



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Echahid Cheikh Larbi Tébessi-Tébessa

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Appliquée

MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : pharmacologie

Thème :

**Screening phyochimique et effet toxique d'extrait aqueux
des fleurs de *nerium oleander* sur la croissance et les
compositions biochimiques a l'égard d'une espèce de
moustique *culiseta longiareolata***

M^{elle} Amrani Bouthaina

M^{elle} Mellouk Bouthaina

Devant le jury :

Me. BOUABIDA Hayet

Pr. Université Larbi Tébessi-Tébessa Président

Me. DRISS Djema

Pr. Université Larbi Tébessi-Tébessa Rapporteur

Me SEGHIR Hanen

MCA Université Larbi Tébessi-Tébessa Examinatrice

Date de soutenance : 05/06/2023.





REMERCIEMENTS

Je remercie avant tous, dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et la patience qu'il ma donné durant toutes les longues années d'études, et le courage pour réaliser ce travail.

En second lieu, je tiens à remercier mon encadreur Mme **Dris Djemaa** , Je la remercie pour son encadrement, pour sa patience pendant la période de travail, ses conseils et ses orientation et aussi la confiance qu'elle m'a accordée, Je lui exprime mon profond respect et mon parfait considération.

Mes remerciements vont également à Mme **Bouabida**

Hayette pour avoir accepté de présider le jury

J'adresse également mes remerciements à Mme **Sghir**

Hanene pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude en me

fait l'honneur de juger et examiner ce travail.





Dédicace

AVEC UN ÉNORME BONHEUR ET UNE
EXTRÊME JOIE

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui j'aime et que
j'apprécie énormément
leur aide et leur soutien durant ma vie

À

Mes chers parents

À mes sœurs *Lobna, Khaoula, Wafa, Hiba* _

Ma belle *FONA*

À mes chers frères *Khaled, Mohammed*

À mes amies *Souma, Chaima, Abir, Rayen, Bouthaina*

À ma famille

À mon encadreur Mme *Dris Djemaa*.

Merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre
disponibilité permanente.



Dédicace

**AVEC UN ÉNORME BONHEUR ET UNE
EXTRÊME JOIE**

Je dédie ce modeste travail à tous ceux qui j'aime et que
j'apprécie énormément
leur aide et leur soutien durant ma vie

À

Mes chers parents

À mes sœurs *Lobna, Khaoula, Wafa, Hiba* _

Ma belle *FONA*

À mes chers frères *Khaled, Mohammed*

À mes amies *Souma, Chaima, Abir, Rayen, Bouthaina*

À ma famille

À mon encadreur Mme *Dris Djemaa*.

Merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre
disponibilité permanente.

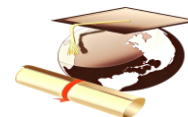
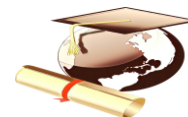
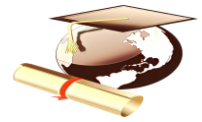


Table des Matières

| | |
|---|----|
| Table des matières | |
| Liste des tableau | |
| Liste des figures | |
| Liste des abréviations | |
| ملخص | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| I. Introduction | |
| II. Matériels et méthodes | 4 |
| II.1. Présentation de la région et les sites d'étude | 4 |
| II.2. Présentation de la plante | 5 |
| II.2.1. La famille <i>Apocynaceae</i> | 5 |
| II.2.2. Genre <i>Nerium</i> | 5 |
| II.2.3. Espèce <i>Nerium oleander</i> | 5 |
| II.2.4. Description botanique | 5 |
| II.2.5 Origine et distribution | 5 |
| II.2.6. Taxonomie | 6 |
| II.2.7. La culture | 7 |
| II.2.8. Utilisations | 7 |
| II.2.9. Composition chimique | 7 |
| II.2.10. Toxicité de plante (<i>Nerium oleander</i>) | 8 |
| II.2.11. Effets de <i>Nerium oleander</i> (sur l'homme et l'animal) | 9 |
| II.2.12. Propriétés pharmacologiques auget | 10 |
| II.3. Présentation de l'insecte | 10 |
| II.3.1. Généralité sur Culicidés | 11 |
| II.3.2. Définition du <i>Culiseta longiareolata</i> | 11 |
| II.3.3. Taxonomie | 11 |
| II.3.4. Cycle de vie | 12 |
| II.3.5. Maladies transmises par les moustiques | 13 |
| II.4. Méthode de collecte de matériel animale | 14 |
| II.5. Récolte et préparation de matériel végétal | 15 |
| II.6. Extraction par macération à partir des fleurs de <i>Nerium oleander</i> | 16 |
| II.7. Screening phytochimique | 17 |
| II.7.1. Recherche des <i>flavonoïdes</i> et des <i>leucoanthocyanes</i> | 17 |
| II.7.2. Recherches des quinones | 18 |
| II.7.3. Recherche de saponines | 18 |

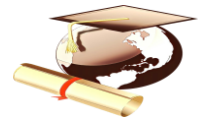


| | |
|---|----|
| II.7.4. Recherche des tanins | 18 |
| II.7.5. Recherche des terpenoïdes et des stéroïdes | 19 |
| II.7.6. Recherche des <i>alcaloïdes</i> | 19 |
| II.8. Etude morphométrique | 20 |
| II.9. Dosage des biomarqueurs | 20 |
| II.9.1. Dosage des glutathion S-transférases | 20 |
| II.9.2. Dosage de la catalase | 22 |
| II.10. Dosage des composants biochimiques | 23 |
| II.10.1. Dosage de protéines totales | 23 |
| II.10.2. Dosage des lipides totaux : | 23 |
| II.10.3. Dosage des glucides totaux | 23 |
| III. Résultat | 24 |
| III.1. Rendement de l'extraction | 27 |
| III.3. <i>Effet d'extrait aqueux de Neruim oleander sur la croissance de Culiseta longiareolata</i> | 28 |
| III.3.1. Croissance pondérale | 28 |
| III.3.2. Croissance linéaire | 28 |
| III.4. Effet d'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> sur les biomarqueurs enzymatiques | 30 |
| III.4.1. Effet sur l'activité spécifique des glutathion S-transférases | 31 |
| III.4.2. Effet sur l'activité spécifique de la catalase | 32 |
| III.5. Impact d'extrait sur la composition biochimique des moustiques | 32 |
| III.5.1. Effet sur le contenu en glucides totaux | 32 |
| III.5.2. Effet sur le contenu en lipides totaux | 33 |
| IV. Discussion : | 35 |
| IV.1. Rendement | 35 |
| IV.2. Screening phytochimique | 35 |
| IV.3. Effet d'extrait aqueux de <i>N.oleander</i> sur la croissance | 36 |
| IV.4. Effet d'extrait aqueux de <i>N.oleander</i> sur les biomarqueurs | 36 |
| IV.4.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs | 37 |
| IV.4.2. Effet sur l'activité spécifique des Catalases | 38 |
| Conclusion | 41 |
| Références et bibliographie | 43 |



Liste des tableaux

| N° | Titres | Page |
|----|--|------|
| 01 | Principales utilisations de <i>Nerium oleander</i> en médecine traditionnelle selon les pays | 8 |
| 02 | Constituants chimiques des différentes parties de <i>Nerium oleander</i> | 9 |
| 03 | Dosage des protéines totales chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage | 23 |
| 04 | Dosage des lipides totaux chez les moustiques : Réalisation de la gamme d'étalonnage | 24 |
| 05 | Dosage des glucides totaux chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage. | 24 |
| 06 | Le rendement d'extraction de la plante <i>Nerium oleander</i> | 27 |
| 07 | Analyse qualitative de composition phytochimique de <i>N.oleander</i> | 27 |
| 08 | Extrait aqueux de <i>Nerium oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur le poids (mg) des larves du quatrième stade chez <i>Culiseta longiareolata</i> (m ± SD, n = 4 répétitions comportant chacune 10 individus). Comparaison des moyennes à différents stades pour une même série (lettres majuscules) et pour un même stade entre les différentes séries (lettres minuscules) | 28 |
| 09 | Effet Extrait aqueux de <i>Nerium oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur la largeur du thorax (mm) des larves du quatrième stade chez <i>Culiseta longiareolata</i> (m ± SD, n = 4 répétitions comportant chacune 10 individus). Comparaison des moyennes à différents stades pour une même série (lettres majuscules) et pour un même stade entre les différentes séries (lettres minuscules) | 30 |
| 10 | Tableau 10 : Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cs longiareolata</i> (m±sem, n=4). | 31 |
| 11 | Tableau 11 : Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> sur l'activité spécifique de catalase (µM/min/mg de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cs longiareolata</i> (m±sem, n=4). | 32 |



Liste des figures

| N° | Titre | Page |
|----|--|------|
| 01 | Situation géographique de la région de Tébessa (Google Maps). | 4 |
| 02 | Différentes parties de <i>N. oleander</i> L. | 6 |
| 03 | L'adulte de <i>Culiseta longiareolata</i> | 11 |
| 04 | Présente le cycle de développement de <i>Culiseta longiareolata</i> | 14 |
| 05 | Les sites de prélèvement | 15 |
| 06 | <i>Nerium oléandre</i> | 16 |
| 07 | Fleurs de la plante <i>Nerium oleander</i> après broyage et tamisage. | 16 |
| 08 | les étapes des études morphométriques | 20 |
| 09 | Extraction et dosage des glutathion S-transférases (Habig et al, 1974) | 21 |
| 10 | Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al, 1967). | 25 |
| 11 | Effet Extrait hydrométhanolique de <i>Nerium oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur le poids (mg) des larves du 4 ^{ème} stades chez <i>Culiseta longiareolata</i> (m ± SD, n = 4) | 29 |
| 12 | Effet extrait hydrométhanolique de <i>Nerium oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur la largeur du thorax (mm) des larves du 4 ^{ème} stades chez <i>Culiseta longiareolata</i> (m ± SD, n = 4) | 30 |
| 13 | : Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéines) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=4). (*Différence très hautement significative (p<0,001) entre les séries témoins et traitées). | 31 |
| 14 | Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur l'activité spécifique de la catalase (µM/min/mg de protéines) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=4). | 32 |
| 15 | Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur le contenu en protéine (µg/individu) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=4). | 33 |
| 16 | Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur le contenu en glucide (µg/individu) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=4). | 34 |
| 17 | Effet de l'extrait aqueux de <i>N. oleander</i> (CL ₂₅ et CL ₅₀) sur le contenu en lipide (µg/individu) chez les larves 4 de <i>C. longiareolata</i> (m ± SD, n=4) | 34 |



Liste des abréviations

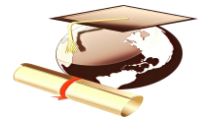
- *N. oleander* : *Nerium oleander*
- *Cs longiareolata* : *Culiseta longiareolata*
- **CL₅₀** : Concentration létale de 50% de la population
- **CL₂₅** : Concentration létale de 25% de la population
- **GST** : glutathion S-transférase
- **GSH** : glutathion S-déshydrogénase (glutathion réduit).
- **CAT** : Catalase
- **trs** : tours
- **1V/1V** : deux solutions avec un même volume
- **m** : moyenne
- **SEM** : écart- moyen
- **n** : nombre de répétitions
- **p** : coefficient de signification
- **g** : Gramme
- **mg** : Milligramme
- **nm** : Nanomètre
- **Rdt(%)** : Rendement (%)
- **±** : Plus ou moins
- **pH** : Potentiel hydrogène
- **µl** : microlitre
- **µg** : Microgramme
- **L1, L2, L3, L4** : Stade larvaire 1, 2, 3,4
- **BBC** : Bleu brillant de comassie
- **TCA** : Acide trichloracétique
- **H₂O₂** : Eau oxygénée



ملخص:

تحتوي المستخلصات الطبيعية من النباتات على مجموعة متنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيا. يتعلق هذا العمل بدراسة الاختبارات الكيميائية النباتية والتأثير السام للمستخلص المائي لزهور نيرويم أولياندر على كوليزيتا لونجياربولاتا، وهو نوع من البعوض الأكثر انتشارًا في منطقة تبسة. تم الحصول على هذا المستخلص عن طريق مذيبة (الماء) macération العائد هو تم تحديد عدة جوانب المظهر الكيميائي النباتي: دراسة الفحص الكيميائي النباتي المظهر المورفومتري: تم النظر في العديد من المعلمات المورفومترية؛ عرض الصدر، وزن، 4 بيرقات كوليزيتا لونجياربولاتا.

أظهرت النتائج أن *Nerium Oleander* يؤثر على هذه المعلمات خلال الفترة التي تم اختبارها (24 و48). جانب المؤشرات الحيوية: يزيد المستخلص المائي بشكل كبير من النشاط المحدد للكاتالاز مع تأثيرات أكثر وضوحًا في 24 ساعة. ويلاحظ أيضًا تحريض نشاط ضريبية السلع والخدمات خلال الفترة التي تمت دراستها (24 و48 و72 ساعة). الجانب الكيميائي الحيوي: تم تحديده من خلال جرعة احتياطات التمثيل الغذائي في البرقات 4 شهود ومعالجتها في أوقات مختلفة. تظهر النتائج انخفاضًا في هذه المحتوى بعد العلاج. الكلمات المفتاحية: *Culiseta longiareolata*، *nerium Oleander*، المستخلصات المائية، الكيمياء النباتية، المورفومتر والتكوين الكيميائي الحيوي، المؤشرات الحيوية.



Résumé :

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives.

Ce travail porte sur l'étude des tests phytochimiques et l'effet toxique d'extrait aqueux des fleurs de *Nerium oleander* sur *Culiseta longiareolata*, espèce de moustique la plus répandue dans la région de Tébessa. Cet extrait a été obtenu par macération dans un solvant polaire (l'eau). Le rendement est : 13.6%

Plusieurs aspects ont été déterminés :

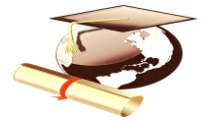
Aspect phytochimiques : la plante de *NERIUM OLEANDER* (fleurs rose) est riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes , tanins , saponines et alcaloïdes

Aspect morphométrique : plusieurs paramètres morphométriques ont été considérés ; la largeur du thorax, le poids, des larves 4 de *Culiseta longiareolata*. Les résultats montrent que *Nerium oleander* affecte ces paramètres au cours de la période testée (24, 48 et 72h).

Aspect biomarqueurs : l'extrait aqueux augmente de manière significative l'activité spécifique de catalase avec des effets plus marqués à 24 heures. Une induction de l'activité de la GST est également observée au cours de la période étudiée (24, 48 et 72 heures).

Aspect biochimique : a été déterminé par le dosage des réserves métaboliques chez les larves 4 témoins et traitées à différents temps. Les résultats montrent une diminution de ces contenus après traitement.

Mots clés : *Culiseta longiareolata*, *Nerium oleander* , Extrait aqueux, phytochimique, morphométrie et composition biochimique, biomarqueurs.



Abstract :

Natural extracts from plants contain a variety of biologically active molecules.

This work relates to the study of phytochemical tests and the toxic effect of aqueous extract of *Nerium Oleander* flowers on *Culiseta Longgiaolata*, a species of the most widespread mosquito in the Tébessa region. This extract was obtained by maceration in a POLAIR solvent (water).

The yield is :

Several aspects have been determined.

Phytochemical apparence : the plant of nerium oleander (flour rose) is riche in metabolite secondaires that contain flavonoids , tanins , saponines and alkaloids

Morphometric appearance: several morphometric parameters have been considered; The width of the thorax, the weight, of the 4 *culiseta longiareolata* larvae. The results show that Neruim Oleander affects these parameters during the period tested (24, 48 and 72 hors).

Biomarkers aspect : Aqueuse extract significantly increases the specific activity of Catalase with more marked effects at 24 hours. An induction of GST activity is also observed during the period studied (24, 48 and 72 hours).

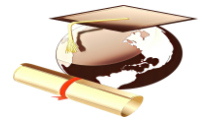
Biochemical aspect : was determined by the dosage of metabolic reserves in larvae 4 witnesses and treated at different times. The results show a decrease in these content after treatment.

Keywords : *Culiseta longiareolata*, *Nerium oleander*, aqueuse extract, phytochemical, morphometry and biochemical composition, biomarkers.



Introduction

Introduction



I. Introduction

Les moustiques (famille : *Culicidae*) sont au centre de la recherche entomologique mondiale en raison de leur importance en tant que vecteurs d'un large éventail de virus et de parasites débilissants animaux (**Korba et al., 2015**).

Elles ont le premier rôle dans la transmission des maladies comme : Dengue, la maladie à virus Zika et Fièvre à Virus West Nile qui représentent, aujourd'hui, les problèmes de santé les plus graves dans le monde. Avec des retombées énormes sur l'économie de nombreux pays et principalement les pays tropicaux (**Benhissen et al., 2018**).

Des campagnes de démoustication régulières sont menées contre ces insectes à la fois pour la réduction des nuisances au niveau des centres urbains et ruraux. L'efficacité de telles luttes, qu'elles soient chimiques ou biologiques, est tributaire de la connaissance de l'écologie de ces insectes (**Lounaci et al., 2014**).

En raison de leur grande répartition géographique, abondance ET nocivité, *Culex pipiens* L. et *Culiseta longiareolata* Macquart sont les deux espèces de moustiques les plus remarquables d'Algérie (**Tine-Djebbar et al., 2011**).

Culiseta longiareolata est une espèce cosmopolite et est impliquée dans la transmission du paludisme aviaire, arbovirus (**Khaligh et al., 2020**).

Le contrôle de cette insecte repose en grande partie sur l'application de quantités considérables d'insecticides chimiques rentables ET efficaces (**Ali et al., 2012**).

Cependant, leur utilisation massive et continue a provoqué divers inconvénients, comme les effets secondaires sur les organismes non visés et l'environnement avec les risques de contamination ou l'accumulation dans le sol, l'eau et les denrées récoltées, ainsi le développement de résistances ou encore les risques pour la santé des travailleurs agricoles (**Carlos, 2010**).

Pour assurer une meilleure intervention, tout en préservant au maximum le milieu naturel, de nouvelles méthodes préventives ainsi que de nouveaux produits sont constamment recherchés. Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie comme anti paludisme, bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent être aussi utilisées comme insecticides alternatif (**Benhissen et al., 2019**).

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides, est connue depuis longtemps. Ils sont les meilleurs alternatifs car ils ont moins d'impact sur l'environnement et biodégradable par opposition aux produits chimiques insecticides (**Gitaari et al., 2018**).

Ce travail propose donc d'étudier la screening phytochimique et les effets d'extrait aqueux d'une plante *Nerium oleander* à l'égard d'une espèce de moustique, *Culiseta longiareolata*, la plus répandue dans la région de Tébessa (**Tine-Djebbar et al., 2016**).

Introduction



Plusieurs aspects ont été déterminés :

1. Aspect phytochimique : Extraction par macération de *Nerium oleander* et connaître les composants de la plante grâce à screening phytochimique.
2. Aspect morphométrique des larves de quatrième stade, témoins et traitées avec une concentration sous létale (CL₂₅) et une concentration létale (CL₅₀) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures).
3. Aspect bio marqueurs de détoxification, les glutathions S-transférases (GSTs), et la catalase après traitement avec deux concentrations (CL₂₅ et CL₅₀).
4. . Aspect biochimique des larves quatrièmes stades, témoins et traitées (CL₂₅ et CL₅₀) de *Culiseta longiareolata* par la détermination du contenu en protéines, glucides et lipides au cours de différentes périodes (24, 48 et 72 heures).



Matériels et méthodes



Matériels et méthodes

II. Matériels et méthodes

II.1. Présentation de la région et les sites d'étude

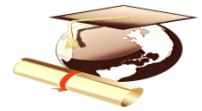
La région de Tébessa appartient à l'Atlas Saharien, chaîne montagneuse linéaire, qui s'étend en Algérie d'Ouest en Est, et se prolonge au-delà de la frontière sous le nom d'Atlas Tunisien (Figure 1) se situe dans le Nord-Est de l'Algérie, dans la wilaya (circonscription) de Tébessa, qui borde la frontière Tunisienne à l'Est. Cette Wilaya, Avec ces 13878 km² se rattache naturellement à l'immense étendue steppique du pays, elle est limitée au Nord par la wilaya de Souk-Ahras, à l'Ouest par les wilayas d'Oum El Bouaghi et Khenchela, au Sud par la wilaya d'El Oued et à l'Est, sur 300 Km de frontières avec la Tunisie (**Ruault-djerrab et al, 2012**)



Figure 01 : Situation géographique de la région de Tébessa (Google Maps).

Les stations sélectionnées pour la présente étude sont au nombre de 3 stations sont localisées au niveau de la commune de Tébessa et 3 stations sont réparties dans les communes : El Hammamet, Boulhef dyr, Tébessa ville (cité el wiam)

II.2. Présentation de la plante



II.2.1. La famille *Apocynaceae*

La famille des *Apocynaceae* ou *Apocynacées* est une famille de dicotylédones de l'ordredes Gentianales, se sont pour la plupart, des lianes ou des plantes herbacées, quelques arbres ou arbustes, à latex, à feuilles persistantes, des régions tempérées à tropicales (**Judde et al., 2002**).

II.2.2. Genre *Nerium*

Le genre *Nerium* regroupe dans le monde deux espèces :

- *Nerium oleander* L
- *Nerium indicum* Mill.

Il est parfois appelé Oléandre et plus rarement Rosage ou Nérion ou Lauraine. Le nom latin *Nerium* vient du grec nerion signifiant «humide», indiquant la prédilection de cette plante pour les zones humides (**Paris et Moyse, 1971**).

II.2.3. Espèce *Nerium oleander*

Le *Nerium oleander* L. ou Laurier rose appelée localement Défla est un arbuste appartenant à la famille des Apocynacée. Le nom latin *Nerium* vient du grec nerion signifiant «humide », indiquant la prédilection de cette plante pour les zones humides (**Paris. R.R. et col, 1971**). Et le nom spécifique *oleander* vient de l'italien de« oleandro » qui vient du latin « olea » qui désigne l'olivier faisant référence à la ressemblance des feuillages. (**Delille, 2007**).

II.2.4. Description botanique

La plante est constituée par les organes suivants :

Écorce : Brun grisâtre, relativement lisse (**Stursa, 2001**). Portant de longs rameaux dressés contenant un suc laiteux (**Maaoui, 2014**).

Les feuilles : longuement lancéolées sont opposées, coriaces et persistantes. Leur face inférieure, à forte nervure principale, est vert pâle. Glabres, a pétiole très court, réunies par trois ; nervure principale forte, nervures secondaires, très nombreuses, fines, parallèles et par paires (**Hamliche et al., 2013**).

Les fleurs : poussent en grappes à la fin de chaque branche ; ils sont blancs, roses à rouges, 2,5–5 cm de diamètre, avec une corolle frangée profondément à 5 lobes autour du tube central de la corolle (**Chaudhary et Prasad, 2014**).Floraison mai à octobre (**Maaoui, 2014**).

Fruit : comporte deux follicules allongés (8-16 x 0.5-1.5cm), soudés jusqu'au début de la déhiscence (**Hussain, 2004**).

Graine : duveteuse, est surmontée d'une aigrette sessile qui en facilite la diffusion (**Delille,2007**) supérieure (**Hamliche, 2013**

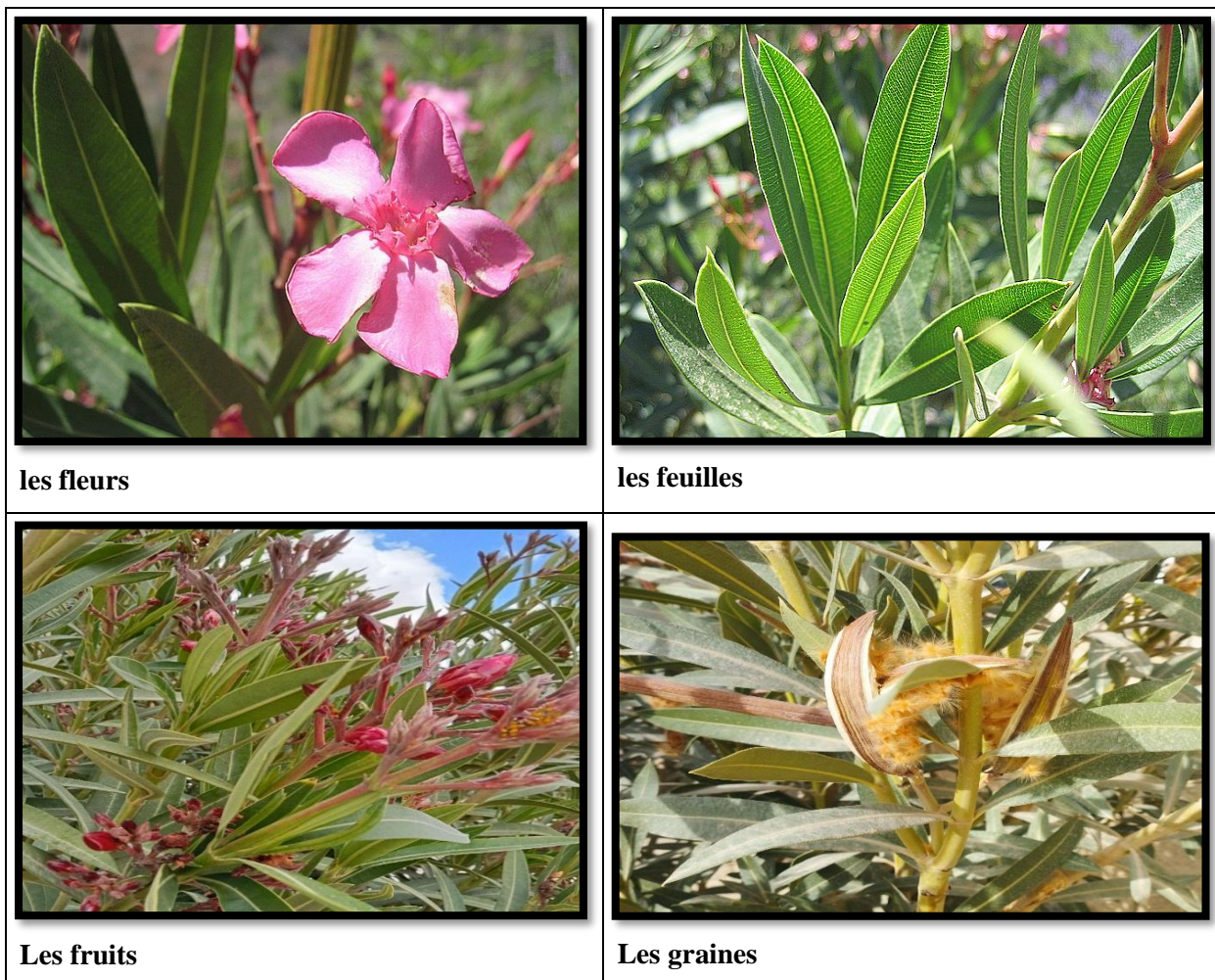
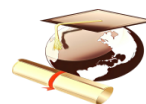


Figure 02 : Différentes parties de *N. oleander L.*

II.2.5 Origine et distribution

Originnaire du bassin méditerranéen, la plante est adaptée à la sécheresse et croît spontanément, dans toutes les régions tempérées du globe (*Hammiche et Maiza, 2006*). Originnaire de l'Asie du sud-est, l'espèce *Nerium indicum* Mill. (Syn: *Nerium odorum* Sol.), est une espèce d'Iran, de l'Inde, répandue de l'Arabie au Pakistan et à la Chine (*Paris et al, 1971*)

A. Dans le monde

Le laurier-rose est originaire d'Afrique du Nord où des buissons fleuris se retrouvent sur le parcours des oueds. Le *N. oleander* se répartit maintenant dans de nombreuses régions du globe au climat méditerranéen ou subtropical (Californie, Australie...) (*Ridings, 1976*).

B. En Algérie

En Algérie, sa présence est assez commune, surtout sur les alluvions et les terrains rocaillieux. Il avance le long des oueds dans le Sahara du Nord et se retrouve dans les montagnes du Tassili et du Hoggar (*Chopra, 1971*).



II.2.6. Taxonomie

Nerium oleander est la seule espèce actuellement classée dans le genre *Nerium* (Al- Obaidi, 2014).

Classification de *Nerium oleander* (Al- Obaidi, 2014).

| | |
|----------------|--------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Classe | Subphyllum–Angiospermes |
| Série | Eudicots |
| Ordre | Gentianales |
| Famille | Apocynaceae |
| Genre | <i>Nerium</i> |
| Espèce | <i>Oleander</i> |

II.2.7. La culture

Le laurier rose se trouve dans les régions méditerranéennes de l'Europe, de l'Asie et de l'Afrique, Il préfère :

- Le climat marin chaud et humide.
- Un sol à pH plutôt basique.
- Pas trop riche en non tolérant à la salinité et pauvre en Matière organique.

II.2.8. Utilisations

Le *Nerium oleander* est employé en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies et fait d'ailleurs partie de plusieurs pharmacopées locales (Almahy *et al.*, 2006). Des études récentes ont attribué à l'extrait de la plante, une activité effective contre certains types de cancers (Rashan, 2011).



Tableau 01 : Principales utilisations de *Nerium oleander* en médecine traditionnelle selon les pays (Adom et al, 2003).

| Parties utilisées | Pays | Indications | Mode d'emploi |
|------------------------------|---------------------|--|-------------------------------------|
| Feuilles fraîches ou séchées | Afrique de sud | Abortif | * |
| | Algérie | Nettoyage et assouplissement des pieds (peau) Contre les caries dentaires | Décoction |
| | Iran | Cardiotonique Diurétique | Infusion |
| | Maroc | Antidiabétique, abortif, démangeaison, mal de tête, anti gale, contre la chute des cheveux et l'eczéma | Décoction Infusion Macération |
| | Tanzanie Turquie | Antibactérien | Décoction |
| Différents Organs | Cuba | Médecine de folklore | * |
| | Inde Bangladesh | Antibactérien | * |

II.2.9. Composition chimique

Composition chimique de *Nerium oleander* : Les études phytochimiques effectuées sur le *N. oleander* ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires tels que les cardénolides, tritèrènes, prégnanes, flavonoïdes, coumarines et des dérivés stéroïdiques (Hanson, 1985). La plante accumule les hétérosides cardénolides dans tous les organes. Les feuilles renferment environ 1,5% de cardénolides, dont 0,1% d'oléandrine ou 3-o- α -Loléandrosyl-16- acétylgitoxigénine. Ces concentrations varient selon des considérations génétiques et environnementales. L'oléandrine est accompagné d'analogues stéroïdiques tel que : la gitoxigénine, adynérigénine, l'uzarigénine... (Bruneton, 1999).

Le composé majoritaire est l'oléandroside ou oléandrine dont la partie aglycone est la 16-acétylgitoxigénine (oleandrigénine) et la partie osidique l'oléandrose (désoxyméthyl-rhamnose). La concentration dans la plante est d'environ 0,08 % (Hammiche, 2013). Les graines renferment de l'oléandrine et des composés voisins : odorosides, adigoside, gluco-strospéside, etc. (Bruneton, 2001).



Tableau 2 : Constituants chimiques des différentes parties de *Nerium oleander*

| Parties utilisées | Les substances composées (référence) |
|--------------------|---|
| Racines | Cardénolides (Hanson, 1985) |
| Feuilles | Cardénolides (Hanson, 1985) Triterpènes (Hanson, 1985) |
| Déférentes Parties | Cardénolides (Hanson, 1985) Flavonoïdes (Hanson, 1985) Coumarines (Hanson, 1985) Phytostérols (Hanson, 1985) |

Les hétérosides du laurier rose sont des cardénolides. Le constituant majoritaire est l'oléandrine (3-0- α -L-oleandrosyl-16-acetylgitoxigénine). Mais elle contient aussi d'autres hétérosides cardiotoniques, comme l'oléandroside, l'oléandrose, l'oleandrigénine, la glucosyloleandrine, le gentiobiosyl oleandrine, le nerigoside, etc. (**Bruneton J, 2001**).

II.2.10. Toxicité de plante (*Nerium oleander*)

Le *Nerium* est une plante toxique par ingestion de ses différentes parties (feuilles, fleurs, tiges, etc.). Sa toxicité pour l'homme, les animaux et certains insectes a fait l'objet de plusieurs études (**Almahy et al., 2006**).

Toute la plante est toxique, le laurier rose est la troisième plante citée parmi celles incriminées dans les intoxications équine. Sur les deux cents substances toxiques répertoriées, le laurier rose a représenté 2,4% des appels reçus au Centre National d'Information Toxicologiques Vétérinaires (CNITV) en 2008 (**Rebelle, 2012**) Les mécanismes responsables de la toxicité des cardénolides du *laurier rose* sont identiques à ceux des glucosides de la digitale classique agissant principalement sur l'inhibition de l'activité Na-K ATPase membranaire et par l'élévation du calcium intracellulaire (**Bakalli, 2010**).

Le laurier rose ou *Nerium oleander* est un petit arbuste connu par ses risques de toxicité systémique en cas de prise par voie orale à cause de la présence d'hétérosides cardiotoniques dont le principal est l'oléandrine. Il a été utilisé rarement en thérapeutique ; c'est un poison violent qui a occasionné de nombreux cas d'empoisonnement. Cette plante appartient à la liste des substances chimiques capables de provoquer une brûlure cutanée lorsqu'elles sont absorbées par voie cutanée (**Stursa, 2001**).

La plante fraîche étant très amère et peu appétente, la contamination a lieu en général lors d'ingestion de foin contaminé, de tailles séchées déposées dans la prairie ou la consommation d'eau dans laquelle des feuilles ont macéré. Toutes les parties de la plante sont toxiques (tiges,



Matériels et méthodes

feuilles et fleurs) (Rebelle, 2012). La dose toxique est évaluée à 0.005% du poids vif de l'animal, soit environ 25g pour un animal de 500kg (Rebelle, 2012).

II.2.11. Effets de *Nerium oleander* (sur l'homme et l'animal)

Le laurier-rose est un arbuste dangereux toutes ses parties sont toxiques pouvant en cas d'ingestion provoquer des accidents graves. Les symptômes apparaissent plusieurs heures après l'ingestion d'une quantité toxique tels que les frissons, les diarrhées, les coliques. Une faiblesse générale, les maux de tête, engels pouls irréguliers, une grande agitation, des palpitations, des vertiges, des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements, l'inconscience, des selles sanguinolentes, une imitation gastro-intestinale avec des troubles respiratoires, ralentissement de la fonction respiratoire et irrégularité cardiaque. Certaines des personnes intoxiquées sont mortes Le suc laiteux contenu dans les tiges peut provoquer chez certaines personnes des dermatites de contact. Il est fortement déconseillé de dormir à l'ombre du laurier-rose cela peut provoquer l'apparition de courbatures, sueurs froides et vertiges (DELILLE, 2007).

II.2.12. Propriétés pharmacologiques auget

Cette plante a des propriétés antimicrobiennes (EISawi *et al.*, 2010), antifongique (Siddiqui *et al.*, 2016), insecticides (Bagari *et al.*, 2013) et une activité antioxydante (Mohadjerani, 2012).

- Activité insecticide

Le spectre aux rayons UV, montre que le *Nerium* contient des acides phénoliques, des flavonoïdes et des tanins

N. oleander est utilisé d'une manière traditionnelle sous forme de boutures par les agriculteurs dans la région de Constantine pour limiter les dégâts des vers blancs (Madaci *et al.*, 2008).

- Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de plantes a été étudiée contre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* et *Streptococcus mutans*. Selon les résultats, l'extrait méthanolique était plus efficace que le chloroforme ou l'hexane (Chauhan *et al.*, 2013).

- Activité fongique

L'extrait méthanolique de *N. oleander* avec différentes concentrations (0,3-0,9%) montre une activité antifongique contre plusieurs champignons avec une capacité d'inhibition qui varie entre 8,7- % et 90,3% (Hadizadeh, 2009).

- Activité hépatoprotectrice et antioxydante

Matériels et méthodes



Nerium oleander possède une activité hépatoprotectrice et antioxydante de l'extrait méthanolique de fleurs de *Nerium oleander* contre les lésions hépatiques induites par CCl₄ chez le rat (Singhal et Gupta., 2012).

- Activité anti-inflammatoire

Une activité anti-inflammatoire et anti nociceptive *in vivo* à partir des extraits éthanoliques de fleurs séchées et fraîches de *N. oleander* contre le modèle d'œdème de la patte arrière induit par le carraghénane chez la souris sans induire de dommages gastriques (Nurgun *et al.*, 2003)

II.3. Présentation de l'insecte

II.3.1. Généralité sur Culicidés

Le moustique est le nom commun des insectes de la famille des Culicidés qui forme le sous ordre des nématocères dans l'ordre des diptères. Leur corps est élancé et ils possèdent de longues antennes à plus de six articles. Leurs pattes sont fines et longues. Seules les femelles sont hématophages. Lebenser peuplement Culicidien de l'Afrique méditerranéenne et composé de 67 espèces appartenant à deux sous-familles et à 7 genres). La famille des *Culicidae* se divise en trois sous-familles, les *Toxorhynchitinae*, les *Anophelinae* et les *Culicinae*. Environ 3500 espèces des *Culicidae* sont connues dans le monde. En Algérie seules les deux sous-familles *Culicinae* et *Anophelinae* sont représentées (Tahraoui, 2012).

II.3.2. Définition du *Culiseta longiareolata*

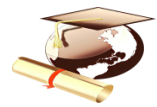
Culiseta longiareolata est une espèce de la famille *Culicidae*, la sous-famille des *Culicinae* et un vecteur aviaire paludisme, tularémie et arbovirus tels que Fièvre du Nil occidental Tismultivoltine, thermophile, et les espèces *ornithophiles* sont réparties en Europe, en Asie, et en Afrique, ainsi qu'en Méditerranée. Ilpse développe principalement dans les petits plans d'eau, et les adultes peuvent entrer dans les maisons et attaquer les humains, bien que leur les hôtes principaux sont les oiseaux. Ces espèces de moustiques sont facilement distinguée des autres espèces de *Culiseta longiareolata*, et ses caractères morphologiques incluent des rayures blanches et des points sur les jambes, la tête et le thorax (Khaligh *et al.*, 2020)



Figure 03 : L'adulte de *Culiseta longiareolata* .

II.3.3. Taxonomie

Matériels et méthodes



La classification a été proposée par (Aitken, 1954).comme suit :

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



II.3.4. Cycle de vie

La vie des moustiques passe par deux phases :

- une phase aquatique (pré-imaginale) : période de croissance par mues (de l'œuf à la nymphe passant par quatre stades larvaires). Cette phase se déroule en 5 à 90 jours en fonction des conditions environnementales (température, présence de nourriture, ...) ;
- une phase aérienne (imaginale) : période de reproduction sans croissance (imago). La phase aérienne dure de 2 à 3 semaines pour les mâles et d' 1 mois à 6 mois pour les femelles hivernantes. Sa durée dépend des conditions environnementales et de l'espèce.

Comme ils vivent en milieu aquatique avant d'atteindre la maturité, tous les moustiques ont besoin d'eau pour se développer (**Anonyme, 2013**)

a) Accouplement

L'accouplement des moustiques a lieu en vol ou dans la végétation. Les femelles gardent le sperme du mâle dans leur spermathèque, une petite poche située dans l'appareil génital. Une fois fécondées, elles partent en quête d'un repas de sang. Après avoir absorbé du sang, les femelles se posent dans un endroit abrité pour digérer leur repas (**Delaunay et al, 2001**).

b) Ponte

Selon **Balenghien (2007)**, les œufs peuvent être déposés sur de la vase ou autre support humide, susceptible d'être submergé. Par la suite, ils éclosent de manière synchrone suite à leur mise en eau (cas chez les *Aedes*), ou directement à la surface de l'eau (cas des autres genres de moustiques : *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*). Le nombre d'œufs par ponte varie en fonction des espèces et de la quantité de sang absorbée.

c) Développement larvaire et nymphose

L'éclosion des œufs libère dans le gîte des larves. Après quatre mues et ayant atteint leur développement maximal, les larves cessent de s'alimenter et se transforment en nymphes. La durée de ce stade varie de 3 jours à plusieurs mois pour les espèces dont la larve est le stade hivernant ; certaines larves survivent dans des eaux gelées, figées dans la glace (**ha, 2013**).

d) Mue imaginale:

Les nymphes donnent naissance à des imagos après quelques jours (1 à 2 jours dans les conditions optimales). Les formes adultes (imagos) émergent à l'air libre en fendant l'enveloppe nymphale (exuvie) qui, leur sert de flotteur pour déplier leurs ailes avant de s'envoler.

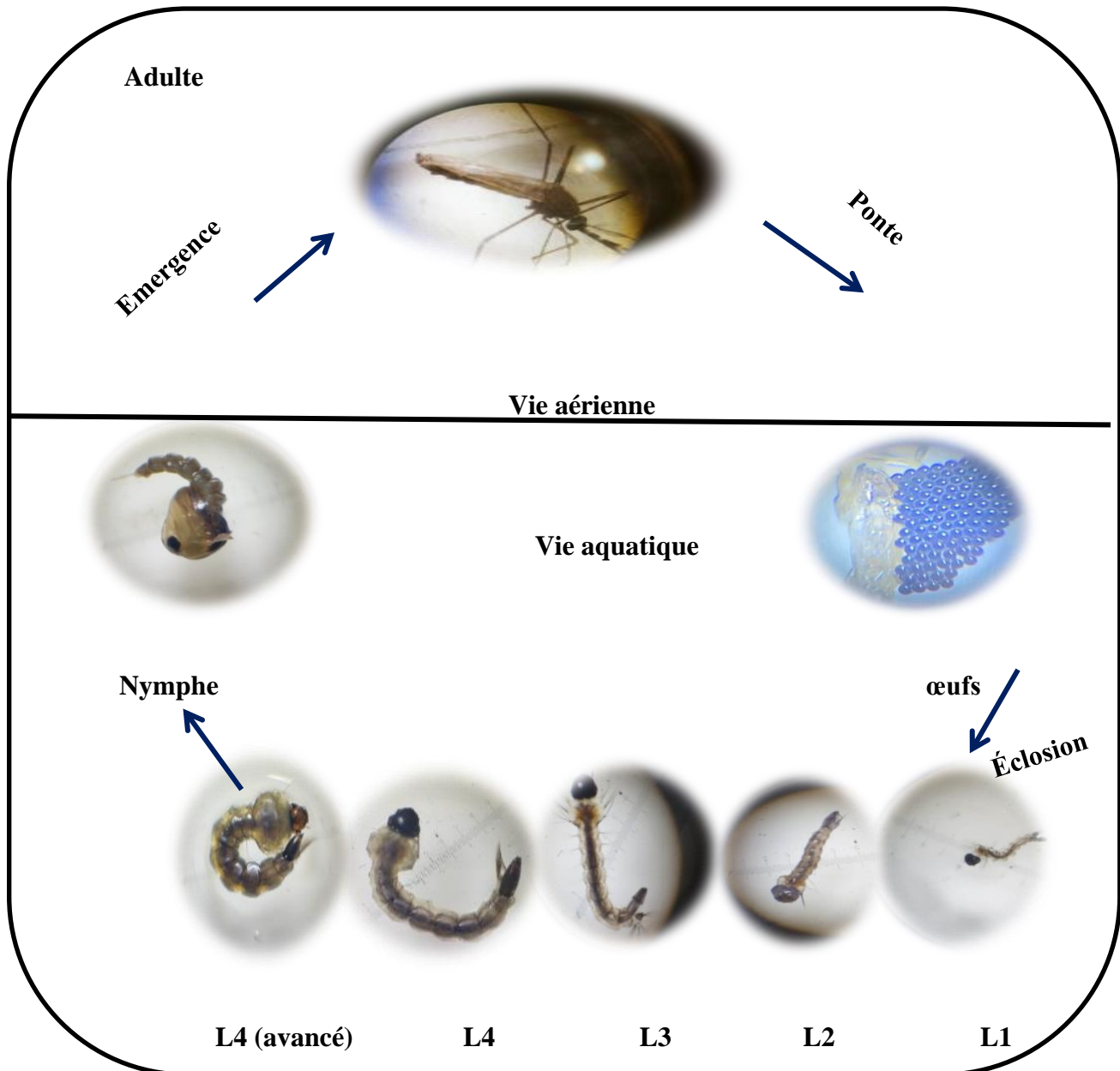


Figure 04 : Présente le cycle de développement de *Culiseta longiareolata*

II.3.5. Maladies transmises par les moustiques

Les piqûres de moustiques affectent la santé des humains et des animaux plus que tout autre arthropode nuisible dans le monde. Les maladies transmises par les moustiques sont transmises à l'homme par la piqûre d'un moustique infecté par un parasite comme dans le cas du paludisme ou par un virus comme dans le cas de la dengue, de la fièvre jaune, du chikungunya, du virus du Nil occidental, du virus Zika, Etc. En outre, les moustiques peuvent non seulement transmettre des maladies qui affligent les humains, mais aussi transmettre des pathogènes graves auxquels les chiens et les chevaux sont sensibles, tels que le ver de coeur de chien, l'encéphalite équine orientale et l'encéphalite équine occidentale (Rueda, 2020).



Matériels et méthodes

II.4. Méthode de collecte de matériel animale

La méthode de collecte utilisée est celle du Dippings ou trempage (**Papierok et al., 1975**). Elle consiste à prélever l'eau du gîte à l'aide d'une louche ou d'un petit récipient, nous avons plongé la louche rapidement dans l'eau plusieurs fois en diversifiant les points de prélèvement, le contenu de la louche a été versé à chaque fois dans un bac en plastique. La collecte des œufs et des larves de *Culiseta longiareolata* a été faite au niveau des régions : d'El Hammamet et Boulhef Edyr et cité el Wiem. Les spécimens collectés ont été transportés au laboratoire pour l'identification des espèces ; Les larves ont été séparées des Nymphes à l'aide d'une pipette compte-goutte et conservés dans des gobelets étiquetés contenant l'eau à une température ambiante et nourries avec du mélange préparé par 75% biscuit et de 25% levure.



Figure 05 : Les sites de prélèvement

II.5. Récolte et préparation de matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude était constitué de la partie florale de la plante de *Nerium oléandre* (les fleurs). Les fleurs du *Nerium oléandre* ont été récoltées en novembre 2022 dans la région de Tébessa. La récolte a été réalisée dans des meilleures conditions possibles durant le matin (entre 10h et 13h). À l'aide d'un sécateur on a prélevé des fleurs de

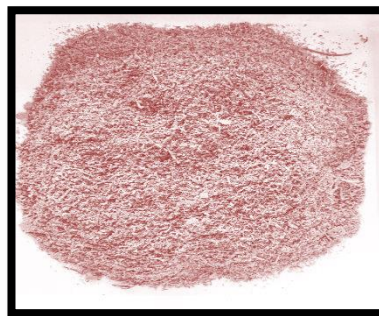


Nerium oleandre d'une manière aléatoire, les mettre dans des sachets, et les conservées à l'abri de la lumière.



Figure 06 : *Nerium oléandre*

- **Séchage :** Le matériel végétal qui a été représenté par des fleurs de *Nerium oleander*, a été séchée à l'ombre et à température ambiante pendant quelques jours, pour préserver le maximum d'intégrité des molécules.
- **Broyage :** Après le séchage, les fleurs séchées ont été broyées dans un mixeur Électrique afin d'obtenir une poudre très fine qui va servir à l'extraction.
- **Tamissage :** La poudre obtenue par le broyage a été tamisée à l'aide d'un tamis pour obtenir



une poudre très fine

Figure 07 : Fleurs de la plante *Nerium oleander* après broyage et tamissage.

II.6. Extraction par macération à partir des fleurs de *Nerium oleander*

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante (**Lagnika, 2005**).

L'extrait aqueux de plante a été préparé à partir de 50g de la poudre végétale (des fleurs de *Nerium oleander*) a été mise à une extraction par macération avec 500ml d'eau distillée, pendant 24H à température ambiante (environ 20°C), l'ensemble est filtré sur du papier filtre afin de séparer. Le solvant est récupéré du filtrat par évaporation dans un évaporateur rotatif, à une température de 55°C. L'extrait sec obtenu était utilisé pour les tests biologiques. Finalement la quantité de l'extrait obtenu est pesée dans une balance pour le calcul du rendement. Le rendement (Rdt) en extrait sec de la plante est déterminé en calculant le rapport



Matériels et méthodes

Suivant (Hadri, 2015)

$$\text{Rdt \%} = [(P1-P2)/P3] \times 100$$

- P1 : poids du ballon après évaporation.
- P2 : poids du ballon avant évaporation
- P3 : poids de la matière végétale de départ

L'extrait de *N. oleander* a été préservé dans un flacon sombre pour éviter toute dégradation des molécules par la lumière. Il est ensuite conservé dans le congélateur pour une utilisation ultérieure.

II.7. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est une technique qui permet d'identifier les composés chimiques présents dans une plante.

Le screening phytochimique ne renseigne pas sur la structure d'une molécule bien déterminée. Il comporte des tests qualitatifs qui permettent de caractériser les différents groupes chimiques contenus dans une matière végétale. Il y a lieu de vérifier la présence des métabolites secondaires (*saponosides, alcaloïdes, flavonoïdes, tanins*, composés réducteurs et autres). Les résultats sont évalués comme suit : + : positif ; - : Négatif ; ND : non déterminé.

II.7.1. Recherche des *flavonoïdes* et des *leucoanthocyanes*

En présence d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1N, de l'acide chlorhydrique (HCl) concentré et des copeaux de Magnésium (Mg), les flavonoïdes donnent les réactions de coloration caractéristique. La même réaction effectuée au bain marie en absence de copeaux de Magnésium, l'apparition de la coloration rouge confirme la présence des *leucoanthocyanes*.

Mode opératoire

- 5 g de matériel végétal placés dans un Erlenmeyer sont infusés dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 minutes.

- Après filtration, prélever 6 ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2 ml par tube.

- Additionner respectivement à l'infusé contenu dans les 3 tubes à essai, 1 ml de NaOH, 1 ml d'eau distillée et 1 ml de HCl concentré et de copeaux de Magnésium. En présence des flavonoïdes, les colorations suivantes : rouge, jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu, jaune et rose peuvent être observées.

Ces couleurs correspondent respectivement aux anthocyanes, *flavones, flavonols, flavonones, isoflavones* et *leucoanthocyanes*.



Matériels et méthodes

II.7.2. Recherches des quinones

En présence de NaOH à 10 %, les solutions des quinones présentent une coloration caractéristique virant du rouge au violet.

Mode opératoire

- 5 g de matériel végétal et les humecter de quelques gouttes de HCl.
- Mettre à macération ce matériel végétal pendant une heure ou 24 heures dans un Erlen Meyer fermé et contenant 10 ml d'éther de pétrole.
- Après filtration, 2 ml de filtrat sont agités avec 2 ml de NaOH à 10 %. La coloration rouge virant au violet apparaît en présence des quinones.

II.7.3. Recherche de saponines

Par agitation, une mousse persistante dont la hauteur est mesurable apparaît dans les solutions de saponines.

Mode opératoire

- 5 g de matériel végétal trituré sont mis dans un Erlen Meyer dans lequel on y ajoute 50 ml d'eau distillée pour réaliser une décoction pendant 30 minutes.
- Après refroidissement, filtrer et prélever 5 ml du décocté et les introduire dans un tube à essai de 16 mm de diamètre et 160 mm de hauteur après agitation. L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines. Cependant, en cas d'une faible mousse, le décocté est testé avec un mélange à volume égal d'acide sulfurique (H_2SO_4) 1N et chrome de potassium (K_2CrO_3) à 10 %

II.7.4. Recherche des tanins

En présence de Chlorure ferrique à 1% ; les extraits aqueux tanniques donnent des colorations bleu-vert, bleu-sombre et verte ou des précipités.

Mode opératoire :

- 5 g de matériel végétal sont infusés dans 50 ml d'eau bouillante contenue dans un Erlen Meyer pendant 30 minutes.
 - 2 ml de l'infusé sont prélevés et mis dans un tube à essai dans lequel on ajoute quelques gouttes de chlorure ferrique à 1%.
- L'apparition d'une coloration ou la formation d'un précipité indique la présence des tanins catéchiques.
- Prendre encore 2 ml de l'infusé et les placer dans un tube à essai saturé en acétate de sodium et y ajouter quelques gouttes de $FeCl_3$. La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.



Matériels et méthodes

II.7.5. Recherche des terpenoïdes et des stéroïdes

En présence de l'acide acétique anhydre et de l'acide sulfurique concentré (réactif de LIEBERMAN-BURCHARD), l'extrait organique étheré contenant les stéroïdes donne des colorations mauves et vertes. L'identification des terpenoïdes suit le même schéma en plus de l'ajout du réactif de Hirschson (acide trichloracétique). La couleur jaune virant au rouge indique la présence de terpenoïdes.

Mode opératoire

- Prendre 1g de matériel végétal qu'on met à macération pendant 24 heures dans l'éther de pétrole ou dans le benzène.
- Après filtration et introduction dans un Erlen Meyer de 100 ml, le solvant est évaporé au bain de sable.
- Le résidu est récupéré par 1 ml de chloroforme, 1 ml d'anhydride acétique et 3 gouttes d'acide sulfurique concentré. Il se produit une coloration violette devenant progressivement verte. La coloration verte se stabilise au bout de 30 minutes et indique la présence des stéroïdes. Par ailleurs, 2 ml de la solution acidifiée sont traités par quelques gouttes de réactif de HIRSCHSON. L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des *terpenoïdes*.

II.7.6. Recherche des alcaloïdes

La mise en évidence des alcaloïdes consiste à les précipiter à l'aide de six réactifs de précipitation à savoir : - réactif de Dragendorff, - réactif de Mayer, - réactif de Hager, - réactif de Bertrand, -réactif de Wagner et -le réactif de Sonnenschein.

Mode opératoire :

- 1 g de poudre de matière végétale sèche a été soumis à une macération dans 10 ml de méthanol à la température ambiante pendant 24 heures, puis à l'étuve à 50 °C pendant 4 heures.
- La solution obtenue est filtrée, lavée avec des portions de méthanol chaud. Ensuite, on évapore à sec la solution obtenue à l'étuve à 50°C. Le résidu est recueilli deux fois par 2 ml de solution chaude d'acide chlorhydrique 1% et est filtré.
- La solution acide obtenue est basifiée par l'ammoniaque concentrée dans une ampoule à décanter. On y ajoute 15 ml de Chloroforme qui sera évaporé à sec à l'air libre et le résidu obtenu, est repris par 0,5 ml de HCl 1% et agiter.
- Ainsi, les alcaloïdes ayant été protonés sont supposés être passés en phases aqueuses. La phase aqueuse au-dessus est prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur. Six gouttes sont déposées sur une lame porte-objet.

II.8. Etude morphométrique



Matériels et méthodes

L'étude morphométrique est basée sur deux paramètres le poids des individus, la largeur du thorax des larves du quatrième stade témoins et traitées de l'espèce de *C. longiareolata* Après (24h ;48h ;72h). L'étude est conduite avec 4 répétitions comportant chacune 10 individus vivante mesurée leur poids (mg). Les mesurations ont été réalisées sous une loupe binoculaire à l'aide d'un micromètre oculaire.



Figure 08 : les étapes des études morphométriques

II.9. Dosage des biomarqueurs

Les larves du quatrième stade (L4) des séries témoins et traitées aux extrait aqueux (CL₂₅=3.32 et CL₅₀=11) ont fait l'objet d'un dosage de des glutathion S-transférases (GST) et de la catalase à différentes périodes après traitement : 24, 48 et 72 heures. Par ailleurs, le contenu en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminé, afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques et le taux du glutathion et la catalase.

II.9.1. Dosage des glutathion S-transférases

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques, impliquées dans diverses opérations de transports et de biosynthèse intracellulaire. Les GSTs, jouent un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques ; elles catalysent souvent la conjugaison des molécules électrophiles avec le glutathion réduit (GSH). Les produits sont ensuite métabolisés en acide mercapturique et excrétés au niveau de la bile et des urines (**Habig et al., 1974**).

Les larves du quatrième stade (L4) de *Culiseta longiareolata* témoins et traitées à la CL₂₅ et la CL₅₀, sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures), pesées puis broyées dans 1 ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 6). L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec une série témoin. L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (1400 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité des GSTs

Le dosage est réalisé selon la méthode de (**Habig et al, 1974**), il consiste à faire réagir 200µl

les larves pesées du 4^{ème} stade témoins et
traitées de *culiseta longiareolata*

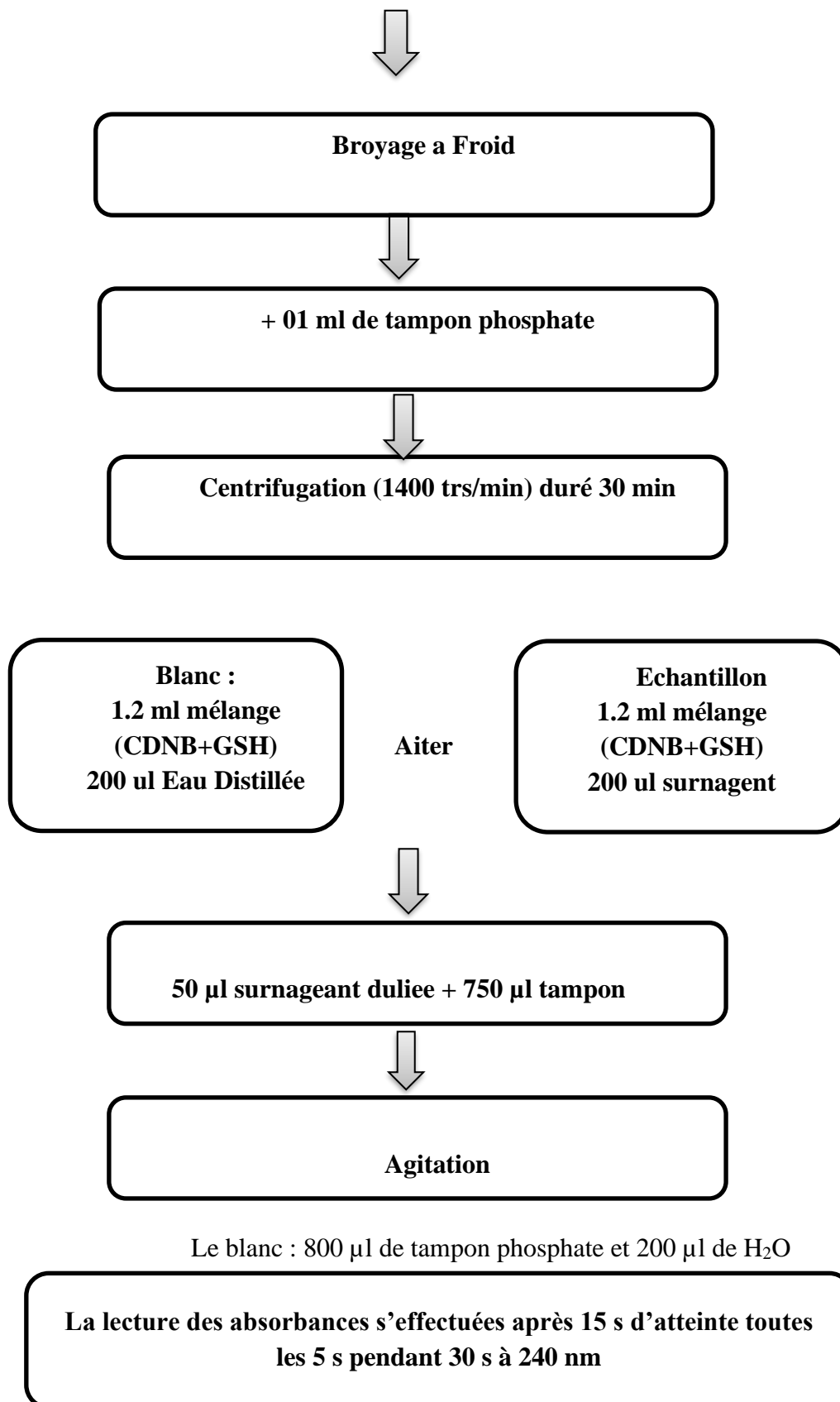


Figure 09 : Extraction et dosage des glutathion S-transférases (**Habig et al, 1974**).

de 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)]. La lecture des absorbances



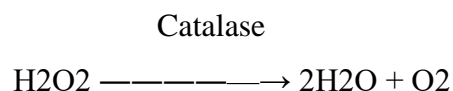
Matériels et méthodes

est effectuée toutes les 1 mn 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.

Figure 09 : Extraction et dosage des glutathion S-transférases (**Habig et al, 1974**).

II.9.2. Dosage de la catalase

Le dosage de la catalase (CAT) est réalisé selon la technique de **Claiborne (1985)**. Cette technique est basée sur la mesure spectrophotométrique de la réduction de l'eau oxygénée (H₂O₂) en une molécule d'oxygène (O₂) et deux molécules d'eau (H₂O) en présence de la CAT à une longueur d'onde UV de 240 nm, selon la réaction suivante :



Les larves du quatrième stade témoins et traitées de *Culiseta longiareolata*, et sont prélevées à différentes périodes (24, 48, 72 et 96 heures), l'essai est conduit avec 3 répétitions comportant 20 individus. Les larves sont homogénéisées dans 1ml de tampon phosphate (100 Mm, pH 7,4), puis centrifugées à 15000 trs/mn, pendant 10 mn. Le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage de l'activité de la catalase s'effectue dans une cuve de spectrophotomètre en quartz à 250C, sur une fraction aliquote de 50 µl du surnageant dilué de façon à se situer entre 1 et 1,5 mg de protéines/ml, soit 0,05 à 0,75 mg dans la cuve, à laquelle on ajoute 750 µl de tampon phosphate (100 Mm, pH 7,4). Après agitation, la lecture est effectuée au spectrophotomètre. L'activité décroît rapidement, il est donc important de mettre toujours le même temps entre le pipetage du surnageant et le moment où on place la cuve dans le spectrophotomètre.

La lecture des absorbances s'effectue après 15 secondes d'attente toutes les 5 secondes pendant 30 secondes à une longueur d'onde de 240nm contre un blanc avec 800 µl de tampon phosphate (100Mm, pH 7,4), et 200 µl de H₂O₂.

L'activité spécifique est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{DO_{max} - DO_{min}}{0,04} \text{ mg de protéines}$$

X : micromole de substrat réduit par minute et par mg de protéines (µM/mn/mg de protéines).

DO max : densité optique maximum obtenue.

DO min : densité optique minimum obtenue.

0,04 : coefficient d'extinction molaire du H₂O₂ (cm-1 .mM-1).

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

II.10. Dosage des composants biochimiques

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon le procédé de (**Shibko et al., 1966**), Les échantillons (larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata*) sont placés dans



Matériels et méthodes

des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de **Duchateau & Florkin, (1959)**. Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (**Goldworthy et al., 1972**) et le culot II, dissout dans de la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon **Bradford, (1976)**.

II.10.1. Dosage de protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de **Bradford (1976)** dans une fraction aliquote de 100 μ l à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G 250 (Merck). Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. 5L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (BSA) titrant 1 mg/ml.

Tableau 03 : Dosage des protéines totales chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage :

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|-----|----|----|----|----|-----|
| Solution standard d'albumine (μ l) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (μ l) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif BBC (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Quantité d'albumine (μ g) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |

II.10.2 Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de **Goldsworthy et al., (1972)** en utilisant le réactif sulfo-phosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 μ l des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles on évapore totalement le solvant puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré, les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, on prend 200 μ l de ce mélange au quel on ajoute 2,5 ml de réactif sulfo-phosphovanillinique. Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide ortho phosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide ortho phosphorique, des complexes roses. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V)



Tableau 04 : Dosage des lipides totaux chez les moustiques : Réalisation de la gamme d'étalonnage

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--------------------------------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| Solution mère de lipides (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Quantité de lipides (µg) | 0 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 |

II.10.3. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de **Duchateau & Florkin (1959)**. Cette méthode consiste à additionner 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min, une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon, la lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml).

Tableau 05 : Dosage des glucides totaux chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.

| Tube | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-------------------------------|-----|----|----|----|----|-----|
| Solution mère de glucose (µl) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |
| Eau distillée (µl) | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 0 |
| Réactif d'anthrone (ml) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Quantité de glucose (µg) | 0 | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 |

Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel SPSS (version 20) et GRAPH PAD PRISM 7. Les résultats obtenus ont été exprimés par la moyenne ± l'écart-type (SD). Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage dont l'équation de la droite de régression exprime l'absorbance en fonction de la quantité du standard utilisé (albumine, glucose et l'huile de tournesol). Le test t de Student et l'analyse de la variance à un et deux critères de classification, ont été utilisés.

Insecte (corps entier)

Broyage (Homogénéiser à ultrasons)

Centrifugation (5000 trs/min, 10min)

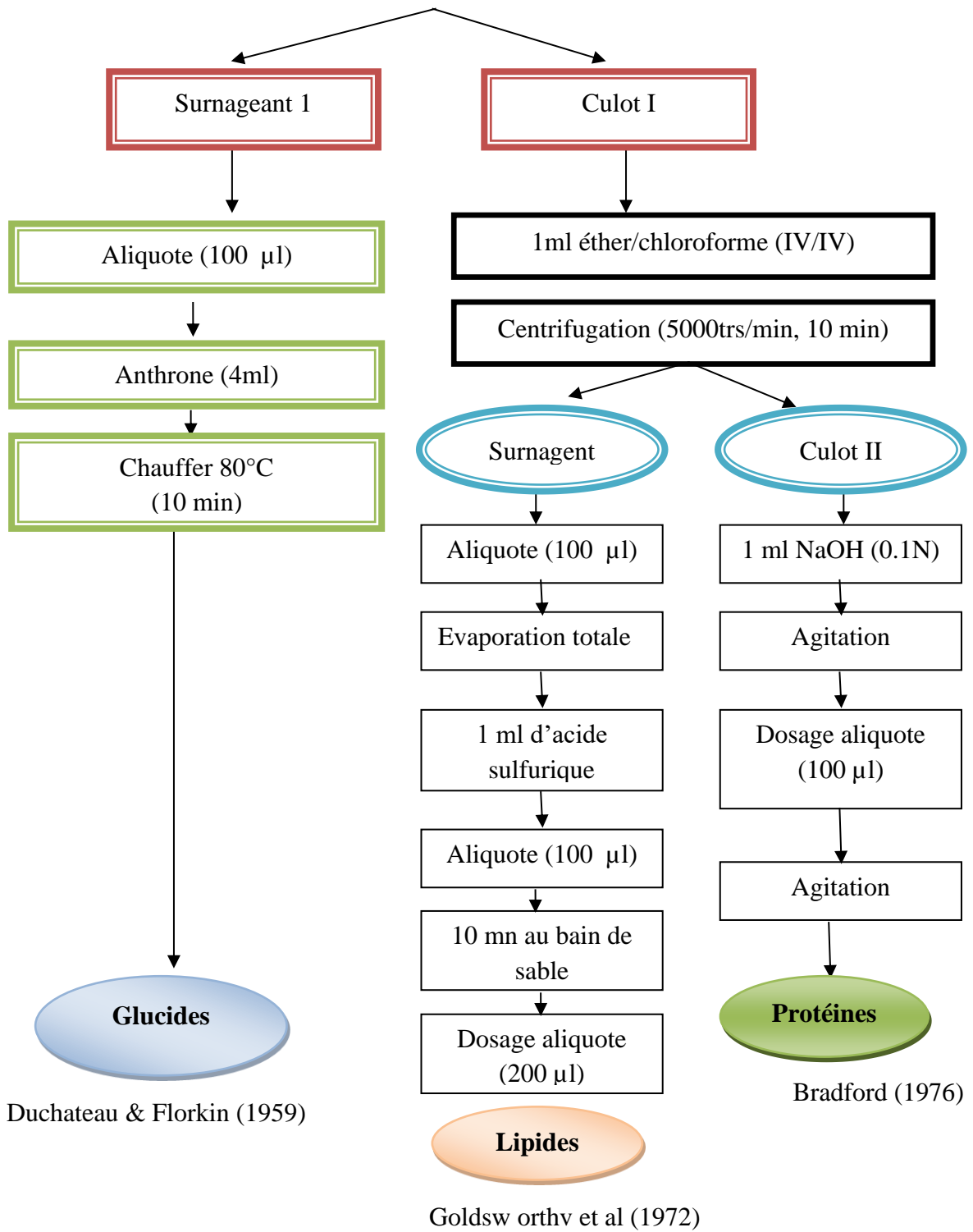


Figure 10 : dosage des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko et al.,1967).



Résultats et discussions



III. Résultat

III.1. Rendement de l'extraction

Le rendement d'extrait est défini comme étant le rapport de la quantité de la matière végétale utilisée.

Tableau 06 : Le rendement d'extraction de la plante *Nerium oleander*

| Espèce | Matière sèche (g) | Rendement de l'extrait |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| <i>Nerium oleander</i> | 50 | 13.6% |

III.2. Screening phytochimique de *N.oleander*

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existants au niveau de la partie aérienne (fleur), de *N.oleander* sur le plan qualitatif. Cette détection est basée sur des réactions de précipitation et de coloration. Les résultats sont présentés dans le **tableau 08**. Le dépistage phytochimique a révélé la présence de flavonoïde, (leucoanthocyane), de tanin catéchique, de quouine de saponine et de stéroïde de tanin gallique, d'alcaloïde e et Terpène et l'absence d'anthrocyanine

Tableau 07 : Analyse qualitative de composition phytochimique de *N.oleander*

| Compositions phytochimiques | Résultats |
|--------------------------------------|-----------|
| Les flavonoïdes : leucoanthocyane | + |
| Les quinones | - |
| Les tanins | + |
| Les saponines | + |
| Les terpènes | - |
| Les stéroïdes | + |
| Les alcaloïdes | + |
| Les anthocyanines | - |



III.3. Effet d'extrait aqueux de *Nerium oleander* sur la croissance de *Culiseta longiareolata*

III.3.1. Croissance pondérale

L'effet d'extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) a été testé sur les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Culiseta longiareolata*.

Les résultats de l'évolution du poids corporel des individus au cours du quatrième stade larvaire étudié sont mentionnés dans le tableau (08) et la figure (11). Pour les séries témoins et traitée à la CL₅₀ on remarque une augmentation significative du poids corporel du 24 h jusqu'à 72h.

La comparaison des moyennes entre les séries témoins et traitées montre que l'extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) affectent le poids corporel des larves L4 d'une manière significative à 24 h (p= 0,029 ; p=0,021), 48 h (p= 0,027 ; p=0,022) et 72 h (p= 0,036 ; p=0,03) avec les deux concentrations respectivement.

Tableau 08 : Extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur le poids (mg) des larves du quatrième stade chez *Culiseta longiareolata* (m ± SD, n = 4 répétitions comportant chacune 10 individus). Comparaison des moyennes à différents stades pour une même série (lettres majuscules) et pour un même stade entre les différentes séries (lettres minuscules).

| Temps (heures) | Témoins | CL ₂₅ | CL ₅₀ |
|----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 24 | 33,10 ± 2,12 a A | 30,36 ± 2,95 b A | 26,57 ± 4,99 c A |
| 48 | 36,26 ± 3,76 a B | 33,71 ± 3,92 b B | 29,21 ± 4,11 c B |
| 72 | 37,55 ± 4,72 a C | 34,99 ± 4,12 b C | 31,28 ± 3,25 c C |

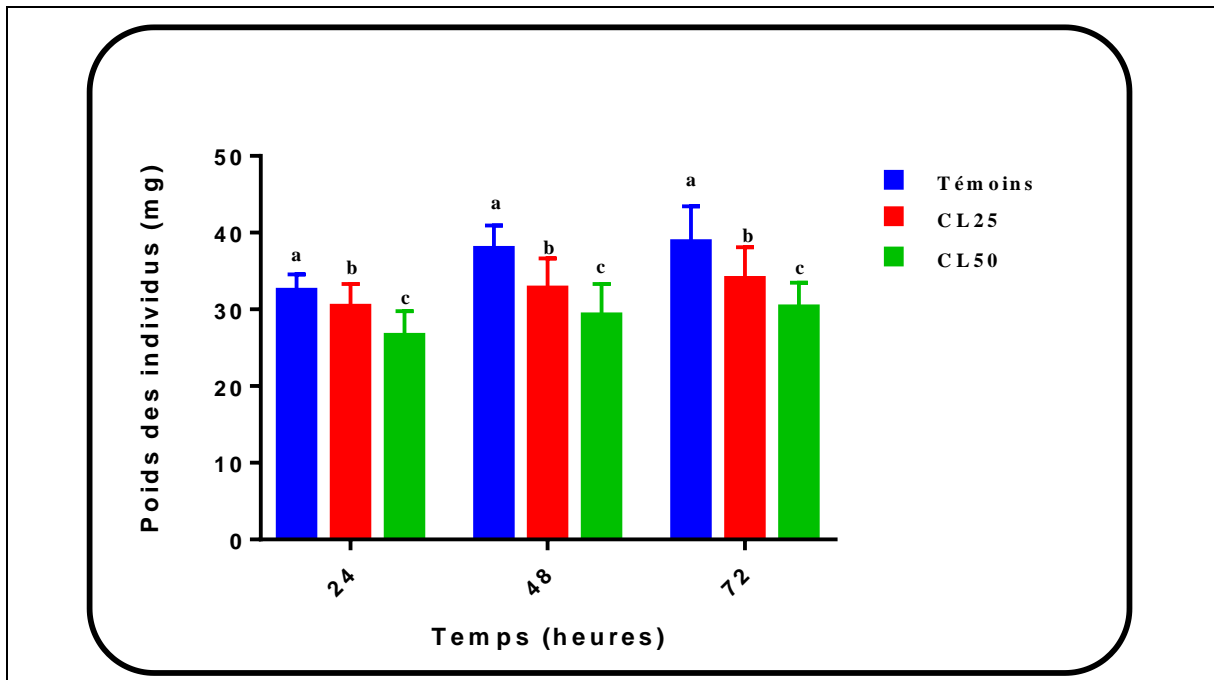


Figure 11 : Effet l'Extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur le poids (mg) des larves du 4^{ème} stades chez *Culiseta longiareolata* ($m \pm SD$, n = 4)

III.3.2. Croissance linéaire

L'effet d'aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) a été évalué sur certains paramètres morphométriques : la largeur du thorax des larves 4 et le volume corporel (V) des individus témoins et traités.

Les résultats de l'évolution de la largeur du thorax des individus du *Culiseta longiareolata* au cours du quatrième stade larvaire étudiés sont mentionnés dans le tableau (09) et la figure (12), les résultats montre une augmentation significative pour la séries témoin ($p=0,035$) et une augmentation hautement significative pour les séries traitées ($p= 0,019$ et $p=0,017$) pour l'extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) respectivement.

La comparaison des moyennes entre les séries témoins et traitées montre que l'extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) affecte la largeur du thorax des larves L4 d'une manière de significative avec CL₂₅ à 24 h et 48 h ($p=0,000$), et 72 h ($p=0,002 ; 0,000$) pour la CL₂₅ et CL₅₀ respectivement



Tableau 09 : Effet Extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur la largeur du thorax (mm) des larves du quatrième stade chez *Culiseta longiareolata* (m ± SD, n = 4 répétitions comportant chacune 10 individus). Comparaison des moyennes à différents stades pour une même série (lettres majuscules) et pour un même stade entre les différentes séries (lettres minuscules)

| Temps (heures) | Témoins | CL 25 | CL 50 |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 24 | 2,63 ± 0,044 a A | 2,55 ± 0,025 b A | 2,38 ± 0,015 c A |
| 48 | 2,72 ± 0,033 a B | 2,64 ± 0,015 b B | 2,42 ± 0,020 c B |
| 72 | 2,75 ± 0,014 a C | 2,68 ± 0,045 b C | 2,47 ± 0,018 c C |

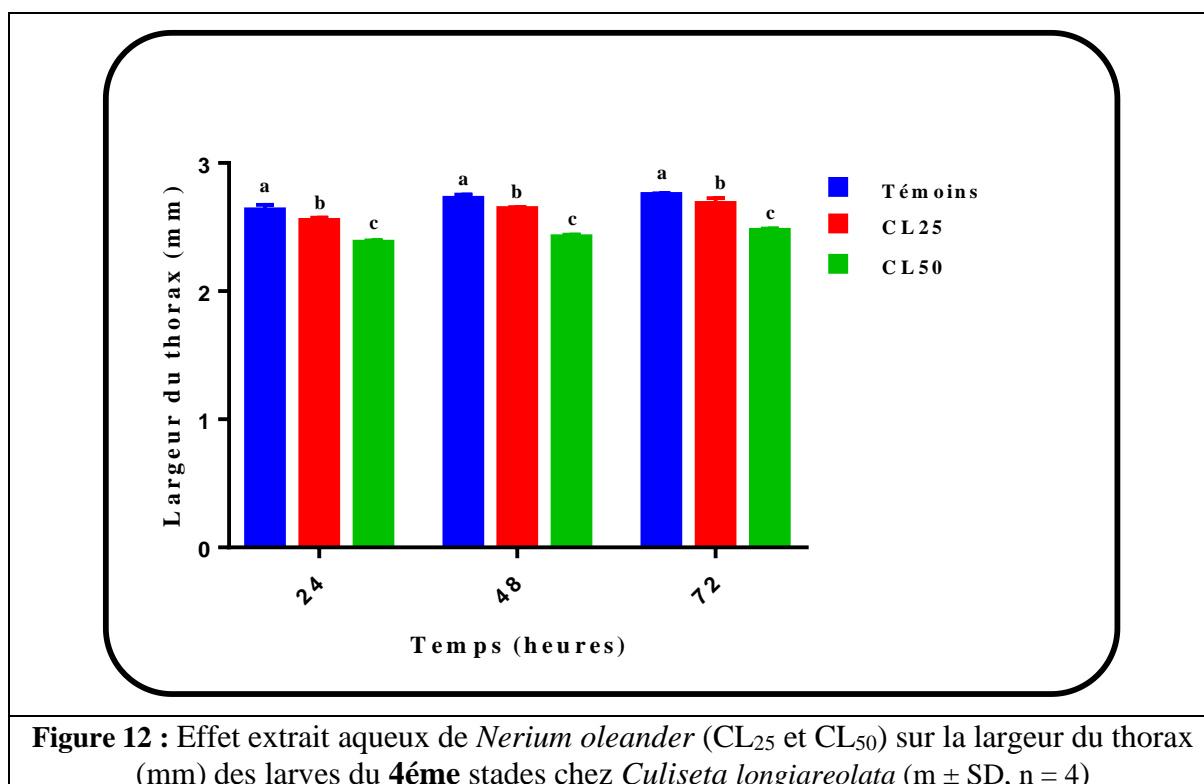


Figure 12 : Effet extrait aqueux de *Nerium oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur la largeur du thorax (mm) des larves du 4^{ème} stades chez *Culiseta longiareolata* (m ± SD, n = 4)

III.4. Effet d'extrait aqueux de *N. oleander* sur les biomarqueurs enzymatiques

L'extrait aqueux de *N. oleander* a été appliqué sur le stade larvaire L4 nouvellement exuvies de *Cs. longiareolata* à deux concentrations létales 25 et 50 (CL₂₅=3.32 et CL₅₀=11) selon les études de l'année précédente 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 un biomarqueur de détoxification, les glutathion S-transférases (GSTs) et un bio marqueur de stress oxydatif, la catalase. Les résultats ont été exprimés par rapport à la quantité de protéines (mg) obtenue à partir d'une courbe de référence.



III.4.1. Effet sur l'activité spécifique des glutathion S-transférases

L'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves L4 de *C. longiareolata* témoins et traitées (CL₂₅ et CL₅₀) est enregistrée à 24, 48 et 72 heures après traitement (tableau 10).

La comparaison multiple des moyennes par le test de Dunnett montre une différence très hautement significative ($p=0,000$) entre les séries témoins et les séries traitées (CL₂₅ et CL₅₀) de l'activité spécifique des GSTs à différentes périodes de traitement (Figure 13)

Tableau 10 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* ($m \pm \text{sem}$, $n=4$).

| Temps (heures) | Témoin | CL ₂₅ | CL ₅₀ |
|----------------|-------------|------------------|------------------|
| 24 | 0,50±0,04 a | 1,24±0,17 b | 1,32±0,21 b |
| 48 | 0,57±0,03 a | 1,16±0,10 b | 1,38±0,19 b |
| 72 | 0,56±0,09 a | 1,43±0,16 b | 1,38±0,19 b |

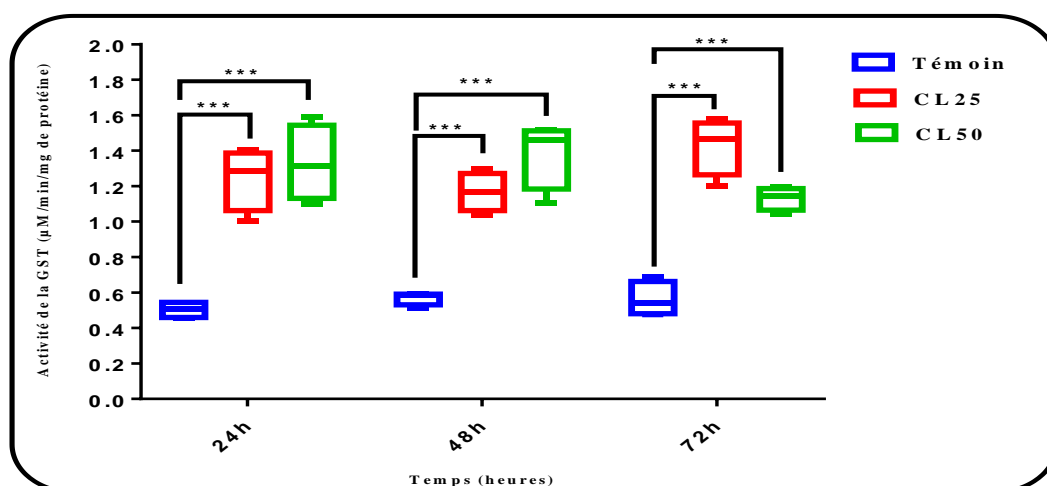


Figure 13 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *C. longiareolata* ($m \pm \text{SD}$, $n=4$). (*Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées).



III.4.2. Effet sur l'activité spécifique de la catalase

L'activité spécifique de la catalase a été estimée chez les séries témoins et traitées. Les résultats obtenus marquent une augmentation très hautement significative ($p=0.000$) de l'activité de catalase chez les séries traitées par l'extrait aqueux de *N. oleander* à la CL_{50} de *Cs longiareolata* après 24h, 48h et 72h comparativement aux séries témoins.

Tableau 11 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* sur l'activité spécifique de catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* ($m \pm \text{sem}$, $n=4$).

| Temps (heures) | Témoin | CL_{25} | CL_{50} |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 24 | 1,33 \pm 0,17 a | 1,74 \pm 0,16 b | 3,47 \pm 0,69 b |
| 48 | 1,01 \pm 0,46 a | 0,43 \pm 0,04 b | 0,65 \pm 0,10 b |
| 72 | 1,90 \pm 0,43 a | 0,32 \pm 0,04 b | 0,54 \pm 0,07 b |

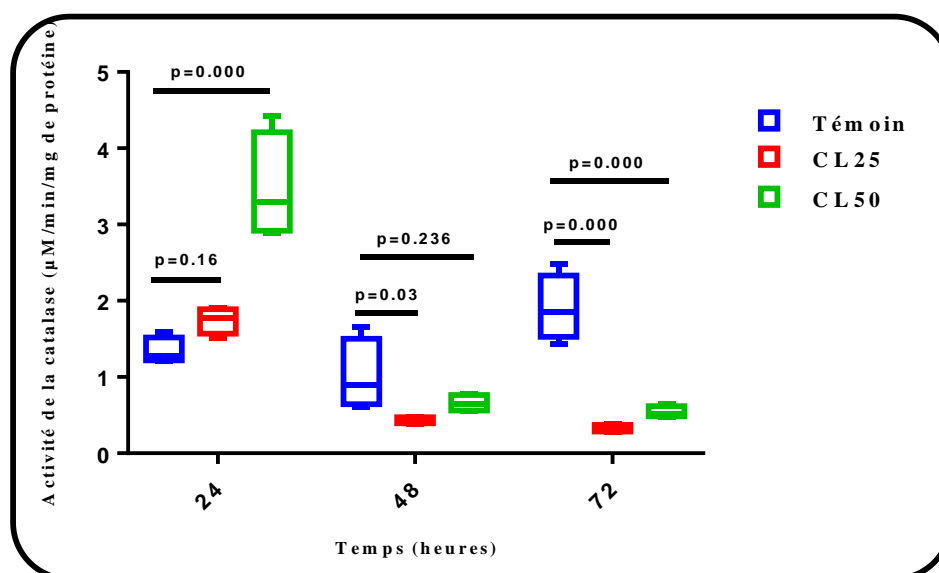


Figure 14 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL_{25} et CL_{50}) sur l'activité spécifique de la catalase ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *C. longiareolata* ($m \pm \text{SD}$, $n=4$).

III.5. Impact d'extrait sur la composition biochimique des moustiques

L'extrait aqueux de *N. oleander* (CL_{25} et CL_{50}) a été appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de *C. longiareolata* et leur effet a été évalué sur la composition biochimique (protéines, glucides et lipides) à différentes périodes (24, 48 et 72) heures après traitement.

III.5.1. Effet sur le contenu en protéines totales

Le contenu en protéines totales a été déterminé chez les larves 4 témoins et traités de *C. longiareolata* à différentes périodes (24, 48 et 72) heures après traitement.



La comparaison des valeurs moyennes par le test de Dunnett montre que l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) induisent une diminution très hautement significative du contenu en protéines totales des larves 4 (p=0,000) (Figure 15).

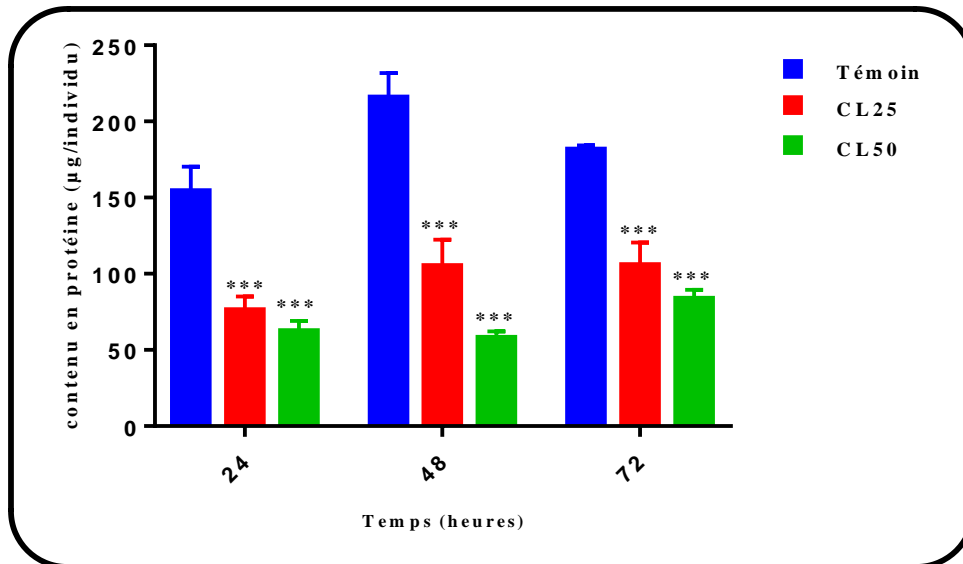


Figure 15 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur le contenu en protéine (µg/individu) chez les larves 4 de *C. longiareolata* (m ± SD, n=4).

III.5.2. Effet sur le contenu en glucides totaux

Le contenu en glucides totaux a été déterminé chez les larves 4 témoins et traités de *C. longiareolata* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures après traitement).

La comparaison des valeurs moyennes par le test de Dunnett montre que l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) induisent une diminution très hautement significative du contenu en glucides totaux à différentes périodes de traitement (p=0,000) (Figure 16).

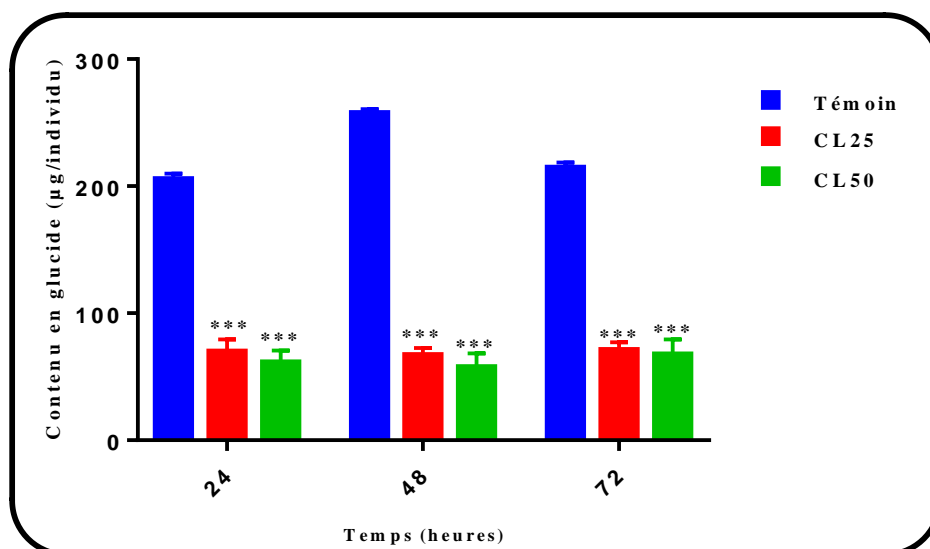


Figure 16 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur le contenu en glucide (µg/individu) chez les larves 4 de *C. longiareolata* (m ± SD, n=4).

III.5.3. Effet sur le contenu en lipides totaux

Le contenu en lipides totaux a été déterminé chez les larves 4 témoins et traités de *C. longiareolata* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures après traitement).

La comparaison des valeurs moyennes par le test de Dunnett montre que l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) induisent une diminution très hautement significative du contenu en lipides totaux à différentes périodes de traitement (p=0,000) (Figure 17).

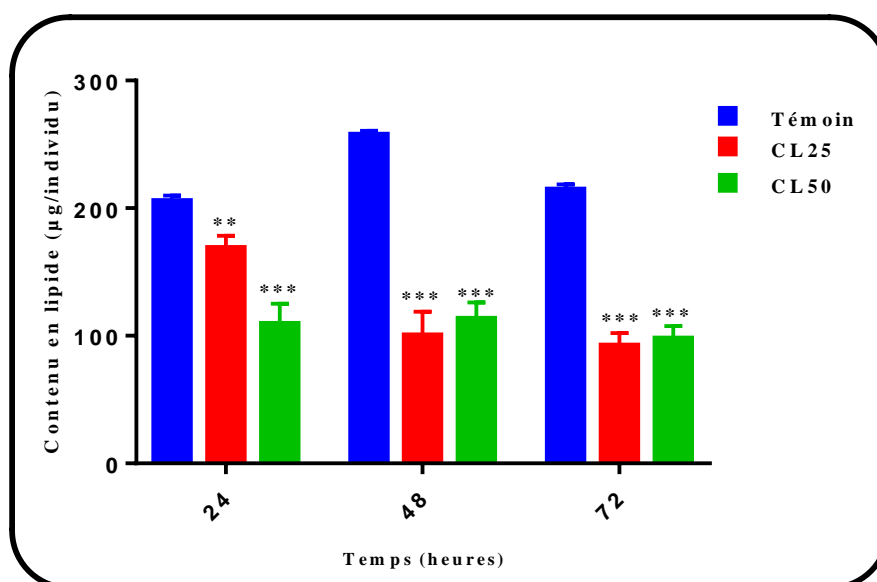


Figure 17 : Effet de l'extrait aqueux de *N. oleander* (CL₂₅ et CL₅₀) sur le contenu en lipide (µg/individu) chez les larves 4 de *C. longiareolata* (m ± SD, n=4)



IV. Discussion :

IV.1. Rendement

L'extrait de *Nerium oleander* obtenues avec un rendement de **13.6%** à partir de la partie aérienne de la plante.

Le rendement d'extrait est défini comme étant le rapport de la quantité de substance végétale extraite sur la quantité de la matière végétale utilisée. **Keddar et al, (2018)** ont notons que le rendement de l'extrait aqueux des feuilles de *N. olenader* est 64.5mL, alors que le rendement de l'huile essentielle d'après **Nia, (2018)** est 6.41% .Quant **Khettab & Knanja,(2020)** ont notons que le rendement de l'extrait hydrométhanolique des fleurs de *N.oleander* est 15.47% . Les résultats obtenus illustrent que nos rendement en extrait *N.oleander* est variable, cette différence serait liée au fait que l'extraction a été faite sur des fleurs sèches alors que les autres études l'ont faite sur des feuilles , tige , racine ou bien huile. Cette variabilité de rendement pourrait également être lié au l'espèce de plante, en plus de processus de tarissement, période de récolte, aux facteurs édaphiques et climatiques ou alors à l'état physiopathologique de la plante, aussi elle peut être liée au type de la technique d'extraction et aux étapes de la récupération (**Bouderhem, 2015**).

IV.2. Screening phytochimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur les fleurs de *Nerium oleander* en utilisant un solvant et des réactifs spécifiques de révélation. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un changement de couleur spécifique.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau de la plante comprenant les groupes chimiques : les flavonoïdes et les anthocyanines les tannins, les composés réducteurs, les quinones, les stérols et triterpènes et les saponines (indice de mousse). En revanche, nous avons enregistré l'absence des anthocyanines. En comparant nos résultats avec d'autres études effectuées dans d'autres région, nous trouvons que notre espèce a marqué une absence des Saponines, flavonoïdes, à celle étudiée par **Kadri et al, (2015)** récoltée à Constantine, Eloued et Mila. Même résultats ont été trouvé par (**Kadi Kenza, 2017**). Au vu des résultats obtenus lors de la présente étude, cette plante renferme presque toutes les grandes familles des métabolites secondaires.



IV.3. Effet d'extrait aqueux de *N.oleander* sur la croissance

Le poids corporel des insectes dépend généralement de la présence de la nourriture dans leurs habitats, des conditions environnementales et surtout des caractères héréditaires de chaque espèce).

Les biopesticides d'origine végétales ont montré des effets délétères sur la croissance et le développement des insectes, en réduisant le poids des larves, des pupes et des adultes et l'allongement des stades de développement (**Talukder, 2006**). Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation montrent que l'extrait (CL₂₅ et CL₅₀) appliquées sur les larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* a provoqué une diminution de divers paramètres morphométrie comme ; la largeur du thorax des larves. (**Tine-Djebbar, (2009)** révèle que l'*halofénozide* appliqué sur les larves du troisième et quatrième stade de *Cs longiareolata*, perturbe les paramètres morphométrie des individus, même remarque pour les travaux de et (**Bouabida, 2017**) après l'utilisation de *spiromesifene*. Chez la même espèce **Torchane et Bougatouf, (2015)**, montre que le traitement par le *Lavandula dentata* (CL₅₀ et CL₉₀) provoque une diminution des paramètres morphométriques. chez les larves du troisième et quatrième stade de *Cs longiareolata*.. Contrairement chez le même espèce de moustique, *Culiseta longiareolata*, le traitement par l'*Ocimum basilicum* (CL₅₀) (**Bouzidi & Ziani, 2015**). De plus, chez une autre espèce de moustique, *Culex pipiens*, le traitement par l'*Eucalyptus globulus* (**Kheled & Dib, 2015**) et de *Lavandula dentata* (**Sahbi & Aouni, 2015**) révèle les même résultats.

IV.4. Effet d'extrait aqueux de *N.oleander* sur les biomarqueurs

Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs concernent l'étude des changements physiologiques, biochimiques, moléculaires ou comportementaux révélant l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition à un ou plusieurs contaminants (**Badiou, 2007**). Les principaux biomarqueurs utilisés sont des marqueurs enzymatiques comme la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase. Les enzymes du système de détoxification sont aussi beaucoup étudiées puisque leurs activités sont susceptibles d'être fortement modifiées après une exposition.. Un petit nombre de mécanismes sont capable de détoxifier les insecticides en métabolites moins toxiques (**Soderlund, 1997**). Ces mécanismes sont généralement classés en trois:

- 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_R).

IV.4.1. Effet sur l'activité spécifique des GSTs

Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'étape de conjugaison du « glutathion réduit » à un grand nombre de xénobiotiques (Boyer, 2006). Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules, du corps gras et des muscles alaires (Haubruge & Amichot, 1998). Elles ont un rôle important dans la détoxification de substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Jakoby & Habig, 1980). 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 (George, 1994).

L'activité spécifique de la GST chez les larves témoins et traitées du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* a été évaluée à 24, 48 et 72h. Les résultats obtenus montrent une augmentation très significative après traitement au *Nerium oleander* comparativement aux témoins. L'augmentation de l'activité de la GST traduit une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense de l'insecte contre le pesticide (Clark, 1989).

Cette observation a été également signalée chez le même espèce traitée par *Mentha piperita* (Chettat, 2013), par *Ocimum basilicum* (Kemache & Meziani, 2015) et par *L. dentata* (Gouasmia & Bouchagoura, 2013), aussi chez *Culex pipiens* traité par *Ocimum basilicum* (Sayada & Messai, 2015) et *L. avendula dentata* (Gheraibia & Abaidia, 2014), aussi 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). 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 HEs de cardamome, la cannelle et la muscade (Tarigan *et al.*, 2016). Ce faible niveau de détoxification qui se traduit par une diminution de l'activité des GSTs, peut être à l'origine du pouvoir insecticide.

IV.4.2. Effet sur l'activité spécifique des Catalases



La catalase joue un rôle crucial dans l'élimination de l'hydrogène peroxyde des cellules ainsi que dans la défense contre le stress oxydatif (Aebi, 1984). Les résultats obtenus chez les larves 4 de *C. longiareolata*, révèle une augmentation significative de l'activité de la catalase chez les traités comparativement aux témoins. Cette augmentation de l'activité traduit une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense de l'insecte contre le pesticide (Clark, 1989).

Nos résultats concordent avec ceux de Pinho *et al.* (2014), qui ont démontré une augmentation de l'activité de la CAT chez les mouches traitées à l'HE de *Psidium guajava*. Une augmentation du taux de CAT a été observée d'exposition de l'HE de *Boswellia carterii* chez *C. chinensis* et *C. maculatus respectivement* (Kiran *et al.*, 2017). Par contre, une diminution de l'activité de CAT a été observée chez *S. oryzae* et *R. dominica* traités à l'HE de *Gaultheria procumbens* (Kiran & Prakash, 2015), ce qui peut être en raison de la production accrue du radical anion superoxide (Kurutas *et al.*, 2009 ; Sreejai & Jaya, 2010).

IV.5. Effet d'extrait aqueux sur la composition biochimique

Le dosage des principaux constituants réalisé sur le corps entier des larves L4, témoins et traités de *Cs. longiareolata*, révèle une modification des composants biochimiques comme les protéines les glucides et les lipides après traitement par les extraits de *N. oleander* à 24, 48, 72, heures.

Les protéines sont des composants biochimiques importants, nécessaires au développement de l'organisme et à sa croissance pour réaliser ses activités vitales (Yazdani *et al.*, 2014). Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation, montrent que le traitement par l'extrait de *N. oleander* chez *Cs. longiareolata*, cause une diminution du contenu en protéine. ceci concorde avec les résultats de (Tine-Djebar, F., & Soltani, N. 2008) indiquent que le traitement par *lavandula dentata* avec la CL₅₀ chez le même espèce, cause une diminution du contenu en protéine. La réduction des protéines est un phénomène fréquent chez les insectes traités par les produits toxiques (Nathan *et al.*, 2008). De plus, la réduction en réserve protéique peut être également due à l'adaptation physiologique de l'insecte à un état de stress causé par les insecticides (Ribeiro *et al.*, 2001). Et le même résultat a été observée chez *Glyphodes pyloalis* traitée par l'HE de *Lavandula angustifolia* (Yazdani *et al.*, 2013). Par contre, Madaci *et al.*, (2008) indiquent que les extraits hydroalcooliques des feuilles de *Nerium oleander* (Apocynacées) provoquent une augmentation du taux de protéines chez les larves du vers blanc rhizotrogini .

Les glucides forment un groupe de composés très importants. Certains représentent une source d'énergie pour les organismes vivants. Les taux de glycogène et de tréhalose dans les tissus sont étroitement liés aux évènements physiologiques tels que le vol, la mue, et la



reproduction (**Kaufmann et Brown, 2008**). Concernant le contenu en glucides, nos résultats montrent que le traitement d'extrait de *N. oleander* chez *Cs. Longiareolata*, cause une diminution du contenu en glucides chez les larves de 4eme stades nouvellement exuviées . Ceci concorde avec les résultats obtenus chez *D. trunculus* exposés aux polluants environnementaux (**Sifi, 2009**). L'application d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-0345, diminue les concentrations des glucides hémolymphatiques chez *B. germanica* et un effet dose-réponse est également observé (**Rouibi, 2002**). Des effets similaires sont observés chez deux espèces de moustiques, *Cx pipiens* et *Cs longiareolata* traitées par le méthoxyfénoside et l'halofénoside (**Tine-Djebbar, 2009**).

Les lipides représentent la principale source d'énergie chez les insectes (**Beenakers et al., 1985**). Ils sont transportés du corps gras, site de leurs synthèses et stockage vers les organes utilisateurs via l'hémolymphes surtout lors de la vitellogénèse (**Downer, 1985 ; Keely, 1986 ; Van Hensden & Law, 1989**). Les lipides augmentent pendant la période d'alimentation et leur quantité varient selon le stade de croissance et les conditions d'alimentation (**Chapman, 1998**). Les résultats obtenus au cours de nos expérimentations révèlent une diminution du contenu en lipides chez le stade testé traité à l'extrait de *N. oleander* est diminution maximale après 72 h de traitement et une augmentation chez les témoins après 48h . War et al. (2013) observent aussi une diminution du contenu en lipides chez *Helicoverpa armigera* après traitement aux HEs d'*Azadirachta indica* . Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue (**Tine-Djebbar, F., &Soltani, N. 2008**).

Plusieurs études ont montré que les moustiques résistants aux traitements contenaient moins de réserves énergétiques que les moustiques sensibles (**Hardstone et al., 2010**), ce qui suggère qu'elles ont utilisé ces réserves pour activer le processus de détoxification.



Conclusion



Conclusion :

Depuis longtemps l'être humain cherche pour une nouvelle stratégie naturelle et plus particulièrement par l'utilisation des extraits de plantes comme bio insecticide pour la lutte contre les moustiques la première source de transmission des maladies, car l'utilisation des insecticides chimiques est nocive pour l'être humain et l'environnement. Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives.

L'objectif de travail consiste à faire un screening phytochimique du *Nerium oleander* et l'étude de l'évaluation de l'activité larvicide d'extraits aqueux de cette plante sur les larves de quatrième stade nouvellement exuvies de *Culiseta longiareolata* l'espèce de moustiques la plus abondante dans la région de Tébessa. Leurs actions ont été évaluées sur plusieurs aspects : Morphométriques (Le volume corporel et le poids), biomarqueurs et biochimiques.

À la lumière des résultats figurés dans ce mémoire, on peut conclure que la plante de *Nerium oleander* est très riche en métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, tanins, saponines, alcaloïdes, ...etc.

L'étude morphométrique montre que : Le volume corporel et le poids des larves de 4^{ème} stade diminue avec le temps durant la période de 24h 48h 72h sous l'effet des concentrations létales suivantes : CL₂₅; CL₅₀.

L'évaluation d'un biomarqueur de détoxication indique que l'extrait aqueux de *N. oleander* provoque une augmentation de l'activité de la GST chez les traités comparativement aux témoins. D'autre part, un biomarqueur de peroxydation lipidique, la catalase a été également affecté par l'application d'extraits aqueux en les augmentant chez l'espèce étudiée, suggérant une induction des processus de détoxication. De plus. Les résultats révèlent une diminution significative du contenu en protéines, glucides et lipides chez les individus de stade étudié. Cette étude basée sur l'utilisation des plantes comme insecticide, ouvre de larges perspectives dans le domaine des connaissances fondamentales d'une part et dans le domaine appliqué d'autre part.

À l'avenir, il serait intéressant de compléter le présent travail par :

- Étude de l'impact d'extraits aqueux sur le potentiel reproducteur de ces espèces de moustiques.
- Évaluation de l'effet des principes actifs (composants majoritaires) d'extraits aqueux de plante et leur formulation pour leur application comme biocide.
- Étude de l'effet toxique de cet extrait à l'égard des nymphes des adultes mâles et femelles des espèces testées.
- Évaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante d'extraits.



***Références
bibliographiques***



Références bibliographiques :

A

- 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.
- Adom. R. O., Gachichi. J. W., Onegi. B., Tamale. J., Apio. S. O. (2003) - The cardiotoxic effect of the crude ethanolic extract of *Nerium oleander* in the isolated guinea pig hearts. *African Health sciences*. vol. 3, pp. 77-82.
- Aebi, H. (1984).—Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*. 105: 121–126.
- Aitken, T. H. G. (1954). The *Culicidae* of Sardinia and Corsica (Diptera). *Bull. Ent. Res.*, 45: 437 - 494.
- Ali A., Ahmad F., Biondi A., Wang Y., & Desneux N., 2012. Potential for using *Datura alba* leaf extracts against two major stored grain pests, the khapra beetle *Trogoderma granarium* and the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Journal of Pest Science.*, 85: 359-366
- Almahy. H. A et Khalid. H. E. (2006). Chemical examination of the leaves of *Nerium oleander* *International journal of tropical medicine*. vol. 1, n°. 2, pp. 58-61.
- Almahy. H. A et Khalid. H. E. (2006). Chemical examination of the leaves of *Nerium oleander* *International journal of tropical medicine*. vol. 1, n°. 2, pp. 58-61.
- Al-Obaidi, O. H. S. (2014). Studies on antibacterial and anticancer activity of *Nerium Oleander* extracts. *Eur. Chem. Bull.*, 3(3), 259–262.

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.
- Bagari, M., Bouhaimi, A., Ghaout, S., and Chihrane, J. (2013): The toxic effects of *Nerium oleander* on larvae of the desert locust *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Zool. Baetica*, 24, 193–203.
- Beenakers, A. M. T. H., Vander Host, D. G. & Van Marrewijk, W. J. A. (1985). Insect lipids and lipoproteins and their role in physiological process. *Progress in Lipid Research* 24 : 19-67.
- Benhissen S., Habbachi W., Khellaf R. & Masna F., 2018. Etude entomologique et typologique des gîtes larvaires des moustiques (Diptera : *Culicidae*) dans la région de Bousaada (Algérie). *Bulletin de la société royale de Liège*, 87, 112-120
- Benhissen S., Habbachi W., Rebbas K., and Masna F. (2019). Bioactivité des extraits foliaires de *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) sur la mortalité des larves de *Culiseta longiareolata* (Diptera, *Culicidae*) Lebanese
- Bouabida, H., Tine-Djebbar, F., Tine, S. & Soltani, N. (2017a). Activity of spiromesifen on Growth and development of *Culex pipiens* (Diptera: *Culicidae*): Toxicological, Biometrical and biochemical aspects. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5(1): 572-577.
- Boudershem Aida (2015)- Effet des huiles essentielles de la plante *Laurus nobilis* sur l'aspect Toxicologique et morphométrique des larves des moustiques (*Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*) - mémoire de master - Université Echahid Hamma Lakhdar D'el-Oued .40p
- Boulkenafet, F. (2006). Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes
- Bouzidi O. Ziani R., 2015. Etude de l'impact des huiles essentielles d'une plante larvicide, l'*Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*



: aspect morphométrique et biochimique. Mémoire du diplôme de Master. Université des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie-Tébessa. 28p.

- Boyer, S. (2006). Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Laboratoire d'Ecologie Alpine. 78 p
 - Braqueunier J.B., 2009. Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat, Université de Liège. 217p.
 - Bruneton J (2001)- Plantes toxiques :-végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2ème édition, pp.129-136.
 - Bruneton J (2001)- Plantes toxiques :-végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 2ème édition, pp.129-136.
 - Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie- Plantes médicinales-Techniques
- C**
- Carlos EC. (2010). Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs *Phthorimaea operculella* et *Tecia solanivora* (Lepidoptera :Gelechiidae). Thèse de doctorat. École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne.193p.
 - Chapman, R.F. (1998). *The Insects Structure and Function*. Cambridge University Press: New York.
 - Chaudhary, K. and Prasad, D.N. (2014): A Review on: *Nerium oleander* Linn. (Kaner). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 2014; 6(3): 593-597.
 - Chauhan, S., Singh, M., Thakur, A., and Dogra M. s (.2013):“Antibacterial activity of *Nerium indicum* against some gram positive bacterial species” *Int. J. Drug Res. Tech*, 3 (1), 8-11. chevalier, Paris : 1-303.
 - Chettat H., 2013. Etude des huiles essentielles de *Mentha pepirita* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire du diplôme de Master. Université de Tébessa 45p.
 - Chopra L C, Abrol B K, Handa K L (1971)- Les plantes médicinales des régions arides considérées surtout du point de vue botanique. Première partie, pp. 45-50.
 - Clark, AG. (1989). The comparative enzymology of GST from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92: 419-446.
 - Clark, AG. (1989). The comparative enzymology of GST from non-vertebrate organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology* 92: 419-446.

D

- Delille. L. (2007) *Les plantes médicinales d'Algérie*, Berti éditions, pp. 141-142. Alger. documentations, 3ème édition, Lavoisier, pp. 463, 661-670, 721-730.
- Delille. L. (2007) *Les plantes médicinales d'Algérie*, Berti éditions, pp. 141-142. Alger.
- Downer, R.G.H. (1985). Lipid metabolism. In *Compr. Insect. Physiol. Biochem. And Pharm.* (G. A. Kerkert et L. I. Gilbert, eds). Pergamon Press. Oxford 10 :77 - 113.

E

- El Sawi, N. M., Geweely, N. S., Qusti, S., Mohamed, M., and Kamel, A. (2010): Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of *Nerium oleander* Extracts. *Journal of Applied Animal Research*, 37(1), 25–31. expansion géographique d'*Aedes albopictus*, Inst. Nat., Médecine agricole, France, 109p.

F

- F.A.B., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D., Posser, T. & Franco, J.L. (2014).



G

- 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.
- Gheraibia S. & Abaidia W., 2014. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide de l'huile essentielle de *Lavandula dentata* à l'égard de moustique *Culex pipiens*. Mémoire du diplôme de Master. Université de Tébessa.
- Gitaari N., Kareru P., and Githua M. (2018). Repellency Effects of *Pelargonium citrosum* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils against Housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). Chemical Science International Journal.25(4).
- Goldworthy A.C., Mordue W. & Guthkelch J., 1972. Studies on insect adipokinetic hormone. Gen. Comp. Endocrinol., 18 : 306-314.
- Gouasmia H., Bouchagoura M., 2013. Etude insecticide des huiles essentielles de *Lavandula dentata* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire de Master. Université de Tébessa

H

- H. Bakkali, M. Ababou, T. Nassim Sabah, A. Moussaoui, A. Ennouhi, F.Z. Fouadi, S.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakoby W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem., 249: 7130-7139.
- Hadri .N (2015). Etude phytochimique et activité antioxydant d'extraits de plantes *sedurn Villosum* L (orpin) et *Anabasis articularata* Moq. (Forsk). Thèse de doctorat, université Abou bekr belkaid Tlemcen.
- Hammiche V., Maiza K., 2006. Traditional medicine in central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili n'Ajjer. J Ethnopharmacol105 : 358-67.
- Hammiche V., Merad,R .,Azzouz M.2013. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. © Springer-Verlag France, Paris.P :57-60.
- Hammiche V., Merad,R .,Azzouz M.2013. Plantes toxiques à usage médicinal du pourtour méditerranéen. © Springer-Verlag France, Paris.P :57-60.
- Hanson J R., 1985.The chemistry of natural products, (R. H. Thomson ed.), chapter 4. Blackie USA: Chapman et Hall, New York, pp. 42.
- Hanson J R., 1985.The chemistry of natural products, (R. H. Thomson ed.), chapter 4. Blackie USA: Chapman et Hall, New York, pp. 42.
- Hardstone, M.C., Komagata, O., Kasai, S., Tomita, T. & Scott, J.G. (2010). Use of isogenic strains indicates CYP9M10 is linked to permethrin resistance in *Culex pipiens unquifasciatus*. Insect Molecular Biology 19: 717-726
- Haubruge, É. & Amichot, M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. France. Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 2 (3): 161–174.
- Hussain M A et Gorski MS (2004)- Antimicrobial activity of *Nerium oleander*

J

- Jakoby W.B. & Habig W.H., 1980. Glutathion transferase. In Jakoby, W. B. Enzymatic basis of detoxification. Academic press. New York., 2 : 63-94
- Judd W S et al. (2002)-dans Botanique systématique.P366

K

- Kaufmann, C., & Brown, M.R. (2008). Regulation of carbohydrate metabolism and flight performance by a hypertrehalosaemic hormone in the mosquito *Anopheles gambiae*. Journal of Insect Physiology 54(2): 367-377.



- -Keddar Nassima, Belayachi Kheira(2018) - Etude de l'effet insecticide des extraits polyphénols et caroténoïdes de *Nerium oleander* sur Aphis spiraeicola- mémoire de master - Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.
- Kemache A. & Meziani H., 2015. Etude de l'effet des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* sur les biomarqueurs à l'égard de deux espèces de moustiques *Culiseta longiareolata* et *Culex pipiens*. Mémoire de Master. Université de Tébessa.
- Khaled I. & Dib D., 2015. Evaluation de l'activité des huiles essentielles de l'*Eucalyptus globulus* à l'égard d'une espèce de moustiques *Culex pipiens* : toxicologie, développement, morphométrie et biochimie. Mémoire de Master. Université de Tébessa. p : 39-44.
- Khaligh FG., NaghianA., Soltanbeiglou S., and Gholizadeh S. (2020). Autogeny in *Culiseta longiareolata* (Culicidae: Diptera) mosquitoes in laboratory conditions in Iran.13:81.
- Khaligh FG., NaghianA., Soltanbeiglou S., and Gholizadeh S. (2020). Autogeny in *Culiseta longiareolata* (Culicidae: Diptera) mosquitoes in laboratory conditions in Iran.13:81.
- 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.
- 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.
- 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.
- Korba Amara R., Boukraa S., Alayat M.S., Bendjeddou M.L., Francis F., Boubidi S.C., and Bouslama Z. (2015). Preliminary report of mosquitoes survey at Tonga Lake (North-East Algeria). *Advances in Environmental Biology*, 9(27) Pages : 288-293.
- Kurutas, E.B., Sahan, A. & Altun, T. (2009). Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of spotted barb (*Capoeta barroisi* Lortet, 1894) living in the river Ceyhan, Adana, Turkey. *Turkish Journal of Biology* 33: 275– 282

L

- Lagnika L. (2005). Étude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles is-sues de Plantes Béninoises. Thèse de Doctorat Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin.
- Laurier-rose, (Apocynacées) sur le taux des protéines, l'activité de l'AchE et les mouvements des vers blancs rhizotrogini, (Coleoptera : Scarabaeidae). *Science et Technologie* 27 : 73 - 78.
- Linn. *Assian Journal of Plant Sciences* 3. Vol 2, P 177-180.
- Lounaci Z., Doumandji S., Doumandji M. B. et Berrouane F. Z., 2014.- Dipterans biodiversity of agricultural and medico veterinary interest in the marsh of Reghaia(Algeria). *International Journal of Zoology and Research (IJZR)*,4 (5): 71-82.

M

- Maaoui M. 2014. Atlas plantes ornementales des Ziban. Edition CRSTRA .P133



- Madaci, B., Merghem, R., Doumandji, B. & Soltani, N. (2008). Effet du *Nerium oleander*,
- Madaci, B., Merghem, R., Doumandji, B. & Soltani, N. (2008). Effet du *Nerium oleander*, laurier-rose, (*Apocynacées*) sur le taux des protéines, l'activité de l'AchE et les mouvements des vers blancs rhizotrogini, (*Coleoptera* : *Scarabaeidae*). *Science et Technologie* 27 : 73 - 78.
- Mohadjerani, M. (2012). Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Nerium Oleander* L. Grown in North of Iran. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(4), 1121–6.

N

- Nathan, S.S., Choi, M.Y., Seo, H.Y., Paik, C.H., Kalaivani, K. & Kim, J.D. (2008). Effect of azadirachtin on acetylcholinesterase activity and histology of brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Stal). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 244–250
- Nurgun, E., Esru, K., Erdem, Y. (2003): “Anti-inflammatory and Antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine” *Journal of Ethnopharmacology*, 89,123.139.

P

- Paris. R.R et Moyses. H. (1971). Précis de matière médicale, pharmacognosie spéciale dicotylédones (tome III), pp.32-52
- Peterson. (1980). Alimit cycle interprétation of a mosquito circadianoscillator .J. theor.
- 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 the *Psidium guajava* Var. *Pomifera* (Myrtaceae) Essential Oil in *Drosophila melanogaster* by Means of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1-8.
- Pinho, A.I., Wallau, G.L., Nunes, M.E.M., Leite, N.F., Tintino, S.R., Cruz, L.C., Cunha,

R

- Rashan LJ, Franke K, Khinec MM et al., 2011. Characterization of the anticancer properties of monoglycosidic cardenolides isolated from *Nerium oleander* and *Streptocaulon tomentosum*. *J Ethnopharmacol* 134: 781-8
- Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A. & Soares, A.M.V.M. (2001) Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Procellia dilatatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 131- 138.
- Ridings W H (1976) - Sphaeropsis witches' broom of *Nerium oleander*. *Proc. Fla. State Hort. Soc.*, vol. 89, pp. 302-303.
- Rouibi, A. (2002). Evaluation d'un mimétique des ecdystéroïdes (RH-0345) sur *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) : Aspects morphométriques et Biochimiques. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister Université de Badji Mokhtar- Annaba. p 14-95.
- Ruault-Djerrab M., Ferré B. & Kechid-Benkherouf F. 2012. Etude micropaléontologique du Cénomano-Turonien dans la région de Tébessa (NE Algérie): implications paléoenvironnementales et recherche de l'empreinte de l'OAE2. *Revue de Paléobiologie*, Genève, 31 (1): 127 – 144

S

- Sahbi F., Aouni M., 2015. Impact des huiles essentielles de *Lavandula dentata* sur la biochimie, la morphométrie chez une espèce de moustique *Culex pipiens*. Mémoire de Master. Université de Tébessa. p : 28-32



- Sayada N. & Messai S., 2015. Etude de l'effet des huiles essentielles d'une plante larvicide *Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique, *Culex pipiens* : aspect morphométrique et biomarqueurs. Mémoire de Master. Université de Tébessa 37p.
- Shibko S., Koivistoinen P., Tratyneck C., New Hall. & Feidman L., 1966. A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.*, 19 : 415-528.
- Siah, et H. Ihrai. Les Brulures Chimiques Par Le Laurier Rose, 2010 sept. 30
- Sifi, K. (2009). Biosurveillance de la qualité des eaux du Golf d'Annaba : croissance, composition biochimique et dosage des biomarqueurs du stress environnementale chez *Donax trunculus* (Mollusque : Bivalve). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université de Annaba. P : 229.
- Singhal, K.G. and Gupta, G.D. (2012): "Hepatoprotective and antioxidant activity of methanolic extract of flowers of *Nerium oleander* against CC14 induced liver injury in rats." *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012, 5(9), 677-685.
- 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.
- Stursa J., 2001. Arbres et Arbustes à feuilles persistantes .Grand.Paris. P118-203.

T

- Talukder, F.A. (2006). Plant products as potential stored product insect management agents A mini review. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 18(1): 17–32
- 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.
- Tine-Djebbar, F., & Soltani, N. (2008). Activité biologique d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue sur *Culiseta longiareolata*: analyses morphométrique, biochimique et énergétique. *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 18, 23-34.
- Tine-Djebbar F., Bouabida H. & Soltani N., 2016. Répartition spatio-temporelle des culicidés dans la région de Tébessa. Edition Universitaire Européennes. ISBN: 978-3-639-50856-7
- Tine-Djebbar F., Larhem A.B., and Soltani N. (2011). Enzyme immunoassay measurements of the molting hormone in different post embryonic stages of two mosquito species, *Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata*. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(67), pp. 15195-15199.
- Tine-Djebbar, F. (2009). Bioécologie des moustiques de la région de Tébessa et évaluation de deux régulateurs de croissance (halofenozide, méthoxyfenozide) à l'égard de deux espèces de moustiques *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata* : toxicologie, morphométrie, biochimie et reproduction. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université Badji Mokhtar de Annaba. 168 p.

Y

- Yazdani, E., Sendi, J.J., Aliakbar, A.R. & Senthil Nathan, S. (2014). Effect of *Lavandula angustifolia* essential oil against lesser mulberry pyralid *Glyphodes pyralis* Walker (Lep: Pyralidae) and identification of its major derivatives. *Pesticide Biochemistry Physiology* 107: 250-257.

