole à une température comprise entre 35 et 60° C, sont toxiques vis-à-vis de *Callosobruchus maculatus* F.

II.3.3. Utilisation sous forme d'extraits aqueux

D'après Hamraoui et Regnault-Roger (1997), Gwinner et *al.*, (1996) ; les extraits aqueux de plusieurs plantes présentent une activité insecticide intéressante. Ainsi les extraits aqueux de pyrèthre et de plusieurs espèces de labiacées

manifestent une efficacité élevée sur presque la totalité des ravageurs des denrées stockées en l'occurrence *Callosobruchus maculatus* F.

II.3.4. Utilisation sous forme d'huiles essentielles

Les huiles essentielles proviennent d'espèces végétales très variées, elles sont extraites à partir d'écorces de plantes, de fruits, de racines, de tubercules, de tiges, de feuilles et de fleurs. Plusieurs huiles essentielles se sont avérées efficaces contre les ravageurs des denrées stockées. Les phytopesticides valorisables sous la forme des huiles essentielles présentent un réel avantage du fait de leur faible rémanence, leur faible toxicité pour l'homme et de leur mode d'action sur les ravageurs. Toutes les plantes dont les huiles ou les extraits sont prometteurs pour la lutte contre les insectes ravageurs ne sont pas indiquées pour l'alimentation humaine, non seulement du fait de leur toxicité mais de leur goût ou de leur senteur (Adjoudj *et al.*, 2000 ; Bekele et Hassanali, 2001 ; Buchbauer *et al.*, 2000 ; Jirovetz *et al.*, 2002 ; Kouninki, 2001 ; Ngamo, 2000).

Les huiles essentielles produisant des composés terpéniques (Kellouche *et al.*, 2004a) sont souvent préconisés pour contrôler les populations de bruches dans les systèmes de stockage comme l'ont montré les travaux de Gbolade et Adebayo (1993), Seck *et al.* (1993), Ramzan (1994), Gakuru et Fouabi (1995), Don-Pedro (1996), Rajapakse et Van Amden (1996), Keita *et al.* (2001), Raja *et al.* (2001), Ketoh *et al.* (2002) et Kellouche *et al.* (2004).

Parallèlement, Kellouche et Soltani (2004); montrent qu'à une dose de 0,15 % soit l'équivalent de 4ml d'eugénol. Ce dernier, représente le principal composé de l'huile essentielle des clous de girofle. A cette dose, tous les individus de *Callosobruchus maculatus* F. sont éliminés en moins de 24 h.

Par ailleurs, l'oviposition de l'espèce est empêchée à des doses allant de 8 à 14 ml d'huile/ Kg (Mohiuddin, 1990).

Cependant, malgré les résultats obtenus certes encourageants, l'efficacité de ces substances utilisées dans les conditions réelles de stockage reste à démontrer.

Dans ce contexte, il convient avant toute utilisation d'huiles essentielles extraites localement ou sur des ressources indigènes, de les caractériser. Ainsi, dans

la mesure des données disponibles, il faut déterminer leur mode d'action (répulsion, action sur la survie, sur la fécondité, anti appétant, etc) contre les ravageurs (Ngamo, 2007).

Selon Keita et ces collaborateurs (2001), ces molécules allélochimiques végétales agissent à des moments déterminés sur les espèces ciblées. Ainsi, les huiles essentielles insecticides sont très actives sur les insectes sans altérer le pouvoir germinatif des graines traitées. Il existe une grande variation dans la sensibilité des espèces pour une même huile essentielle (Delobel, 1994) ou même pour un même composé (Regnault-Roger et Hamraoui, 1997). Ainsi, une même molécule allelochimique n'exerce pas forcément la même activité aux différents stades du cycle biologique d'un insecte.

II.4. Approches biotechnologiques

L'utilisation d'approches biotechnologiques, comme la modification du génome par transgénése introgressive ou par l'utilisation de marqueurs d'ADN assistés peuvent fournir des moyens pour réduire les pertes de rendements et augmenter nettement la production (Collard et Mackill, 2008).

Depuis lors, l'utilisation de la transformation génétique a été répartie dans la plupart des cultures, y compris les légumineuses, telles que *Cicer arietinum* (Fontana et al., 1993), *Vicia faba* (Ramsay et Kumar, 1990) et *Pisum sativum* (Schroeder et al., 1993). Parallèlement, les études biochimiques sur les légumineuses, confirment que les lectines, les sucres liants les protéines se trouvent d'une manière naturelle dans les graines et sont impliquées dans les mécanismes de défense des plantes contre les bruchidae (Chrispeels et Raikhel, 1991, Peumans et Vandamme, 1995). Ainsi, le gène codant pour ces protéines regroupe aussi les arcélines, les phytohemagglutines et les inhibiteurs d'alpha amylases (Lioi et al., 2003).

Concernant les marqueurs d'ADN. Ces derniers sont utilisés depuis 1980 dans la sélection de stratégies pour l'amélioration des plantes par l'exploitation de résistances élevées appelée élevage moléculaire (molecular breeding) (Rafalski et Tingey, 1993). Le progrès de la reproduction dépend de divers facteurs, y compris

l'ampleur de la variabilité génétique parmi les germoplasmes, l'héritabilité des traits désirés et la pression de sélection exercée (Lale et Kolo, 1998).

Chez diverses légumineuses, des gènes de résistance spécifiques aux bruchidae ont fréquemment été rapportés chez des variétés sauvages (Somta et *al.*,2008).

*PARTIE II : Partie
expérimentale*

CHAPITRE I : Matériels et méthodes

Matériel et méthode

Notre partie expérimentale a été réalisée dans le laboratoire de protéomique à l'institut de biologie et de médecine moléculaire à l'université Libre de Bruxelles.

I.Sensibilité des variétés de haricot aux attaques de *Callosobruchus maculatus* F.

I.1. Matériel biologique

I.1.1. Matériel animal

Les adultes de *Callosobruchus maculatus* utilisés pour nos essais proviennent d'une souche élevée au laboratoire de Zoologie à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d' El Harrach. L'espèce a été déterminée par le muséum d'histoire naturelle de Paris (France).

L'élevage de masse est réalisé dans des bocaux en verre d'une capacité de 78,5 cm fermés par de la moustiquaire permettant l'aération des insectes. Le substrat alimentaire est constitué par 100g de pois chiche commercialisé infesté par 20 couples de *C. maculatus*. Les bocaux constitués sont maintenus à l'obscurité dans une étuve portée à $28^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C et une humidité relative de 70 ± 5 %.

Lors de notre expérimentation, nous avons travaillé sur des adultes âgés de zéro à 24 heures. Ces derniers sont obtenus à partir des tamisages quotidiens.

I.1.2. Le matériel végétal

Les variétés de haricot sont fournies par l'Institut Technique de Grandes Cultures de Oued smar El Harrach (ITGC). Seule la variété sauvage d'origine indienne a été récoltée dans la région de Kabylie Ait laaziz Bouira. Il s'agit de : *Phaseolus caracalla*.

Il est à noter que toutes les variétés présentent un aspect textural lisse excepté le pois chiche qui a une texture ridée. Les variétés utilisées sont les suivantes :

- La variété S102.
- La variété Zeta.
- La variété Pinto.

- La variété Judia.
- Haricot blancRoyal Burgundy
- La variété *Phaseolus caracalla*.

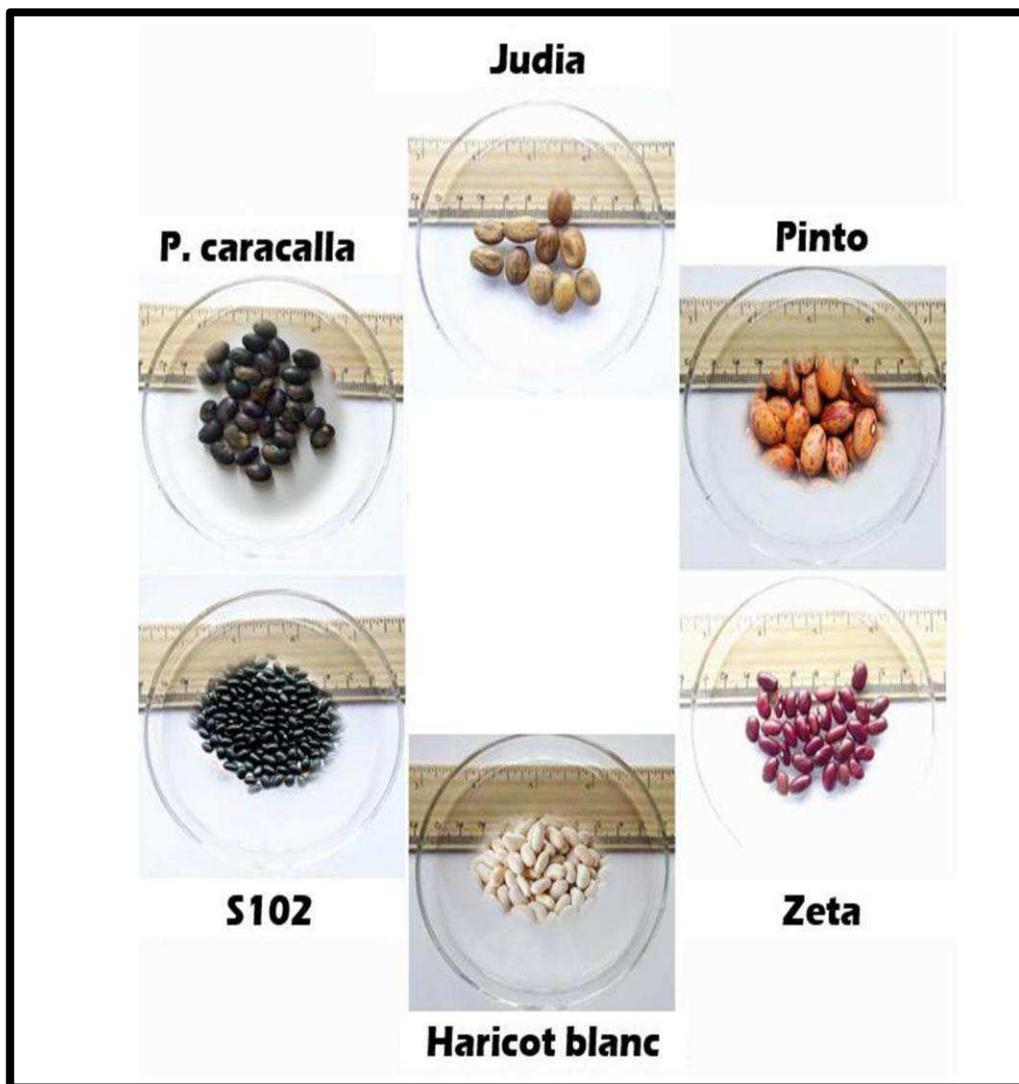


Figure 16: Les variétés de haricot utilisées dans nos expérimentations.

I.2. Détermination des paramètres biologiques

I.2.1. Fécondité et longévité

La fécondité est déterminée par le nombre d'œufs émis par la femelle au cours de sa vie. Elle est étudiée sur 25 couples d'adultes âgés de zéro à 24 heures répartis à raison de cinq couples par boîte de pétri en verre de 11cm de diamètre. La quantité de graines de haricot réparti par bocal de capacité de 190 cm est de 10g avec 5 couples. Le nombre de répétition est fixé à cinq.

L'observation des pontes est quotidienne et est effectuée à la loupe binoculaire avec un éclairage direct jusqu'à la mort des femelles et des mâles (les œufs pondus sont comptés puis éliminés).

I.2.2. Fertilité et durée de développement

Pour déterminer la fertilité et la durée de développement de l'espèce *Callosobruchus maculatus* F. 150 œufs âgés de zéro à 48 heures sont récupérés lors de l'étude de la fécondité. Ces œufs sont répartis à raison de 30 œufs par bocal contenant 15 graines reconstituées, ceci pour chaque variété.

Le nombre de répétition étant fixé à cinq. Le pourcentage d'éclosion est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ éclosion} = \frac{\text{Nombre d'œufs éclos}}{\text{Nombre d'œufs pondus}} \times 100$$

La durée de développement est calculée comme la durée écoulée à partir du temps médian qui représente le milieu de la période de ponte jusqu'à l'émergence de 50% de l'effectif des adultes. C'est un paramètre important, il permet une évaluation globale de la qualité nutritionnelle de l'alimentation des insectes. Cette durée est calculée suivant la méthode d'Haryadi (1994) :

$$\text{DMD} = j_x + [(n_{50} - n_x) / (n_y * n_x)] * (j_y * j_x)$$

- **j x** : jours de contrôle précédent l'émergence de 50 % de l'effectif total.
- **j y** : jours de contrôle suivant l'émergence de 50 % de l'effectif total.
- **n x** : effectif cumulé au j x.
- **n y** : effectif cumulé au j y.
- **n 50** : 50 % de l'effectif des adultes émergés.

I.3. Conditions expérimentales

Les boîtes de pétri en verre préparées pour l'étude des paramètres biologiques sont placés dans une étuve obscure réglée à une température de $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ et une humidité relative de $70 \pm 5 \%$.

I.4. Calcul de l'indice de sensibilité variétal 'IS'

L'indice de sensibilité de Dobie est basé sur deux critères de la dynamique des populations les plus utilisés pour la détermination de la sensibilité des graines aux attaques des insectes des denrées stockées. Il s'agit du nombre total des adultes émergents (NE) et de la durée moyenne de développement (DMD). A l'indice le plus élevé correspond la variété la plus sensible.

$$\text{IS} = [\log \text{NE} / \text{DMD}] * 100$$

II. Effet entomotoxique des variétés de haricot sur *Callosobruchus maculatus* F.

II.1. Essais sur graines entières de haricot

Les différents tests biologiques ont été réalisés sur des graines entières des six variétés de haricot à raison de 100g pour chaque variété. Ces graines sont réparties dans des bocaux à raison de 20g par bocal infesté par cinq couples de *Callosobruchus maculatus* âgés de 0-24 heures.

II.2. Effet entomotoxiques des graines reconstituées de pois chiche

II.2.1. Préparation des graines reconstituées de pois chiche

II.2.1.1. Préparation des farines

La farine de pois chiche utilisée appartient à une variété de Belgique commercialisée de calibre 10.

Les farines de pois chiche et des variétés de haricot sont obtenues après un broyage des graines par un moulin de type Warring Blendor. Les farines obtenues sont tamisées avec des tamis de 0,5 mm de diamètre de maille. Les farines obtenues sont utilisées pour confectionner des graines de pois chiche enrichies en haricot.

II.2.1.2. Préparation des graines reconstituées enrichies de farine de haricot

Les farines de haricot ont été additionnées à la farine de pois chiche dans des proportions bien connu (0 %, 10 %, 20 %, 40 %, 80 % et 100 %). Le mélange homogène des farines est réalisé dans un robot centrifuge pendant 60 secondes (Fig17).

Pour obtenir une pâte bien consistante, non cassante et facile à modeler ; nous avons réalisé des tests préliminaires afin de déterminer la quantité d'eau nécessaire. A ces 100g de mélange, nous avons donc ajouté 45ml d'eau.

Cette pâte a été par la suite placée dans une seringue pour pouvoir déposer la même quantité de pate sur une microplaque contenant plusieurs puits afin d'obtenir des graines artificielles de forme sphérique. Celles-ci ont été mises à sécher pendant 48 heures avant utilisation dans une étuve obscure réglée à une température de 20°C.

Ce procédé a été réalisé et suivi pour toutes les variétés utilisées au cours de notre expérimentation.

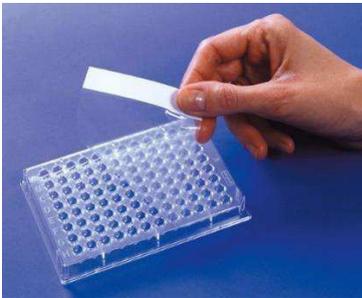
Après séchage, ces graines sont réparties dans des bocaux de dimensions cité ci-dessus à raison de 20g / bocal. Le nombre de dose étant fixé à six pour chaque variété, l'expérience a été réitérée trois fois pour chaque dose.



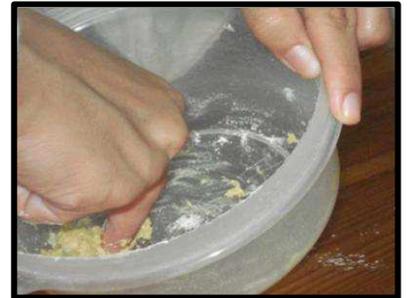
1. Pesée des farines.



2. Mélange des farines.



4. Injection dans une microplaque



3. Obtention de la pâte.



7. Obtention des graines reconstituées.

Figure 17: Schéma représentatif des étapes de confection des graines artificielles.

III. Caractérisation de la substance toxique des graines de haricot

III.1. Extraction de l'arcéline semi purifiée, la protéine à activité insecticide à partir des graines de haricot

Les protéines ont été extraites à partir des graines de six variétés de haricot selon la méthode de Sakthivelkumar et ces collaborateurs (2014). Ainsi, pour l'ensemble des variétés testées, 10g de farine de haricot ont été agités dans 200ml de NaCl (0,5M, 0,1% lazidure de sodium, 1µl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases) pendant 20 heures à une température ambiante. Après 20 h d'agitation continue, la solution a été centrifugée et le surnageant clair a été conservé à -20C°.

Le culot récupéré a subi deux réextractions à raison de 5 heures pour chacune des variétés testées, ce qui équivaut à un total de 30heures pour toute l'extraction. Les surnageants ont été combinés, puis dilués dans 5 volumes d'eau distillée froide. Le PH a été mesuré à l'aide d'un PH-mètre (PH= 6,2), la solution a été acidifiée avec le HCl à un PH de 4. Le PH acide permet la formation d'un précipité représentant la phaséoline.

Les surnageants acidifiés ont été refroidi, puis centrifugé à 30 000g pendant 20min à 4°C dans une ultracentrifugeuse Beekman J21. Le culot a été conservé et le surnageant a été dialysé dans des boudins de dialyse pendant 48 heures à 4C° contre 6l d'eau distillée, avec trois changements.

La dialyse permet le relargage des sels et donc la précipitation des globulines qui sont solubles dans les sels. Selon Gueguen (1991), la dialyse permet de situer le poids moléculaire de la molécule recherchée. En effet, la dialyse est réalisée à travers d'une membrane dont le rôle est de séparer un mélange en deux car elle possède des pores à des diamètres calibrés. Le seuil de coupure de cette membrane est de 30kDa et de 45kDa en fonction de notre molécule à rechercher.

Cette membrane présente une forme cylindrique allongée appelée boudin de dialyse. Ces derniers sont noués aux deux extrémités à l'aide de pinces afin d'éviter la fuite de nos extraits.

La taille des pores de la membrane permet uniquement le passage des molécules ayant une taille inférieure à celle des pores de la membrane. Ces molécules représentent le perméat alors que les molécules de tailles plus grandes

sont retenues à l'intérieur des boudins de dialyse formant le retentât. Le dialysat a été ultracentrifugé de nouveau à 20000g pour faire tomber les globulines précipitées dans le culot, le surnageant issu de cette ultracentrifugation constitue notre substance toxique.



1) Broyage des graines



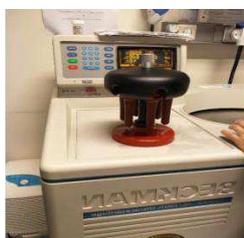
2) Poudre d'haricot



3) Préparation des solutions



4) ultracentrifugation



5) Boudin de dialyse



6) Dialyse a l'équilibre

Figure 18: Récapitulatif des étapes d'extraction d'arcéline (Original).

III.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines contenues dans la fraction acide, est réalisé par la méthode de Pierce. Pour cela, on a utilisé le Kit Pierce 660nm Assay.

Le kit de dosage des protéines par la méthode de Pierce Coomassie est une formulation stable et prête à l'emploi du réactif de dosage Bradford traditionnel pour mesurer la concentration totale de protéines par rapport à un étalon de protéines. Lorsqu'il est mélangé avec une solution protéique, le réactif acide de colorant-coomassie change de couleur du brun au bleu en proportion de la quantité de protéine présente dans l'échantillon.

Les déterminations des protéines sont effectuées par comparaison à la réponse en couleur des étalons de protéines, habituellement préparés en une série de dilutions connues de sérumalbumine bovine (BSA) ou de gamma globuline bovine (BGG).

Le kit comprend le réactif Coomassie Protein Assay Reagent et un paquet d'ampoules standard d'albumine. La procédure simple est adaptable à presque n'importe quelle échelle de volume, y compris les tubes à essai, les cuvettes et les microplaques

Pour la préparation de la gamme d'étalonnage, une série de dilutions de BSA (sérum albumine bovine) a été utilisée.

BSA	[$\mu\text{g/ml}$]	Blanc	125	250	500	750	1000	1500	2000
	μl	00				10			
Eau	μl	10				00			

Après préparation de la gamme d'étalonnage, 10 μl d'extraits protéiques des six variétés de haricot ont été déposés dans la plaque, en utilisant comme blanc le tampon d'extraction ; le chlorure de sodium NaCl. Ensuite 15 μl de solution Pierce 660 ont été introduit et les absorbances ont été mesurées au spectrophotomètre UV-Visible (SAFAS UVmc TouchSnake) à 660nm.



Figure 19: Microplaque à 96 puits pour quantification des protéines.

III.3. Détermination du poids moléculaire de la substance toxique arcéline

III.3.1. Electrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)

La détermination du poids moléculaire de la protéine à activité insecticide est réalisée par électrophorèse.

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est une technique dénaturante et séparative des protéines en fonction de leur poids moléculaire à travers un réseau macromoléculaire. Les protéines à faible taille traversent le gel facilement et migrent loin par contre les

plus volumineuses sont retenues par les mailles formées lors de la polymérisation et donc restent proches de la ligne de dépôt.

III.3.2. Préparation du gel

III.3.2.1. Gel de séparation (11%)

Pour préparer ce gel, 3,12ml d'acrylamide sont ajouté à 3,18ml d'eau MilliQ et 2,13ml de tampon Tris-Hcl à PH 8,8. Après agitation délicate, nous avons ajouté 42,5µl de SDS à 20%, 42,5µL d'APS 10% et 2,55µl de TEMED, le mélange est agité tout en évitant la formation des bulles d'air. Par la suite, on patiente jusqu'à ce que ce gel se solidifie ensuite, nous incorporons le deuxième gel de concentration à 5%.

III.3.2.2. Gel de concentration (Gel stacking) (5%)

Pour la préparation du gel, 0,58 ml d'acrylamide sont ajouté à 2ml d'eau MilliQ et 0,88ml de tampon Tris-Hcl à PH 6,8. Après agitation délicate, nous ajoutons 17,5µl de SDS 20%. Avant de déposer le gel sur la plaque on ajoute 17,5µL d'APS 10% et 4,2µl de TEMED, le mélange est bien agité avant dépôt. On nettoie et on sèche les plaques avant utilisation.

On pose le joint d'étanchéité sur la plaque puis, on met en place des espaceurs et de la deuxième plaque en verre. L'ensemble est ensuite consolidé à l'aide des pinces.

On fait couler le gel de séparation entre les 2 plaques à l'aide d'une pipette. Le gel est ensuite recouvert d'éthanol. Après solidification du gel on verse l'éthanol et on ajoute le gel de concentration, après cela on met un peigne et on laisse solidifier. Après solidification on retire le peigne, on obtient des puits sur lesquels on déposera nos échantillons.

Les plaques et les cuves de migration sont placées sur le support. Les cuves sont remplies avec le tampon de migration en commençant par la partie supérieure puis inférieure.

III.3.3. Conduite de l'électrophorèse

Nous avons mélangé la fraction contenant la protéine toxique avec dulaemmi (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 20% glycérol, 4% β -mercaptoethanol et bleu de Bromophénol) ce dernier permet de surveiller la migration et dénature les protéines. Nous avons utilisé le marqueur de taille Prestained Protein Ladder (10-180 KDa).

Les échantillons sont déposés dans les puits à l'aide d'une micropipette. Les électrodes de la cuve sont reliées au générateur. La migration se fait à 70 volts puis à un voltage plus important jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bord inférieur de la plaque.

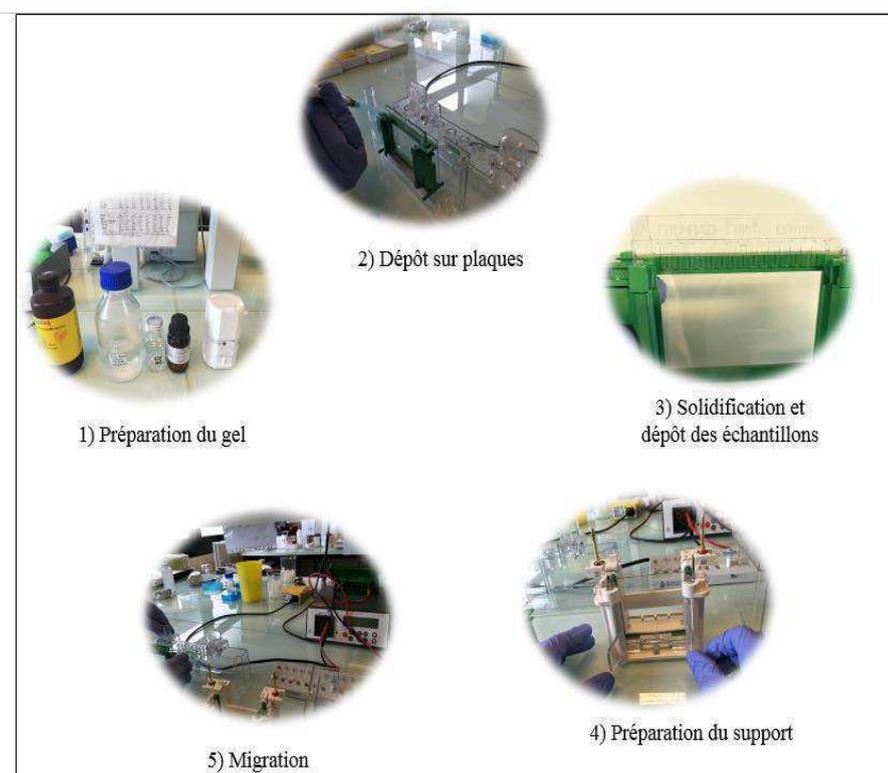


Figure 20: Etapes de réalisation de l'électrophorèse SDS-PAGE (Original).

III.4. Immunoblotting (Western Blot)

Cette technique permet de cibler l'arcéline en utilisant un AC primaire capable de reconnaître d'une manière spécifique notre protéine d'intérêt, cet AC est révélé par la suite par une AC secondaire anti-isotype, capable de reconnaître l'AC primaire. Pour cela, les protéines séparées par électrophorèse ont été transférées sur

une membrane de nitrocellulose (Thermofisher, Merelbeke, Belgium) par électrotransfert pendant 75min à 150V à 4C°, en utilisant le tampon de transfert (0,25M Tris, 200Mm Glycine, 20% méthanol).

Après transfert la membrane a été saturée pendant une nuit par une solution de lait à 5% contenant 0,1% de Tween20 préparée dans le TBS (20Mm Tris, 150Mm NaCl, PH 7,6) cela permet de couvrir la membrane par les protéines du lait, pour que l'anticorps reconnait exclusivement la protéine à activité entomotoxique.

Par la suite la membrane a été incubée pendant 3H dans une solution à base de lait en poudre à 2,5% renfermant l'anticorps de lapin anti arcéline (Rabbit IgG polyclonal antibody), ce dernier est capable de reconnaître des épitopes conservés à notre substance toxique. La membrane a été lavée 5 fois par la solution du lait à 2,5%, afin d'éliminer l'excès d'anticorps. Après lavage nous avons introduit l'anticorps secondaire anti lapin marqué par une peroxidase, cet anticorps reconnait l'anticorps primaire. Les anticorps liés ont été détectés par chimioluminescence, de sorte que la lumière produite par la réaction enzymatique est détectée par imagerie numérique avec un système de caméra CCD (Odyssey® Fc, Bad Homburg, Allemagne).

IV. Effet entomotoxique de l'arcéline sur les paramètres biologiques de *Callosobruchus maculatus*

Pour étudier l'effet entomotoxique de l'arcéline sur *Callosobruchus maculatus*, quatre concentrations différentes de la protéine toxiques (0.05 %, 0.1 %, 0.15 % et 0.2 %) ont été retenues pour la réalisation de ces essais à base de graines artificielles. Pour cela 10g de farine de pois chiche ont été mélangés avec 10ml d'eau contenant les concentrations de cette entomotoxine. De ce fait, on a obtenu quatre pâtes molles relatives aux quatre doses différentes.

La pâte a été introduite dans une microplaque 96 puits à l'aide d'une seringue. La plaque a été déposée par la suite à -20°C pendant 1H, afin d'obtenir une pâte modelable.

Des graines homogènes ont été confectionnées à partir des puits. Les graines ont été déposés dans une boîte de pétri dans une étuve à 20°C et une hygrométrie de $60 \pm 5\%$ pendant 48H pour séchage.

Ces graines ont été placées dans des bocaux à raison de dix graines infestées par cinq couples de *C. maculatus* pendant quatre jours. L'effet de diverses doses de la substance entomotoxique sur la fécondité, la fertilité et la mortalité a été étudié.

V.Expression des résultats

Pour donner une signification à notre étude, Les résultats obtenus sont traités à l'aide du logiciel xlstat version 6 Pour chaque critère étudié, les intervalles de confiances ont été calculés.

Les effets des divers traitements ont été analysés par une analyse de la variance de xlstat suivie du test de Newman & Keuls par la comparaison multiple des moyennes.

Par ailleurs, l'efficacité des différentes doses sur la mortalité des individus de *Callosobruchus maculatus* est exprimée en pourcentage de mortalité qui est corrigé au moyen de la formule d'ABBOT (1925).

$$\% \text{ Mc} = \frac{\% \text{ M traité} - \% \text{ M témoin}}{100 - \% \text{ M témoin}} * 100$$

- **Mc : Mortalité corrigée.(%)**
- **% M traité : Mortalité enregistrée dans les lots traités (%)**.
- **% M témoin : Mortalité enregistrée chez le témoin**

Le pourcentage des mortalités corrigées est transformer en probit et sont représentés graphiquement en fonction des logarithmes des doses afin d'évaluer la dose létale 50 (DL50) ou, des logarithmes de temps pour estimer le temps létale.

CHAPITRE II : Résultats et discussion

I. Etude des paramètres biologiques de *Callosobruchus maculatus* sur graines entières de haricot et sur graines reconstituées de pois chiche

I.1. Etude sur graines entières

I.1.1. La fécondité

Les résultats mentionnés dans le tableau 4, nous permettent de relever une variabilité de la fécondité sur les différentes variétés de haricot.

Cette fécondité est considérable sur la variété Pinto avec 10,6 œufs / femelle, suivie par les deux variétés ZETA et Royal blanc qui affichent respectivement une fécondité de 9 œufs / femelle et 8,8 œufs / femelle puis la variété Judia avec 7,06 œufs/femelle. Sur la variété S102, on note une fécondité moyenne de 4,39 œufs / femelle et en dernier lieu, on retrouve la variété sauvage *Phaseolus caracalla* avec une fécondité moyenne de 2,49 œufs / femelle.

Débutant au deuxième jour, après l'accouplement des insectes, cette fécondité s'échelonne jusqu'au 6^{ème} jour pour les variétés *Phaseolus caracalla*, S102 et Pinto et jusqu'au 8^{ème} jour pour les variétés Zeta, judia et la royal blanche (figure 21).

Sur l'ensemble des variétés représentées, le maximum de ponte est observé au 2^{ème} jour avec 5,84 œufs / femelle sur la variété Pinto, avec 4,4 œufs / femelle sur royal blanche, 4,08 œufs / femelle sur Zeta et 3,9 œufs / femelle sur Judia. La S102 présente 3 œufs / femelle et enfin la variété sauvage *Phaseolus caracalla* avec une fécondité de 1,77 œufs / femelle.

Au 8^{ème} jour, la ponte est faible où on enregistre 0,04 œufs / femelle sur Zeta puis vient la variété Judia avec 0,09 œufs/femelle et enfin la variété de haricot blanc avec un nombre d'œufs émis de 0,14 œufs / femelle. Pour les autres variétés, le nombre d'œufs émis/femelle s'annule.

Cependant, par rapport au pois chiche *Cicer arietinum*, qui affiche une fécondité moyenne de 57,22 œufs par femelle ; l'ensemble des variétés testées de haricot du genre *Phaseolus* présentent une faible fécondité et entraînant une

diminution de 4,36 % pour la variété sauvage, variété jugée la plus résistante une diminution de 18,59% pour la variété pinto jugée la plus résistante aux attaques de *Callosobruchus maculatus*.

Parallèlement, une certaine variabilité de la fécondité est enregistrée sur les différentes variétés testées de haricot. Cette variabilité est considérable sur la variété Pinto avec 10,6 œufs / femelle. Les deux variétés Zeta et le haricot blanc et affichent respectivement une fécondité moyenne assez rapprochée avec 9 œuf / femelle et 8,8 œufs / femelle.

Sur la variété S102, on note une fécondité moyenne de 4,39 œufs / femelle et en dernier lieu, la variété sauvage *Phaseolus caracalla* avec une fécondité moyenne de 2,49 œufs / femelle.

Débutant au deuxième jour, après l'accouplement des insectes ; cette fécondité s'échelonne jusqu'au 14^{ème} jour pour le pois chiche « variétés témoin » et jusqu'au 8^{ème} jour pour les variétés de haricot Zeta, Haricot blanc et Judia. Pour les autres variétés, S102, Pinto et *Phaseolus caracalla*, la durée de ponte est de 6 jours.

Selon Lepesme (1944), les femelles de *Callosobruchus maculatus* F. préfèrent pondre sur des variétés à surfaces lisses. Seulement, les résultats obtenus au cours de notre expérimentation révèlent un taux nettement inférieur d'œufs émis quotidiennement par cette même espèce sur les variétés de haricot par rapport à celui obtenu sur pois chiche. Ceci nous amène à dire que l'aspect textural n'est pas le seul facteur dont dépend la ponte mais le choix repose sur la composition biochimique des graines. En effet, le haricot commun *Phaseolus vulgaris* est doté de composés défensifs généraux qui le protègent contre l'attaque des bruches de pois chiches.

Tableau 4: Influence des graines entières des six variétés de haricot sur la fécondité des femelles de *Callosobruchus maculatus* F

JOURS	FECONDITE CUMULEE TOUS LES DEUX JOURS						
	EN FONCTION DES VARIETES						
	V. témoin pois chiche	V.1 <i>Phaseolus caracalla</i>	V.2 S102	V3 Judia	V.4 Pinto	V.5 Zeta	V.6 Haricot blanc
2 ^{ème} jour	18.92	1,77	3	3,9	5.84	4.08	4.4
4 ^{ème} jour	16,01	0,65	1.19	2,38	3.86	3.36	2.52
6 ^{ème} jour	12.76	0.07	0,20	0,69	0.90	1.52	1.74
8 ^{ème} jour	7.28	0.00	0.00	0,09	0.00	0.04	0.14
10 ^{ème} jour	1.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
12 ^{ème} jour	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14 ^{ème} jour	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16 ^{ème} jour	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Fécondité cumulée par femelle	57,22± 7,87	2,49±0,63	4,39±1,12	7,06±1,47	10,6±1,83	9±1,64	8,8±1,65

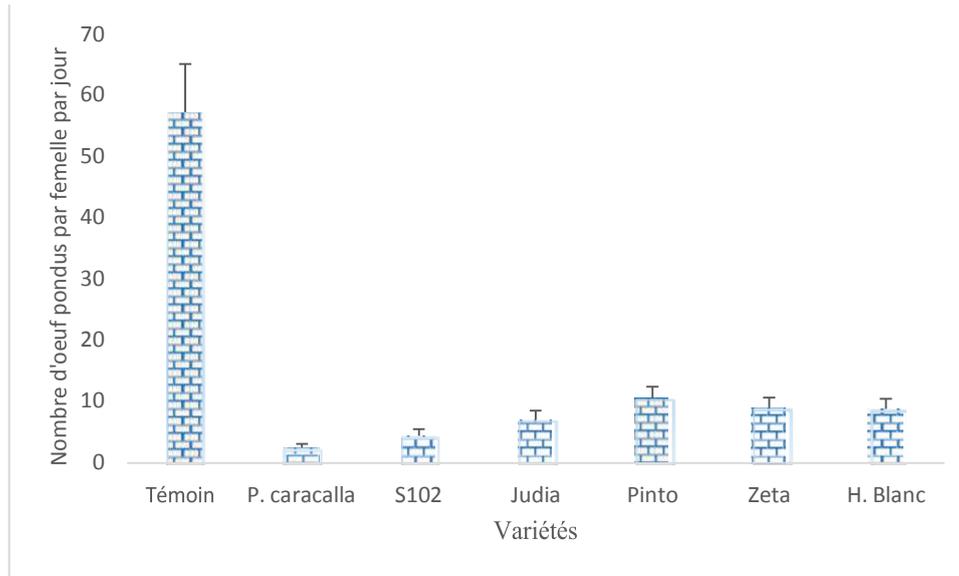


Figure 21: La fécondité de *C. maculatus* sur les graines entières des six variétés testées de haricot.

Le test de NEWMAN& KEULS au seuil de 5 % met en évidence l'apparition de trois groupes homogènes pour la fécondité des femelles de *C. maculatus*.

Tableau 5: Analyse de la variance des résultats de l'évolution de la fécondité de *Callosobruchus maculatus* F. sur graines entières des variétés de Haricot.

Source	ddl	S.C.M.	C.M.	F de Fischer	Pr > F	Modalités	Moyenne
Modèle	5	267517.20	53503.44	249.20	< 0,0001	<i>P. caracalla</i>	13.93 A
Résidus	24	5152.80	214.70			S102	23.70 AB
Total	29	272670.00				Judia	35.00B
						Haricot blanc	37,00B
						Zeta	39.00 B
						Pinto	40.00 B
						Témoin	287.10 C

Le groupe A est représenté par les deux variétés : *Phaseolus caracalla* et S102 avec des valeurs relativement basses respectives de 13,93 et 23,70.

La variété S102 est située dans un groupe intermédiaire entre les deux groupes A et B.

Le groupe B est formé par les variétés Judia, haricot blanc, Zeta et Pinto avec des moyennes respectives de 35,00 ; 37,00 ; 39,00 et 40,00.

Le groupe C représenté par la variété témoin (Pois chiche) se détache nettement avec une moyenne de 287,10.

D'après ces résultats, nous pouvons dire que les deux variétés *Phaseolus caracalla* et S102 paraissent de loin moins favorables à la ponte de *Callosobruchus maculatus* F. car la ponte est nettement inférieure par rapport aux autres variétés testées.

I.1.2. La fertilité

Sur les graines entières de haricot testées, l'éclosion des œufs de *Callosobruchus* est nulle. De ce fait, le haricot ne semble pas être un substrat favorable à l'éclosion des œufs.

Le nombre élevé d'œufs par femelle non éclot montre que les graines de haricot sont dotées d'un potentiel entomotoxique due à la présence de substances telles que les lectines tronquées plus précisément à la présence de la protéine arceline. Une protéine de stockage des graines de haricot dont le rôle est d'assurer la protection des graines stockées face aux attaques de *Callosobruchus maculatus* c'est-à-dire qu'elles pourraient empêcher l'éclosion des œufs et le développement larvaire de cette espèce. En effet, Jansen et *al.*, 1976, Gatehouse et Gatehouse, 1998 ont révélé des taux élevés en lectines empêchant le développement de *Callosobruchus maculatus* chez les espèces de légumineuses comme *Dolichos lablab* et *Rhynchosystena saucia*.

I.1.3. La longévité

Les résultats des longévités représentées par les figures 22 et 23 montrent que quelle que soit la variété testée, la longévité moyenne varie de 2 à 6 jours pour les mâles et de 2 à 4 jours pour les femelles. Ainsi la durée de vie des mâles est supérieure à celle des femelles, ce qui est le contraire sur pois chiche. En effet, sur ce dernier, à une température de 30°C et une humidité de 70% ± 5%, la durée de vie

des mâles est inférieur à celle des femelles de *Callosobruchus maculatus* et varie de 4 à 6 jours pour les mâles et de 5 à 6 jours pour les femelles (Karbache, 2000).

Sur graines entières de certaines variétés de pois chiche nouvellement introduites, Rezkellah (1998) a obtenu une longévité moyenne de 5 à 6 jours pour les femelles et de 3 à 4 jours pour les mâles dans les mêmes conditions de l'expérience citées ci-dessus. Cependant, ces derniers restent toujours inférieurs à ceux obtenus par Khalfi (1983), qui affiche une longévité moyenne des femelles de 8.5 jours et celle des mâles à 7.3 jours à une température de 28°C et une hygrométrie de 40% ± 5%. Cette différence est surtout liée aux conditions expérimentales.

Tableau 6: longévité moyenne des mâles et des femelles de *Callosobruchus maculatus* sur les graines entières des six variétés de haricot et sur *Cicer arietinum*.

Variété	Longévité moyenne en jour des males	Longévité moyenne en jour des femelles
<i>Phaseolus caracalla</i>	2,6 ± 0,10	2,28 ± 0,09
S102	3,48 ± 0,23	3,36 ± 0,12
Pinto	3,88 ± 0,04	3,6 ± 0,08
Zeta	4,44 ± 0,07	4,6 ± 0,13
Haricot blanc	5,52 ± 0,18	4,24 ± 0,17
Judia	5,22 ± 0,23	5,82 ± 0,30
<i>Cicer arietinum</i>	6,22 ± 0,23	6,73 ± 0,29

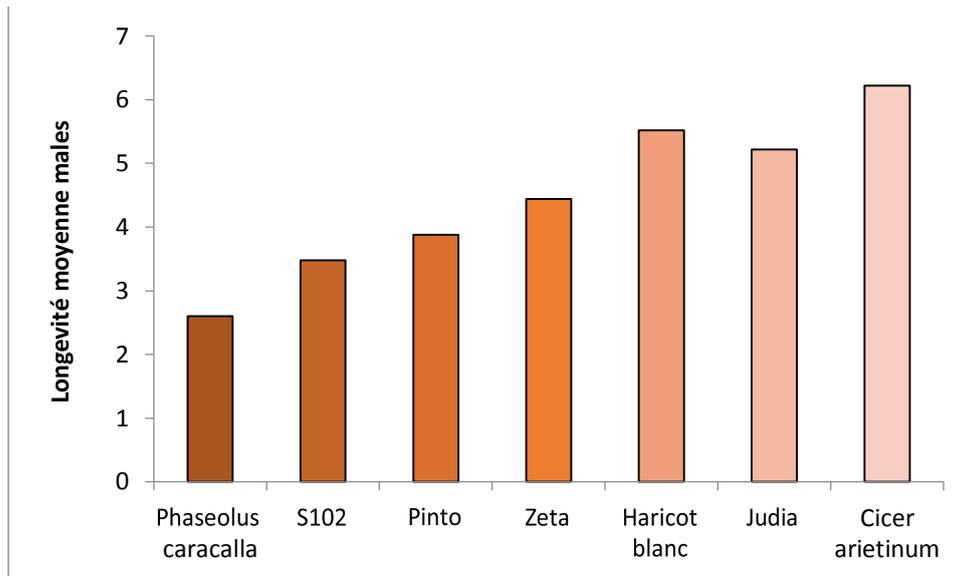


Figure 22: Longévité moyenne des mâles de *Callosobruchus maculatus* sur les graines entières des six variétés de haricot.

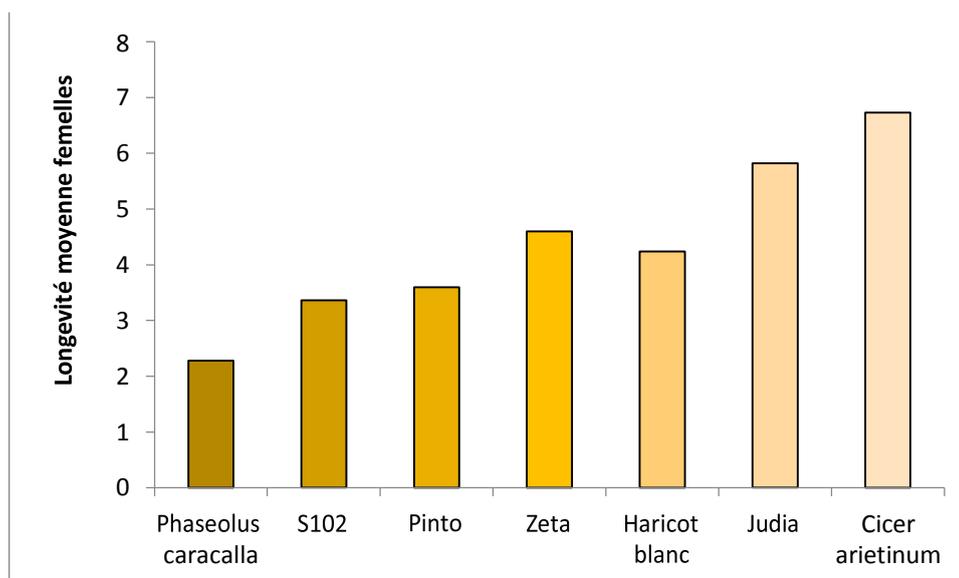


Figure 23: Longévité moyenne des femelles de *Callosobruchus maculatus* sur les graines entières des six variétés de haricot.

I.1.4. La mortalité

Dans tous les essais, le dénombrement des insectes morts est réalisé quotidiennement après l'exposition de ces derniers aux différentes variétés de haricot testées.

Le tableau 7 montre que pour les six variétés de haricot testées, les mortalités enregistrées après 72 heures sont élevées, nous avons noté 76,51 % pour *Phaseolus*

caracalla, 57,20 % pour la S102, 38,56 % pour Pinto, 27,53 % pour Zeta et 23,24 % pour la variété de haricot blanc et enfin 21,32 pour Judia.

La létalité augmente nettement après le 3^{ème} jour d'exposition et est totale au 5^{ème} jour pour *P. caracalla*, au 6^{ème} jour pour la S102 et Pinto. Au 9^{ème} jour pour Zeta et enfin au 10^{ème} jour pour les deux variété de haricot blanc et Judia. Ce pourcentage est de 2 % sur *Cicer arietinum*.

Tableau 7: Influence des graines entières des six variétés de haricot sur la mortalité de *Callosobruchus maculatus* au 3^{ème} jour.

<i>Phaseolus caracalla</i>		S 102		Pinto		Zeta		Haricot blanc		Judia		Témoin	
Mortalité	M.M.	% M.C.	M.M.	% M.C.	M.M.	% M.C.	Mortalité						
desadultes	0,77	76,51	0,56	57,20	0,37	38,56	0,28	27,53	0,24	23,24	22,8	21,32	2

Les tests biologiques concernant l'activité entomotoxique des variétés de haricot mesurée par le taux de mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus* montrent que sur graines entières, les six variétés de haricot ont un effet sur la mortalité de cette espèce. Cependant, le calcul du pourcentage de mortalité corrigée nous permet d'établir le classement suivant :

1. *Phaseolus caracalla*.
2. S102.
3. Pinto.
4. Zeta.
5. Haricot blanc
6. Judia.

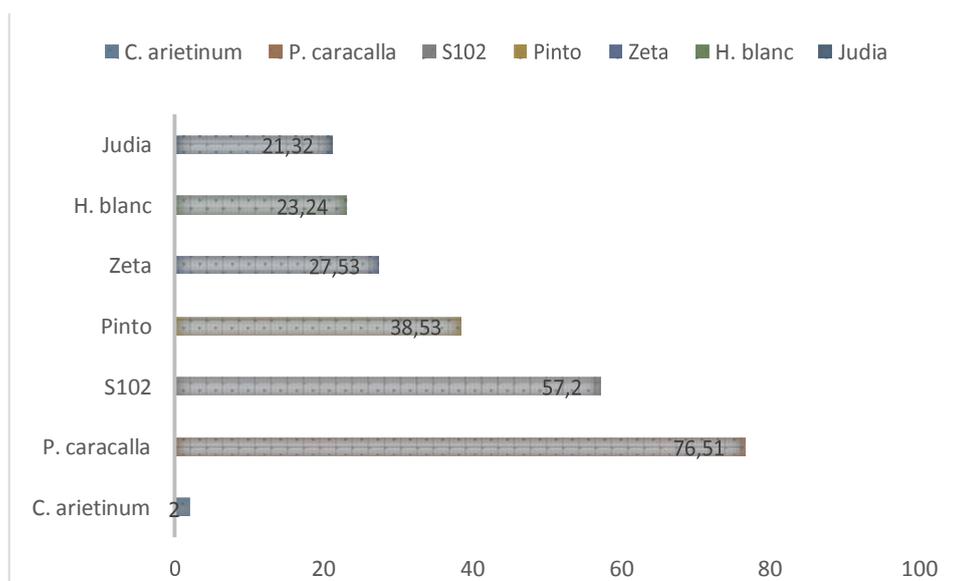


Figure 24: Evolution de la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus* sur les graines entières des six variétés de haricot.

I.2. Etude sur graines reconstituées

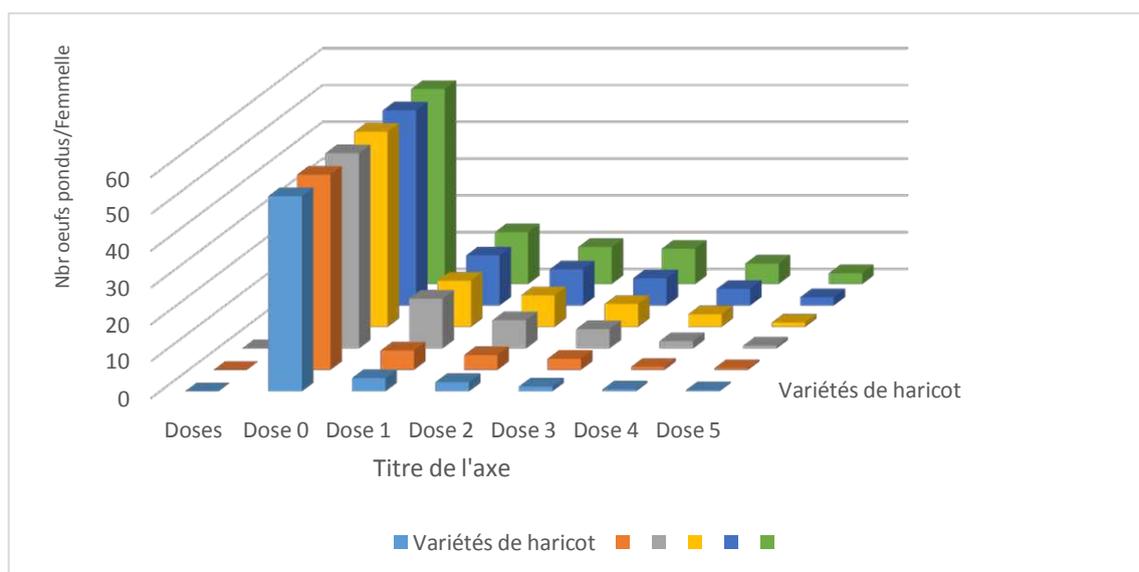
I.2.1. La fécondité

Les résultats de nos essais consignés dans le tableau 8 montrent que toutes les variétés haricot testées à différentes doses affectent clairement la fécondité de *Callosobruchus maculatus*. En effet, le taux d'œufs émis par femelle est nettement inférieur à celui obtenu chez le témoin « pois chiche commercial » à la dose 1 (10 %) soit une diminution de 49,42 œufs / femelle pour la variété sauvage *Phaseolus caracalla*, suivie par la S102 avec une différence de 46,77 œufs / femelle et Zeta avec 40,46 œufs / femelle.

Pour les variétés Pinto et haricot blanc, cette différence est largement similaire avec respectivement 39,5 œufs / femelle et 39,42 œufs / femelle et enfin Judia avec 38,96 œufs/femelle.

Tableau 8: Influence des six variétés de haricot étudiées sur grains reconstituées de pois chiche sur la fécondité moyenne par femelle de *Callosobruchus maculatus* F.

Doses	Variétés de haricot					
	<i>P. caracalla</i>	S102	Pinto	Zeta	Haricot blanc	Judia
Dose 0	53,02	53,02	53,02	53,02	53,02	53,02
Dose 1	3,60	5,25	13,52	12,56	13,60	14,06
Dose 2	2,51	4,01	7,67	8,60	9,81	10,03
Dose 3	1,32	3,04	5,24	6,26	7,39	9,59
Dose 4	0,52	0,81	1,97	3,45	4,52	5,56
Dose 5	0,34	0,49	0,74	1,20	2,24	2,93

**Figure 25:** Effet dose des six variétés de haricot sur la fécondité de *Callosobruchus maculatus* F. étudiée sur grains reconstituées de pois chiche.

Par ailleurs, pour l'ensemble des variétés de haricot étudiées sur grains reconstituées, nous constatons que la fécondité moyenne par femelle de *C. maculatus* la plus élevée est observée avec la plus faible dose (10 %). Celle-ci diminue à chaque fois que la dose augmente de (10 à 100 %).

Ces résultats montrent que les doses les plus efficaces contre *C. maculatus* sont la D3=40%, D4=80% et D5=100%. Ces dernières témoignent l'effet engendré

par les farines des différentes variétés haricot traduit par une diminution du nombre d'œufs émis sur ces graines reconstituées.

En effet, aucun œuf n'est pondu sur les graines enrichies en farine de haricot au 14ème jour pour l'ensemble des variétés excepté la variété sauvage de haricot *P. caracalla* et la variété S102 où l'oviposition s'arrête au 10ème jour.

L'analyse de la variance de l'étude de la fécondité de *C. maculatus* sur les six variétés de haricot étudiées sur graines reconstituées de pois chiche montre à une probabilité inférieure à 0.05 une différence hautement significative par rapport au témoin. Ceci aux différentes doses testées.

Tableau 9: Analyse de la variance des résultats de l'évolution de la fécondité de *Callosobruchus maculatus* F. sur les six variétés de haricot à graines reconstituées

Source	ddl	S.C.M.	C.M.	F de Fischer	Pr > F
Modèle	9	809537,12	89948,57	224,68	< 0,0001
Résidus	140	56047,41	400,33		
Total	149	865584,54			

Pour le facteur variété, le test de NEWMAN et KEULS attribue l'ensemble des variétés testées de haricot à un seul groupe homogène.

En ce qui concerne le facteur dose, la D5= 100% et la D4=80% sont les plus efficaces rassemblées en un seul groupe A, la D3=40% et la D2=20% sont dans le groupe B. La D1 et la D0 appartiennent respectivement aux groupes C et D.

A la D1=10%, les variétés *Phaseolus caracalla* et S102, affichent un nombre insignifiant d'œufs émis par femelle par rapport au nombre d'œufs émis par le témoin et les autres variétés. Néanmoins, ces deux variétés semblent contenir des teneurs élevées de substances entomotoxiques par rapport aux autres variétés face aux attaques de la bruche du pois chiche *C. maculatus*.

L'observation essentielle qui ressort de ce test est que les graines de pois chiche reconstituées enrichies en farine de haricot contiennent des composants biochimiques qui agissent négativement sur la fécondité des femelles de *C. maculatus*.

En effet, pendant la maturation des graines de légumineuses, des substances de protection sont élaborées entre autre les arcélines chez le haricot. Ainsi, quand elles sont présentes dans les graines de tous les génotypes des espèces cultivées, elles peuvent représenter la protéine principale dans la graine (Sparvoli *et al.*, 1998) et leurs présence est associée à la résistance aux bruches du pois chiche.

Par ailleurs, par la spécificité des arcélines chez les légumineuses, les larves d'une espèce de bruches ne consomment généralement que les graines d'une espèce déterminée de plante (Rendon-Anay *et al.*, 2017).

De ces résultats, nous remarquons que les arcélines, protéines apparentées aux lectines affectent sérieusement la fécondité de *C. maculatus* contrairement au témoin qui s'avère sensible aux attaques de cette espèce. Ceci implique que ces arcélines sont étroitement liées aux mécanismes de défense des graines de haricot. En effet, cette protection est liée au degré de glycosylation de cette protéine.

Selon Sakthivelkumar *et al.*,(2014), une évolution importante du locus APA (Arcelin / PHA/Amylase inhibiteur) s'est produite chez *Phaseolus vulgaris* dans laquelle un gène d'ancêtre de lectine a subi une transduction en donnant naissance aux lectines à forme biologiquement active et à partir de la duplication, les arcélines.

Par ailleurs, l'identification de ces protéines insecticides dans différentes espèces sauvages de légumineuses Algériennes fournira, espérons bien, de nouveaux facteurs potentiellement actifs contre différents insectes nuisibles à la protection des cultures car le germoplasme des légumineuses est considéré comme une source importante de gènes pour plusieurs aspects bénéfiques, notamment, la résistance aux insectes pour les futures programmes d'amélioration des cultures de variétés cultivées.

I.2.2. La fertilité

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 10, nous remarquons que le maximum d'émergence est observé sur le témoin soit 96.73 % (graines reconstituées composées de 100 % de farine de pois chiche).

Tableau 10: Effet des doses des six variétés de haricot sur le pourcentage moyen d'émergence de *Callosobruchus maculatus* étudié sur graines reconstituée de pois chiche.

Doses	Variétés de haricot.					
	<i>Phaseolus caracalla</i>	S102	Pinto	Zeta	Haricot blanc	Judia
D0= Témoin	96,73 %	96.73 %	96.73 %	96.73 %	96.73 %	96.73 %
D1 (10%)	29,00 %	43,33 %	63,00 %	67,66 %	82,33 %	80,33 %
D2 (20%)	13,00 %	18,33 %	49,66 %	52,33 %	60,00 %	62,66 %
D3 (40%)	0,00 %	6, %	30,66 %	35,33 %	40,00 %	42,00 %
D4 (80%)	0,00 %	0,00 %	0,00 %	12,66 %	21,00 %	19,00 %
D5 (100%)	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Les six variétés de haricot introduites isolément sous forme de farine à différentes doses (10%, 20%, 40%, 80% et 100%) dans les graines reconstituées de pois chiches ont permis une diminution proportionnelle du taux d'émergence suite à l'augmentation des doses. Ce taux s'annule pour la dose 100 % quelque soit la variété de haricot étudiée et dès la dose D3 (40%) pour *Phaseolus caracalla* et D4 (80%) pour la S102 et Pinto.

A la dose D1= 10%, la variété *Phaseolus caracalla* a inscrit une diminution de 68 % par rapport au témoin. Cette diminution avoisine 53% pour la S102 ; de 40% pour Pinto ; de 29 % pour Zeta, 16% pour la variété de haricot blanc et 14% pour Judia.

Par ailleurs, à la dose 20 %, nous avons obtenu un pourcentage moyen d'émergence de 13 % avec la variété *Phaseolus caracalla*. Suivie par la S102

« variété Brésilienne de haricot noir avec un pourcentage d'émergence moyen de 18,33 %.

Les autres variétés de haricot ont affiché des pourcentages moyens d'émergences assez proches et sont de 49,66 % sur Pinto, 52,33 % sur Zeta, 60 % sur la haricot blanc et 62,66% sur Judia.

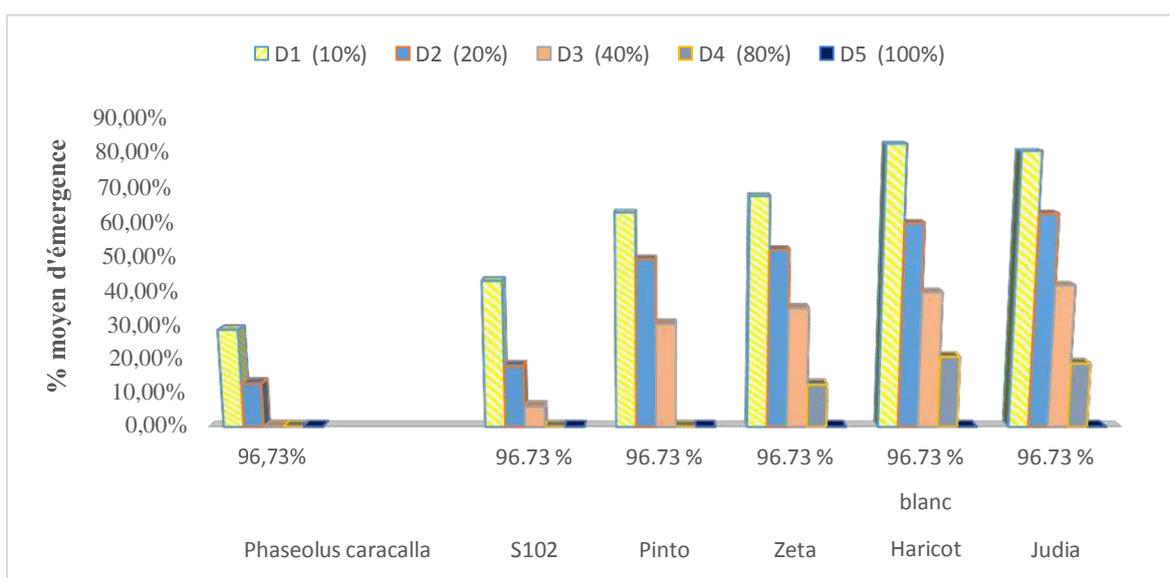


Figure 26: Pourcentage moyen d'émergence de *Callosobruchus maculatus* sur les six variétés de haricot testées aux différentes doses étudiées sur graines reconstituées de pois chiche.

Sur la variété sauvage *P. caracalla*, à la dose 3 (40 %), aucune émergence n'a été observée. Sur les autres variétés de haricot, ce pourcentage a considérablement diminué par rapport aux résultats obtenus avec la dose 1 (10 %). Ainsi, à 40% on note un pourcentage moyen d'émergence de 6 % sur la S102 suivie par Pinto et Zeta qui présentent des pourcentages moyens d'émergence assez proches et sont respectivement de 30,66 % et 35,33 %. Enfin, se classe la variété de judia avec 42% suivie de haricot blanc qui affiche un pourcentage d'émergence de 40 %.

A la dose 4 (80 %), le pourcentage d'émergence moyen est observé que sur les variétés Zeta, Judia et haricot blanc 12,66%, 19% et 21%.

Enfin, à la dose 5 (100 %), les émergences sont nulles sur toutes les variétés de haricot testées.

De ce fait, nous pouvons dire qu'il soit sous forme de graines entières ou reconstituées de pois chiche, le haricot offre des conditions défavorables au bon développement des larves et à l'émergence des adultes de *Callosobruchus maculatus*. La dureté du tégument de la graine n'est pas à l'origine de l'absence du développement de *C. maculatus* sur graines de haricot.

I.2.3. Effet des six variétés de haricot sur la mortalité des adultes

Les résultats mentionnés dans le tableau 11 montrent que la toxicité des six variétés de haricot présentées sous forme de graines reconstituées de pois chiche varie d'une variété à une autre pour les différentes doses testées.

Ainsi, l'étude des mortalités cumulées au troisième jour justifie cette différence (Figure. 27, 28 et 29).

La variété sauvage de haricot *Phaseolus caracalla* s'avère la plus toxique à la dose D2 affichant une mortalité corrigée de 55 %, elle est suivie par la S102 et Pinto qui présentent des pourcentages de mortalité corrigée respectifs de 26 % et 21 %. Les variétés Zeta et haricot blanc affichent un faible pourcentage de mortalité corrigé de 6 %. Ce pourcentage est de 5% chez la variété Judia.

A la dose D3, les mortalités sont importantes au troisième jour sur *Phaseolus caracalla* (63 %). Pour les autres variétés, le pourcentage de mortalité corrigée augmente et on enregistre respectivement 37 %, 32 % sur les deux variétés S102 et Pinto, les variétés Zeta et haricot blanc présentent le même pourcentage de mortalité corrigé et est de 13%. Enfin, la variété Judia le plus faible pourcentage de mortalité qui est de 9%.

Tableau 11: Toxicité de la farine des six variétés de haricot vis-à-vis des adultes de *Callosobruchu maculatus* après trois jours d'exposition.

Doses (%)	Log Doses	<i>Phaseolus caracalla</i>		S102		Pinto		Zeta		Haricot blanc		<i>Judia</i>	
		% MM	% M.C	% MM	% M.C	% M.M	% M.C	% MM	% M.C	% M.M	% M.C	% MM	% M.C.
D1= 10	1	35	34	14	12	11	9	3	1	3	1	3	1
D2= 20	1,3	53	52	27	26	22	21	8	6	8	6	5	5
D3= 40	1,6	64	63	38	37	33	32	15	13	15	13	7	9
D4= 80	1,9	74	73	59	58	48	47	22	20	20	18	14	12
D5= 100	2	77	76	65	64	53	52	26	24	24	22	17	15

Concernant la D4, les mortalités sont respectivement pour *Phaseolus caracalla*, S102 et Pinto de 73 %, 58 % et 47 % ; alors que pour la D1= 10%, ce taux ne dépassait pas les 34 % pour *Phaseolus caracalla*, 12 % pour la S102 et 9% pour Pinto.

En ce qui concerne les variétés Zeta, Haricot blanc et Judia, le pourcentage de mortalité corrigée est nettement supérieur à celui enregistré à la dose D1=10% et est respectivement de 20, 18 et 12 %.

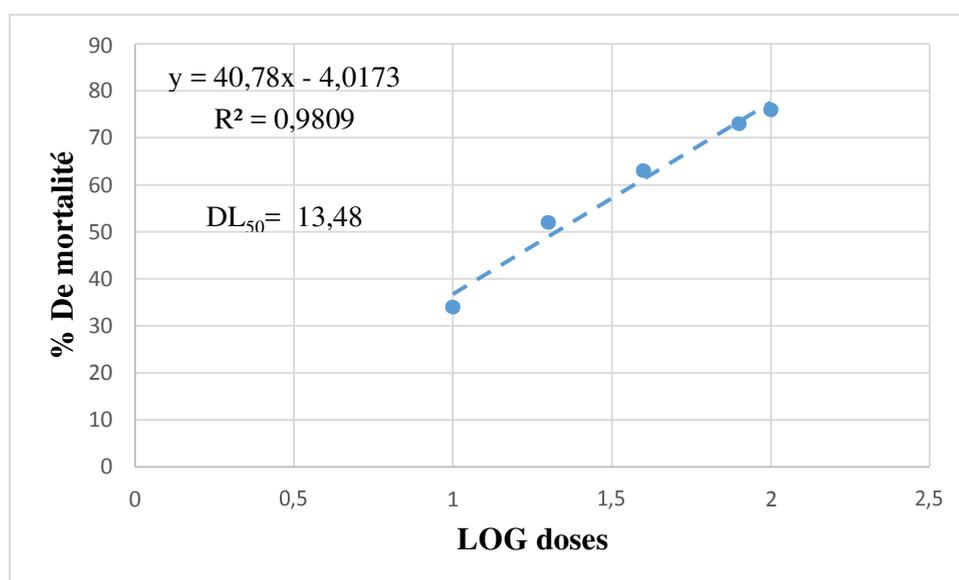


Figure 27: Activité entomotoxique de *Phaseolus caracalla* sur les adultes de *C. maculatus*

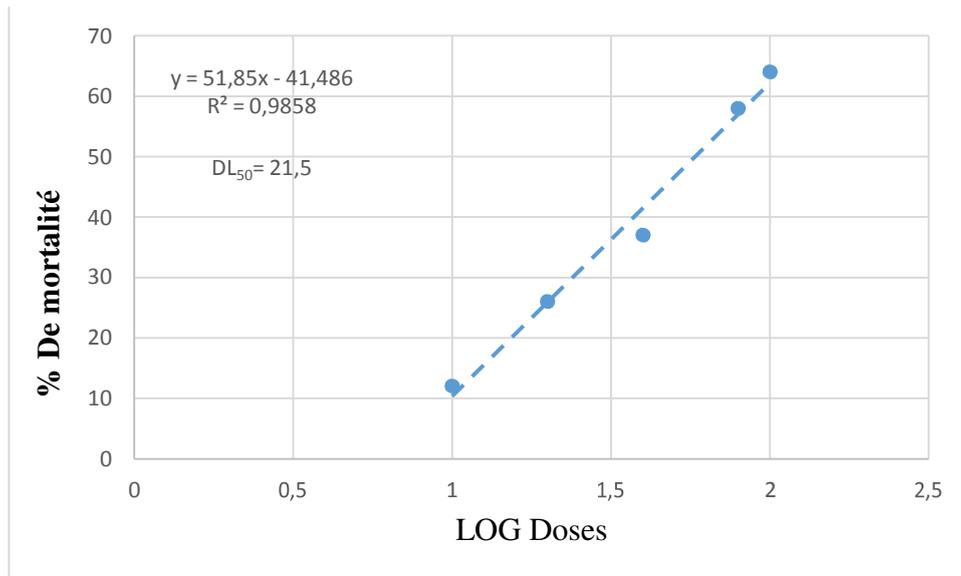


Figure 28: Activité entomotoxique de S102 sur les adultes de *C. maculatus*.

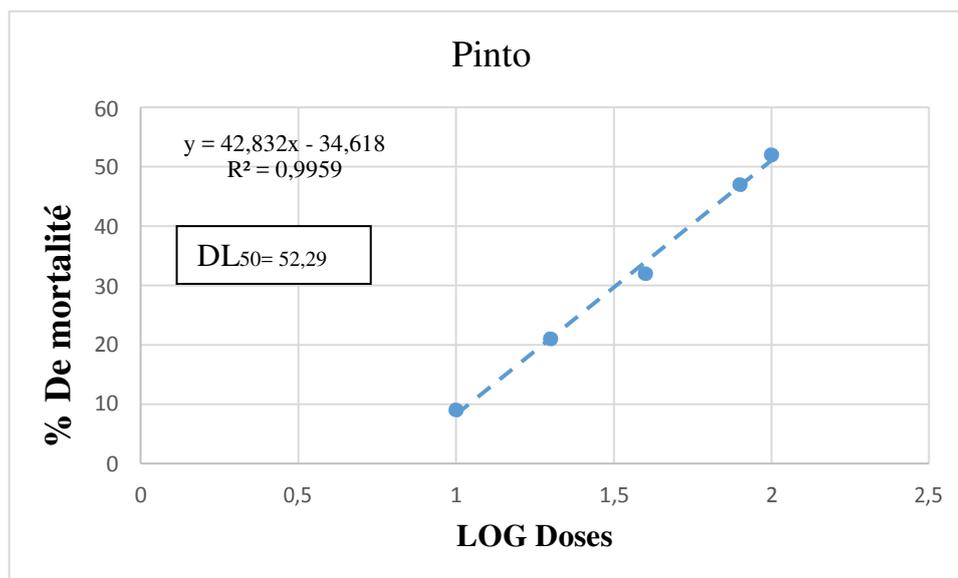


Figure 29: Activité entomotoxique de Pinto sur les adultes de *C. maculatus* F

A la dose $D5 = 100\%$, le pourcentage de mortalité corrigée sur les variétés *Phaseolus caracalla*, S102 et Pinto diffère légèrement à celui obtenu avec la dose $D4 = 80\%$. Sur Judia, ce pourcentage ne dépasse pas les 15%. Pour les variétés Zeta et Haricot blanc, le pourcentage de mortalité corrigée est respectivement de 24 et 22% à la dose $D5$.

De ces résultats, nous constatons que quelle que soit la variété testée, le haricot parait toxique à partir de la dose D3 (40 %). La variété *Phaseolus caracalla* apparaît alors la plus toxique suivie de la S102 et de Pinto. Les variétés Zeta, Haricot blanc et Judia sont les moins toxiques à l'égard de *Callosobruchus maculatus*.

Si on se réfère aux DL50 calculées à partir des équations des différentes droites de régressions établies, les variétés *Phaseolus caracalla*, S102 et Pinto se classent respectivement en 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} position. En effet la DL50 calculée pour *Phaseolus caracalla* est estimée à 13,48g de farine et est comprise entre la D1=20% et D2= 20% (Figure 27). Celle de la variété S102 est de 21.5 g de farine et se situe entre la D2 et la D3 (Figure 28). La DL50 calculée pour la variété Pinto est de 52.29 g, elle est entre la D3 et D4 (Figure 29).

I.2.4. Durée de développement

Les données sur la durée totale de développement de *Callosobruchus maculatus*, allant de l'œuf à l'imago affichent une différence entre les six variétés de haricot et ce aux différentes doses testées (10, 20, 40, 80 et 100 %).

Ainsi à une température de 30 C° et une hygrométrie de 70 % \pm 5 %, cette durée est de 27 jours chez le témoin. Cependant, sur le haricot, le cycle de développement de *Callosobruchus maculatus* parait plus long.

Pour la variété *Phaseolus caracalla*, la durée de développement est au multiple de trois, à la dose D1=10% et au multiple de cinq à la dose D2= 20%. A la dose D3=40%, aucun développement n'a été observé. La variété S102, affiche une durée moyenne de développement de 60.93 j soit deux fois plus importante que le témoin à la dose D1= 10% et de 88.10 j à la dose D2=20% soit trois fois plus longue que celle enregistrée chez le témoin.

Concernant la variété Pinto, un allongement de 13 jours et de 21 jours de la durée moyenne de développement a été observé aux doses respectives D1 et D2. A la dose D3=40%, cette durée est au multiple de deux par rapport au témoin. Parallèlement, aucun développement n'a été observé à la dose D4=80%. A la dose

D5= 100%, aucun développement n'a été enregistré sur l'ensemble des variétés testées (Figure 30).

De ce fait, pour *Phaseolus caracalla*, cette durée moyenne de développement est de 82,40 jours et de 148,20 jours aux doses respectives D1 (10 %) et D2 (20 %).

En ce qui concerne la S102, la durée moyenne de développement est de 60,93 jours et 88,10 jours aux mêmes doses citées ci-dessus. A la D3=40%, la S102 affiche une durée moyenne de développement assez proche de celle obtenue avec la D2=20% et est de 90,80 jours.

Les durées moyennes de développement de *Callosobruchus maculatus* sur la variété Pinto est à 40,07journs alors que sur les variétés Zeta, Haricot blanc et Judia à la D1 (10 %) restent inférieurs à 40 jours et sont respectivement de 28,03 jours, 33,25 jours et 31,20 jours. A la D2 (20 %), cette durée se prolonge légèrement chez ces mêmes variétés pour atteindre 42,98 jours chez Zeta et 40.59 jours chez le Haricot blanc et 37,39 j pour les judia à la dose D3. Cette durée de développement est obtenue avec la variété Judia qu'avec la D4 où l'on enregistre une durée de développement de 43,96 jours.

Tableau 12: Effet des doses des six variétés de haricot sur la durée moyenne de développement en jours de *Callosobruchus maculatus* étudiée sur graines reconstituées de pois chiche.

Doses	Durée de développement en jours					
	<i>P. caraccala</i>	S102	Pinto	Zeta	H. Blanc	Judia
D0 Pois chiche	27					
D1 = 10 %	82,40	60,93	40,07	28,03	33,25	31,20
D2 = 20 %	148,20	88,10	48,32	37,48	35,20	30,10
D3 = 40 %	0	90,80	54,68	42,98	40,59	37,39
D4 = 80 %	0	0	0	47,90	42,84	43,96
D5 = 100 %	0	0	0	0	0	0

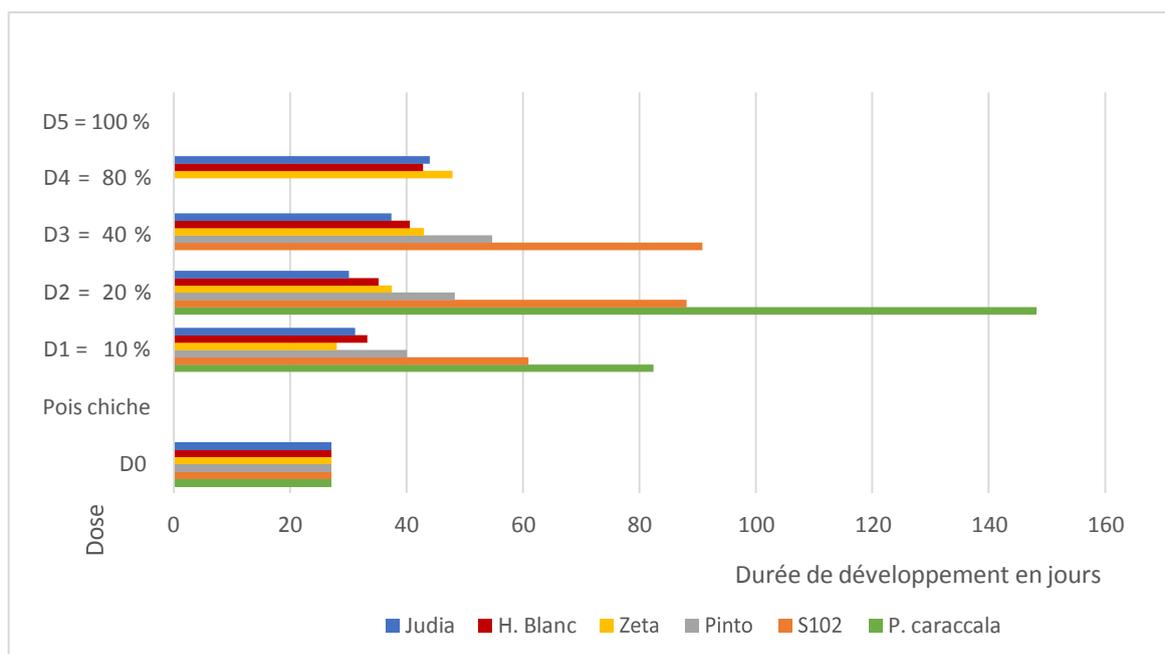


Figure 30: Effet doses des six variétés de haricot sur la durée moyenne de développement de *Callosobruchus maculatus* étudiée sur graines reconstituées de pois chiche.

Les résultats de l'analyse de variance à une probabilité égale à 0,0001 affichent une différence significative pour les facteurs variété et dose.

Ainsi, nous pouvons dire que l'effet variété et dose influencent sur la durée de développement de *Callosobruchus maculatus*.

De ce fait, le test de NEWMAN et KEULS attribue l'ensemble des variétés testées de haricot à un seul groupe homogène.

Pour le facteur dose, le test de NEWMAN et KEULS au seuil de 5 % fait apparaître quatre groupes homogènes disjoints.

Le groupe A renferme la D5 (100 %) avec un résultat égale à 0,00. La D4 et D0 appartiennent au groupe homogène B avec des moyennes respectives de 19,60 et 27,42.

Le groupe C comprend la D3 et la D1 avec des moyennes respectives de 42,63 et 53,42. La D1 appartient au groupe intermédiaire CD car on la retrouve aussi bien dans le groupe C que dans le groupe D.

Enfin, le groupe D représenté par la D2 qui affiche une moyenne de 62,40.

La durée de développement est un paramètre important dans la détermination de la sensibilité d'une denrée vis-à-vis des attaques des insectes et le développement de ces derniers (Bekon et Fleurat lessard, 1988). De ces résultats, les doses D1=10%, D2= 20% et D3= 40% paraissent les plus importantes car elles prolongent significativement la durée de développement de *Callosobruchus maculatus*.

Ce prolongement est dû à la présence des arcelines dans les farines de haricot qui une fois ingérées par *Callosobruchus maculatus*, ralentissent son cycle de développement.

Lara (1997), Wanderley et al.(1997) et Mazzonetto et Vendramim (2002), ont également observé un temps de développement prolongé de *C. maculatus* avec les variétés contenant de l'arcéline. De plus, Lara (1997) et Wanderley et al.(1997) ont trouvé des périodes de développement supérieures à 45jours. Ces résultats s'alignent avec les notre et ceci est dû à l'effet insecticide que renferme cette protéine au niveau de ses génotypes qui la contiennent.

Par ailleurs, lorsque la nourriture n'est pas adéquate sur le plan nutritionnel pour un insecte qui se nourrit exclusivement durant son développement, la conséquence est un développement anormal qui peut conduire à de plus petits insectes (petite taille et/ou petit poids), faible capacité de reproduction ou encore mortalité larvaire et nymphale (Baldin et al., 2017).

I.2.5. Calcul de l'indice de sensibilité variétal 'IS'

L'indice de sensibilité variétal de Dobie, est considéré comme un critère de mesure de la variété la plus résistante face aux attaques de l'espèce *Callosobruchus maculatus* F.

Ce facteur est égal au rapport entre le nombre total des adultes émergés et la durée moyenne de développement. A l'indice le plus bas correspond la variété la plus résistante.

Ce rapport a été calculé pour chaque variété testée aux différentes doses.

Comme le montre le tableau 13, les variétés *Phaseolus caracalla* et S102 manifestent une résistance accrue face aux attaques de *Callosobruchus maculatus* car elles présentent des indices de sensibilité très bas soit des valeurs respectives de 0,06 et 0,20 à la dose D2. Cet indice est de 1,02, 1,39, 1,70 et 2,08 aux variétés respectives Pinto, Zeta, haricot blanc et judia à la même dose. Sur la base de cet indice, les variétés testées sont classées comme suit :

1. Variété *P. caracalla*.
2. Variété S102.
3. Pinto
4. Variété Zeta
5. Variété de Haricot blanc.
6. Variété Judia.

Tableau 13: Les indices de sensibilité des six variétés de haricot étudiées à différentes doses sur graines reconstituées de pois chiche.

Doses	<i>P. caracalla</i>	S102	Pinto	Zeta	Haricot Blanc	Judia
D1 = 10 %	0,35	0,71	1,54	2,41	2,47	2,57
D2 = 20 %	0,06	0,20	1,02	1,39	1,70	2,08
D3 = 40 %	/	0,06	0,50	0,82	0,98	1,12
D4 = 80 %	/	/	/	0,26	0,49	0,43
D5 = 100 %	/	/	/	/	/	/

Le calcul de l'indice de sensibilité a permis de classer les variétés de haricot en fonction de leur sensibilité aux attaques de *Callosobruchus maculatus* aux différentes doses testées et par conséquent d'opter pour la variété sauvage *P. caracalla* afin de tester l'effet de l'activité insecticide de l'arcéline, protéine semi

purifiée extraite de cette variété sur les différents paramètres biologiques de *C. maculatus*.

Nos résultats s'alignent avec ceux obtenus par d'autres auteurs. En effet, Hamelryck et al. (1996), Louis (2004), Brinda (2004), Zambre (2006), Blair et al., 2010, Pandurangan et al., (2016) et Rendom-Anaya et al.(2017) ; ont déjà signalé la résistance des graines de haricot du genre *Phaseolus* vis à vis de *Callosobruchus maculatus*. Parmi ces variétés, nous citons la G02771, *Phaseolus calcaratus* et *Phaseolus lathyroides*.

II. Isolation et identification de la protéine insecticide arcéline des graines de haricot

II.1. Dosage de l'arcéline et des protéines contenues dans les différentes fractions extraites à partir des farines de haricot

Les teneurs en protéines des six variétés de haricots *Phaseolus vulgaris* L. mentionnées dans le tableau suivant montre que l'ensemble des variétés présentes des teneurs relativement importantes et différentes en protéines totales. Notre variété sauvage ; *Phaseolus caracalla* se classe en première position avec une concentration de $1880 \pm 89 \mu\text{g/ml}$. La variété Zeta affiche une concentration voisine à la variété sauvage. Les autres variétés renferment des teneurs en protéines totales moins importantes par rapport à ces deux variétés.

Tableau 14: Teneur en protéines totales et d'arcélines purifiées pour les six variétés de haricot.

Variétés	<i>P. caracalla</i>	Zeta	S102	Pinto	Judia	Haricot blanc
Teneur en protéines totales $\mu\text{g/ml}$	1880±89	1858±120	1008,75±66	1483,75±131	1633,75±100	1540±140
Teneur en arcélines ($\mu\text{g/ml}$)	780±14	480±39	338,75±22	438,75±30	481,25±30	80±20

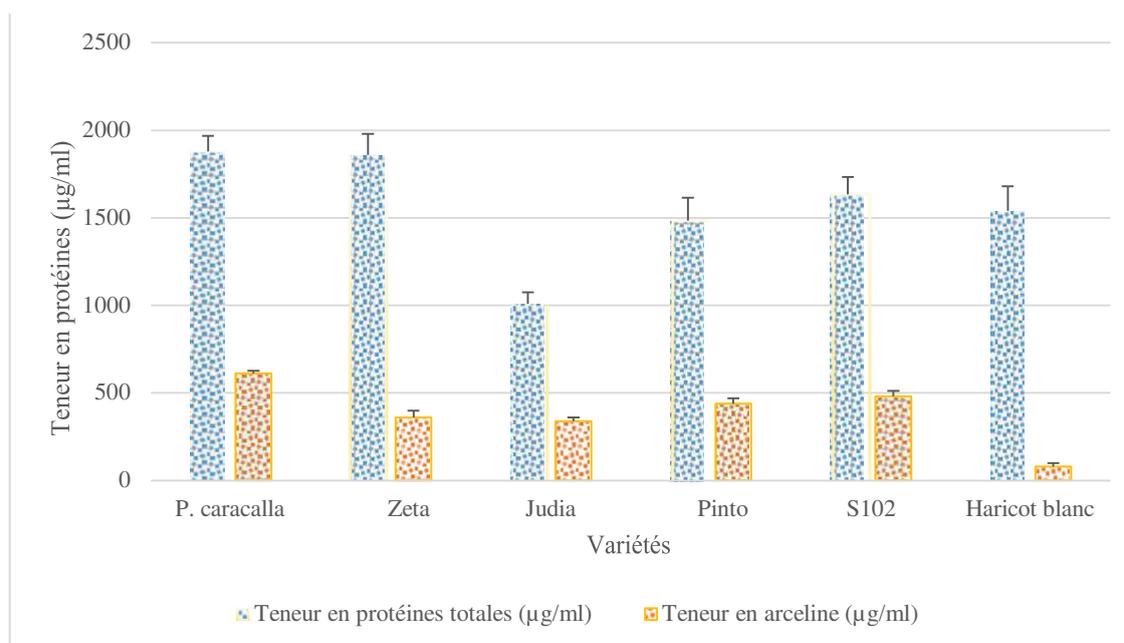


Figure 31: Teneurs comparatives en protéines totales et arcelines purifiée des six variétés de haricot.

Le protocole expérimental a été choisi de façon approprié à celui adapté dans la purification de la molécule toxique. En effet, la dialyse a permis par la suite de situer le poids moléculaire de la substance toxique recherchée. Selon la littérature, plusieurs auteurs évoquent l'activité insecticide poids moléculaire se situe entre 30kDa et 45kDa.

La variété sauvage *Phaseolus caracalla* renferme plus de 40% d'arcéline, ces résultats convergents avec ceux de Hartweck et ses collaborateurs 1991. Selon Sakthivelkumar (2014), quand les arcélines existent, elles représentent environ 50% de la fraction protéique. Cependant, on constate que la S102 se classe en deuxième position avec un pourcentage d'environ 30% d'arcéline, alors que sa teneur en protéines totale est faible par rapport à la variété sauvage. Les arcélines sont minoritaires dans les autres variétés en particulier chez le haricot blanc avec un pourcentage de 5% de la fraction protéique totale.

II.2. Electrophorèse SDS-PAGE des protéines totales extraites à partir des six variétés de haricot.

Les profils électrophorétiques des six variétés de haricot sont représentés dans la figure 32 :

Nous avons pu identifier les variantes d'arcelines présentes dans nos variétés de haricot en fonction de leurs poids moléculaire. La variété sauvage *P. caracalla* renferme deux types d'arcelines ; arceline 4 et 5, l'épaisseur de la bande correspondante à l'arceline 5 avec un poids moléculaire de 32 KDa est plus importante par rapport aux autres, cela nous permet de dire que cette dernière est abondante et cela correspond aux résultats quantitatifs que nous avons effectués (figure 32). Dans la piste de la variété S102, on observe une bande aux alentours de 31kDa, cette bande correspond à l'arceline 5. L'abondance de cette protéine chez cette variété est moins importante par rapport à la variété sauvage.

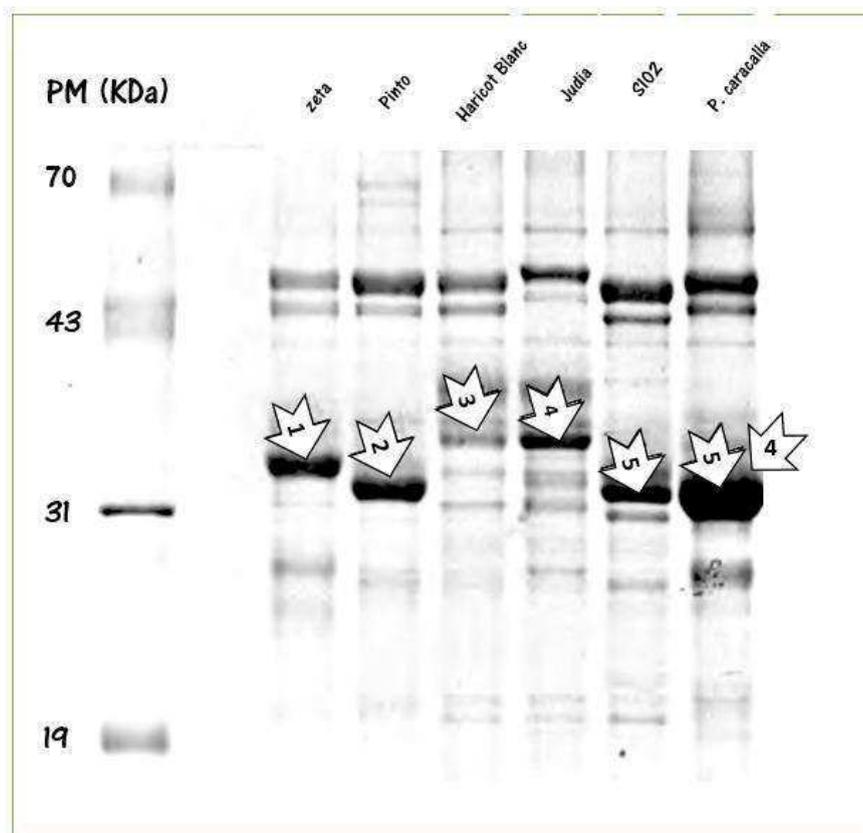


Figure 32: Electrophorèse SDS-PAGE des protéines des six variétés de haricot. Chaque piste correspond à l'équivalent de 15 μ g de protéines extraites à partir des graines de haricot. (zeta : arceline1, Pinto : arceline2, haricot blanc : arceline3, Judia : arceline4, S102 : arceline5 et *P. caracalla* (arceline5 et 4).

On remarque également que les variétés Judia et le haricot blanc renferment l'arceline 3, avec une faible présence chez le haricot blanc.

Dans la piste de la variété Pinto, on observe une bande caractéristique à 35KDa qui correspond à l'arceline 2, avec une absence d'autres variantes d'arcelines.

La variété Zeta renferme exclusivement l'arceline 1, dont le poids moléculaire est de 37KDa.

II.3. Capture immunologique d'arcelines par Western blot

Une hybridation moléculaire Western blot a été effectuée afin de vérifier nos résultats qualitatifs obtenus par électrophorèse SDS-PAGE. Les résultats obtenus après avoir cibler les arcélines par un anticorps capable de reconnaître un épitope commun aux six variantes d'arcelines sont représentés dans la figure suivante.

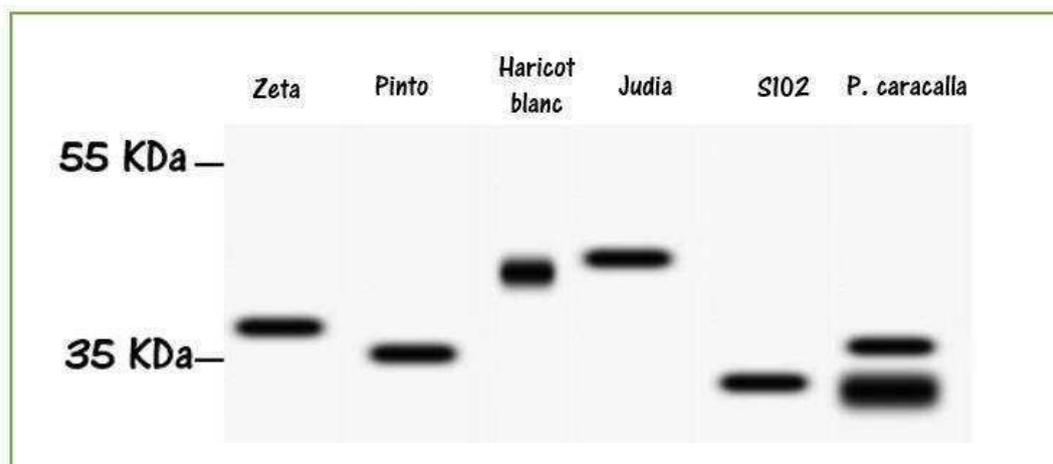


Figure 33: Western blot pour la détection d'arcelines présentes dans les six variétés de haricot.

Le signal chimique émis lors de la réaction enzymatique est détecté par imagerie numérique avec un système de caméra CCD (Odyssey® Fc, Bad Homburg, Allemagne).

Le résultat obtenu par Western blot confirme notre interprétation de l'électrophorèse SDS-PAGE. Toutes les variétés de haricot renferment un seul type d'arceline à l'exception de la variété sauvage *Phaseolus caracalla* qui possède à la

fois l'arceline 4 et 5. L'immunoblotting montre que chaque variété possède une variante d'arcelines propre à elle.

Les résultats obtenus par Western blot sont importants, car les différentes variétés étudiées appartiennent au même genre. Cette différence protéique est due certainement à un épissage génétique alternatif.

En effet les gènes codant pour les différentes variantes d'arcelines sont soumis au même promoteur, l'épissage alternatif fait cette différence entre les différentes espèces de haricot. Toutes les espèces appartenant au même genre contiennent la même information génétique (Pandurangan et *al.*, 2016, Thao et *al.*, 2017). Seulement, le type d'arceline exprimé dans chaque variété est différent, ainsi que le taux d'expression de cette protéine. Nous pouvons expliquer cette différence par la présence d'un système de régulation d'expression génétique impliquant des éléments régulateurs agissant au niveau post transcriptionnel et traductionnel conduisant à un protéome propre à chaque variété. Les différentes variantes d'arcelines présentent une certaine homologie, car elles sont toutes reconnues par le même anticorps. Selon plusieurs auteurs, ces variantes d'arceline appartiennent au même locus d'un point de vue cytogénétique appelé APA (arceline, PHA et IA).

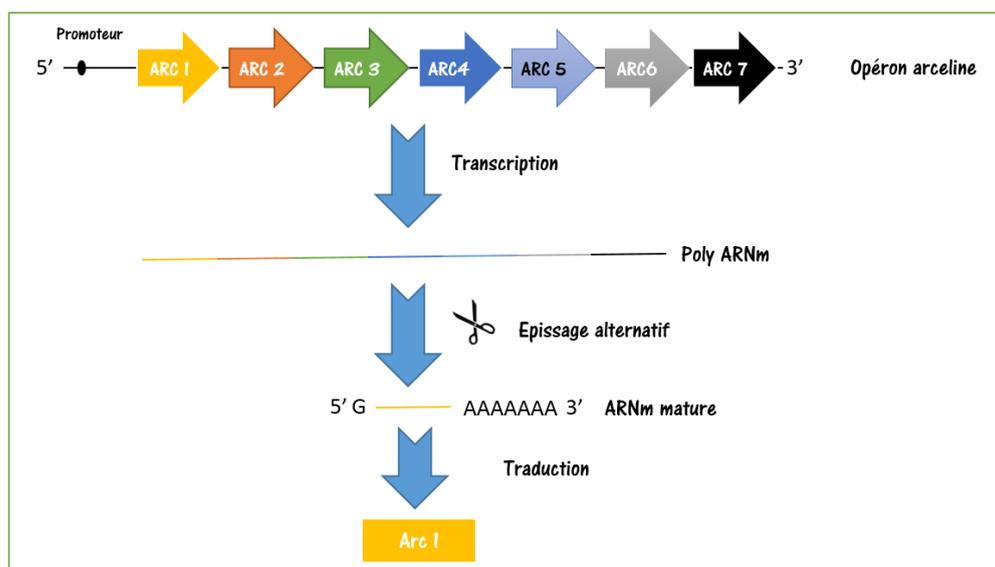


Figure 34: mode d'expression génétique des différentes arcelines chez l'espèce *Phaseolus vulgaris*L. (Original).

Ces résultats suggèrent la présence de la nature toxique de l'arcéline isolée à partir des graines des six variétés de haricot. Les arcélines spécifiques à l'espèce *Phaseolus vulgaris* appartiennent à la famille des léctines tronquées des protéines de stockage des graines. Ces protéines contiennent des polypeptides étroitement apparentés aux phytohemagglutinines (PHA) et aux inhibiteurs d'alpha amylase (AI) (Sundaram, 1992, Miao et al., 2017; Pereira et al., 2000 ; Pandurangan et al., 2016).

Selon Goossens et al.(1994), sept variantes électrophorétiques de l'arcéline ont été décrites dont la masse moléculaire varie de 31 à 45Kd. Leurs séquences d'ADNc ont montré des similitudes élevées.

Basés sur l'homologie des séquences d'ADNc, six sont regroupées en trois groupes (Sparvoli et bollini, 1998 ; Sparvoli et al., 2001 ; Rezende et al., 2017). Arc 1, Arc2 et Arc6 appartiennent à la même grappe tandis que qu'un deuxième groupe est composé d'Arc3 et Arc4, les plus anciennes variantes. Le troisième groupe est représenté par Arc5 qui possède trois isoformes Arc5a, Arc5b et Arc5c (Meyer et al., 2016 ; Ramos-Madrigal et al., 2016 ; Lioi, 1996).

III.Effet de la protéine entomotoxique arcéline de la variété sauvage sur les paramètres biologiques de *C. maculatus* F.

Les résultats obtenus suite aux essais de l'étude de la sensibilité variétale des six variétés de haricot et des tests de toxicité vis à vis de *Callosobruchus maculatus* F. aux différentes doses testées ; classent la variété S102 en deuxième position après la variété sauvage *Phaseolus caracalla* qui s'est manifestée résistante. Ces deux variétés ont affecté le développement de *C. maculatus* au fur et à mesure que nous augmentons la dose. La semi purification de l'arcéline a été réalisée selon la méthode décrite par Sakthivelkumar et ces collaborateurs (2014).

L'extrait obtenu contient de l'arcéline, la protéine à effet insecticide de la fraction protéique considérée toxique. Nous allons vérifier l'effet entomotoxique de cette protéine semi purifiée sur *C. maculatus*.

III.1. Effet de l'arcéline sur la fécondité

Les résultats consignés dans le tableau 15 montrent que la fécondité varie avec les doses testées des extraits à base d'arcéline semi purifiée de la variété *Phaseolus caracalla*. En effet, elle diminue au fur et à mesure que la dose augmente. Ainsi, une fécondité moyenne de 4,61 œufs / femelle est enregistrée à la dose 1 soit 0,05% d'extrait d'arcéline pure. Celle-ci est de 2,2 œufs / femelle à la dose 2 soit 0,1% de protéine pure. A la dose 3 soit 0,15% d'arcéline, on enregistre une fécondité moyenne de 1,02 œufs / femelle et enfin à la dose4=0,20%, cette fécondité est à 0,51œufs/femelle.

Ces résultats sont comparés avec ceux obtenus sur graines entières et sur graines enrichies en farine de haricot de la même variété seulement à une concentration de 10 % qui représente la dose 1.

Tableau 15: Effet dose de la protéine semi purifiée arcéline caractéristique des graines de haricot sauvage de la variété *Phaseolus caracalla* sur la fécondité cumulée par femelle de *Callosobruchus maculatus* F.

Doses Jours	Dose 1 0,05 %	Dose 2 0,10%	Dose 3 0,15%	Dose 4 0,20%	Témoin
2 ème jour	2,79	1,44	0,98	0,48	16,80
4 ème jour	1,82	0,76	0,04	0,03	14,60
6 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	9,60
8 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	6,56
10 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	2,88
12 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	1,04
14 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20
16 ème jour	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fécondité cumulée par femelle	4,61 ± 1,52	2,20 ± 0,62	1,02 ± 0,36	0,51±0,23	51,68 ± 6,61

Selon la figure 35, le maximum de ponte est observé au deuxième jour. Par ailleurs, nous constatons que la fécondité de *Callosobruchus maculatus* s'échelonne jusqu'au quatrième jour pour l'ensemble des variétés testées aux différentes doses et s'annule au 6 ème jour.

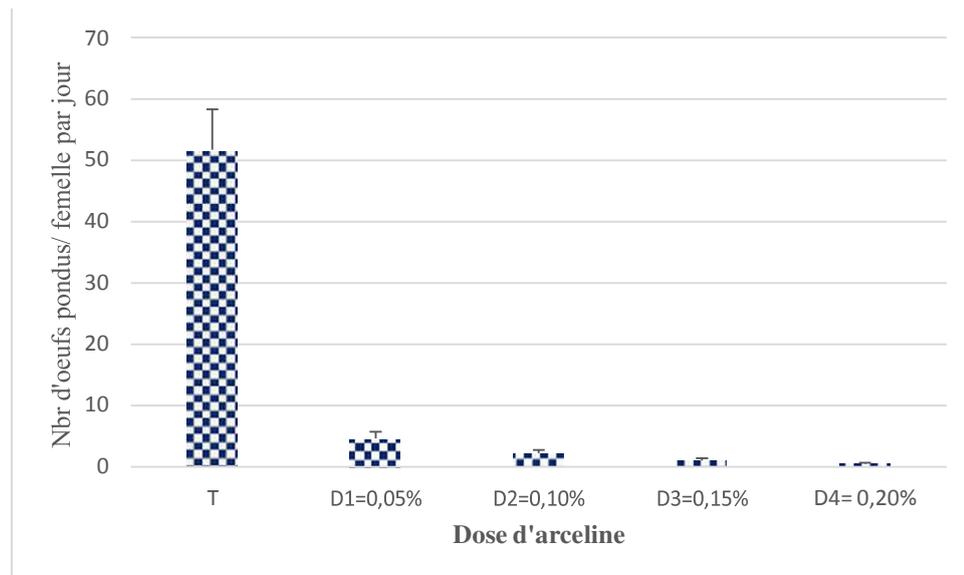


Figure 35: Effet de l'arcéline semi purifiée de la variété sauvage *Phaseolus caracalla* sur l'évolution temporelle de la fécondité de *Callosobruchus maculatus*.

Par rapport au témoin, une nette diminution est enregistré soit 90 % à la plus faible dose D1 (0,05%). Cet écart a dépassé les 90% pour l'ensemble des autres doses.

L'analyse de la variance des résultats montrent qu'à une probabilité de 0,0001 nettement inférieur au seuil de 5 %, la différence est hautement significative, ce qui implique que l'effet dose influence beaucoup la fécondité.

Le test de NEWMAN & KEULS met en évidence l'apparition de deux groupes homogènes bien distincts pour la fécondité des femelles de *Callosobruchus maculatus*.

Le groupe A représenté par les doses D4, D3 et D2 où la fécondité est la plus faible avec des moyennes respectives de 5,40 ; 6,12 et 12,00. La D2 est une dose rencontrée aussi bien dans le groupe A que dans le groupe B (Groupe intermédiaire AB).

Le groupe B représenté par D1 avec une moyenne de 31,00. Enfin le groupe C comprenant le témoin avec une moyenne de 258,40.

De ce fait, nous pouvons dire que la variété sauvage *Phaseolus caracalla* Parait la plus résistante à l'égard de *C. maculatus* car elle possède un milieu

défavorable à la ponte des œufs de cette espèce aux quatre doses testées. De ce fait, l'arcéline affecte sérieusement la fécondité de *C. maculatus*.

Tableau 16: Analyse de variance des résultats de l'évolution de la fécondité de *Callosobruchus maculatus* sur les graines artificielles à base d'arcéline semi purifiée issu de *Phaseolus caracalla*.

Source	ddl	S.C.M.	C.M.	F de Fischer	Pr > F	Modalités	Moyenne	G.H.
Modèle	3	221079,60	73693,20	398,55	< 0,0001	Dose 4	5,40	A
Résidus	16	2958,40	184,90			Dose 3	6,12	A
Total	19	224038,00				Dose 2	12,00	A B
						Dose1	31	B
						Dose 0	258,40	C

Suite aux résultats obtenus avec l'arcéline semi purifiée à partir des graines de haricot sauvage, nous pouvons déduire que la toxicité est probablement due à la présence de cette dernière. En effet, sa présence au niveau des graines implique officiellement la présence d'une toxicité selon plusieurs auteurs car son rôle est d'assurer la protection des graines face aux attaques de *C. maculatus* (Lioi et Ballini, 1989 ; vitale et *al.*, 1995 ; Santino et *al.*, 1991 ; Madakbas et *al.*, 2014)

Dans ce contexte, le haricot commun, a été domestiqué à l'origine à partir de plantes indigènes sauvages (Mina-Vargas, 2016 ; Valasova et *al.*, 2016) seulement, un seul segment lié à la diversité génétique a été retrouvé dans la nature qui est capturé dans le processus de domestication (Debouck, 2000 ; Geptser victor, 2012). Les graines de cette espèce contiennent en plus de la phaséoline, une famille de protéines étroitement apparentée qui joue un rôle important dans la protection des plantes contre les prédateurs (Osbornet *al.*, 1988 ; Chrispeels et raikhel, 1991). Ces protéines sont représentées par la lectine phytohemagglutinine (PHA), l'inhibiteur d'amylase et l'arcéline (Vitale et Bollini, 1995). Ils partagent un haut degré d'homologie de séquence (Osborn et *al.*, 1986).

Sur la base des résultats obtenus, celles-ci sont similaires avec ceux rapportés par Mazzonetto et Vendramim (2002) et ceux de Sathivelkumar (2014) où ils notent une baisse importante de la fécondité par rapport au témoin. Selon Lara (1997) et Mazzonetto et Vendramim, (2002), ya pas de différence dans le nombre d'œufs pondus par *C. maculatus* dans les génotypes contenant ou non de l'arcéline. En effet, si l'on considère que les bruches ne se nourrissent pas à l'âge adulte, l'antixénose du haricot pourrait être une non préférence pour l'oviposition au lieu de non préférence pour l'alimentation (Kedia et al., 2015 ; Worthington et al., 2012).

Cependant une autre observation est à évoquer concernant le poids des adultes. Ce dernier varie de 1,73 à 2,30mg à l'état normal alors que ce dernier est nettement faible (Paes et al., 2000; Karbache 2009 ; Baldin et al. 2017).

Baldin et Lara (2008) ont également enregistré des poids faibles d'adultes de *C. maculatus* se nourrissant de génotypes de haricot contenant de l'arceline5, arceline1 et arceline3.

De même, les poids des larves immatures qui se développent sur graines artificielles contenant de l'arcéline de haricot sont réduits par rapport au témoin dépourvu d'arcéline (Velten et al., 2007 ; Karbache, 2009 ; Xu et al., 2014 ; Mina-Vergan et al., 2016 ; Vlasova et al., 2016).

Selon Smith(2005), étant donné que les taux de consommation larvaire de *C. maculatus* obtenus avec de différents génotypes de haricot était similaires, ceci implique la présence d'une antixénose réduite et l'expression d'une antibiose est probable principalement chez les arcelines1 et 2 (Mairay et al., 1998 ; Sandaram et al., 2012 ; Beck et al., 2014 ; Baldin et al., 2017).

III.2. Effet de l'arcéline semi purifiée sur la mortalité

Les résultats des essais d'efficacité de l'arcéline semi purifiée à partir de la variété sauvage vis-à-vis des individus de *C. maculatus* montrent que cette arcéline a provoqué des pourcentages de mortalité corrigée atteint les 75 % au troisième jour d'exposition avec la plus forte dose.

Ainsi, à la dose D1 « 0,05% », le pourcentage de mortalité corrigée est de 28,57 %. A la dose D2 « 0,1% », ce pourcentage double à celui obtenu avec la dose 1 ; il est de 46,43%. Pour la dose D3 « 0,15% », le pourcentage de mortalité corrigée atteint est de 57,14% et à la D4 « 0,2% » il atteint 70%.

Ce dernier est assez proche de 100 % pour la même durée d'exposition « 3 jours ». Ces résultats sont confirmés par la DL50 calculée à partir de la droite de régression. Cette dernière est proche de la D1 et égale à 0,073g d'extrait d'arcéline semi-purifiée.

La comparaison des DL50 ainsi que les droites de régressions obtenues sur graines reconstituée de la variété *P. caracalla* et sur l'extrait issu de cette même variété confirme que l'effet de l'arcéline semi-purifiée de la variété sauvage *P. caracalla* est plus efficace que sur les graines artificielles conçues de pois chiche de cette même variété sur *Callosobruchus maculatus* figure 36.

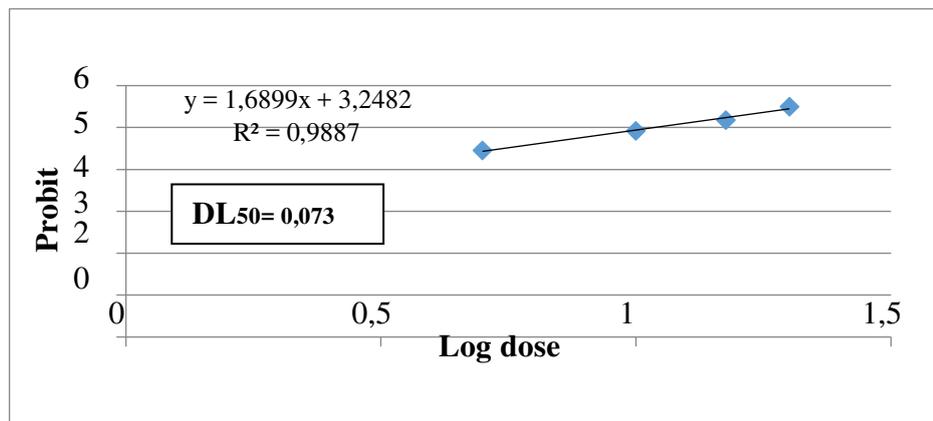
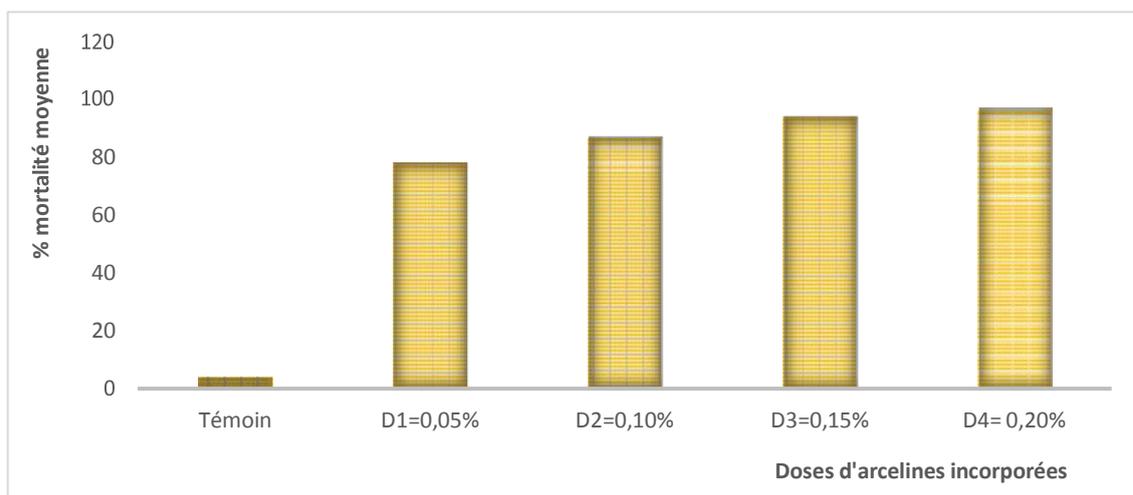


Figure 36: Efficacité de l'arcéline semi purifiée de la variété sauvage *P. caracalla* sur *C. maculatus*.

Tableau 17: Efficacité de l'arcéline purifiée à partir de *P. caracalla* sur la mortalité de *Callosobruchus maculatus* F.

DOSES	Log dose	Nombre de morts					Total	Mortalité moyenne	% Mortalité Corrigée (M.C.)	Probit
		R1	R2	R3	R4	R5				
5	0,698970004	3	4	2	3	3	15	30	28,57	4,45
10	1	4	5	4	6	5	24	48	46,43	4,92
15	1,176091259	5	6	5	7	6	29	58	57,14	5,18
20	1,301029996	7	8	5	8	7	35	70	70	5,5
D0= Témoin		1	1	0	0	0	2	0,4		

**Figure 37:** Effet des différentes doses de l'arcéline semi purifiée de *P. caracalla* sur la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus*.

L'analyse statistique montre que la mortalité de *C. maculatus* est influencée par l'effet dose au seuil de probabilité égale à 0,016. De ce fait, le test de

NEWMAN et KEULS au seuil de 5 % fait apparaître deux groupes homogènes à savoir :

Le groupe A formé des deux doses D0 et D4=0,20% avec des moyennes respectives de 0,40 et 1,80.

Le groupe B représente les doses D3=0,15, D2=0,10 et D1=0,05 avec des moyennes identiques et sont de 2,60. Pour D2 et D1 et une moyenne de 2,64 pour la D3. La dose D4 appartient à un groupe intermédiaire AB.

Tableau 18: Analyse de la variance des résultats de l'efficacité de l'arcéline de la variété sauvage sur la mortalité des individus de *Callosobruchus maculatus* F.

source	ddl	S.C.M.	C.M.	F de Fischer	Pr > F	Modalités	Moyenne	G.H.
Modèle	3	16,15	5,38	4,68	< 0,016	Dose 0	0,40	A
Résidus	16	18,40	1,15			Dose 4	1,80	A B
Total	19	34,55				Dose3	2,64	B
						Dose2	2,60	B
						Dose1	2,60	B

La mortalité est un paramètre important dans la détermination de la sensibilité de la variété sauvage *P. caracalla* vis-à-vis des attaques de *C. maculatus*. En effet, les résultats obtenus suite aux essais de toxicité réalisés le montre bien.

Dans ce contexte, plusieurs auteurs attribuent la présence de plusieurs molécules entomotoxiques impliquées dans la défense des plantes tels que les terpènes, les alcaloïdes, les glycosides cyanogéniques et les protéines (Minney et al., 1990, Gepts, 1999, Sakthivelkumar et al., 2014).

Dans la défense des plantes, on retrouve aussi, les lectines, les inhibiteurs de l'alpha amylase, les inhibiteurs de protéinase, les ribosomes protéiniques inactivateurs, les réserves protéiques (viciline), les protéines impliquées dans le transport des lipides et les glucanases (Chrispeels et Raikhel, 1991, Kasahara et al., 1996, Grossi de Sa et Chrispeels, 1997, Franco et al., 1999, Carlini

et Grossi de Sa, 2002 ; Worthington et *al.*, 2012 ; Sundaranet *al.*, 2012 ; Vlasova et *al.*, 2016 ; Mina vergas et *al.*, 2016).

D'autres protéines végétales sont impliquées dans les mécanismes complexes de la défense des plantes comprennent les arcélines (Osborn et *al.*, 1988, Lara, 1998, Barbosa et *al.*, 2000), les chitinases (Herget et *al.*, 1990, Sales et *al.*, 2000) .

Notre étude est focalisée sur la protéine de défense naturelle abondante au niveau des graines de haricot, c'est l'arceline. En effet, cette dernière, une fois introduite et entre en interaction avec le mésentéron se lie à des structures chitineuses telle qu'une membrane péritrophique qui interfère négativement avec l'assimilation des nutriments, ce qui peut provoquer la mort des insectes (Amorim et *al.*, 2008).

En effet, selon plusieurs études histologiques, des adultes traités présentent la même anatomie que les adultes témoins seulement, les adultes ayant été en contact avec les graines artificielles de pois chiche à partir d'extrait d'arceline semi purifiée issu de la variété noir de haricot ou de variétés sauvages présentent un rétrécissement du tube digestif qui est difficilement visible à l'œil nu et par conséquent impossible de délimiter les trois parties constitutives de l'intestin à savoir : le stomodeum, le mésentéron et le proctodeum car leur volume a considérablement diminuer. Selon plusieurs auteurs, la taille moyenne des adultes témoins de *C. maculatus* est de 7.73 ± 2.35 et celle des adultes traités est de 1.2 ± 0.72 mm.

Parallèlement des coupes histologiques des tubes digestifs renfermant de l'arceline semi purifiée présentent un défaut général dans leurs fonctionnalités structurales et on assiste à la présence d'une lyse des cellules au niveau du mésentéron et une dilatation anormale du jabot due à une accumulation du bol alimentaire ont été remarquées (Hartweck et *al.*, 1991 ; Hamelryck et *al.*, 1996 ; Goossens et *al.*, 2000 ; Singh, 2001 ; Karbache, 2009, Goossens et *al.*, 2014 ; Sakthivelkumar et *al.*, 2014 ; Beck et *al.*, 2014 ; Mishra et *al.*, 2017; Rendon-Anaya et *al.*, 2017)

Dans ce contexte, Bell (1972) estime qu'il existe des systèmes de protection développés par les graines au cours de leur maturation contre les attaques des insectes.

La famille des légumineuses semble avoir évolué vers l'élaboration des substances chimiques protectrices des graines qui forment une source remarquable d'acides aminés exceptionnels (Singh, 2001 ; Sakthivelkumar et al., 2014 ; Beck et al., 2014 ; Mishra et al., 2017 ; Singh, 2001 ; Rendon-Anaya et al., 2017).

Cependant, si la longueur de la période de conservation des graines de légumineuses est avantageuse pour la consommation humaine, elle favorise aussi la contamination par les insectes susceptibles de surmonter les barrières tégumentaires et allélochimiques des graines (Sharon & Lis, 1990). Il y a ainsi la spécificité des défenses puisque ces barrières sont différentes suivant les espèces de légumineuses qui présentent des spectres différents de substances allélochimiques (Labeyrie, 2005).

Les composés chimiques produits par les plantes sont probablement le facteur le plus important contrôlant le comportement des insectes dans la nature (Schiltz, 1997) et l'intérêt porté aux défenses chimiques des plantes n'a cessé de croître. Ces composés de structure et natures variées peuvent avoir des effets répulsifs, antiappétants ou toxique pour les insectes. En effet, la meilleure connaissance des fractions intervenant dans la défense contre le ravageur considéré permet d'orienter les sélections de variétés résistantes destinées à l'alimentation (Elgarish et shaaman, 2001).

Pour accroître la résistance aux attaques des insectes ravageurs, il est intéressant d'étudier les mécanismes de résistance fonctionnant dans les variétés sauvages (Sales et al., 2000). En effet, des niveaux élevés de résistance contre *Callosobruchus maculatus* ont été trouvés dans un certain nombre de variétés sauvages de *Phaseolus vulgaris* (Goossens et al., 2000).

Parallèlement, les larves d'*Acanthoceides obtectus* en contact avec le broyat de graines de *Phaseolus vulgaris*, meurent si la teneur en tégument est artificiellement augmentée (Stamopoulos et Huignard, 1980). Ainsi, à une concentration de 5% on obtient un taux de mortalité de 100% .

Selon Yunes et *al.* (1998), les vicilines isolées à partir des graines du dolique de chine, ralentissent le développement de cette espèce. Par ailleurs, des résultats ont suggéré, que des niveaux plus élevés de résistances pourraient être obtenus en augmentant la concentration d'une substance entomotoxique l'arcéline. Cette protéine antimétabolique (Malaikozhundan et *al.*, 2003) se lie à la périphérie de la matrice de l'intestin des insectes pour interférer avec l'absorption nutritive (Higgins et *al.*, 1998) et provoque par conséquent un retard des émergences des adultes de *C. maculatus* (Sales et *al.*, 2000).

Selon Goossens et *al.* (2000), il existe une différence entre les diverses variétés de haricot en leur :

- Teneur globale en protéine.
- Pourcentage que représente l'arcéline par rapport à la teneur globale des protéines. Le rapport Arcéline / Phaséoline.

Dans ce cadre, plusieurs protéines de haute valeur nutritionnelle ont été produites dans différents tissus végétaux transgéniques en l'occurrence les graines de haricot (De jaeger et *al.*, 2002).

Selon Muzquiz et *al.*(1999), les teneurs en oligosaccharides de la famille des raffinoses, des phytates, des saponines et des lectines de *P. vulgaris* sont clairement influencés par des facteurs environnementaux et génétiques. Aussi, des études mettent en évidence que les arcélines jouent un rôle de défense contre certains insectes (Huesing et *al.*, 1991, Yamamoto, 1994 ; Peumans et Van Damme, 1995 ; Gatehouse et Gatehouse, 1998; Foissac et *al.*, 2000 ; Moura et *al.*, 2007). Ainsi, en se fixant sur la muqueuse intestinale, les arcélines pourraient avoir différents effets entomotoxique (Pusztai et *al.*, 1993) de nature et d'intensité variables selon leur origine botanique (Crevieu, 1999).

Plusieurs auteurs révèlent que la seule anomalie réside au niveau du mésentéron. En effet, chez les insectes, le mésentéron est la partie réellement « digestive » du tube digestif et intervient dans l'absorption.

La paroi intestinale comprend un épithélium protégé par une membrane péritrophique mince et transparente. Cette dernière, emballe la nourriture pendant son passage le long du mésentéron. Elle est formée d'un réseau de fines fibrilles et renferme de la chitine et des protéines.

La membrane péritrophique agit comme un filtre dans l'absorption des produits de la digestion. En effet, les cellules épithéliales tapissant le tube digestif des insectes sont en contact avec les protéines du bol alimentaire et sont donc des cibles potentielles des protéines de défense. De ce fait, en réalisant ces coupes histologiques, la localisation de l'effet des arcélines au niveau de cette partie du tube digestif de *Callosobruchus maculatus* est nettement visible. Ainsi, la lyse des cellules de la membrane péritrophique est certainement due à la présence des protéines de défense au niveau de la fraction protéique des graines du haricot, qui une fois ingérée par *Callosobruchus maculatus*, interfèrent négativement avec les constituants de cette membrane en l'occurrence avec les glycanes.

Plus précisément, lorsque l'on sait que les glycoprotéines sont les constituants majoritaires des membranes de ces cellules, on peut imaginer que la lumière de l'intestin moyen est littéralement couverte de sites de liaison potentiels pour les arcélines contenues dans le bol alimentaire.

A la suite d'une interaction arcéline - glycoprotéine, d'importantes lésions locales du mésentéron apparaissent ayant pour conséquences de rendre les graines reconstituées enrichies en farine de haricot ou formée à partir de l'utilisation d'extrait d'arcéline, toxique pour l'insecte *Callosobruchus maculatus* F.

Les dégâts ont une amplitude plus ou moins grande suivant les concentrations des arcélines ingérées, mais se traduisant toujours par une accumulation importante dans la lumière mésentérale de débris membranaires et de matériels cytoplasmiques. L'intoxication cellulaire par les arcélines est indiscutable. Nous pouvons nous demander s'il existe une relation entre les fonctions de cellules mésentériques et leur sensibilité aux arcélines. Ces cellules à la fois secrétrices et absorbantes offrent des différences d'une région à l'autre qui reflètent des rôles physiologiques diversifiés : sécrétion (Enzymes digestives, substances diverses), absorption, excrétion et régulation osmotique.

Raccaud-schoeller (1980), considère que le mésentéron est le siège de nombreuses sécrétions. Dans ce contexte, plusieurs auteurs s'alignent avec lui, sur *Callosobruchus maculatus*. En effet, dans la région de l'intestin, les cellules de sécrétion sont absentes. La fonction essentielle des cellules de cette région serait l'absorption. Ainsi, les cellules intestinales offrent une grande surface luminale et une bordure striée bien développée.

Parallèlement, d'autres travaux suggèrent que les lectines agiraient sur la perméabilité membranaire des cellules épithéliales (Gatehouse et Gatehouse, 1984). Ce même auteur a étudié la toxicité des arcélines vis-à-vis de la bruche *Callosobruchus maculatus* (Hartweck et al., 1991 ; Hamelryck et al., 1996 ; Karbache, 2009, Goossens et al., 2014; Sakthivelkumar et al., 2014 ; Beck et al., 2014 ; Mishra et al., 2017; Rendon-Anaya et al., 2017)

Enfin, il est important de montrer que les arcélines sont très résistantes à la protéolyse intestinale. La multiplicité de ces observations démontre que le mode d'action des arcélines au niveau cellulaire est encore imparfaitement compris.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

A la lumière des résultats obtenus, nous remarquons que toutes les variétés testées qu'elles soient présentées sous forme de graines entières ou reconstituées de pois chiche sont exposées aux attaques de *Callosobruchus maculatus* mais à des différents degrés.

Les résultats relatifs aux tests entomotoxiques sur graines entières des six variétés de haricot sur *Callosobruchus maculatus* montrent une variabilité de la fécondité moyenne par femelle de cette espèce par rapport au pois chiche « variétés témoin ».

Cette fécondité est plus élevée sur Pinto avec 10,6 œuf par femelle, suivie des deux variétés Zeta et Haricot blanc avec des valeurs respectives de 9 œuf par femelle et 8,8 œuf par femelle puis la variété Judia avec 7,06 œufs/ femelle. La variété S 102 affiche une fécondité moyenne de 4,39 œufs par femelle et enfin, Phaseolus caracalla où l'on enregistre une faible moyenne de 2.49 œuf par femelle.

Cependant, sur l'ensemble des variétés de haricot étudiées sous forme de graines entières, nous avons constaté que ces dernières empêchent les œufs de *Callosobruchus maculatus* d'éclore malgré la présence de pontes sur la surface de ces graines. En effet, le haricot ne semble pas être un substrat favorable à l'éclosion des œufs du fait qu'il est doté de certains composés défensifs généraux.

Pour *Callosobruchus maculatus*, la longévité moyenne des mâles est légèrement plus longue que celle des femelles. Cette dernière varie de 2 à 6 jours chez les mâles et de 2 à 4 jours Chez les femelles.

Concernant le pourcentage de mortalité enregistré, les six variétés de haricot testé ont un effet entomotoxique par rapport au témoin engendrant des mortalités supérieures à 50 % au bout de trois jours d'exposition pour la S102 (57%) et Phaseolus caracalla (76,5%).

Les graines de pois chiche reconstituées enrichi isolement en farine des six variétés de haricot révèlent une variabilité entomotoxique des paramètres biologiques de l'espèce *Callosobruchus maculatus*. En effet, la fécondité de cette espèce sur les six variétés de haricot est nettement inférieure à celle réalisée sur

témoin, ainsi les doses D3, D4 et D5 ont manifesté un effet entomotoxique contre *Callosobruchus maculatus*.

Pour l'étude de la fertilité sur graines reconstituées de pois chiche enrichi en farine de haricot, nous constatons que ce dernier n'offre pas des conditions favorables au bon développement de *Callosobruchus maculatus*, ainsi les doses les plus efficaces sont la D3 et D4 où nous avons enregistré un très faible pourcentage d'émergence car ce pourcentage à la D » a diminué de moitié par rapport à la D1.

Il ressort des résultats, que les variétés les plus résistantes suite à l'étude de l'indice de sensibilité sont Phaseolus caracalla et la S102. En effet, ces dernières sont dotées de substances de défense naturelle qui leur permettent de développer une certaine résistance face aux attaques de *Callosobruchus maculatus*. Ceci implique que la composition chimique du haricot est un facteur majeur déterminant le choix de la plante par l'insecte ravageur.

Concernant la durée moyenne de développement de *C. maculatus*, les doses D1, D2 et D3 paraissent les plus importantes du fait qu'elles la prolongent significativement. En effet, à la D1, cette durée a doublé avec la variété sauvage, la S102 et a significativement été prolongée avec les autres variétés.

La purification d'extrait d'arcéline, la protéine à activité insecticide présente un effet sur les six variétés testées de haricot. Par ailleurs, le dosage des protéines, montre que l'ensemble des variétés présentent des teneurs relativement importantes en protéines totales.

Les profils électrophorétiques SDS-PAGE des protéines mettent en évidence, la présence de la substance toxique arcéline chez les variétés testées d'un poids moléculaire variant de 27 kDa à 45 kDa. La variété P. caracalla s'est avérée plus toxique que les autres variétés testées et renferme deux variantes d'arcéline 4 et 5 suivie par la variété noir de haricot S102 qui renferme uniquement arcéline5.

Le résultat relatif à la capture immunologique d'arcéline par western blot confirme nos interprétations d'électrophorèse où on a constaté que toute les variétés testées possèdent un type d'arcéline alors que la variété sauvage en a deux.

Les résultats obtenus par western blot montrent que les six variétés testées appartiennent au même genre et contiennent la même information génétique, seulement, le type d'arcéline exprimé dans chaque variété est différent. Par ailleurs, les différentes variantes d'arcéline présentent une certaine homologie car elles sont toutes reconnues par le même anticorps et par conséquent, appartiennent au même locus APA d'un point de vue cytogénétique.

Les essais biologiques sur graines reconstituées à base d'extrait d'arcéline, la fécondité moyenne par femelle de *Callosobruchus maculatus* obtenue aux quatre doses testées à 0,05% , 0,10%, 0,15% et 0,20% diminue au fur et à mesure que la dose augmente.

L'extrait d'arcéline a agi sur la longévité des mâles et des femelles de *C. maculatus* car l'ensemble des doses s'avère toxiques sur cette espèce où nous avons enregistré un pourcentage de mortalité supérieur à 50 % pour les D2, D3 et D4, après trois jours d'exposition des adultes.

En effet, par rapport au témoin, sur graines reconstituées à base de farines de pois chiche, 50% de mortalité d'individus de *C. maculatus* est obtenu avec la variété sauvage *P. caracalla* à la D2 et est obtenu avec la S102 à la dose D4 alors que sur graines reconstituées à base d'extrait d'arcéline ce pourcentage de mortalité est obtenu avec une incorporation de 0,1% d'arcéline purifiée pour cette variété. Le pourcentage de mortalité avec la variété sauvage atteint plus de 70% avec la dose la plus élevée fixée à seulement 2% d'incorporation d'extrait d'arcéline.

Suite aux résultats obtenus, la présence de toxicité différentielle dans l'extrait des graines de la variété sauvage *P. caracalla* et de la variété S102 est incontournable car les méthodes de purification de cette glycoprotéine confirment son existence au fur et à mesure qu'on avance dans les méthodes de purification. On a possédé notre étude de purification jusqu'au séquençage de l'arcéline, protéine responsable de la synthèse de la substance entomotoxique, à la réalisation de l'alignement des séquences avec les autres types d'arcéline déjà identifiées par UNIPROT et terminer avec l'identification du gène responsable de la biosynthèse de cette arcéline par PCR. Ces résultats ne sont encore prêts à être exploités.

D'autre part, l'effet entomotoxique de cette arcéline est confirmé par sa mauvaise interaction avec le mésentéron de *C. maculatus*. En effet, des modifications histologiques sont observées au niveau de ce dernier représentées essentiellement par une altération de l'épithélium intestinal après liaison des arcélines aux cellules et cela au niveau des sites de glycanes car cette protéine présente une grande affinité aux sucres et sa toxicité est en fonction de son degré d'affinité à ces derniers.

Il ressort de tous ces résultats, que l'arcéline est efficace sur le coléoptère *Callosobruchus maculatus* car son mode d'action réside au niveau du mésentéron.

A la lumière de tous les résultats obtenus, il ressort que cette glycoprotéine de défense des graines de haricot est dotée de propriétés insecticides certains, permettant de réduire les populations de *Callosobruchus maculatus*. Cette étude pourrait être élargie aux autres insectes de post récolte pour l'essentiel *Sitophilus oryzae*, *Tribolium confusum* et *Rhyzoperta dominica*.

Au future, il serait important, d'élucider d'une part le mécanisme de toxicité de l'arcéline des graines de *Phaseolus caracalla* car elle a révélé une nature antimétabolique et aussi une indigestibilité par les protéases intestinales chez *Callosobruchus maculatus* F. et d'autre part, identifier le gène codant pour l'arcéline insecticide dans les graines des variétés sauvages pour l'utiliser comme un outil dans le développement de plantes transgéniques. Cela contribuera à la mise au point d'une lutte non polluante contre les insectes des denrées stockées et à une meilleure connaissance de la phylogénie des légumineuses.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. **Abe J. L., Sidenius U. et Svensson B., 1993.** Arginine is essential for the alpha amylase inhibitory activity of the alpha amylase / subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* Vol. 293, pp. 151-155.
2. **Acostagallegos J.A., Quintero C., Vargas J., Taro O., Tohme J. et Cardona C.; 1998.** A new variant of arcelin in wild common bean, *Phaseolus vulgaris* L., from Southern Mexico. *Genetic Resources and crop evolution.* Vol. 45, pp. 235-242.
3. **Adjoudji O., Ngassoum M.B., Essia Ngang J.J., Ngamo L.S.T. et Ndjouenkeu R., 2000.** Activité insecticide des huiles essentielles des fruits de *Piper nigrum* (*Piperaceae*) et de *Xylopiya aethiopica* (*Annonaceae*) sur *Sitophilus zeamais* (*Curculionidae*). *Biosciences Proceedings*, 7, 511-517.
4. **Ali R. et Muzquiz M., 1998.** ANFs in tropical legume seeds for human nutrition. In Jansman AJM, Hill GD, Huisman J. Vander poell AFB. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and repeseed, pp.207-213.
5. **Altieri M.A., Nicholls C.I., Alejandro H. et Lana M.A., 2015.** Agroecology and the desingn of climate change- resilient farming systems. *Agron. Sustain. Dev.* INRA.
6. **Appert J. 1992.** Le stockage des produits vivriers et semanciers. Ed. Maisonneuve et Larose, Vol. 2pp.223.
7. **Arbogost R.T. et Mullen M.A., 1990.** Interaction of maize weevil (*Coleopteran: Curculionidae*) and parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (*Hymenoptera: Pteromalidae*) in a Small bulk of stored corn. *J.Econ. Entomol.* (U.S.A.), N°6, Vol.83, pp. 2462-2468.
8. **Arthur F.H., 1996.** Grain protectants: Current status and prospectsfor the coleop. *J. Stored prod. Res.*, Vol.32, pp.293-302.
9. **Arthur F.H. et Puterka G.J., 2002.** Evaluation of kaolinite based particle films to control *Tribolium* species (*Coleoptera : Tenebrionidae*). *Journal of Stored Products Resaerch* 38 : 341- 48. PERGAMON.

B

- 10. Balachowsky A. S., 1962.** Entomologie appliquée à l'agriculture. Les coléoptères. Ed. Masson et Cie, Paris, T1, Vol.1, 564p.
- 11. Balachowsky A. S. Hoffman A. et Labeyrie V., 1962.** Traité d'entomologie appliquée à l'agriculture. Vol.1, pp. 434-494.
- 12. Balls A.K., Hale W.S. et Harris T.H., 1942.** AcrySTALLine protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chemistry*. Vol. 19, pp. 279-288.
- 13. Bardocz S. et Pusztai P., 2004.** The twentieth international lectin meeting, *INTERLEC 20*. Abstract 1p.
- 14. Bell E.A., 1972.** Toxic amino-acid in the leguminosae. *Phytochemical Ecology*, J.B. Ed. Harbone, Acad. Press. pp. 163-177.
- 15. Bekele J. et Hasanali A., 2001.** Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum Kilimands* and *Ocimum Kenyense (Labiatae)* on two post-harvest insects pests. *Phytochemistry*, 57, 385-391.
- 16. Beck W.C. et Blumer S. L., 2014.** A Handbook on Bean Beetles, ed. Inglis David, Anna Almila.
- 17. Benhamou K., Kadimi A., Habibi Y., Ounaies Z. et Kaddami H., 2016.** Nanocellulose Alignment and Electrical properties improvement. In : Multifunctional polymeric Nanocomposites based on cellulosic reinforcements. Pp. 343-376.
- 18. Bernays E.A. et Graham M., 1988.** On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. *Ecology* 69, 886-92.
- 19. Bernays E.A. et Chapman P., 1994.** Host plant selection by phytophagous insects. Chapman et Hall. Springer, New York.
- 20. Birk K., 1976.** Proteinase inhibitors from plant sources. *Methods Enzymol.* Vol. 45, pp. 695-697.
- 21. Bitochi E., Nanni L., Bellucci E., Rossi M., Giardini A. et Zeuli P. S., 2012.** Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) is revealed by sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109 : E788-96.
- 22. Blair M.W., Prieto S., Diaz L.M., Buendia H.F. et Cardona C., 2010.** Linkage disequilibrium at the APA insecticidal seed protein locus of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*). *BMC Plant Biology* 10 :79. pp. 3-15.
- 23. Brattsten L.B., 1992.** Metabolic defenses against plant allelochemicals : In : Rosenthal G.A., Berenbaum M.R. (eds) *Herbivores : Their interactions with secondary plant metabolites*, Vol. II. Ecological and evolutionary processes. Academic Press, New York, pp. 176-242.

- 24. Brinda K.V., Mitra N., Surolia A. et Vishveshwara S., 2004.** Determinants of quaternary association in legume lectins. In *Protein Science*, Vol. **13**, pp: 1735- 1749.
- 25. Brown L. et Downhower P., 1988.** Analyses in behavioral Ecology : A manual for Lab and Field. Sinauer Associates, 194p.
- 26. Brown E.A.L., Gay L., Vasudev R., Tregenza T. E., Eady P. E. et Hosken D.J., 2009.** Negative phenotypic and genetic associations between copulation duration and longevity in male seed beetles. *Heredity* 103, 340-345.
- 27. Boman H.G., 1995.** Peptide antibiotics and their Role in Innate Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* Vol.**13**, pp. 61-92.
- 28. Boucherit K., 1979.** Etude des alpha-galactosides du saccharose du Haricot. Mémoire d'Ingénieur INA. El Harrach, Alger.105p.
- 29. Boughdad F., Morales F. et Ramirez H. et Legrand M., 1986.** Tannin Chemistry. 39p. *Departement of Chemistry and Biochemistry*
- 30. Boutin J.P., Dronne Y., Ducournau S., Gueguen J., Leguen J., Munier – Jolain N., Seve B., et Tivoli B., 2006.** Les protéagineux. Ed. INRA, 102p.
- 31. Broekaert W.F., Vanparijs J., Leyns F. et Joos H; 1989.** A chitin binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Sciences*. Vol. **245**. pp. 1100-1102.
- 32. Brunner F., Stintzi A., Fritig B. et Legrand M., 1998.** Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J.* Vol. **14**, pp. 225-234.
- 33. Buctuanon E.M., Morallo-Rejesus B., 1997.** Influence of insect and seed sample size and heat treatment on the infestation of *Callosobruchus chinensis* (L.) on mungbean, *Vigna radiata* (L.). *Wilczek BIOTROPIA*, n°10 :14-28, 14.

C

- 34. Caballero J.L., 2003.** Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J. Exp. Bot.* Vol. **54**, pp. 1865-1877.
- 35. Capelle M.J., 2003.** Diversité génétique et Dynamique adaptative de *Colletotrichum lindemuthianum* à l'intérieur de populations sauvages de son hôte, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*). Thèse de Doctorat. Université Paris 6/ Pierre et Marie curie. UFR de biologie. 234p.
- 36. Cardona C., Kornegay J., Posso C.E., Morales F. et Ramirez H., 1990.** Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. *Entomologia Experimentalisand Applicata*. Vol.**56**, pp: 197-

206.

- 37. Carlini C.R. et Guimaraes J.A., 1981.** Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A *Toxicon*. Vol.19, pp. 667-75.
- 38. Carlini C.R., Barcellos G.B.S., Baeta Neves A.D.V. and Guimaraes J.A., 1988.** Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins of legume seeds. *Phytochemistry*. Vol. 27, pp. 25-30.
- 39. Carlini C.R. et Guimaraes J.A., 1991.** Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin *Toxicon*. Vol.29, pp. 791-806.
- 40. Carlini C.R., Oliveira A.E., Azambuja P., Xavier-Filho J. et Wells M.A., 1997.** Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ Entomol.*Vol. 90, pp. 340-8.
- 41. Carlini C.R. et Grossi de Sa F., 2002.** Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides *Toxicon*. Vol. 40, pp. 1515-39.
- 42. Caswell G.I.I., 1961.** The infestation of cowpeas in the western region of Nigeria. *Trop. Sci.*Vol. 3 pp. 154-158.
- 43. Catala I., 1998.** La défense des plantes in document : la main à la pâte 5p.
- 44. Champ R. et Dyte C.E., 1978.** Rapport de l'enquête mondiale de la F.A.O. sur les insectes des céréales entreposées et leur sensibilité aux insecticides. Ed. F.A.O., Rome, 374p.
- 45. Chapmann R.F., 1975.** The insects structure and function (Chapter III, The alimentary canal). The English university press LTD, Vol.38, pp. 91.
- 46. Chen K., Lin C.Y., Kuan C.C., Sung H.Y. et Chen C.S.A., 2002.** A novel defensin encoded by mungbean cDNA exhibits insecticidal activity against bruchid. *J. Agric. Food chem.* Vol.50, pp. 7258-7263.
- 47. Chi P., Kwon Y., Visnapuu ML, Lam I.Santa Maria S.R., Zheng X., Epshtein A., Greene E.C., Sung P. et KleinH.L.2011.** Analyses of the yeast Rad51 recombinase A265V mutant reveal different in vivo roles of SWI2-like factors. *Nucleic Acids Res* 39(15) : -(6511-22), Journal article/ Research Support, N.I.H., Extramural.
- 48. Chrispeels M.J. et Raikhel N.V., 1991.** Lectins, Lectin Genes and Their Role in Plant Defense. *Plant Cell*. Vol. 3 pp. 1-9.
- 49. Christeller J.T., Farley P.C., Ramsay R.J., Sullivan P.A. et Laing W.A., 1998.** Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J.Biochem.* Vol.254, pp. 160-167.
- 50. Clore G.M., Nilges M., Sukumaran D.K., Brunger A.T., Karplus M. et**

- Gronenborn A.M., 1986.** The three dimensional structure of alpha-1- purothionin in solution: combined use of nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics. *EMBO Journal*. Vol. **5**, pp. 2729- 2735.
- 51. Cohen E., 1993.** Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Arch.InsectBiochem.Physiol*.Vol. **22** pp. 245-261.
- 52. Colling D., Kragh K., Mikkelsen J., Nielsen K., Rasmussen U. et Vad K., 1993.** Plant chitinases. *Plant J*. Vol.**3**, pp. 31-40.
- 53. Collins P.J., 1990.** A new resistance to pyrethroids in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Pestic. Sci. (United-Kingdom)*, N° 1, Vol.**28**, pp.101-115.
- 54. Cordeiro A.T., Gerhardt I.R., Oliveira – Neto O.B., Bloch C., J. et Grossi de sa M.F.F., 2000.** Molecular modeling of arcelin5c from bean seeds and détermination of ist solution state in protein and peptid letters, N°4, Vol.**7**,pp.249-256.
- 55. Crevieu G., 1999.** Digestion des protéines végétales chez les monogastriques.
Exemple des protéines de pois. Ed. INRA, *Production Animal*. Vol.**12**, pp.147-161.
- 56. Crowson R.A., 1981.** The biology of Coleoptera. Academic Press, London, New yorkToronto, pp.1-801.

D

- 57. Debouq D.G., 1988.**Early beans (*Phaseolus vulgaris* L. and *Phaseolus lunatus* L.) domesticated for their aesthetic value? *Ann. Rep. Bean Improvement Coop*. Vol. **32**, pp. 62-63.
- 58. De Jaeger G., Sheffer S., Jacobs A., Zambre M. Zobell O., Goossens A., Depicker A. et Angenon G., 2002.** Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using *Phaseolus vulgaris* regulatory sequences. *Nat. Biotechnol*. N°12. Vol.**20**, pp. 1265-8.
- 59. Delgado-Salinas A., Bibler R., Lavin M., 2006.** Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae) : a recent diversification in an ancient landscape. *Syst Bot*. 31 : 779-91.
- 60. Delobel B., 1999.** Une protéine du petit pois contre les charançons. In *Presse info*. INRA.pp.5-10.
- 61. Delobel A. et Tran M., 1993.** Coléoptères des denrées alimentairesentrepasées dans les régions chaudes. Orstom Publ., Paris, 424p.
- 62. Delobel B. et Grenier A.M., 1999.**Effect of non cereal food on cereal and tamarin pod weevils (*Coleoptera: Curculionidae*) *J. Stored Prod. Res*. Vol.**29**, pp.7-14.
- 63. Dent F.J., 1991.** Culture comptables et organisationnelles : étude sur le terrain de l'émergence d'une nouvelle réalité organisationnelle. *Accounting Organizations and Society* **16**(8) : 705-732.
- 64. Deshpand S.S. et Damodaran S., 1989b.** Effect of phytate on solubility, activity and

conformation of trypsin and chymotrypsin. *J. Food Sci.*, Vol. **54**, 695-699.

- 65. D'Mello J.P.F., 1991.** Toxic amino acids. In *Toxic substances in crop plants*, (Eds.J.P.F; D'Mello C.M. Duffus and J.H. Duffus) Cambridge: *The Royal Society of Chemistry*. pp. 22-48.
- 66. Don Pedro K.N., 1996.** Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citrus peel oil components. *Pestic. Sci.* Vol.**46**, pp. 79-84.
- 67. Dongre T.K., Harwalkar M. R., Nene S.P., Padwa L. et Desai S.R., 1997.** Radiosensitivity of different developmental stage of pulse beetle (*Callosobruchus maculatus*) In *Food Technol. Div., BHABHA atomic Res. Cent. Trombay, Mumbai- 400085, India. Journal of Food Science and Technology (MYSORE)*, N°5. Vol. **34**, pp 413-415.
- 68. Douliez J.P., Michon T., Elmorjani K. and Marion D., 2000.** Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal Kernels. *J. Cereal Sci.* Vol. **30**, pp. 1-20.
- 69. Rougé P., Barre A., Coulon A., Ioulès –Astoul C. et Menu-Bonaouich L., 2004.** Lectines et reconnaissance. 2p.
- 70. Ducom P., 1982.** Protection chimique des grains en climat tropical. In Multon J.L., 1982. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés, céréales, oléagineux et protéagineux, aliments pour animaux. Ed. APRIA, Paris, pp.1092- 1101.
- 71. Ducom P. et Bourges F., 1987** Dernières tendances dans la protection des grains stockées. *Phytoma.Déf. Des Cultures*, N° 385, pp. 38-39.

E

- 72. Eady P.E., 1991.** Concurrence spermatique chez *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) : comparaison de deux méthodes d'estimation de la paternité. *Entomologie Ecologique* /Vol.16 N1. Département des sciences végétales et animales.
- 73. Ehrilch P. et Raven P., 1964.** Butterflies and plants. A study in coevolution. *Evolution* 18 : 586-608. Cross ref. / web of science/Google Scholar.
- 74. Etzler M.E., 1986.** Distribution and function of plant lectins in the lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando (USA): Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J., *Academic Press, Inc*, pp.371-437.
- 75. Evans S.V., Fellows L.E., Shing T.K.M. et Fleet G.W.J., 1985.** Glycosidase inhibition by plant alkaloids which are structural analogues to monoisaccharides. *Phytochemistry*. Vol.**24**, pp. 1953- 1955.

F

- 76. Fabiano T., Moura ., Adeliana S ., Oliveira., Leonardo L .P ., Macedo ., Andre L ., B .R . Vianna ., Lucia B . S., Andrade, A. S., Martins –Miranda ., Jose T. A., Oliveira ., Elizeu A., Santos ,And Mauricio P.D.E. Sales,2007.** Effects of a Chitin- Binding Vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* seeds on bean bruchid Pests (*Callosobruchus maculatus* and *zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*), AGRICULTURAL and FOOD CHEMISTRY, Vol. **55**, NO. 2. Page 260-266, 12/22/2006.
- 77. F.A.O., 2006.** Bulletin trimestriel. F.A.O. de statistique. F.A.O. QBS. Vol.9, N°19. pp78.
- 78. Fabre C., Causse H., Mourey L., Koninkw J., Riviere M., Hendriks H., Puzo G., Samama J.P. et Rougé P., 1998.** Characterization and sugar binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. CV. RAZ-2) seeds *Biochem J.* 329 :551-560.
- 79. Fellows L., Evans S.V., Nash R.J. etBell E.A., 1986.** Polyhydroxy plant alkaloids as glucosidase inhibitors and their possible ecological role. In *Natural Resistance of plants to pests*, pp 72-78.
- 80. Feng G.H., Richardson M., Chen M.S., Kramer K.J., Morgan T.D. et Reeck G.R., 1996.** Alpha-amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human alpha-amylases *Insect Biochem Mol.*Vol.**26**, pp. 419-426.
- 81. Fields P. G., 1992.** The control of stored product insects and mites with extremes temperatures. *J. Stored Prod. Res.*, Vol. **34**, pp 269-277.
- 82. Fields P., 2001.** Ravageurs des entrepôts de grains et des produits alimentaires. Ed .*Centre de recherche sur les céréales. Canada.* pp. 698-699.
- 83. Firmino F., Fernandes K.V.S., Sales M.P., Gomes V.M., Miranda M.R.A., Domingues S.J.S. et Xavier-Filho.J., 1996.** Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Braz J. Med. Biol. Res.* Vol. **29**, pp. 749-756.
- 84. Fleurat Lessard F., 1980.** Enquête sur l'état sanitaire des stocks de grains en France. Deuxième partie : Les résultats. *Bulletin technique d'information du ministère de l'agriculture*, N° 349, pp. 271-280.
- 85. Fleurat Lessard F., 1989.** Autre méthodes de lutte. Ed. AFNOR & ITCF. Paris, pp. 165-168.
- 86. Fleurat Lessart F., 1998.**Entomologie des céréales et des dérivés et autres contaminationd'origine Animal. In Godon B., Willm C., 1998. Les industries des premières transformations des céréales. Ed. Technique et Documentation Lavoisier, pp. 174-202.

- 87. Foissac X., Loc N.T., Christou P., Gatehouse A.M.R. et Gatehouse J.A., 2003.** Resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescences*) and brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) in transgenic rice expressing snowdrop lectin (*Galanthus nivalis* agglutinin; GNA). *J. insect physiol.* Vol. **46**, pp.573-583.
- 88. Follmer C., Barcellos G.B.S., Zingali R.B., Machado O.L.T., Alves E.W., Barja Fildago C., Guimaraes J.A. et Carlini C.R., 2001.** Canatoxin, a toxic protein of jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC3.5.1.5.). Biological effects of urease independant of its ureolytic activity. *Biochem. J.*Vol. **360**, pp. 217-224.
- 89. Fontes W., Sousa M.V., Aragao J.B. et Morhy L., 1997.** Determiration of the amino acid sequence of the plant cytolysin enterolobin. *Arch. Biochem. Biophys.* N°347, Vol. 2, pp.201-207.
- 90. Fory L.F., Finardi F., Quintero C.M., Osborn T.C., Cardona C., Chrispeels M.J. et Mayer J.E., 1996.** Alpha- amylase inhibitors in resistance of common beans to the mexican bean weevil and the bean weevil (*Coleoptera: Bruchidae*). *J.Econ. Entomol.* Vol. **89**, pp. 204-210.
- 91. Fossdal C.G., Nagy N.E., Sharma P. et Lonneborg A., 2003.** The putative gymnosperm plant defensin polypeptide (SPI1) accumulates after seed germination, is not readily released, and the SPI1 levels are reduced in *Pythium dimorphum*- infected spruce roots. *Plant Mol. Biol.* Vol.**52**, pp. 291-302.
- 92. Fouilloux G. et Bannerot H. (1988). Le haricot**
www.inra.fr
www.aprifel.com
www.biodiversity.soton.ac.uk
- 93. Fraenkel G.S., 1959.** The raison of secondary plant substances. *Science* 129, 1466-1470.
- 94. Fox D., Grevengeod E., Myster S., Bain G, PeiferM., 2004.** Régulation des jonctions Adhérents et le cytosquelette au cours de la morphogénèse. *A. Dros. Res. Conf.* 45 : 211A
- 95. Futuyama D.J., 1995.** *Science on trial : the case for evolution.* Sun derland. MA : Sinaur publishers.
- 96. Futuyama D.J. et Slatkin M., 1983.** *Coevolution ;* Sinauer, Sunderland, Mass.

G

- 97. Gaitan G., Micol J.L., Garcia 6Bellido A.1990.** Analyse génétique du développement des mutations de contrabithorax chez *Drosophila melanogaster*. *Génétique* **126** : 139-155.
- 98. Gakuru S. et Foua-Bi k. 1995.** Effet comparé des huiles essentielles de quatre espèces végétales contre la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus*Fab.) et le charançon du riz(*Sitophilus oryzae* L.). *Tropicultura* N°4, Vol. **13**, pp.143-146.

- 99. Gatehouse A.M.R. et Gatehouse J.A., 1998.** Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. *Pestc. Sci.* Vol. **52**, pp.156-175.
- 100. Gbolade A.A. et Adebayo T.A., 1993.** Fumigant effects of some volatile oils on fecundity and adult emergence of *Callosobruchus maculatus* F. *Insect. Sci. Applic.* Vol. **14**, pp. 631-636.
- 101. Gepts P., 2014.** The contribution of genetic and genomic approaches to plant domestication studies. In : *Curr. Opin. Plant Biol.* 18 : 51-9.
- 102. Gepts P., 1999.** Development of an integrated genetic linkage map in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and its use. In Singh S. editor. *Bean Breeding for the 21st Century*. Dordrecht : kluwer, pp. 53-91, 389- 400.
- 103. Gerhardt I.R., Paes N.S., Bloch C.J.R., Mendes P.A.M., Leite A., Chrispeels M.J., Grossi de Sa M.F., 2000.** Molecular characterization of a new arcelin-5 gene. *Biochem Biophys. Acta* 1490 : 87-98.
- 104. Ghasemzadeh A., Omidvar V. et Jaafar H.Z.E. 2012.** Contenu polyphénolique et leur activité anti oxydante de l'extrait de feuille de pot sucré (Ipomoea batatas) ; *journal des plantes médicinales* vol 6(15) : 2971-76
- 105. Gilbert B.L. et Norris D.M., 1968.** A chemical basis for bark beetle (*Scolytus*) distinction between host and non-host trees. *J. Insect Physiol.* Vol. **14**, pp. 1063- 1068.
- 106. Giri A.P. et Kachole M.V., 1998.** Amylase inhibitors of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds. *Phytochemistry*. Vol. **47**, pp.197-202.
- 107. Goldstein I.J. et Hayes C.E., 1978.** The lectins: Carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, Vol. **35**, pp.127-334.
- 108. Goldstein I.J. et Portez R.D., 1986.** Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins: properties, functions and applications. In *Biology and Medicine*. Orlando (USA): Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J., Academic Press Inc. pp. 35-249.
- 109. Gomes E., Sagot E., Gaillard C., Laquitaine L., Poinssot B., Sanejouand Y.H., Delrot S. et Coutos-Thevenot P., 2003.** Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis* sp.) cells in response to fungal elicitor treatment. *Mol. Plant Microbe Interac.* Vol. **16**, pp. 456-464.
- 110. Gomes V.M., Da cunha M., Miguens F.C., Fernandes K.V.S., Rose T.L. et Xavier – filho J., 1998.** Ultra structure and immunolabelling of *vigna unguiculata* vicilins (7S storage proteins) associated to fungi cells. *Plant Sci.* Vol. **138**, pp. 81- 89.
- 111. Goossens A., Dillen W., De clercq J., Van Montagu M., Cardona C. et Angenon G., 2000.** Analysis of bruchid resistance in the wild common bean accession G02771: no evidence for insecticidal activity of arcelin5. *Journal of Experimental Botany*, N°348, Vol. **51**, pp. 1229-1236. Oxford University Press.
- 112. Goossens H.A., Nohlmans M.K. et Van den Bogaard A.E., 1999.** Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections cause false-positive results in IgMtwo-test protocol for early

lyme borreliosis. 27(3) : 231. In Pub Med. Gov. US. National Library of Medicine National Institutes of health.

113. Goossens A., Geremica R., Bauw G., Van Montagu M. and Angenon G., 1994. Isolation and characterization of arcelin5 proteins and cDNA. Abstract. *Eur. J. Biochem.* N°3, Vol.225, pp. 787-795. Copyright c by federation of European Biochemical Societies.

114. Grant G., More L.G., Mc Kenzie N.H. and Pusztai A., 1982. The effect of heating on the haemagglutinating activity and nutritional properties of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Journal of Science Food and Agriculture*. Vol. 33, pp. 1324-1326.

115. Grant G., 1991. Lectins in toxic substances in crop plants. Ed. J.P.F.D'Mello M.C. Duffus and J.H. Duffus. Cambridge: *Royal Society of Chemistry* pp. 49-67.

116. Grasse P., 1949. Traité de zoologie, anatomie, systématique, biologie. Ed. Masson Cie. Paris T. IV, 979p.

117. Green T.R., Ryan C.A., 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves : a possible defense mechanism against insects. *Science* 175 : 776- 777.

118. Griffiths D.W., 1982. The phytate content and Iron-binding capacity of various field Bean (*Vicia faba* L.) preparations and extracts. *J. Sci. Food Agri*, Vol.33, pp. 847-851.

119. Grossi De Sa M.F., Mirkov T.E., Ishimoto M., Colucci G., Bateman K.S. et Chrispeels M.J., 1997. Molecular characterization of a bean alpha-amylase inhibitor that inhibits the alpha-amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta*. Vol.203, pp. 295-303.

120. Gueguen M. et Cerletti S., 1994. Proteins of some legumes seeds: Soy bean, Pea, Faba beans and Lupin. In: B.J.F. Ed. HDSON, *New and developing sources of food Proteins* Chapman and Hall, USA. Pp. 145-193.

121. Gusmao R., Quintao S., Mc Daid D., Arensman E., Van Audenhove C., Coffey C., Vamik A., Varnik P., Coyne J. et hegerl U., 2013. Antidepressant utilization and suicide in Europe: An Ecological Multi-National Study. In OPEN ACCESS Freely available online. Volume 8 issue 6. E66455. PLOS ONE/ www. Plosome. org

122. Gwinner J., Harnisch R. et Muck O, 1996. Manuel sur la manutention et la conservation des graines après récolte. *Progrès de protection des stocks et des récoltes*. Eshborn, R.F.A., 388p.

H

123. Hagstrum D.W., Vick K.W. and Webb J.C., 1990. Acoustical monitoring of *Rhyzoperta dominica* (Coleoptera- Bostrychidae). Population wheat. *J. Environ. Entomol.* Vol. 83, N°2, pp 625-628.

124. Hamelryck T.W., Poortmans F., Goossens A., Angenon G., Van Montagu M.,

- Wyns L. et Lois R., 1996.** Crystal structure of arcelin5, a lectin-like defense protein from *Phaseolus vulgaris*. *The American Society for Biochemistry and molecular Biology, INC*, N°51, Vol. **271**, pp. 32796-32802.
- 125. Hamraoui A. et Regnault-Roger C., 1997.** Lutte contre les insectes phytophages par les plantes aromatiques et leurs molécules allélochimiques. *Acta bot. Gallica*, N°4, Vol.**144**, pp. 401-412.
- 126. Harberd N., 2004.** Seed to seed. The secret life of plants. Ed Bloomsbury USA 876p.
- 127. Harborne J.B., 1988.** Introduction to ecological biochemistry. New York: *Academic press*. Vol. **19**, pp.1498-1501.
- 128. Hartmann S., 1996.** The world as a process : Simulations in the natural and social sciences. In R. Hegselmann, U. Mueller and K.G. Troitzsch, editors, *Modelling and simulation in the social science : from the philosophy of science point of view*, vol. 23, pp. 77-100. Kluwer Academic Publishers.
- 129. Hartweck L.M., Vogelzang R.D. et Osborn T.C., 1991.** Characterization and comparison of arcelin seed protein variants from common bean. *Plant Physiol.*Vol. **97**, pp. 204-211.
- 130. Hawkes C. et Sullivan J., 2001.** The impact of herbivory on plants in different resource conditions : a meta- analysis. *Ecology*, 82, 2045-2058
- 131. Haryadi, 1994.** Sensibilité variétale du riz aux attaques de *Sitophilus oryzae* L. et *Sitotrogacerealelia* (olivier). Analyse de l'origine d'une résistance potentielle. *Thèse doct. Scien. Agr. Ecol. Nat. sup. Agr. De Montpellier*
- 132. Higgins T.G.V., Grossi de sa M.F. et Chrispeels M.J., 1998.** Genetic engineering with amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Sci. Res* Vol. **8**, pp.1-8.
- 133. Highland H. A., 1991.** Post irradiation protection from infestation by insect resistant packaging in porc of the final. *Res. Coordination meeting, ienna (Austria)*. IAFA, pp.51-57.
- 134. Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Sheerman S.E., Barker F. et Boulter D., 1987.** A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330 : 160-163.
- 135. Hirabayashi J., 1997.** Introduction to lectinIn *Glyco Word Protein*.Teikyo university, *faculty of Pharmaceutical Scienses*. . Pp.1-3.
- 136. Hirashina A., Lieno R. and Eto M., 1992.** Effects of various stressors on larval growth and whole body octopamine levels of *Tribolium castaneum* (Herbst) *Pest. Bioch. Physiol. (USA)*, N°3.Vol. **44** pp 217-225.
- 137. Hojjati S.M., 1976.** Amino acid patterns of kidney beans grown under different S and K regimes. *Argon J.*Vol. 68, pp.668-671.
- 138. Hoffman A. et labeyrie V., 1962.** Entomologie appliquée à l'agriculture. Ed. Masson et Cie., Paris, T.1, 564p.

- 139. Hopquin B., 1994.** Lisses, rides, sucres colores tous les pois sont dans la nature, Vol. **86**, pp.10-11. Unité informations, In *PELT JM*, 1993, Des légumes, pp.165- 170.
- 140. Hopquin B., 1997.** Légumes d'industrie : le renouvellement des variétés en 1996. *Unilet-Information*, Vol. **96**, pp. 8-11.
- 141. Hopquin B., 1998.** Le haricot vert *Phaseolus vulgaris*. In Description, production et amélioration génétique des légumes. pp.131-141.
- 142. Hruska A.J., 1988.** Cyanogenic glucosides as defense compounds: a review of the evidence. *J. Chem. Ecol.* Vol.**14**, pp. 2213-2217.
- 143. Huesing J.E., Murdock L.L. et Shade R.E., 1991.** Rice and Stinging Nettle Lectins. Insecticidal Activity similar to wheat-Germ-Agglutinin. *Phytochemistry*, N°11 Vol.**30**, pp.3565-3568.

I

- 144. Iserin, 1997.** Encyclopédie des plantes médicinales identification, préparation, soin. Préface de Paule Iserin. Ed. Lavoisier. 95p.
- 145. Ishaaya I., Birk Y., Bondi A. and Tencer Y., 1969.** Soybean saponins. IX. Studies of their effects on birds, mammals and cold-blooded organisms. *J. Sci. Food Agric.* Vol.**20**, pp. 433-436.
- 146. Ishimoto M. et Chrispeels M.J., 1996.** Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of amylase inhibitor in the common bean. *Plant physiology*, 111(2) : 393-401, 47.
- 147. Iulek J., Franco O.L., Silva M., Slivinski C.T., Bloch C., Rigden D.J. et De Sa M.F.G., 2000.** Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new alpha-amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye) *Inter. J. Biochem. Cell Physiol.* Vol. **32**, pp. 1195-1204.

J

- 148. Jacobson M., 1995.** Toxicity of neem to vertebrates and side effects on beneficial and other ecologically important non- target organisms. In Schmutterer H. (ed.), the neem Tree source of unique Natural target organisms, in Schmutterer H. (ed.), the neem Tree source of unique Natural target organisms purposes. , weinheim, Germany, pp. 485-495.
- 149. Janzen D., 1980.** When Is It Coevolution ? *Evolution*, 34(3), 611-612.
- 150. Janzen D.H., 1977.** The interaction of seed predators and seed chemistry in comportement des insectes et milieu trophique, Ed.CNRS, 493p pp. 415-428.
- 151. Janzen D.H., 1976.** Seed eaters versus seed size, number, toxicity and dispersal-evolution. N°23, Vol. 1, pp.1-27.

152. Janzen D.H., 1969. Birds and the Ant x Acacia Interaction in central America, with notes on birds and other Myrmecophytes. The condor, vol. 71, N°3, pp. 240-256. Published by : University of California Press Cooper Ornithological Society.

153. Jirovetz L., Buchbauer G., Ngassoum M.B. & Geissler M., 2002. Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid – phase micro-extraction –gas chromatography, solid –phase microextraction –gas chromatography –mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography*, 976, 1-2, 265-275.

154. John M.E. et Long C.M., 1990. Sequence analysis of arcelin 2, a lectin-like plant protein. *Gene* 86, 171- 176.

K

155. Kabsch W. et Sander C., 1983. Dictionary of protein secondary structure : pattern recognition of hydrogen- bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22 : 2577-2637.

156. Kader J.C., 1996. Lipid- transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 19, pp. 398-402.

157. Kami J., Becerra V., Debouck D.G. et Gepts P., 1995. Identification of presumed ancestral DNA sequences of phaseolin in *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 1101-4.

158. Kaminski P.A., Buffard D. & Strosberg A.D. ; 1987. The pea lectin gene family contains only one functional gene. *Plant Molec. Biol.* N° 5, Vol.9, pp. 497-507.

159. Kaplan L. et Lynch T.F., 1999. *Phaseolus* (Fabaceae) in archaeology ; AMS radiocarbon dates and their significance for pre-colombian agriculture. *Econ. Bot.* 53 : 261-72.

160. Karbache F., Mouhouche F. et Fleurat Lessard F., 2011. Deterrent and insecticidal properties of bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) whole meal or protein extract incorporated into the diet of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 47 : 197- 203.

161. Karbache F., 2000. Etude du comportement de quelques variétés de pois chiche vis à vis des attaques de deux insectes de stock *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) et *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Curculionidé). *Thèse Ing. Agron., Inst. Nat. Agro., EL Harrach*, 109 p.

162. Karban R. et Baldwin I.T., 1997. Induced responses to herbivory. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA, in Press.

Kasahara S., Pellegrino K.C.M., Rodrigues M.T. et Yonenaga-Yassuda Y., 1996. Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae), with banding patterns. In *hereditas* 125 : 37-46. Lund, Sweden. ISSN 0018-0661.

- 163. Kellouche A., 2005.** Etude de la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* F. (*Coleoptera Bruchidae*), physiologie, reproduction et lutte. *Thèse Doctorat d'état en Science Naturel.* Univ. T.O.Z. Spécialité : Entomologie, 216p.
- 164. Kellouche A. et Soltani N., 2004.** Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* F. *International Journal of Tropical Insect Science.* N° 2, Vol. **24**, pp.184-191.
- 165. Kellouche A., Soltani N., Kreiter S., Auger J., Arnold I. et Kreiter P., 2004.** Biological activity of four vegetable oils on *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (*Coleoptera Bruchidae*). In *REDIA, LXXXVII*, pp. 39-47.
- 166. Kellouche A., Soltani N. et Huignard J. 2004.** Activité de reproduction et capacité de développement de la descendance de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (*Coleoptera : Bruchidae*) dans des graines de différents cultivars de *Vigna unguiculata* (Walp) et de *Cicer arietinum* (L.).
- 167. Keita S.M., Vincent C., Schmidt J.P., Amason J.T. et Belanger A., 2001.** Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) (*Coleoptera: Bruchidae*). *J. Stored Prod. Res.* Vol. **37**, pp. 339-349.
- 168. Ketoh G.K., Glitho A.I. et Huignard J., 2002.** Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (F.) and its parasitoid *Dinarmus basalis* (Rond) (Hymenoptera: Pteromalidae). To three essential oils. *J. Econ. Entomol.* **95**, pp. 174-182.
- 169. Khalfi O., 1983.** Biologie de la reproduction de *Callosobruchus maculatus* F. (*Coleoptera Bruchidae*). Effet de trois insecticides de synthèse sur la reproduction. *Thèse Magister Inst. Nat. Agronomie, El Harrach, Alger*, 87p.
- 170. Kigel J., 1999.** Culinary and nutritional quality of *Phaseolus vulgaris* seeds as affected by environmental factors. In *Biotechnol. Argon. Soc. Environ.* N°4. Vol.3, pp. 205-209.
- 171. Kisten H., 2007.** Climate change 2007. The Physical Science Basis, couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. Pp. 538-540. Cambridge University Press.
- 172. Kocourek J., 1986.** Historical background in the lectins: properties, functions and applications in biology and medicine. Orlando (USA): Liener I.E., Sharon N., Goldestein I.J., *Academic press. Inc*, pp. 3-34.
- 173. Kogan M., 1995.** Educational policy making : A study of interest groups and parliament. London : Allen and Unwin.
- 174. Kolandaivel P., Selvarengan P., Gunavathy K.V. 2006.** Structure and potential energy surface studies on 310 helices of hen egg white lysozyme and phaseolus vulgaris arcelin-1 proteins. *BBA Proteins Proteomics* 1764 : 138-145.

- 175. Kornegay J., Cardona C. et Posso C.E., 1993.** Inheritance of resistance to mexican bean weevil in common bean, determined by bioassay and biochemical tests. *Crop. Science* Vol. **33**, pp. 589-594.
- 176. Kossu D.K. et Aho N., 1993.** Stockage et conservation des grains alimentaires tropicaux : principes et pratiques. Ed. *Flamboyant*, Cotonu, Benin, 125 p.
- 177. Kostukovsky M., Ravid U. et Shaaya E., 2002.** The potential use of plant volatils for the control of stored product insects and quarantine pests in pests in cut flowers. *Proc. And. Conf. on MAP*. Ed. *J. Bernath & al.*, pp. 347-353.
- 178. Kounink H., 2001.** Etude de l'activité anti-insecte de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiacea) et *Xylopiia aethiopica* dunal (*Annonacea*) sur *Tribolium castaneun* (Herbst) (*Coleoptera : Tenebrionieda*). Mémoire de maitrise en zoologie. Université de Ngaoundéré. Cameroun 33 p.
- 179. Knuckles B.E., Kuzmicky D.D., Gumbmann M.R. et Betschart A.A., 1989.** Effet of myo- inositol phosphate esters on in vitro and in vivo digestion of protein. *J. Food. Sci.*, Vol. **54**, pp. 1348-1350.
- 180. Krieger M., Stroud R.M. et Kay L.M., 1974.** Structure and specific binding of trypsin : comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *Journal of Molecular Biology*. 83(2) : 209-30.
- 181. Kumar M.A., Timm D.E., Neet K.E., Owen W.G., Peumans W.J. et Rao A.G., 1993.** Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (Winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* N°33, Vol. **268**, pp. 25176-25183.
- 182. Kuroda Y., Hamada D., Tanaka T. et Goto Y., 1996.** High helicity of peptide fragments corresponding to B-stand regions of B-lactoglobulin observed by 2D-NMR spectroscopy ; Volume1, Issu4, pp. 255-263.
- 183. Kusolwa P.M. et Myers J.R., 2011.** Seed storage proteins ARL2 and its variants from the APA locus of wild Tepary bean 255 G40199 confers resistance to *Acantocellides obtectus* when expressed in common beans. *African Crop Science Journal*, vol. 19, n°04, pp. 255-265.
- 184. Kwak M. et Gepts P., 2009.** Structure of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., *Fabaceae*) ; theor. Appl. Genet. 118 : 979-92.

L

- 185. Labeyrie V., 1981.** Vaincre la carence protéique par le développement des légumineuses alimentaires et la protection de leurs récoltes contre les bruches. *Food Nutr. Bull.*, N°1, Vol. **3**, pp. 24-38.
- 186. Labeyrie V., 2005.** Vaincre la carence protéique par le développement des légumineuses alimentaires et la protection de leurs récoltes contre les bruches. In *Post – Harvest Conservation of food*. 16p.

- 187. Larson G., Piperno D.R., Allaby R.G., Purugganan M.D., Andersson L., Arroyo kalin M. 2014.** Current perspectives and the future of domestication studies. *Proc. Natl. Acad Sci.USA*, 111/ 6139- 46.
- 188. Laskowski M.J. and KatoI., 1980.** Protein inhibitors of proteinases. *Pnnu. Rev. Biochem.* Vol. **49**, pp. 593-626.
- 189. Lepesme P., 1944.** Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés. Ed. Paul Le Chevalier, Paris, 335p.
- 190. Lee R.E., Lee M.R., Strong G. et Gunderson J.M., 1993.** Insect cold Hardiness and ice nucleating active microorganismes including their potential Use for biological control. *J.Insect Physiol.* N°1, Vol. **39**, pp.1-12.
- 191. Lee S.C., Gepts P.L. et Whitaker J.R., 2002.** Protein structures of common bean (*Phaseolus vulgaris*) α - amylase inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* N°22, Vol. **50**, pp. 6618-27.
- 192. Liaca V. et Gepts P.** Pulsed_field gel electrophoresis analysis of the phaseolin locus region in *Phaseolus vulgaris*, Genome Downloaded from www.nrcresearchpress.com by Calif Dig Lib-Davis on 10/27/12 For Personal use only , Genome ,Vol.**38**,1996 .Page 722-729.
- 193. LienardV. et Seck D., 1994.** Revue des méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus* (F.) (*Coleoptera: Bruchidae*) 21p.
- 194. Liener I.E., 1986.** Nutritional significance of lectins in the diet the lectins (Liener I.E., Sharon N. et Goldstein I.J.: editors). *Academic Press*, New York, USA, pp. 527-552.
- 195. Liener I.E., 1982.** Toxic constituents in legumes. In *Arora S.K. chemistry and biochemistry of legumes*. New Delhi. India/ oxford and IBH, p.217.
- 196. Lioi L. et Bollini R., 1989.** Identification of a new arcelin variant in wild bean seeds. *Bean Improvement Cooperative* 32, 28p.
- 197. Lioi L., Sparvoli F., Galasso I., Lanave C. et Bollini R., 2003.** Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events. *Theor. Appl. Genet.* N°5, Vol.**107**, pp.814-22.
- 198. Lis H. et Sharon N., 1986.** Biological properties of lectins in *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Orlando (USA): Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J., *Academic press. Inc*, pp. 266-293.
- 199. Loris R., Steyaert J., Maes D., Lisgarten J., Pickesgill R. And Wyns L., 2003.** Crystal structure determination and refinement at 2,3 angstroms resolution of the lentil lectin. *Biochemistry* **32**, pp. 8772-8781.
- 200. Loris R., 1999.** The PHA-family from *Phaseolus vulgaris* pp. in *Crystal studies of lectin*. VUB-ULTR, *Paardens traat* 65, B-1640 Sint- Genesius Rode. pp. 27-32.

- 201. Loris R., Langhorst U. Devos S., Decanniere K., Bouckaert J., Maes D., Transue T.R. et Steyaert J., 1999.** Conserved water molecules in a large family of microbial ribonucleases. In *proteins* 36 : (1) 117-134.
- 202. Louda S. et Mole S., 1991.** Glucosinolates: chemistry and ecology. In *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*. Eds. G.A. Rosenthal and M.R. Berenbaum) New York: *Academic press*, Vol.I, pp. 124-164.
- 203. Louis S., 2004.** Diversité structurale et d'activité biologique des albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. Thèse Doctorat, Inst. Nat. des Sciences appliquées de Lyon. Option : analyse et modélisation des systèmes biologiques. Paris. 260p.
- 204. Lynn M ., Hartweck ., Robert D ., Vogelzang .and Thomas C ., Osborn .** Characterization and Comparison of Arcelin Seed Protein Variants from Common Bean, *Plant Physiol.*(1991)97 ,204-211 ,*Plant Physiol* .Vol .97 ,1991 ,Received for publication February 26 ,1991 ,Accepted May 9 ,1991.

M

- 205. Mahr S.E.R., Raymond A.C., Mahr D.L. et Sadof C.S., 2011.** Biological control of insects and other pests of greenhouse crops, extension Biological programs, department of Entomology. University of Wisconsin-Madison. Noeth Central Regional Publication 581.
- 206. Malaikozhudan B., Suresh P., Seshadri S. et Janarthanan S., 2003.** Toxicity assessment of wild bean seed protein-arcelin on Asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fabricius). *Indian J. Exp. Biol.*, N°12, Vol. 41, pp.1436-5.
- 207. Maliyakal E.J., 1992.** An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20 : 2381.
- 208. Mankin R.W., Shuman D. et Weaver D.K., 1998.** Thermal enhancement of acoustic Detectability of *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. Ed. *United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service*. N°3, Vol.24, pp. 1269-70.
- 209. M.A.P, 2006.** Statistiques agricoles, superficies et production, série B, M.A.P. Algérie.
- 210. Martin-Cabrejas M.A., Esteban R.M., Waldron K.W., Maina G., Grant G., Bardoza S. et Pusztai A., 1995.** Hard to cook phenomenon in beans: Changes in antinutrient factors and nitrogenous compounds during storage. *J. Sci. Food Agri.* Vol.69, pp.429-435.
- 211. Mauricio R. M., Rausher D. et Burdick S.D., 1997.** Variation in the defense strategies of plants : are resistance and tolerance mutually exclusive ? *Ecology* 78 : 1301- 1311.
- 212. Mauricio R. M., Bustos ., Begum D ., Fatma A ., Kalkan ., Michael J ., Batraw and Timothy C ., 1991.** Hall, Positive and negative cis-acting DNA domains are required for spatial and temporal regulation of gene expression by a seed storage protein promoter, the *EMBO Journal* vol. 10 No. 6, pp.1469-1479.

- 213. Mc Gauchey W.H. et Akins R.G., 1989.** Application of modified atmospheres. In frame grain storage bins. *J. Stored. Prod. Res.* Vol. **25**, pp. 201-210.
- 214. Mc key D., 1979.** The distribution of secondary compounds within plants. Pp. 56-133 in G.A. Rosenthal and D.H. Janzen, editors. *Herbivores : their interactions with secondary plant metabolites.* Academic Press, New York, USA.
- 215. Megersa B., 2010.** Etude épidémiologique des principales maladies du chameau dans la plaine de Borana, dans le sud de l'éthiopie. Groupe de coordination des zones arides.
- 216. Melo F.R., Sales M.P., Silva L.S., Franco O.L., Bloch C.J. and Ary M.B., 1999.** Alpha-amylases from cowpea seeds. *Prot. Pept. Lett.* Vol. **6**, pp. 387-392.
- 217. Miao L.I., Qin L.I.U., Cui Y., Dong L.I., Hexiang W. et Tzibun N.G., 2017.** Isolation and characterization of a *Phaseolus vulgaris* trypsin inhibitor anti proliferative activity on leukemia and lymphoma cells molecular 22, 187.
- 218. Mikolajczak K.L., Madrigal R.V., Smith J.C.R. and Reed D.K., 1984.** Insecticidal effects of cyanolipids on three species of stored product insects, European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) larvae, and striped cucumber beetle (*Coleoptera: Chrysomelidae*). *J. Econ. Entomol.* Vol. **77**, pp. 1144-1148.
- 219. Mills J.T., 1990.** Protection des grains et de graines oléagineuses stockées à la ferme contre les insectes, les acariens et les moisissures. *Minist, Approv, Serv, Canada, Agrican. Public*, N° 1851, 49p.
- 220. Minney B.H.P., Gatehouse A.M.R., Dobie P., Dendy J., Cardona C. et Gatehouse J.A., 1990.** Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (Common bean): a mechanism for arcelin toxicity. *J. Insect Physiol.* Vol. **36**, pp.757-767.
- 221. Mirkov T.E., Wahlstrom J.E., Hagiwara K., Finardi-Filho F., Kjemtrup S. et Chrispeels M.J., 1994.** Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin – α amylase inhibitors family of common bean and its relative. *Plant Mol. Bio.* Vol. **26**, pp.1103-1113.
- 222. Mishra S.K., Macedo M.L.R., Panda S.K., Panigrahi J.** Bruchid pest management in pulses: past present status and use of modern breeding tools for development of resistant varieties, *Annals of applied biology* ISSN 0003- 4746, Ann Appl Biol 172 (2018)4-19 -2017 Association of Applied Biologists160.
- 223. Mohiuddin S., 1990.** Studies on the repelbint activity of some indigenous plant oils against *Tribolium castaneum* (Herbs). *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* N°8, Vol. **33**, pp. 326-328.
- 224. Montecucco C., 1998.** Protein toxins and membrane transport. *Curr. Opin. Cell. Biol.* Vol.10, pp.530-536.
- 225. Mosse J. et Pernollet J.C., 1982.** Storage proteins of legum seeds. In ARORAS.K. *Chemistry and Biochemistry of legumes*, I.B.H. Publishing co.; Oxford, 1983, pp.111-193.

- 226. Mouhouche Sadaoui F., 2005.** Identification des facteurs de la sensibilité variétale du pois chiche aux attaques d'un ravageur de stockage adapté *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae) et non adapté *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). 50, 100 et 200ml.
- 227. Mouhouche F. et Fleurat-lessard F., 2003.** Sensibilité de quelques variétés de pois chiche aux attaques de *Sitophilus oryzae* L. et *Callosobruchus maculatus* F. N°5, 15p.
- 228. Mouhouch F., karbache F., Fleurat -Lessard F., 2010.** Insecticidal properties of whole meal or protein extracts of the bean seeds *Phaseolus vulgaris* L. On juvenile stage of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera : Bruchidae), International working Conference on stored Product Protection, Juluis-kuhn-Archiv, 425- 669, 2010.
- 229. Moura F.T., Oliveira A.S., Macedo L.L.P., Andre L.B.R., Vianna, Andrada L.B.S. Martin M.A.S., Jose T.A., Santos E.A. et Sales M.P., 2007.** Effet of chitin binding vicellin from enterolobium contortisiliquum seeds on bean Bruchid Pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and phytopathogenic fungi (*Fusarium solani* and *colletrichum lindemuntianum*. *J. agri. Food Chem.* Vol. 55, pp. 260-266.
- 230. Mourey A., 2004.** Manuel de nutrition pour l'intervention humanitaire. *Comité international de la croixrouge*. 724p.
- 231. Mourey L., Pedelacq J.D., Fabre C., Causse H., Rougé P., Samama J.P. 1997.** Small-angle X-ray scattering and crystallographic studies of arcelin-1 : an insecticidal lectin-like glycoprotein from *Phaseolus vulgaris* L. In : *Proteins*. 29(4) : 433-42.
- 232. Mourey A., Pedelacq J.D., Birck C., Fabre C., Rougé P. et Samama J.P., 1998.** Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1,9 Å Resolution. *J. Biol.Chem.*, Issue 21, Vol. 273 pp. 12914-12922.
- 233. Muller-Riebau F., Berger B., Yegen O. et Cakir C., 1997.** Seasonal variations in the chemical composition of essential oils of selected aromatic plants growing wild Turkey. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 45, pp. 4821-4825.
- 234. Multon J.L., 1982.** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Ed. Lavoisier, Tec & Doc. APRIA. T.1 Paris, pp. 394-412.
- 235. Muzquiz M., Burbano C., Ayet G., Pedrosa M.M. et Cuadrado C., 1999.** The investigation of antinutritionnels factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* N° 4, Vol. 3, pp. 210-216.

N

- 236. Nagata K., Kudo N., Abe k., Arai S et Tanokura M., 2000.** Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. *Japonica Biochemistry*. Vol.39, pp. 14753-60.
- 237. Neupane F. P. et Norris D.M., 1990.** Indo-acetic acid alteration of soybean resistance to the Cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* Vol.19, pp. 215-221.
- 238. Ngamo L .S.T. & Hance Th .,** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical ,TROPICULTURA , Ngamo et hance 2007 ,25 ,4 ,215-220.
- 239. Ngamo L .S.T., 2000.** Protection intégrée des stocks de céréales et de légumineuses alimentaires. Analyses scientifiques .Bulletin Panafricain d'Informations Phytosanitaires, N°26-27 ,13-15.
- 240. Ngamo L.S.T., 2001.** Premier rapport annuel (1999-2000).Grand programme de recherche universitaire .Développement et valorisation des ressources animales et végétales .Protection intégrée des denrées stockées. Université de Ngaoundéré .31 p.
- 241. Ngamo L.S.T., 2001.** Deuxième rapport annuel (1999-2001). Grand programme de recherche universitaire. Développement et valorisation des ressources animales et végétales .Protection intégrée des denrées stockées. Université de Ngaoudéré. 15 p.

O

- 242. O'Dell B.L. and De Boland A., 1976.** Complexation of phytate with proteins and cations incorn germ and oilseed meal. *J. Agric. Food Chem.* Vol. **24**, pp.804-808.
- 243. Olsnes S., Wesche J. et Falnes P., 1999.** Binding, uptake, routing and translocation of toxins with intracellular sites of action. In *The comprehensive Sourcebook of bacterial protein toxins*, (Eds. J.E. Alouf and J.H. Freer) London: Academic Press, pp. 73-93.
- 244. Orozco- Cardenas M.L., Narvaez6Vasquez J., Ryan C.A., 2001.** Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding systemin and methyl jasmonate. *Plant Cell* 13 : 179-191.
- 245. Osborn T.C., Alexander D.C., Sun S.S.M., Cardona C. et Bliss F.A., 1988.** Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein science .Vol. **240**: 207-210.
- 246. Osborn T.C., Blake T., Gepts P. et Bliss F.A., 1986.** Bean arcelin2. Genetic variation, inheritance and linkage relationships of a novel seed protein of *phaseolus vulgaris* L., *Theoretical and applied Genetics*.Vol.**71**, pp.847-855.

247. Osborn T.C. et Wittrock M., 1985. The generative learning model and its implications for science education studies in science education, 12, 59-87.

248. Ouedraogo A.P., Sou S., Sanon A., Monge J.P., Huignard J., Tran M.D. et Credland P.F., 1996.Influence of the temperature and humidity on population of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid *Dinarmus basalis*(Pteromalidae) in two zones of Burkinafasso. *Bull. Entomol. Research*.Vol.**86**, pp. 695-702.

P

249. Pacheco I.A., 1990. Resistance to malathion, pirimiphos-methyl and fenitrothion in coleopteran from stored grain. In Flleurat-Lessard F., Ducon P., Editors. Proc 5 Th. *Int.Working. Confer. Stored product. Prot.*,Bordeau, France, Vol.**2**, pp. 1029-1037.

250. Padin S.B., Dal G.M. et Vasicel L., 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) In stored grains. *Entomophaga*. Vol. 42, N° 4, pp. 569-574.

251. Paes N.S., Gerhardt I.R., Coutinho M.V., Yokoyama M., Santana E., Harris N., Chrispeels M.J. et Sa M.F.G., 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *Journal of insect physiology*, vol. 46. N°04, pp. 393-402. Ref 23.

252. Panda N., Khush G.S., 1995. Host plant resistance to insects. CAB international wallingford, oxon, UK, 431p.

253. Pandurangan S., Marsolais F., 2017. Analysis of phaseolin copy number by quantitative PCR. *Annu. Rep. Improv. Coop* 60 : 107-108.

254. Pandurangan S ., Daipari M .,Yin F., Munholland S ., Gregory E ., Perry B ., chapman P ., Huang S ., Sparvoli F ., Bollini R ., William L ., Crosby., PK . Pauls K.P.and Marsolais F. 2016. ORIGINAL RESEARCH , Genomic Analysis of Storage Protein Deficiency in Genetically Related Lines of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Front Plant Sci.* 7 : 389.

255. Papaj D.R. et Rauster M.D., 1987. Genetic differences and phenotypic plasticity as causes of variation in oviposition preference in *Battus philenor* *Oecologia* (Berlin) 74 : 24-30. (*Phaseolus vulgaris*), Genomis of Storage Protein Deficiency, *Frontiers in Plant science*,Vol 7 ,Page 12.

256. Peitsch M.C., 1996. Introduction to Immunol. *Biochem. Soc. Trans.* 24, 274-279.

257. Pereira J. et Wohlgmuth R., 1982. Neem (*Azadirachta indica*) of West African origin as a protectant of store maize. *Z.Arg. Ent.*, N° 94. pp. 208-214.

- 258. Peumans W.J. et Van Damme E.G.M., 1995.** Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiologie*. Vol. **109**, pp. 347-352.
- 259. Prabu M.M. Sankanarayanan R., Puri K.D., Sharma V., Surolia A., Vijayan M. et Suguna K., 1998.** Carbohydrate specificity and quaternary association in basic winged bean lectin X-ray analysis of the lectin at 2.5Å°. *J. Mol. Boil.* Vol. **276**, pp.787-796.
- 260. Puztai A., Clarke E.M.W., King T.P. et Stewart J. C, 1979.** Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): Chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. *J. Sci. Food Agric.* Vol. **30**: pp.843-848.
- 261. Puztai A., Begbie R., Grant G., Ewen S.W.B. et Bardocz S., 1993.** Indirect effects of food antinutriments on protein digestibility and nutritional value of diets. In: *M.F.Fuller* (Ed), *In vitro digestion for pigs and poultry*,. *Cab international*, Wallingford, UK. Pp.45-61.

R

- 262. Raccaud- schoeller, 1980.** Les insectes: Physiologie et Développement. Ed. Masson, Paris, 296p.
- 263. Rahbé Y., Febvay G. et Kermarrec A., 1988.** Foraging activity of the attine ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich))(Hymenoptera: Formicidae) on resistant and susceptible yam varieties. *Bull. Entomol. Res.* Vol. **78**, pp. 329-337.
- 264. Raja N., Albert S., Ignacimuthu S. & Dorn S., 2001.** Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *J. Stored. Prod. Res.* Vol. **37**, pp. 127-132.
- 265. Rajapakse R. and Van Amden H.F., 1997.** Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C.chinensis* and *C. rhodesianus*. *J. Stored. Prod. Res.* N°5, Vol. **33**, pp. 59-68.
- 266. Ramzan M., 1994.** Efficacy of edible oils against pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.), *J. Insect Sci.* Vol.7, pp. 37-39.
- 267. Rausher M.D. 2001.** Co- evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* 411 : 857-864.
- 268. Rausher M.D. 1996.** Genetic analysis of coevolution between plants and their natural enemies. *Trends in Genetics* 12 : 212- 217.
- 269. Rausher M.D. 1992.** Natural selection and the evolution of plant- insect interaction. Pp ; 20-88 in B.D. Roitberg and M.B.Isman, eds. *Insect chemical ecology : an evolutionary approach*. Chapman et Hall, New York.

- 270. Regnault –Roger C. 2016.** Preserver la santé des plantes avec des allomones végétales et straits botaniques : quelques clefs pour une phytoprotection agricole durable. Academie d’agriculture de France, potentiel de la science pour l’avenir de l’agriculture, de l’alimentation et de l’environnement, 23p.
- 271. Regnault –Roger C. et Hamraoui A., 1994.** Reproductive inhibition of *Acantholides obtectus* Say (Coleoptera) bruchid of kidney beans (*P. vulgaris* L.) by some aromatic essential oils, *Crop protection*, 13 ,624-628.
- 272. Regnault –Roger C. et Hamraoui 1993.** *Efficiency of plants from south of France used as traditional protectant of Phaseolus vulgaris L. Against its bruchid Acantholides obtectus Say: Journal of Stored Products Ressearch*, 29, 259-264.
- 273. Rendon-Anaya M., Montero-Vargas J.M., Saburido-Alvarez S. et Vlasova A. 2017.** Genomic history of the origin and domestication of common bean unveils its closest sister species ; In *Genomic Biology*.
- 274. Rezende A.A., Pacheco M.T.B., Silva V.S.N., Ferreira T.A.P.C. 2017.** Nutritional and protein quality of dry Brazilian beans (*Phaseolus vulgaris* L.) *Food Sci. Technol., Campinas*. 7p.
- 275. Rezkallah H., 1998.** Comportement de quelques variétés de pois chiche *Cicer arietinum* L. vis-à-vis des attaques de *Callosobruchus maculatus* L. (Coleoptera : Bruchidae) thèse Ing. Agr., Int. Nat. Agro. El harrach.
- 276. Rhoades D.F., 1979.** Evolution of plant chemical defense against herbivores. Pp. 3-54. In : G.A. Rosenthal and D.H. Janzen, editors. *Herbivores : their interactions with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York, USA.
- 277. Richardson M., 1991.** Seed Storage Proteins- The Enzyme Inhibitors In *Methods In Plant Biochemistry*, New York: *Academic Press*, Vol.5, pp. 259-305.
- 278. Ridet J.M., 1992.** Des protozoaires aux échinodermes. Ed. *Marketing, Paris*, 223p.
- 279. Rodrigues Macedo M.L., Coelho M.B., Machado Freire M. Das Gracias, Macado O.L.T., Marangoni S. et Novello J.C., 2000.** Effect of a toxic Protein Isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Protein and peptid letters*. N°4, Vol.7, pp.225- 231.
- 280. Romero Andreas J., Yandell B.s., Bliss F.A., 1986.** Bean arcelin. 1. Inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effect on seed composition. *Theor Appl. Genet.* 72 : 123-128.
- 281. Rosenthal G.A., 1982a.** Plant non-protein amino and amino acids, *New York: Academic Press*, Vol. 3, pp.57.
- 282. Rosenthal G.A., 1982b.** Secondary plant metabolites-round table discussion In 5 th International Symposium on Insect Plant Relationships, Eds. J.H. Visser and A.K. Minks, pp. 331-334.

283. Royo c. Voltas J. et Romagosa I., 1999. Remobilization of preanthesis assimilates to the grain for grain only and dual purpose (Forage and grain) Tritical. *Agron. J.* 91 : 312-316.

S

284. Sales M.J., William G.H., Yuting Du, Amitha S.S., Naaman M.S., Paul A.J. 2018. Séquences complètes du génome de *Streptococcus sobrinus* SL1 (ATCC33478= DSM 20742), NIDR 6715-7 (ATCC27351) ? NIDR 6715 (ATCC 27352) et NCTC 10919 (ATCC 33402). IN American society for microbiology

285. Sales M.P., Gerhardt I.R., Grossi –de – sa M.F. and Filho J.X., 2000. Do legume storage proteins play a role in défending seeds against Bruchids? *In plant Physical*, Vol. 124: pp.515-522.

286. Sakthivelkumar S., Veeramani V., Hilda K ., Arumugam M . et Janarthanan S. 2014. Analysis on the arcelin expression in bruchid pest resistant wild pulses using real time RT-Qpcr, *Indain Journal of Experimental Biology*, Vol. 52, December 2014, pp.1195-1200.

287. Sakthivelkumar S., Jesse M.I., Veeramani V., Ramaraj P., Kathiravan K., Arumugam M ., Sundaram J. 2013. Diversity and analysis of sequences encoded by arcelin genes from Indian wild pulses resistant to bruchids. *Process Biochemistry* 48, pp. 1697-1705.

288. Samac D.A., and Shah D.M., 1991. Developmental and Pathogen- Induced Activation of the Arabidopsis Acidic Chitinase Promoter. *Plant Cell*. Vol. 3, pp. 1063-1072.

289. Sanon H. et Kanwe A., 2010. Valorisation des pelures de mangue et des cerneaux de graines dans l'alimentation des animaux : valeur nutritive et consommation alimentaire volontaire chez les ovins. *Adv. Anim. Biosc.*, 1(2) : 445-446.

290. Santimone M., Koukiekolo R., Moreau Y., Le Berre V., Rougé P., Marchi-Mouren G. et Desseaux V., 2004. Porcine pancreatic alpha amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (alpha –AI1) and structural changes in the alpha –amylase inhibitor complex. *Biochem. Biophys. Acta* Vol.2. 181-90.

291. Santino A., Valsasina B., Lioi L., Vitale A. et Bollini R., 1991. Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed lectins: a novel electrophoretic variant of arcelin. *Plant physiology (life sciences Advances)*. Vol. 10: pp.7-1.

292. Sathe S.K., Deshpande S.S. et Salunkhe D.K., 1984. Interrelationships between certain physical and chemical properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Qual. Plant Foods Hum Nutr.* 34 : 53-65. MARTINUS NITHOFF/Dr W. Junk Publishers, the Hague. Printed in the Netherlands. Departement of Nutrition and Food Science, Utah State University, Logan. UT84322, USA.

- 293. Sayaboc P.D. et Acda M.A., 1990.** Resistance of the major Coleopterous pests of stored grain to malathion and pirimiphos-methyl. *J. Entomol.*, Philippine, Vol. **8**, N°1, pp. 653-660.
- 294. Schiltz M., 1997.** Utilisation du xéron et du Krypton pour la résolution du problème des phases par les méthodes du remplacement Isomorphe et de la diffusion Anormale PH.Thesis, university of Paris XI, Orsay. France.197p.
- 295. Schmutterer H., 1995.** The neem Tree : Source of unique Natural Products for integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other purposes, VCH, weinheim, Germany, pp. 1-696.
- 296. Schneider R., Massow M., Lisowsky T. et Weiss H., 1995.** Different respiratory defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein. *Curr Genet.* 29(1) : 10-7.
- 297. Schonle I. et Bergelson J., 2000.** Evolutionary ecology of the tropane alkaloids of *Datura stramonium* L. (solanaceae). *Evolution* 54 : 778-788.
- 298. Schoonhoven A.V., Cardona C. et Valor J., 1983.** Resistance to the bean weevil and the mexican bean weevil (*Coleoptera: Bruchidae*) in non- cultivated common bean accessions. *Journal of economic Entomology.* Vol.75: pp.567-569.
- 299. Schultz T.P., 2002.** Wage grains associated with height as a form of health human capital. *American Economic Review*, American Economic Association, vol.92(2), pp. 349-353.
- 300. Seck D., Lognay G., Haubruge E., Wathel J.P., Marlier M., Gaspar M. et Severin M., 1993.** Biological activity of the shrub *Boscia senegalensis* (Pers.) Lam. Ex Poir (Capparaceae) on stored grain insects. *J. Chem. Ecol.* Vol. **19**, pp.377-38.
- 301. Shahein A., 1991.** Susceibility of some stored product insects to high and low temperatures. *Zagazig. J. Agri. Res. Egnot.* N°2. Vol.18, pp. 577-584.
- 302. Shakoori A.R., Malik M.Z. et Salem M.A., 1993.** Toxicity of Karate to Malathion resistant Pakistan strain of *Tribolium castaneum* (Herbst) adults, Pkistan. *J. Zool.*, Vol.25, pp. 261-271.
- 303. Sharon et Lis, 1990.** Lectins as cell recognition molecules. *Science.* Vol. **246**, pp.227-234.
- 304. Shewry P.R., Napier J.A. et Tatham A.S., 1995.** Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell.* Vol.7: pp. 945-956. American Society of plant Physiologists.
- 305. Shih C., Gepts P.L. et Whi taker J.R., 2002.** Proteins structures of common bean *Phaseolus vulgaris*. *J. Agrc. Food Chem.* Vol. **50**, pp.6618-6627.
- 306. Shudong He., John Shi ., Xisheng Li ., Ying Ma ., Sophia Jun Xue. 2015.** Identification of a lectin protein from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*) using LC-MS/MS and PCR method, LWT –*Food Science and Technology* 60 1074 – 1079.

- 307. Shukla R., Anand K., Prabhu K.M. et Murthy P.S., 1995.** Hypocholesterolemic effect of water extract of the bark of banyan tree, *Ficus bengalensis*.
- 308. Singh B.D., 2001.** Plant Breeding : Principales and methods. Kalgani Publishers, New Delhi, India, 896p.
- 309. Singh S.R. et Van Emden H.F., 1979.** Insect pests of grain legumes. *Ann. Rev. Entomol.* Vol. **24**: pp.255-278.
- 310. Singh H.R. et Taylor T.A., 1978.** Pests of grain legumes: Ecology and control Edition Singh S.R., Van Emden H.F. and Taylor T.A. *Academic Press*, New York, 454p.
- 311. Sinha R.H. et Watters F.L., 1985.** Insectes des minoteries, des silos – éleveurs. 311p.
- 312. Smith, 1993.** Plant resistance to insects: a fundamental approach. New York: John Wiley & Sons, Ed.Wiley, 270p.
- 313. Sparvoli F. Bollini R., Coninelli E., 2015.** Nutritional value. In : De Ron AM (ed) Grain legumes. Handbook of plant Breeding, vol.10. Springer Science and Business Media, New York, pp. 291-325.
- 314. Soltner D., 1990.** Les bases de la reproduction végétale. Sol, Climat, Plante. Ed. Lavoisier, 464p.
- 315. Soudararajan R.P., Chitra N., Geetha S. et Poorani J.2012.** Biological control of Bruchid *Callosobruchus maculatus* (F.) in blackgram. *J. Biopest*, 5 : 192-195. Managment of pulse beetle.
- 316. Southgate B.J., 1983.** Observations on the larval emergence in species of the genus *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Entom. Gen.*, Vol. **8**, pp.3-4.
- 317. Southgate B.J., 1978.** The importance of the bruchidae as pests of grain legumes, their distribution and control. In *Pests of Grain Legumes: Ecology and Control*. *Academic Press*, London.pp. 219-229.
- 318. Sparvoli F., Lanave C., Santucci A., Bolini R. and Lioi L., 2001.** Lectin and lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: *biochemical and evolutionary studies*. *Plant Mol.biol.* N°5, Vol. **45**, pp.587-597.
- 319. Sparvoli F., Gallo A., Marinelli D., Santucci A. et Bollini R., 1998.** Novel lectin-related proteins are major components in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds. *Biochem. Biophys. Acta*, 1382-323.
- 320. Stamopoulos D. et Huignard J., 1980.** Influence des diverses parties de la graine de haricot (*Phaseolus vulgaris*) sur le développement des larves d'*Acanthoscelide obtectus* Say (Coleoptera : Bruchidae). Envoyé pour publication dans *C.R. Acad. Sc. Paris*. Pp.231-246.

321. Sundaram J ., Shanmugavel S ., Velayutham V., Dixit R ., Subbaratnam M . 2012. A new variant of antimetabolic protein, arcelin from an Indian bean, *Lablab purpureus* (Linn.) and its effect on the stored product pest, *callosobruchus maculatus*, Food Chemistry, 135, 2839-2844.

322. Surech S., Fields P.G. et Hou X., 2006. Effet insectifuge, antiappétant et toxique des graines de cinq espèces de légumineuses sur trois espèces d'insectes ravageurs des produits entreposés. *Agriculture et Agroalimentaire Canada, centre de recherche sur les céréales.*
www.pfields@arg.gc.ca

T

323. Talukder F., Malik M., Khanam L.A. M. et Dey K.C., 1998. Toxicity of some indigenous plant seed against *Tribolium confusum* (Coleoptera- Tenebrionidae). 113p.

324. Thomma B.P.H.J., Cammue B.P.A. et Thevissen K., 2002. Plant defensins.
Planta. Vol. 216, pp.193-202.

325. Tuda M., Ronn J., Buranapanichpan S. Wasano N. et Arnqvist G., 2006. Diversification évolutive du genre *Callosobruchus* (Coleoptera : Bruchidae) du dendroctone du haricot : traits au statut de ravageur stocké. *Ecologie moléculaire*, vol 15 N12.

326. Tufail N., Salem A. et Shakoori A.R., 1994. Biochemical changes in six (th) Instar larvae of PAK and FSS II strains of red flower beetle *Tribolium castanium* (herbst) (Coleoptera- Tenebrionidae) following administration of sublethal doses of a synthetic pyrethrinoid bifenthrin. *J. Zoo., Pakistan*, Vol. 26, N° 3. PP. 197-206.

U

327. Umeozor O.C., 2005. Effet de l'infection de *Callosobruchus maculatus* (Fab) sur la perte du poids du niébé stocké (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Revue de sciences appliquées et de gestion de l'environnement*. Vol. 9, N°1, 1119- 1123.

328. Utida S., 1954. Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus*. *Jap. J. App. Zool.* Vol. 18, pp.161-168.

V

329. Van Loon L., Greenhaff P. et Constantin- Teodosiu D., 2001. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J. Physiol.* 536 : 295-304.

330. Velten J., Pogson B.J. et Cazzonelli C.I., 2008. Luciferase as a reporter of Gene Activity in Plant. *Transgenic Plant Journal Global Science Books* 2 (2), 1-13.

W

- 331. Wato S., Kamei K., Arakwa T., Philo J.S., Wen J., Hara S. et Yamaguchi H., 2000.** A chimera α -amylase inhibitor suggesting the evolution of *Phaseolus vulgaris*. α amylase inhibitor. *J. Biochem.* (Tokyo). Vol.128, pp.139-144.
- 332. While N.D.G. et Jayas D.S., 1991.** Effect of periodically elevated carbon dioxide on stored wheat ecosystems at cool temperatures (*Ashverus advena*, *Tarsonemus granaries*, *Parathryphydeus coleanis*, *Lepidoglyphus destructor*, *Aeroglyphus volustus*). In Fleurat Lessard F. & Ducom P. Ed. Procs. Th. Int. Workin, Conf. Stored Product Protect. Bordeaux, France, 9-14 September, Vol.2, pp. 925-933.
- 333. Wilkin D.R. et Chambers J., 1987.** Methods of detecting insects in grain. Ann. Conf. Int. Ravageurs, ANPP. Paris, pp.489-496.
- 334. Wirsta P., Le Cornu C. et Lance C., 1996.** Evaluation d'une nouvelle méthode immuno-enzymatique destinée à estimer la contamination de lots de Blé et de farine par les insectes. Rev. Industrie des céréales. Assoc. Prog. Indus. Cereal. N°96. pp. 29-32.
- 335. Wolfson J.L., 1982.** Developmental responses of *Pieris rapae* and *Spodoptera eridania* to environmentally induced variation in *Brassica nigra*. Environ. Entomol. Vol.11, pp. 207-213.
- 336. Woodhead S. et Chapman R.F., 1986.** Insect behaviour and the chemistry of plant surface waxes. In *Insect and the plant surface*, (Eds. B.Juniper and T.R.E. Southwood) London: Edward Arnold, pp. 123-135.
- 337. Wooley J.G., 2001.** Plant alkaloids. In *Encyclopedia of life sciences* Nature Publishing Group, pp.1-11. (www.els.net):

X

- 338. Xavier- filho J., 1993.** Sementes e suas defesas contra insectos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e alimentos, Organizacao dos Estados Americanos, Imprensa universitaria: Fortaleza, Brazil. Pp. 1-31.

Y

- 339. Yamagata H., Kunimatsu K., Kamasaka H., Kuramoto T. and Iwasaki T., 1998.** Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization and changes in developing and germinating seeds. Biosc. Biotechnol. Biochem. Vol. 62, pp. 978-985.

- 340. Yamamoto K., Konami Y. et Osawa T. et Irimura T., 1992.** Carbohydrate-binding peptides from several anti-H (O) lectins. *J. Biochem.* Vol. **111**: 436-439.
- 341. Yamamoto K., 1994.** Structure and fonction of lectins and lectin- carboxydrate interactions. *In Glycowordproteins.* Vol. **66**, pp. 1111-1129.
- 342. Yamamoto K., Konami Y. et Osawa T., 2000a.** Chimeric lectin of *Brauhinia purpurea* lectin and *Lens culinaris* lectin recongnizes unique carbohydrate structure. *J. Biochem.* Vol.**127**, pp. 129-135.
- 343. Yamamoto K., Maruyama I.N. et Osawa T., 2000b.** Cyborg lectins: Novel leguminous lectins havingunique specificities. *J. Biochem.* Vol. **127**, pp.137-142.
- 344. Young N.M., Thibault P., Watson D.C. et Chrispeels M.J., 1999.** Post-translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. *FEBS Lett* Vol. 446, pp. 203-206.
- 345. Yubero-Serrano E.M., Moyano E., Medina-Escobar N., Munoz-Blanco J. et Caballero J.L., 2003.** Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J. Exp. Bot.*Vol. **54**, pp. 1865-1877.
- 346. Yunes A.N.A., Andrade M.T., Sales M.P., Morais R.A., Fernandes K.V.S., Gomes V.M. et Xavier-Filho J., 1998.** Legme seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* F.). *J. Sci. Food Agric.* Vol. **76**, pp. 111-116.

Z

- 347. Zambre M., Goossens A., Cardona C., Van Montagu M., Terryn N. et Angenon G., 2005.** A reproducible genetic transformation system for cultivated *Phaseolus acutifolius* (Tepary bean) and its use to assess the role of arcelins in résistance to the Mexican bean weevil.
- 348. Zangerl A.R. et Bazzaz F.A., 1992.** Theory and pattern in plant defense allocation. IN : Fritz R.S., Simmus E.L. eds. *Plant Resistance to herbivores and Pathogens* University of chicago Press, chicago 363-391.
- 349. Zaugg R.H., Walder J.A. et Klotz I.M., 1977.** Schiff base adducts of hemoglobin. Modifications that inhibit erythrocyt sickling. *J. Biol. Chem.* 252, 8542-8548.
- 350. Zorica T., Nikolic ., Mirjan A ., Vasic ., Mirjana B., Milosevic ., Milka Lj ., Vujakovic, Jelica M., Gvozdanovic -Varga .** Caractization of common bean *Phasilus vulgaris* L. varieties from Serbia, Page 27-28.

RESUME

Activité entomotoxique des extraits de quelques variétés de *Phaseolus vulgaris* contre *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae). Identification des substances à l'origine de la toxicité.

La présente étude contribue à une lutte biologique par l'utilisation d'arcéline, protéine de défense des graines de haricot contre la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* (F.). Les essais biologiques sont réalisés dans des conditions de laboratoire ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $70\% \text{ HR} \pm 5\%$). L'effet entomotoxique des arcélines sur la biologie de *Callosobruchus maculatus* (F.), est mené sur des graines entières puis sur des graines reconstituées à base de farine de pois chiche aux doses respectives 20%, 40%, 60% et 80% sur plusieurs paramètres biologiques. Une purification et caractérisation de la molécule entomotoxique arcéline est réalisée par électrophorèse SDS-PAGE et western blot. Par la suite, on a étudié par des essais biologiques, l'effet entomotoxique de l'extrait d'arcéline semi purifiée de la variété du haricot la moins sensible à l'attaque de cet insecte aux doses respectives 0.05 %, 0.10%, 0.15% et 0.20%.

Sur graines entières, les résultats de toxicité ont montrés une grande efficacité de *Phaseolus caracalla* suivie par la S102 et affichent un pourcentage de mortalité supérieur à 50% après seulement 03 jours d'exposition alors que les graines de pois chiche reconstituées révèlent une variabilité entomotoxique des paramètres biologiques de l'espèce *Callosobruchus maculatus*. En effet, la fécondité diminue significativement avec les doses D3, D4 et D5. Pour l'étude de la fertilité, les doses les plus efficaces sont la D3 et D4. Les DL50 montrent que *Phaseolus caracalla* est la plus toxique suivie par la S102. Parallèlement, l'indice de sensibilité montre que *Phaseolus caracalla* et S102 sont les plus résistantes et sont dotées de substances de défense naturelle qui leur permettent de développer une certaine résistance face aux attaques de *Callosobruchus maculatus*. Concernant la durée moyenne de développement de *C. maculatus*, les doses D1, D2 et D3 paraissent les plus importantes du fait qu'elles la prolongent significativement.

Par ailleurs, le dosage des protéines, montre que l'ensemble des variétés présentent des teneurs relativement importantes en protéines totales. Les profils électrophorétiques SDS-PAGE des protéines mettent en évidence, la présence de la substance toxique arcéline chez les variétés testées d'un poids moléculaire variant de 31 kDa à 45 kDa. La variété *P. caracalla* s'est avérée plus toxique que les autres variétés testées et renferme deux variantes d'arcéline 4 et 5 suivie par la variété noir de haricot S102 qui renferme uniquement arcéline5. Le résultat relatif à la capture immunologique d'arcéline par western blot confirme nos interprétations et montrent que les six variétés testées appartiennent au même genre et contiennent la même information génétique, seulement, le type d'arcéline exprimé dans chaque variété est différent. Par ailleurs, les différentes variantes d'arcéline présentent une certaine homologie car elles sont toutes reconnues par le même anticorps et par conséquent, appartiennent au même locus APA d'un point de vue cytogénétique.

Les essais biologiques sur graines artificielles à base d'extrait d'arcéline semi purifiée montrent que la fécondité moyenne par femelle de *Callosobruchus maculatus* obtenue aux quatre doses testées à 0,05%, 0,10%, 0,15% et 0,20% diminue au fur et à mesure que la dose augmente. L'extrait d'arcéline semi purifiée a agi sur la longévité des mâles et des femelles de *C. maculatus* car l'ensemble des doses s'avère toxiques sur cette espèce où nous avons enregistré un pourcentage de mortalité supérieur à 50 % pour les D2, D3 et D4, après trois jours d'exposition des adultes. Ce pourcentage est obtenu à la D2 avec *P. caracalla* et atteint 70% avec une incorporation de la plus forte dose d'extrait d'arcéline semi purifiée.

Suite aux résultats obtenus, la présence de toxicité différentielle dans l'extrait des graines de la variété sauvage *P. caracalla* et de la variété S102 est incontournable car les méthodes de purification de cette glycoprotéine confirment son existence au fur et à mesure qu'on avance dans les méthodes de purification.

Dans le contexte de cette étude, il serait important d'élucider et d'étudier la génétique de la résistance par le biais de la biologie moléculaire et d'élucider le mécanisme d'action de l'arcéline extraites de graine de haricot. Cela contribuera à la mise au point de la formulation d'un biopesticide à base de cette protéine qui contribuera dans la mise en place d'une lutte non polluante contre les insectes des denrées stockées.

Mots clés : Coléoptères – bruche – *Callosobruchus maculatus* F. - variétés de haricot – lectines – arcéline-Substances entomotoxiques- purification – caractérisation-Stockage

Entomotoxic activity of extracts of some varieties of *Phaseolus vulgaris* against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae). Identification of the substances causing the toxicity.

This study contributes to biological control through the use of arcelin, the defense protein of bean seeds against the chickpea shrub *Callosobruchus maculatus* (F.). The bioassays are performed under laboratory conditions ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ and $70\% \text{RH} \pm 5\%$). The entomotoxic effect of arcelines on the biology of *Callosobruchus maculatus* (F.) is carried out on whole seeds and then on reconstituted seeds made from chickpea flour at the respective doses of 20%, 40%, 60% and 80% on several biological parameters. A purification and characterization of the entomotoxic molecule arcelin is carried out by SDS-PAGE electrophoresis and western blot. Subsequently, the entomotoxic effect of a semi-purified arcelin extract of the bean is likely to be affected by this insect at the respective doses of 0.05%, 0.10%, 0.15% by bioassays. % and 0.20%.

On whole seeds, the toxicity results showed a high efficacy of *Phaseolus caracalla* followed by S102 and show a mortality percentage greater than 50% after only 03 days of exposure while reconstituted chickpea seeds reveal an entomotoxic variability of biological parameters of the species *Callosobruchus maculatus*. Indeed, fertility decreases significantly with doses D3, D4 and D5. For the study of fertility, the most effective doses are D3 and D4. LD50 shows that *Phaseolus caracalla* is the most toxic followed by S102. At the same time, the sensitivity index shows that *Phaseolus caracalla* and S102 are the most resistant and are endowed with natural defense substances that allow them to develop a certain resistance against *Callosobruchus maculatus* attacks. Regarding the average duration of development of *C. maculatus*, doses D1, D2 and D3 appear the most important because they prolong it significantly.

Moreover, the protein assay shows that all varieties have relatively high levels of total protein. The SDS-PAGE electrophoretic profiles of the proteins highlight the presence of the toxic substance arcelin in the varieties tested with a molecular weight ranging from 31 kDa to 45 kDa. The variety *P. caracalla* was more toxic than the other varieties tested and contains two variants of arcelin 4 and 5 followed by the black bean variety S102 which contains only arcelin5. The result concerning the immunological capture of arcelin by western blot confirms our interpretations and shows that the six varieties tested belong to the same genus and contain the same genetic information, only, the type of arcelin expressed in each variety is different. Moreover, the different variants of arcelin have a certain homology because they are all recognized by the same antibody and therefore belong to the same APA locus from a cytogenetic point of view.

The bioassay on artificial seeds based on semi-purified arcelin extract shows that the mean fecundity per female of *Callosobruchus maculatus* obtained at the four doses tested at 0.05%, 0.10%, 0.15% and 0.20%. % decreases as the dose increases. The semi-purified arcelin extract has acted on the longevity of males and females of *C. maculatus* because the whole of the doses proves toxic on this species where we recorded a percentage of mortality higher than 50% for the D2, D3 and D4, after three days of adult exposure. This percentage is obtained at D2 with *P. caracalla* and reaches 70% with incorporation of the highest dose of semi-purified arcelin extract.

Following the results obtained, the presence of differential toxicity in the seed extract of the wild variety *P. caracalla* and the variety S102 is essential because the methods of purification of this glycoprotein confirm its existence as we advance. in purification methods. In the context of this study, it would be important to elucidate and study the genetics of resistance through molecular biology and to elucidate the mechanism of action of arcelin extracted from bean seed. This will contribute to the development of the formulation of a biopesticide based on this protein which will contribute to the establishment of a non-polluting fight against the insects of stored products.

Keywords :

beetles- bruche -*Callosobruchus maculatus* F. - bean varieties -lectins -arceline- Entomotoxic substances- purification - characterization-Storage

النشاط الحركي لمستخلصات بعض أصناف *Phaseolus vulgaris* ضد *Callosobruchus maculatus* (F.) (معدنات الأجنحة). تحديد المواد المسببة للسمية.

وتسهم هذه الدراسة في السيطرة البيولوجية من خلال استخدام *arcelin* ، البروتين الدفاعي من بذور الفول ضد شجيرة الحمص **(F) Callosobruchus maculatus**. يتم إجراء **bioassays** تحت ظروف المختبر (28 درجة مئوية \pm 2 درجة مئوية و RH % 70 \pm 5). يتم تنفيذ التأثير الحماسي للأترلين على بيولوجيا الكالوسوبروسس **maculatus (F.)** على بذور كاملة ثم على البذور المعاد تصنيعها من دقيق الحمص عند الجرعات ذات الصلة من 20 % ، 40 % ، 60 % و 80 % على عدة معلمات بيولوجية.

يتم تنقية وتوصيف *arcelin* جزيء **entomotin** من قبل الكهربائي **SDS-PADE** وصمة الغربية. بعد ذلك ، درسنا من خلال الاختبارات البيولوجية ، التأثير الحماسي لمستخلص الأريزولين شبه المستخلص من تنوع الفاصوليا الأقل عرضة لمهاجمة هذه الحشرة عند الجرعات ذات الصلة 0.05% و 0.10% و 0.15% و 0.20%.

البذور كلها ، وأظهرت النتائج سمية عالية الكفاءة من *Phaseolus caracalla* تليها **S102** ولها نسبة عالية من الوفيات إلى 50% بعد أيام فقط 03 من التعرض بينما بذور الحمص أعيد تكشف عن التباين **entomotoxic** المعلمات البيولوجية لأنواع **Callosobruchus maculatus**. وبالفعل ، تقل الخصوبة بشكل كبير مع الجرعات **D3** و **D4** و **D5**. لدراسة الخصوبة ، فإن الجرعات الأكثر فعالية هي **D3** و **D4**. ويظهر الجرعة المميتة 50 أن *Phaseolus caracalla* هو الأكثر سمية يليه **S102**. وفي الوقت نفسه ، يظهر مؤشر الحساسية التي فاصيلوس كركلا و**S102sont** الأكثر مقاومة وميزة المواد الدفاعية الطبيعية التي تسمح لهم لتطوير بعض المقاومة لهجمات **Callosobruchus** المبقة. وفيما يتعلق متوسط الوقت اللازم لتطوير من **C**. المبقة ، جرعات **D1** ، **D2** و **D3** تظهر أهم لأنها تمتد إلى حد كبير. وعلاوة على ذلك ، يظهر فحص البروتين أن جميع الأصناف لديها مستويات عالية نسبيا من البروتين الكلي. الملف الشخصي الكهربائي **SDS-PAGE** للبروتينات تكشف عن وجود مادة سامة في أنواع ارسلان اختبار مع الوزن الجزيئي تتراوح بين 31 كيلو دالتون إلى 45 كيلو دالتون.

مجموعة متنوعة *P. caracalla* أثبتت أكثر سمية من أصناف أخرى اختبارها ويحتوي على نوعين مختلفين من ارسلان 4 و 5 يليها فول متنوعة السوداء **S102** الذي يحتوي على **arceline5** فقط. إن النتيجة المتعلقة بالتقاط مناعي من *arcelin* بواسطة اللطخة الغربية تؤكد تفسيراتنا وتبين أن الأصناف الستة المختبرة تنتمي إلى نفس الجنس وتحتوي على نفس المعلومات الوراثية ، فقط ، نوع من *arcelin* أعرب في كل مجموعة مختلفة. وعلاوة على ذلك ، أنواع مختلفة من ارسلان تظهر بعض التماثل وكلها معترف بها من قبل الأجسام المضادة نفسها ، وبالتالي تنتمي إلى نفس مكان **APA** نقطة الوراثة الخلوية نظر. يوضح التحليل الحيوي للبذور الاصطناعية المستندة إلى خلاصة *arcelin* شبه النقية أن الخصوبة المتوسطة لكل أنثى من **Callosobruchus maculatus** التي تم الحصول عليها عند الجرعات الأربعة تم اختبارها عند 0.05% ، 0.10% ، 0.15% و 0.20%. ينقص كلما زادت الجرعة. لقد عمل مستخلص الأريزولين شبه المعطر على إطالة عمر الذكور والإناث لدى **C. maculatus** لأن الجرعات الكلية تثبت أنها سامة على هذا النوع حيث سجلنا نسبة من الوفيات أعلى من 50% للـ **D2** و **D3** و **D4** ، بعد ثلاثة أيام من تعرض البالغين. يتم الحصول على هذه النسبة في **D2** مع *P. caracalla* وتصل إلى 70% مع دمج أعلى جرعة من مستخلص *arcelin* شبه النقي. بعد النتائج التي تم الحصول عليها ، فإن وجود سمية تفاضلية في مستخلص بذور الصنف البري *P. caracalla* والتنوع **S102** أمر ضروري لأن طرق تنقية هذا البروتين السرطاني تؤكد وجوده كلما تقدمنا. في طرق التنقية.

في سياق هذه الدراسة ، سيكون من المهم توضيح ودراسة علم الوراثة للمقاومة من خلال البيولوجيا الجزيئية وإيضاح آلية عمل الأريزولين المستخرج من بذرة البسلة. سيساهم ذلك في تطوير صياغة مبيد بيولوجي يعتمد على هذا البروتين الذي سيساهم في إنشاء مكافحة غير ملوثة ضد حشرات المنتجات المخزونة.

كلمات البحث:

الخنابس- بروش - *Callosobruchus maculatus* F. - أصناف الفول - lectins - *arceline*- المواد الدوائية تنقية - توصيف التخزين