

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique Université de Ghardaïa



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

Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Filière : Science biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : BELBACHIR Hanan

TOUIRIK Hind

Thème

Cholinestérase et toxicité des extraits aqueux de *Pergularia tomentosa* L. chez les larves de *Culex pipiens* Linnaeus, 1758.

Soutenu publiquement, le / / . **Devant les jurys composés de :**

Mme KEBILI Zohra	MAA	Univ. Ghardaïa	Présidente
Mme HAMID OUDJANA Aïcha	MCB	Univ. Ghardaïa	Encadreur
Mme MEZERAI Rabiha	MCB	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023



Remerciements

*En premier lieu nous remercions **ALLAH** le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la volonté et la patience pour finir ce travail.*

*Au terme de cette étude, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre encadreur M^{me} **HAMID OUDJANA Aïcha** pour son investissement, sa disponibilité dans l'élaboration de ce travail, sa gentillesse et sa patience.*

*Nous profitons de l'occasion pour remercier les membres du jury d'avoir examiner et évaluer notre travail. Nos sincères remerciements vont à Madame **KEBILI Zohra** Maître assistante au département de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Ghardaïa de nous faire l'honneur de présider le jury et d'apprécier notre travail. Nos remerciements s'adressent aussi à Madame **MEZERAI Rabiha** Maître de conférences au département de biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université de Ghardaïa, qui nous a fait l'honneur d'accepter d'examiner notre travail avec intérêt.*

*Nous remercions tous les enseignants du département de la biologie ainsi que les techniciens du laboratoire de l'Université du Ghardaïa. Surtout **M. BEN SALEH** et **M. MOULAY**.*



Dédicace

Je dédie ce travail à mes très chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien tout au long de ma vie.

A la mémoire de mon défunt grand-père je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et mon amour, ton présence dans ma vie a été un cadeau précieux et ton départ a laissé un vide immense. Je garde dans mon cœur les souvenirs des moments que nous avons partagés et de l'amour que vous avez toujours donné sans condition.

A mon frère, mes sœurs et ma belle-sœur Je tiens à vous exprimer tout mon amour et ma gratitude.

Je dédie à mes chères familles Et Mes chères amies

Hanan



Dédicace

Je dédie ce modeste travail a mes très chers parents qui m'ont encouragée a aller de l'avant et qui m'ont donnée tout leur amour pour terminer mes études que Dieu les protèges

Je dédie également ce mémoire a mes frères pour les bons moments que l'on a passé ensemble

Je dédie à ma chère tante Halima pour m'avoir encouragée

A la personne la plus chère pour moi et son souvenir restera vivant dans ma mémoire, il était comme un père et un frère pour moi, paix à son âme.

A tous ceux qui j'ai croisé leurs chemins et qui ont participé de près ou de loin a la réalisation de ce travail

Hind

Liste des tableaux

1	Position taxonomique de <i>Culex pipiens</i> L.	16
2	Caractères morphologiques des 4 stades larvaires de <i>Culex pipiens</i> L.	20
3	La position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i> L.	26
4	Rendement d'extraction a reflux des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> .	36
5	Mortalité cumulée observé chez les larves (L4) de <i>Culex pipiens</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> L	37
6	Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait de <i>Pergularia tomentosa</i> .	39
7	Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de <i>Pergularia tomentosa</i>	40
8	Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez les larves de <i>Culex pipiens</i> traitées par l'extrait aqueux de <i>Pergularia tomentosa</i> L. à différentes concentration	41
9	Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL50 évaluées pour les quatre concentrations de l'extrait aqueux.	41
10	Analyse de la variance appliquée sur l'activité d'enzyme cholinestérase chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i> ; P: Probabilité; S: Signification (-Effet non significatif ; * : Effet significatif ; ** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).	48
11	Analyse de la variance appliquée sur l'activité spécifique d'enzyme cholinestérase chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i> ; P: Probabilité; S: Signification (-Effet non significatif ; * : Effet significatif ; ** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).	50
12	Analyse de la corrélation appliquée sur l'activité d'enzyme cholinestérase et la mortalité chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i> ; r : Coefficient de corrélation ; P: Probabilité; S: Signification (-Effet non significatif ; * : Effet significatif ; ** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).	51

Liste des Figures

1	Hydrolyse de l'acétylcholine.	4
2	Structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase	5
3	L'enzyme de butyrylcholinestérase	6
4	Site actif d'acétylcholinestérase	8
5	Site actif de la butyrylcholinestérase est au fond d'une gorge de 20 Å	9
6	Mécanisme général d'hydrolyse par une serine hydrolase	10
7	Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse Cholinergique	11
8	Structure moléculaire de l'Acétylcholine	12
9	Structure de site actif de l'acétylcholinestérase chez les insectes	13
10	Faisceaux des œufs de <i>Culex pipiens</i> L	17
11	Larve de <i>Culex pipiens</i> L	17
12	Morphologie de lympe de <i>Culex pipiens</i> L	18
13	Morphologie d'adulte de <i>Culex pipiens</i> L	19
14	Cycle de développement du moustique <i>Culex pipiens</i>	19
15	<i>Morphologie de larve Culex pipiens L.</i>	20
16	<i>Pergularia tomentosa</i> L	23
17	Poudre des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> L	24
18	Présentation de la région de Daia ben Dahoua, Wilaya de Ghardaïa	24
19	Présentation des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> L	25
20	Larve L ₄ de <i>Culex pipiens</i> L	27
21	Elevage des larves de <i>Culex pipiens</i> L.	28
22	Extraction à reflux	29
23	Protocole de la préparation d'extrait aqueux par reflux.	30
24	Protocole de test de la mortalité	32
25	Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux foliaire de <i>Pergularia tomentosa</i>	38
26	Relation entre la mortalité corrigée des larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i> et la dose de l'extrait aqueux foliaire de <i>Pergularia tomentosa</i> L	40
27	Action de l'extrait aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i> L. sur les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i> .	42

28	Temps létale de 50 des larves (TL50) à différentes doses de l'extrait aqueux <i>Pergularia tomentosa</i>	43
29	Effet des différentes doses d'extraits aqueux des feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i> L. sur l'activité de la cholinestérase mesurée en unité $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ chez <i>Culex pipiens</i> L. après 1 heure et 24 heures d'exposition.	47
30	Effet des différentes doses d'extraits aqueux de <i>Pergularia tomentosa</i> L. sur l'activité spécifique de cholinestérase mesurée en unité ($\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine) chez extrais <i>Culex pipiens</i> L. après 1 heure et 24 heures d'exposition.	49

Liste des abréviations

AChE	Acétylcholinestérase
Cys	Acide aminée Cystéine
His	Acide aminée Histidine
Ser	Acide aminée Sérine
Ala	Acide aminée Alanine
Asp	Acide aspartique
Tyr	Acide aminée Tyrosine
Glu	Acide glutamique
Trp	Acide aminée Tryptophane
Phe	Phénylalanine
ACh	Acétylcholine
TcAChE	Triade catalytique d'acétylcholinestéras
nAChR	Les récepteurs nicotiques
A	Chaîne alpha
B	Feuillets Beta
km	Kilomètre
cm	Centimètre
ml	Millilitre
H	Heur
%	Pourcentage
L4	Les larves de quatrième stade de <i>Culex pipiens</i>
M	La masse molaire
<i>C.pipiens</i>	<i>Culex pipiens</i>
BSA	le sérum albumine bovin.
°C	Degré Celsius
G	Gramme
EC	Enzyme Commission
mg/l	milligramme par litre
L	Litre
µl	Microlitre
DIL	Dilution
P	Probabilité

S	Signification
*	Effet significatif
**	Effet hautement significatif
***	Effet très hautement significatif
DL	Dose létale
TL	Temps létale

Résumé

Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité insecticide des extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. sur les moustiques *Culex pipiens*. Le rendement d'extraction des feuilles est de 9,29 %. Les résultats obtenus montrent un effet toxique chez les larves L4 traitées à différentes doses de l'extrait aqueux de la plante. Les tests de la toxicité sont réalisés à différentes doses de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. de (25%,50%,75% et 100%) et comparés à 0% pour le témoin et permet de déterminer le taux de mortalité, la DL50 et DL90, TL50 et TL90 ensuite les tests biochimiques permettent de déterminer l'activité cholinestérasique et l'activité spécifique. Le taux de mortalité corrigé est maximal chez les larves traitées avec la dose la plus élevée considéré (100%) par rapport aux dilutions, entraînant une mortalité totale après 2 jours d'exposition. Ainsi, la DL50 est de 1,0505 mg/ml et DL90 est de 4,467 mg/ml. Le temps léthal 50 (TL50) le plus court est enregistré chez les larves traitées avec la dose la plus élevée de 100% avec TL50 est de 9,12 h par rapport aux autres dilutions, et le temps léthal 90 (TL90) le plus court enregistré chez les larves traitées avec la dose la plus élevée de 100% avec TL 90 est de 29,51 h par rapport aux dilutions. Ainsi l'activité d'enzyme cholinestérase augmente avec l'augmentation de la dose de l'extrait de *Pergularia tomentosa* L. Le maximum d'activité enzymatique est noté chez les larves traitées à la dose (100%) de l'extrait aqueux considéré après 1 h et 24 h d'exposition avec $22,63 \pm 0,90 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et $31,53 \pm 2,56 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ successivement. Pareillement, l'activité spécifique d'enzyme augmente avec l'augmentation de la dose de l'extrait de *Pergularia tomentosa* L. le maximum d'activation d'enzyme est noté chez les larves traitées à la dose (100%) de l'extrait aqueux considéré après 1 h et 24 h d'exposition sont de $3,450 \pm 0,17 \mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine et $4,806 \pm 0,68 \mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine successivement, L'analyse de la variance montre un effet significatif de la dose appliquée sur les larves, ainsi une corrélation positive et très significative existe entre la mortalité et l'activité d'enzyme cholinestérase.. Les résultats de l'activité larvicide ont montré l'efficacité des extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. contre les larves de *Culex pipiens*.

Mots clés : *Pergularia tomentosa* L, *Culex pipiens*, extraits aqueux, cholinestérase, activation, effet insecticide.

Abstract

The aim of this study is to evaluate the insecticidal activity of aqueous extracts from *Pergularia tomentosa* L. leaves against *Culex pipiens* mosquitoes. The extraction yield from the leaves is 9.29%. The results obtained demonstrate a toxicity effect on L4 larvae treated with different doses of the Aqueous plant extract. Toxicity tests are conducted using various doses of the aqueous extract of *Pergularia tomentosa* L. (25%, 50%, 75%, and 100%), and 0% for the witnesses. allowing for the determination of mortality rates, DL50 and DL90, TL50 and TL90. Biochemical tests are then performed to determine the cholinesterase activity and specific activity. The corrected mortality rate is highest in larvae treated with the highest dose (100%), resulting in complete mortality after 2 days of exposure. The calculated DL50 is 1.0505 mg/ml and DL90 is 4.467 mg/ml. The shortest lethal time (TL50) is recorded in larvae treated with the highest dose of 100%, with TL50 is 9.12 hours compared to other dilutions, and the shortest TL90 is recorded in larvae treated with the highest dose of 100%, with TL90 is 29.51 hours compared to the dilutions. The cholinesterase enzyme activity increases with increasing dose of *Pergularia tomentosa* L. extract, and the maximum enzyme activity is observed in larvae treated with the dose of 100% of the aqueous extract after 1 hour and 24 hours of exposure, with values of 22.63 ± 0.90 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ and 31.53 ± 2.56 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ respectively. Similarly, the specific enzyme activity also increases with increasing dose of *Pergularia tomentosa* L. extract. The maximum enzyme activation is noted in larvae treated with the dose of 100% of the aqueous extract after 1 hour and 24 hours of exposure, with values of 3.450 ± 0.17 $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ of protein and 4.806 ± 0.68 $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ of protein respectively, The analysis of the variance shows a significant effect of the applied dose on the larvae, also a positive and very significant correlation exists between the mortality and the activity of the enzyme cholinesterase.

The results of the insecticidal activity demonstrate the effectiveness of aqueous leaf extracts of *Pergularia tomentosa* L. against *Culex pipiens*.

Keywords : *Pergularia tomentosa* L., *Culex pipiens*, aqueous extracts, cholinesterase, activation, insecticidal effect.

المخلص

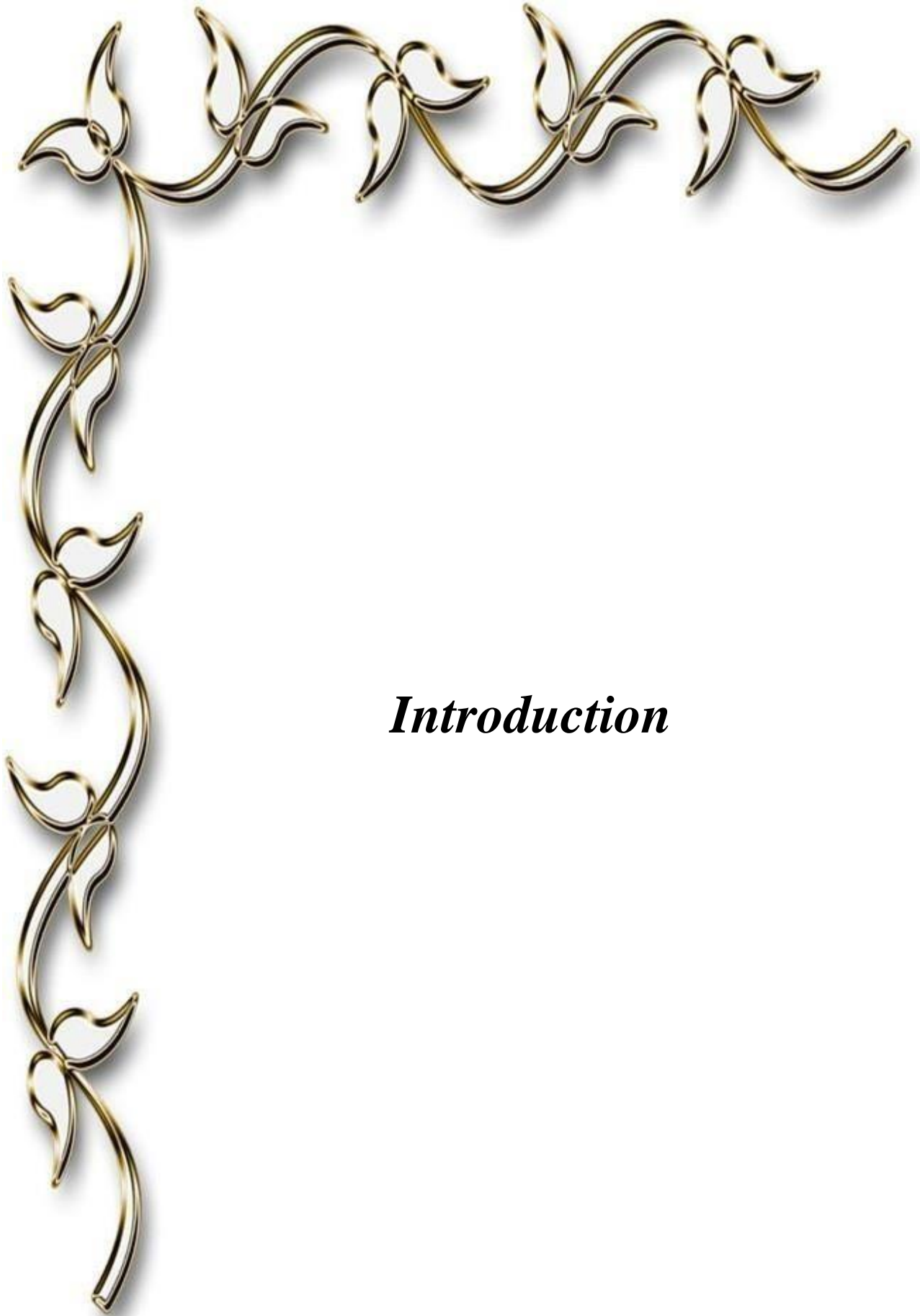
تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط الابادي للحشرات للمستخلصات المائية لأوراق *Pergularia tomentosa* L. على بعوض *Culex pipiens*. مردودية استخراج الأوراق هو 9.29%. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها التأثير الابادي على يرقات L4 المعالجة بجرعات مختلفة من المستخلص النباتي (25%، 50%، 75%، 100%)، و0% بالنسبة للشواهد. أجريت اختبارات السمية باستخدام جرعات مختلفة من المستخلص المائي من *Pergularia tomentosa* L. لتحديد معدل الوفيات، DL50 و DL90 و TL50 و TL90. بعد ذلك، تحدد الاختبارات الكيميائية الحيوية نشاط الكولينستراز. سجل معدل الوفيات المصحح الأقصى في اليرقات المعالجة بأعلى جرعة مدروسة (100%) مقارنة بالتخفيفات، والذي أدى إلى إجمالي وفيات بعد يومين من التعرض. وبالتالي، فإن الجرعة المميتة DL50 هي 1.0505 ملغ/مل و DL90 هي 4.467 ملغ/مل. تم تسجيل أقصر وقت مميت TL50 في اليرقات المعالجة بأعلى جرعة مدروسة (9.12 ساعة) مقارنة بالتخفيفات، وتم تسجيل أقصر وقت مميت TL90 في اليرقات المعالجة بأعلى جرعة مدروسة (29.51 ساعة) مقارنة بالتخفيفات. يزداد نشاط الكولينستراز مع زيادة جرعة مستخلص *Pergularia tomentosa* L. ويلاحظ أقصى نشاط للإنزيم في اليرقات المعالجة بجرعة 100% من المستخلص المائي، مع قيم 0.90 ± 22.63 ميكرومول/د/مل و 2.56 ± 31.53 ميكرومول/د/مل بعد ساعة و 24 ساعة من التعرض على التوالي. وبالمقابل، يزداد نشاط البروتين المحدد مع زيادة جرعة مستخلص *Pergularia tomentosa* L. ويلاحظ أقصى نشاط للإنزيم في اليرقات المعالجة بالجرعة 100% من المستخلص المائي، مع قيم 3,450 (ميكرو غرام / د / ميكرو غرام من البروتين) و 4,806 (ميكرو غرام / د / ميكرو غرام من البروتين) بعد 1 ساعة و 24 ساعة من التعرض على التوالي، يوضح تحليل التباين تأثيرًا كبيرًا للجرعة المطبقة على اليرقات، لذلك يوجد ارتباط إيجابي وهام جدًا بين الوفيات ونشاط إنزيم الكولينستراز. تبين نتائج النشاط الابادي للحشرات فعالية المستخلصات المائية لأوراق نبات ال *Pergularia tomentosa* L. ضد يرقة *Culex pipiens*.

الكلمات الرئيسية: *Pergularia tomentosa* L. ، *Culex pipiens* ، المستخلصات المائية، الكولينستراز، النشاط ، التأثير الابادي.

Table des matières

Remerciments	
Dédicace	
Liste des tableaux	
Liste des des figures	
Liste des abréviation.....	
Résumé.....	
Introduction	1
Chapitre I Etude bibliographique	
I.1. Cholinestérase	4
I.1.1. Différents types de cholinestérase.....	4
I.1.2.1. Acétylcholinestérase ou cholinestérase globulaire ou encore cholinestérase vraie	4
I.1.2.2. Butyrylcholinestérase ou cholinestérase non spécifique.....	5
I.1.2. Structure de cholinestérase.....	6
I.1.3. Site actif d'Acétylcholinestérase	7
I.1.4. Mécanismes d'action de cholinestérase.....	9
I.1.5. Rôle physiologique.....	10
I.1.6. Acétylcholine	11
I.1.7. Récepteurs de l'acétylcholine.....	12
I.1.8.1. Récepteurs de type nicotinique	12
I.1.8.2. Récepteurs de type muscarinique.....	12
I.1.9. Cholinestérase chez les insectes	13
I.1.10. Inhibiteurs de cholinestérase	14
I.1.10.1. Inhibiteurs réversibles	14
I.1.10.2. Inhibiteurs irréversibles.....	14
I.2. La lutte biologique contre les insectes ravageurs	14
I.2.1. Moyens de lutte biologique.....	15
I.2.1.1. Moustiques transgéniques	15
I.2.1.3. Utilisation de bactéries entomopathogènes	15
I.2.1.4. Utilisation des insecticides d'origine botanique	15
I.3. <i>Culex pipiens</i> L.....	16
I.3.1. Position systématique.....	16
I.3.2. Morphologie de <i>Culex pipiens</i> L.	17
I.3.2.1. L'œuf	17
I.3.2.2. La larve	17
I.3.2.3. La lymphe	18
I.3.2.4. L'adulte.....	18
I.3.3. Cycle de développement	19
I.3.4. Risques sanitaires de <i>Culex pipiens</i> L.	21

Chapitre II Matériels et méthodes	
II.1. Principe adopté.....	23
II.2. Matériel biologique	23
II.2.1. Choix de la matière végétale	23
II.2.1.1. Présentation de la région de collecte.....	24
II.2.1.4. Nom vernaculaire et position systématique de <i>Pergularia tomentosa</i> L.	26
II.2.2. Choix de l'insecte.....	27
II.2.2.1. Elevage.....	27
II.3. Méthodes d'extractions.....	28
II.3.1. Extrait végétal de <i>Pergularia tomentosa</i> L.....	28
II.3.1.1. Principe d'extraction à reflux.....	28
II.3.1.2. Mode opératoire	29
II.3.2. Extraction d'enzyme cholinestérase	30
II.3.2.1. Principe	30
II.3.2.2. Mode opératoire	31
II.4. Tests biologiques.....	31
II.4.1. Etude de la mortalité	31
II.4.2. Etude de l'activité de cholinestérase.....	32
II.4.3. Dosage de protéine	33
II.4.4. Taux de mortalité	33
II.4.5. Temps léthal.....	34
II.4.6. Dose léthal 50 (DL50).....	34
II.5. Analyses statistiques.....	34
Chapitre III Résultats et discussion	
III.1. Rendement d'extraction	36
III.3. Mesures neurochimiques.....	43
III.3.1. Activité de cholinestérase	43
III.3.2. Activité spécifique de cholinestérase	45
III.4. Analyse de la corrélation.....	47
III.5. Discussions	48
Conclusion et perspectives	
Conclusion	55
Perspectives	56
Références bibliographiques	58
Annexes	



Introduction

Introduction

Culex pipiens Linnaeus, 1758 est l'une des espèces de moustiques les plus répandues, joue un rôle central dans la transmission de maladies telles que l'encéphalite équine (**Segondy, 2020**) et le virus de la fièvre du Nil occidental (**Zientara et al., 2009**), ce qui en fait un vecteur majeur de préoccupation pour la santé publique (**Krida et al., 2011**). La prévention de la propagation de ces pathologies repose donc sur le contrôle efficace de cette espèce de moustique.

Au fil des années, différentes approches ont été utilisées pour lutter contre les populations de moustiques, notamment l'utilisation de produits chimiques insecticides. Cependant, l'utilisation excessive et inappropriée de ces substances a conduit à des problèmes de résistance et à des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine (**Tchamadeu et al., 2017**). Par conséquent, il est impératif de trouver des alternatives efficaces et respectueuses de l'environnement pour le contrôle des moustiques.

Dans cette optique, les extraits de plantes sont devenus une source d'intérêt croissante en raison de leur potentiel insecticide. *Pergularia tomentosa* L. (Apocynaceae), une plante de la famille des Asclépiadacées (**Acheuk et Doumandji-Mitiche., 2013**) est connue pour ses propriétés médicinales et son utilisation traditionnelle dans le traitement de diverses affections (Chehema, 2006). Cette plante est connue pour sa richesse en composés bioactifs, notamment des alcaloïdes (**Belloum et al., 2020**), des flavonoïdes (**Lahmar et al., 2017**) et des saponines (**Yakubu et al., 2015**). Cependant, les mécanismes exacts de son action restent largement inexplorés.

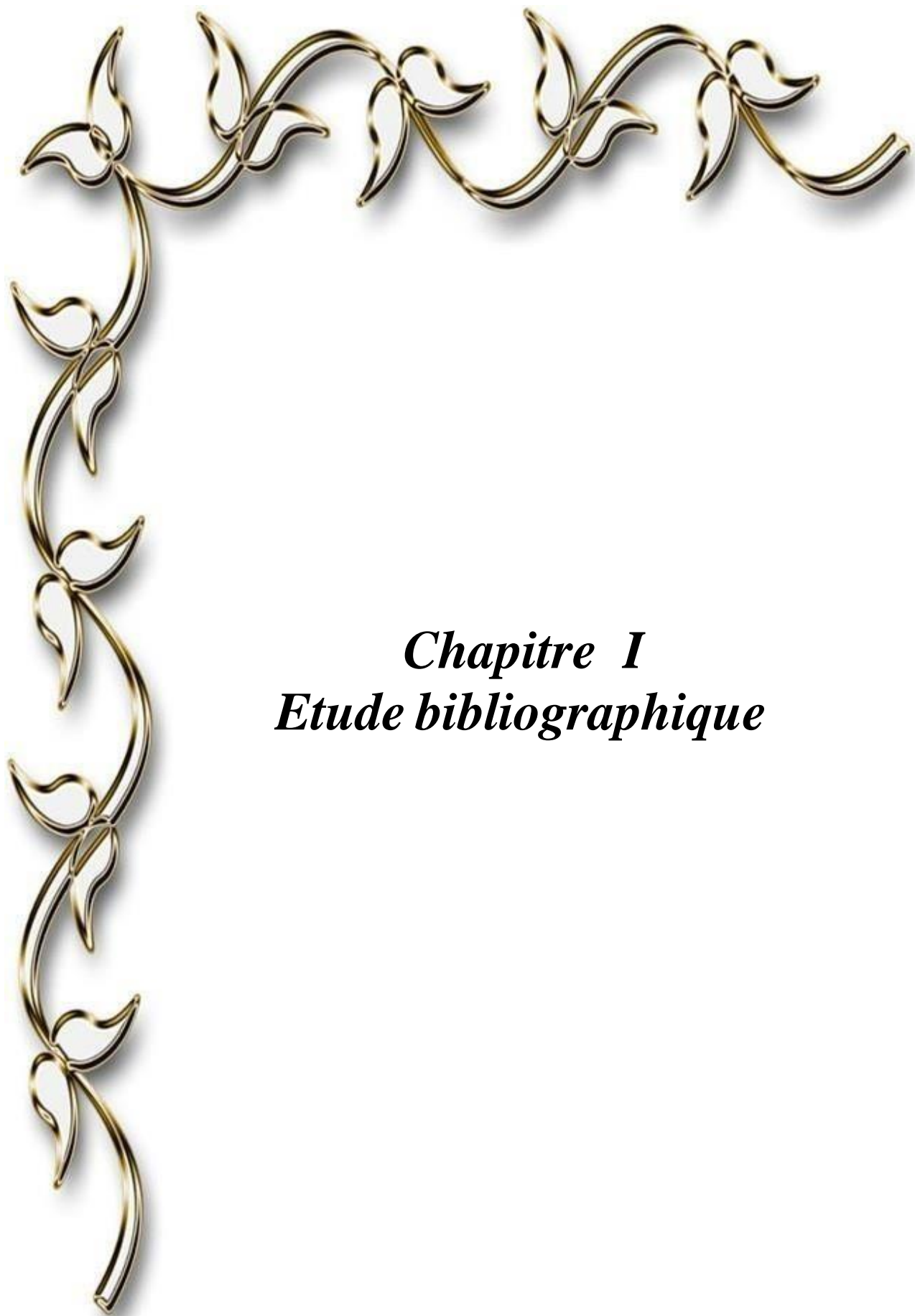
La cholinestérase est une enzyme présente chez les insectes, y compris les larves *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) (Culcidae) de moustiques, qui joue un rôle crucial dans la contrôle de transmission des signaux nerveux. Son rôle principal consiste à dégrader l'acétylcholine (**Krejci, 2005**). Un neurotransmetteur essentiel, afin de réguler la transmission des impulsions nerveuses (**Fantozzi, 2019**).

Certains métabolites secondaires présents dans les plantes ont la propriété de cibler de manière sélective l'enzyme cholinestérase. La perturbation de la cholinestérase peut avoir des conséquences significatives sur la fonction neurologique des insectes exposés à ces métabolites

secondaires par des quantités excessives d'exposition, montré que cette exposition entraîne des effets néfastes tels que la paralysie ce qui conduit à la mortalité (**Fournier *et al.*, 1992; Smulders *et al.*, 2004; Bhavya *et al.*, 2018**).

Notre objectif est de réaliser une étude approfondie sur les effets neurotoxiques potentiels des extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. chez les larves de *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758). Cela implique l'analyse de la toxicité des extraits de *Pergularia tomentosa* L. sur les larves de moustiques *Culex pipiens* et l'évaluation de l'activité de l'enzyme cholinestérase.

Le document présent est organisé en trois parties. La première partie est une revue bibliographique qui regroupe les informations disponibles sur l'enzyme cholinestérase, le *Culex pipiens* L. et la plante *Pergularia tomentosa* L. La deuxième partie concerne la méthodologie utilisée dans l'étude. La troisième partie présente les résultats et les discussions des essais expérimentaux portant sur la toxicité. Enfin, une conclusion est formulée et des perspectives sont proposées pour compléter cette étude.



Chapitre I
Etude bibliographique

I.1. Cholinestérase

L'enzyme cholinestérase est une protéine de coordination entre différents tissus et elle intervient dans la régulation de leur fonctionnement (**Hamid oudjana, 2017**).

C'est l'une des enzymes les plus efficaces et les plus rapides connues à ce jour, avec des efficacités hydrolytiques comprises entre 1000 et 20000 molécules/sec selon les espèces. (**Benziane, 2014**).

Les cholinestérases sont des hydrolases de serine qui agissent préférentiellement sur les esters de choline (Fig.1) (**Girard, 2006**). Cette réaction est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation (**Kerboua laouar et Kerrouchi, 2021**). Ainsi les cholinestérases forment un système enzymatique complexe à partir de nombreuses isoformes capables de cliver les esters de choline (**Ben dahou et Fili, 2017**).

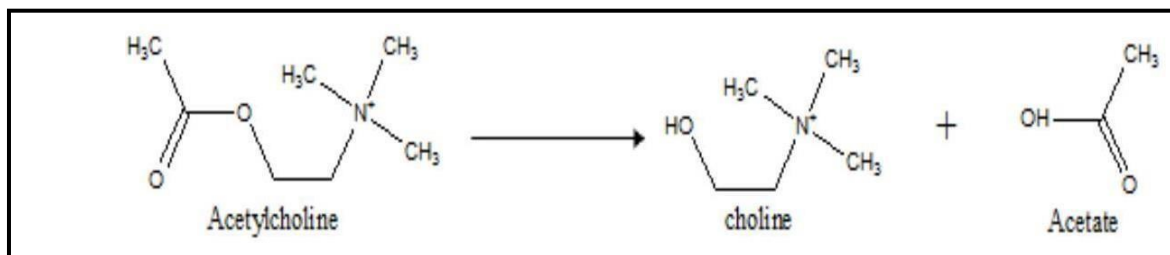


Figure 1: Hydrolyse de l'acetylcholine (**Zerdaoui et Bounasla, 2020**).

I.1.1. Différents types de cholinestérase

Les cholinestérases sont traditionnellement distingués sur base de leur spécificité de substrat et par cinétique hydrolyse (**Girard, 2006**). Chez l'être humain il existe deux types de cholinestérase qui diffèrent par leur origine, leur structure, leur lieu de synthèse, leur spécificité d'action et leur fonction physiologique (**Ezzaher et al., 2012**).

I.1.2.1. Acétylcholinestérase ou cholinestérase globulaire ou encore cholinestérase vraie

(EC : 3.1.1.7) : Ces enzymes sont présentes dans le cerveau, les globules rouges et le plasma de certains vertébrés, ainsi que dans les tissus du système nerveux (**Camire, 2007**) au sein des synapses dites cholinergiques, qui utilisent le neurotransmetteur ACh (**Colletier,**

2006). Elles sont impliquées dans le mécanisme de la transmission de l'influx nerveux dans l'organisme (Camire, 2007) elle est intracellulaire (Chenabzia, 2009) (Fig. 2)

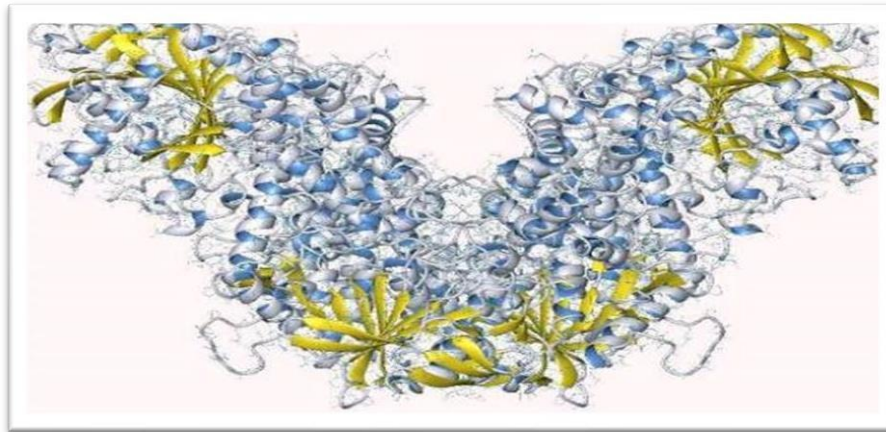


Figure 2 : Structure tridimensionnelle de l'acétylcholinestérase (Khaled et Chefiri, 2019)

I.1.2.2. Butyrylcholinestérase ou cholinestérase non spécifique

Cette enzyme présente nombreuses synonymes tels que pseudo cholinestérase, le cholinestérase sérique plasmatique. Parce qu'il est extracellulaire, mais sa dénomination est acylcholineacyl hydrolase avec le numéro de code EC3.1.1.8 (Chenabzia, 2009). Elle est présente dans le foie ; le pancréas et l'intestin (Huynh- moynot *et al.*, 2013), elle peut hydrolyser divers esters synthétiques et naturels, tels que l'acétylcholine et la succinylcholine. Il est présent dans le plasma ou le sérum, le foie (site de synthèse), le pancréas, l'intestin et d'autres tissus. Son rôle physiologique est actuellement inconnu. Cependant, il est généralement envisagé en association avec l'acétylcholinestérase (AChE) (Zerdaoui et Bounasla, 2020) (Fig. 3).

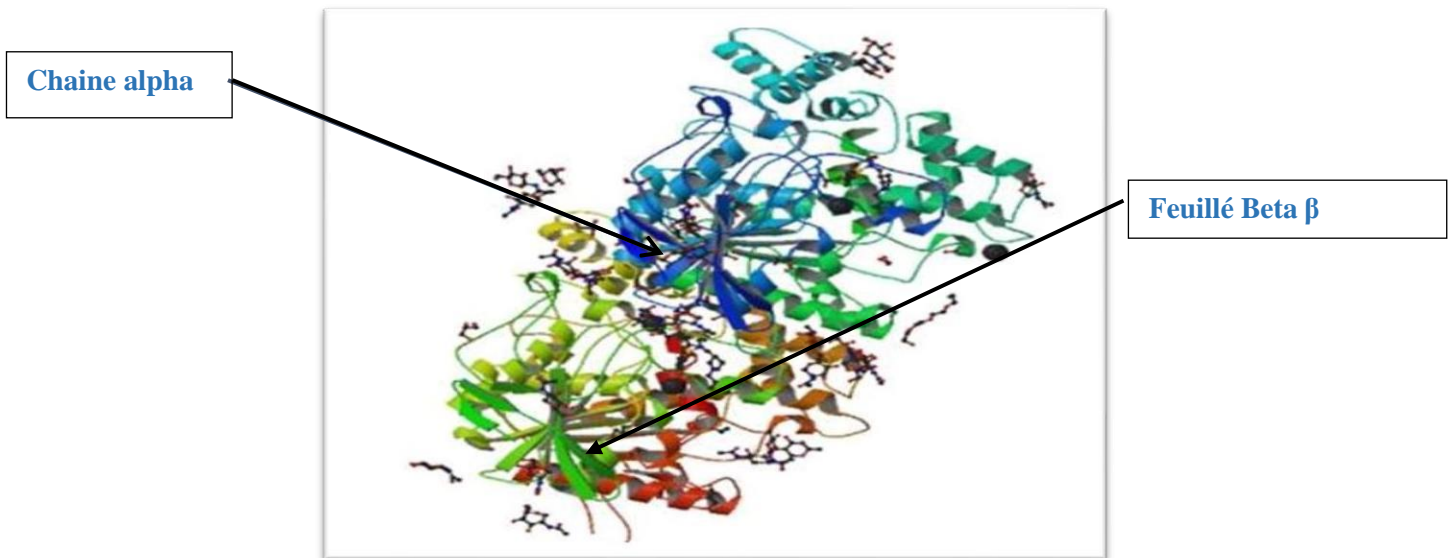


Figure 3 : L'enzyme de butyrylcholinestérase
(Zerdaoui et Bounasla, 2020)

I.1.2. Structure de cholinestérase

L'AChE a été identifiée pour la première fois en 1867 à partir de la toxine de torpille (*Torpedo californica*) (Chibat et Guechir, 2015). Les domaines catalytiques de ces enzymes sont organisés en assemblages globulaires de feuillets β et d'hélices α (plis α/β). La structure atomique de l'ACH a permis de mettre en évidence deux régions essentielles à l'enzyme situées de part et d'autre de la gorge qui pénètre l'enzyme jusqu'à son centre : le site actif au fond et le site périphérique à l'entrée où se trouve la machinerie catalytique (Ben dahou et Fili, 2017). Le site actif et le site périphérique seront ainsi deux cibles potentielles en vue de l'inhibition de l'AChE par des composés thérapeutiques ; cette enzyme doit être sous forme dimérique pour agir en tant que protéase à sérine ; (Chibat et Guechir, 2015). Chaque monomère est constitué de 11 feuillets β et de 15 hélices α , ainsi que d'une courte portion de feuillet β , à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure, le repliement global de l'enzyme est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases. Dans le dimère, les deux monomères sont liés, l'un à l'autre, par un « paquet » de 4 hélices α : deux hélices α de chaque monomère, dont l'hélice α C-terminale, participent à la mise en place d'un accollement inter-résidus très stable. Les cystéines C-terminales (Cys537) de chacun des deux monomères établissent entre elles un pont disulfure inter-chaînes qui stabilise la structure quaternaire de l'enzyme (Laouar, 2015). On distingue, dans un monomère d'AChE, deux domaines indépendants l'un de l'autre, et disposés de part et d'autre de la gorge menant au site actif ; (Zegouba et Lahlah, 2018).

I.1.3. Site actif d'Acétylcholinestérase

AChE est une enzyme dimère de 537 acides aminés. Le site actif contient quelques acides aminés spécifiques qui jouent un rôle important dans la stabilité du complexe AChE-ACh. Selon une étude récente de Sussman *et al.*, (1991), le site actif de l'AChE est spécifiquement représenté par les acides aminés Glu 327, His 440 et Ser 200 et se situe à la base de la gorge profonde étroite de 20 Å (**Chibat et Guechir, 2015**). Ce site actif possède un site catalytique qui peut être décomposé en 2 parties :

Le site estérasique correspond au locus au niveau duquel la portion acétyl de la molécule d'ACh se fixe et forme l'intermédiaire tétraédrique. L'ACh est alors clivée, libérant ainsi la choline et l'intermédiaire « enzyme-acylé »

La triade catalytique est composée des résidus Ser200, Glu327 et His440 C'est au niveau de la sérine catalytique que se fixe la portion carbonyle de la molécule d'ACh ;De son côté, L'His440 se comporte comme un catalyseur acido-basique pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire tétraédrique « acétyl-enzyme » ;Grâce à son noyau imidazole, elle établit deux liaisons hydrogènes avec la Ser200 et le Glu327 qui jouent, dans cette triade catalytique, le rôle de donneur et d'accepteur final de proton, respectivement. L'enzyme devra pouvoir stabiliser l'oxygène du carbonyle de l'ACh, qui se charge négativement lors de la formation de l'intermédiaire tétraédrique « acétyl-enzyme ».De ce fait, une poche est présente dans le site actif de l'enzyme, qu'on nomme le trou « oxyanion » et qui est constituée des résidus Gly118, Gly119 et Ala201 ;de même, on constate, au niveau du site éstérasique, on trouvera une petite cavité hydrophobe nommée la « poche acyle », constituée des résidus Trp233, Phe288, Phe290 et Phe331 Cette poche joue un rôle clé dans la stabilité du fragment hydrophobique du substrat. (**Laouar, 2015**)

Le site anionique est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330. La charge positive du ligand sera effectivement stabilisée par l'attraction électrostatique du résidu Glu199, mais le sera beaucoup plus effectivement par son interaction avec les électrons π des noyaux aromatiques environnant. Les résidus Trp84 et Phe330 seront les deux plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation (**Chibat et Guechir ; 2015**). Ainsi le groupement choline de l'ACh peut établir des interactions de type cation- π avec les résidus aromatiques du site anionique. Le sous-site anionique est également impliqué dans la liaison à des inhibiteurs du site actif de l'AChE. Les structures des complexes de la TcAChE avec les inhibiteurs

edrophonium et tacrine montrent des interactions de type cation- π , et des empilements π (π stackings), respectivement, avec le noyau indole du Trp84. On estime que près de la moitié de l'énergie libre de stabilisation de l'ACh est fournie par le site anionique. En outre, ce site permet des affinités beaucoup plus élevées que celles de l'ACh : l'affinité de l'analogue de substrat m-(N,N,N-triméthylammonio)-2,2,2-trifluoroacétophenone (TMTFA) est 10^{10} fois plus élevée que celle de l'ACh. Enfin, ce site joue également un grand rôle dans la spécificité de l'AChE. (Sanson, 2009). (Fig. 4 et 5).

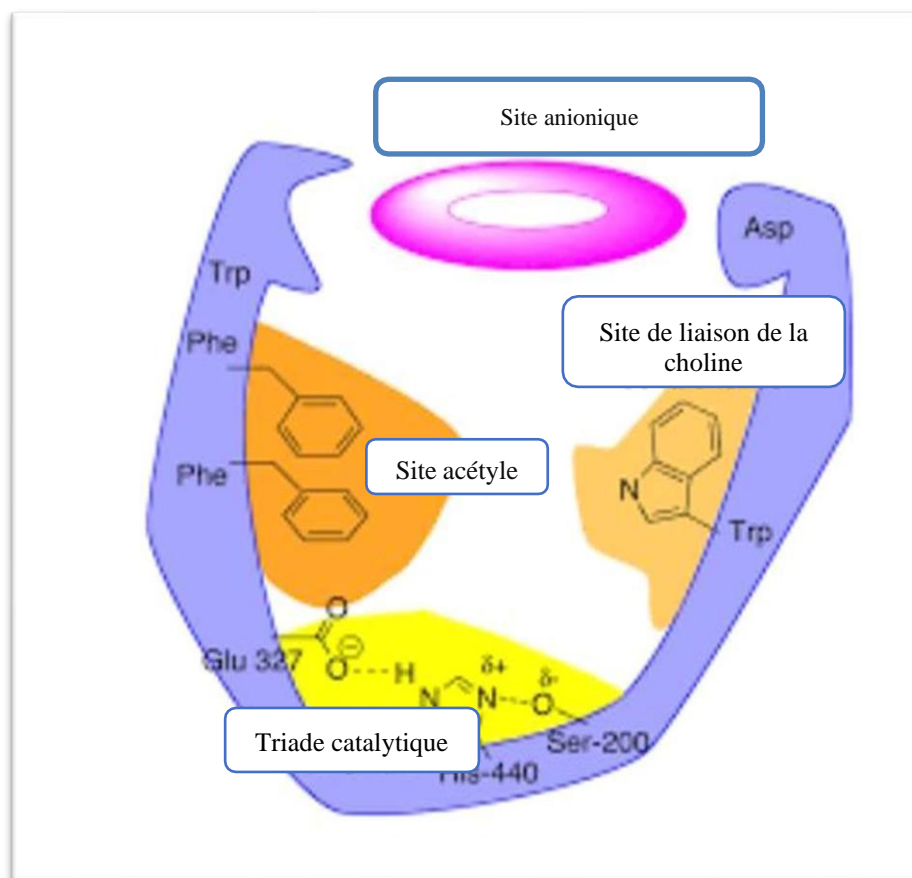


Figure 4 : Site actif d'acétylcholinestérase (Kerboua laouar et Kerrouchi, 2021)

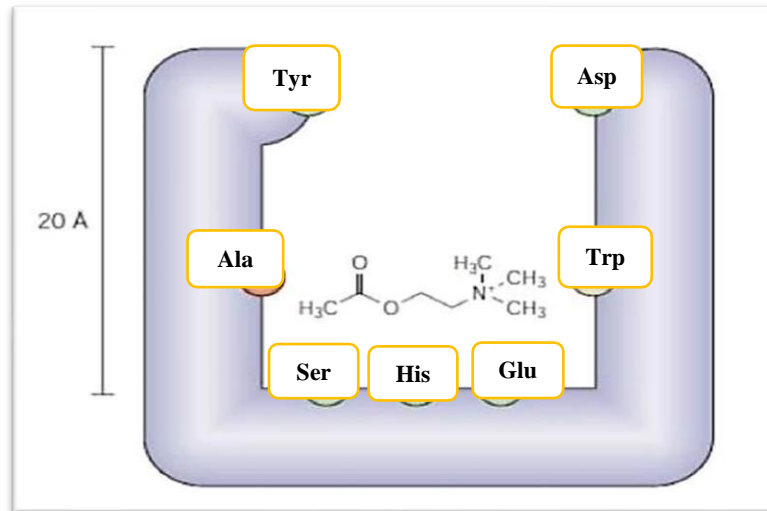


Figure 5 : Site actif de la butyrylcholinestérase est au fond d'une gorge de 20 Å (Girard, 2006).

I.1.4. Mécanismes d'action de cholinestérase

Le rôle de cette enzyme est l'hydrolyse du substrat acétylcholine. Cette hydrolyse se déroule en deux étapes : Acylation et dé-acylation.

Une fois que l'acétylcholine est stabilisée au site actif, l'acylation se produit par conversion de protons (transfert) de Ser200 vers le fragment imidazole de His440, après le Ser200 déprotoné attaque le substrat (Acétylcholine). Ce proton est capturé par la choline et quitte le site actif. Le complexe acyl-enzyme tétraédrique résultant est stabilisé par une lacune d'oxyanion. Une molécule d'eau est ensuite ajoutée à ce complexe pour décomposer l'acide acétique. C'est l'étape de désacylation (Kerboua et Kerrouchi, 2021).

Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases conservé, est le suivant :

- (0) : Formation du complexe michaëlien
- (1) : Attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le substrat.
- (2) : Formation du 1er intermédiaire tétraédrique.
- (3) : Libération du 1er produit (choline).
- (4) : Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la sérine acylée.
- (5) : Formation du 2ème intermédiaire tétraédrique.
- (6) : Libération du 2ème produit (acétate) (Zegouba et Lahlah, 2018) (Fig. 6).

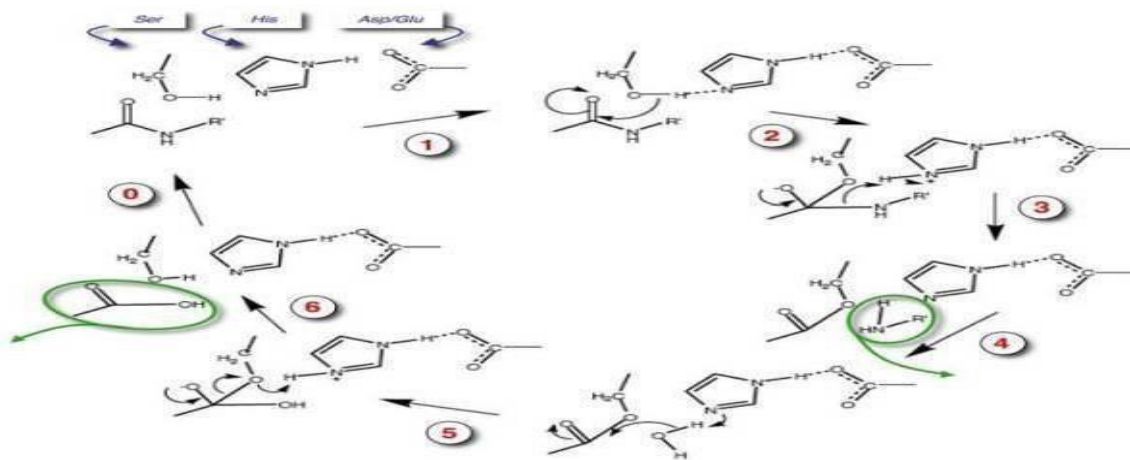


Figure 6 : Mécanisme général d'hydrolyse par une serine hydrolase
(Colletier, 2006)

I.1.5. Rôle physiologique

L'ACHé joue un rôle clé dans l'arrêt de l'activation des récepteurs dans la transmission cholinergique intervenant dans les terminaisons parasympathiques (Chibat et Guechir, 2015). Les fonctions non classiques des cholinestérases peuvent inclure l'hydrolyse catalytique de l'ACh dans des contextes non synaptiques, comme cela a été proposé pour les cholinestérases solubles circulantes et les cholinestérases associés aux cellules dans l'influx sanguin dans le système nerveux central (Girard, 2006). La fonction de l'acétylcholinestérase dans l'organisme est l'hydrolyse spécifique du neurotransmetteur acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques (Hamid oudjana, 2017). La principale fonction physiologique de cette enzyme est de contrôler une grande partie de l'excitation cholinergique qui se produit dans le cerveau en décomposant rapidement l'excès d'acétylcholine (Chibat et Guechir, 2015).

Le rôle physiologique de la butyrylcholinestérase est encore au stade hypothétique. Il peut hydrolyser l'acétylcholine. Il pourrait être impliqué dans l'hydrolyse des neurotransmetteurs lors de la différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire. Les personnes atteintes d'un déficit en butyrylcholinestérase n'ont pas de problèmes métaboliques ni d'effets secondaires à moins qu'elles ne reçoivent du mivacurium ou de la succinylcholine (Bilami et Boukahil, 2015) (Fig.7).

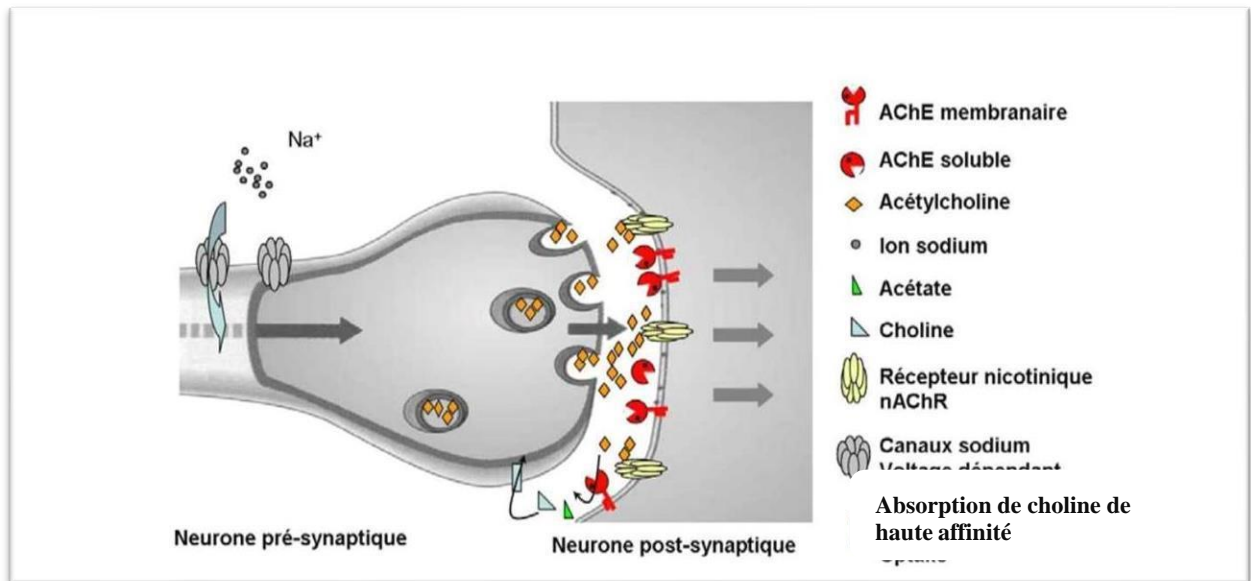


Figure 7 : Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique (**Badiou, 2007**).

I.1.6. Acétylcholine

L'acétylcholine est l'ester acétique de la choline (Fig.8) (**Ben dahou et Fili, 2017**) et est synthétisée à partir de la choline et de l'acétyl-CoA par l'enzyme choline acétyltransférase et rarement par l'enzyme carnitine acétyltransférase. Pour limiter l'activation des cellules effectrices, l'acétylcholine est dégradée en choline et acétate après avoir été hydrolysé par l'acétylcholinestérase (**Medjber ,2012**). L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle important dans le système nerveux central (**Dontigny, 2014**).

L'acétylcholine est impliquée dans diverses fonctions cérébrales telles que le développement, le contrôle du flux sanguin cérébral, le cycle veille-sommeil, ainsi que les processus cognitifs et mémoriels (**Faucher, 2015**). Il peut dépolariser la membrane et transmettre des impulsions à la jonction neuromusculaire (**Ben Nasr, 2022**). Ainsi selon Medjber (2012) la molécule d'acétylcholine est synthétisée, stockée et sécrétée à partir des synapses colinérgiques.

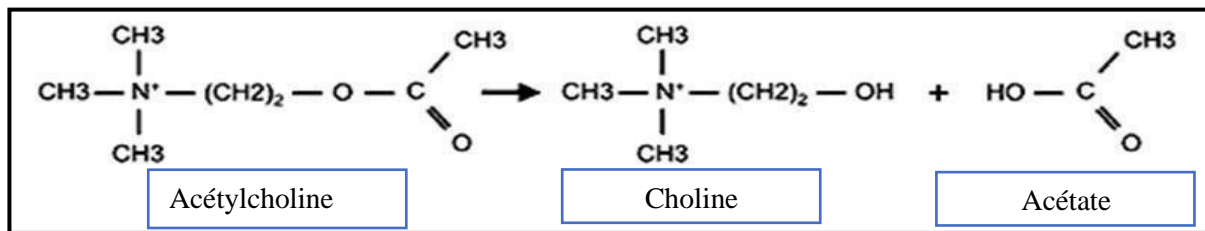


Figure 8 : Structure moléculaire de l'Acétylcholine (Colletier, 2006).

I.1.7. Récepteurs de l'acétylcholine

L'acétylcholine interagit avec deux types de récepteurs cholinergiques qui se différencient par les molécules naturelles qui les activent, la muscarine pour les récepteurs muscariniques et la nicotine pour les récepteurs nicotiniques (Medjber, 2012).

I.1.8.1. Récepteurs de type nicotinique

Les récepteurs nicotiniques (nAChR) sont des récepteurs de canaux ioniques qui appartiennent à la superfamille des récepteurs pentamériques à boucle de cystéine. Ils sont composés de cinq sous-unités identiques ou hétérogènes (α , β , γ , δ , ϵ) agencées pour former des canaux ioniques. Il existe deux isotypes de récepteurs nicotiniques : 1) le muscle situé à la jonction neuromusculaire des muscles somatiques et composé de deux sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité γ ou ϵ et une sous-unité δ ; et 2) les récepteurs de type neuronal présents dans le système nerveux central et périphérique et dans les cellules non neuronales telles que les cellules épithéliales respiratoires (bronchiques, alvéolaires, glandulaires, etc.. Les Récepteurs nicotiniques nAChR sont organisés soit en homopentamères, constitués de cinq sous-unités identiques $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, soit en hétéropentamères, constitués de combinaisons de sous-unités ($\alpha 2$ – $\alpha 6$) ou $\alpha 10$ avec les sous-unités $\beta 2$ – $\beta 4$ (Medjber, 2012).

I.1.8.2. Récepteurs de type muscarinique

Concernant la répartition des récepteurs muscariniques, parmi les différentes espèces moléculaires, les récepteurs de type M1 sont connus pour être les plus abondants dans le cerveau. Ils sont principalement présents dans l'hippocampe, le striatum et le thalamus. Ils représentent 60 % du nombre total de récepteurs muscariniques de l'hippocampe (Tayebati *et al.*, 2006) ; (Barbier, 2009).

Il est également impliqué dans la mise en œuvre de la mémoire hippocampique, notamment liée à la mémoire dite associative (Barker et Warburton, 2009).

I.1.9. Cholinestérase chez les insectes

Chez les insectes, l'AChE est une protéine complexe avec un seul site de liaison. Sites anioniques, sites estérases, divers sites périphériques et de nombreux domaine hydrophobe, le site actif de l'enzyme contient un centre anionique. Il rejoint les groupements cationiques (OP et carbamate) du substrat et le fragment estérase (qui possède une sérine). Le groupe OH du site estérase est acylé au cours de la réaction d'hydrolyse pour inclure un site anionique (Mohamed, 2011).

Charge négative du groupe COO sur la chaîne latérale de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique. Ce site anionique ancre la charge positive portée par l'ammonium quaternaire de l'ACh. L'AChE est une sérine hydrolase essentielle à la régulation de l'action des neurotransmetteurs. Agents pathogènes de l'ACh dans le système nerveux central des mammifères et des insectes. Chez les insectes, l'AChE réside principalement dans le SNC, Forme monomoléculaire, dimère amphipathique ancré à la membrane par le glycolipide glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'AChE des insectes est largement distribuée dans le cerveau, le thorax, l'abdomen et les ganglions abdominaux. Les distributions favorables comprenaient les neuropiles du SNC tels que les neuropiles précérébraux et tricérébraux, les lobules et la moelle du lobe optique, les centrosomes, à l'intérieur du calice et les glomérules antennaires (Mohamed, 2011) (Fig. 9).

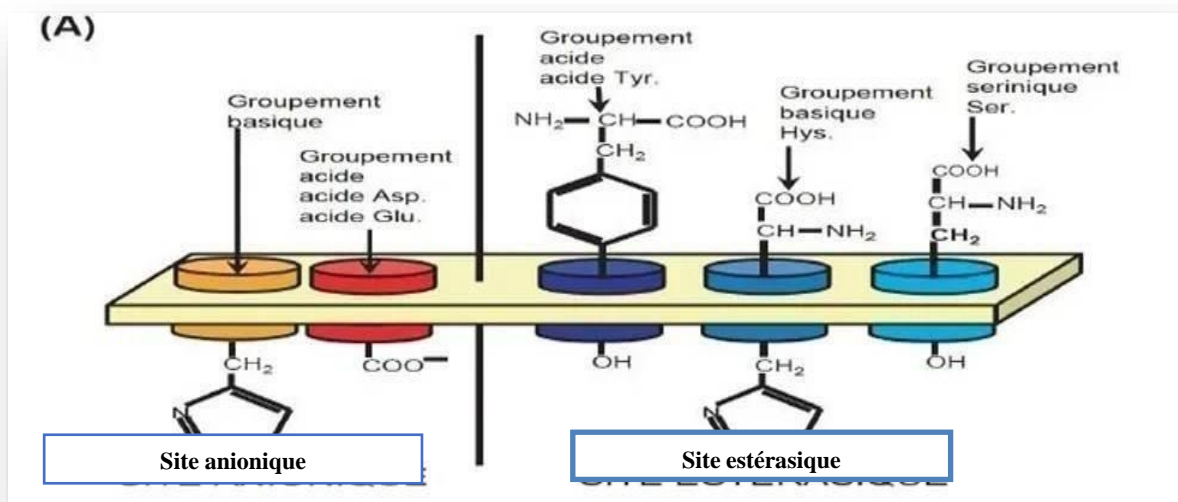


Figure 9 : Structure de site actif de l'acétylcholinestérase chez les insectes

(Mohamed, 2011).

I.1.10. Inhibiteurs de cholinestérase

Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase empêchent la dégradation de l'acétylcholine libérée, il en résulte une persistance du médiateur dans la synapse et une amplification de la réponse biologique. Ils réagissent chez les insectes avec l'acétylcholinestérase. Ils empêchent ainsi la destruction de l'acétylcholine dont l'accumulation perturbe le comportement de l'insecte et entraîne sa mort sans se mouvoir et se nourrir (**Hamid oudjana, 2017**). D'après le mode d'action les inhibiteurs de l'ACH peuvent être divisés en deux groupes réversible et irréversible (**Colovic et al., 2013**).

I.1.10.1. Inhibiteurs réversibles

Ces inhibiteurs bloquent temporairement l'enzyme pendant qu'elle est active. Les concentrations sont suffisantes, elles sont utilisées en thérapeutique, et la plupart sont connues depuis longtemps (**Laouar, 2015**) exemple : Carbamates : le carbaryl, l'aldicarbe, le carbofuran, le bendiocarb, le propoxur ou l'aprocarbe, le méthomyl, le pirimicarb, le formétanate et l'oxamyl (**Chefirat et al., 2013**).

I.1.10.2. Inhibiteurs irréversibles

Exemple des composés organophosphorés qui sont des molécules composées d'un atome de phosphate auquel sont attachés divers groupes chimiques qui déterminent les propriétés exactes du composé. Par conséquent, il existe de nombreux types de pesticides organophosphorés. Les organophosphorés sont des inhibiteurs irréversibles de l'AChE. Ils font des lésions. Il agit biochimiquement par phosphorylation du site estérase de l'enzyme, empêchant l'hydrolyse de l'acétylcholine. Ainsi, une liaison covalente est formée entre le groupe phosphate et le résidu Ser200 du site actif de l'enzyme. Dans un second temps, cette phosphorylation est rendue irréversible par désalkylation. Cela conduit au vieillissement des enzymes, ce qui équivaut à une inactivation quasi permanente (**Laouar, 2015**) exemple : organophosphorés : le chlorpyrifos, le diazinon, le dursban, le fenthion, le malathion et le parathion (**O'Malley, 2022**).

I.2. La lutte biologique contre les insectes ravageurs

Les moustiques ont toujours été considérés comme une source de perturbation principalement en raison de leur rôle prévalent dans la transmission de diverses maladies aux humains et aux animaux. Pour lutter contre ces insectes nuisibles, l'humanité a utilisé plusieurs

approches qui ont engendré des effets néfastes sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine et animale (**Belkhiri et al., 2023**). Il est important de mettre en œuvre des mesures de prévention et de lutte contre les moustiques, y compris *Culex pipiens* L., afin de réduire ces dommages et de protéger la santé humaine et animale.

I.2.1. Moyens de lutte biologique

I.2.1.1. Moustiques transgéniques

La technique du lancement des moustiques génétiquement modifiés consiste à libérer les moustiques mâles porteurs d'un transgène qui code pour un gène dominant qui provoque une stérilité des individus. C'est un gène artificiellement modifié. Lorsque l'accouplement avec les femelles de *C. pipiens* est réalisé, ce transgène est transféré chez de nombreuses descendances. En effet, les larves hybrides ne peuvent survivre qu'en présence de l'antibiotique "tétracycline" (**Mourot, 2020**).

I.2.1.2. Utilisation de *Gambusia affinis* (Poeciliidae)

Gambusia affinis (Poeciliidae) est une espèce de poisson d'eau douce utilisée dans la lutte biologique contre les moustiques. Ce poisson larvivore se nourrit des larves de moustiques, contribuant ainsi à réduire leur population de manière naturelle (**Bendlali et al., 2001; Zerouali-Khodja et al., 2010**).

I.2.1.3. Utilisation de bactéries entomopathogènes

Sont des bactéries spécifiques, telles que *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) et *Bacillus sphaericus* (Bs), sont des bactéries de Gram+, utilisées comme agents de lutte biologique contre les larves de moustiques. Ces bactéries produisent des toxines qui ciblent spécifiquement les larves de moustiques (**Zogo, 2019**).

I.2.1.4. Utilisation des insecticides d'origine botanique

Des insecticides contenant des produits naturels et respectueux de l'environnement peuvent être utilisés pour éliminer les moustiques. Différentes plantes possèdent une activité insecticide notable en raison de la présence de composés actifs qui agissent contre les insectes, exemple de *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae), *Lippia multiflora* (Verbenaceae) et *Tephrosia vogelii* (Fabaceae) (**Diahuissie et al., 2023**).

I.3. *Culex pipiens* L.

Les *Culex pipiens* L. sont des insectes omnivores. Ils vivent principalement en milieu aquatique, obtenus par la pluie, la fonte des neiges, les lacs et des champs irrigués, ces sources sont des cibles optimales pour les programmes de lutte contre les moustiques (**Ibrahim et al., 2023**). En fin d'été, il a fait preuve d'une agressivité excessive, se distinguant par une piqûre principalement nocturne et une activité accrue dans l'obscurité. Les femelles possèdent des pièces buccales, utilisées pour drainer le sang de leur proie (**Hekal et al., 2023**). Ce faisant il est constitué l'un des principaux vecteurs de maladie dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord (**Haba et al., 2022**).

I.3.1. Position systématique

Culex pipiens L. appartient à la famille des Culicidae qui présente un groupe des insectes piqueur-suceurs, appartenant à l'ordre des Diptères et au sous-ordre des Nématocères. Ainsi ils occupent la première place, soit par la nuisance des autres, soit par le rôle de vecteur d'organismes pathogènes de certaines espèces (**Touati, 2019**). La position systématique selon (**Berchi, 2000**) est la suivante (Tab. 01).

Tableau 01- Position taxonomique de *Culex pipiens* L.

Règne	Animalia
Sous règne	Metazoa
Embranchement	Arthropoda
Sous embranchement	Antennata
Classe	Insecta
Sous classe	Pterygota
Ordre	Diptera
Sous ordre	Nematocera
Famille	Culcidae
Sous famille	Culicinae
Genre	Culex
Espèce	Pipiens

I.3.2. Morphologie de *Culex pipiens* L.

I.3.2.1. L'œuf

La femelle pond ses œufs, de moins de 1 mm de diamètre, perpendiculaire à la surface de l'eau sous forme de faisceaux. Une femelle peut se reposer jusqu'à 300 œufs, qui éclosent entre 24 et 48 heures quand la température de l'eau est adéquate (Resseguier, 2011). Leur morphologie sont noirs et allongés-ovales. L'extrémité postérieure est pointue, et La largeur est plus grande à l'extrémité antérieure (Soliman *et al.*, 2014) (Fig. 10).

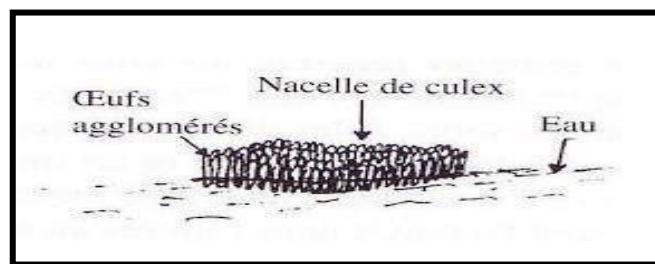


Figure 10 : Faisceaux des œufs de *Culex pipiens* L. (Resseguier, 2011).

I.3.2.2. La larve

La larve émerge de l'œuf et est positionnée en oblique par rapport à la surface de l'eau et bouge par mouvements saccadés (Fig. 11). Son régime alimentaire est composé de plancton et de particules organiques ingérés raison de ses pièces buccales, Elle respire par le siphon (Resseguier, 2011). Au stade larvaire, ce qui subsiste le plus souvent entre 6 à 7 jours jusqu'en s'évalué en lympe (Ibrahim *et al.*, 2023).

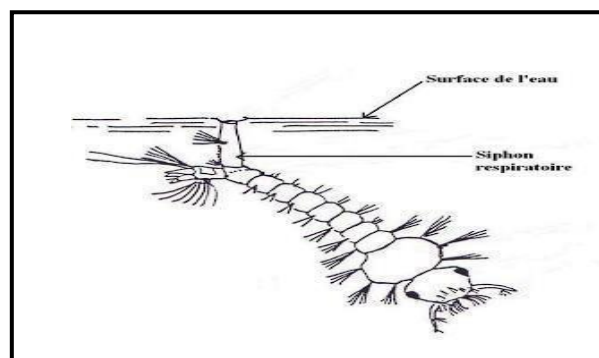


Figure 11 : Larve de *Culex pipiens* L. (Resseguier, 2011).

I.3.2.3. La lympe

La nymphe a un modèle de point d'interrogation elle est respirée par des trompettes, situées dans le céphalothorax, ainsi Elle ne consommer aucune nourriture. Elle est extrêmement sensible et plonge dans l'eau au faible mouvement. Les lymphes restartant entre 2 à 4 jours (Resseguier, 2011) (Fig. 12).

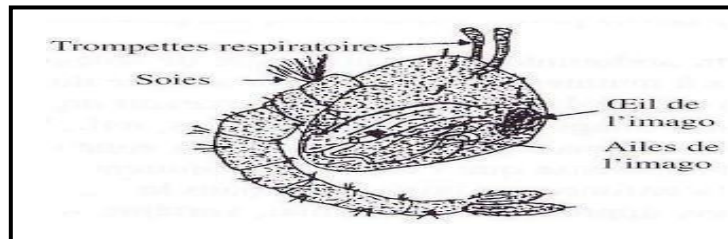


Figure 12 : Morphologie de lympe de *Culex pipiens* L. (Resseguier, 2011).

I.3.2.4. L'adulte

Les adultes sont des aériens. Leur corps et leurs ailes sont couvrant par des poils, le bord postérieur des ailes est frangé par des écailles ; chez le male les antennes à caractère plumeuses de 14 articles, et chez la femelle de 15 articles d'antennes (Balenghien, 2007) (Fig. 13).

Le mâle de *Culex pipiens* L. consomme seulement le nectar et le sec suc d'extrait de plantes et mourrait après le couplage. La femelle vit de trois semaines à trois mois selon le degré de température, se drainer de sang essentiel pour la maturation les ovules. À l'automne, lorsque les températures baissent, les femelles cherchent un abri passant plusieurs mois sans nourriture. Elles présentent la capacité de survivre grâce aux réserves lipidiques amassées aux suc des végétaux. À partir de printemps, elles reviennent à la consommation de repas sanguins (Resseguier, 2011).

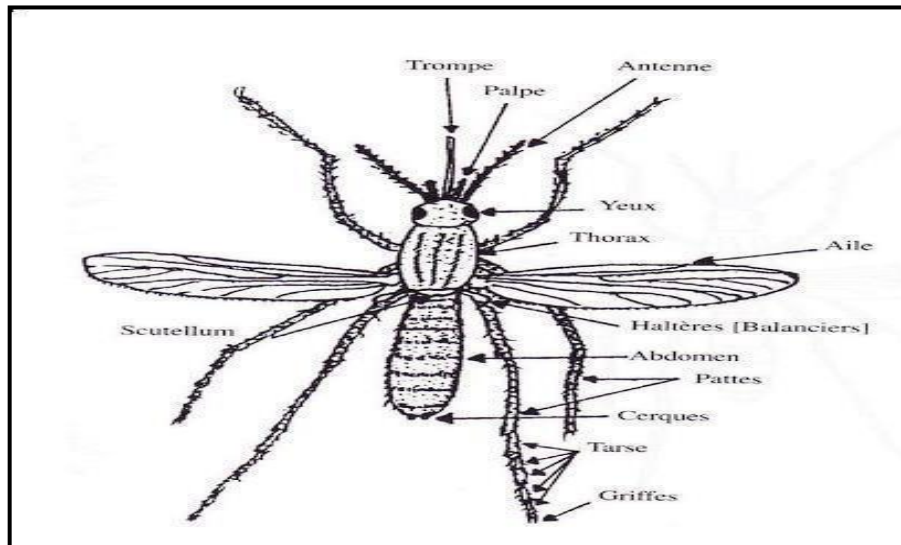


Figure 13 : Morphologie d'adulte de *Culex pipiens* L. (Resseguier, 2011).

I.3.3. Cycle de développement

Les moustiques en tant qu'insectes holométaboles, subissent une transformation complète de leur développement. Ils passent par une phase larvaire aquatique, suivie d'une phase nymphale courte, avant de devenir des adultes aériens, la durée du cycle de vie de la larve de *Culex pipiens* L. varier en fonction des conditions environnementales (Poupardin, 2011) (Fig.14).



Figure 14 : Cycle de développement du moustique *Culex pipiens*

(Sahir-Halouane et al., 2021).

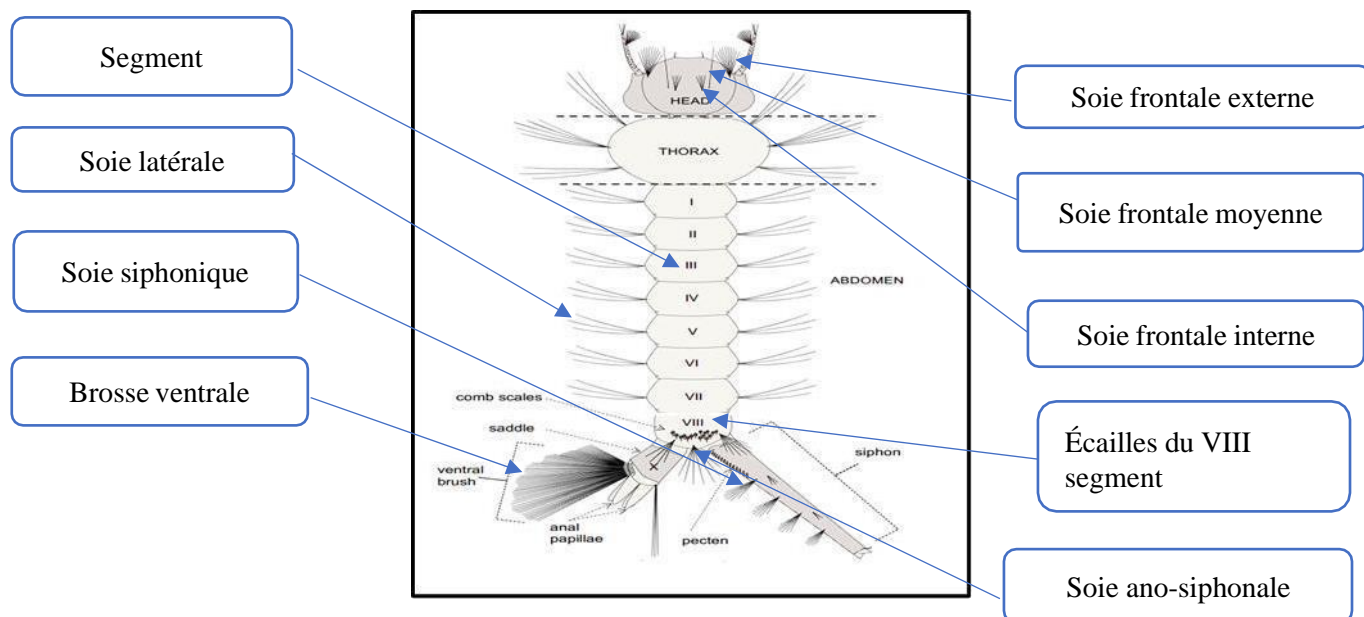


Figure 15: Morphologie de larve *Culex pipiens* L. (Burkett-Cadena, 2013).

les quatre stades larvaires peuvent être différenciés selon plusieurs paramètres cités dans le tableau 02

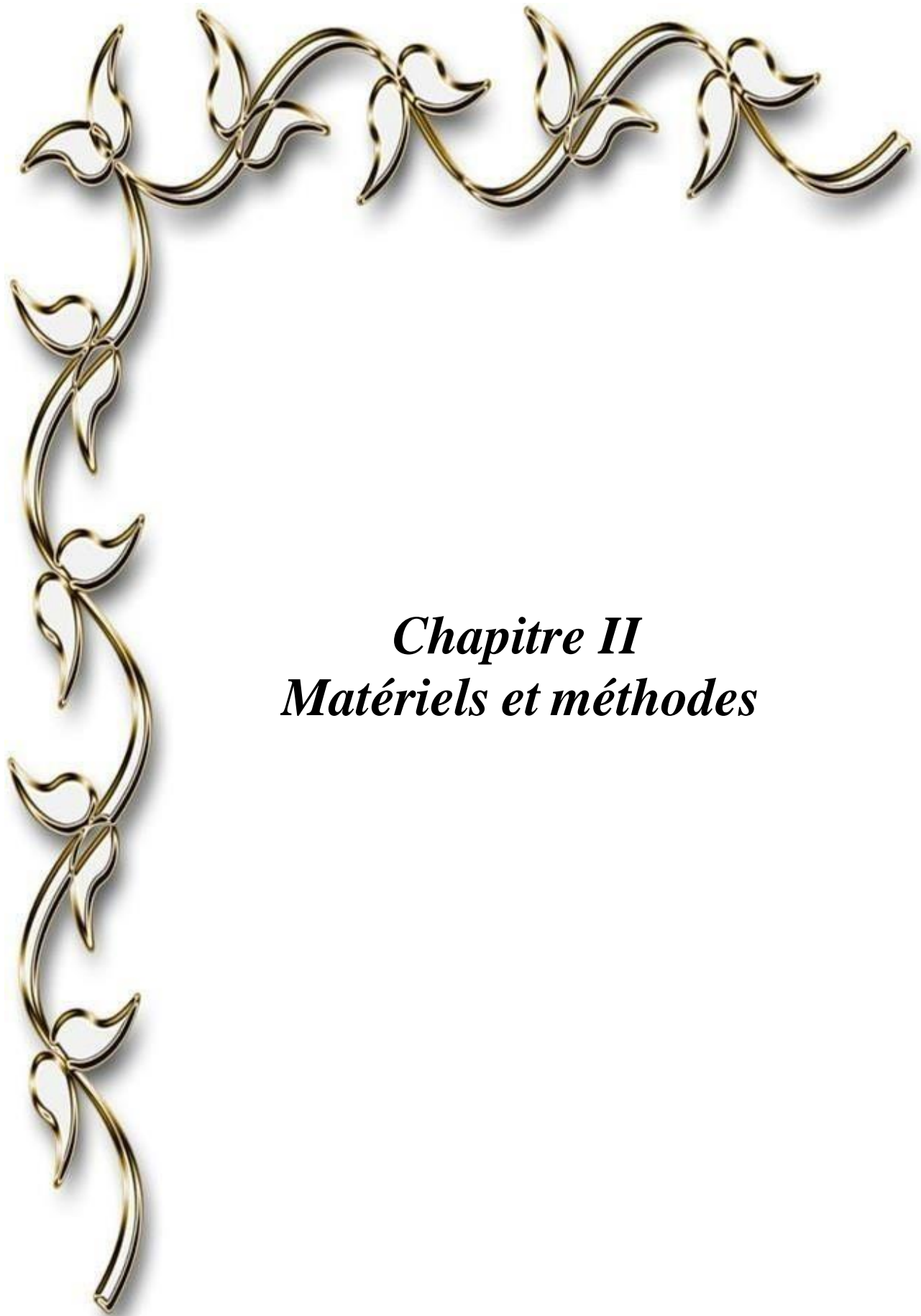
Tableau 02- Caractères morphologiques des 4 stades larvaires de *Culex pipiens* L. (Krida et al., 1998).

Stades	L1	L2	L3	L4
Moyenne de longueur (mm)	1,27	2,26	3,76	5,75
Tête				
Soie frontale interne	Simple	2 branches	4 branches	5 branches
Soie frontale moyenne	Simple	2 branches	3 branches	5 branches
Soie frontale externe	Simple	2 branches	5 branches	8 branches
Soie antennaire	3 branches	10 branches	14 à 17 branches	21 à 28 branches
Abdomen				
Écailles du VIII segment	10 écailles sur 1 rangée	18 à 24 écailles sur 2 rangées	33 à 46 écailles sur 3 rangées	33 à 46 écailles sur 4 rangées
Soie ano-siphonale	Simple	2 ou 3 branches	3 ou 4 branches	5 à 8 branches
Brosse ventrale	Absent	4 paires de soies	6 paires de soies	6 paires de soies

I.3.4. Risques sanitaires de *Culex pipiens* L.

Transmission de maladies : *Culex pipiens* L. est un vecteur important de diverses maladies, notamment la fièvre du Nil occidental (**Zientara et al., 2009**). L'encéphalite équine (**Segondy, 2020**) et certaines formes de fièvres hémorragiques, Ces maladies peuvent avoir des conséquences graves sur la santé humaine et animale (**Krida et al., 2011**).

Les piqûres de *Culex pipiens* L. peuvent provoquer des réactions allergiques (**Fecherolle, 2008**). Des démangeaisons, des irritations et des inflammations de la peau, entraînant une gêne et une perte de qualité de vie. Les infestations de moustiques peuvent également perturber le sommeil et causer de l'anxiété (**Brunet, 2008**).



Chapitre II
Matériels et méthodes

II.1. Principe adopté

Notre étude a pour but de déterminer l'effet toxique des extraits aqueux de la plante *Pergularia tomentosa* (Apocynaceae) sur les larves de *Culex pipiens* (Apocynaceae). Il s'agit d'une évaluation de la réponse biologique du *Culex pipiens* (Apocynaceae) mis en présence d'extraits bruts foliaires de *Pergularia tomentosa* (Apocynaceae) et de rechercher leurs activités larvicides. Les paramètres étudiés sont le taux de mortalité des individus et l'activité d'enzyme cholinestérase utilisée comme indice de la toxicité, compte tenu de ses propriétés biochimiques faisant d'elle le plus souvent les cibles de certains métabolites secondaires botaniques.

II.2. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé se compose des larves L₄ de *Culex pipiens* L. (Culicidae) ainsi que un extrait aqueux des feuilles de la plante *Pergularia tomentosa* L. (Apocynaceae).

II.2.1. Choix de la matière végétale

Les feuilles de la plante *Pergularia tomentosa* L. (Apocynaceae) (fig. 16) ont été cueillies par le ciseau au mois de février 2023, dans la région de Daia ben Dahoua, située à 10Km au nord-ouest de la wilaya de Ghardaïa. La partie aérienne de la plante (feuilles) a été rincées à l'eau, puis séchée à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant plusieurs jours à une température ambiante. Après séchage les feuilles ont été broyées en poudre fine dans un broyeur de la marque IKA de 230 V, (fig. 17) et conservées dans des bocaux hermétiques en verre portant une étiquette où le nom de l'espèce, la date et lieu de la récolte sont mentionnés.



Figure 16: *Pergularia tomentosa* L. (Photo originale, 2023).



Figure 17 : Poudre des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. (Photo originale, 2023)

II.2.1.1. Présentation de la région de collecte

Daia ben Dahoua est une commune de la wilaya de Ghardaïa située à 10 km au nord-ouest de Ghardaïa et en Algérie, à environ 600 kilomètres au sud de la capitale Alger. Elle est située dans la partie nord du plateau saharien à 32° 30' de latitude nord, Longitude 3°45' (Kemassi et al., 2014) (Fig. 18).

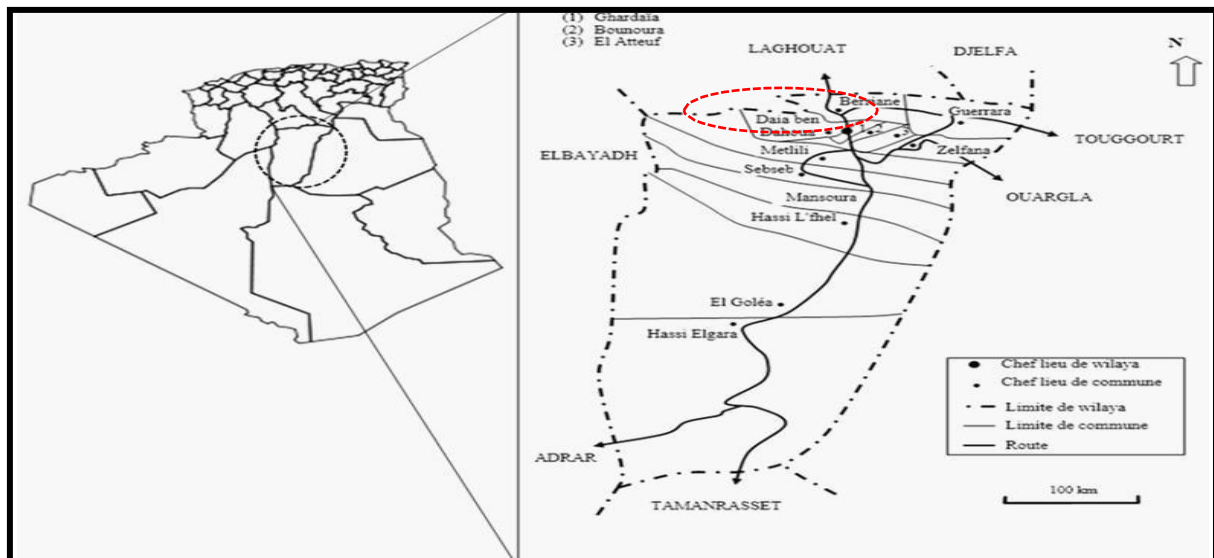


Figure 18 : Présentation de la région de Daia ben Dahoua, Wilaya de Ghardaïa (Ben Semaoune et al., 2019).

II.2.1.2. Repartitions géographiques de *Pergularia tomentosa* L.

P. tomentosa L. est une plante vivace des pays secs. Elle pousse sur les sols généralement sableux et couvre de vastes régions allant du sud Algérien jusqu'en Afrique du Nord (Goyder et al., 2006 ; Tlili, 2015). De même Babaamer et al., (2012) signalent que cette plante est connue pour être distribuée dans le Sahara et les pays subsahariens d'Afrique du Nord dont l'Algérie, le Niger et l'Égypte. Cette plante est également commune au Moyen-Orient y compris l'Arabie saoudite et la Jordanie. *P. tomentosa* L. habite les lits d'oued et les dépressions à fond rocheux. C'est une plante poison selon Tlili (2015).

II.2.1.3. Description botanique de *Pergularia tomentosa* L.

C'est une plante herbacée ou semi-ligneuse, appartient à la famille des (Asclepiadaceae) qui comprend environ 200 genres et 2500 espèces et est une plante herbacée ou un arbuste essentiel endémique des régions tempérées et subtropicales (Francois, 2008) ; (Rebouh, 2016).

Un arbuste vivace pouvant atteindre plus d'1 mètre de hauteur. Les jeunes pousses volubiles s'enroulent souvent autour des pousses plus âgées, leur donnant un aspect touffu, ainsi un latex blanc corrosif qui peut endommager la peau, est observé au niveau des tiges. La tige est ornée de petits poils verts et peut grimper ou s'enrouler, apparaissant floue à ses débuts. Les feuilles sont caractérisées par leur simplicité. Elles sont recouvertes de poils gris argentés, formant une texture orbiculaire. Leur extrémité est pointue, et elles sont attachées à la tige par un pétiole mesurant entre 0,5 et 3 cm de long (fig. 19). Elles sont dépourvues de stipules et ont des pétioles mesurant de 0,5 à 1,5 cm de long. Les Fleurs sont bisexuées, régulières, aromatiques. Sépales et pétales plus ou moins connés à la base. La Graine est ovales, plates, de 7 à 9 mm de long, d'environ 6 mm de long, blanc cassé au bord, couverte de poils courts et denses, avec une touffe à une extrémité, d'environ 3 cm de long (Popov *et al.*, 2010 ; Schmelzer et Gurib-Fakim, 2013 ; Schmelzer *et al.*, 2013).



Figure 19: Présentation des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. (Photo originale, 2023).

II.2.1.4. Nom vernaculaire et position systématique de *Pergularia tomentosa* L.

Selon (TLILI, 2015) le nom vernaculaire de *Pergularia tomentosa* L. est el kalgha ainsi elle possède de nombreux noms folkloriques

- Arabe : En Algérie ; en Egypte et en Arabie Saoudite, il est connu sous le nom Ghalaka et Ghoulga, Demya, Leben el hamir et Kalga (Chehma, 2006).
- Targui : Tashkat, Dellakal, Tellakh, Sellaha.
- Français : Pergulaire (Al-Mekhlafi et Masoud, 2017).
- Anglais : Pergularia (Lahmar *et al.*, 2017).

La position systématique de *Pergularia tomentosa* L. est présentée dans le tableau 3 :

Tableau 3- Position systématique de *Pergularia tomentosa* L. (Al-Mekhlafi *et al.*, 2017).

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Gentianales
Famille	Asclepiadaceae
Genre	<i>Pergularia</i>
Espèce	<i>Pergularia tomentosa</i> L.

II.2.1.5. Usage de *Pergularia tomentosa* L.

La décoction des feuilles ou des racines sont appliquées sur les plaies, les maladies de la peau, les panaris, les verrues et les ulcères (Schmelzer *et al.*, 2013). Les tiges du *Pergularia Tomentosa* L. ont des utilisations antifongiques (Hassan *et al.*, 2007). En Algérie, cette plante est traditionnellement utilisée pour traiter les angines. Pour cela, elle est grillée jusqu'à ce qu'elle soit complètement brûlée, puis elle est broyée en poudre et mélangée avec du ghee. Ensuite, le mélange est appliqué sur la zone cutanée où se trouve l'angine en effectuant un massage de deux ou trois minutes pour faciliter la pénétration du produit. Enfin, l'endroit est recouvert avec une compresse stérile (Chehma, 2006).

Les douleurs causées par une piqûre de scorpion peuvent être soulagées en utilisant le latex des branches de cette plante. Les propriétés thérapeutiques de *Pergularia tomentosa* L. visant à traiter les effets de l'envenimation scorpionique (Khezzani *et al.*, 2019). Ainsi la poudre sèche de cette plante est utilisée pour effectuer le processus de tannage (Djibo *et al.*, 2021).

II.2.2. Choix de l'insecte

Les insectes utilisés dans l'expérimentation sont des individus de *Culex pipiens* (Culicidae) dans le quatrième stade larvaire, issue d'un élevage de masse réalisé au laboratoire de l'université de Ghardaïa. Le choix des larves est justifié puisque elles sont plus faciles à obtenir que les échantillons des larves des stades L4 de *Culex pipiens* par rapport à ceux des adultes (Séguy, 1931), (Bouabida *et al.*, 2012). L'élevage en laboratoire de ces larves au 4^{ème} stade se fait de manière pratique et en plus grande quantité, ce qui facilite la collecte des échantillons nécessaires pour les études enzymatiques (fig.21).



Figure 20: Larve L₄ de *Culex pipiens* L. (Photo originale, 2023)

II.2.2.1. Échantillonnage de *Culex pipiens* L.

Les larves de *Culex pipiens* L. ont été transportées en mois d'avril à partir d'un bassin situé dans la région de Berriane située à 50 km au nord de Ghardaïa (Belhout et Hassini, 2021). Elles ont été transportées dans un bidon en plastique de 10 L contenant l'eau du bassin à l'aide d'une passoire.

II.2.2.1 Élevage

L'élevage de masse a été réalisé dans un laboratoire au niveau de la faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université de Ghardaïa, dans une cage en forme cubique de 60 cm³ recouverte d'une tulle (fig. 21). La température est comprise entre 30° et 35°, l'humidité relative est de 40±3 % et une photopériode de 12h/12h. Les larves sont nourries tous les 2 jours

d'une mixture composée des résidus de feuilles de plantes et du sucre, ainsi les adultes femelles et mâles sont nourris de l'eau sucrée et pour assurer une fécondation des femelles, un repas sanguin humain est porté de l'hôpital chaque deux jours.

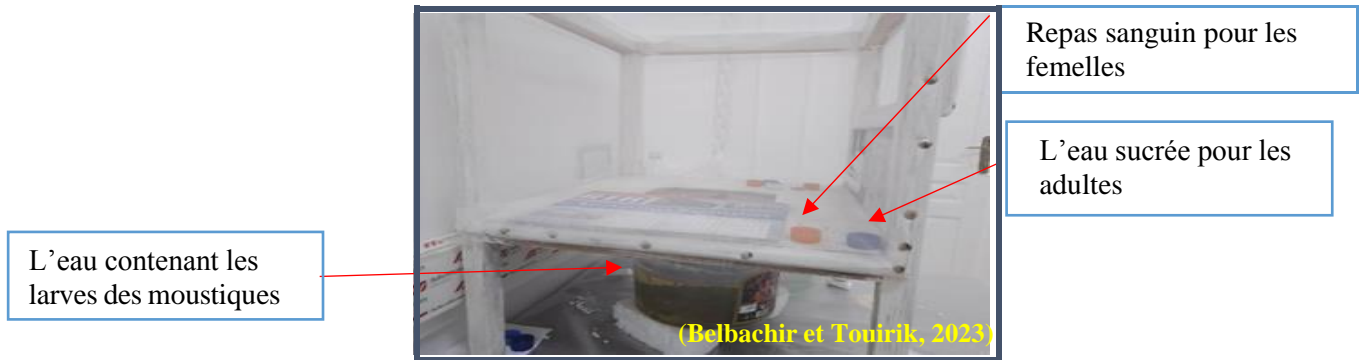


Figure 21 : Elevage des larves de *Culex pipiens* L. (Photo originale, 2023).

II.3. Méthodes d'extractions

Dans le cadre de cette étude, deux procédures d'extraction ont été effectuées. La première consistait en une extraction à reflux utilisant les feuilles de la plante *Pergularia tomentosa* L. la seconde extraction a été réalisée afin d'obtenir l'enzyme cholinestérase à partir des larves L4 des moustiques *Culex pipiens* L.

II.3.1. Extrait végétal de *Pergularia tomentosa* L.

Les feuilles de *Pergularia tomentosa* L. ont été soumises à une méthode d'extraction à reflux afin d'obtenir un extrait aqueux.

II.3.1.1. Principe d'extraction à reflux

Le principe de l'extraction à reflux (extraction solide-liquide) L'extraction par reflux est une méthode d'extraction solide-liquide à chaud. Le reflux permet la réalisation d'une extraction à une température constante (température de reflux) égale à la température d'ébullition du solvant. Ainsi le solvant s'évapore et le réfrigérant condense les vapeurs qui retombent dans le ballon, permettant au solvant d'être ainsi recyclé. Le chauffage (augmentant solubilité et transfert de matière), l'ébullition (agitation) et le reflux (recyclage du solvant) permettent une extraction efficace avec un appareillage relativement simple. Le chauffage à reflux est utilisé pour extraire efficacement des composés phytochimiques (Bonys, 2013). Le chauffage à reflux est couramment utilisé pour extraire efficacement des composés

Phytochimiques à partir de matières végétales. Grâce à la chaleur, l'extraction à reflux facilite la dissolution des composés phytochimiques dans le solvant.

II.3.1.2. Mode opératoire

Une extraction par reflux thermique (fig. 22) est réalisée en plaçant 50 g de poudre sèche des parties aériennes dans un ballon d'un 1 litre et en les portant à ébullition avec 400 ml d'eau distillée. Cette opération est effectuée sur un appareil électrothermique model Electrothermal, portant le numéro de série M752980, fonctionnant à 230 V, pendant une durée de 3 heures. L'extrait obtenu est filtré à l'aide de pompe à vide Rothenberger, modèle Roairvac 3.0, portant le numéro de série 170062, en utilisant un papier filtre plissé de la marque VWR d'un diamètre de 185 mm. Le résidu sec est éliminé tandis que le filtrat est recueilli. L'extrait aqueux récupéré est utilisé pour des tests biologiques (fig. 23).

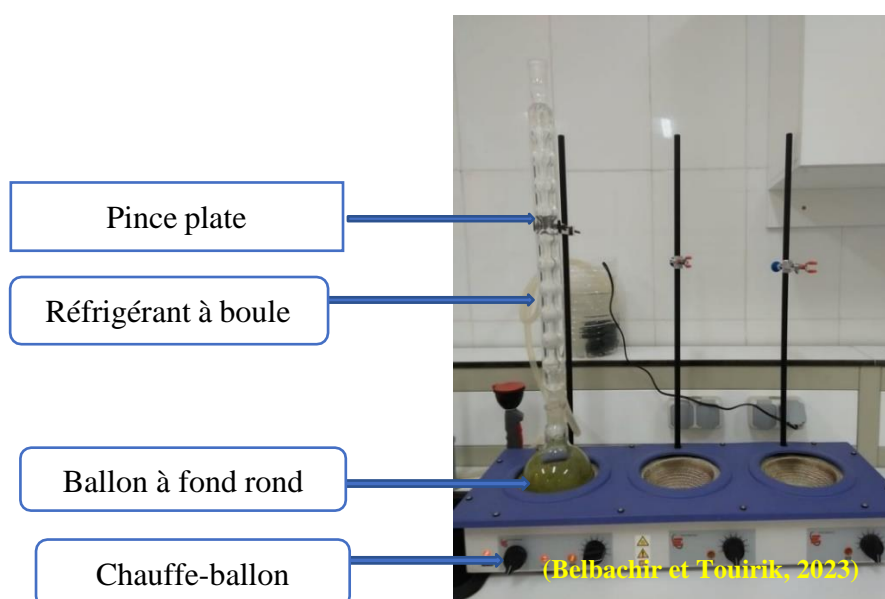


Figure 22 : Extraction à reflux (Photo originale, 2023).

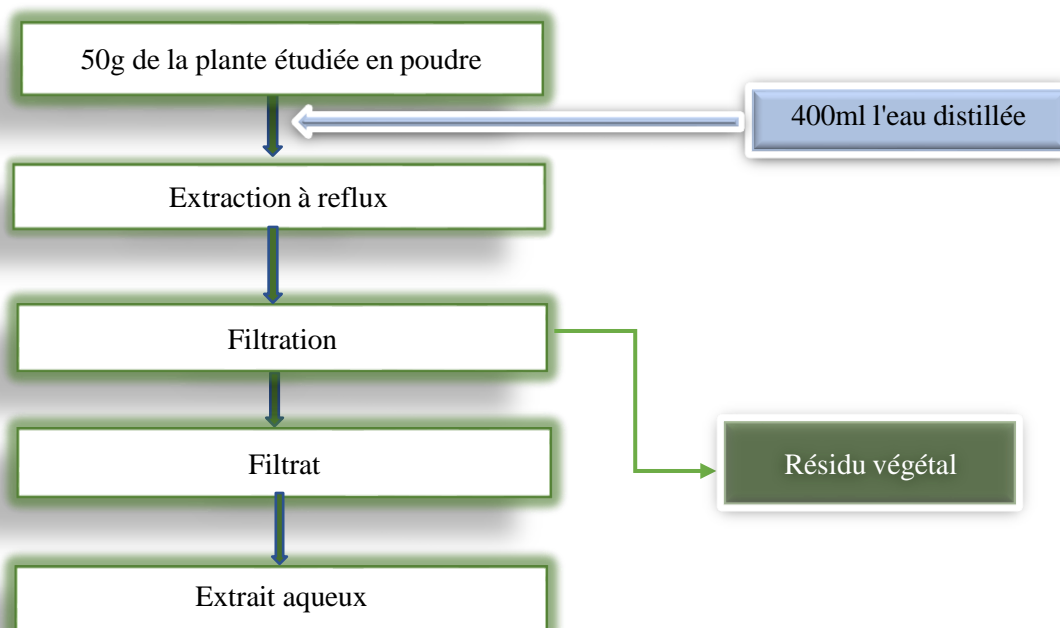


Figure 23 : Protocole de la préparation d'extrait aqueux par reflux.

II.3.2. Extraction d'enzyme cholinestérase

L'extraction de l'enzyme cholinestérase à partir des larves L4 de *Culex pipiens* L. permet l'isolement et la récupération de cette enzyme spécifique pour l'étude de l'activité enzymatique et le dosage de protéines.

II.3.2.1. Principe

Le processus d'extraction d'une enzyme à partir d'un tissu commence par la désintégration de l'organisation cellulaire grâce à des techniques telles que le broyage, les ultrasons ou la lyse des parois cellulaires. Cependant, l'extraction des enzymes membranaires présente des défis particuliers et nécessite l'utilisation de détergents neutres ou ioniques afin de les solubiliser après la dissociation des membranes. L'extraction d'enzyme acétylcholinestérase des moustiques est réalisée à froid selon la méthode proposée par (Liu et al., 2007).

II.3.2.2. Mode opératoire

Les procédures d'extraction de l'enzyme sont réalisées à froid afin de préserver son activité contre toute altération. Cinq larves L4 sont homogénéisées dans un mortier qui a été préalablement refroidi dans un congélateur.

L'homogénat est récupéré avec 1ml d'eau glacée et 1 ml d'un mélange de 0,1 M tampon phosphate (pH 7,4) contenant 0.1% d'un détergent : le triton X-100. Afin d'éliminer les impuretés et les lipides membranaires détruits par le détergent, une sédimentation est effectuée par centrifugation à 4000 tours/min pendant 20 mn dans une centrifugeuse de type Rotofix 32A, référence 1206. Le surnageât renfermant l'enzyme est récupéré à l'aide d'une micropipette.

II.4. Tests biologiques

Pour évaluer l'effet toxique de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. sur les larves L4 de *Culex pipiens* L. deux tests sont réalisées. Le premier in vivo permet de déterminer le taux de mortalité ainsi que la dose létale pour 50% et 90% des individus (DL50 et DL90) et le temps létal pour 50% et 90% des individus (TL50 et TL90). Le deuxième test réalisé in vitro permet d'évaluer l'effet d'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. Sur l'activité d'enzyme cholinestérase.

II.4.1. Etude de la mortalité

L'étude de la toxicité de l'extrait végétal a été réalisée en diluant celui-ci dans de l'eau minérale à différentes concentrations : 75%, 50% et 25%, ainsi qu'un extrait brut à 100% et un témoin à 0% de l'eau minérale. Les larves L4 ont été soumises à ce traitement avec trois répétitions pour chaque lot Ainsi l'étude est réalisée selon le test de sensibilité normalisé par l'Organisation Mondiale de la Santé pour évaluer l'efficacité des insecticides contre les insectes vecteurs de maladies (**World Health Organization, 2023**).

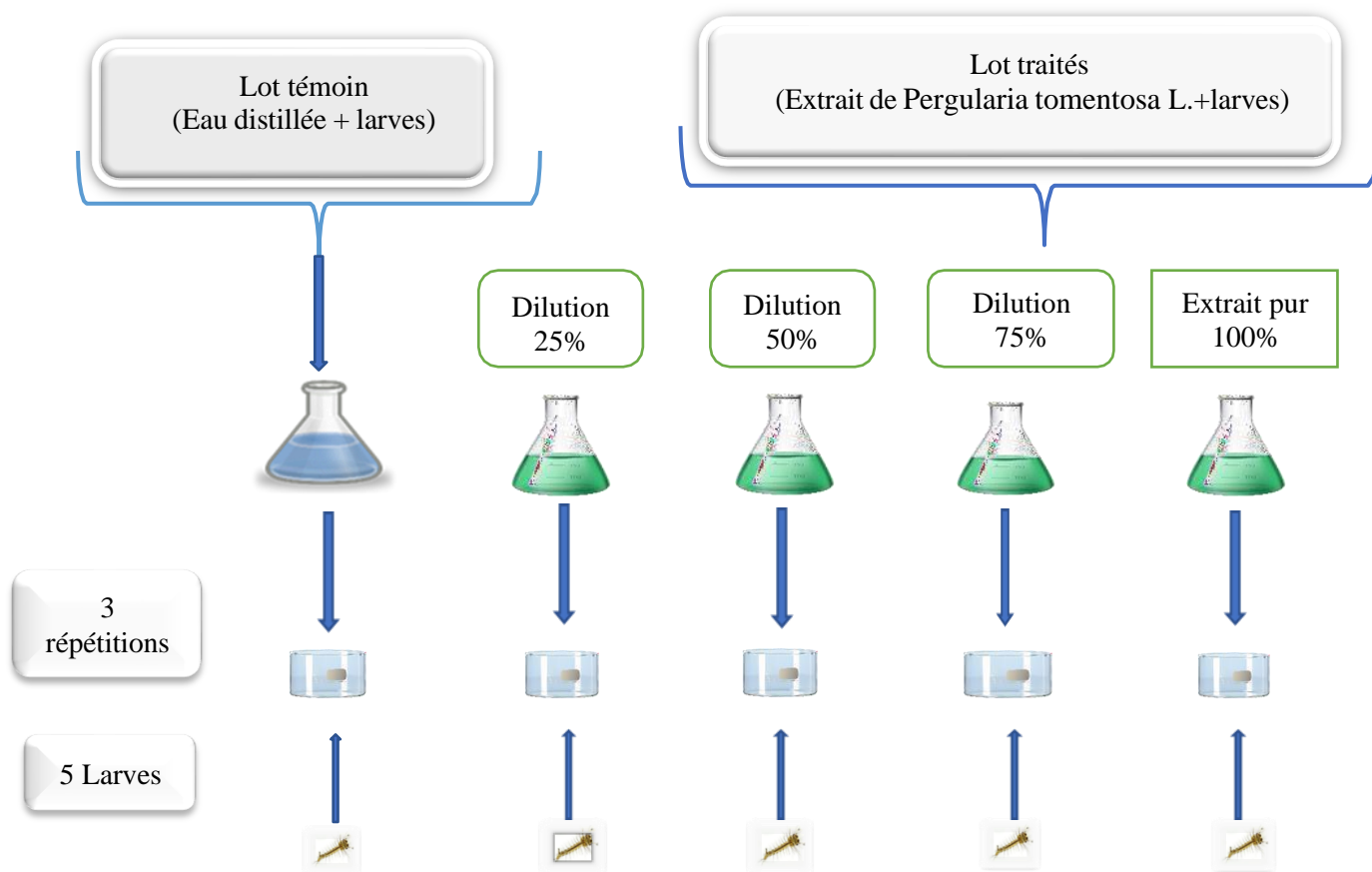


Figure 24 : Protocole de test de la mortalité des larves de *Culex pipiens* L.

II.4.2. Etude de l'activité de cholinestérase

Cette méthode est réalisée *in vitro* sur cinq lots contenant l'extrait enzymatique, les lots se composent d'un témoin 0% (l'eau distillée + l'extrait enzymatique) et des lots traités à différentes dilutions d'extraits des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. 25 %, 50 %, 75 %, en plus d'un extrait brut de 100% avec l'extrait enzymatique. L'incubation est réalisée pendant 1 heure et 24 heures. Après 1 heure d'incubation, une centrifugation est effectuée à une vitesse de 4 000g pendant une durée de 20 minutes dans une centrifugeuse de type Rotofix 32A, référence 1206. Afin de permettre la sédimentation des particules indésirables.

Le suivi de l'activité d'enzyme cholinestérase est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.*, (1961) avec 500 μ l d'extrait obtenu après incubation et 500 μ l de réactif d'Ellman (Annexe I) Chaque mesure a été réalisée pendant une durée de 15 minutes, avec un intervalle de 60 secondes entre chaque mesure. Cette activité est évaluée par rapport à un blanc contenant un tampon phosphate de sodium (Annexe II) et le réactif d'Ellman à une température de 25°C.

Enfin l'absorbance des échantillons a été mesurée sur le spectrophotomètre model Uvi Line numéro de série 9400C à 412 nm.

Selon Hamid oudjana *et al.*, (2022) L'activité enzymatique est déterminée par équation suivante :

$$A = \frac{\Delta DO \cdot V}{(t2 - t1) \cdot \epsilon \cdot d \cdot x}$$

DO : variation de la densité optique à 412

nmt1 : temps initial de lecture

t2: temps final de lecture après un intervalle de 60 s

ϵ : Coefficient d'extinction spécifique de l'acide dithiobisnitrobenzoïque à 412 nm pour une réponse en nanomoles transformés, estimé à $13,6 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

d : épaisseur de la cuve 1 cm.

V: volume de milieu d'incubation dans la cuve en ml.

x : prise d'essai en ml.

A: Activité enzymatique en $\mu\text{moles min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$

II.4.3. Dosage de protéine

Le dosage des protéines permet de déterminer l'activité spécifique d'enzyme. La solution de Bradford (**Annexe III**) de 5 ml est ajoutée à 100 μl de l'extrait enzymatique avec des différents dilution de *Pergularia tomentosa* L. Après une incubation de 5 minutes, le bleu de Coomassie, qui est initialement de couleur bleu-vert, forme un complexe avec les protéines, ce qui lui confère une couleur bleue. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm.

II.4.4. Taux de mortalité

Le pourcentage de mortalité observé chez les larves L4 dans les lots témoins et des lots traités par l'extrait aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. Calculé par l'équation suivante (**Ould Elhadj et al., 2006 ; Kemassi et al., 2019**) :

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = \frac{\text{nombre d'individus mort}}{\text{nombre total d'individu}} \cdot 100$$

II.4.5. Temps léthal

La formule de Schneider est utilisée pour corriger le pourcentage de mortalité observé par rapport au témoin (Kemassi, 2014 ; Hamid oudjana *et al.*, 2022).

$$MC = [M2 - M1 / 100 - M1] \times 100$$

MC : % de mortalité corrigée,

M2 : % de mortalité dans la population traitée,

M1 : % de mortalité dans la population témoin.

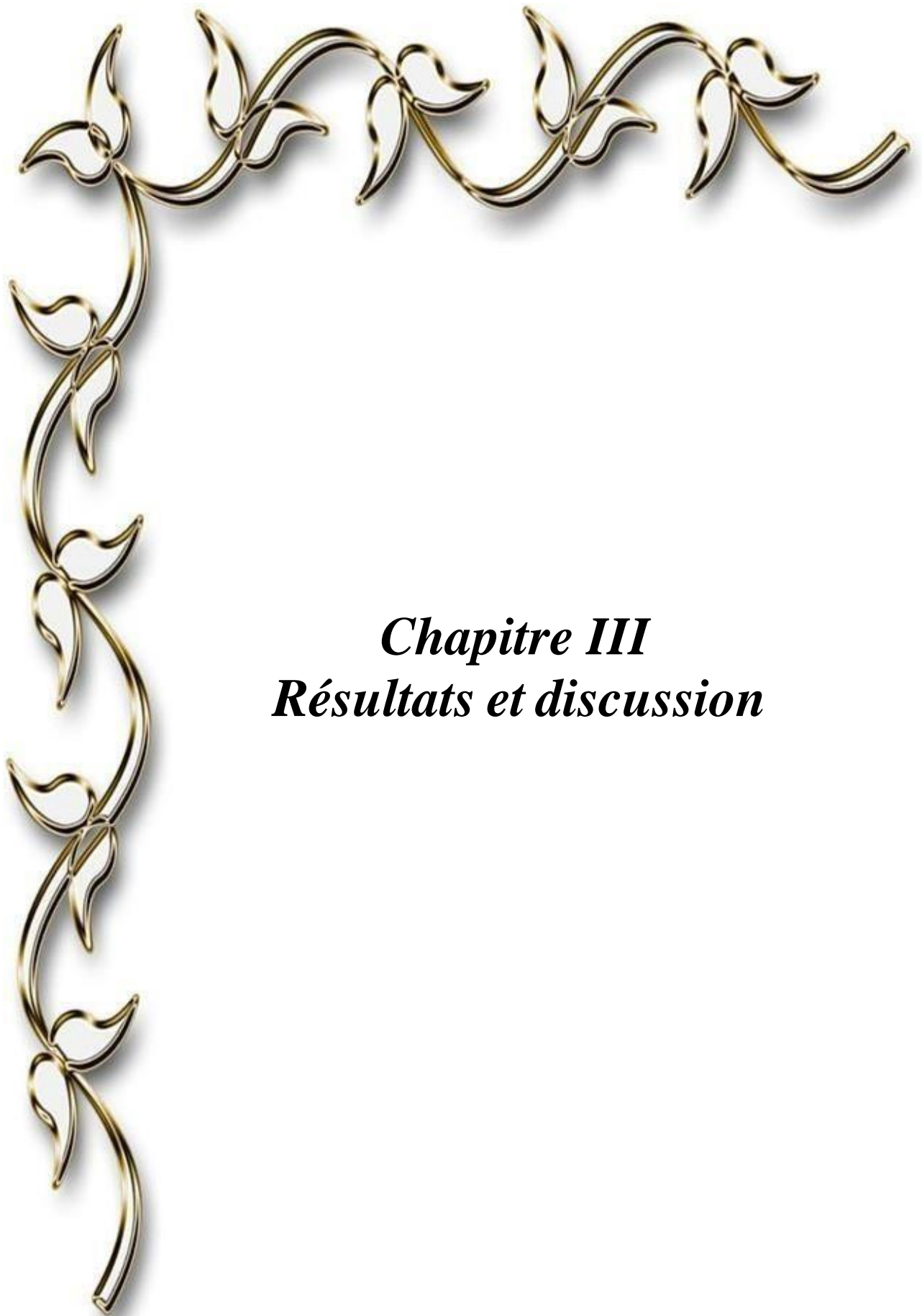
II.4.6. Dose létale 50 (DL50)

La DL50 (Dose Létale 50) est utilisée pour mesurer la quantité d'une substance qui provoque la mort de 50% des insectes traités (Kemassi, 2014 ; Hamid oudjana *et al.*, 2022).

II.5. Analyses statistiques

La signification statistique des résultats est évaluée grâce aux logiciels IBM.SPSS.Statistics-version 22, pour l'analyse de la variance (ANOVA) et pour l'étude de la corrélation de Pearson entre la mortalité et l'activité d'enzyme cholinestérase les résultats sont significatifs pour des probabilités inférieures à 0,05 :

- ($p < 0,05$) considérés significatifs (*).
- ($p < 0,01$) inférieurs à 0,01 hautement significatifs(**).
- ($p < 0,001$) inférieurs à 0,001 très hautement significatifs(***)).
- Tandis que les probabilités supérieures à 0,05 ne sont pas significatives ($p > 0,05$).



Chapitre III
Résultats et discussion

Le présent chapitre regroupe les résultats obtenus sur l'effet des extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. sur des larves (L4) de *Culex pipiens* ; Les paramètres mesurés sont la mortalité, la dose létale 50 (DL 50), les temps létaux 50 (TL50) et 90 (TL90) de l'extrait, ainsi que les mesures neurochimiques envisagées sur l'activité de cholinestérase, l'activité spécifique.

III.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction présente le pourcentage du poids de l'extrait obtenu par rapport au poids de la matière végétale première utilisé pour l'extraction. Le tableau 4 montre la valeur du rendement d'extraction de *Pergularia tomentosa*. D'après les résultats obtenus le rendement est de 9,29%.

Tableau 4-Rendement d'extraction a reflux des feuilles de *Pergularia tomentosa*.

	Feuilles de <i>Pergularia tomentosa</i>
Rendement d'extraction	9,29%

Baaisa et Guettiani, (2020) notent un rendement d'extraction de la partie aérienne de la plante *Pergularia tomentosa* de 8,6%, cette valeur est inférieure à notre rendement d'extrait. D'autre travaux de Belloum et Nani, (2019) montrent un rendement de l'extrait éthanolique des racines séchées de *Pergularia tomentosa* de 9,78 %. Ce résultat semble proche par rapport a notre rendement d'extraction.

III.2. Effets de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* sur la mortalité des larves (L₄) de *Culex pipiens*

Le taux de la mortalité cumulée observée des larves (L4) de *Culex pipiens* au niveau de différents lots témoins et traités par l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. à différentes concentrations (100% ,75%, 50%,25% 0%) sont regroupé dans le tableau 5

Après exposition des larves de *Culex pipiens* L4 à différentes concentrations d'extrait des solutions aqueuses de *Pergularia tomentosa*, un suivi expérimental de 6 jours est réalisé.

Tableau5- Mortalité cumulée observé chez les larves (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L.

Lots expérimentaux					
Temps (Jours)	Témoin (0%)	<i>Culex pipiens</i> (L4) traités par l'extrait aqueux de <i>Pergularia tomentosa</i> L.			
		Doses			
		25%	50%	75%	100%
1	0	13,33	20,00	53,33	66,67
2	0	13,33	46,67	73,33	100
3	0	26,67	60,00	93,33	100
4	0	66,67	73,33	93,33	100
5	13,33	73,33	93,33	100,00	100
6	20	93,33	100,00	100,00	100

Les résultats de tableau 5 rapportent que le taux de la mortalité cumulée varie selon les concentrations et au cours du temps. Les valeurs rapportées pour le lot témoin sont plus faible que celles notées pour les lots traites surtout les quatre premier jours 0% de mortalité est noté puis le cinquième jour et le sixième jour présentent une faible mortalité de 13,33% et 20% successivement.

Les lots traités par l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. montrent un pourcentage de mortalité après 24H qui augmente en fonction de la concentration et au cours du temps. Les individus traités à la dose de 25% montrent de la première et au deuxième jours un taux de mortalité de 13,33% puis le taux de mortalité montre un croisement du 3eme jusqu'au 6eme jour de 26,67% ; 66,67% ; 73,33% ; 93,33%. Ainsi les individus traités à la dose de 50% indiquent un taux de mortalité en augmentation continue. Le pourcentage de mortalité est de 20% le premier jour, 46,67% le deuxième jour, 60% le troisième jour et 73,33 % le quatrième jour. La mortalité totale de 100% est enregistrée à partir de cinquième jour. La dose de 75% entraine les trois premiers jours après traitement une mortalité de 53,55% ; 73,33% et 93,33% successivement, suivie d'une mortalité totale des larves les cinquièmes et sixième jours. Les individus traités à la dose 100 % montrent le premier jour une mortalité de 66,67% suivie

d'une mortalité totale 100 % à partir du deuxième jour.

II.2.1 Effet de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* sur la cinétique de la mortalité chez les larves (L4) de *Culex pipiens*

Le pourcentage de mortalité cumulée observée obtenus est exprimé en courbe présenté dans la **figure 25** pour mieux suivre le pourcentage de mortalité en fonction de la concentration d'insecticide. En considérant les résultats, nous constatons qu'avec le temps, la mortalité larvaire maximale est de 100 % chez les larves (L4) de *Culex pipiens* traités avec un extrait aqueux concentré (100%). Par conséquent, étant donné le résultat aucun mortalité n'est notée au niveau du lot témoin avant les quatre premiers jours que celles notées pour les lots traités.

En effet, la mortalité cumulée des larves augmente chaque jour et atteint un maximal (effet cumulatif, la mort se produit après l'accumulation d'une certaine quantité de l'extrait dans le corps des insectes) ; un taux de mortalité de 100% est atteint au bout de 2 jours.

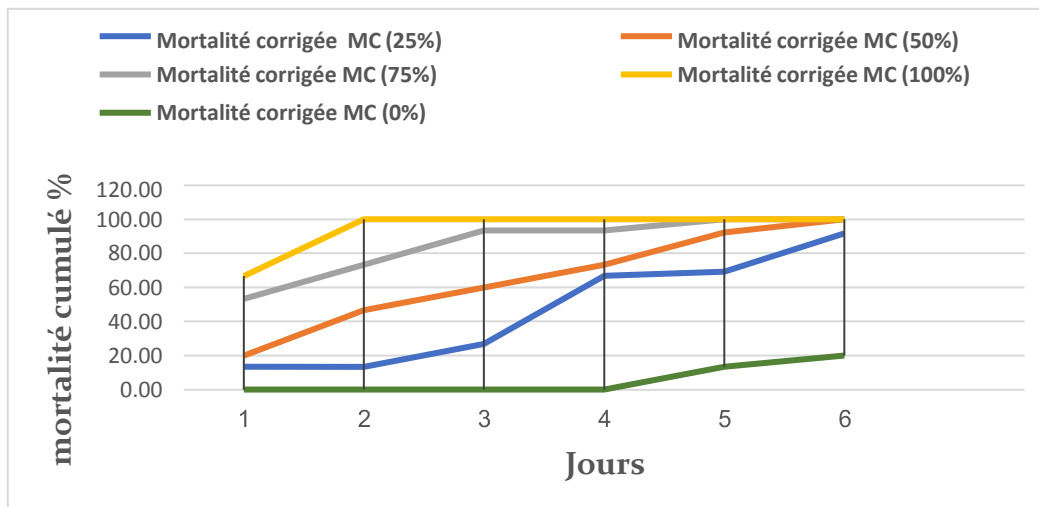


Figure 25 : Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les larves (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'extrait aqueux foliaire de *Pergularia tomentosa*.

III.2.2 Dose létal (DL50) et (DL90) d'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* sur les larves (L4) de *Culex pipiens*

Afin de déterminer la DL50 (Dose létal suffisante pour tuer 50% des individus) DL90 (Dose létale suffisante pour tuer 90% des individus) les pourcentages de mortalité corrigée sont transformés en probits et les doses sont transformées en logarithme décimale. Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Après la droite de régression obtenue (Fig. 26) permis d'estimer la DL50 et DL90 relatives à la mortalité de 50% et de 90% successivement des larves de *Culex pipiens*. Les résultats de calcul des doses létales 50 et 90 sont présentés dans le tableau 06. Les résultats montrent une dose létale 50 (DL50) égale à **1,0505 mg/ml** et une DL90 de **4,467 mg/ml**.

Tableau 6- Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait de *Pergularia tomentosa*.

Doses		Mortalité corrigée		
Pourcentage (%)	Concentration (mg/ml)	Log [C _{mg/ml}]	Pourcentage (%)	Probits
25	6,45	0,810	91,667	6,405
50	12,9025	1,111	100	7,614
75	19,35	1,287	100	7,614
100	25,805	1,412	100	7,614

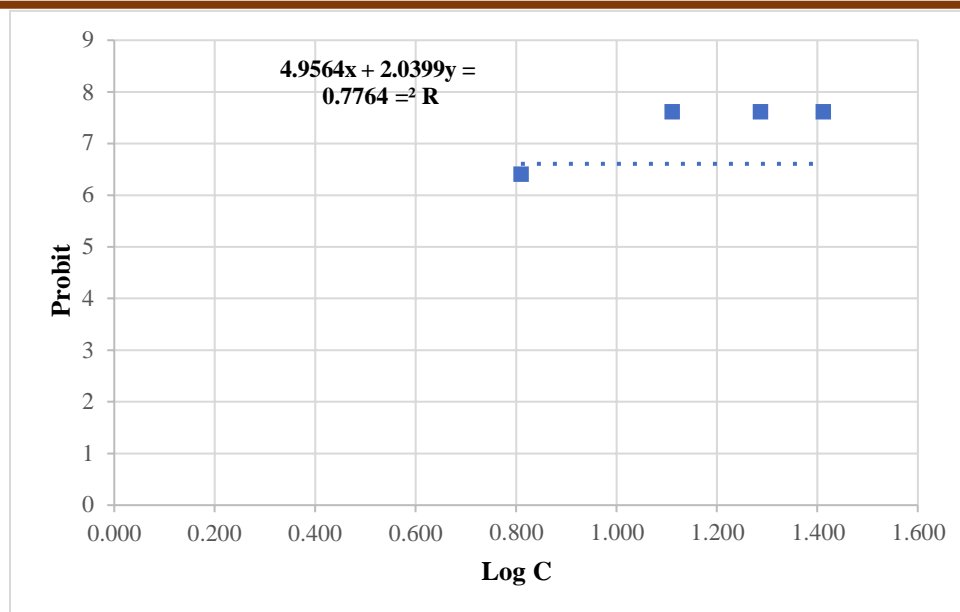


Figure 26 : Relation entre la mortalité corrigée des larves (L4) de *Culex pipiens* et la dose de l'extrait aqueux foliaire de *Pergularia tomentosa* L.

Tableau 7- Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa*

Organe	Equation de régression	de Coefficient de régression	Dose létale 50 [mg/ml]	Dose létale 90 [mg/ml]
Feuille	$Y=2,0399X+4,9564$	$R^2=0,7764$	DL₅₀%=1,0505	DL₉₀%=4,467

III.2.3-Temps léthal 50 (TL50) d'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* L. sur les larves (L4) de *Culex pipiens*

Les calculs de temps léthal 50% (TL50) ont été effectués en dressant la droite de régression des probits correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des temps de traitement. Les données sont groupées en classe de temps, dans cette étude en heure. Les méthodes d'analyse de survie permettent d'associer la fréquence et le délai de survie de l'événement étudié qui est la mort des insectes. Le temps qui écoule entre le début du traitement et la date de la dernière observation est étudiée. À la dernière heure du comptage le nombre de survivants, est noté. Les mortalités et les probits correspondants sont illustrés dans le tableau 8, ainsi les droites de régressions correspondantes sont illustrées dans le tableau 5 et figure 27.

Tableau 8- Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez les larves de *Culex pipiens* traitées par l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. à différentes concentration

Temps (T) (heurs)	Log T	Mortalité corrigée et probits de pourcentage de la mortalité corrigée chez les larves L4 (<i>Culex pipiens</i>) traité par l'extrait de <i>Pergularia tomentosa</i> L.							
		Doses							
		MC 25%	Probit	MC (50%)	Probit	MC (75%)	Probit	MC (100%)	Probit
24	1,380	13,33	3,874	20	4,158	53,33	5,075	66,67	5,44
48	1,681	13,33	3,874	46,67	4,925	73,33	5,613	100	7,614
72	1,857	26,67	4,387	60	5,253	93,33	6,476	100	7,614
96	1,982	66,67	5,44	73,33	5,613	93,33	6,476	100	7,614
120	2,079	69,23	5,496	92,31	6,405	100	7,614	100	7,614
144	2,158	91,67	6,405	100	7,614	100	7,614	100	7,614

Tableau 9- Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL50 évaluées pour les quatre concentrations de l'extrait aqueux.

Concentration (%)	Equation de régression	Coefficient de régression	Temps léthal 50 (TL ₅₀) (en heure)	Temps léthal 90 (TL ₉₀) (en heure)
25	Y=3,1949x-1,0185	R ² =0,8006	75,85	194,98
50	Y=3,8486x-1,4834	R ² =0,8359	47,86	104,71
75	Y=3,4182x+0,1323	R ² =0,9133	26,3	63,09
100	Y=2,5002x+2,6103	R ² =0,6572	9,12	29,51

Au vu des valeurs de la TL50 et de TL90 de chaque concentration en extrait aqueux foliaire de *pergularia tomentosa* présenté dans le tableau 5 et la figure 28. Il semble que le temps léthal pour 50% et 90% des individus augmentent avec la diminution de la dose. Ainsi

Les résultats montrent que le TL50 le plus long est de 75,85h enregistré pour la dose 25% et son TL90 :194,98 h, et 9,12 h enregistrée pour la dose 100% et son TL90 :29,51 h et pour TL50 de dose 50% est 47,86h et son TL90 est de 104,71h et pour la dose de 75% Temps létal 50 enregistré est 26,3h et son TL90 = 63,09. Les extraits foliaires de *pergularia tomentosa* aux doses 100% et 75 % présentent une valeur minimale de TL50 donc semblent les plus toxiques que les autres concentrations. Cela signifie une rapidité d'action particulière vis-à-vis les larves (L4) de *Culex pipiens*

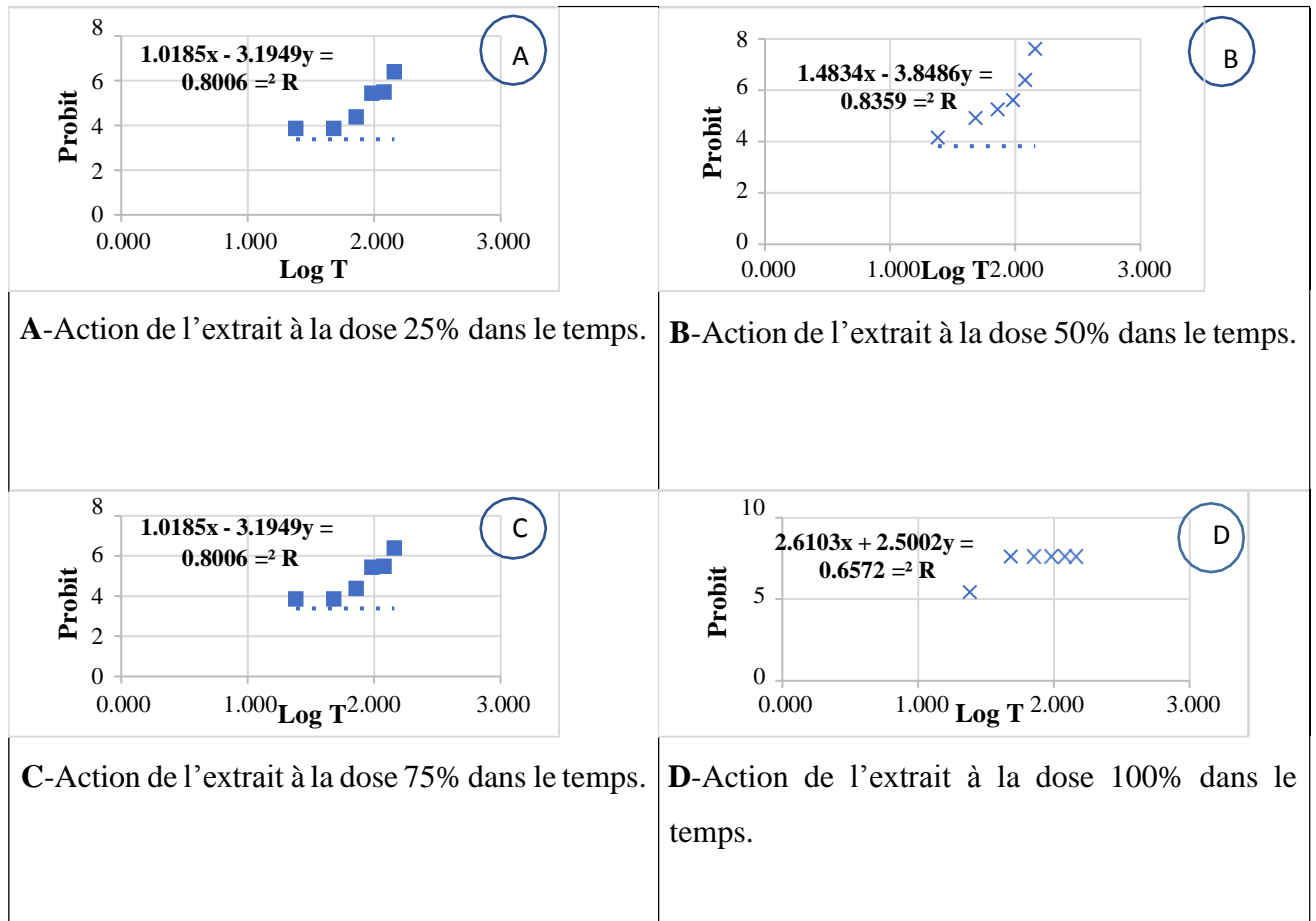


Figure 27 : Action de l'extrait aqueux foliaires de *Pergularia tomentosa* L. sur les larves (L4) de *Culex pipiens*.

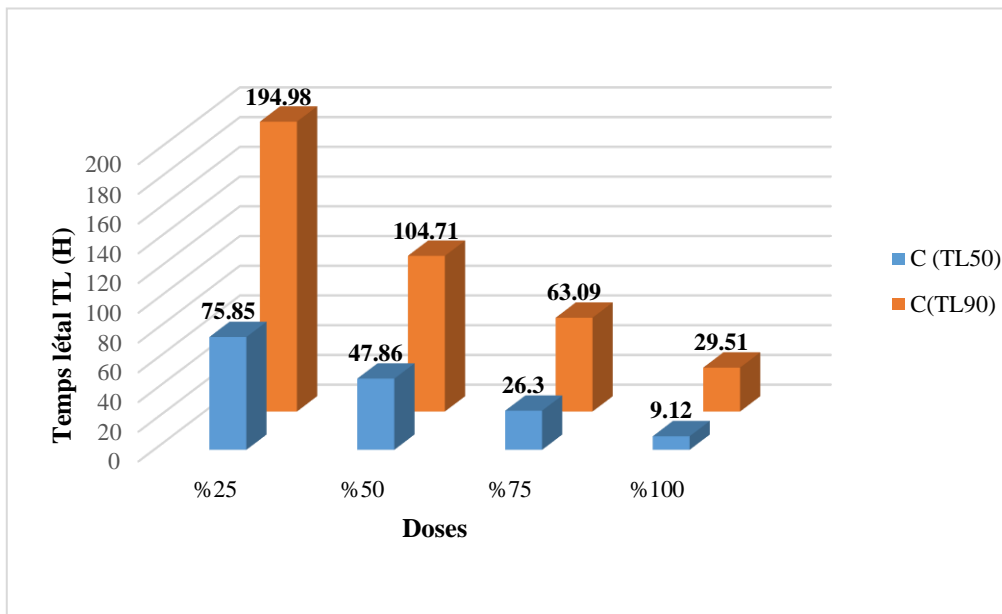


Figure 28 : Temps létale de 50 des larves (TL50) à différentes doses de l'extrait aqueux

Pergularia tomentosa

III.3. Mesures neurochimiques

L'effet d'extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. à différentes doses de 0%, 25%, 50%, 75%, et 100% sur l'activité de cholinestérase et sur l'activité spécifique chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens* L. est étudié.

III.3.1. Activité de cholinestérase

Les résultats de l'activité cholinestérasique chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens* à différentes doses d'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. après une heure et 24 heures sont illustrés dans la (fig. 29) Il semble que l'enzyme cholinestérase présente une hyperactivité après traitement. Cette hyperactivité augmente en fonction de la dose de l'extrait après 1 heure d'exposition. Ainsi il apparaît des variations de l'activité cholinestérasique entre les larves témoins qui enregistrent une activité de cholinestérase de $4,16 \pm 0,63 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et les larves traitées à différentes concentrations d'extrait de *Pergularia tomentosa* L. Les valeurs d'activité sont de $6,73 \pm 0,59 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, $12,65 \pm 0,32 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, $20,61 \pm 1,43 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, $22,63 \pm 0,90 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ pour les doses 25%, 50%, 75%, et 100% successivement.

Après 24 d'exposition, les résultats de l'activité cholinestérasique chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens*, soumises à différentes doses d'extrait aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., cette hyperactivité augmente en fonction de la dose.

Des variations considérables d'activité cholinestérasique ont été enregistrés entre les larves témoins ($4,29 \pm 0,10$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$) et les larves traitées avec des concentrations d'extrait de *Pergularia tomentosa* L. de 25%, 50%, 75% et 100%. Les valeurs d'activité sont respectivement de $13,11 \pm 0,62$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, $20,19 \pm 0,56$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, $28,87 \pm 11,58$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et $31,53 \pm 2,56$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

L'analyse de la variance enregistre une différence non significative ($P=0,220$) de l'activité d'enzyme cholinestérase chez les larves traitées par la dose (25%) de l'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* et une différence significative pour les larves traitées aux doses (50%) et (75%) avec ($P=0,021$) et ($P=0,035$) successivement, tandis que la dose élevée de 100% enregistre un effet très hautement significatif de ($P=0,001$). Ainsi l'analyse après 24 h d'exposition avec l'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* montre une différence très hautement significative pour les individus traités à (25%, 50%, 75%, 100%) avec une valeur de probabilité P égale à 0,001 ; 0,000 ; 0,002 et 0,000 successivement (Tableau. 10).

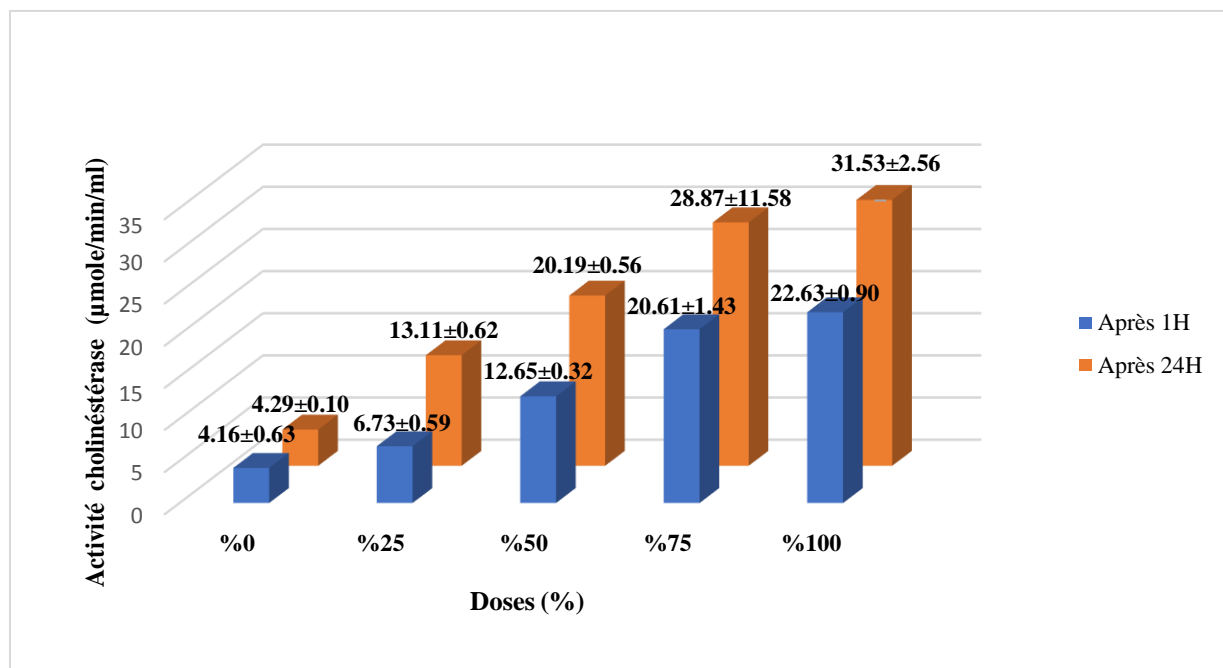


Figure 29 : Effet des différentes doses d'extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. sur l'activité de la cholinestérase mesurée en unité $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ chez *Culex pipiens* L. après 1 heure et 24 heures d'exposition.

Tableau 10- Analyse de la variance appliquée sur l'activité d'enzyme cholinestérase chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de *Pergularia tomentosa* ; P: Probabilité; S: Signification (-Effet non significatif ; * : Effet significatif ;** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).

Extrait végétal	Paramètre	Durée	Dose	P	S
Extraits aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i>	Activité enzymatique de cholinestérase	Après 1heure	Témoin (0%)		
			25%	0,220	-
			50%	0,021	*
			75%	0,035	*
	100%	0,001	***		
	Activité enzymatique de cholinestérase	Après 24heures	Témoin (0%)		
			25%	0,001	***
			50%	0,000	***
75%			0,002	***	
100%	0,000	***			

III.3.2. Activité spécifique de cholinestérase

Les résultats obtenus concernant l'activité spécifique cholinestérase chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens*, suite à l'exposition à différentes doses d'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., sont présentés dans la (fig. 30) Après 1 heure d'exposition, il semble exister une relation proportionnelle entre l'activité spécifique de protéine et la dose d'extrait, ont été notées dans l'activité spécifique de protéine entre les larves témoins ($1,327 \pm 0,25$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine) et les larves traitées avec différentes concentrations d'extrait de *Pergularia tomentosa* L. successivement à 25%, 50%, 75% et 100%. Les valeurs d'activité sont respectivement de $1,326 \pm 0,07$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine, $2,151 \pm 0,39$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine, $3,271 \pm 0,40$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine, $3,450 \pm 0,17$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine.

Après 24 heures d'exposition, les résultats de l'activité spécifique de cholinestérase chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens*, soumises à différentes doses d'extrait des feuilles de *Pergularia tomentosa* L., sont présentés de la même figure montrent une hyperactivité semble également exister et qui augmente en fonction de la dose de l'extrait aqueux. Des variations considérables l'activité spécifique de cholinestérase ont été enregistrées entre les larves témoins ($1,368 \pm 0,48$ $\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine) et les larves traitées avec des concentrations d'extrait de *Pergularia tomentosa* L. de 25%, 50%, 75% et 100%. Les valeurs d'activité étaient

respectivement de $2,584 \pm 0,12$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine, $3,434 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine, $4,583 \pm 0,00$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine et $4,806 \pm 0,68$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine.

L'analyse à un critère de différence chez les larves de *Culex pipiens* traitées par l'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* n'indique aucune différence significative de l'activité spécifique d'enzyme cholinestérase après une heure chez les individus traités aux doses 25% et 50% avec $P=1,000$ et $P=0,116$ respectivement, alors que la dose 75% et 100% indiquent une différence très hautement significative avec $P=0,001$ et $P=0,000$ successivement.

Après 24 heures l'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif pour les doses 25% ; 50% et 100% avec $P=0,001$, $P=0,000$ et $P=0,000$ respectivement, alors que la dose de 75% l'effet est significatif avec $P=0,036$ (Tableau. 10).

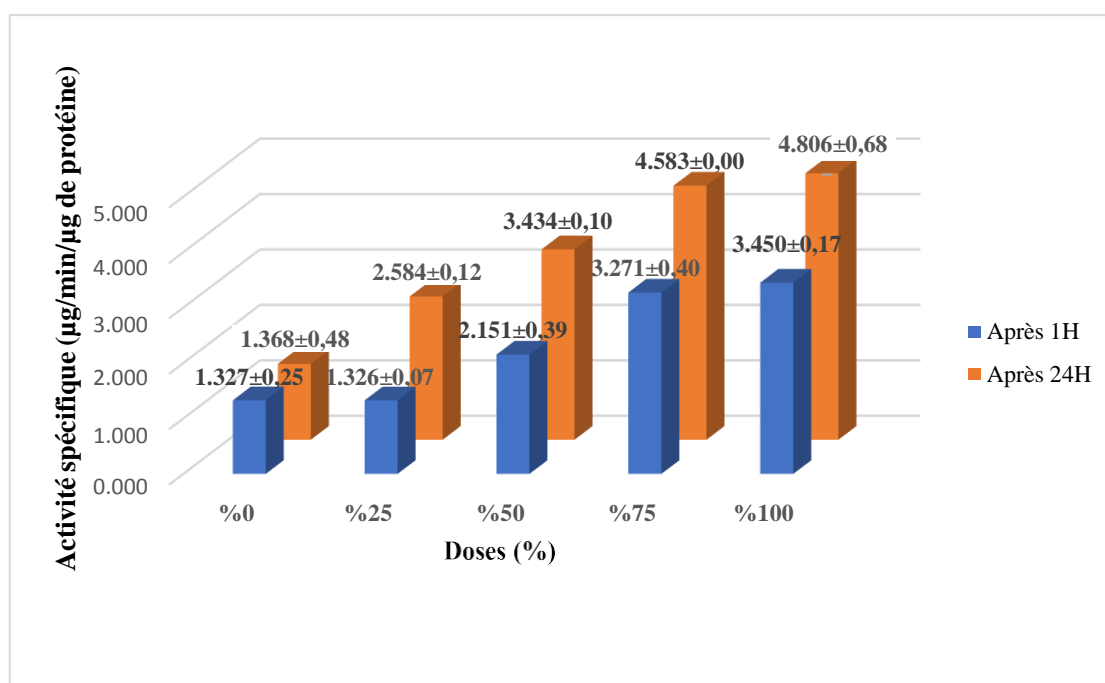


Figure 30 : Effet des différentes doses d'extraits aqueux de *Pergularia tomentosa* L. sur l'activité spécifique de cholinestérase mesurée en unité ($\mu\text{mole}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine) chez extrais *Culex pipiens* L. après 1 heure et 24 heures d'exposition.

Tableau 11- Analyse de la variance appliquée sur l'activité spécifique d'enzyme cholinestérase chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de *Pergularia tomentosa* ; P: Probabilité; S: Signification (Effet non significatif ; * : Effet significatif ;** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).

Extrait végétal	Paramètre	Durée	Dose	P	S
Extraits aqueux foliaires de <i>Pergularia tomentosa</i>	Activité spécifique de cholinestérase	Après 1heure	Témoin (0%)		
			25%	1,000	-
			50%	0,116	-
			75%	0,001	***
	100%	0,000	***		
	Activité spécifique de cholinestérase	Après 24heures	Témoin (0%)		
			25%	0,001	***
			50%	0,000	***
75%			0,036	*	
100%	0,000	***			

III.4. Analyse de la corrélation

Afin de chercher l'existence d'une relation probable entre les paramètres neurochimiques (Activité d'enzyme cholinestérase après 24 heures) et les paramètres comportementales (le temps de mortalité après 24 heures) et de mesurer l'intensité de cette relation, on fait appel au test de corrélation. L'étude de la corrélation entre les mesures neurochimiques dont l'activité d'enzyme cholinestérase et le temps de mortalité chez les larves L4 de *Culex pipiens* traitées par l'extrait foliaire de *Pergularia tomentosa* montrent une corrélation hautement significative et positive entre l'activité d'enzyme cholinestérase et la mortalité avec (P=0,009) après 24 heures et une corrélation significative et positive entre l'activité spécifique de l'enzyme et la mortalité (P=0,011) (Tableau. 12).

Tableau 12- Analyse de la corrélation appliquée sur l'activité d'enzyme cholinestérase et la mortalité chez les larves L4 traitées par les extraits aqueux foliaires de *Pergularia tomentosa* ; r : Coefficient de corrélation ; P : Probabilité; S: Signification (Effet non significatif ; * : Effet significatif ;** : Effet hautement significatif ; *** : Effet très hautement significatif).

Extrait végétal	Paramètre	Durée	r	P	S
Extraits aqueux foliaires de <i>Pergulariatomentosa</i>	Activité de cholinestérase et mortalité	Après 24heures	0,961	0,009	**
	Activité spécifique de cholinestérase et mortalité	Après 24heures	0,955	0,011	*

III.5. Discussions

Baaisa et Guettiani, (2020) notent un rendement d'extraction de la partie aérienne de la plante *Pergularia tomentosa* de 8,6%, cette valeur est inférieure à notre rendement d'extrait. D'autres travaux de Belloum et Nani, (2019) montrent un rendement de l'extrait éthanolique des racines séchées de *Pergularia tomentosa* de 9,78 %. Ce résultat semble proche par rapport à notre rendement d'extraction.

D'après les résultats la poudre de *Pergularia tomentosa* a donné un bon résultat pour la toxicité sur les larves de *Culex pipiens* ; cette efficacité est confirmée par la mort de la totalité des larves 100% au bout de 2 jours.

Les résultats obtenus montrent une sensibilité variable des larves traduite par des taux de mortalité faibles à très élevés en passant d'une concentration à l'autre, les résultats peuvent également indiquer que l'activité larvicide est progressive sur la durée puisque il a été enregistré la mortalité augmentant avec l'augmentation du temps d'exposition, atteignant un taux de mortalité maximal de 100 % à la dose la plus élevée de la plante de *pergularia tomentosa* . Ainsi, la mortalité dépend des doses utilisées est d'autant plus accrue que l'exposition des larves aux insecticides est prolongée dans le temps.

Les mêmes effets sont notés chez **Bourega (2013)**, l'évolution de taux de mortalité cumulée a été enregistrée à partir de 2 premières heures jusqu'à le dixième jour. Les résultats montrent une mortalité totale des larves durant deux heures après le traitement dans la

concentration de 100% et 75%. Après 24h un taux de mortalité de 90%, 10%, 13,33%, 6,67%, 6,67%, 6,67% a été enregistré successivement dans les lots traités par l'extrait de concentration 50%, 25%, 15%, 10%, 5%, 1% respectivement. La mortalité est d'autant plus importante que la dose est plus élevée. En effet la mortalité augmente progressivement avec le temps, jusqu'à atteindre un taux de mortalité maximal après 10 jours, il est de l'ordre de 100%, 83,33%, 53,33%, 40%, 36,66%, 16,67% pour les lots traités par l'extrait végétal à 100%, 75%, 50%, 25%, 15%, 10%, 5%, 1% de concentration respectivement.

Par ailleurs la TL50 et de TL90, de chaque extrait végétal testé et la droite de régression des probits en fonction du logarithme des durées de traitement, montre que l'extrait de *P.tomentosa* à 100%, 75%, 50% sont plus toxiques, avec un TL50 et TL90 calculé à (3h, 19,49 h) pour la concentration de 50%. Quant aux autres concentrations, il est de l'ordre des (107,89 / 1148,15) heures pour 25%, suivi de 15% avec (257,03 / 912,01) heures, et de 10% avec (346,873 / 1047,12) heures (409,26 / 1312,2) et (620,86 / 2264,64) heures pour 5% et 1%. Cette variabilité du TL50 constatée, entre la différente concentration d'extraits est probablement due aux variations de pourcentage de mortalité cumulée enregistrée.

De même notes pour Benzait (2013) l'extrait aqueux pur de *Pergularia tomentosa* engendre une mortalité moyenne élevée des pucerons après 24 heures d'observation, en effet le taux de mortalité obtenu avec la concentration 100% est de 47,84%, alors que pour les autres lots traités des mortalités sont observées à des taux diminuant en fonction des concentrations des extraits aqueux; ils sont de 32,2%, 25,3% et 11,76% pour les concentrations respectives de 75%, 50% et 25%.

Ainsi d'autres études sur les extraits de plante montrent un effet larvicide, Kemassi *et al.*, (2015) notent que chez les larves du *Culex pipiens* traitées à l'aide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana*, le taux de mortalité varie en fonction de la concentration en extrait, cette action est probablement liée à la concentration des extraits en molécules actives capable de tuer les larves. Selon **Rajasekaran *et al.*, (2012)** les extraits à l'éther de pétrole de *Lantana camara* L (Verbenaceae) ; *Tridax procumbens* L (Asteraceae) et *Datura stramonium* L (Solanacées) montrent une mortalité de 100% après 48h d'incubation chez les moustiques *Aedes aegypti*. Chetan *et al.*, (2010) ont évalué le potentiel larvicide de l'extrait aqueux des feuilles de *Cestrum nocturnum* L (Solanaceae) sur la même espèce *A.aegypti* (Diptère, Culicidae). L'extrait de méthanol est un larvicide hautement actif, atteignant 100% de mortalité larvaire en 24 heures lorsqu'il est testé à la concentration de 45µg/ml (Soxhlet) et 25 µg/ml (percolation).

Selon Aouinty *et al.*, (2006) Après avoir exposé des larves du stade 4 de l'espèce *C. pipiens* aux différentes concentrations des cinq extraits aqueux pendant 24 h, le taux de mortalité varie selon les concentrations. Pour tous les extraits, à l'exception de celui du laurierrose, la mortalité des larves atteint un taux de 100 % à partir d'une concentration de 4 %. Cependant, dans l'extrait du *Ricinus communis*, la mortalité est plafonnée à 100 % dès la concentration de 1 %. De l'ensemble de ces résultats un premier classement de l'efficacité toxique des extraits testés est mis en évidence, ainsi les extraits les plus toxiques sont ceux des feuilles du ricin et du bois de thuya et le moins toxique celui des feuilles du laurier rose.

Selon Boutiche *et al.*, 2017 d'après la cinétique de mortalité, ils ont remarqué que la mortalité des larves évolue dans le temps et varie selon les différents stades larvaires traités et les différentes souches microbiennes utilisés. Les essais toxicologiques sur les larves *C. pipiens* montrent que *B. bassiana* et *B. thuringiensis* présente une activité larvicidaire après 24h. Selon Benserradj, 2014 l'apparition de la mortalité chez les larves de *C. pipiens* traitées avec *Metarhizium anisopliae* est enregistrée dès le premier jour de traitement.

Pour la dose létale de 50 et de 90 % des larves Bourega (2013) montre une DL 50 pour des larves du troisième stade (L3) de l'espèce *Culex pipiens* plus faible de 0,007 mg/ml et une DL90= 0,023 mg/ml.

Selon Zegouba et Lahlah (2018) Chez *Culex pipiens* traitées avec l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* la durée de la mortalité est plus par rapport aux résultats obtenus, l'extrait engendre une mortalité larvaire totale de 100% chez les larves L4 de *Culex pipiens* après trois jours. Le pourcentage de mortalité augmente en fonction de la concentration en extrait appliqué, un pourcentage de mortalité de 91,66 %, 66,66% , 33,33% et 8,33% respectivement est noté au niveau du lot traité par l'extrait des feuilles à 80%, 60% , 40% et 20% de concentration.

Dans la présente étude nous avons étudiés le pouvoir larvicide des extraits foliaires aqueux de *Pergularia tomentosa* L. (*Aslepiadaceae*) sur le troisième stade larvaire de *Culex pipiens* (*Diptera-Culicidae*). Les résultats ont montré une pouvoir biocide exceptionnelle avec une rapidité d'action très marquée vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*. Des pourcentages de la mortalité important sont notés même à des doses d'application relativement faibles. L'évaluation des concentrations létales 50 et 90 ont expliqué le degré d'efficacité de ces produits biologiques contre les larves de *Culex pipiens* et la sensibilité de ces dernières au produit testé. En outre ; des temps létaux restreint sont rapportés pour l'extrait concentré,

témoignant ainsi la rapidité d'action de ces extraits végétaux sur les larves de *Culex pipiens*.

Selon KEMASSI, 2008. L'évaluation des temps létaux 50 (TL 50) montre que les larves sont plus sensibles à l'effet toxique que les adultes. L'extrait aqueux de *Laurus nobilis* (Lauraceae) est toxique pour les larves L4 de moustiques *Culex pipiens* L. Cet extrait montre une activité larvicide avec une relation dose-réponse, une toxicité élevée au niveau des L2, comparativement aux L3 et L4. Cette sensibilité est encore plus élevée lorsque l'exposition des larves aux insecticides est prolongée dans le temps (48h et 72h).

Cherif (2020) note que la partie aérienne de *Pergularia tomentosa* (feuilles) s'avère toxique pour les imagos de *Tribolium confusum*. De ce fait, les composantes chimiques de cet extrait expliquent son action insecticide vis-à-vis l'espèce test. En effet, les deux extraits aqueux de *C. arabica* et *P. tomentosa* sont riches en métabolites secondaires dont les alcaloïdes, flavonoïdes, triterpénoïdes, tanins, glucosides et les saponosides. La plante *P. tomentosa* contient également des alcaloïdes, des polyphénols, des terpénoïdes, des flavonoïdes, des coumarines, des anthraquinones et des tanins. Ainsi Alghanem et El-amier (2017), signalent la présence de tanins, de saponines, de flavonoïdes et d'alcaloïdes dans l'extrait de *P. tomentosa*.

Les résultats d'étude de l'activité de cholinestérase révèlent une augmentation progressive de l'activité du cholinestérase chez les larves de stade 4 *Culex pipiens* Traités à différentes doses d'extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. Cependant les travaux de Shahat *et al.*, (2020) sur les larves L3 de *Culex pipiens* montrent une forte inhibition de cholinestérase par les extraitsmethanolique de $6,61 \pm 0,11$ U/L.

Cependant les travaux de Miladi *et al.*, (2018) montrent une augmentation de l'activité d'enzyme cholinestérase observée chez les larves de *Schistocerca gregaria* exposés au phéromone (phénylacétonitrile) en mélange avec *Pergularia tomentosa*. Le mélange présente des propriétés insecticides en perturbant le comportement et en réduisant la neurotoxicité, comme en témoigne une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase, le mode d'action et son interférence avec le système nerveux est encore imparfaitement connu et nécessite une étude plus détaillée comme l'interaction possible avec certains neurotransmetteurs du système nerveux central tels que la sérotonine et le GABA qui accompagnent changement de phase du criquet.

De même dans une étude réalisée par Kandeda *et al.*, (2017) sur l'extrait aqueux des racines de *Pergularia daemia*, obtenus par decoction, Ils sont observés une augmentation considérable de l'activité de cholinestérase et les enzymes antioxydantes, catalase glutathione-S -transférase.

Ainsi l'augmentation de l'activité enzymatique de cholinestérase est observée même avec un insecticide chimique inhibiteur de cholinestérase de type organophosphoré au début de l'exposition (après 30min). Les individus femelles et males de *Schistocerca gregaria* montrent à la dose de 4g de Malatox EC 50 /l une augmentation de l'activité cholinestérasique plus perceptible chez les individus femelles soit $59,23 \pm 12,76$ nanomole /min /ml par rapport aux individus mâles avec $54,53 \pm 6,46$ nanomole/min /ml (Hamid oudjana, 2009).

Pour l'activité spécifique elle semble être liée, au taux de protéines et à l'activité cholinestérasique qui est inversement proportionnelle à la dose de la toxine. (Hamid oudjana, 2009).

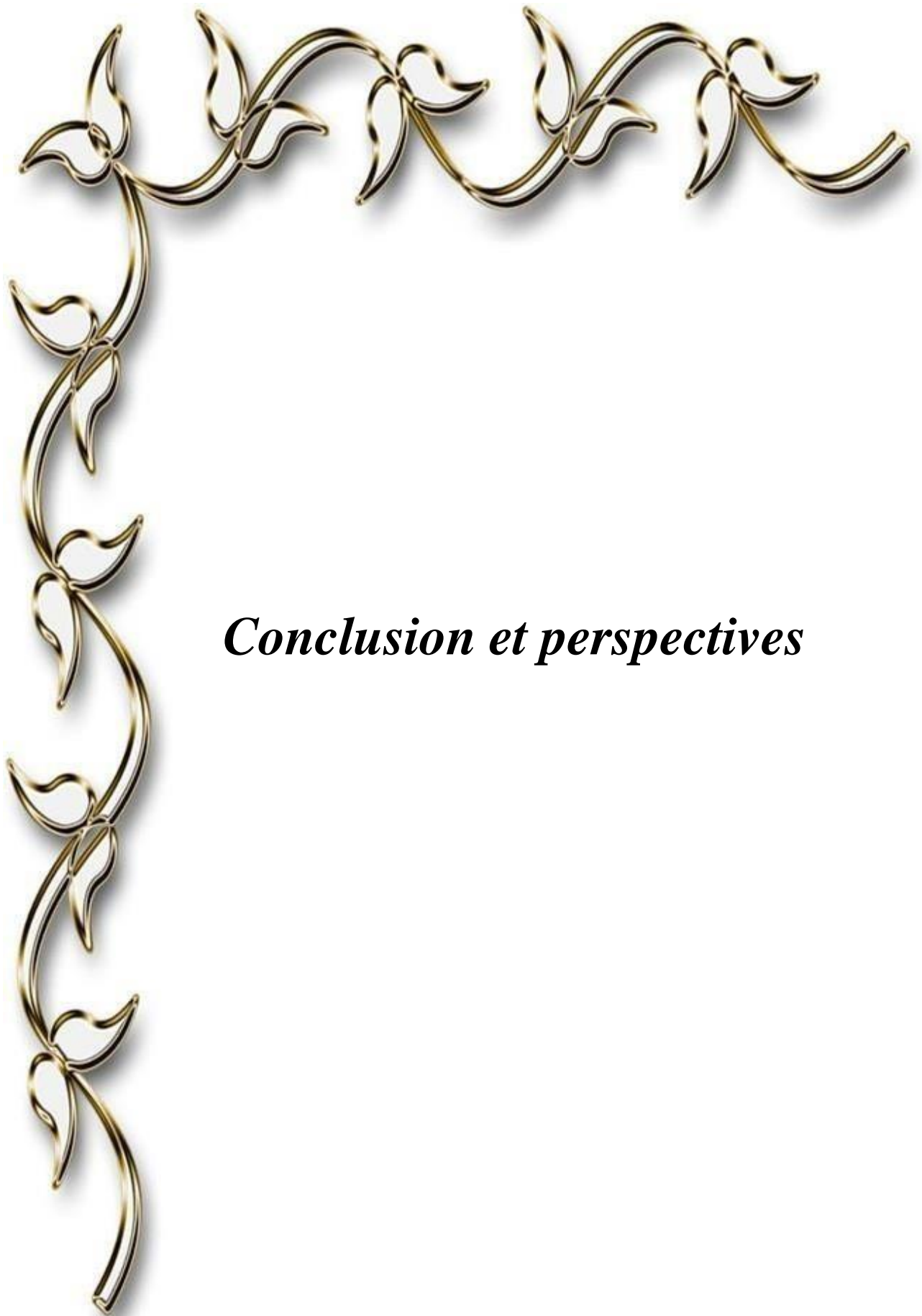
Bhavya *et al.*, (2018) montrent que certains métabolites secondaires produits par les plantes ont la capacité de cibler spécifiquement la cholinestérase, et peuvent perturber l'activité enzymatique, du fait que l'acétylcholinestérase est une enzyme cholénergique clé qui catalyse l'hydrolyse des neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine, dans le système nerveux et la perturbation de l'activité d'enzyme par certain métabolites secondaires a donc un effet significatif sur la fonctionnalité du système nerveux en perturbant la dégradation normale de l'acétylcholine, ces métabolites secondaires peuvent interférer avec le processus de dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur clé dans la transmission des impulsions nerveuses .

Ainsi certains composés bioactifs présents dans les extraits de *Pergularia tomentosa* L. (Dadda *et al.*, 2022), (Laid *et al.*, 2020), en agissant en tant que modulateurs positifs de l'activité enzymatique de la cholinestérase, se lient à un site allostérique spécifique sur l'enzyme, cette liaison induit des changements conformationnels favorisant une augmentation de l'activité catalytique de l'enzyme, cette interaction complexe peuvent faciliter ou accélérer la réaction de dégradation de l'acétylcholine et d'augmenter ainsi l'activité de la cholinestérase (Bordet *et al.*, 2019).

De même Tomlinson *et al.*, (2011) réalisent une étude des effets cinétiques de fixation périphérique des ions métalliques, notamment certains ions tels que Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} et Na^{+} sur l'enzyme acétylcholinestérase. Il souligne une hyperactivité de l'enzyme n'est observée que dans des solutions de faible force ionique et est attribuée à la fixation des ions métalliques.

D'autre part Smati (2011) montre que les plantes contiennent des ions métalliques. Les ions métalliques jouent un rôle essentiel dans le métabolisme et le fonctionnement des plantes. Les ions métalliques tels que le fer (Fe), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le calcium (Ca) et le magnésium (Mg) sont des éléments indispensables pour les processus biologiques des plantes. Donc il semble que parmi les causes d'hyperactivité observée dans l'activité enzymatique de cholinestérase la théorie de la présence des activateurs au niveau de l'extrait aqueux est bien possible.

Ainsi des études réalisées par Zivkovic *et al.*, (2023) montrent une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase responsable de l'hydrolyse d'acétylcholine, à la suite d'un traitement (chimique ou biologique) pourrait indiquer une phase très précoce d'inflammation et pourrait provoquer la mortalité des individus. L'augmentation observée a persisté pendant une longue période et directement corrélée avec la gravité de la toxicité. Cette constatation indirectement suggère que l'activité cholinergique pourrait moduler l'intensité du déséquilibre.



Conclusion et perspectives

Conclusion

Le but principal de cette étude était d'évaluer l'activité larvicide de l'extrait aqueux de *Pergularia tomentosa* L. sur les larves de quatrième stade de *Culex pipiens*. Pour cela un suivi de la mortalité des larves (L4) est réalisé ainsi que des mesures biochimiques réalisées pour déterminer l'activité d'enzyme cholinestérase. Les résultats de rendement d'extraction est de 9,29%. Cela signifie que le poids de l'extrait obtenu représente 9,29% du poids de la matière végétale initiale utilisée pour l'extraction. Les résultats préliminaires obtenus de l'étude de mortalité des larves de stade 4 de *Culex pipiens* L. démontrent une corrélation positive entre la concentration de l'extrait aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. et la mortalité des larves. La concentration la plus élevée de l'extrait (100%) a entraîné une mortalité significativement supérieure des larves L4, ce qui suggère un potentiel effet insecticide de cette plante. Ainsi, la DL50 est de 1,0505 mg/ml et DL90 est de 4,467 mg/ml. Le temps léthal le plus court est enregistré chez les larves traitées avec la dose la plus élevé de 100% avec un TL50=9,12 h et un TL 90=29,51 h, par rapport aux dilutions.

Les résultats des études sur l'activité cholinestérase révèlent une augmentation progressive de cette activité chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens* L. qui ont été traitées avec différentes doses d'extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. L'activité enzymatique maximale est observée chez les larves exposées à la dose (100%) de l'extrait aqueux après 1 heure et 24 heures, avec des valeurs respectives de $22,63 \pm 0,90$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et $31,53 \pm 2,56$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$. Cette hyperactivité augmente même au cours du temps après 1 heure et 24 heures d'exposition chez les larves de *Culex pipiens* L. traités par la dose pure *Pergularia tomentosa* L. 100 %. Pareillement, l'activité spécifique d'enzyme augmente avec l'augmentation de la dose de l'extrait de *Pergularia tomentosa* L. le maximum d'activation d'enzyme est noté chez les larves traitées à la dose (100%) de l'extrait aqueux considéré après 1 h et 24 h d'exposition sont de $3,450 \pm 0,17$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine et $4,806 \pm 0,68$ $\mu\text{g}/\text{min}/\mu\text{g}$ de protéine successivement. L'analyse de la variance montre un effet significatif de la dose appliquée sur les larves, ainsi une corrélation positive et très significative existe entre la mortalité et l'activité d'enzyme cholinestérase.

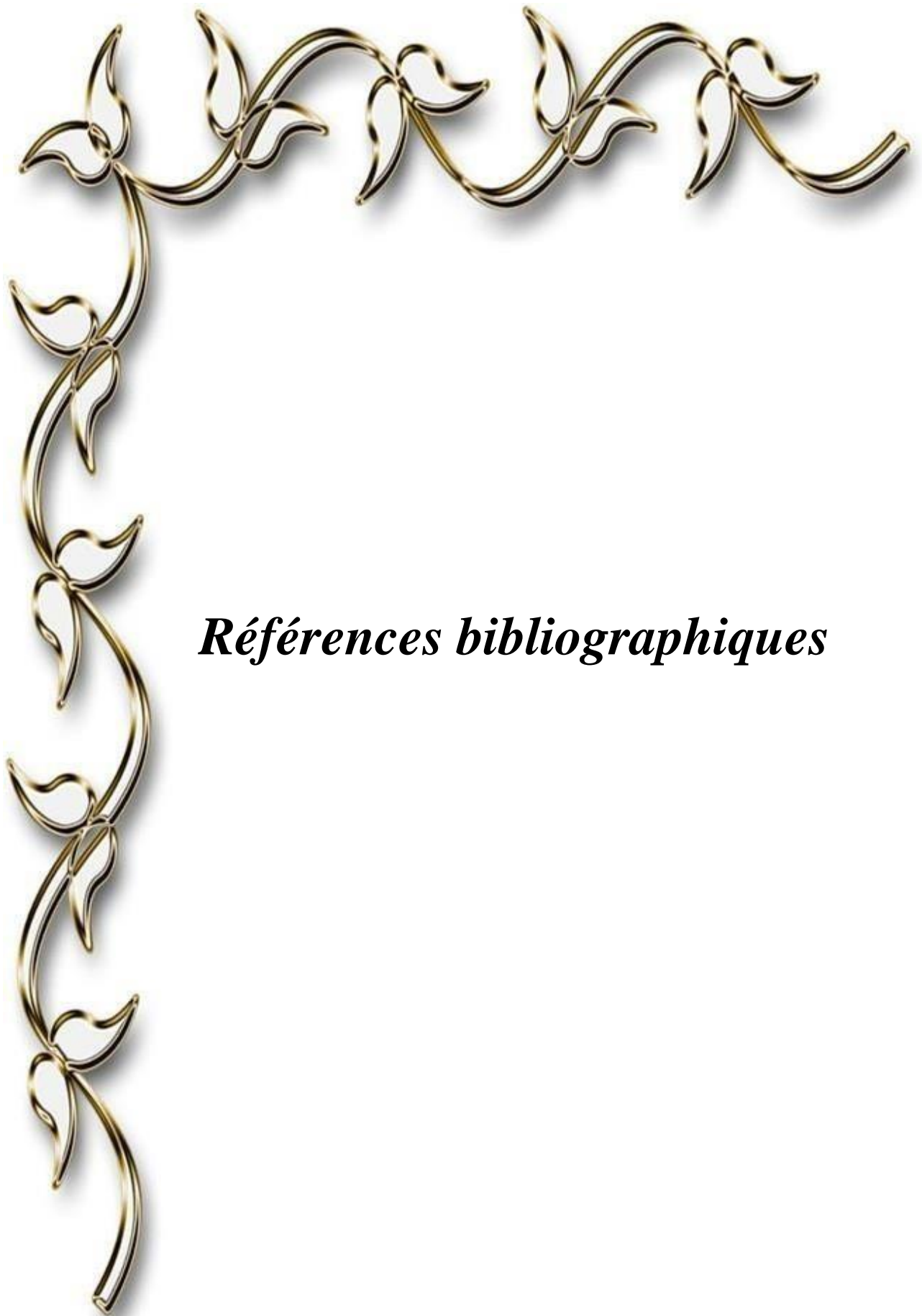
En conclusion, ces résultats préliminaires fournissent les premières indications de l'activité potentiellement insecticide de la plante *Pergularia tomentosa* L. contre les larves L4 de *Culex pipiens*. Ces résultats ouvrent des perspectives pour de futures recherches visant à évaluer leur potentiel d'utilisation dans le contrôle des populations de moustiques.

Perspectives

Ces résultats encourageants suggèrent que la plante *Pergularia tomentosa* L. mérite d'être étudiée plus en détail en tant qu'agent potentiellement insecticide contre les moustiques *Culex pipiens*. Cependant, il est important de souligner que des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les composés actifs responsables de cette activité et pour évaluer leur sécurité et leur efficacité à plus grande échelle.

Ainsi des études supplémentaires sur la plante *Pergularia tomentosa* L. sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes sous-jacents et évaluer les conséquences écologiques de ces interactions et très peu exploité et d'étudier la composition chimique de la métabolite secondaire et les ions métaux pour cibler les molécules responsable de l'effet bioinsecticide et de sa toxicité.

Les résultats préliminaires obtenus sont encourageants et nécessitent d'autres études approfondies. Il serait intéressant de poursuivre les essais en utilisant d'autres plantes possédant des propriétés insecticides similaires. De plus, il serait bénéfique d'élargir les traitements à d'autres variétés de larves. Etant donné le taux d'infestation observé chez *Culex pipiens* L., ce qui permettrait de renforcer la validité de nos résultats.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abid A., et Touahria T. (2018). Etude phytochimique et activité biologique d'une plante médicinale appartenant à la famille des Asclepiadaceae dans la région du sud d'Algérie. Mémoire Master, Université Kasdi Merbah-Ouargla, 1-61 p.

Acheuk F., et Doumandji-Mitiche B. (2013). Insecticidal activity of alkaloids extract of *Pergularia tomentosa* (Asclepiadaceae) against fifth instar larvae of *Locusta migratoria cinerascens* (Fabricius 1781)(Orthoptera: Acrididae). International Journal of Science and Advanced Technology, 3(6), 8-13p.

Alghanem M., et EL-AMIER A. Y. (2017). Phytochemical and Biological Evaluation of *Pergularia tomentosa* L. (Solanaceae) Naturally Growing in Arid Ecosystem. University Tabuk, KSA. American Institute of Science, 3(2), 7-15 p.

Al-Mekhlafi N. A., et Masoud A. (2017). Phytochemical and pharmacological activities of *Pergularia tomentosa* L.- a review. Pharmaceutical sciences. Indo american journal of Pharmaceutical sciences, 4 (11), 4558-4565 p.

Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., Mahari S. (2006). Evaluation 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). BASE. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10 (2), 67–71 p.

Baaisa S., Guettiani, F.Z.(2020). Contribution à l'évaluation de l'activité antioxydante in vivo de différents extraits de la plante médicinale *Pergularia tomentosa* L. Mémoire Master. Université besekra ,1-40 p.

Babaamer Z.Y., Sakhri, L., Al-Jaber H.I., Al-Quada M.A. and Abu zargam H., (2012). Two new taraxasterol-type triterpenes from *Pergularia tomentosa* growing wild inAlgeria, Journal of Asian Natural Products Research, Vol. 14(12), 1137–1143 p.

Badiou A. (2007). Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur acétylcholinesterase chez l'abeille, *Apis mellifera*. Thèse Doctoral, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 1-123 p.

Balenghien T. (2007). Les moustiques vecteurs de la Fièvre du Nil Occidental en Camargue. Insecte, 146(3), 13-17 p.

- Barbier L. (2009).** Effets centraux de la pyridostigmine administrée en situation de stress. Thèse Doctoral, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 1- 198 p.
- Barker G.R, Warburton E.C. (2009).** Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. *Learn Mem* ,16 (1), 8-11 p.
- Bbilami Y., et Boukahil M. (2015).** etude in silico de l'inhibition de butylcholinestérase. Mémoire Master, Université des Frères Mentouri Constantine, 1-43 p.
- Belkhiri N., Benhissen S., Aberkane N., Habbachi W., Rebbas K. (2023).** Étude comparative de l'effet de l'extrait des feuilles et des fruits de *Solanum sodomaeum* (Solanaceae) sur les larves de *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata* (Culicidae). *Phytothérapie*. 21(1),35-39 p.
- Bellou N., Nani N. (2020).** Contribution à l'étude phytochimique de racine de *P.tomentosa* L. dans la région d'ElOued, Mémoire Master, Université El Oued, 1-87p
- Ben Semaoune Y., Senoussi A., Faye B. (2019).** Typologie structurale des élevages camelins au Sahara septentrional Algérien-cas de la willaya de Ghardaïa. *livestock research for rural development*, 31(2).
- Bendahou A., et Fili N. (2017).** Cholinesterase et toxicite des extraits aqueux foliaires de *Peganum Harmala* sur *Drosophile Melanogaster* dans la region de Ghaedaia. Mémoire Master. Université de Ghardaia. 2-58 p.
- Benserradj O. (2014).** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. Thèse doctoral, Université Constantine ,1-208 p.
- Benzi H. (2013).** Effet des extraits aqueux des feuilles de *Pergularia tomentosa* L. et *Peganum harmala* L. sur les pucerons noirs *Aphis fabae* Scopoli (1763). Mémoire Master, Université Gardaia, 9-54 p.
- Benziane A. D. (2014).** Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos chez le rat Wistar : étude de l'activité enzymatique des cholinestérases comme indicateur biologique. Thèse Doctoral. Université Abou Bekr Belkaid Telemcen, 1- 51 p.
- Bhavya M. L., Chandu A. G. S., Devi S. S. (2018).** *Ocimum tenuiflorum* oil, a potential insecticide against rice weevil with anti-acetylcholinesterase activity. *Industrial Crops and Products*. Elsevier Masson, vol. 126, 434-439p.
- Bony N. F. (2013).** Stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires. Thèse Doctoral, Université Paris Sud, 2-175 p.
- Bordet R., Deguil J., Carton L., Dondaine T. (2019).** *Neuropsychopharmacologie.ch* 11(approche pharmacologie de la récompense et de la dépendance). Sous l'égide de la Société

Française de Pharmacologie et de Thérapeutique (SFPT) et du Collège National de Pharmacologie Médicale (CNPM). Elsevier Masson, 1-304 p.

Bouabida H., Djebbar F., Soltani N. (2012). Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie). *Entomologie faunistique-Faunistic entomology*, vol.65, 99-103 p.

BOUREGA F. (2013). Evaluation du pouvoir larvicides d'extrait foliaire aqueux de *Pergularia tomentosa* L (Asclepidaceae). Mémoire Master, Université Ghardaia, 2-53 p.

Boutiche S., Kemache D., Msela K. (2017). Essai d'évaluation de l'activité insecticide de deux agents microbiens contre un vecteur responsable d'arbovirose *Culex pipiens*. Mémoire Master, Université M'Hamld Bougara Boumerdas, 4-43 p.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254 p.

Brunet J. L. (2008). Piqûres d'insectes et voyages. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, 48(3), 204-213.

Burkett-Cadena N. D.(2013). Morphology of Adult and Larval Mosquitoes.Universilie Florida, 1-202 p.

Camiré M. (2007). Effets de l'exposition chronique aux pesticides sur le statut physiologique du poisson d'eau douce. Thèse Doctorat. Université du Québec à montéal . 1-96 p.

Chefirat B., Belabbaci N., Abouregal N., Rezk-Kallah H. (2013). Intérêt des oximes et du dosage de l'activité cholinestérasique dans les intoxications aiguës aux insecticides carbamates. *Bulletin d'information toxicologique*, 29(1), 26-36 p.

Chehma A. (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, Laboratoire de protections des écosystèmes en zones arides et semi-arides, Université Kasdi Merbah-Ouargla, éd. Dar El Houda Algérie, 1- 141 p.

Cherif R. (2020). Etude comparative des activités biologiques des extraits de deux plantes spontanées récoltées au Sahara Algérien. Thèse Doctoral, Université de Ghardaia, 2-157 p.

Cherifi A. (2019). Conception in silico de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Thèse Doctoral, Université Abdelhafid Boussouf centre-Mila.

Chetan J., Ramhau K., Laxmikant D. (2010). Larvicidal activity of *Cestrum nocturnum* on *Aedes aegypti*. *A Journal of the Bangladesh Pharmacological Society (BDPS)*, 5(1), 39 -40 p.

Chiba F., Guechairi A. (2015). Contribution à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase par docking moléculaire. Mémoire Master. Université des Frères

Mentouri Constantine, 1-41 p.

Colletier J. P. (2006). Etude des relations structure-dynamique-fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Thèse Doctoral. Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 1-214 p.

Colovic M. B., Krstic D. Z., Lazarevic-Pasti T. D., Bondzic A. M., Vasic V. M. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Current neuropharmacology*, 11(3), 315-335 p.

Dadda M., Ghabra N., Hammouya O. (2022). Etude phytochimique de l'extrait des tanins à partir de *Pergularia tomentosa* L. de région d'El-Oued. Mémoire de Master, Université El Oued, 1-66 p.

Djibo I., Sissoko D., Boukari S., Coulibaly Y. (2021). Colonisation des aires de pâturage par les espèces envahissantes: cas de *Pergularia tomentosa* L. dans la Commune rurale d'Azagor au Niger. *Afrique Science*, 18(5), 118-130 p.

Dontigny E. (2014). Déficit cholinergique dans le cerveau : la piste des céramides. Thèse Doctoral, Université du Québec à Trois-Rivières.

Diahouissie F., Saint S., Coulibraly T., Akpessé A A M., Kouassi P. (2023). Insecticidal Activity of Aqueous Plant Extracts in the Control of Termite Pests in Cashew Orchards in Northern Côte D'Ivoire. *Easy Chair Preprint*. N° 9867, 1-23 p.

Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95 p.

Ezzaher A., Mouhamed D. H., Mechri A., Neffati F., Douki W., Gaha L., Najjar, M. F. (2012). Étude de l'activité pseudocholinestérasique chez des patients bipolaires de type 1. In *Annales de Biologie Clinique*, 70(1), 25-31 p.

Fantozzi N. (2019). Synthèse et études de sondes fluorescentes pour la détection de neurotransmetteurs. Thèse Doctoral, Université de Bordeaux, 1-151 p.

Faucher P. (2015). Implication des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ dans les déficits mnésiques induits par des injections intra-hippocampiques de peptides amyloïdes-beta (1-42) chez la souris. Thèse Doctoral, Université de Bordeaux, 9-191 p.

Fecherolle J. (2008). Évaluation de l'efficacité des actions de lutte anti-vectorielle en France: État des lieux et recommandations. Mémoire de l'école des hautes études en santé publique, 1-50 p.

- Gerald F., et O'Malley R. (2022).** Intoxication par les organophosphorés et les carbamates. le manuel msd version pour professionnels de la santé.
- Ghenabzia I. (2009).** Cholinestérase et Toxicité par Le Carbamates Chez les adultes De *Schistocerca Gregaria* (Forskay, 1775). Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah, Ouargla. Annales de la Faculté des Sciences et Sciences de l'Ingénieur, 1(4), 46-56 p.
- Girard E. (2006).** Altérations génétiques des cholinestérases chez des souris : conséquences morphologiques et fonctionnelles à la jonction neuromusculaire. Thèse Doctoral, Museum national d'histoire naturelle-MNHN Paris, 1-90 p.
- Goyder D.J., (2006).** A Revision of the Genus *Pergularia L. (Apocynaceae: Asclepiadoideae)*. Springer on behalf of Royal Botanic Gardens, Kew. Vol.61, 245-256 p.
- Haba Y., et McBride L. (2022).** Origin and status of *Culex pipiens* mosquito ecotypes. Current Biology, 32(5), 237-246 p.
- Hamid Oudjana A. (2007).** Cholinestérases et toxicité par les organophosphorés chez *Schistocerca gregaria* Forskål 1775. Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah Ouregla, 1- 110 p.
- Hamid oudjana A. (2017).** Cholinestérases et toxicité d'extraits de quelques plantes acridicides ou acridifuges chez *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Thèse de Doctorat. Universitie kasdi merbah ouregla, 93p.
- Hamid oudjana A., Zegouba B., Lahlah B., Kemassi A., Ould el hadj M. D. (2022).** Effet insecticide et anticholinestérase de l'extrait aqueux foliaire de l'ortie *Urtica dioica L. (Urticaceae)* sur les larves L4 du *Culex pipiens L. (Diptera, Culicidae)*. Algerian journal of arid environment. 12(1), 87-97 p.
- Hassan S. W., Umar R. A., Ladan M. J., Nyemike P., Wasagu R. S. U., Lawal M., Ebbo A. A. (2007).** Nutritive value, phytochemical and antifungal properties of *Pergularia tomentosa L. (Asclepiadaceae)*. Internasional journal of Pharmacology, 3(4), 334-340 p.
- Hekal M. H., Ali Y. M., Abdel-Haleem D. R., El-Azm F. S. A. (2023).** Diversity oriented synthesis and SAR studies of new quinazolinones and related compounds as insecticidal agents against *Culex pipiens L. Larvae* and associated predator. Bioorganic Chemistry, vol.133.
- Huynh-Moynot S., Moynot J. C., Thill C., Commandeur D., Ould-Ahmed M., Drouillard I. (2013, July).** Curarisation prolongée après injection de succinylcholine sur déficit congénital en butyrylcholinestérase et potentialisée par un traitement au lithium : à propos d'un cas. In Annales de Biologie Clinique, 71(4), 485-488 p.

Ibrahim A. M., Thabit M. A., Ali A. M. (2023). Physiological and developmental dysfunctions in the dengue vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) immature stages following treatment with zinc oxide nanoparticles. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, Elsevier.

Kandeda A. K., Taiwe G. S., Moto F. C., Ngoupaye G. T., Nkantchoua, G. C., Njapdounke J. S., Ngo Bum E. (2017). Antiepileptogenic and neuroprotective effects of Pergularia daemia on pilocarpine model of epilepsy. *Frontiers in Pharmacology*, vol.8, 1-14 p.

Kandeda A. K., Taiwe G. S., Moto F. C., Ngoupaye G. T., Nkantchoua G. C., Njapdounke J. S., Ngo Bum E. (2017). Antiepileptogenic and neuroprotective effects of Pergularia daemia on pilocarpine model of epilepsy. *Frontiers in Pharmacology*, vol.8, 1-17 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). Thèse Doctoral, Université kasdi Merbah Ouregla, 8-153 p.

Kemassi A., Darem S., Cherif R., Boual Z., Sadine S. E., Aggoune M. S., Ould El Hadj M. D. (2014). Recherche et identification de quelques plantes médicinales à caractère hypoglycémiant de la pharmacopée traditionnelle des communautés de la vallée du M'Zab (Sahara septentrional Est Algérien). *Journal of advanced research in science and technology*, 1(1), 1-5 p.

Kemassi A., Boukhari K., Cherif R., Ghada K., Bendaken N., Bouziane N., Ould Elhadh E. M. (2015). Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'Euphorbia guyoniana (Boiss. & Reut.)(Euphorbiaceae). *Revue El Wahat pour les Recherches et les Etudes*, 8(1), 44-61.

Kemassi A., Herouini A., Hadj S. A., Cherif R., Elhadj M. O. (2019). Effet insecticide des extraits aqueux d'Euphorbia guyoniana (Euphorbiaceae) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algerien) sur le Tribolium castaneum. *Lebanese science journal*, 20(1), 55-70 p.

Kerboua Laouar A., et Kerrouchi, R. (2021). Docking moléculaire in silico et propriétés ADMET de certains composants d'huile de graines de *Lepidum Sativum* contre L'Acétylcholinestérase pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, Mémoire de Master, Université Constantine, 1-33 p.

Khezzani B., Barika D., Tahrine A. (2019). Situation épidémiologique de l'envenimation scorpionique dans la province d'El-Oued (Sahara algérien). *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, 112(5), 1-275 p.

Krejci É. (2005). Les cholinestérases: des enzymes ancrées dans les membranes et les lames

basales. Journal de la Société de Biologie, 199(1), 55-60 p.

Krida G., Rhaïem A., Jarraya A., Bouattour A. (1998). Morphologie comparée des quatre stades larvaires de *Culex (Culex) pipiens* Linné récolté en Tunisie (*Diptera, Culicidae*). Bulletin de la Société entomologique de France, 103(1), 5-10 p.

Krida G., Diancourt L., Bouattour A., Rhim A., Chermiti B., Failloux A. B. (2011). Estimation du risque d'introduction du virus de la fièvre de la vallée du Rift en Tunisie par le moustique *Culex pipiens*. Bulletin de la Société de pathologie exotique, 104(4), 250-259 p.

Kuppusamy E., Dhamodharan K. I., Jayakumar S. (2016). Role of plants and plant based products towards the control of insect pests and vectors: A novel review. Journal of Coastal Life Medicine, 4(11), 902-917 p.

Lahlah B., et Zegouba B. (2018). Valorisation de l'extrait aqueux foliaire de l'ortie (*El Herayeg*), *Urtica dioica* par l'étude de ses activités anticholinestérase sur *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum vulgare*. Université Gardaia, 1-47 p.

Lahmar I., Belghith H., Ben Abdallah F. Belghith K. (2017). Nutritional Composition and Phytochemical, Antioxidative, and Antifungal Activities of *Pergularia tomentosa*. L. Bio Med Research International, vol,2017, 1-9 p.

Laouar I. (2015). Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Mémoire de Master, Université el ouad.1-94 p.

Medjber K. (2012). Etude de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans le développement des cancers pulmonaires non à petites cellules. Diplôme Doctoral, Université Reims.

Messai N., Berchi S., Boulknafd F., Louadi K. (2010). Inventaire systématique et diversité biologique de *Culicidae (Diptera: Nematocera)* dans la région de Mila (Algérie). Entomologie faunistique-Faunistic entomology. 63 (3), 203-206 p.

Miladi M., Abdellaoui K., Ben Hamouda A, Boughattas I. (2018). Toxicity of the active fraction of *Pergularia tomentosa* and the aggregation pheromone phenylacetone nitrile on *Schistocerca gregaria* fourth-instar nymph: effects on behavior and acetylcholinesterase activity. Tunisian Journal of Plant Protection, 13(12), 201-216 p.

Miladi M., Abdellaoui K., Hamouda A. B., Boughattas I., Mhafdhi M., Acheuk F., Halima-Kamel M. B. (2019). Physiological, histopathological and cellular immune effects of

Pergularia tomentosa extract on Locusta migratoria nymphs. Journal of Integrative Agriculture, 18(12), 2823-2834 p.

Mohamed A. A. A. E. (2011). Etude du mode d'action neurotoxique d'un répulsif, le deet utilisé seul et en association avec un insecticide sur l'acétylcholinestérase des dum neurones d'un insecte la blatte *Periplaneta americana*. Thèse Doctoral, Université d'Angers. 2-178 p.

Mourot E. (2020). Biodiversité et moustiques face au changement climatique et à la mondialisation-Impacts sur la santé en France métropolitaine. Thèse Doctoral, Université Bodeaux. 9-99 p.

Nasr R. B. (2022). Investigation phytochimique, évaluation des activités larvicide et anti-acétylcholinestérase de différents extraits de *Mercurialis annua* L. Thèse Doctoral, Université de Carthage Tunisie, 1- 126 p.

Pohanka M., et Zakova J. (2021). A smartphone camera colorimetric assay of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. Sensors, 21(5), 1-1796 p.

Popov H., Itoh H., Mander U., Brebia C.A., (2010).waste management and the environment v . Wit transactions on ecology and the environment.WIT press.vol.140, 327 p.

Poupardin R. (2011) . Interactions gènes –environnements chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Thèse Doctoral, Université Grenoble, 3-275 p.

Rajasekaran A., et Duraikannan G. (2012). Larvicidal activity of plant extracts on *Aedes aegypti* L. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(3), 1578-1582 p.

Rebouh M., et Belkhirat S. (2014). Evaluation de l'activité antibactérienne et le pouvoir cicatrisant d'une *Asclepiadaceae*. Mémoire Master. Université M'hamed Bougara. Boumerdes, 1-43 p.

Sahir -Halouane F., Hamid S., Ouledtaleb R., Oukal Z., Benzina F. (2021). Évaluation de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis vis à vis des larves du 4 stade de moustique domestique Culex pipiens (Diptera: Culicidae). Université M'hamed Bougara de Boumerdes. Afrique science , 18(1), 90-99p.

Sanson B. (2009). Dynamique structurale de l'acétylcholinestérase étudiée par cristallographie aux rayons X et par une méthode spectroscopique complémentaire. Thèse Doctoral, Université Grenoble 1, 2-211 p.

Schmelzer G. H., Gurib F.A., (2013). Ressources végétales de l'Afrique tropicale plante médicinales 2^{ème} édition, Fondation PROTA, Wageningen, Pays- Bas, 11 (2), 224- 226 p.

Segondy M. (2020). Infections virales transmises par les moustiques. Revue Francophone des Laboratoires, 2020(524), 44-52 p.

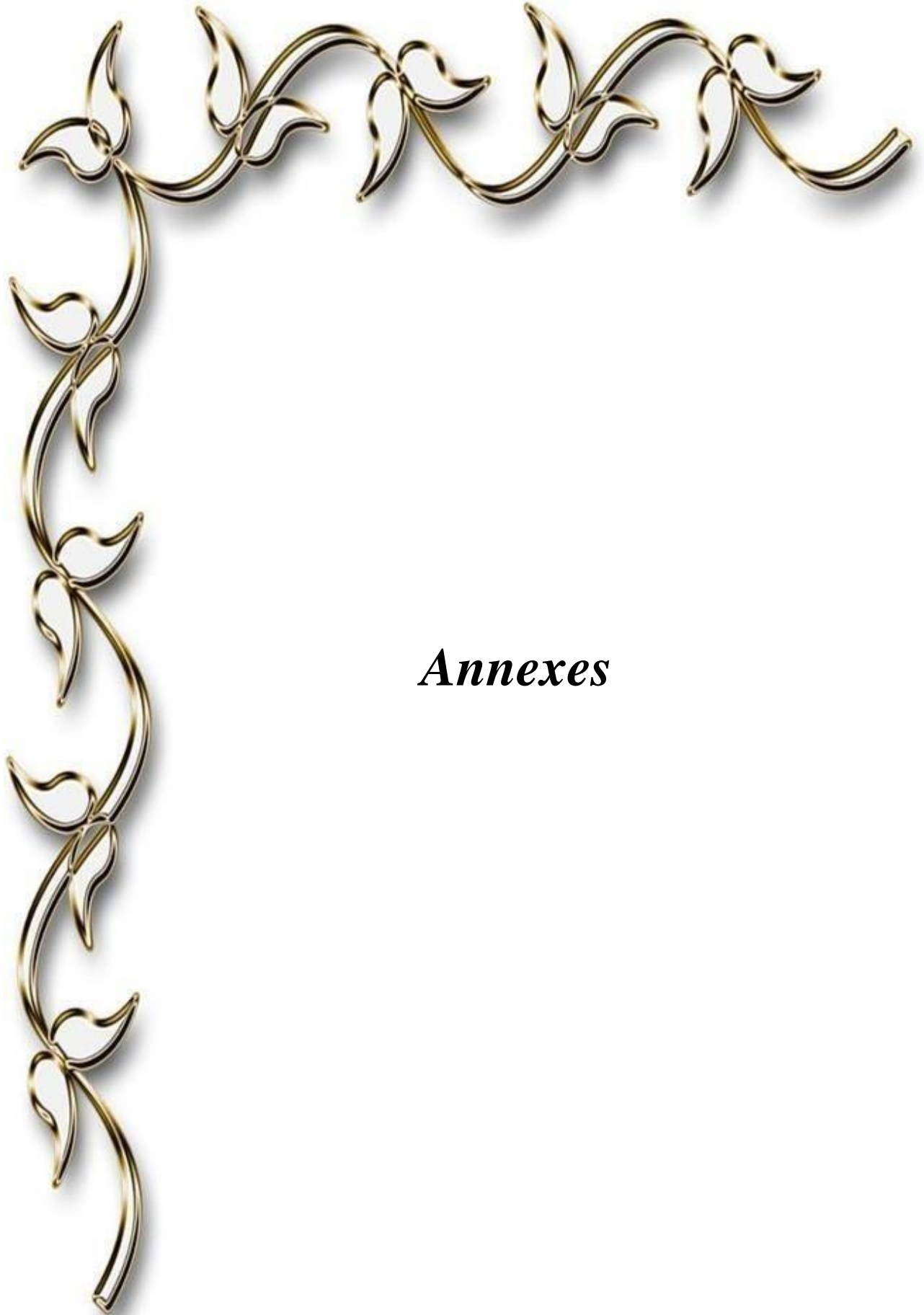
- Séguy E. (1931).** Les moustiques : biologie et nouvelles méthodes de destruction. Revue d'histoire naturelle. 388-396p.
- Smati D., Hammiche V., Azzouz M., Alamir B. (2011).** Dosage des métaux lourds dans les Zygophyllum réputés antidiabétiques. In Annales de Toxicologie Analytique. EDP Sciences, 23(3), 125-132 p.
- Soliman B. A., Tewfick M. K., Wassim N. M. (2014).** Comparative fine structure of eggs of autogenous and anautogenous *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Journal of the Egyptian Society of Parasitology, 44(3), 761-769 p.
- Tayebati S. K., Di Tullio M. A., Amenta F. (2006).** Muscarinic cholinergic receptor subtypes in cerebral cortex of Fisher 344 rats : a light microscope autoradiography study of age-related changes. Mechanisms of ageing and development, 127(2), 115-122 p.
- Tchamadeu N. N., Nkontcheu D., Nana, E. D. (2017).** Evaluation des facteurs de risques environnementaux liés à la mauvaise utilisation des pesticides par les maraîchers au Cameroun: le cas de Balessing à l'Ouest Cameroun. Afrique science, 13(1), 91-100 p.
- Tlili M.L. (2015).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et biologique des extraits de *Pergularia tomentosa* issue de quatre sites sahariens différents (Sahara septentrional). Mémoire Magister, Université Kadi Merbah Ouargla, 1-86 p.
- Tlili M.L., Hamoudi R., Dehak K., Hadj-Mahammed M. (2020).** Étude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de feuilles de *Pergularia tomentosa* issus d'El Oued (Algérie). Revue des BioRessources, 10(2), 1-12 p.
- Tomlinson G., Mutus B., McLennan L. (2011).** Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. Canadian Journal of Biochemistry, 59(9), 728-735 p.
- World Health Organization. (2023).** Mettre fin à la négligence pour atteindre les objectifs de développement durable: une stratégie mondiale pour l'eau, l'assainissement et l'hygiène afin de lutter contre les maladies tropicales négligées, 2021-2030. World Health Organization.
- Yakubu R., Jibril F. M., Lukman A., Sheikh F. (2015).** Research Article Trends for Antioxidant Power of Phytochemicals from *Pergularia tomentosa* L.(Asclepiadacea) Whole Plant. Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP), 4(2), 74-80 p.
- Zerdaoui S., et Bounasla S. (2020).** Docking moléculaire de deux flavones naturels contre l'acétylcholinestérase et le butylcholinestérase. Thèse Doctoral, Université Mohamed Boudiaf -M'Sila, 1-42 p.
- Zerouali-Khodja F., et Mokrane Z. (2010).** Structure du tractus digestif et régime alimentaire de *Scorpaena porcus* (Linné, 1758) des côtes algériennes. De l'institut national des sciences et

technologie de mer, 1- 147 p.

Zientara S., Lecollinet S., Bréard E., Sailleau C., Boireau P. (2009). La fièvre du Nil Occidental et la fièvre catarrhale ovine, deux viroses en progression inattendue. Bulletin de l'Académie vétérinaire de France, 162(1), 73-87p.

Zivkovic A. R., Paul G. M., Hofer S., Schmidt K., Brenner T., Weigand M. A., Decker S. O. (2023). Increased Enzymatic Activity of Acetylcholinesterase Indicates the Severity of the Sterile Inflammation and Predicts Patient Outcome following Traumatic Injury. *Biomolecules*, 13(2), 3-13 p.

Zogo M. B. (2019). Impact entomologique de stratégies complémentaires de lutte intégrée contre le paludisme dans un contexte de résistance des vecteurs aux insecticides au nord de la Côte d'Ivoire. Thèse Doctoral. Université d'Abomey-Calavi (Bénin), 1-211 p.



Annexes

Annexe I

Activité enzymatique

1. Réactifs

- Iodure Acétylthiocholine (P.M. 289,18)
- DNTB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)) (P.M.396.35)
- tampon phosphate de sodium pH 7.4

2. Préparation la solution de iodure d'acétylthicholine (P.M.289.18)

- Dissoudre 0.5 g de acétylthicholine dans 20 ml de tampon phosphate pH 7.4 Faire de aliquotes de 1 ml.

3. Préparation solution de DTNB (P.M. 396.35)

- Dissoudre 0.4 g de DTNB dans 20 ml de tampon phosphate de sodium 7.4
- Faire des aliquotes de 1ml

4. Mélange réactionnel d'ELMAN

- 0.5 ml de solution d'acétylthiocholine.
- 1 ml de solution de DTNB.
- 10 ml de tampon phosphate pH 7.4
- Compléter à 100 ml d'eau distillée.

Annexe II

Préparation de solution tampon phosphate

1. Réactifs

- Détergent : le triton X-100
- Tampon phosphate : acide citrique 2.10 g, phosphate disodique 7.16 g

2. Tampon phosphate de sodium 7.4

- 2.10 g d'acide citrique (0.1M) dans 100 ml d'eau distillée
- 7.16 g de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (0.2M) dans 100 ml d'eau distillée

Annexe III

Dosage des protéines par méthode de Bradford

1. Réactif

- Commassie Brilliant Bleu
- Éthanol
- acide phosphorique à 85%

2. Mode opératoire

- Dissoudre 10 mg de Commassie Brilliant Bleu G-250 dans 5 ml d'éthanol à 96%
- Agiter énergiquement pour favoriser la dissolution du colorant.
- Ajouter ensuite 10 d'acide phosphorique à 85%
- Ajuster le volume à 100 ml avec l'eau distillée.
- Filtrer pour éliminer le colorant non dissout. La solution est stable 1 à 2 semaines a température -4°.

3. Dosage des proteines

- Réaliser une gamme étalon (0 à 100 µg de protéines) avec le sérum albumine bovin (BSA)
- Prélever 0.1 ml de l'échantillon à doser (contenant au maximum 50 µg de protéines).
- Ajouter 2.5 ml de réactif au bleu de commassie et lire l'absorbance à 595 nm après 5 min d'incubation.

Annexe VI

Taux de protéines

0%	25%	50%	75%	100%
3,135±0,69	5,074±0,58	5,889±0,64	6,3±0,82	6,56±0,45