



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tbessi - Tébessa

Faculté des Sciences Exactes, de la Nature et de la vie

Département de biologie appliquée

## MEMOIRE

Présente en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

En : Sciences Biologique

Spécialité : Biologie Moléculaire et cellulaire

Thème :

**Effet de l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* sur les biomarqueurs à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata***

Présenté par

**Ameur fares**

**Lassoued Fouad**

Devant le jury :

<b>Dr. Bouabida Hayette</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup>. Seghier Hanene</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Driss Djemaa</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Rapporteuse</b>

Date de soutenance : 11/06/2019



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

Et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tbessi - Tébessa

Faculté des Sciences Exactes, de la Nature et de la vie

Département de biologie appliquée



## **MEMOIRE**

Présente en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

En : Sciences Biologique

Spécialité : Biologie Moléculaire et cellulaire

Thème :

**Effet de l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* sur les biomarqueurs à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata***

Présenté par

**Ameur fares**

**Lassoued Fouad**

Devant le jury :

<b>Dr. Bouabida Hayette</b>	<b>M.C.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup>. Seghier Hanene</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Driss Djemaa</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de Tébessa</b>	<b>Rapporteuse</b>

Date de soutenance : 11/06/2019

# **Remerciements**

*Avant tout, je remercie le bon Dieu qui m'a éclairé le chemin et m'a donné la patience et le courage pour réaliser ce travail.*

*Mes profonds remerciements vont à mon encadrant **Dr. DRIS DJEMAA**. Qui a accepté d'encadrer mes travaux pour ses encouragements, ses conseil et sa Disponibilité. Nous avons été satisfaites de votre qualité exceptionnelle de bonne Enseignante, merci de nous avoir guidés avec patience et d'avoir consacré autant Heuré pour les corrections de ca manuscrit ; nous ne pouvons, madame, que Sincèrement vous exprimé notre respect et notre gratitude*

*Nous tenons à remercier à la présidente de jury de notre mémoire **Dr. BOUAABIDA HAYETTE**.*

*Toute ma considération à l'égard de **Dr. SEGHEIR HANENE**. Qui m'a fait l'honneur de juger le présent travail.*

*Je remercie ma famille et surtout mes parents pour leur soutien moral, leurs encouragement set leur patience durant les étapes difficiles de ce travail.*

*Merci à toutes les personnes qui ont accepté de m'aider*

# ***DEDICACE***

*Que le bon dieu me donne la puissance de vous rendre au moins une partie de ce que vous m'avez donné.*

*A mon cher père : qui m'a toujours soutenu, qui a sacrifié sa vie pour notre bien, qui s'est privé de tous pour répondre à nos besoins.*

*A ma chère mère : Celle qui m'a donné la vie, à la lumière de mon âme, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, merci pour votre présence dans les moments qui m'étaient les plus difficiles, je vous aime plus que moi-même maman.*

*A mes chers frères et sœurs aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que Vous méritez, je vous souhaite un avenir plein de santé, de bonheur de réussite et de sérénité.*

*A mes amies, mes très chères amies **Mohammed nadj, Amel, Khawla, Rawnek et Safa rayen** je ne trouve pas des mots suffisants pour vous remercier pour votre solidarité*

*A responsable de laboratoire **Souad, Fouaz, Nardjes, Karima***

*Tous mes collègues de promotion 2013 et 2014 et spécialement 2<sup>e</sup> année master  
LMD : biologie moléculaire et cellulaire 2018-2019*

Tables des matières	
Remerciement	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
ملخص	
Abstract	
Résumé	
1. Introduction	1
2. Matériel et méthode	3
2.1. Présentation du matériel biologique	3
2.1.1. Présentation de l'insecte	3
2.1.2. Position systématique	4
2.1.3. Cycle de développement	4
2.2. Elevage au laboratoire	6
2.3. Présentation de la plante : <i>Ruta graveolens</i>	8
2.3.1. Description botanique	8
2.3.2. position systématique de la plante : <i>Ruta graveolens</i>	9
2.3.3. constituants chimique et propriétés médicales de <i>Ruta graveolens</i>	10
2.4. Préparation de l'extrait végétal	10
2.5. Dosage des biomarqueurs	11
2.5.1. Dosage de glutathion S-transférase	11
2.5.2. Dosage du glutathion	12
2.6. Analyse statistique	14
3. Résultats	15
3.1. Effet sur le taux du glutathion	15
3.2. Effet sur l'activité spécifique du glutathion S-transférases	19
4. Discussion	24
4.1. Effet de l'HE sur le taux de glutathion	24
4.2. Effet de l'HE sur l'activité spécifique de la GST	25
5. Conclusion et perspective	27
6. Références bibliographiques	28

Tableau N°	Titre	Page
Tableau 1	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du premier stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	15
Tableau 2	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du deuxième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	16
Tableau 3	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du troisième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	17
Tableau 4	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	18
Tableau 5	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du premier stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	19
Tableau 6	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du deuxième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	20
Tableau 7	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du deuxième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	21
Tableau 8	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du deuxième stade de <i>Cs longiareolata</i> ( $m \pm \text{SD}$ , $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	22

Figure N°	Titre	Page
Figure 1	cycle de développement de <i>Culiseta Longiareolata</i>	6
Figure 2	Les sites d'élevage des moustiques	7
Figure 3	Technique d'élevage	7
Figure 4	Photo de feuille et fleur de <i>Ruta graveolens</i>	9
Figure 5	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 1 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD ; n=3). (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	16
Figure 6	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 2 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD ; n=3). (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	17
Figure 7	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 3 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD ; n=3). (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	18
Figure 8	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD ; n=3). (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	19
Figure 9	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 1 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=3). (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	20
Figure 10	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 2 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=3). (ns Différence non significative (p≥0,05), (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	21
Figure 11	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 3 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=3). (** Différence hautement significative (p<0,01), (***) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).	22
Figure 12	Effet de l'extrait de <i>R. graveolens</i> (CL <sub>25</sub> et CL <sub>50</sub> ) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 4 de <i>C.</i>	23

---

---

	<i>longiareolata</i> ( $m \pm SD$ , $n=3$ ). (***) Différence très hautement significative ( $p<0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).	
--	---	--



*Résumés*

## ملخص

في إطار البحث عن الطرق الفعالة للمكافحة البيولوجية ضد البعوض, تم اختبار مستخلص الميثانول لنبات الفجل على يرقات *Culiseta longiareolata*

تم تقييم تأثير مبيد اليرقات للنبات على المراحل ال 4 اليرقية L1 ، L2 ، L3 و L4 من *Culiseta longiareolata* بتركيزات مميتة

تكشف نتائج المؤشرات الحيوية عن تحريض لنظام إزالة السموم من مستخلص الميثانول لنبات الفجل عن طريق زيادة في GST وانخفاض في GSH.

كجزء من مكافحة البعوض ، يمكن استخدام مستخلص هذا النبات كمبيد بيولوجي طبيعي.

**الكلمات المفتاحية:** *Culiseta longiareolata* ، الفجل ، مستخلص الميثانول ، المؤشرات الحيوية.

## **Abstract**

As part of the search for new alternatives for a clean and effective fight against mosquitoes, the methanolic extract of *Ruta graveolens* was tested on larvae of *Culiseta longiareolata*.

The larvicidal effect of plant: *Ruta graveolens*, was evaluated on the 4 larval stages: L1, L2, L3 and L4 of *Culesita longiareoleta* with lethal concentrations LC25, LC50.

The biomarker results reveal an induction of the detoxification system of the methanolic extract of *Ruta graveolens* via an increase in GST and a decrease in GSH.

As part of mosquito control, the extract of this plant can be used as a natural biocide.

**Key words:** *Culesita longiareoleta*, *Ruta graveolens* , methanolic extract, biomarkers.

## Résumé

Dans le cadre de la recherche de nouvelles alternatives pour une lutte propre et efficace contre les moustiques, l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* a été testé sur les larves de *Culiseta longiareolata*.

L'effet larvicide de plante : *Ruta graveolens*, a été évalué sur les 4 stades larvaires : L1, L2, L3 et L4 de *Culesita longiareoleta* avec des concentrations létales CL25, CL50.

Les résultats des biomarqueurs révèlent une induction du système de détoxification de l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* via une augmentation de la GST et une diminution de la GSH.

Dans le cadre de lutte anti-moustique, l'extrait de cette plante peut être utilisé comme biocide naturel.

**Les mots clés :** *Culesita longiareoleta*, *Ruta graveolens*,. extrait méthanolique, biomarqueurs.

# *Introduction*

## 1. Introduction

L'ensemble des moustiques constitue la famille des *Culicidae*. Elle est homogène et comprend 2800 à 3000 espèces réparties dans le monde entier (Knight et Stone, 1977) à l'exception des continents antarctiques et de quelques îles (Mouchet et Carnevale, 1991). Plusieurs espèces de moustiques (Diptera ; *Culicidae*), appartenant notamment aux genres *Aedes Meigen*, *Culex Linnaeus* ou *Anopheles Meigen*, sont des vecteurs d'organismes pathogènes responsables de zoonoses d'incidence médico-vétérinaire considérable (Goddard, 2008). Les femelles, par le biais d'un repas de sang sur un hôte vertébré, sont capables de contracter et véhiculer trois types d'agents infectieux selon les espèces de moustiques: (1) des virus responsables de nombreuses arboviroses (dengue, chikungunya, fièvre du Nil occidental, fièvre de la vallée du Rift, ou encore fièvre jaune), (2) des protozoaires du genre *Plasmodium Marchiafava* et Celli responsables du paludisme, et (3) des nématodes responsables de filarioses (en particulier la filariose lymphatique et la dirofilariose) (Goddard, 2008 ; Mullen et Durden, 2009). Actuellement, une modification de la distribution géographique de ces vecteurs majoritairement causée par des facteurs anthropiques est accompagnée de (ré) émergences de maladies infectieuses notamment en Europe et en Amérique du Nord (Reiter, 2001; Jones et *al.*, 2008; Gould et Higgs, 2009 ; Randolph et Rogers, 2010 ; Medlock et *al.*, 2012 ; Bonizzoni et *al.*, 2013).

Dans les campagnes de lutte anti-moustique, les matières actives des insecticides utilisés appartiennent aux organophosphorés, pyréthrinoïdes et carbamates de synthèse. Ces préparations, bien qu'elles se soient révélées très efficaces sur les moustiques culicidés, présentent plusieurs inconvénients. En effet, en plus de leur coût élevé, elles peuvent être à l'origine de divers problèmes environnementaux, l'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes traités, aquatiques et terrestres est un problème de pollution (Barbouche *et al.*, 2001). Par ailleurs, les substances actives des produits utilisés présentent un large spectre d'action et n'épargnent pas les organismes non cibles. À tous ces inconvénients s'ajoute aussi un grand problème de développement de résistance aux insecticides chimiques, chez les insectes traités (Georghiou et *al.*, 1975 ; Sinigre et *al.*, 1977).

Pour la lutte biologique, l'utilisation des substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement. L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (Crosby et *al.*, 1966).

---

Dans certaines régions d'Afrique noire, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales. En effet, les odeurs du basilic : *Ocimum basilicum*, Basil (Labiée) et de Sarghina : *Corrigiola telephiifolia* (Caryophyllacée) sont des répulsifs très efficaces. D'après Jacobson (1989), plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées. Récemment, la litière de l'aulne, plante riche en polyphénols s'est révélée être douée de propriétés toxiques importantes vis-à-vis des larves des moustiques *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* et *A. albotropus* (David *et al.*, 2000). Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les larves d'insectes. Nous citons à cet effet, les travaux de Jang *et al.*, (2002 a) sur *A. aegypti* et *C. pipiens* en testant l'activité larvicide de certaines légumineuses et les travaux d'Alaoui Slimani (2002) dans lesquels la toxicité de *Mentha pulegium* (Labiée) a été confirmée sur des larves de culicidés. L'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de Jang *et al.*, (2002 b). Par ailleurs, la protection des cultures contre les ravageurs par des extraits végétaux a été étudiée aussi bien sur des larves de lépidoptères (Lee *et al.*, 2002) que sur des larves d'acridiens (Barbouche *et al.*, 2001). Une étude réalisée par Ferchichi et Habhoub l'année précédente confirme l'activité larvicide et pupicide de l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata* la plus abondante dans la région de Tébessa.

Dans ce contexte, notre travail s'intéresse de compléter cette étude par l'évaluation de l'effet de cet extrait sur les biomarqueurs de détoxification, la glutathion S-transférase (GST) et son cofacteur, la glutathion réduit (GSH) chez les différents stades larvaires de *Culiseta longiareolata*.

*Matériels*

*et*

*Méthodes*



---

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Présentation du matériel biologique

#### 2.1.1 Présentation de l'insecte

*Culiseta longiareolata* est un insecte nuisible à métamorphose complète, plus abondant dans les régions chaudes. Il fait partie des Diptères, famille des Culicidés. Ce moustique a une taille qui varie de 3 à 5mm. Il possède un corps mince et des pattes longues et fines avec des ailes membraneuses, longues et étroites (Villeneuve et Desire, 1965). Les femelles sont sténogames et autogènes. Elles piquent de préférence les vertébrés surtout les oiseaux, très rarement l'humain, l'espèce est considérée comme un vecteur de Plasmodium d'oiseau. La larve est caractérisée par un peigne siphonal dont ses dents sont implantées irrégulièrement. Chez l'adulte, on remarque la présence au moins d'une tache d'écailles sombres sur l'aile, le thorax avec trois bandes blanches longitudinales et l'absence des soies longues et fortes au niveau du lobe basal du gonocoxite (Bruhnes et al, 1999).

*Cs longiareolata* peut présenter une diapause hivernale chez les imagos femelles (régions froides) et chez les larves (régions tempérées). Les adultes sont présents toute l'année avec un max de densité au printemps et un autre en automne (Bruhnes et al. 1999). Les œufs de *Culiseta* groupés en nacelle sont cylindro-coniques, porte environ 50 à 400 oeufs (Boulkenafet, 2006). *Cs longiareolata* est une espèce multivoltine, thermophile et principalement ornithophile. Il se reproduit généralement dans de petits plans d'eau, principalement d'origine humaine, et les adultes peuvent pénétrer dans les colonies et les maisons et parfois attaquer les humains (Maslov, 1967). L'espèce a été impliquée dans la transmission de virus, de plasmodies aviaires et de Francisella tularensis (Maslov, 1967 ; Pletzen et Linde, 1981) et était très sensible à l'infection par le virus du Nil occidental après microinjection dans l'hémocèle (Hurlbut, 1956). Dans la nature, il ne semble pas avoir de pertinence épidémiologique pour les maladies humaines ou zoonotiques.

### 2.1.2 Position systématique

La position systématique de *Cs longiareolata* comme suit (Aitken, 1954).

Règne :	Animalia
Sous-règne :	Metazoa
Embranchement :	Arthropoda
Sous-embranchement :	Hexapoda
Super-classe :	Protostomia
Classe :	Insecta
Sous-classe :	Pterygota
Infra-classe :	Neoptera
Super-order :	Endopterygota
Ordre :	Diptera
Sous- ordre :	Nematocera
Infra-ordre :	Culicomorpha
Famille :	Culicidae
Sous-famille :	Culicinae
Genre :	<i>Culiseta</i>
Espèce :	<i>Culiseta longiareolata</i>

### 2.1.3 Cycle de développement

Les moustiques sont des insectes holométaboles. Leur développement passe par une phase larvaire aquatique avant le stade adulte aérien entrecoupé d'une courte phase nymphale (Poupardin, 2011).

**a- Œufs :** les femelles pondent les œufs sur la surface des gîtes différents (bassins, puits abandonnés, trous des rocher, mers, étangs, canaux, citernes, eau de pluie...), dont l'état de l'eau est toujours stagnant et riche en matières organiques. Ces gîtes sont permanents ou temporaires, ombragés ou ensoleillés, remplis d'eau douce ou saumâtre, propre ou polluée (Paul, 2009). Les œufs sont fusiformes, ils ont une taille de 0.5 - 1mm. Au moment de la ponte

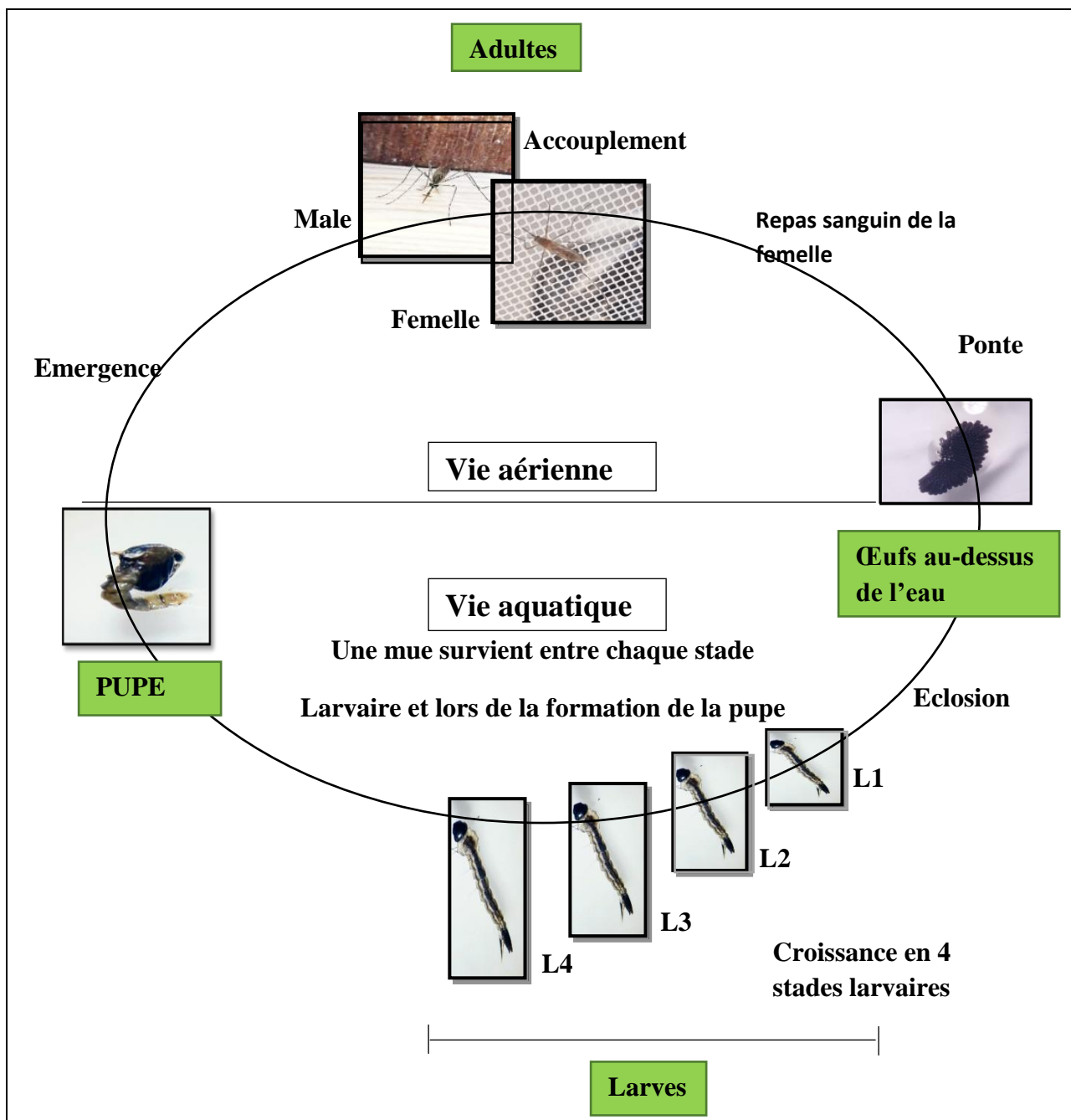
ils sont blanchâtres et prennent rapidement, par oxydation de certains composants chimiques de la thèque ; une couleur noire (Peterson, 1980).

**b- Larves :** le développement des larves à ce stade est exclusivement aquatique, leur déplacement est assuré par des mouvements frétilants caractéristiques, et leur évolution comporte quatre stades, de taille variant de 2 mm à 12 mm (Boulkenafet, 2006).

Les larves vivent environ 10 jours. La rapidité du développement des larves dépend de la quantité de nourriture contenue dans l'eau du gîte (Peterson, 1980).

**c- Nymphes :** la nymphe ou pupa est en forme de virgule, mobile, présente un céphalothorax fortement renflé avec deux trompettes respiratoires (Boulkenafat, 2006). La nymphe, également aquatique, éphémère (de 1 à 5 jours), ne se nourrit pas. Il s'agit d'un stade de transition, au métabolisme extrêmement actif, au cours duquel l'insecte subit de profondes transformations morphologiques et physiologiques préparant le stade adulte (Peterson, 1980).

**d- Adultes (ou l'imago) :** une déchirure ouvre la face dorsale de la nymphe et l'adulte se dégage lentement. L'adulte qui vient d'émerger est plutôt mou en général, avant de s'envoler, il reste à la surface jusqu'à ce que ses ailes et son corps sèchent et durcissent. L'adulte pourra enfin voler de ses propres ailes, et leur corps est rigide grâce à la membrane chitineuse mince, il est composé de trois parties la tête, le thorax et l'abdomen bien différencié (Boulkenafet, 2006).



**Figure 1** : cycle de développement de *Culiseta Longiareolata* (schéma personnel)

## 2.2. Elevage au laboratoire

Les œufs et les larves de moustiques sont récoltés dans des sites situés au niveau de la région d'El-Hammamet (Wilaya de Tébessa). Les larves sont élevées dans des récipients contenant 150 ml d'eau déchlorurée et nourries avec 0,04 g du mélange biscuit 75% - levure 25% (Rehimi & Soltani, 1999). L'eau est renouvelée chaque deux jour. Le régime alimentaire joue

un grand rôle dans la fécondité car les protéines permettent à la femelle de pondre plus d'œufs par rapport aux femelles nourries de sucre seulement (Wiggles, 1972)



(a)



(b)

**Figure 2** (a, b). Les sites d'élevage des moustiques



**Figure 3.** Technique d'élevage

## 2.3. Présentation de la plante : *Ruta graveolens*

### 2.3.1. Description botanique

*Ruta graveolens* est une plante de la famille Rutacée, qui comprend également tous les Citrus (Oranger, Citronnier...). Ces espèces partagent un caractère ligneux (même si la Rue ne se lignifie qu'après une phase de croissance à l'état herbacé), une morphologie florale similaire, et la présence d'un type bien particulier de poches à essences : les poches schizolysogènes, dont la formation résulte à la fois de la division et de la lyse de cellules parenchymateuses. Les Rutacées font partie du super-ordre des Sapindales que les analyses de phylogénie moléculaire (basées sur les gènes *rbcl*, *atpB* et 18S rADN) donnent pour plus proche parent des Malvales, comprenant entre autres le coton (*Gossypium arboreum*) (Bray, 2000).

*Ruta graveolens* L. est une bonne source de diverses classes de métabolites secondaires, y compris les coumarines, les flavonoïdes, furanocoumarines et alcaloïdes (Oliva et al., 2003). Mentionné dans les herbes anciennes, cette plante a une longue histoire alchimie et folklore (Wink 1998). Extraits de *R. graveolens* ont été utilisés dans le traitement d'infections, les inflammations et l'eczéma ainsi qu'un antidote au serpent et venins de scorpions (Wink 1998). Coumarins isolés gravesolens, comme la xanthotoxine, le bergaptène et le isopimpinéline, ont été utilisés dans le traitement de la peau maladies, des troubles de la pigmentation et de la maladie symptomatique traitement des maladies démyélinisantes (Ekiert et al., 2005). Les alcaloïdes comme la dictamine et la méthoxydictamine, trouvés dans les tissus de *R. graveolens*, ont une activité antimicrobienne et sont fongicides naturels très efficaces (Oliva et al., 2003).

*R. graveolens* L. est une plante méditerranéenne commune, ornementale, et utilisée depuis longtemps pour des usages thérapeutiques et culinaires (en tant qu'épice). La rue est l'une des plantes présentant le plus de vertus médicamenteuses et les brûlures qu'elle provoque aux personnes qui la récoltent (Pline, 1999). Différentes pharmacopées traditionnelles en font un usage abortif malgré l'importance des effets secondaires occasionnés (Conway et Slocumb, 1979).



**Figure 4.** Photo de feuille et fleur de *Ruta graveolens*

### 2.3.2. Position systématique de la plante « *Ruta graveolens* »

La position systématique de *Ruta graveolens* (Wiart, 2006 ; Bonnier, 1999 ; Takhtajan, 2009).

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Sous règne :</b>	Tracheobionta
<b>Super division :</b>	Spermatophyta
<b>Division :</b>	Magnoliophyta
<b>Sous division :</b>	Angiospermae
<b>Classe :</b>	Magnoliopsida
<b>Sous classe :</b>	Rosidae
<b>Super ordre :</b>	Rutanae
<b>Ordre :</b>	Sapindales
<b>Famille :</b>	Rutaceae
<b>Genre :</b>	<i>Ruta</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Ruta graveolens</i> L



### 2.3.3. Constituants chimiques et propriétés médicales de *R. graveolens*

Les études phytochimiques de la *R. graveolens* ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, de rutine, de quercétine, de furocoumarine et de citronnine comme principaux composants actifs. (Anonyme, 2004 ; Kirtikar et Basu ; 2003). Les principaux flavonoïdes analysés sont la rutine (quercétine-3- $\beta$ -rutinoside) et la quercétine. (Sailani, 2007).

Il constitue aussi des autres composants tels que l'impérorine, l'iso-impérorine, la xanthotoxine, le bergaptène et le psoralène. Les alcaloïdes graveoline, gravelinine, rutamine, rutamarine sont également présents dans l'herbe. (Nadkarni et al., 2005 ; Anonyme 2004 ; Kirtikar et Basu ; 2003).

Il a été rapporté que la rutine et la quercétine possèdent des propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-thrombotiques et anti-superoxyde. (LIN, HC et al ; 2007) De plus, plusieurs huiles essentielles ont été rapportées chez *Ruta graveolens* ayant des propriétés anti-inflammatoires et propriétés cytotoxiques. (Ratheesh, M et al ; 2001).

Les flavonoïdes présentent plusieurs effets biologiques, tels que des actions anti-inflammatoires, anti hépatotoxiques et antiulcéreuses. Ils inhibent également des enzymes telles que l'aldose réductase et la xanthine oxydase. (Robak, Gryglewski, 1988). (Ils sont de puissants antioxydants et ont une activité de piégeage des radicaux libres. Beaucoup ont des actions anti allergiques et antivirales et certaines d'entre elles offrent une protection contre la mortalité cardiovasculaire. (WU, T. et al., 2003). Il a été démontré qu'elles inhibent la croissance de diverses lignées de cellules cancéreuses in vitro et réduisent le développement de tumeurs chez les animaux de laboratoire. (Varamini, et al., 2009).

### 2.4. Préparation de l'extrait végétal

La matière végétale de *Ruta graveolens* est récoltée au moins février de région de Tébessa 2019, et séchée à l'air libre pendant (07-15 jours). A l'issue de cette étape, puis broyées manuellement jusqu'à obtenir une poudre fine.

L'extrait méthanolique est obtenu par solubilisation des fractions actives dans la solution aqueuse de méthanol (4 : 1), (400 de méthanol, et 100 d'eau distillée) et divisé cette solvant en deux. Dans la 1ère macération on ajoute 80 grammes de la poudre végétale est mis dans un Bêcher de 500 ml capacité avec suffisamment de la solution aqueuse de méthanol 250 ml, Le mélange est agité pendant 40 minutes par un agitateur magnétique ; puis filtrés par un papier



filtre standard. Et dans le 2<sup>ème</sup> macération on met la poudre avec 250 ml de solvant pendant 24 heures, après 2<sup>ème</sup> filtration on mélange les deux filtrats.

Pour éliminer le méthanol, le filtrat est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 1 à 1 :30 heure. Le produit obtenu, est conservé dans un récipient hermétiquement fermé ,et couvert par du papier aluminium à une température avoisinant à 4 C° est utilisé par la suite aux tests biologiques.( Kemassi et *al.*, 2015).

## 2.5. Dosage des biomarqueurs

Les concentrations létales CL25 et CL50 d'extrait méthanolique de *R. graveolens* pour les quatre stades larvaires de *Culiseta longiareolata* sont déterminées par une étude précédente comme suit :

Stade larvaire	CL <sub>25</sub> (mg /ml)	CL <sub>50</sub> (mg/ml)
L1	23,19	33,06
L2	29,01	37,08
L3	56,97	82,27
L4	109,6	150,6

### 2.5.1. Dosage de glutathion S-transférase

La mesure de l'activité de glutathion S-transférase (GST) est déterminée selon la méthode de Habig et *al.* (1974). Elle est basée sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2, 4 dinitrobenzène) en présence d'un cofacteur le glutathion (GSH) et mesurée à une longueur d'onde de 340 nm dans un spectrophotomètre.

Les larves de différents stades (L1, L2, L3 et L4) nouvellement exuviées de *Culiseta longiareolata* témoins et traitées par l'extrait méthanolique à deux concentrations, correspondant à la CL25 et la CL50, sont homogénéisés dans 1 ml de tampon phosphate (0,1 M ; pH 6). L'homogénat est centrifugé à 13000 trs/ mn pendant 30 mn et le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM)/GSH (5mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec des séries témoins. La lecture des absorbances est effectuée toutes les minutes

pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (mM/min/mg de protéines).

$\Delta Do$  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>).

Vt : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

### 2.5.2. Dosage du glutathion

Le taux du glutathion (GSH) est quantifié selon la méthode de Weckberker & Cory (1988), dont le principe repose sur la mesure colorimétrique de l'acide 2-nitro 5-mercapturique, résultant de la réduction de l'acide 5-5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB) par les groupements thiol (-SH) du glutathion mesuré à une longueur d'onde de 412 nm.

Le dosage s'effectue après homogénéisation des échantillons témoins et traités à différents temps (24, 48 et 72h) dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [7,448g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 % [0,25g ASS, 100 ml eau distillée] où 0,2 ml du ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 1000 trs/mn pendant 5 mn.

Une fraction aliquote de 500 µl de l'homogénat est ajoutée à 1 ml du tampon tris/EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec une série témoin. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de

la couleur contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_o}{13.1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \text{ /mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM / mg de protéines).

Δ Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris / EDTA + 0,025 ml DTNB].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

## **2.6. Analyse statistique**

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart-moyen ( $m \pm \text{sem}$ ). Différents tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GRAPH PAD PRISM 7, tels que l'analyse de la variance à deux critères de classification, pour la comparaison multiple (le test de Dunnet et Tuckey).

*Résultats*

### 3. Résultats

L'extrait méthanolique d'*Ruta graveolens* a été appliqué sur les différents stades larvaires (L1, L2, L3 et L4) nouvellement exuvies de *Cs. Longiareolata* à deux concentrations létales 25 et 50 (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) avec des séries témoins. L'effet de cet extrait a été évalué à différentes périodes (24, 48 et 72 heures après traitement).

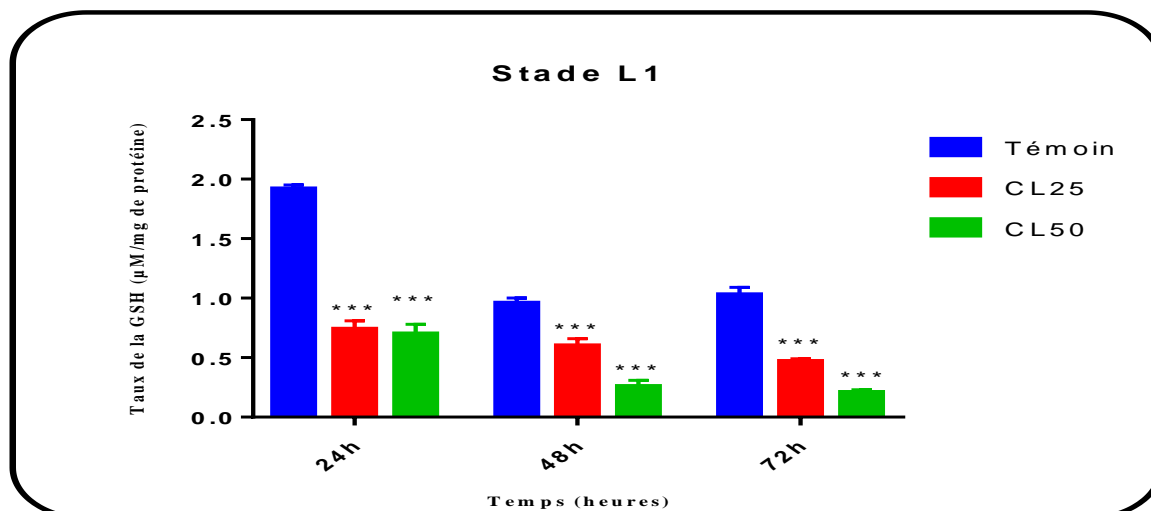
Il a été testé sur deux biomarqueurs de détoxification, les glutathion S-transférases (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH) L'éventuel impact de sur le développement d'une résistance a été apprécié par le dosage d'une enzyme cible du système de détoxification (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH). Les résultats ont été exprimés par rapport à la quantité de protéines (mg) obtenue à partir d'une courbe de référence.

#### 3.1. Effet sur le taux du glutathion

Le taux du glutathion ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves L1, L2, L3 et L4 de *C. longiareolata* témoins et traitées (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) est enregistrée à 24, 48 et 72 heures après traitement.

**Tableau 1 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves du premier stade de *Cs longiareolata* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

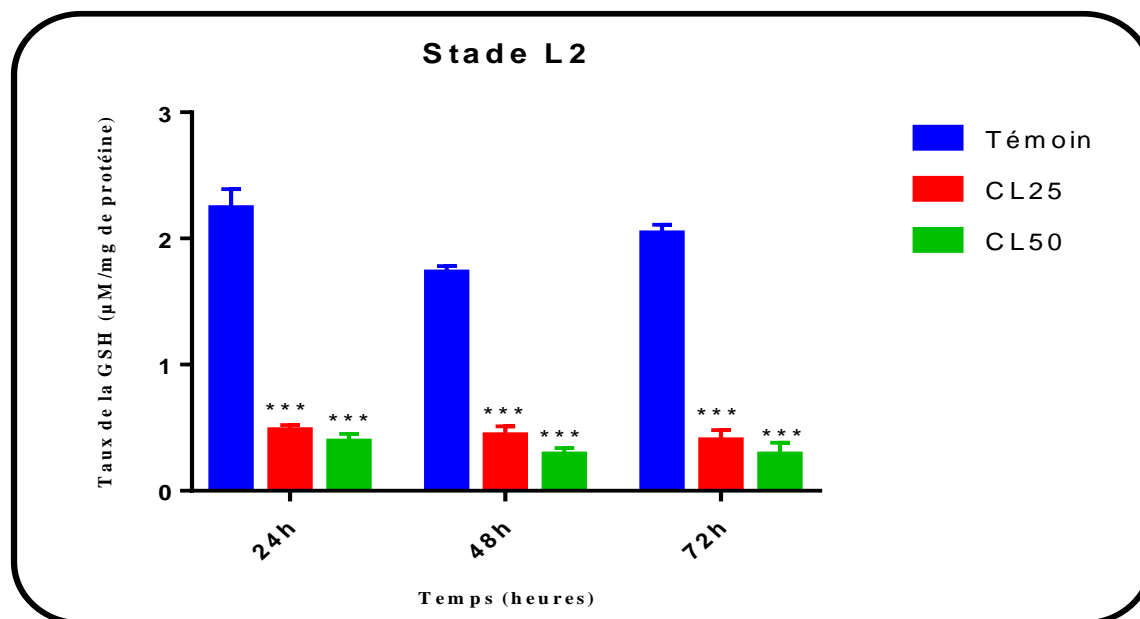
Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
24	1,29 $\pm$ 0,03 a A	0,74 $\pm$ 0,07 b A	0,70 $\pm$ 0,08 b A
48	0,96 $\pm$ 0,04 a B	0,60 $\pm$ 0,06 b B	0,26 $\pm$ 0,05 b B
72	1,03 $\pm$ 0,06 a B	0,47 $\pm$ 0,02 b C	0,21 $\pm$ 0,02 b B



**Figure 5.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 1 de *C. longiareolata* (m ± SD ; n= 3). (\*\*\*) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 2 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves du deuxième stade de *Cs longiareolata* (m ± SD, n=3). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
<b>24</b>	2,24±0,15 a A	0,48±0,04 b A	0,39±0,06 b A
<b>48</b>	1,73±0,05 a B	0,44±0,07 b A	0,29±0,05 b A
<b>72</b>	2,04±0,07 a C	0,40±0,08 b A	0,29±0,09 b A

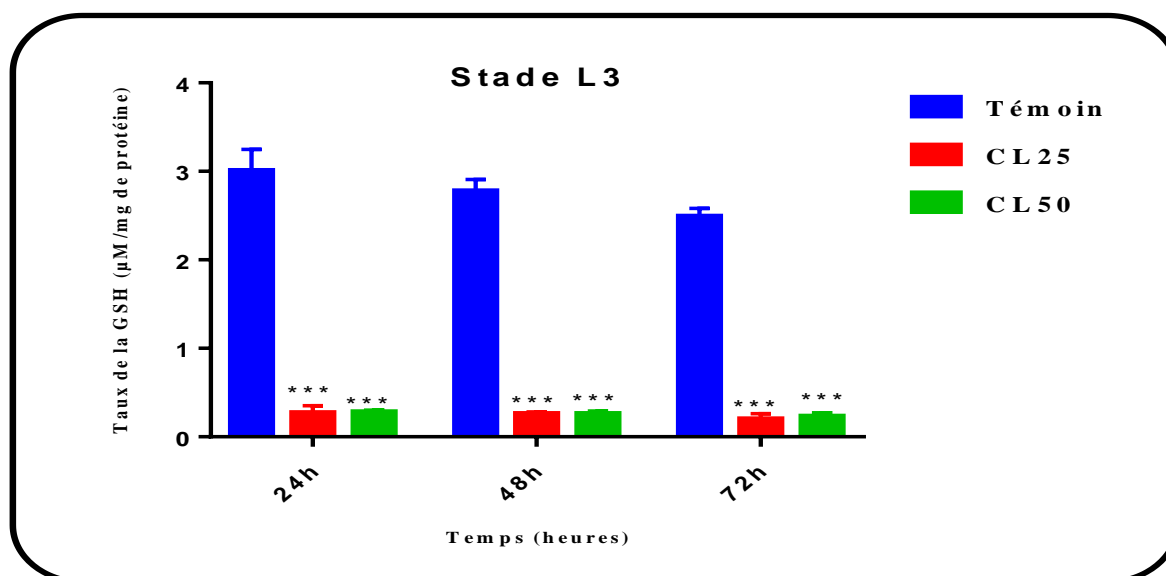


**Figure 6.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 2 de *C. longiareolata* ( $m \pm SD$ ;  $n= 3$ ). (\*\*\*) Différence très hautement significative ( $p<0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 3 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves du troisième stade de *Cs longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
24	3,01±0,24 a A	0,27±0,08 b A	0,28±0,02 b A
48	2,78±0,13 a B	0,26±0,02 b B	0,26±0,03 b B
72	2,49±0,09 a C	0,20±0,06 b C	0,23±0,04 b C

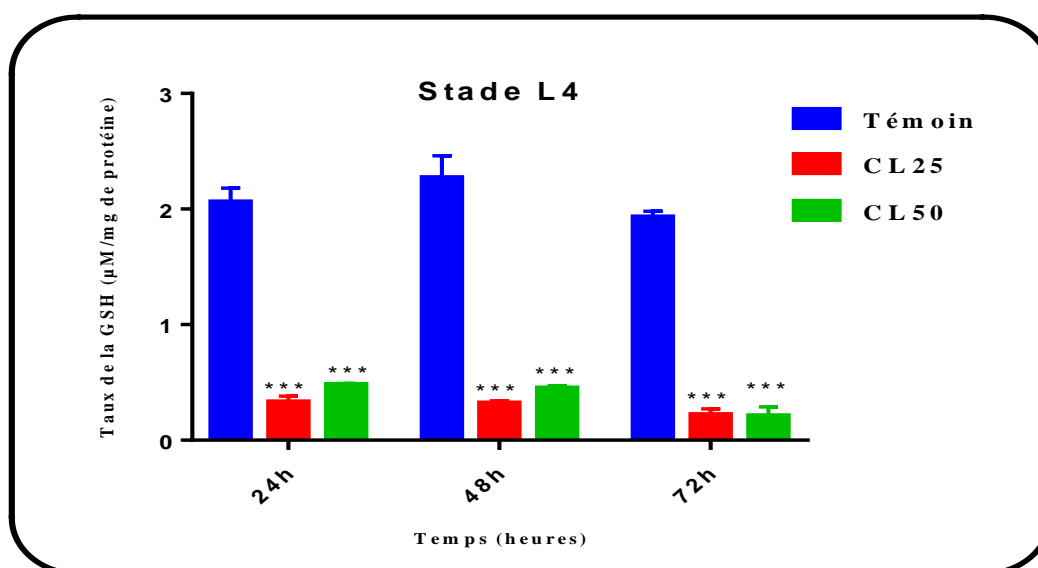




**Figure 7.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves 3 de *C. longiareolata* ( $m \pm \text{SD}$ ;  $n=3$ ). (\*\*\*) Différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 4 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur le taux de GSH ( $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* ( $m \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
<b>24</b>	2,06±0,12 a A	0,33±0,05 b A	0,48±0,01 b A
<b>48</b>	2,27±0,19 a B	0,32±0,02 b B	0,45±0,02 b B
<b>72</b>	1,93±0,05 a C	0,22±0,05 b C	0,21±0,08 b C



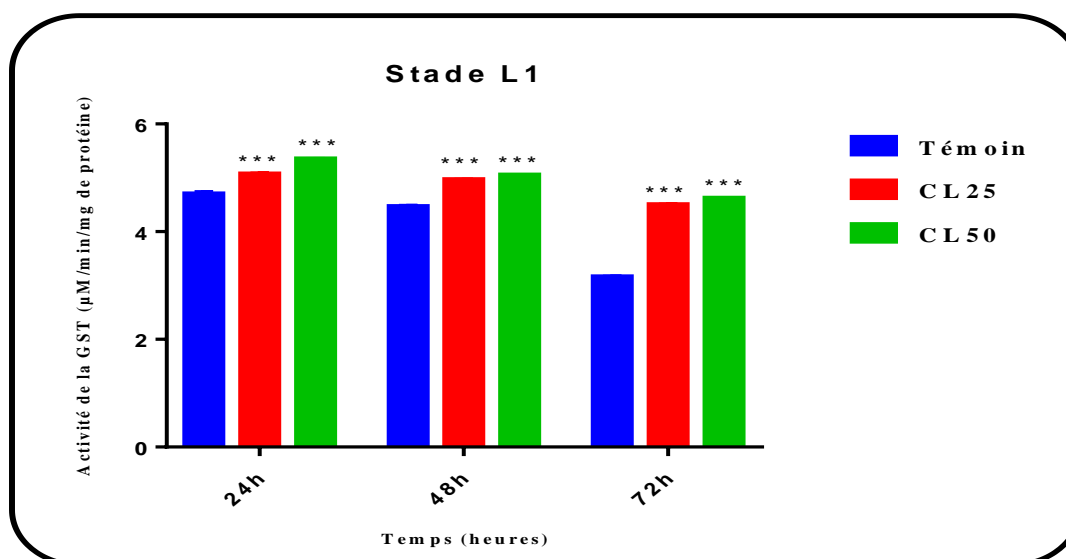
**Figure 8.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur le taux de GSH (µM/mg de protéines) chez les larves 4 de *C. longiareolata* (m ± SD ; n= 3). (\*\*\*) Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).

### 3.2. Effet sur l'activité spécifique des glutathion S-transférases

L'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 1, 2, 3 et 4 de *C. longiareolata* témoins et traitées (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) est enregistrée à 24, 48 et 72 heures après traitement.

**Tableau 5 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves du premier stade de *Cs longiareolata* (m ± SD, n=3). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

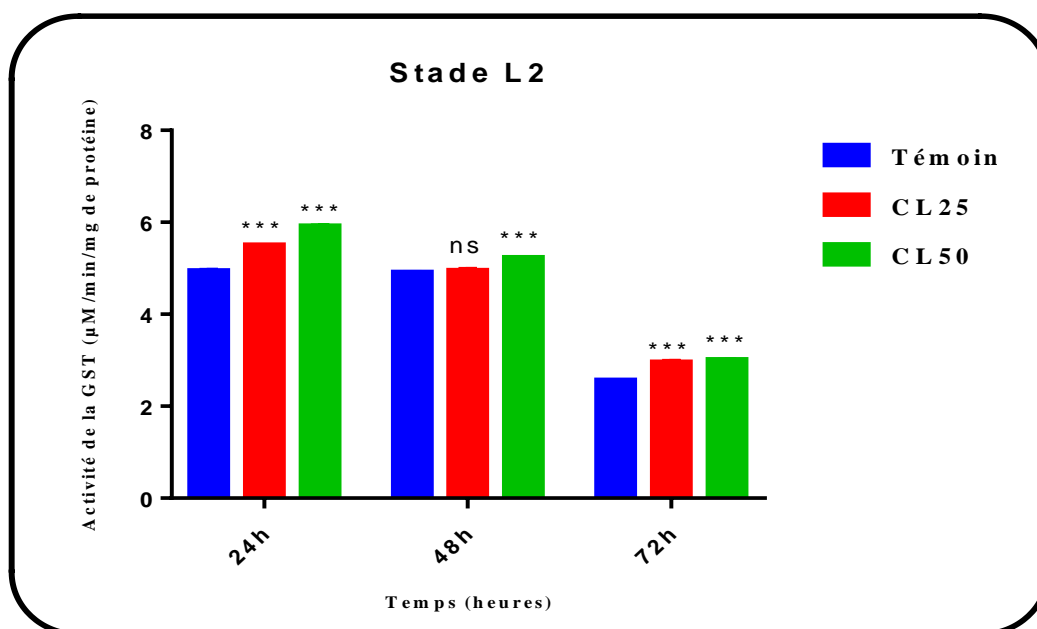
Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
24	4,70±0,04 a A	5,07±0,017 b A	5,35±0,002 b A
48	4,47±0,02 a B	4,97±0,004 b B	5,05±0,007 b B
72	3,16±0,01 a C	4,50±0,014 b C	4,62±0,003 b C



**Figure 9.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 1 de *C. longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). (\*\*\*) Différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 6 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves du deuxième stade de *Cs longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

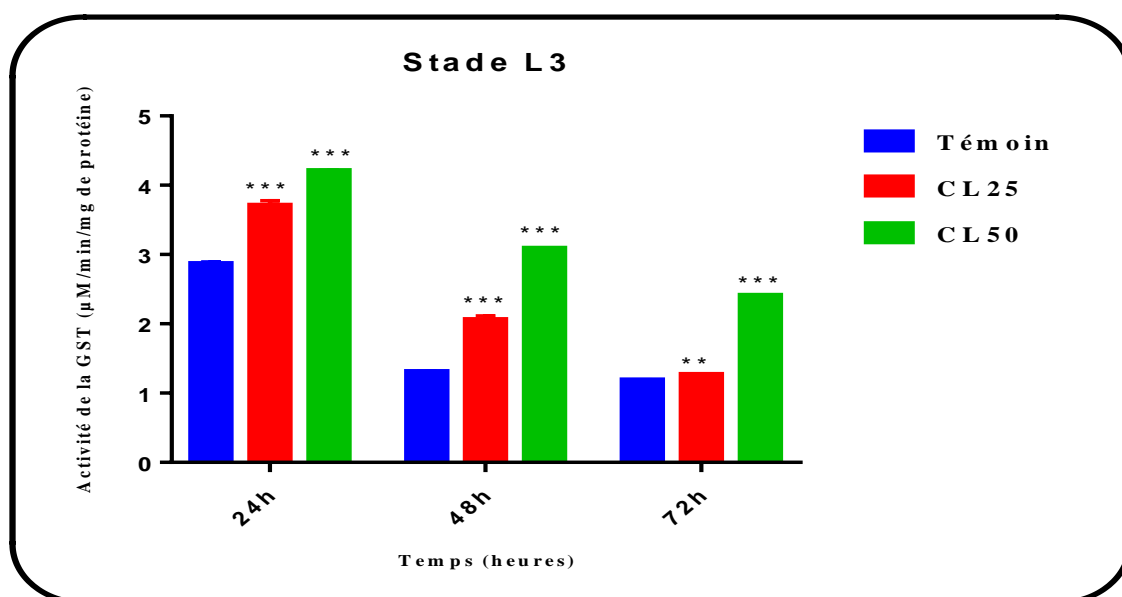
Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
24	4,94±0,03 a A	5,50±0,01 b A	5,92±0,02 b A
48	4,91±0,013 a A	4,95±0,04 a B	5,23±0,01 b B
72	2,56±0,004 a B	2,96±0,03 b C	3,01±0,01 b C



**Figure 10.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 2 de *C. longiareolata* (m ± SD, n=3). (ns Différence non significative (p≥0,05), \*\*\* Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 7 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves du troisième stade de *Cs longiareolata* (m ±SD, n=3). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

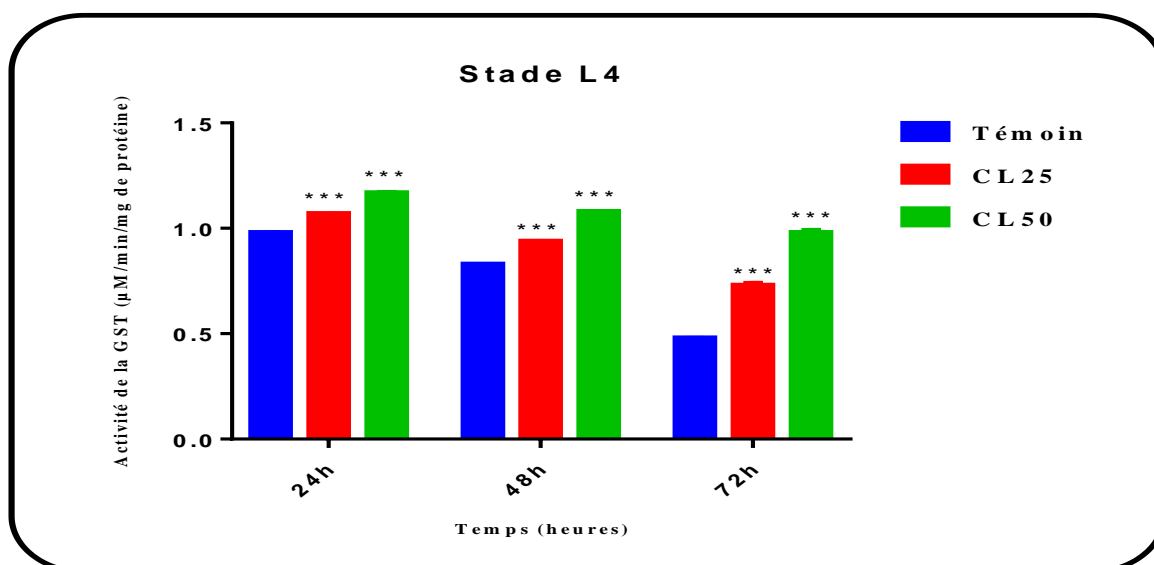
Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
24	2,87±0,024 a A	3,71±0,069 b A	4,21±0,005 b A
48	1,31±0,004 a B	2,06±0,056 b B	3,09±0,001 b B
72	1,19±0,004 a C	1,27±0,004 b C	2,41±0,002 b C



**Figure 11.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 3 de *C. longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). (\*\* Différence hautement significative ( $p<0,01$ ), \*\*\* Différence très hautement significative ( $p<0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).

**Tableau 8 :** Effet de l'extrait de *R. graveolens* sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (heures)	Témoin	CL <sub>25</sub>	CL <sub>50</sub>
<b>24</b>	0,98±0,002 a A	1,07±0,001 b A	1,17±0,005 b A
<b>48</b>	0,83±0,002 a B	0,94±0,002 b B	1,08±0,001 b B
<b>72</b>	0,48±0,002 a C	0,73±0,013 b C	0,98±0,014 b C



**Figure 12.** Effet de l'extrait de *R. graveolens* (CL<sub>25</sub> et CL<sub>50</sub>) sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves 4 de *C. longiareolata* ( $m \pm SD$ ,  $n=3$ ). (\*\*\*) Différence très hautement significative ( $p<0,001$ ) entre les séries témoins et traitées).

# *Discussion*

#### 4. Discussion

Une bonne évaluation de l'impact écotoxicologique des contaminants nécessite souvent une approche multifactorielle utilisant plusieurs marqueurs biologiques. Au niveau biochimique, il existe différents types de biomarqueurs regroupés selon leur fonction au niveau cellulaire (Badiou, 2007). Les principaux biomarqueurs utilisés sont des marqueurs enzymatiques comme la catalase, la glutathione peroxydase, les glutathion S-transférases et l'acetylcholinestérase (Durou *et al.*, 2007).

En dépit des diversités chimiques des insecticides et diversités biologiques des insectes, un nombre de mécanismes de résistance sont capable de détoxifier les insecticides en métabolites moins toxiques (Soderlund, 1997). Ces mécanismes sont :

- ✓ Résistance comportementale s'observe au niveau de l'insecte qui présente un comportement différent, empêchant le toxique d'agir.
- ✓ Résistance physiologique s'exprime au niveau des tissus et organes ; elle est caractérisée par une diminution de la pénétration ou par une augmentation de l'excrétion des insecticides.
- ✓ Résistance biochimique se situe au niveau cellulaire. Elle consiste d'une part, en une augmentation de l'activité enzymatique des systèmes de détoxification (Cytochromes P450, GSTs et Carboxylestérases) et d'autre part, en une diminution de l'affinité des sites d'action vis-à-vis des insecticides (Canal sodium "voltage-dépendant", AChE et GABA<sub>R</sub>).

Pour contribuer à une compréhension de ces mécanismes, nous avons évalué l'effet de l'extrait méthanolique de *Ruta graveolens* sur l'activité des biomarqueurs du stress oxydatif, glutathion S-transférases et son cofacteur, le glutathion chez une espèce de moustiques, *C. longiareolata* à différentes périodes après traitement, 24, 48 et 72heures.

##### 4.1. Effet de l'HE sur le taux de glutathion

L'activité du système antioxydant subit une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un produit toxique ou un polluant, ces deux types de réponse dépendent de la durée d'exposition d'une part et de la sensibilité de l'espèce exposée d'autre part. L'induction du système de défense antioxydant peut être considérée comme une adaptation de l'organisme à un environnement pollué (Droge, 2002).

Le glutathion (GSH) est un tripeptide soluble dans l'eau, constitué de trois acides aminés ; glutamate, cystéine et glycine (L- $\gamma$ -glutamyl-L cysteinyl glycine) (Meister & Anderson, 1983 ; Noctor *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2005). Dans la plupart des organismes,



le glutathion est majoritairement synthétisé dans le cytoplasme à partir de deux acides aminés, la cystéine et le glutamate. Mais, dans des conditions physiologiques, cette forme ne représente que 5-12% de la concentration du glutathion total qui varie entre 0,1 et 10 mM selon les espèces (Foyer *et al.*, 1991; Frendro *et al.*, 1999). Le glutathion peut être transporté et/ou produit dans d'autres compartiments cellulaires. Dans la plupart des organismes vivants, le glutathion joue plusieurs rôles incluant le transport des acides aminés, la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire, la régulation des activités enzymatiques et la régulation du cycle cellulaire (Kim *et al.*, 2005 ; Lu, 2009 ; Meister & Anderson, 1983 ; Penninckx, 2002 ; Shan *et al.*, 1990 ; Sies, 1999 ; Wang & Ballatori, 1998). Le glutathion est un biomarqueur non-enzymatique qui joue un rôle primordial dans la défense intracellulaire. C'est le principal système impliqué dans la détoxification des ions peroxyde et dans la lutte contre le stress oxydatif (Gannagé-Yared *et al.*, 1998). Le glutathion existe sous deux formes, une forme oxydée (GSSG) et une forme réduite (GSH), et ses enzymes comprennent la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion S-transférase (GST) qui sont impliquées dans la détoxification (Yu, 1994 ; Kisek *et al.*, 2004 ; Zehnalek *et al.*, 2004, Singh *et al.*, 2017).

L'analyse des résultats obtenus au cours de nos expérimentations, révèle une diminution significative du taux de GSH chez les séries traitées. La diminution du glutathion pourrait être expliquée par une consommation accrue de ce cofacteur par les GSTs afin de détoxifier ces biopesticides. Kiran *et al.* (2017) observent une réduction du taux de GSH chez *Callosobruchus chinensis* et *C. maculatus* après traitement (CL<sub>50</sub>) à l'HE de *Boswellia carterii*. Cette diminution a été également observée chez *S. oryzae* et *R. dominica* traités à la CL<sub>50</sub> d'HE de *Gaultheria procumbens* (Kiran & Prakash, 2015). Par contre, les travaux de Singh *et al.* (2017) mettent en évidence une augmentation du taux de GSH chez *S. oryzae* exposée à l'anhydride 2,3-diméthylmaléique.

#### **4.2. Effet de l'HE sur l'activité spécifique de la GST**

Les GSTs sont des enzymes antioxydantes impliquées dans la phase II de détoxification des xénobiotiques (Sau *et al.*, 2010) en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Chelvanayagama *et al.*, 2001 ; Boyer, 2006 ; Walters *et al.*, 2009 ; Ebadoallahi *et al.*, 2013). Le rôle majeur du glutathion est de convertir des composés lipophiles en molécules hydrophiles facilement excrétables (Habig *et al.*, 1974). Les GSTs permettent le développement de la résistance envers les agents chimiothérapeutiques, les insecticides, les herbicides et les antibiotiques microbiens. Elles jouent un rôle important

---

dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies de biosynthèse (Oppenoorth *et al.*, 1977 ; Kao & Sun, 1991 ; George, 1994 ; Sun *et al.*, 2001).

Dans la présente étude, l'activité spécifique des GSTs chez les larves de différents stades de *C. longiareolata* traitées à l'extrait méthanolique de *R. graveolens*, a augmenté d'une manière significative à différentes périodes, par rapport aux témoins. L'augmentation de l'activité des GSTs se traduit par une mise en place du processus de détoxification. Par ailleurs, la surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme, et à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour ces enzymes (Cédric, 2008). Le processus de détoxification est incapable d'empêcher l'effet insecticide de ces extraits de plantes.

Les travaux antérieurs montrent des résultats similaires à ceux obtenus dans notre étude (Vanhaelen *et al.*, 2001, Dugravot *et al.*, 2004; Khosravi *et al.*, 2010 ; Zibae & Bandani 2010 ; Bouayad *et al.*, 2013). Une augmentation de l'activité des GSTs est signalée chez *Xanthogaleruca luteola* traitée à l'huile de neem (Valizadeh *et al.*, 2013), chez *Glyphodes pyloalis* traitée à l'extrait méthanolique d'*Artemisia annua* (Khosravi *et al.*, 2011), chez *Zonocerus variegatus* exposé à l'extrait d'*Ocimum gratissimum* (Adeyi *et al.*, 2014) et chez *Drosophila melanogaster* exposée à l'HE de *Psidium guajava* (Pinho *et al.*, 2014). De plus, (Shojaei *et al.* 2017) montrent une augmentation de l'activité des GSTs chez les larves de *Tribolium castaneum* traitées à la CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> et CL<sub>70</sub> de l'HE d'*Artemisia dracuncululus* avec une relation dose-réponse. Par contre, une réduction de l'activité des GSTs a été notée chez les larves du troisième stade de *T. castaneum* et *C. maculatus* traitées aux l'HE de cardamome, cannelle et muscade (Tarigan *et al.*, 2016), chez les larves de *Tribolium castaneum* traitées à l'huile de *Agastache foeniculum* (Ebadoallahi *et al.*, 2013), chez les larves de *Culex quinquefasciatus* traitées à l'HE de *Citrus grandis* (Mahanta *et al.*, 2017) et chez les larves de *T. castaneum* traitées aux l'HE de six plantes : *Allium sativum*, *Mentha piperita*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*, *Sesamum Indicum* et *Chamaemelum nobile*) (Abd El-Aziz & El-Sayed, 2009). Ce faible niveau de détoxification qui se traduit par une diminution de l'activité des GSTs, peut être à l'origine du pouvoir insecticide.

*Conclusion*

*et*

*Perspectives*

## 5. Conclusion et perspectives

En raison des problèmes liés à l'utilisation des insecticides chimiques et leur impact nocif sur la santé et l'environnement, le recours à des alternatives naturels remplaçant les insecticides de synthèse et présentant des avantages écologiques et économiques, s'avère nécessaire.

L'extrait méthanolique de *R. graveolens* a été testée sur les larves (L1, L2, L3 et L4) de *Culiseta longiareolata*, l'espèce de moustique le plus abondante dans la région de Tébessa. Leur action a été évaluée sur deux biomarqueurs de détoxification : les GSTs et son cofacteur la GSH.

Cet extrait provoque une réduction du taux de GSH et une augmentation de l'activité de la GST chez les traités comparativement aux témoins.

Cette étude basée sur l'utilisation des plantes aromatiques comme insecticide, ouvre de larges perspectives dans le domaine des connaissances fondamentales d'une part et dans le domaine appliqué d'autre part.

*Références*

*Bibliographiques*

## 6. References bibliographies

### -A-

**Abd El-Aziz, M.F. & El-Sayed Y.A.** (2009). Toxicity and biochemical efficacy of six essential oils against *Tribolium confusum* (du val) (Coleoptera: Tenebrionidae). Egyptian Academic Journal of Biological Sciences 2 (2): 1 – 11.

**Adeyi, A.O., Akozi1, G.O. , Adeleke, M.A. , Agbaogun, B.K.O. & Idowu A.B.**

(2014). Induction and activity of glutathione S-transferases extracted from *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) exposed to insecticides. International Journal of Tropical Insect Science 1-7.

**Aitken T.H.G.,** (1954). The culicidae of Sardinia and Corsica (Diptera). Bulletin of entomological research 45(3): 437-494.

**Alaoui Slimani N.** (2002). *Faune culicidienne d'une zone marécageuse de Rabat-Salé : Biotypologie et contribution à la lutte par des substances naturelles.* Thèse Doct. es Sci. Biol., Fac. Sci. Univ. Mohammed V., Rabat, Maroc, 192 p.

**Anonyme.** (2004). The Wealth of India. 5th ed., New Delhi: Council of Scientific and Industrial Research;:94-96.

### -B-

**Badiou, A.** (2007). Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille, *Apis mellifera*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université de Paul Cezanne AIX-MARSEILLE III. 147 p.

**Bainy, A.C.D.** (2000). Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. Aquaculture 191: 163- 168.

**Barbouche, N., Hajjem, B., Lognay, G., Ammar, M.** (2001). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (*Solanaceae*) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2), p. 85–90.

**Boulkenafet**, (2006). Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Présentation pour l'obtention du Diplôme de Magister en entomologie (option ; application agronomique et médicale). 191p.

**Bocquené, G., Galgani, F. & Walker, H.** (1997). Les cholinestérasés, biomarqueurs de neurotoxicité. *In*: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C. and Ramade, F., (eds), Biomarqueurs en écotoxicologie-Aspects fondamentaux. *Masson, Paris*, pp. 209 –240.

**Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A.A.** (2013). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29:460–468.

**Bonnier, G. (1999)** .La Grande Flore en Couleur ; Ed : BELIN ; Tome : 205 - 206.

**Boyer, S.** (2006). Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, 78 p.

**Bouayad, N., Rharrabe, K., Ghailani, N.N., Jbilou, R., Castañera, P. & Ortego, F.**(2013). Insecticidal effects of Moroccan plant extracts on development, energy reserves and enzymatic activities of *Plodia interpunctella*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11(1): 189-198.

**Bray, L.** (2000) .Plantes à fleurs d'Europe occidentale. Systématique évolutive. (Paris: Diderot

Multimedia, collection Pavages, Le Seuil Distribution).

**Brunhes, Rhaim, Geoffroy, Angel & Hervey**, (1999). Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel d'identification et d'enseignement. IRD édition.

-C-

**Chelvanayagama, G. Parker, M.W. & Board, P. G.** (2001). “Fly fishing for GSTs: A unified nomenclature for mammalian and insect glutathione transferases,” *Chemico-Biological Interactions* 133 (1–3): 256–260.

**Cédric, P.** (2008). Interactions entre insecticides non pyréthrinoïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae* : Mécanismes, efficacité et impact sur la sélection de la résistance. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Université de Montpellier I, Formation doctorale : Parasitologie, 65 p.

**Conway, G.A., & Slocumb, J.C.** (1979). Plants used as abortifacients and

emmenagogues by Spanish New Mexicans. *Journal of Ethnopharmacology* 1, 241-261.

**Crosby, D.G.** (1966). Natural pest control agents. In Gould, R.F. (Ed.). *Natural Pest Control Agents*. *Advances in Chemistry Series* 53: 1-16

**-D-**

**David, J.P., Rey, D., Pautou, M.P., Meyran, J.C.** (2000). Differential toxicity of leaf litter to *Dipteran larvae* of mosquito developmental sites. *J. Invertebr. Pathol.* 75, p. 9–18.

**Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Romeo, M. & Amiard-Triquet, C.** (2007). Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148: 445-458.

**Dugrovot, S., Thibout, E., Abo-Ghalia, A. & Huignard, J.** (2004). How a specialist and a non specialist insect cope with dimethyl disulfide produced by *Allium porrum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 113 (3): 173–179.

**Dröge, W.**, (2002). *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Scientific Society Publisher Alliance 82(1): 47-95.

**-E-**

**Ebadollahi, A., Khosravi, R., Sendi, J.J., Honarmand, P. & Amini, R.M.** (2013). Toxicity and Physiological Effects of Essential Oil from *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) Larvae. *Annual Review & Research in Biology* 3(4): 649-658.

**Ekiert, H., Czygan, F - C.** Accumulation of biologically active furanocoumarins in agitated cultures of *Ruta graveolens* L. and *Ruta graveolens* ssp. *divaricata* (Tenore) Gams . *Pharmazie* 2005 ; 60 : 623 – 626 .

**Eldefrawi, M.E.** (1985). Nicotine. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol.12. *Insect Control* (G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.), pp. 263-272. Pergamon, Elmsford, NY.

**-F-**

**Foyer, C., Lelandais, M., Galap, C. & Kunert, K. J.** (1991). Effects of Elevated Cytosolic Glutathione Reductase Activity on the Cellular Glutathione Pool and Photosynthesis in Leaves under Normal and Stress Conditions. *Plant physiology* 97: 863-872.



**Frendo, P., Gallesi, D., Turnbull, R., Van de Sype, G., He´rouart, D. & Puppo, A.** (1999). Localisation of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *The plant journal* 17(2): 215-219.

**-G-**

**Gannagé-Yared, M., Khneisser, I., Salem. N., Gouyette. A., Loiselet. J., &Halaby. G.** (1998). Glutathion et glutathion S-transférase sanguins et leucocytaires : relation avec la cholestérolémie chez des volontaires sains. *Annales de Biologie Clinique* 56 (3): 321-327.

**George, S. G.,** (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. *In: Malins, D.C., Ostrander, G. K.* Aquatic. Toxicology, *Molecul. Biochem and Cell.Perspect* Lewis, Boca Raton, FL, pp. 37-85.

**Georghiou, GP., Ariaratnam, V., Pasternak, ME., Lin, CS.**(1975). Organophosphorus multi résistance in *Culex quinquefasciatus* in California. *J. Econ. Entomol.* 68, p. 461–467.

**Goddard, J.** 2008. Mosquito-borne diseases. Dans *Infectious diseases and arthropods.* Sous la direction de J. Goddard. Humana Press, Totowa, New Jersey, Les États-Unis d'Amérique. Pp. 31–79.

**Gould, E.A. & Higgs, S.** (2009). Impact of climate change and other factors on emerging arbovirusdiseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* 103: 109–121.

**-H-**

**Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B.** (1974). Glutathione S-Tranferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem* 249: 7130-7139.

**Hurlbut, H.S.** (1956) West Nile virus infection in arthropods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,* 5, 76-84.

**-I-**

**-J-**

**Jang, YS., Kim, MK., Ahn, YJ., Lee, HS.** (2002 b). Larvicida lactivity of Brazilian

plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera : Culicidae). *Agric.Chem. Biotechnol.* 45 (3), p. 131–134.

**Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., & Daszak, P.** 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451:990–993.

Jacobson M. (1989). Botanical pesticides, past present and future *In* Arnason JT. *et al.* (Ed.). *Insecticides of plant origin*. Washington, D.C. : American Chemical Society Symposium, series 387, p. 1-10.

-K-

**Kao, C.H. & Sun, C.N.** (1991). In vitro degradation of some organophosphorus insecticides by susceptible and resistant diamondback moth. *Pestic Bioch Physiol* 41: 132-141.

**Khosravi, R., Jalali-Sendi, J. & Ghadamyari, M.** (2010). Effect of *Artemisia annua* L. on deterrence and nutritional efficiency of lesser mulberry pyralid (*Glyphodes pyloalis* Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Protection Research* 50(4): 423-428.

**Knight, K. L. & Stone, A.** (1977). A catalog of the mosquitoes of the world (Diptera:Culicidae).—611 pp. College Park, Maryland, Entomological Society of America(Thomas Say Foundation, Vol. VI).

**Kemassi A.,** (2015) - Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae). *ElWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.8 n°1: 44 à 61.

**Khosravi, R., Jalali Sendi, J., Ghadamyari, M. & Yezdani, E.** (2011). Effect of sweet worm wood *Artemisia annua* crude leaf extracts on some biological and physiological characteristics of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. *Journal of Insect Science* 11: 156.

**Kim, B. J., Choi, C. H., Lee, C. H., Jeong, S. Y., Kim, J. S., Kim, B. Y., Yim, H. S. & Kang, S. O.** (2005). Glutathione is required for growth and prepore cell differentiation in *Dictyostelium*. *Developmental biology* 284: 387-398.

**Kiran, S., Kujur, A., Patel, L., Ramalakshmi, K. & Prakash, B.** (2017). Assessment of toxicity and biochemical mechanisms underlying the insecticidal activity of chemically characterized *Boswellia carterii* essential oil against insect pest of legume seeds. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139: 17-23.

**Kiran, S. & Prakash, B.** (2015). Assessment of Toxicity, Antifeedant Activity, and

Biochemical Responses in Stored-Grain Insects Exposed to Lethal and Sublethal Doses of *Gaultheria procumbens* L. Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (48): 10518–10524.

**Kirtikar, KR, Basu BD.**(2003). *Indian Medicinal Plants with Illustrations*. 2nd ed.,

Uttaranchal: Oriental Enterprises;:625-629.

**Kisek, R., Vacek, J., Trnkova, L. & Jelen, F.** (2004). Cyclicvoltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry* 63: 19 – 24.

-L-

**Lee, HK. , Park, C., Ahn, YJ.** (2002). Insecticidal activities of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutoidae). *Jap.Soc. Appl. Entomol. Zool.* 37 (3), p. 459–464.

**Lin HC, Tsai SH, Chen CS, et al.** (2008). Structure-activity relationship of coumarin derivatives on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. *Biochemical pharmacology*;75:1416-1425.

**Lu, S. C.** (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine* 30: 42-59.

-M-

**Mahanta, S., Khanikor, B. & Sarma, R.** (2017). Potentiality of essential oil from *Citrus grandis* (Sapindales: Rutaceae) against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(3): 803-809.

**Maslov, A.V.** (1967) Krovososushchie komary podtriby Culisetina (Diptera, Culicidae) mirovoï fauny. Akademiya Nauk SSSR 1967. [English translation: Blood-sucking Mosquitoes of the Subtribe Culisetina (Diptera, Culicidae) in World Fauna. Smithsonian Institution Libraries and the National Science Foundation, Washington D.C., 1989.]

**Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W.** (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public .

**Meister, A. & Anderson, M. E.** (1983). Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52: 711-760.

**Mullen, G. & Durden, L.** (2009). *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier

Academic Press, Amsterdam, Pays-Bas

**Mouchet, J et Carnevale P.** (1991). Les vecteurs et la transmission : épidémiologie. Le paludisme Ellipses U.R.E.F. : 34-59p.

-N-

**Noctor, G., Arisi, A. C. M., Jouanin, L., Kunert, K. J., Rennenberg, H. & Foyer, C. H.** (1998). Glutathione: Biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 623-647.

**Nadkarni KM. Indian Plants et Drugs.**( 2005). 5th ed., New Delhi: Srishti Book Distributers; 2005:344-345.

-O-

**Oppenoorth, F.J, Smissaert, H.R, Welling, W., Van Der Pas, L.J.T. & Hitman, K.T.** (1977). Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione-S-transferase, and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 7: 34-47.

**Oliva, A., Meepagala, KM, David, E, & al.** (2003). Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J agricultural food chemistry.*; 51:890-896.

-P-

**Paul,** (2009). Généralités sur les moustiques du littoral méditerranéen français .EID méditerranée .p: (1-11).

**Peterson,** (1980). Alimit cycle interprétation of a mosquito circadianoscillator .J. theor.

**Poupardin,** .(2011). Interactions gènes –environnements chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'université de Grenoble, Spécialité : Biodiversité, Ecologie et Environnement. P:275. Professionnels de la santé et de la médecine sous la direction du docteur pierrick horde. *Product. végét. Sér. Généralités*, 3 (1), art. 8 : 47 p. + 1 carte.

**Penninckx, M.J.** (2002). An overview on glutathione in *Saccharomyces versus non-the Psidium guajava* Var. Pomifera (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by conventional yeasts. *FEMS yeast research* 2: 295-305.

**Pinho, A.I., Wallau, G.L., Nunes, M.E.M., Leite, N.F., Tintino, S.R., Cruz, L.C., Cunha, F.A.B., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D., Posser, T. & Franco, J.L.** (2014). Fumigant Activity of Means of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular*

Longevity 1-8.

**Pline**, (1999). La vertu des plantes (Histoire Naturelle, livre XX). (Paris: Arléa).

**-R-**

**Randolph, S.E. & Rogers, D.J.** (2010). The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nature Reviews Microbiology*, 8:361–371.

health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12: 435–447.

**Ratheesh M, Shyni GL, Sindhu G, Helen A.** (2011) Inhibitory effect of *Ruta graveolens* L. on oxidative damage, inflammation and aortic pathology in hypercholesteromic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*;63:285-290.

**Rehimi, N. & Soltani, N.** (1999). Laboratory evolution of alsystine. A chitin synthesis inhibitor agonist *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Effects on development and cuticule secretion. *Journal of Applied Entomology* 123: 437 - 441.

**Reiter, P.** (2001). Climate change and mosquito-borne disease. *Environmental Health Perspectives*, 109: 141–161.

**Robak J, Gryglewski RJ.**(1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical pharmacology*;37:837-841. 62.

**-S-**

**Sailani MR**, (2007). Moeini H. Effect of *Ruta graveolens* and *Cannabis sativa* alcoholic extract on spermatogenesis in the adult wistar male rats. *Indian Journal of Urology: IJU: J Urological Society of India*;23:257.

**Sau, A. Pellizzari Tregno, F. Valentino, F. Federici, G. & Caccuri, A. M.** (2010). “Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance,” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500 (2): 116–122.

**Shan, X. Q., Aw, T. Y. & Jones, D. P.** (1990). Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacology & therapeutics* 47: 61-71.

**Shojaei, A., Talebi, K., Sharifian, I. & Ahsae, S.M.** (2017). Evaluation of detoxifying enzymes of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidae) exposed to essential oil of *Artemisia dracuncululus* L. *Biharean Biologist* 11 (1): 5-9.

**Soderlund, D.M.** (1997). Molecular mechanisms of insecticide resistance. *In situ* V (Ed). Molecular mechanisms of resistance to agrochemicals, Chemistry of plant protection. Berlin Heidelberg New York 13: 21-56.

**Soreq, H. & Zakut, H.** (1993). Human Cholinesterase and Anticholinesterase. Academic Press, New York.

**Sies, H.** (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free radical biology & medicine* 27: 916-921.

**Singh, K.D., Labala, R.K., Devi, T.B. Singh, N.I., Chanu, H.D., Sougrakpam, S., Nameirakpam, B.S., Sahoo, D., & Rajashekar, Y.** (2017). Biochemical efficacy, molecular docking and inhibitory effect of 2, 3-dimethylmaleic anhydride on insect acetylcholinesterase. *Scientific report* 1-11.

**Sinegre, G., Jilien, J.L., Gaven, B.** (1977). Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens* (L.) dans le Midi de la France. *Parasitologia* 19 (1/2), p. 79–94.

**Sun, C.N., Huang, S.Y., Hu, N.T. & Chung, W.Y.** (2001). Glutathione S-transferase and insect resistance to insecticides. In: *Biochemical sites of insecticide action and resistance* (Ishaaya I, ed). Springer, Berlin 239-252.

-T-

**Tarigan, S.I., Dadang, D. & Sakti Harahap, I.** (2016). Toxicological and physiological effects of essential oils against *Tribolium castaneum* (Coleoptera:Tenebrionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Biopesticides* 9(2): 135-147.

**Takhtajan, A** (2009). *Flowering Plants*. Ed 2: SPRINGER. P: 33 - 41, 375.

-V-

**Varamini P, Soltani M, Ghaderi A.** (2009) Cell cycle analysis and cytotoxic potential of *Ruta graveolens* against human tumor cell lines. *Neoplasma*;56:6.

**Van Pletzen, R. & van der Linde, T.C. de K.** (1981) Studies on the biology of *Culiseta longiareolata* (Macquart) (Diptera: Culicidae). *Bulletin of Entomological Research*, 71, 71-79.

**Valizadeh, B., Sendi, J.J., Zibae, A. & Oftadeh, M.** (2013). Effect of Neem based insecticide Achook® on mortality, biological and biochemical parameters of elm leaf beetle *Xanthogaleruca luteola* (Col.: Chrysomelidae). *Journal of Crop Protection* 2 (3): 319-330.

**Vanhaelen, N., Haubruge, E., Lognay, G. & Francis, F.** (2001). Hoverfly glutathione S-transferases and effect of Brassicaceae secondary metabolites. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 71 (3): 170–177.

**Vermeil,** (1953). Contribution à l'étude des *Culicidés* du Fezzan (Libye). Présence d'*Anopheles brousesi* à El Barka (Territoire de Rhat), *Bull Soc Path Ex*, 46, 445-454.

**Villeneuve et Desire ,1965.** *Zoologie*. Bordas. 1ere édition. Pages 323.14 p.

---

---

**-W-**

**Wang, W. & Ballatori, N.** (1998). Endogenous glutathione conjugates: occurrence and biological functions. *Pharmacological reviews* 50: 335-356.

**Walters, K. B. Grant, P. & Johnson, D.L.E.** (2009). "Evolution of the GST omega gene family in 12 *Drosophila* species," *Journal of Heredity* 100 (6): 742–753.

Wink MA (1998) Short history of alkaloids. In: Robert MF, Wink M(eds) *Alkaloids biochemistry, ecology and medicinal applications*. Plenum Press, New York, pp 11–44

**Weckberker, G. & Cory, J. G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cancer letters* 40: 257-264.

**Wiert, C. (2006).** *Medicinal Plants of the Asia – Pacific: Drugs for the future*. Ed: *WORLD SCIENTIFIC*, p: 401 - 416.

**Wiggles, W.** (1972). *The principal of Insect physiology*. Seventh Edition. Chapman and Hall, 827 p.

**Wu TS, Shi LS, Wang JJ, et al.** (2003). Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. *Journal-chinese chemical society taipei*;50:171-178.

**-Y-**

**Yu, B.P.** (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews* 74: 139 – 162

**-Z-**

**Zehnalek, J., Adam, V. & Kizek, R.** (2004). Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Listy Cukrovarnické Reparske* 120: 222 - 224.

**Zibae, A., Bandani, A.R.** (2010). Effects of *Artemisia annua* L. (Asteracea) on digestive enzymes profiles and cellular immune reactions of sun pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae), against *Beauveria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research* 100 (2): 185–196.