



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Larbi Tébessa –Tébessa
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie



Département:

DOMAINE: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Option:

MEMOIRE : présente en vue de l'obtention de diplôme de MASTER

**Screening phytochimique d'une plante médicinale
Ruta graveolens et l'étude théorique de son activité
biologique sur un modèle biologique *Drosophila
melanogaster***

Présenté par:

GOUAMI Chaïma Nébilí Imen

Devant le jury:

Mme DRIS Djemaa	M.C.B.	Université de Tébessa	Présidente
Mme BOUABIDA.H	M.C.A.	Université de Tébessa	Rapporteuse
Mme HAMIRI M	M.A.A.	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 22/06/2020

Remerciements

Nous remercions avant tout Dieu le tout puissant pour la volonté, la santé et
la patience

Qu'il nous a donné durant toutes les longues années d'études

Afin que je puisse arriver là.

Notre reconnaissance, notre vive gratitude et notre sincère remerciement
Vont aussi à Mme. Bouabida Hayette, (MCA) au département de Biologie
Animale,

Pour nous avoir dirigé tout au long de la réalisation de ce travail. Ses
orientations,

Ses encouragements, sa disponibilité constante c'était inestimable pour nous.

Vous avez su faire partager votre expérience et vous nous avez guidé
Dans le monde de la recherche scientifique. Merci d'avoir cru en moi.

Au président de jury de notre mémoire, Dr. DRIS Djemaa (MCB)

qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.

Merci vivement pour vos conseils, pour faire partager votre expérience et de
nous guidé pour bien réaliser ce travail scientifique

Je remercie également Mme. SEGHIR Hanene (MAA) pour avoir accepté de
faire partie des membres du jury ; lire et de juger ce travail.

Nous remercions tout le personnel professionnel et administratif de la faculté
de biologie pour les efforts déployés en vue d'assurer le service et le
développement des étudiants dans l'enseignement supérieur.

Enfin nous remercions s'adressent à ceux qui ont aidé de près ou de loin à
la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à : mes parents

*Mon père, **Yahya** qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie .puisse Dieu faire en sorte que ce travail port son fruit, Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi*

*Ma mère, **Yasmina** qui a œuvré pour ma réussite , de par son amour , son soutien , tout les sacrifices conseils et ses précieux conseils , pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit –il , l'expression de mes sentiment et de mon éternelle gratitude*

*A mes précieuse sœur **Aicha, Khadija** , et surtout mon amour **Rahma**, les mots ne peuvent résumer ma reconnaissance et mon amour à ton égard*

*A la moure de mon coure : **Zaideet Montasar***

*A mes tants : **Akila et Sakina et Soued et Hiba***

*Ama grande pére : **Djamila** et ma grande mère **Djemaa***

*A mon amie proche : **Azzem** qui ma aidé beaucoup à faire ce travaille*

*A mon amie : **Amine***

*A mes adorables amies **Sabrina ; Rahma ; Rihena ; Nesrin ; Sara**, et tous ceux qui font partie intégrante de mes souvenirs et ma vie.*

*A ma binôme **Imene***

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance

Chaima

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mon père **SAMIR***

Dieu prolonge sa vie.

À celui qui m'a mis sur le chemin de la vie et m'a calmé,

Elle a pris soin de moi jusqu'à ce que je grandisse

*(Ma chère mère **FAIZA**) Que Dieu bénisse sa richesse.*

*Pour mes frères **MOUHAMED**, **OUSSAMA**, **TAKIEDDIN** ET **SAHAR**. Ceux qui ont eu un impact majeur sur de nombreux obstacles et difficultés.*

*À tous mes amis, surtout à mes chers (**ASMAA**), et que Dieu la guide et éclaire son chemin*

*À ma binôme : **Chaima***

À tous mes chers professeurs, ceux qui n'ont pas hésité à m'aider

IMENE

Table de matière

Liste des Figures.....	I
ملخص.....	II
Abstrac.....	Error! Bookmark not defined.
Résumé.....	IV
Introduction Générale.....	1
Chapitre 01 : Présentation de la plante <i>Ruta graveolens</i>	3
1. Présentation de la plante <i>Ruta graveolens</i>	3
2. Caractéristiques botaniques :.....	3
3. Classification botanique : (Wiart, 2006 ; Bonnier, 1999).....	4
4. L'origine :.....	4
5 .Exigences et culture :.....	4
6. L'utilisation de la plante.....	4
6.1. Usage Médicinale.....	5
6.2. Usage Vétérinaire.....	5
6.3. Autre Utilisation :.....	6
7. Préparation de l'extrait végétal.....	6
8. Screening phytochimiques.....	9
8.1. Recherche des flavonoïdes et des leucoanthocyanes.....	9
8.2. Recherches des quinones.....	9
8.3. Recherche de saponines.....	10
8.4. Recherche des tanins.....	10
8.5. Recherche des terpenoïdes, et des stéroïdes.....	10
8.6. Recherche des alcaloïdes.....	11
Chapitre 02 :Présentation de <i>Drosophila melanogaster</i>	12
1. présentation de la Mouche « <i>Drosophile melanogaster</i> ».....	12
2. Caractéristiques.....	13
3. Caractérisation du contexte écologique de <i>Drosophila melanogaster</i>	15
4. Répartition géographique.....	15
5. L'habitat :.....	15
6. Plantes hôtes :.....	16
7. La Classification de cet insecte est :.....	16
8. Mode de Reproduction.....	17
9. Cycle de vie de la Drosophile :.....	17
9.1. Fécondation et ponte :.....	18
9.1.1.Œufs.....	18
9.1.2. Stade larvaire.....	18
9.1.3. Stade pupal.....	19
9.1.4. Stade adulte.....	19
10. Rôle écologique :.....	21
11. moyens de lutte :.....	21
11.1. La lutte biologique (culturelle).....	21
11.2. La lutte chimique :.....	21

11.3. Symptôme et dégât.....	21
11.4. Piégeage des drosophiles adultes :.....	22
11.5. Composition exacte de l'appât.....	23
11.6. Alimentation :	24
11.7. Technique d'élevage de <i>Drosophila melenogaster</i>	24
Chapitre 03 : Screening phytochimique et activité larvicide d'extrait <i>Ruta graveolens</i> ..	24
1. Screening phytochimiques de l'extrait <i>Ruta graveolens</i>	24
2. Effet de la plante <i>Ruta graveolens</i> sur d'autres insectes (moustique mouche)	25
2.1 Effet de l'extrait aqueux de <i>Ruta graveolens</i> sur les larves et les pupes de <i>Culiseta longiareolata</i>	25
2.2 Effet d'extraits bruts de <i>Ruta graveolens</i> sur <i>Aedes aegypti</i> et <i>Anopheles stephensi</i> et <i>Culex pipens</i>	26
3. Effets des plantes médicinales sur la <i>Drosophila melanogaster</i> :.....	26
3.1 Effet toxique :	26
3.2.Effet des extraits aqueux des six plantes sur PER (Proboscis Extension Reflex chez <i>Drosophila melanogaster</i>) :.....	27
Conclusion.....	28
Références Bibliographiques.....	29

Liste des Figures

N°	Titre	Page
1	<i>Ruta graveolens</i>	3
2	Région géographique d'échantillonnage	6
3	Zone d'échantillonnage	7
4	La 1 ^{ère} Filtration de Mélange sur un papier Filtre	7
5	Le Mélange des deux filtrats.	8
6	Photographie représentant un appareil Rotavapeur (photo personnelle).	8
7	<i>Drosophila melanogaster</i>	13
8	(A) un adulte de <i>drosophile</i> ; (B) male (à gauche) et femelle (à droite) ..	14
9	Peignes sexuels sur une mouche mâle.	14
10	Organes génitaux chez la <i>drosophile</i> , vue de face(A) et vue de côté(B). (male à gauche, femelle droite).	15
11	œuf de <i>Drosophile</i>	18
12	Un des stades larvaires (asticot)	19
13	(A) Pupa ; (B) Pupa (photo personnelle)	19
14	Eclosion les ailes pas encore déployées	20
15	Cycle de vie de la <i>Drosophila melanogaster</i>	20
16	Des pièges-gobelets du type Becherfalle (à droite) ou des pièges de fabrication maison (à gauche) permettent de surveiller le vol et de faire des piégeages de masse.	23
17	Utilisation d'un microscope pour identifier la <i>Drosophile</i>	24
18	(A) Le milieu nutritif artificielle (photo personnelle) ; (B) Elevage de <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	25

ملخص

المكافحة بالمبيدات الحشرية النباتية موصى بها كثيرا، فهي من بين الوسائل المتبعة من طرف النباتات للدفاع عن نفسها ضد أعدائها.

ذبابة الفاكهة (أو ذباب الفاكهة) التي تنتمي إلى عائلة *drosophilidae* نموذج تجريبي حديث ويمكن زراعته بسهولة.

يتعلق هذا العمل بالدراسة النظرية للكيمياء النباتية للمستخلص المائي لنبات السذاب ونشاطها البيولوجي على نوع من الذباب (*Drosophila melanogaster*).

فقد سلط الفحص الكيميائي النباتي الضوء على وجود les flavonoïdes, des alcaloïdes, tanins catéchiqية des tanins galliques, des quinones, des saponines و terpènes et les stéroïdes

الكلمات المفتاحية: الأيض الثانوي، السمية، الفيجل أو السذاب، المستخلص المائي، *Drosophila melanogaster*

Abstract

The fight by plant insecticides is highly recommended, among the means used by plants to defend themselves against their pests.

Drosophila melanogaster or ((fruit flies)) belonging to the family *Drosophilidae* is a modern experimental model and easily cultivated.

This work concerns the theoretical study of the phytochemistry of the aqueous extract of *Ruta graveolens* and their biological activity on a species of fly (*Drosophila melanogaster*).

Phytochemical screening highlighted the presence of flavonoids,, terpenes and steroids and the absence of gallic tannins, quinones, and saponins.

Key words: *Ruta graveolens*, *Drosophila melanogaster*, toxicity, secondary metabolites, aqueous extract.

Résumé

La lutte par les insecticides végétaux est très recommandée, parmi les moyens mis en œuvre par les plantes pour se défendre contre leurs déprédateurs.

Drosophila melanogaster ou ((mouches des fruits)) appartenant à la famille *drosophilidae* est un modèle expérimentale moderne et facilement cultivées.

Ce travail porte : sur l'étude théorique de la phytochimie de l'extrait aqueux de *Ruta graveolens* et leur activité biologique sur une espèce de la mouche (*Drosophila melanogaster*).

Le screening phytochimique a mis en évidence la présence, des flavonoïdes, les terpènes et les stéroïdes et l'absence des tanins galliques, des quinones, et des saponines.

Mots clés : *Ruta graveolens*, *Drosophila melanogaster* , toxicité, métabolites secondaires, extrait aqueux.

Introduction Générale

Introduction Générale

La biodiversité peut être comprise comme une étude de la différence, à savoir ce qui distingue et par la même rend originale deux entités voisines dans l'espace ou dans le temps (Blondel, 1975). La conservation de la biodiversité passe obligatoirement par une parfaite connaissance de la distribution de la faune et de la flore (Lobo *et al.*, 1997). Cette faune qui est représentée par toutes les espèces animales d'un écosystème, compte les insectes qui constituent près de 60% du règne animal (Pavan, 1986) et 50% de la diversité de la planète (Wilson, 1988).

Les invertébrés, représentent plus de 95% des espèces du règne animal, sont présents presque dans tous les types d'écosystèmes et constituent une part très importante de la biodiversité des milieux terrestres et aquatiques (Wilson *et al.*, 1999). L'embranchement des Arthropodes est celui, qui a le plus de succès sur notre planète. Cet embranchement est de très loin celui qui possède le plus d'espèce et le plus d'individus de tout le règne animal (80%) des espèces connues, soit plus d'un million d'espèces dont les trois quarts sont des insectes (Morin, 2002). C'est grâce à leur capacité et leur compétence vectorielle, que les arthropodes assurent la transmission de nombreuses maladies d'origine parasitaire (protozooses, helminthiases), bactériennes (rickettsioses) et virales (arboviroses) (Chabasse, 2001; Parola, 2005).

Les insectes jouent un rôle considérable dans l'équilibre biologique de la nature mais l'Homme, les classes en espèces utiles ou nuisibles (Ebeling, 1978). En effet, malgré un rôle écologique incontestable, les insectes peuvent avoir une incidence économique néfaste sur les productions agricoles et être responsables de la transmission d'agents pathogènes à l'homme ou à l'animal. Les méthodes de lutte contre ces espèces nuisibles sont basées, généralement, sur l'utilisation de molécules chimiques ou pesticides de synthèse (Ouédraogo, 2005).

L'application de ces produits chimiques, parfois de façon irraisonnée, a engendré des problèmes inattendus, tels que le développement de phénomènes de résistance aux molécules de synthèse, l'extermination des antagonistes naturels, les effets nocifs sur la santé humaine et animale et les problèmes liés à la pollution de l'environnement. Dans ce cadre, et dans les années 1970-1990 la recherche a développé des insecticides moins toxiques et plus spécifiques, basés sur des données physiologiques de l'insecte comme les phéromones ou encore les régulateurs de croissance dénommés InsectGrowthRégulator (IGRs) qui perturbent le développement et la reproduction des insectes (Dhadialla *et al.*, 2005). Parmi les « bio pesticides » ou produits dérivés de sources naturelles (Miller *et al.*, 1983)

L'utilisation des extraits des plantes comme insecticides est connue des puis longtemps (Aouinty *et al.*, 2006). Parmi plusieurs huiles essentielles celles de la famille des *Labiatae* ont reçu une attention considérable dans la recherche des produits naturels pour lutter contre les insectes (Benayad, 2008).

Notre étude est structurée en trois chapitres

Chapitre 01 : Présentation et screening phytochimique de l'extrait de *Ruta graveolens*

Chapitre 02 : Présentation de *Drosophila melanogaster*

Chapitre 03 : Screening phytochimique et l'activité larvicide d'extrait de *Ruta graveolens*

Présentation de la plante

Ruta graveolens

Chapitre 01 : Présentation de la plante *Ruta graveolens*

1. Présentation de la plante *Ruta graveolens*

Ruta graveolens L'appelée communément rue fétide, rue des jardins, herbe de grâce, rue officinale, ou rue commune est un arbrisseau de la famille des *Rutaceae* du genre *Ruta*. C'est une plante méditerranéenne semi arbustive, d'un mètre de haut environ, très ramifiée et ligneuse à la base. Ses feuilles d'un vert terne, semi persistantes, sont alternes, pennatiséquées et de consistance un peu charnue. La floraison s'étend de mai à août. Ses fleurs, regroupées en corymbe, sont composées de 4 à 5 pétales jaunes verdâtres soudés à la base, du même nombre de sépales et de 8-10 étamines. La plante est hermaphrodite et entomogame. Les fruits sont des capsules déhiscents libérant à maturité de petites graines noirâtres. Le mode de dissémination des graines est barochore.



Figure 1 : *Ruta graveolens* (photo personnelle).

2. Caractéristiques botaniques :

Ruta graveolens caractérise par une odeur forte, acre et pénétrante émise par les huiles contenues dans les poches schizolysigènes à la surface des feuilles. *Ruta* vient du grec 'rhyté' qui signifie sauver, prévenir, ou de 'reô' qui signifie qui coule faisant certainement référence à ses vertus emménagogues ; *gravelons* vient du latin 'gravis' qui signifie fort et du verbe 'ollaire' qui veut dire sentir, donc odeur forte et désagréable (Doerper Sébastien, 2008).

3. Classification botanique : (Wiart, 2006 ; Bonnier, 1999)

- Règne : Plantae
- Sous règne : Tracheobionta
- Super division : Spermatophyta
- Division : Magnoliophyta
- Sous division : Angiospermae
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Rosidae
- Super ordre : Rutanae
- Ordre : Sapindales
- Famille : Rutaceae
- Genre : Ruta
- Espèce : *Ruta graveolens*

4. L'origine :

La rue des montagnes appartient à la famille des Rutaceae, elle comporte environ 700 espèces spontanées et est présentes dans les lieux arides de la région méditerranéenne sous un climat tempéré et chaud. Donc présente en Espagne, Portugal, Italie septentrionale, Grèce, Turquie; Afrique septentrionale et Asie Mineure et Caucase (Hammiche *et al.*, 2013). Elle a été la première plante introduite sur le continent américain (Heinrich *et al.*, 2006).

5. Exigences et culture :

Culture : en plein soleil ou à l'ombre partielle, de même au sec, dans un sol assez riche, de préférence très bien drainé, mais la rue accepte bien les terres argileuses, fortes. La multiplication se fait par semi ou bouturage (Doerper, 2008).

6. L'utilisation de la plante

Pendant longtemps, *R. graveolens* a été utilisé comme médicament de folklore pour le traitement de diverses conditions telles que des problèmes oculaires, les rhumatismes, la dermatite, la douleur et de nombreuses maladies inflammatoires et l'hypertension Il agit comme un emménagogue sous l'effet de la rutine et stimule la fibre de base utérin.

D'après les études pharmaceutiques actuelles, les applications pharmaceutiques supplémentaires de *R. graveolens* ont révélé un antioxydant, un anti-inflammatoire, antidiabétiques, antibactérien, antifongique, anti androgène, insecticide entre autres effets (Dahchar Zineb, 2017)

6.1. Usage Médicinale

- **Peau:** l'effet de la rue sur la peau revêt deux aspects. D'une part, la rue, comme plusieurs rutacées et certaines ombellifères, contient des composés susceptibles de provoquer des dermatites sous l'action du soleil. D'autre part, il est reconnu depuis longtemps que le jus ou la sève des feuilles de la rue sert d'antidote contre les morsures de serpent, les piqûres d'insectes et les allergies dues aux plantes. Elle servirait également à soigner les maladies de peau comme le psoriasis ainsi que les blessures (Ait, 2006)

- **Système nerveux:** la rue est antispasmodique. Les Arabes en mâchent les feuilles, ce qui est sensé calmer tout trouble d'origine nerveuse. Les feuilles fraîches écrasées en application externe soulagent la sciatique. Traditionnellement, la rue était utilisée dans les cas d'épilepsie.

Les victimes de la maladie portaient des feuilles de rue au cou pour prévenir les crises (Ait,2006).

- **Circulation sanguine:** une des propriétés reconnues de la rue est sa capacité pour abaisser la pression artérielle, ce qui en fait une plante utile pour le traitement des vaisseaux sanguins.

La rue accroît également le flot sanguin du système gastro-intestinal, protégé dans le cas de coliques ou troubles digestifs (Ait, 2006).

- **Sens:** les anciens reconnaissaient les vertus de la rue dans les cas de trouble de la vue. En homéopathie, le jus extrait des plantes fraîches est utilisée pour renforcer la vue, il conseille pour soigner les cataractes de dissoudre les fleurs de rue dans un plat d'eau peu profond exposé au soleil. On baigne les yeux plusieurs fois par jour avec le liquide jaune obtenu en pressant les fleurs ayant trempées dans l'eau. Le jus chauffé soulagera les maux d'oreilles (Ait,2006)

- **Fertilité:** le pouvoir de la rue est redoutable en ce domaine, la plante agissant sur l'utérus.

En petites doses, la rue est bonne pour le soulagement des dysménorrhées. A plus forte dose, la rue est abortive et son utilisation a donc été envisagée comme 'pilule du lendemain'.Autrefois, la rue était utilisée comme anaphrodisiaque pour encourager à la chasteté (Ait, 2006).

6.2. Usage Vétérinaire

La rue a déjà été employée dans de nombreux remèdes vétérinaires surtout pour aider à la délivrance et contre la météorisation chez les bovins, caprins et ovins.

D'autre usages, ceux-là empiriques, incluent le traitement des fièvres persistantes des bovins, les parasites intestinaux; de la morve des chevaux; des parasites externes et la prévention de la rage. En homéopathie animale, la rue entre dans la composition d'un remède antirhumatismal et d'une poudre calcique (Ait, 2006).

6.3. Autre Utilisation :

Huile de rue est extrait de la rue qui est une plante permet comme le séné d'attaquer le djinn et la sorcellerie dans le ventre, elle est efficace surtout quand le séné ne donne pas de résultats. *Ruta graveolens* est prescrit en rhumatologie pour soulager les douleurs au niveau des articulations. Il aide également à soulager les tendinites, les périarthrites, les lombalgies et les pubalgies. *Ruta graveolens* est par ailleurs efficace pour faire disparaître la sensation de lourdeur ainsi que les douleurs survenant après un effort, elle est aussi indiquée pour traiter les troubles ophtalmologiques.

7. Préparation de l'extrait végétal

Nous avons rassemblé les échantillons de la Montagne de Ouenza le : 12/02/2020 sous la température modérée de 8 degrés.

Ensuite séchée à l'air libre pendant (07-15 jours). A l'issue de cette étape, puis broyées avec un mixeur électrique jusqu'à obtenir une poudre fine.

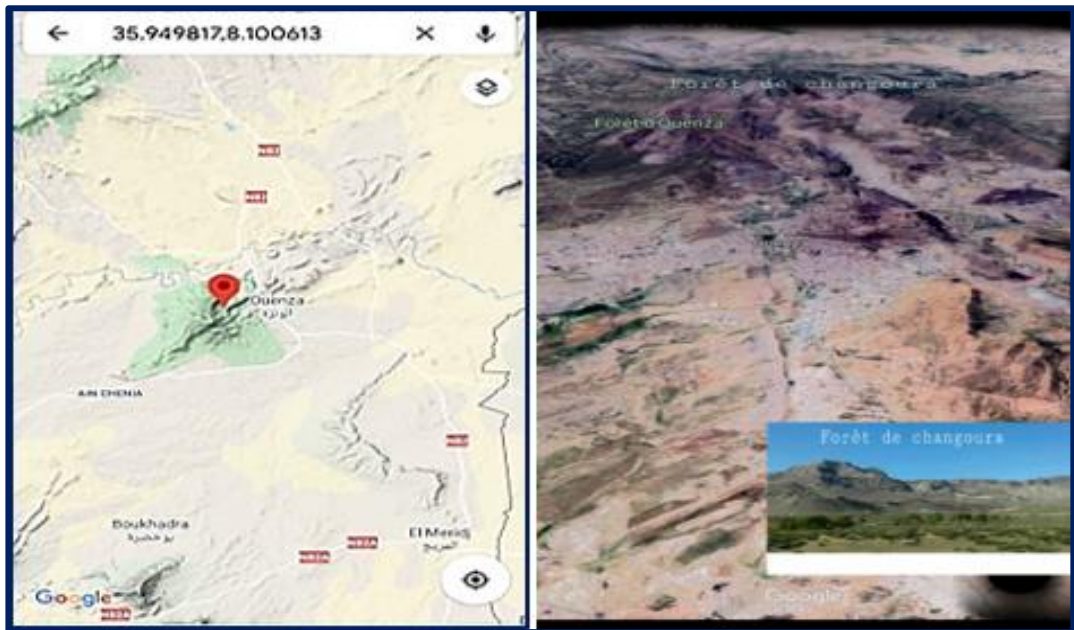


Figure 2 : Région géographique d'échantillonnage



Figure 3: zone d'échantillonnage (image personnelle)

L'extrait aqueux est obtenu par solubilisation des fractions actives dans la solution aqueuse de méthanol (4 : 1), (400 de méthanol, et 100 d'eau distillée) et divisé cette solvant en deux. Dans la 1ère macération en ajoute 80 grammes de la poudre végétale est misent dans un Bucher de 500 ml capacité avec suffisamment de la solution aqueuse de méthanol 250 ml, Le mélange est agité pendant 40 minute par un agitateur magnétique ; puis filtrés sur du papier filtre standard de type FIORONI R0122A00010, (Figure 04) et obtient le filtrat.

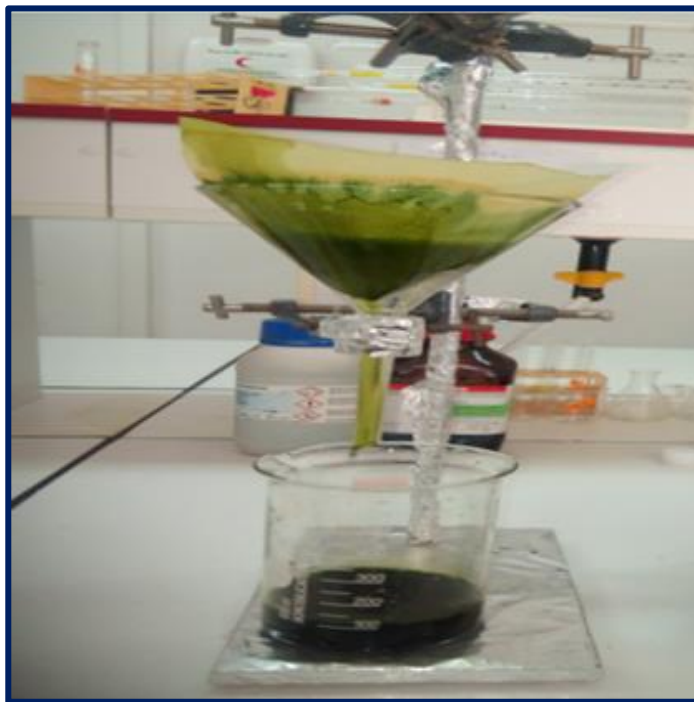


Figure 4 : La 1ère Filtration de Mélange sur un papier Filtre (image personnelle)

Et dans le 2ème macération en prend la poudre est misent avec 250 ml de solvant pendant 24 heures, après 2ème filtration en mélange les deux filtrats (Figure 05).



Figure 5: Le Mélange des deux filtrats

Pour éliminer le méthanol, le filtrat est soumis à une évaporation Sous vide à l'aide d'un Rotavapeur de type IKA-WERKE GMBH et CO KG référence D-79921 RV06-ML (Figure. 06), pendant 10 à 20 minute. Le produit obtenu, est un extrait aqueux conservé dans un bocal hermétiquement fermé ,et couvert par du papier aluminium à une température avoisinant à 4 C° est utilisé par la suite aux tests biologiques.(Kemassiet *al.*, 2008)

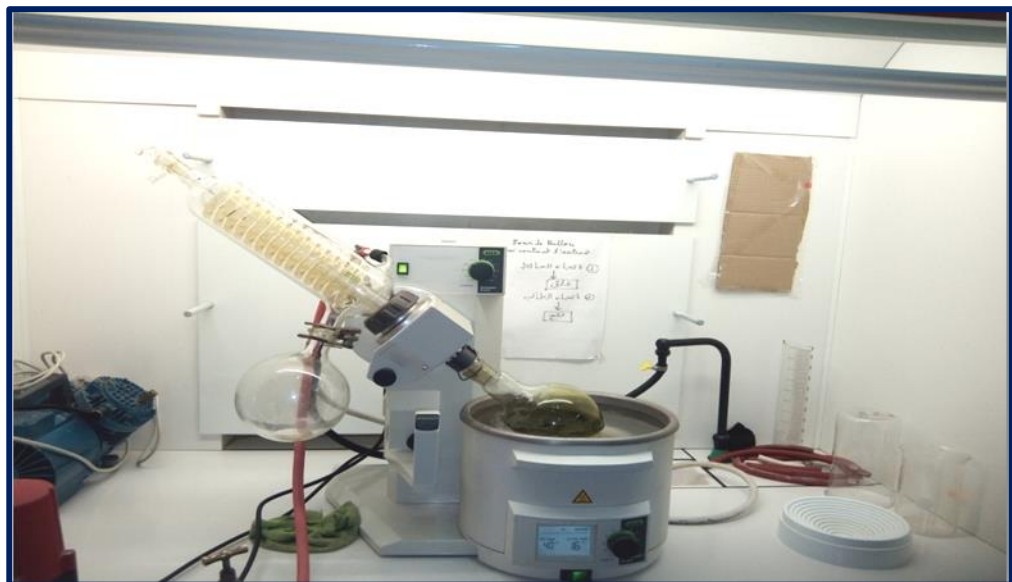


Figure 6: Photographie représentant un appareil Rotavapeur (photo personnelle)

8. Screening phytochimiques

Les métabolites secondaires sont un groupe de molécules qui interviennent dans l'adaptation de la plante à son environnement ainsi que la régulation des symbioses et d'autres interactions plantes-animaux, la défense contre les prédateurs et les pathogènes, comme agents allélopathiques ou pour attirer les agents chargés de la pollinisation ou de la dissémination des fruits (Judd *et al.*, 2002).

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure-dépendant (Makkar, Siddhuraju et Becker, 2007)

8.1. Recherche des flavonoïdes et des leucoanthocyanes

Principe

En présence de NaOH 1N, de HCl concentré, et des copeaux de Magnésium, 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 leuco anthocyanes.

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, 1ml d'eau distillée, et 1ml 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, flavonels, flavonones, isoflavones, et leucoanthocyanes.

8.2. Recherches des quinones

Principe

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

Mode opératoire

Broyer 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.

8.3. Recherche de saponines

Principe

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 160mm 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 de H₂SO₄ 1N et K₂CrO₃ à 10 % (chrome de potassium).

8.4. Recherche des tanins

Principe

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 FeCl₃. La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

8.5. Recherche des terpenoïdes, et des stéroïdes

Principe

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 terpénoïdes 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 terpénoïdes.

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 terpénoïdes.

8.6. Recherche des alcaloïdes

Principe

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 SONNENSCHNEIN.

Toute fois selon Abisch la présence des alcaloïdes n'est confirmée que lorsque chacun de six réactifs donne un précipité.

Mode opératoire

Prendre 1 g de poudre de matière végétale sèche qu'on met à macérer 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.

Chapitre 02 :Présentation de
Drosophila melanogaster

Chapitre 02 : Présentation de *Drosophila melanogaster*

1. présentation de la Mouche « *Drosophila melanogaster* »

Drosophile est un genre de petites mouches, appartenant à la famille *Drosophilidae*, dont les membres sont souvent appelés «mouches des fruits» ou (moins souvent) grignons mouches, vinaigre mouches, ou vin mouches, une référence à la caractéristique de nombreuses espèces de se attarder autour mûrs ou fruits pourris. Ils ne doivent pas être confondus avec *Tephritidae*, une famille liée, qui sont aussi appelés les mouches des fruits (parfois appelé "véritables mouches des fruits»); *tephritidés* nourrissent principalement immatures ou mûrs fruits, avec de nombreuses espèces étant considérées comme destructrices parasites agricoles, en particulier la mouche méditerranéenne des fruits. Une espèce de drosophile en particulier, *D. melanogaster*, a été fortement utilisé dans la recherche sur la génétique et est un commun organisme modèle en biologie du développement. Les termes «de mouches des fruits» et « *Drosophila*» sont souvent utilisés indifféremment avec *D. melanogaster* dans la littérature biologique moderne. Ce sont des insectes très communs vivant souvent à proximité des activités humaines. La majorité d'entre elles sont frugivores, avec une préférence pour les fruits très mûrs ou même pourris ; les autres espèces se nourrissent de champignons, de fleurs ou sont prédatrices d'autres invertébrés. A peu près 3000 espèces de drosophiles ont été décrites dans le monde, se répartissant en 65 genres dont le fameux genre *drosophila* (Powell, 1997 in anonyme 2012). La première drosophile fût décrite par Fabricius en 1787 sous le nom de *Muscafunnebris*, le genre *Drosophila* apparu plus tard en 1823, créé par Fallen (Tsacas et Bocquet, 1976 in anonyme 2012). L'ensemble du genre, cependant, contient plus de 1500 espèces et est très diversifiée en apparence, le comportement et l'habitat de reproduction.

Drosophila sont de petites mouches, généralement jaune pâle à brun rougeâtre au noir, avec les yeux rouges. De nombreuses espèces, y compris les images-ailes hawaïennes constatées, ont distinctes motifs noirs sur les ailes. La plumeuses (plumes) Arista, hérissés de la tête et du thorax, et nervures de l'aile sont caractères utilisé pour diagnostiquer la famille. La plupart sont de petite taille, environ 2-4 millimètres de long, mais certains, notamment de nombreuses espèces hawaïennes, sont plus grandes que d'une mouche domestique.

Drosophila melanogaster est un animal expérimental populaire parce qu'il est facilement cultivées en masse sur la nature, a un temps de génération court, et les animaux mutants sont faciles à obtenir. En 1906, Thomas Hunt Morgan a commencé son travail sur *D. melanogaster* et rapporté sa première constatation d'un blanc (yeux) mutant en 1910 à la communauté universitaire. Il était à la recherche d'un organisme modèle pour étudier l'hérédité génétique et

requis une espèce qui pourrait acquérir hasard mutation génétique qui serait visiblement manifeste que les changements morphologiques dans l'animal adulte. Son travail sur la drosophile lui a valu le 1933 Prix Nobel de médecine pour l'identification des chromosomes en tant que vecteur de l'héritage de gènes. Ceci et d'autres *Drosophila* espèces sont largement utilisés dans des études de la génétique, embryogenèse, et d'autres domaines.

Drosophila melanogaster (Figure 07) est un insecte hygrophile, et holométabole à la métamorphose complète (Colombani et al., 2006) ; cette mouche est de couleur brune rougeâtre avec des anneaux reversaux noirs à travers de l'abdomen, elle vit dans les maisons, les caves et très attirée par le vinaigre et les fruits fermentés (Wolfgang et werner, 1992) d'où son nom mouche du vinaigre. Cet insecte présente un dimorphisme sexuel où le mâle est plus petit que la femelle ; sa taille varie de 2 à 3 mm.



Figure 7: *Drosophila melanogaster* (Mohamed Ali Naqvi, 2006)

2. Caractéristiques

La *drosophile* est un insecte hygrophile (qui aime l'humidité) et luciole (qui aime la lumière) les Adultes mesurent 3mm de long ce qui nécessite de les observer sous une loupe binoculaire Figure 07.

Ces mouches sont de couleur brun jaunâtre, avec des anneaux transversaux noirs à travers l'abdomen. Elles ont des yeux rouges vifs et présentent un dimorphisme sexuel. Les femelles mesurent environ 3 à 4 millimètres de long et les mâles sont un peu plus petits de 2 à 3mm avec la partie arrière de leur corps plus foncée (Figure.08-B). Les antennes sont courtes et possèdent une extrémité plumeuse. De plus, cette mouche possède des ailes de taille réduite et chiffonnée. Pour un néophyte qui essaierait de décrire la différence entre les sexes sous un

microscope, le caractère distinctif le plus marquant est probablement l'amas de poils entourant l'anus et les parties génitales du mâle. (Anonyme, 2013).

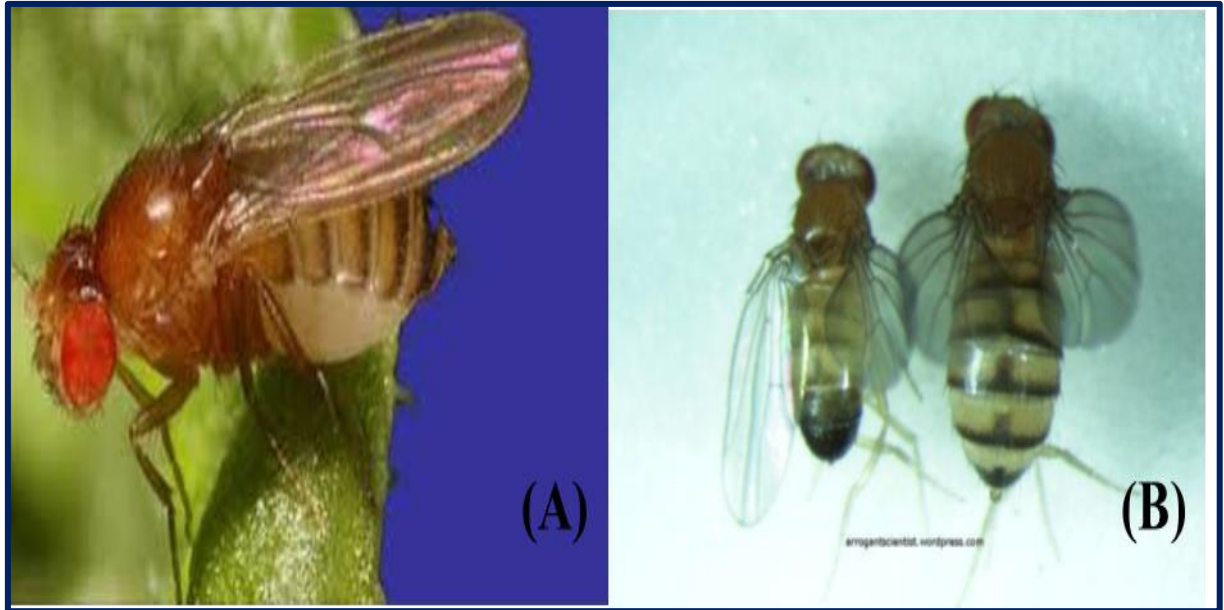


Figure 8 : (A) un adulte de *drosophile* ; (B) male (à gauche) et femelle (à droite)

Le male de *Drosophila* a un patch de poils (les bits noires au-dessus) sur leurs pattes antérieures, utilisés pendant la parade nuptiale, que les femmes ne le font pas. Si elle a des peignes de sexe est un mâle. Cette méthode est probablement la plus précise, mais rarement utilisé pour sexe drosophile dans la pratique. (Figure 09).



Figure 9 : Peignes sexuels sur une mouche mâle.

Et une autre méthode pour distinguer le male de la femelle est de simplement regarder leurs organes génitaux. (Figure 10)



Figure 10: Organes génitaux chez la *drosophile*, vue de face(A) et vue de côté(B). (male à gauche, femelle droite).

3. Caractérisation du contexte écologique de *Drosophila melanogaster*

La *drosophile* (droso = rosée, phile = qui aime) est également appelée communément « mouche du vinaigre » pour son attirance envers les produits fermentés. Elle a une alimentation très variée, se nourrissant sur les fruits et légumes fermentés, les végétaux et champignons en décomposition et les liquides fermentés et sucrés.

4. Répartition géographique

Les *drosophiles* se trouvent dans le monde avec la répartition suivante :

En Asie : inde, japon(1916), chine, Corée (1936), Birmanie, Russie et Thaïlande.

- En Amérique du nord : canada (Colombie-Britannique en 2009),
- Etats-Unis : Hawaï, Californie(2008), Oregon(2009), Washington(2009).
- En Amérique centrale : Costa Rica(1997) et équateur(1998).
- En Europe : Italie (septembre 2009),
- Espagne : catalogne(2009). France : alpes- maritime, corse, grade et var (mai- juin 2010).

5. L'habitat :

Elle vit dans les maisons, les caves, les fabriques de vinaigre et de confitures et il est très attirée par le vinaigre et les fruits fermentés (Wolfgang et Werner, 1992) d'où son nom : « mouche du-vinaigre ».

6. Plantes hôtes :

Les femelles préfèrent pondre dans des fruits mûrs bien qu'elles peuvent aussi pondre sur des fruits verts ou trop mûrs (BiosecurityAustralia , 2010). Les plantes hôtes connues sont :

- *Prunus spp* (cerisier, abricotier, pêché, prunier)
- *Rubus sp* (framboisier, mûre...)
- *Vaccinium sp* (myrtille)
- *Fragaria sp* (fraisier)
- *Ficus caricasp* (figuier)
- *Actinidia sp* (kiwi)
- *Vitis vinifera sp* (raisin de table et de cuve)
- *Malus domestica sp* (pommier)
- *Solanum lycopersicum sp* (Tomate)
- *Diospyros kaki*
- *Pyrus pyrifolia sp*
- Position systématique :

7. La Classification de cet insecte est :

- Règne : *Animalia*
- Embranchement : *Arthropoda*
- Sous-embranchement : *Hexapoda*
- Classe : *Insecta*
- Sous-classe : *Pterygota*
- Infra-classe : *Neoptera*
- Ordre : *Diptera*
- Sous-ordre : *Brachycera*
- Famille : *Drosophilidae*
- Sous-famille : *Drosophilinae*
- Genre : *Drosophila*
- Sous-genre : *Sophophora*
- Groupe : *melanogaster*
- Espèce *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (wikipedia , 2013)

8. Mode de Reproduction

D. melanogaster est caractérisée par une reproduction très rapide (Griffiths *et al.*, 2002) ; élevé au laboratoire, se reproduit toute l'année, sans interruption, avec une nouvelle génération tous les 10 jours à une température de 25°C donnant ainsi plus de 30 générations par ans.

- Période de reproduction : toute l'année.
- Cycle de vie : deux semaines à 25°C, quatre semaines à 18°C.
- Les femelles peuvent pondre jusqu'à 400 œufs.
- La larve sort de l'œuf après 24h, croît pendant cinq jours et mue deux fois (24h et 48h après l'éclosion).
- Les larves s'encapsulent dans le patagium où ils se métamorphosent en adulte en 5 jours (Patterson *et al.* , 1943).

9. Cycle de vie de la *Drosophile* :

La *drosophile* C'est un insecte holométabole: Juste après la fécondation, les femelles pondent leurs œufs et l'embryon se développe. Le stade embryonnaire dure 24 h et à la fin de l'embryogenèse, une larve de premier stade émerge. (Terhzaz ,2003). Après l'éclosion de l'œuf, son développement larvaire comprend trois stades, et est caractérisé par une forte activité alimentaire. Puis la larve du dernier stade arrête de manger, s'immobilise et forme une puppe.

La puppe subit alors une métamorphose (transformation complète) transformant progressivement son organisme larvaire en organisme adulte. A l'émergence, l'imago commence à s'alimenter. Il passe encore par une phase de 8 à 12h d'imaturité où son système nerveux finit de se développer, puis le nouvel adulte devient sexuellement mature et s'engage dans la reproduction (Figure 11).

La durée de vie de l'adulte a été évaluée à 5 jours en conditions naturelles (Rosewell et Shorrocks, 1987). Les *drosophiles* ont une stratégie de reproduction de type itéroparité (par opposition avec la stratégie de semelparité ; (Costa ,2006), c'est à dire que les femelles se reproduisent plusieurs fois au cours de leur cycle de vie et pondent des œufs en grande quantité à différents endroits et à plusieurs périodes de temps. Cette stratégie se base sur le fait que la probabilité de survie d'un adulte est plus élevée que la probabilité de survie d'un individu de la progéniture. Le temps de génération est court (environ 10 jours à 25°C), et le mode de reproduction induit un grand nombre de descendants à chaque génération (Figure 15)

Donc Le cycle de vie se divise en quatre phases durant lesquelles les individus prennent des morphologies très différentes : l'œuf (stade embryonnaire), la larve (stade larvaire), la

pupe (stade pupal) et l'imago (stade adulte). La durée de ces stades est variable d'après la température de culture.

9.1. Fécondation et ponte :

Les femelles peuvent être fécondées dès la 8^{ème} heure après leur émergence. En général, une femelle n'est fécondée qu'une seule fois dans sa vie et utilise les spermatozoïdes stockés dans sa spermathèque. La ponte commence dès le deuxième jour de la vie adulte.

9.1.1. Œufs

La femelle pond des centaines d'œufs sur des fruits en putréfaction ou d'autres matières humides ou en fermentation. Les œufs pondus sont à peine visibles, de couleur blanchâtre, d'environ 0,5 mm de long et ont la forme d'un ballon de rugby.



Figure 11: œuf de *Drosophile*

9.1.2. Stade larvaire

Une trentaine d'heures après la ponte, les œufs vont éclore pour donner naissance à une larve blanchâtre appelée aussi « asticot ». Celle-ci se nourrit alors de la pulpe du fruit en creusant des galeries. La *drosophile* vit sous forme de larve durant 5 à 6 jours environ en passant par 3 stades larvaires, pendant lesquels elle mange, croît et mue (Compbel et Reece, 2004).



Figure 12: Un des stades larvaires (asticot)

9.1.3. Stade pupal

Les périodes embryonnaire et larvaire se succèdent et conduisent à la formation d'une pupe. La taille de l'animal est déterminée par la taille de la larve à l'issue d'une période de forte croissance larvaire (Colombani *et al.*, 2006 ; la larve rampe jusqu'à une portion sèche des aliments, ou à l'extérieur et après plusieurs jours passés sous forme de pupe, apparaît, enfin l'adulte (Compbel et Reece, 2006 ; Watson. J. D, 1928.).



Figure 13: (A) Pupe ; (B) Pupe (photo personnelle)

9.1.4. Stade adulte

Après 5 jours, la jeune *drosophile* adulte non encore pigmentée sort de la pupette au bout de 8 heures la pigmentation est terminée et les ailes sont gonflées. Les adultes s'alimentent des

fruits mûrs ou avariés, des végétaux et des champignons en décomposition ainsi que les liquides fermentés (Tracqui et Demongeot, 2003).



Figure 14 : Ecllosion les ailes pas encore déployées

Les femelles sont fécondables (matures sexuellement et s'accouplent environ 12 heures après être sorties de leur pupa. Elles stockent le sperme des mâles auxquels elles se sont accouplées pour pouvoir l'utiliser ultérieurement et commencent à pondre un jour plus tard (Tracqui et Demongeot, 2003).

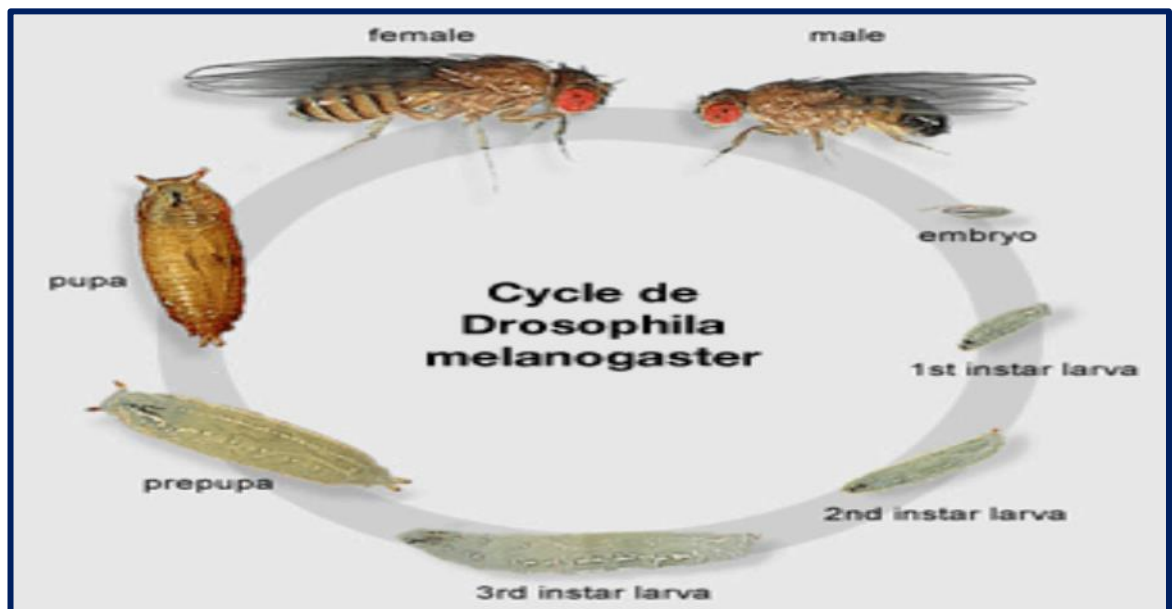


Figure 15: Cycle de vie de la *Drosophila melanogaster*

10. Rôle écologique :

Cette petite mouche sert de nourriture à plusieurs espèces d'animaux insectivores. Elle contribue à accélérer le processus de décomposition des végétaux sur lesquels elle pond ses œufs. (Ramade, 2003)

11. moyens de lutte :

La lutte contre la *Drosophile* est une combinaison de mesures incluant la surveillance, la lutte culturale (mesures d'assainissement, récolte au moment opportun) et des traitements avec des insecticides homologués (Jacquet *et al.*, 2002).

11.1. La lutte biologique (culturale)

Les moyens de lutte culturale sont importants pour la maîtrise de ce ravageur.

- L'élimination des fruits tombés ou trop mûrs, la cueillette au moment opportun et l'éradication des hôtes sauvages permettent de réduire les populations. (Jacquet *et al.*, 2002)- Le compostage ne constitue pas une solution fiable pour détruire les œufs et les larves dans les fruits. Il faut enterrer tous les fruits de rebut (à 30 cm et plus) ou les éliminer dans un contenant scellé. (Gillespie, 1988).

- Retirer les fruits non vendables du champ. Ne pas laisser les fruits déclassés exposés pendant plus d'une journée.

11.2. La lutte chimique :

Quand on détecte les mouches dans les pièges et que les fruits sont à un stade sensible (dès qu'ils commencent à se colorer), il faut appliquer un insecticide. (Jacquet *et al.*, 2002). Il faut protéger les fruits dès qu'ils commencent à se colorer jusqu'à la fin de la cueillette. Il faudra peut-être une autre application selon l'activité résiduelle du produit.

11.3. Symptôme et dégât

La *drosophile* est responsable de l'installation de la pourriture grise.

Les symptômes sont observés après la véraison :

- grappes serrées, ternes, grisâtres.
- les baies dégagent une odeur aigre et renferment de nombreuses larves.

Les grappes atteintes par les drosophiles donnent en cuve un goût désagréable d'amertume au moût, ou engendrent des piqûres acétiques. (The Dow Chemical Company (1995-2015) Les fruits attaqués sont reconnaissables par la présence de petites cicatrices à la surface du fruit (trous) engendrées par les piqûres d'oviposition. En se développant, la larve se nourrit de la pulpe, ce qui entraîne un affaissement de l'épiderme autour du site de nutrition (Chouibaniet

al.,2003) Les plaies créées facilitent l'installation d'autres maladies et ravageurs (maladies cryptogamiques, bactéries...) qui contribueront à la détérioration du fruit.

Les dégâts causés par une attaque de *Drosophila* peuvent provoquer une perte de la totalité de la production (Verger *et al.*,2005).

11.4. Piégeage des *drosophiles* adultes :

Les producteurs et les dépisteurs peuvent surveiller la présence de la *drosophile* en plaçant des pièges appâtés dans les cultures vulnérables et en vérifiant leur contenu une ou deux fois par semaine (Keiding ,1977).La conception des pièges fait l'objet d'intenses recherches. On peut se procurer des pièges préfabriqués ou les faire soi-même.

Jusqu'à maintenant, l'expérience semble montrer que les pièges maison sont efficaces. Ces derniers doivent être munis de couverts pour empêcher la pluie d'y pénétrer et être suffisamment solides pour résister au vent. Les pièges peuvent être fabriqués avec des contenants en plastique transparent (250-750ml) munis de couvercle étanche, comme des contenants commerciaux de 500ml. Percer de nombreux petits trous de 3 à 4 mm de diamètre sur les côtés du contenant, ce qui empêchera les insectes plus gros d'y pénétrer tout en permettant aux mouches à vinaigre d'y entrer. Faire deux autres trous vis-à-vis l'un de l'autre de manière à ce que les pièges puissent être suspendus à l'aide d'attaches de jardin ou avec un mince fil flexible.

La recherche montre que l'efficacité des pièges augmente avec la surface des orifices de ventilation; par conséquent, plus il y a de trous ou de surface ouverte dans le piège, plus il sera efficace. Éviter toutefois de percer des trous sur tous les côtés du contenant pour qu'il ne soit pas trop difficile de verser le contenu du piège dans le contenant principal (Warlopet *al.*,2000).

Des pièges doivent être posés pour contrôler la présence éventuelle du ravageur dans les cultures sensibles (fraises, cerises, myrtilles framboises, mûres, raisins, baies sauvages aux environs des vergers). Il faut suspendre ces pièges quand les fruits changent de couleur. On utilisera des boîtes ou des bouteilles en plastique fermées dont la partie supérieure sera percée de trous d'environ 5 millimètres de diamètre faits avec une aiguille chaude. Laisser un côté sans trous pour faciliter la vidange des bouteilles.

Comme appât, mettre dans les récipients le mélange suivant:

1. 50 % d'eau
2. 40 % de vinaigre de pomme
3. 10 % de vin rouge
4. 2 gouttes de savon ou de détergent pour la vaisselle



Figure 16 : Des pièges-gobelets du type Becherfalle (à droite) ou des pièges de fabrication maison (à gauche) permettent de surveiller le vol et de faire des piégeages de

11.5. Composition exacte de l'appât

Les pièges seront suspendus dans des endroits ombragés dans les bords des parcelles et régulièrement contrôlés. L'appât liquide doit être changé toutes les deux semaines. Après utilisation, l'appât liquide ne doit pas être versé dans les cultures lors du contrôle des pièges. Les mâles sont facilement reconnaissables à leurs taches sombres sur les ailes, et on peut en général tabler sur un rapport mâles-femelles d'environ 1:1.

Pour déterminer si les fruits sont attaqués, mettre des échantillons de 100 fruits au congélateur pendant quelques heures. Les larves sortent des fruits et peuvent être comptées. Une alternative consiste à écraser les fruits dans une solution d'eau salée (350 g de sel par litre).

Après 10 minutes environ, les larves apparaissent à la surface et peuvent être comptées. Placer au moins deux pièges par site. Dans le cas de sites couvrant plus de deux hectares, installer un ou deux pièges pour chaque hectare additionnel. Vider le contenu des pièges dans un contenant principal et remplacer les appâts chaque semaine.

La prochaine étape consiste à déterminer si les pièges contiennent des *drosophiles*. Alors que les mâles peuvent être identifiés avec un grossissement minimal, il faut un microscope pour identifier les femelles (Jacquet *et al.*, 2002).



Figure 17: Utilisation d'un microscope pour identifier la *Drosophila*

11.6. Alimentation :

Les adultes se nourrissent de fruits mûrs ou avariés, de végétaux et de champignons en décomposition, ainsi que de liquides fermentés (bière, vin, cidre, vinaigre). Ils s'alimentent aussi de nectar et d'autres solutions sucrées.

Les larves se développent sur divers matériaux sucrés ou fermentés, habituellement d'origine végétale, qui produisent des éthers et des esters. Ceci favorise la croissance des levures dont les larves se nourrissent. (Tracqui et Demongeot, 2003).

11.7. Technique d'élevage de *Drosophila melanogaster*

L'élevage des *drosophiles* en laboratoire est réalisé à une température de 25°C, une hygrométrie de 70% et une Scot phase de 12 h Le milieu nutritif artificiel (figure 16) préparé au niveau de notre laboratoire est un milieu gélosé à base de farine de maïs et de levure de bière.

La recette à chaud préparée est composée essentiellement de 33,3 g semoule de maïs, 33,3 g levure de bière, 4,8g d'agar-agar, et 10 ml d'antifongique (mét yl-hydroxy-4-benzoate à 10%).

Les *drosophiles* sont élevées dans des flacons de plastique et bouchés par un tampon de mousse (Figure 18)

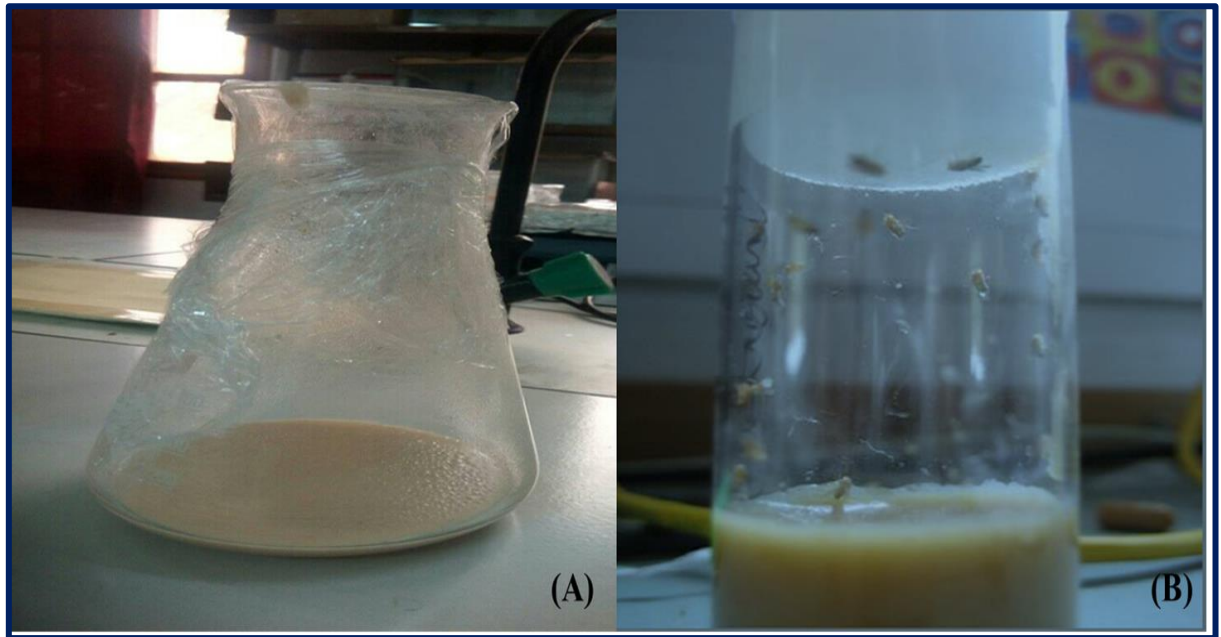


Figure18: (A) Le milieu nutritif artificielle (photo personnelle) ; (B) Elevage de *D. melanogaster*

**Chapitre 03 : Screening
phytochimique et activité
larvicided'extrait *Ruta
graveolens***

Chapitre 03 : Screening phytochimique et activité larvicide d'extrait *Ruta graveolens*

1. Screening phytochimiques de l'extrait *Ruta graveolens*

Les composés phénoliques participent à la coloration des organes végétaux, et jouent à ce titre-là un rôle important dans l'interaction de la plante avec son environnement biologique soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Macheixet *al.*, 2005 ; Collin et Crouzet, 2011). Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits, et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (Macheixet *al.*, 2005).

Le screening phytochimiques réalisé, a révélé la richesse de *Ruta graveolens* en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes (flavoneles, flavone, anthocyanes), tanins catéchique, les stéroïdes, des terpènes, des alcaloïdes et des huiles essentielles. Et l'absence des tanins galliques, les quinones, et les saponines.

D'après les résultats obtenus sur la plante de *Ruta montana* ont montré que la présence des flavonoïdes, Tanins gallique et Catéchique, Les hétérosides, stérols, coumarines et protéines et l'absence des anthocyanes et quinones. Ces résultats montrent la richesse de la partie aérienne de la plante en polyphénols et flavonoïdes et une très faible quantité en tanins Comparativement aux résultats de *Ruta graveolens*, on note presque les même composition chimique avec *Ruta montana* et l'absence des tanins gallique chez le *Ruta graveolens*.

Etude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante d'une plante médicinale *Ruta montana* collectée de la région de Mostaganem. L'étude menée par Attou (2011) sur *Ruta chalepensis* L., récoltée à « AinTemouchent» (Ouest Algérien), affirme également sa richesse en coumarines, flavonoïdes, alcaloïdes, tanins, stérols et triterpènes. D'après plusieurs auteurs, Les résultats des tests phytochimiques des tiges et des feuilles de trois espèces : *Ruta chalepensis*(Mostaganem), *Ruta angustifolia* (Bordj Bou Arreridj) sont renferment des acides aminés, saponines, alcaloïdes, flavonoïdes, coumarines et fur coumarines, tannins, huiles essentielles, glycosides, stérols et les tri terpènes (Hnatyszynet *al.*, 1974 ; Chen *et al.*, 2001).

2. Effet de la plante *Ruta graveolens* sur d'autres insectes (moustique mouche)

À cause de leur effet négatif sur l'environnement, l'utilisation des insecticides chimiques est devenue de plus en plus restrictive. L'utilisation des insecticides chimiques conduit aussi à un désordre éco-toxicologique accompagné d'une augmentation spectaculaire du nombre d'espèces résistantes.

2.1 Effet de l'extrait aqueux de *Ruta graveolens* sur les larves et les pupes de *Culiseta longiareolata*

L'application des produits naturels reste la méthode qui présente beaucoup d'avantages pour la santé de l'être vivant et pour son environnement par rapport aux produits de synthèse chimique qui contaminent globalement la biosphère (Benayad, 2008). En Algérie, l'utilisation des produits naturels, spécifiquement les extraits des plantes, comme type de lutte contre les insectes a commencé de se développer, à travers une multitude des travaux récentes (Kemassi, 2008 ; Labouzi, 2010 ; Habbachiet *et al.*, 2013 ; Aouati et Berchi, 2015).

L'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de Jang *et al.*, (2002). Par ailleurs, la protection des cultures contre les ravageurs par des extraits végétaux a été étudiée aussi bien sur des larves de lépidoptères (Lee *et al.*, 2002) que sur des larves d'acridiens (Barbouche *et al.*, 2001).

La toxicité est évaluée à partir du taux de mortalité enregistré après traitement et qui dépend des doses administrées.

Parmi les études toxicologiques ont permis de déterminer l'efficacité d'extrait aqueux de *Ruta graveolens* sur les larves de différents stades L1, L2, L3 et L4 et sur les pupes de *Culiseta longiareolata* évaluée à partir de la mortalité enregistrée chez les individus cibles avec un effet cumulé.

D'après Les résultats de cette étude montrent que l'extrait aqueux de plante choisie (*Ruta graveolens*) possède une activité insecticide à l'égard des différents stades de *Culiseta longiareolata* (L1, L2, L3, L4, et pupes). Les résultats obtenus révèlent une sensibilité variable des larves de *Culiseta longiareolata* on traduit par des taux de mortalité faibles à très élevés en passant d'une concentration à l'autre, d'extrait aqueux de *Ruta graveolens*. Ces résultats montrent également que l'activité larvicide est augmentée progressivement avec le stade et avec la relation dose-réponse.

2.2 Effet d'extraits bruts de *Ruta graveolens* sur *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi* et *Culex pipiens*

A travers les études menées par les auteurs Amrutha Chacko, Priscilla Helen Christy, Kavya KS (2015), trois solvants, l'hexane, l'éther de pétrole et du méthanol ont été utilisés. Parmi les trois solvants utilisés ici, le solvant d'éther de pétrole est le plus approprié pour *R. graveolens*, tandis que le solvant restant tel que l'hexane et le méthanol a montré une faible sensibilité au moustique larves.

L'extrait d'éther de pétrole a montré une mortalité élevée contre les larves des deux *An. stephensi* et *Ae. aegypti*. Le haut la mortalité pourrait être dû aux constituants chimiques présents dans extraits qui arrêtent les activités métaboliques des larves. Les variations des solvants d'extraction, des espèces de moustiques ou de l'exposition période affecte la variation de la sensibilité des extraits aux larves des moustiques.

Dans une étude réalisée par Khater, K. S.(2015) sur l'activité larvicide des extraits d'éther de pétrole de *Ruta graveolens* et *Raphanus sativus* contre les larves de *Culex pipiens*, Les taux de mortalité ont augmenté avec l'augmentation concentration de 50 à 150 ppm. Les valeurs de CL50 ont montré que le *Ruta graveolens* (124,45 ppm) était toxiques contre les larves de *C. pipiens*.

3. Effets des plantes médicinales sur la *Drosophila melanogaster* :

Les extraits végétaux, provenant des plantes médicinales, présentaient un potentiel de lutte contre les espèces invasives comme la *Drosophila melanogaster*, notamment en raison des métabolites secondaires qu'elles contiennent. Dans notre travail en va citer les effets de quelque extraits des plantes sur la *Drosophila melanogaster*.

En va citer les effets des extraits aqueux des cis plantes qu'ils sont les suivantes :

- a. *A-Nerium oleander L. Laurier Rose "Deffla"*
- b. *B- Myrtus communis L. le myrte commun "Rihan" :*
- c. *C- Urticadioica L. L'Ortie dioïque "Herayek "*
- d. *D- Eucalyptus camaldulensis Dehn .*
- e. *E- Olea europea L. "Olivier "*
- f. *F- Schinus molle L. "Felfel-kadeb "*

3.1 Effet toxique :

La mortalité est le premier critère de jugement de l'efficacité d'un traitement chimique ou biologique. Six poudres des feuilles des plantes à tester ont été présentées aux adultes de *Drosophila melanogaster*. Pour étudier et comparer leur efficacité, la dose et le temps qui ont

provoqué le maximum de mortalité ; soit la dose de 20 g et le temps de 48 h d'exposition ils sont choisis. Après l'expérience les résultats étaient les suivants :

Un premier classement de l'efficacité toxique des extraits des poudres testées est mis en évidence, ainsi l'extrait le plus toxique est celui des feuilles du laurier rose avec un taux de mortalité d'environ 100% (99%), il est suivi d'eucalyptus, avec un taux de mortalité plus de 80% (82,5%). Pour les extraits des poudres des feuilles de l'ortie et du faux poivrier, ces derniers ont présenté une toxicité importante de plus de 70% de mouches mortes, avec respectivement (77,5% et 72,5%)

Les poudres des feuilles de l'olivier ainsi que du myrte, sont relativement moins actives sur *Drosophila melanogaster*, avec un taux de mortalité très faible, moins de 09%. Par ailleurs, avec une pullulation de l'insecte en contact surtout avec la poudre de l'olivier, témoignant ainsi l'effet non toxique des poudres de cette plante.

3.2. Effet des extraits aqueux des six plantes sur PER (Proboscis Extension Reflex chez *Drosophila melanogaster*) :

Pour tester la réponse gustative de *Drosophila melanogaster* envers les extraits aqueux des six plantes médicinales à savoir : *N.oleander*, *M.communis*, *U.dioica*, *E.camaldulensis*, *O.europea* et *S.molle*, le test de PER (Proboscis Extension Reflex) a été réalisé, et les résultats étaient les suivants :

La réponse gustative de *Drosophila melanogaster* envers les extraits aqueux des six plantes médicinales étudiées montre que tous les extraits inhibent presque totalement la détection de sucre aux doses 0,9 et 1,4ml tandis qu'à la dose de 0,4 ml, cette dernière n'a pas eu d'effet sur la détection du sucre par l'insecte. La dose 0,4 ml en présence du saccharose présente un effet très hautement significatif sur l'extension du Proboscis avec un taux d'attraction de 100% pour tous les extraits. Quant aux doses 0,9 et 1,4ml, ces dernières présentent un effet anti appétant, vu que la perception du saccharose mélangé aux différentes doses d'extrait était nul (pas de réponse de PER).

Conclusion

Conclusion

Durant ces dernières années et face à une législation de plus en plus restrictive sur l'application des pesticides de synthèse, la recherche de phyto- insecticides s'inscrit dans une Stratégie particulièrement adaptée aux exigences du consommateur, tout en préservant l'environnement.

A cet effet, ce modeste travail de recherche a pour but de valoriser les Plantes Aromatiques et Médicinales Algériennes.

Notre hypothèse de départ était de confirmer que les extraits végétaux, provenant des plantes médicinales, présentaient un potentiel de lutte contre les espèces invasives, notamment en raison des métabolites secondaires qu'elles contiennent.

De ce fait, deux objectifs ont alors guidé cette étude, le premier s'intéresse à l'étude de la Screening phytochimique d'une plante médicinale : *Ruta graveolens* ; et le second, est concerne l'étude théorique de leur activité biologique sur un modèle biologique : *Drosophila melanogaster*.

Premièrement Le screening phytochimiques de l'extrait aqueux réalisé, a révélé la richesse de *Ruta graveolens* en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des flavonoïdes (flavoneles, flavone, anthocyanes), tanins catéchique, les stéroïdes, des terpènes, des alcaloïdes et des huiles essentielles. Et l'absence des tanins galliques, les quinones, et les saponines ;

et deuxièmes Et parce que nous n'avons pas pu faire le côté appliqué afin de confirmer l'effet de la plante : *Ruta graveolens* sur la mouche : *Drosophila melanogaster*, nous avons étudié l'effet d'autres plantes qui ont une composition chimique très similaire à nôtre plante et qui ont un effet similaire à celui des pesticides, et à partir de cela, nous avons supposé que *Ruta graveolens* avait un impact significatif sur la mouche étudié et à partir de là, nous pouvons l'utiliser pour protéger les cultures agricoles Contre les insectes et pour protéger la santé des consommateurs contre les dangers des pesticides.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- AIT MY (2006).** Plantes médicinales de Kabylie. Ed. Ibispress. Paris. 293pp.
- Amrutha Chacko School of Biological Sciences ,CMS College of Science and Commerce, Coimbatore-641 049,Tamil Nadu, India.
- Anonyme, (2012) - Une nouvelle drosophile (*Drosophila suzukii*) en vignoble bordelais .Union girondine des vins de Bordeaux .36p
- Anonyme,(2013)** - http://fr.wikipedia.org/wiki/Drosophila_melanogaster du 12/07/201
- Aouinty, B, Oufara, S., Mellouki, F. et Mahari, S. (2006).** Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis L.*) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10 (2): 67 — 71.
- Aouti A. & Berchi S. (2015).** Larvicidal Effect of Marrubium Vulgare on *Culex pipiens* in Eastern Algeria. *International Conference on Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability, TMREES.15. (74).* 1026-1031.
- Attou, A. 2011.** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en biologie .Option : « Produits naturels : Activités biologiques et synthèses ». Université ABOU BEKR BELKAID (TLEMCEM).
- Barbouche, N., Hajjem, B., Lognay, G. & Ammar, M. (2001).** Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 5 (2) : 85–90.
- Benayad, N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V- Agdal. Rabat, 63p.
- Benayad, N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : Moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V - Agdal. Rabat, p 63.
- Blondel J., (1975)**-L'analyse des peuplements d'oiseaux. Elément d'un diagnostic écologique. La méthode d'échantillonnage fréquentiels progressifs (E.F.P). *Rev. Ecol. Terre et Vie*, 29 (4) : 533-589.
- BONNIER G. ;(1999);** La Grande Flore en Couleur; Ed : BELIN; Tome 3; p:205 - 206.

- Campbel. N;Reece.J, 2004.**Biologie. Adaptation et revision scientifique de Richard. Mathieu, 2eédition de Boeck. Pp1482.
- Campbell. N. A, Reece. J. B; Mathieu. R, 2006.** Biologie. Edition 2, De Boeck Université, p 1482
- Chabasse, D. (2001).** Ectoparasites et vecteurs d'intérêt médical.
- Chen, C. C., Huang, Y. L., Huang, F. I., Wang, C. W., &Ou, J. C. 2001.** Water soluble glycosides from *Rutagraveolens*. *Journal of Natural Products*, 64, 990–992.
- ChouibaniM;Ouizbouben A et KAACKH;2003:**protection intégrée des agrumes . Ed .ouvrageréalize par la direction de la protection des végétaux,descontrôles technique et de la repression des faudes en cooperation avec la GTZ(projet contrôle phytosanitaire).13p.
- Colombani. J, Biamchini. L;Layalle. S; Léopard. P, 2006.** Stéroïdes, insulín et croissance: Les mouches dopent. La recherche/stéroïdes, insulín and growth: The files. Dope the research.Revue: M/S: medecine sciences, 22(3): 241-243.
- Costa, .JT. (2006)** -The other insect societies. The Belknap Press of HarvardUniversity Press,Cambridge, Massachusetts and London, England, 812 p.
- Dahchar, Z. (2017).** Inventaire des Culicidae de la région Ouest de la ville d'Annaba. Etude bioécologique, systématique des espèces les plus abondantes. Lutte biologique anti larvaire par les extraits aqueux de quelques plantes (Médicinales et toxiques) et le *Bacillus thuringiensis israelensis* H14, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Université Badji Mokhtar de Annaba: 286 p(Intitulé : Effet d'huile essentielle de *Rutagraveolens* sur la biochimie, la morphométrie des larves d'une espèce de moustique *culisetalongiareolata*)
- Doerper, S . (2008).** Modification de la synthèse des fur coumarines chez *ruta gravelons* l. par une approche de génie métabolique. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'INPL , Université Badji Mokhtar de Lorraine: 199 p
- Ebeling W., 1978.** Urban Entomology. University of California Division of AgriculturalScience. Berkeley
- Gillespie, D.R.1988** Greenhouse evaluations of a predatory mite,*hypospisp* sp,1 :34.
- Griffiths, A.J.F., Miller J. H., Suzuki D. T., Sanlaville C., Lewontin R. C. &Gelbart W.M. 2002.** Introduction a l'analyse génétique. 3eme édition De BoeckUniversité. 860 p.
- Habbachi,W., Benhissen, S. &Ouakid, M.L., (2013).**Effets biologiques d'extraits aqueux de *Peganumharmala* (L.)(Zygophyllaceae) sur la mortalité et le développement larvaire de *Drosophilamelanogaster* (Diptera-Drosophilidae).Algerian journal of arid environnement. (3):1, 82-88.

Hamliche V., Azzouz M., (2013) - Les rues : ethnobotanique, phytopharmacologie et toxicité. *Phytothérapie*. 11:22-30.

Heinrich M., Kufer J., Leonti M., Pardo-de-Santayna M., (2006) - Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *JEthnopharmacol*107:157R60.

Hnatyszyn, O., Arenas, P., Moreno, A.R., Rondina, R., Coussio, J.D., 1974. Plantas reguladoras de la fecundidad medicinales segun el folclore. *Revista de la Sociedad Científica*, 14-37.

Jacquet V.F., Guéguen, R., Dutton, 2002. Intérêt du spinosad en viticulture pour lutter contre les lépidoptères, les thrips et la drosophile. *Annales. 6e CIRA, Montpellier*, 46. décembre 2002, 8p.

Jang, Y. S., Kim, M. K., Ahn, Y. J., & Lee, H. S. (2002). Larvicidal activity of Brazilian plant against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Agri. Chem. Biotechnology.*, 45 (3) : 131-134.

Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogge, A., & Sevens, P. (2002). *Botanique Systématique : une perspective phylogénétique* ; Ed 1 : DEBOECK, p : 84-336..

Kavya KS Kerala Agricultural University, Mannuthy, Kerala, India. Study on larvicidal activity of crude extracts of *Rutagraveolens* against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*

Keiding J., 1977. Resistance in the housefly in Denmark and elsewhere in Watsun DL, Braown AWA. *Pesticide management and insecticide resistance*. new

KEMASSI A., 2008 - Toxicité comparée des extraits de quelques plantes acridifuges du Sahara septentrional Est algérien sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). *Mémo. Mag. Agro. Sah., Univ. KASDI Merbah Ouargla*, 160 p.

KEMASSI A., 2008 - Toxicité comparée des extraits de quelques plantes acridifuges du Sahara septentrional Est algérien sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). *Mémo. Mag. Agro. Sah., Univ. KASDI Merbah Ouargla*, 160 p.

Khater, K. S. 2009. Toxicological and biological studies on the fly, *Synthesomyia nudiseta* (Wulp) (Muscidae: Diptera), Ph D. Thesis, Zagazig Univ., Egypt. 134 pp.

Lebouzi. (2010). Activité biologique des extraits foliaires de *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) chez *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera, Acrididae). *Mem. Mag. Uni de Mohamed Kheider. Biskra*. 165p.

Lobo J.M., Lumaret J.P. et Jay Robert P., (1997) - Les atlas faunistiques comme outils d'analyse spatiale de la biodiversité. *Ann SocEntomolfr.*(N.S) 1997, 33(2) :129-138.

Macheix J. J., Fleuriet A., Allemand J. C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux:un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses Polytechnologiques ET Universitaires romandes, p 4-216.

Makkar, H.P.S., Siddhuraju, P. & Becker, K. ;(2007); Plant Secondary Métabolites, Méthodes in MoléculaireBiology 393; Ed: HUMANA PRESS, p: 67-111

Morin, A. (2002). Note de cour : les Arthropodes. Biologie, U. d'Ottawa

Ouédraogo S., 2005, Intensification de l'agriculture dans le plateau central du BurkinaFaso:une analyse des possibilités à partir des nouvelles technologies. Thèse de Doctorat,GroningenRijksuniversiteit, 317 p.

p661-665.

Parola, P. (2005). Utilisation des arthropodes comme outils épidémiologiques et diagnostiques des maladies infectieuses émergentes.

Patterson J., R. Wagner., L. Wharton., 1 avril 1943.Le drosophilidés du Sud-Ouest.Austin, TX: The University of Texas Press.400p.

Pavan M., (1986)-Una revolutione. Cultural. Europea. La "carta sugliinvertebrate"delonsigliod'europa. Pubblicazioni dell' Institute entonologico, Universita di Pavia, 33 :1-51.

Priscilla Helen Christy School of Biological Sciences, CMS College of Science and Commerce, Coimbatore-641 049, Tamil Nadu, India.

Ramade F., 2003:element écologie fondamentale, 3 émeeditionDUNOD,Paris ,690p.

Rosewell, .J., Shorrocks, B. (1987) -The implications of survival rates innatural populations of *Drosophila*: capture-recapture experiments on domesticspecies. Biological Journal of the Linnean Society, 32, p373-384.ropharmacologie 182p.

Stocker, .R. F. (1994) -The organization of the chemosensory system in*Drosophila melanogaster* - a review. Cell and Tissue Research, p275, 3-26.

Terhzaz .,S. (2003) - Caractérisation de deux neuropeptides chez *Drosophilamelanogaster* : la leucokinine et l'IFamide. Thèse de doctorat en neurosciences etneu

Tracqui. P, Demongeot. J, 2003. Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines dela structure aux fonctions, EDP sciences Edition, 94-95.

Umar A, Abdulrahman HT, Kokori M. 2002 Evaluation of the effects of dichlofos on the larvae of field and laboratory strains of *Aedes aegypti* L. and *Culex pipiens* Fatigans Weid. (Diptera: Culicidae). *Nigerian J Exp Appl Biol.*; 3(1):309-312.

Verger P, Aulagnier M, Schvoebel V, etlang T. 2005. « Démarche épidémiologiques après une catastrophe » la documentation française, 266p.

Warlop F, M. Thomas, L. Reynaud, 2000. essai de lutte contre la mouche de la cerise en agriculture biologique, rapport final GRAB 2000, 3p.

Watson. J. D, 1928. Michael Gilman, O. AND. Recombinant. De Boeck. Université, p.390

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

Wilson E.O., (1988)- The current state of biological diversity; In: E O. Wilson. Biodiversity. P.3-18. Washington DC: National Academy Press. Parasitologia, Ornithologia, Entonologia. Institute of ecology, Vilnius. ISSN 1392 6.

Wilson, J.D., Morris, A.J., Arroyo, B.E., Clark S.C. & Bradbury, R.B. (1999). A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change. *Agriculture Ecosystem Environment* **75** : 13-30.

Wolfgang Pierl & Werner Ring, 1992. Guides des insectes, délaux et niestlé, Paris, pp 42-198