

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre:
N° de série:

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

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Biologie
Spécialité : Biochimie appliquée

Par : BEN DAHOU Amel
FILI Nesrine

Thème

**Cholinestérase et toxicité des extraits aqueux
foliaires de *Peganum Harmala* sur *Drosophile
Melanogaster* dans la région de GHARDAIA.**

Soutenu publiquement le :21/05/2017

M. DJELLID Youssef	Devant le jury : Maître Assistant B	Univ. Ghardaïa	Président
Mme. HAMID OUDJANA Aïcha	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Encadreur
Melle. BENSANIA Wafa	Maître Assistant A	Univ. Ghardaïa	Examinatrice

Année universitaire 2016/2017

DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents : a celle qui m'a noyée avec ses sentiments et le cœur qui m'a réchauffe avec son amour a la personne la plus chère au monde : à ma mère : HALIMA et aussi mon chère père : DINE que dieu protège et qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.

A mes chers frères : DJAMEL ET HAMMZA.

A ma précieuse sœur : GHANIA, je souhaite son près retour et le bonheur dans sa vie.

A toute la famille: BEN DAHOU ET CHAMKHA.

A toute mes amis partout et en particuliers et surtout les étudiants de promotion 2^{ème} MASTER biochimie appliquée.

A tous mes amis : ABIR, SARA, FATIMA et surtout Nesrine

A mes chers amie : IMANE

ET a tout qui ma aider pour obtenir ce diplôme, et a tout ceux qui j'aime.

AMEL

DÉDICACE

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents : à celle qui m'a noyée avec ses sentiments et le cœur qui m'a réchauffé avec son amour a la personne la plus chère au monde : à ma mère : SOUAD et aussi mon chère père : BOUHAFS que dieu protège et qu'Allah vous garde longtemps parmi nous.

Mes chers frères : Fouad,

Islam et Adel

Mes chers sœurs : Maria, Fardousse

A mes adorables amies : Insaf, Ahlam, Soumia , Zhayro , Amel, Sara, Abir , et spécialement Amel, toute mon amitié .A ma chère amie, ma binôme Wissem ;chez qui m'a supporter durant ces cinq dernières années.et chez qui j'ai trouvé l'entente dont j'avais besoin.

A toute la famille : FILI :mes tantes (ALdja, Fatima,Hadjer) ,mes oncles(Bachir ,Brahim)

A mes cousines : Aya,Hafsa,Hanan,Dhiba, Zineb

Et a tous mes amis avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Nesrine

Remerciement

*Au terme de ce travail,
Nous tenons à remercier Allah pour le
Courage et la pascience qu'il nous donné afin de
Mener ce projet a terme. Nous remercions vivement notre encadreur M^{me}
HAMID OUDJANA Aicha, Pour avoir accepté la charge d'être
rapporteuse de ce mémoire.*

*Nous les remercier pour sa disponibilité, ses nombreux et pertinents
conseils, son aide précieuse, ses orientations, sa compréhension et pour les
efforts qu'elle avait consentis durant la rédaction de ce mémoire.*

*Nos remerciements s'adressent aussi aux membres du jury, qui ont
accepté d'examiner notre mémoire de fin d'étude, et qui ont manifesté un
intérêt pour notre travail.*

*Ainsi que tous les enseignants du département de biologie pour leur
contribution notre formation et leur disponibilité à orienter les
étudiants, surtout Mr MAHAMEDI .A et Melle. HEROUINI. A
Nous remercions également les membres et les techniciens du laboratoire
du l'Université du Ghardaïa. Pour leur aide durant mon travail.*

*Surtout Nour Eddine et cheikh et Hicham
Enfin nous remercions toute personne ayant contribué de près de loin à
la réalisation de ce travail.*

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Diagramme du ruban de la tridimensionnelle structure d'AChE.....	5
2	Formes moléculaires des sous unités ACHET de l'acétylcholinestérase.....	6
3	Le site actif de la TcAChE. Les résidus de la triade catalytique, du trou oxydation, du site anionique et de la poche acyle sont représentés par des bâtonnets jaunes, orange, cyan et vert, respectivement. Les liaisons hydrogène qui assurent le maintien de la triade catalytique sont représentées par des tirets noirs.....	7
4	Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique.....	8
5	Structure moléculaire de l'acétylcholine.....	9
6	Biosynthèse de l'acétylcholine.....	9
7	Libération de la choline à partir de l'acétylcholine.....	10
8	Structure de l'AChE chez les insectes. Asp. : aspartique ; Glu. : Glutamique ; Tyr. : Tyrosine ; His. : Histidine ; Ser.: sérine	11
9	Mécanisme d'action d'un organophosphoré sur l'activité de l'AChE.....	14
10	Mécanisme d'action d'un carbamate sur l'activité de l'AChE.....	15
11	Carte de l'oasis de Sebseb, Wilaya de Ghardaïa.....	17
12	Protocole utilisé pour l'extraction du principe actif à partir des parties aériennes de la plante Peganum Harmala L.....	26

13	Protocole d'étude de la toxicité par contact.....	28
14	Protocole d'étude de la toxicité in vitro.....	29
15	Réaction d'Ellman.....	32
16	Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les adultes de <i>D.melanogaster</i> témoin et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de <i>P.harmala</i>	36
17	Relation entre la mortalité corrigée de <i>D.melanogaster</i> et la dose de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P.harmala</i>	37
18	A, B, C, D, E .action de l'extrait des feuilles de <i>P.harmala</i> sur les adultes de <i>D.melanogaster</i>	40
19	Temps létale de 50% des individus (LT50) à différentes doses de l'extrait aqueux de <i>Peganum harmala</i>	41
20	Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les adultes de témoins et traitées par de l'extrait aqueux des feuilles de <i>P.harmala</i> à différentes concentrations.	43
21	A, B, C, D, E. Action de l'extrait des feuilles de <i>P.harmala</i> sur les adultes de <i>D.melanogaster</i>	46
22	Courbe de TL50 pour le test de toxicité par ingestion.....	47
23	Activité cholinestérasique chez les individus adultes de <i>D.melanogaster</i> témoins et traités par différentes dose d'extrait de <i>P.harmala</i>	49
24	Taux de protéines chez la <i>D.melanogaster</i> traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de <i>P.harmala</i>	52
25	Cinétique de l'activité spécifique cholinestérasique chez les <i>D.melanogaster</i> traités à différentes doses de extraits des feuilles de <i>P.harmala</i>	53

Liste des photos

N°	Titre	Page
1	<i>Peganum harmala</i> L. (Hay ELJADR, Sebseb, Ghardaïa).....	16
2	Différentes parties de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.....	18
3	Cycle de vie de la drosophile <i>D.melanogaster</i> (Meigen, 1830) adulte : femelle et mâle.....	22
4	Elevage de la <i>Drosophile melanogaster</i> au laboratoire.....	22
5	Montage d'extraction à reflux.....	23
6	Montage de rota vapeur pour l'élimination du solvant.....	25
7	<i>Peganum harmala</i> L. (Hay ELJADR, Sebseb, Ghardaïa).....	25

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Taux de mortalité cumulée observé chez les adultes de <i>D.melanogaster</i> témoin et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de <i>P.harmala</i>	34
2	Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué.....	36
3	Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de <i>P.harmala</i> L.....	37
4	Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez <i>D.melanogaster</i> traitées par l'extrait aqueux <i>P.harmala</i> à différentes concentration.....	38
5	Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL50 évaluées pour les cinq concentrations de l'extrait aqueux.....	39
6	Taux de mortalité cumulée observé chez les adultes de <i>D.melanogaster</i> témoin et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de <i>P.harmala</i>	42
7	Mortalités corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué.....	44
8	Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de <i>P.harmala</i>	44
9	Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez <i>D.melanogaster</i> traitées par l'extrait aqueux de <i>P.harmala</i> à différentes concentrations.....	46

Liste des abréviations

%	Parentage.
°C	Dégré Celsius
µl	Microlitre
Ach	Acétylcholine
AChE	L'acétylcholinestérase.
BuChE	Butyrylcholinestérase
ChAT	choline acétyltransférase
DDT	Dichloro diphenyltrichloroéthane
g	Gramme
g/l	Gramme par litre
g/mol	Gramme par mole
Glu	Glutamine
His	Histidine
I%	Pourcentage d'inhibition
KDa	Kilo dalton
l	Litre
M	La masse molaire
m	Mètre
mAChRs	Récepteurs muscariniques de l'Acétylcholine
MFO	oxydases à fonction multiples
MFO	oxydases à fonction multiples
SNC	Système nerveux central.
mg/g	Milligramme par gramme
mg/l	Milligramme par litre
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Milli mole
mm	Millimètre

msec	milliseconde
nAChRs	Récepteurs Nicotiniques de l'Acétylcholine
OP	Organophosphorés
Ph	Potentiel d'hydrogène
Phe	Phényle alanine
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Ser	Serine
Trp	Tryptophane

Résumé

La présente étude porte sur les effets toxiques des extraits foliaires aqueux de *Peganum harmala* L sur l'activité de l'enzyme cholinestérase chez les individus adultes de la *Drosophile Melanogaster* dans la région de Sebseb, Ghardaïa. Les feuilles de *P. Harmala* sont récoltées au Hay ELJADR et soumises à un séchage, broyage et une extraction à reflux. Les tests de la toxicité sont réalisés à différentes doses de l'extrait aqueux de *P.harmala*L, le traitement *in vivo*, soit par contact (toxicité par contact et inhalation) ou par consommation de nourriture mélangée avec l'extrait foliaire (toxicité par ingestion), permet de déterminer des paramètres physiologiques (le temps létale 50 ou TL₅₀, le taux de mortalité et la dose létale 50 ou DL₅₀) et le traitement *in vitro* permet de déterminer des paramètres biochimiques (l'activité cholinestérasique, l'activité spécifique et le taux de protéines). Le traitement *in vivo* révèle un pourcentage de mortalité qui augmente en fonction de la concentration en extrait appliquée soit 55,55 % pour traitement par contact à la dose 80% d'extrait appliqué et 100% pour traitement par ingestion à la dose de 80%. Le temps létale 50 (TL₅₀) enregistre 8.80 heures avec une dose létale de 0.03mg/ml par contact, 33.7 heures avec dose de 0.005mg/ml par ingestion, la toxicité de traitement par contact semble être la plus efficace. Cependant le traitement des individus des drosophiles *in vitro* par différentes doses d'extrait de *P.harmala* montre une diminution importante de l'activité cholinestérasique plus perceptible à la dose la plus forte, 0.03 ± 0.02 nanomole /mn/ml pour la dose 100%, .. par rapport à l'activité cholinestérasique chez les individus témoins qui est égale à 3.39 ± 1.24 nanomole /mn/ml. Ainsi il apparait une diminution du taux de protéines pour tous les lots traités, le maximum de diminution est noté à la dose pure, avec 10.5 ± 6.71 µg/ ml, de même une diminution de l'activité spécifique est notée, le maximum de diminution est à la dose pure avec 0.068 ± 0.048 nanomole /mn/µg. L'extrait foliaire aqueux de *P. harmala* possède des propriétés insecticides et anticholinestérasique chez la *D. Melanogaster*.

Mots clés: Cholinestérase, Mortalité, *Drosophile Melanogaster*, *Peganum Harmala*, extraits foliaires, GHARDAÏA.

Abstract

This study investigates the toxic effects of aqueous foliar extracts of *Peganum harmala* L on the activity of the cholinesterase enzyme in adult *Drosophila melanogaster* in the Sebseb region of Ghardaïa. *P. Harmala* leaves are harvested at Hay ELJADR, and subjected to drying, grinding and reflux extraction. Toxicity tests are carried out at different doses of the aqueous extract of *P.harmala* L, treatment in vivo, either by contact (contact toxicity and inhalation) or by consumption of food mixed with the leaf extract (toxicity by ingestion), Determines physiological parameters (lethal time 50 or LD50, mortality rate and dose 50 or LD50) and the in vitro treatment makes it possible to determine biochemical parameters (cholinesterase activity, activity). The in vivo treatment revealed a percentage of mortality which increased as a function of the extract concentration applied: 55.55% for contact treatment at the dose 80% of applied extract and 100% for treatment with Ingestion at a dose of 80%. The lethal time 50 (TL50) registers 8.80 hours with a lethal dose of 0.03mg / ml per contact, 33.7 hours with a dose of 0.005mg / ml per Treatment, toxicity of contact treatment seems to be the most effective. However, treatment of *Drosophila* individuals in vitro with different doses of *P.harmala* extract shows a significant decrease in the more perceptible cholinesterase activity at the highest dose, 0.03 ± 0.02 nanomole / min / ml for the 100%, In comparison with the cholinesterase activity in the control individuals, which is equal to 3.39 ± 1.24 nanomole / min / ml, thus showing a decrease in the level of proteins for all batches treated, the maximum decrease being noted at A pure dose, with 10.5 ± 6.71 μ g / ml, similarly a decrease in the specific activity is noted, the maximum decrease is at the pure dose with 0.068 ± 0.048 nanomole / mn / μ g. The aqueous foliar extract of *P. Harmala* has insecticidal and anticholinesterasic properties in *D. Melanogaster*.

Key words: Cholinesterase, Mortality, *Drosophila Melanogaster*, *Peganum Harmala*, leaf extracts, GHARDAÏA.

ملخص

تركز هذه الدراسة على الآثار السمية للمستخلصات المائية لنبات الحرمل شائع على نشاط الكولين في الأفراد البالغة من ذبابة الفاكهة، تم الحصاد في حي الجدر في منطقة سبب غرداية، وتعرضها للتجفيف والطحن والاستخلاص، تجرى اختبارات السمية بجرعات مختلفة من المستخلص في علاج الجسم الحي أو عن طريق الاتصال (سمية الاتصال والاستنشاق) أو تناول الطعام مختلط مع مستخلص الأوراق (سمية عن طريق الفم) يمكن تحديد المعلومات الفسيولوجية (الوقت القاتل 50، جرعات من الركود 50). المعاملة في المختبر تسمح بتحديد القياسات البيوكيميائية (نشاط الكولين، نشاط محتوى البروتين). العلاج في الجسم الحي يكشف عن النسبة المئوية لزيادة الوفيات مع تركيز المستخلص، سواء 55,55 في علاج الاتصال بجرعة 80 من المستخلص، و 100 في العلاج عن طريق الابتلاع بجرعة 80. الوقت القاتل (LT50) يسجل 8.80 ساعة مع جرعة قاتلة من 0.03 ملغ / مل عن طريق الاتصال، 33.7 ساعة مع جرعة من 005,0 ملغ / مل عن طريق الابتلاع، يبدو علاج سمية الاتصال أكثر فعالية. ومع ذلك، فإن معالجة الأفراد ذبابة الفاكهة في المختبر مع جرعات مختلفة من المستخلص الحرمل أظهرت انخفاضا كبيرا من النشاط الكولين أكثر وضوحا أعلى جرعة 0.02 ± 0.03 نانومول / دقيقة / مل لجرعة 100٪،، فيما يتعلق النشاط الكولين في الأفراد تحت سيطرته والتي تساوي 1.24 ± 3.39 نانومول / دقيقة / مل، وبالتالي يبدو أن هناك انخفاض في مستويات البروتين لجميع المجموعات المعالجة، ويلاحظ أقصى انخفاض في جرعة نقية، مع 6.71 ± 10.5 ميكروغرام / مل، ويلاحظ حتى انخفاض في نشاط معين، والحد الأقصى هو جرعة نقية مع 0.048 ± 0.068 نانومول / دقيقة / ميكروغرام. المستخلص المائي لأوراق حرمل له خصائص المبيدات الحشرية و انتيكولينستراز عند ذبابة الخلد.

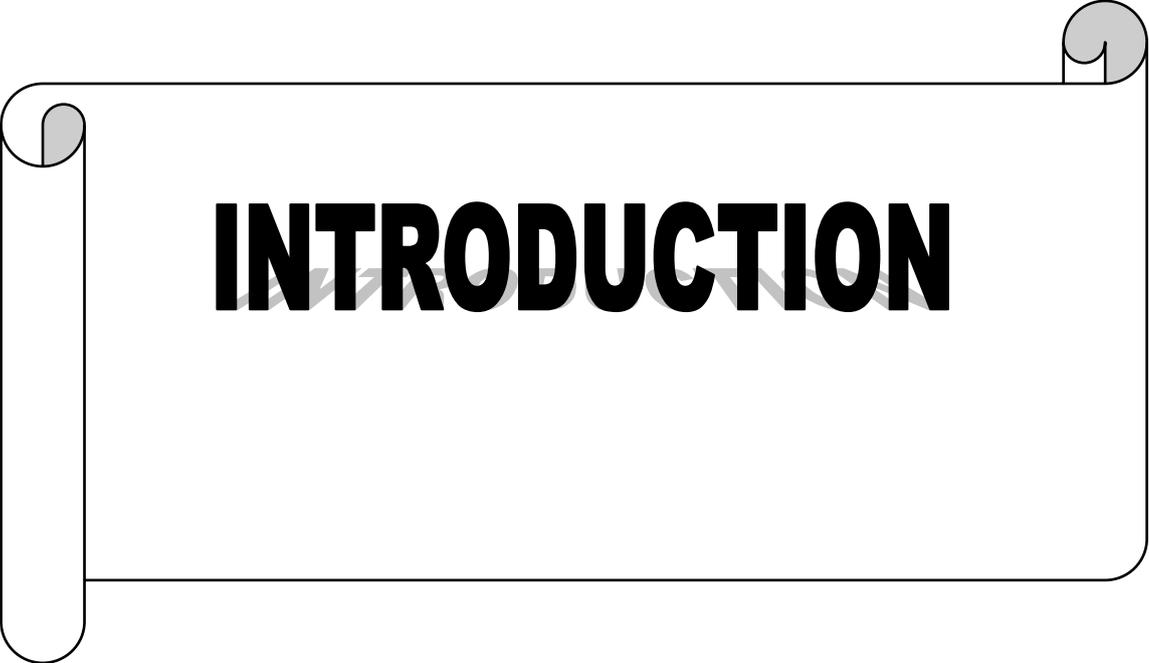
الكلمات المفتاحية: كولينستراز، وفيات، ذبابة الفاكهة، حرمل شائع ومستخلص ورقي، غرداية.

TABLE DES MATIERES

Sommaire	
Dédicace	
Remerciement	
Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Introduction	2
Chapitre I : synthèse	
bibliographique	3
I.1.- Cholinestérases.....	3
I.1.1.- Historique.....	3
I.1.2.- Définition.....	3
I.1.3.- Différents types de cholinestérases.....	3
I.1.3.1.- L'Acétylcholinestérase.....	4
I.1.3.2.- Butyrylcholinestérase ou cholinestérase sérique.....	4
I.1.4.- Structure de Cholinestérase.....	4
I.1.5.- Site actif de l'acétylcholinestérase.....	6
I.1.6.- Rôle physiologique des cholinestérases.....	7
I.2.- L'acétylcholine.....	8
I.2.1.- Synthèse et stockage:.....	9
I.2.2.- Libération.....	9
I.2.3.- Récepteurs de l'acétylcholine.....	10
I.2.3.1.- Récepteurs Nicotiniques de l'Acétylcholine (nAChRs).....	10
I.2.3.2.- Récepteurs muscariniques de l'Acétylcholine (mAChRs).....	10
I.3.- cholinestérase chez les insectes :.....	11
I.4.- Toxicité et cholinestérase.....	11
I.4.1.- Définition de la toxicité.....	11
I.4.2.- Différentes formes d'intoxication.....	12
I.4.2.1.- Toxicité aigue.....	12
I.4.2.2.- Toxicité à long terme.....	12
I.4.3.- Inhibiteurs de cholinestérase.....	13
I.4.3.1.- Inhibiteurs réversible.....	13
I.4.3.2.- Inhibiteurs irréversibles.....	13
I.4.4.- Mécanisme d'action des inhibiteurs de cholinestérase.....	13
I.4.4.1.- Cas des organophosphorés.....	13
I.4.4.2.- Cas des carbamates.....	14
Chapitre II: Matériel et	
methodes	16
II.- Matériel et Méthodes.....	16
II.1.- Principe adopté.....	16
II.2.- Matériel.....	16

II.2.1.-Matériels de laboratoire	16
II.2.2.- Matériel biologiques	16
II.2.2.1.- Choix de la matière végétale.....	16
II.2.2.1.1.- Présentation de la région d'étude.....	16
II.2.2.1.2.-Présentation et description de la plante.....	17
II.2.2.1.3.- Classification botanique.....	18
II.2.2.1.4.-Répartition géographique (habitat)	18
II.2.2.1.5.-Composition chimique de <i>Peganum Harmala</i>	19
II.2.2.1.6.-Toxicité de <i>P. Harmala</i>	19
II.2.2.1.7.-Intérêt socioéconomique	19
II.2.2.2.- Choix de l'insecte	20
II.2.2.2.1.- Choix des stades de la <i>Drosophila melanogaster</i>	20
II.2.2.2.2.-Cycle de vie de la drosophile	21
II.2.2.2.3.-Position systématique	22
II.2.2.2.4.-Elevage.....	23
II.3.- Préparation des extraits végétaux	23
II.3.1.-Extraction par reflux	24
II.3.1.1.-Principe de l'extraction	24
II.3.1.2.-Mode opératoire	24
II.4.- Etude de la toxicité	26
II.4.1.-Etude in vivo	27
II.4.1.1.-Toxicité par contact	27
II.4.1.2.- Toxicité par ingestion	29
II.4.2.-Etude in vitro	29
II.4.2.1.-Préparation de l'homogénat	30
II.4.2.2.-Dosage de protéines	31
II.4.2.2.1-Principe de dosage	31
II.4.2.2.2-Mode opératoire	31
II.4.2.3.-Mesure de l'activité de cholinestérase	31
II. 4.2.3.1.-Principe de la méthode.....	31
II.4.2.3.2.-Mode opératoire	32
II. 5. Méthode exploitation des résultats.....	33
II. 5.1.- Taux de mortalité	33
II. 5.2.- Temps de mortalité (TL ₅₀)	33
II. 5.3.- Dose létale (DL ₅₀).....	33
III.- Chapitre III: Résultats et discussion	35
III.1.-Etude de la toxicité par contact d'extrait aqueux de <i>P.harmala</i>	35
III.1.1.-Effet de l'extrait aqueux sur la mortalité.....	35
III.1.2.-Dose létale (DL ₅₀) d'extrait foliaire de <i>P. harmala</i> sur les adultes de <i>D.melanogaster</i>	36
III.1.3.-Temps léthal 50 (TL ₅₀) d'extrait foliaire de <i>P. harmala</i> sur les adultes de <i>D.melanogaster</i>	38
III.1.4.- Discussion.....	41
III.2.-Etude de la toxicité par ingestion d'extrait aqueux de <i>P.harmala</i>	42
III.2.1.- Action sur la mortalité	42
III.2.2.- Dose létale 50 (DL ₅₀) d'extrait aqueux de <i>P. harmala</i> sur les individus adultes de <i>D.melanogaster</i>	43
III.2.3.- Temps léthal 50 (TL ₅₀) d'extrait foliaire de <i>P. harmala</i> sur les adultes de <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	45
III.2.4.- Discussion.....	48

III.3-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de <i>P.harmala</i> sur l'activité d'enzyme cholinestérase.....	50
III.4-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de <i>P.harmala</i> sur le taux de protéines.....	52
III. 5.- Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de <i>P.harmala</i> sur l'activité Spécifique....	54
Conclusion	55
Références bibliographiques	58
Annexes	



INTRODUCTION

Les insectes sont très étudiés en raison de leurs impacts sur la santé humaine et animale, ainsi que sur les cultures et l'habitat et spécialement leurs dégâts. Les diptères regroupent un grand nombre d'insectes qui causent un risque majeur pour la santé humaine, y compris la mouche des fruits, *Drosophila melanogaster* (M.) (Dipteran, Drosophilidae). C'est une espèce d'origine tropicale (Afrique de l'Est), répartie dans le monde entier en raison des activités humaines et de l'abondance est corrélée au degré d'urbanisation. Sa nuisance provient du fait qu'il est responsable de l'humidité et de l'infestation des fruits par des champignons et des bactéries, de plus cette espèce constitue un modèle biologique de choix pour toute étude de toxicité en laboratoire (BOUHOUHOU, 2016). Les dégâts imputés à ces ravageurs peuvent être comparés aux grands fléaux de l'humanité et leurs attaques attirent beaucoup l'attention du public, pour minimiser les dégâts causés par les *D. Melanogaster*, plusieurs méthodes de lutte ont été utilisées; parmi celles-ci, la lutte chimique, les insecticides utilisés en lutte sont généralement neurotoxiques, qui appartiennent aux groupes des organophosphorés, carbamates ou leur constitution appartient à l'un des deux composants (SHOWLER et POTTER, 1991).

L'acétylcholinestérase est la cible des organophosphorés et des carbamates. Cette enzyme hydrolyse l'acétylcholine pour stopper la transmission synaptique et réguler la concentration de ce neurotransmetteur dans la synapse cholinergique. L'acétylcholine réagit avec les sites actifs de l'AChE et subit une hydrolyse (BOUHOUHOU, 2016).

Cependant au cours des dernières décennies, les problèmes environnementaux, la phytotoxicité, la toxicité des sols, des eaux, l'apparition des formes de résistances chez les organismes ciblés, ont incité les organisations et les établissements de recherche pour développer plus de méthodes biologiques, afin de limiter l'utilisation d'insecticide chimiques. (SHOWLER et POTTER, 1991; KEMASSI, 2008). Une des méthodes biologiques est l'utilisation de composés secondaires de plantes pour contrôler les insectes nuisibles (SHOWLER et POTTER, 1991). Le Sahara dispose d'une biodiversité floristique exceptionnelle, constituée d'environ 500 espèces végétales et à laquelle s'ajoute une tradition séculaire de pharmacopée traditionnelle. Plusieurs espèces sont connues par leurs propriétés thérapeutiques remarquables (OZANDA, 1991).

Les plantes médicinales sont de plus en plus présentes dans la politique de développement. Leur utilisation et leur préservation sont un thème transsectoriel englobant, outre les soins de santé, la protection de la nature, la biodiversité, la lutte biologique, ainsi que la promotion économique, le commerce et divers aspects juridiques. Ces plantes sont reconnues par leur effet insecticide contre plusieurs groupes zoologiques (ELBAH *et al.*, 2016).

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes. Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les insectes (ELBAH *et al.* , 2016).

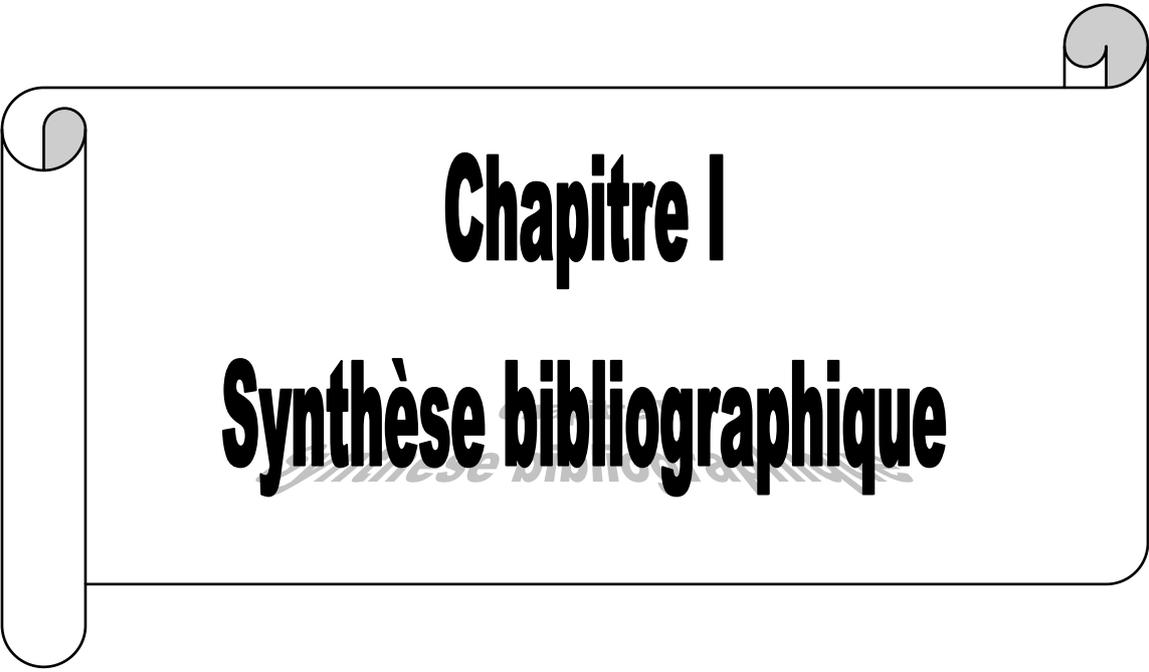
Peganum harmala (L.) (Zygophyllaceae), est une des sources les plus importantes des substances naturelles en raison de la diversité structurelle des alcaloïdes présents dans la plante et de leurs bioactivité. Il est abondant dans les zones arides méditerranéennes (Maroc oriental, Septentrional Sahara, hauts plateaux algériens, Tunisie, Libye et Égypte). Beaucoup d'études ont montrés les effets toxiques des substances extraites de *P. harmala*. Contrôlent de plusieurs espèces de l'insecte. (ELBAH *et al.* , 2016).

Face à ce constat, la présente étude recherche la toxicité de *P. harmala* L. plante spontanée très répandue dans la région du Ghardaïa, sur la *D. Melanogaster*, les paramètres d'appréciation de l'étude de la toxicité, portent sur la mortalité, activité de cholinestérase, l'activité spécifique et le taux de protéines.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur l'enzyme cholinestérase et la toxicité.

Le deuxième chapitre (ou chapitre matériel et méthodes), présente les données systématiques et biologiques sur le matériel végétal et animal utilisé sont présentées. De plus, le matériel étudié et les méthodes suivies dans la réalisation de ce travail sont expliqués.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le troisième chapitre, à la fin une conclusion générale achève ce travail.



Chapitre I

Synthèse bibliographique

I.1.- Cholinestérases

I.1.1.- Historique

En 1914, alors qu'il isolait l'ACh, Henry Dale suspectait déjà une enzyme d'être responsable de son élimination dans le système circulatoire. Il devait recevoir, conjointement à Otto Loewi, le prix Nobel de médecine en 1936 pour ses « découvertes relatives à la transmission chimique de l'impulsion nerveuse ».

En 1932, une enzyme capable d'hydrolyser à la fois l'ACh et la butyrylcholine (BCh) fut isolée dans le sérum de cheval. Elle fut nommée choline-estérase(ChE). Il fut alors proposé pour la première fois qu'une enzyme soit responsable de l'hydrolyse spécifique de l'ACh. En 1940, Alles et Hawes furent les premiers à décrire les différences entre les cholinestérases du sérum et celles des érythrocytes. Richter et Croft montrèrent en 1942 que les ChE érythrocytaires hydrolysent spécifiquement l'ACh. L'AChE fut isolée dans le cerveau des mammifères en 1935. Dix ans plus tard, il fut montré que la ChE présente dans le cerveau des vertébrés était du même type que la ChE érythrocytaire. En s'appuyant sur sa spécificité pour l'ACh, Augustins son et Nachmannsohn baptisèrent définitivement l'AChE en 1949.

A partir des années 50, la quête de la compréhension du fonctionnement de l'AChE a suscité beaucoup d'efforts. Des études biochimiques et de biologie moléculaire ont permis d'élaborer des modèles de plus en plus précis de sa structure et de sa cinétique (SANSON, 2009).

I.1.2.- Définition

Les cholinestérases forment un système enzymatique complexe composé de nombreuses isoformes capables de cliver les esters de la choline (CHIANEA *et al.* , 2001).est une des enzymes les plus efficaces et les plus rapides connues actuellement (une efficacité d'hydrolyse de 1000 à 20 000 molécules /seconde selon l'espèce) (BENZIANE AHMED, 2014).

I.1.3.- Différents types de cholinestérases

Les cholinestérases sont des hydrolases de sérine qui agissent préférentiellement sur les esters de choline, différents types de cholinestérases sont traditionnellement distingués sur base de leurs spécificité au substrat et par la cinétique d'hydrolyse (GHENABZIA, 2009).

Chez l'être humain, il existe deux types de cholinestérase qui diffèrent par leurs origines, leurs structures, leurs lieux de synthèse, leurs spécificités d'action et leurs fonctions physiologiques (EZZAHER, 2012), tandis que les arthropodes possèdent une seule enzyme, présentant les

caractéristiques des deux types de cholinestérases. Il s'agit généralement de l'acétylcholinestérase (ISHAAYA, 2001 ; BOTTI *et al.*, 1999).

I.1.3.1.- L'Acétylcholinestérase

Le terme acétylcholinestérase est donné par AUGUSTIN et NACHMANSON (1949) pour décrire une enzyme capable d'hydrolyser rapidement l'acétylcholine et d'autres esters de la choline. Toutefois, c'est en 1964 que les commissions internationales de nomenclatures biochimiques entérinent une distinction, en nommant la première enzyme contenue dans les érythrocytes, les tissus nerveux et la jonction neuromusculaire, Acétylcholinestérase ou cholinestérase vraie avec le numéro de code EC : 3.1.1.7. Car elle est intracellulaire (GHENABZIA, 2009).

I.1.3.2.- Butyrylcholinestérase ou cholinestérase sérique

Butyrylcholinestérase ou cholinestérase non spécifique, a porté de nombreux synonymes comme cholinestérase sérique, plasmatique, pseudo cholinestérase ; du fait qu'elle est extracellulaire. Mais sa dénomination est acylcholineacyl hydrolase, avec le numéro code EC : 3.1.1.8 (GHENABZIA, 2009), présente dans le foie (siège de sa synthèse), le pancréas et l'intestin (HUYNH-MOYNOT *et al.*, 2013).

I.1.4.- Structure de Cholinestérase

La première structure tridimensionnelle d'une AChE à être résolue fut celle d'une raie du pacifique, *Torpedo californica* (Tc) (SANSON, 2009). Les domaines catalytiques de ces enzymes sont organisés comme un ensemble globulaire de feuilles β et d'hélices α (poli α/β) qui est partagé avec d'autres estérases et protéines non catalytiques, telle que la glutactine de drosophile la neurotactine et la neurologine des mammifères (HARRY *et al.*, 2003).

La structure atomique de l'AChE a permis de mettre en évidence deux régions essentielles à l'enzyme, situées de part et d'autre de la gorge (Figure 1) qui pénètre l'enzyme jusqu'à son centre : le site actif au fond, et le site périphérique à l'entrée (SANSON, 2009).



Figure 1 :Diagramme du ruban de la tridimensionnelle structure d'AChE (HARRY *et al.* , 2003).

AChE et BChE présentent un Amphiphilique ou soluble similaire Formes moléculaires dans les tissus et les fluides corporels.

Les formes homomères l'AChE existent typiquement sous forme de dimères et de tétramères ; on trouve aussi des espèces monomères (TAYLOR, 1991). Les formulaires sont résumés comme suit :

Dérivés amphiphiles de type I: Glycophosphatidyl les dimères ancrés à l'inositol aux membranes plasmatisques. C'est une forme abondante d'AChE.

Monomères et dimères amphiphiles de type II: Distingué du type I en raison du manque de glycolipides Ancrer et ne pas agréger en l'absence defd Détergents. Ils sont solubilisés par des solutions salées. Celles-ci Les formes sont abondantes dans les cerveaux, les muscles et les muscles des mammifères. Intestin pour les deux cholinestérasés.

Tétramères à queue hydrophobe: ancrés au plasma Membranes par une longueur hydrophobe, 20 k Dalton sous-unité de polypeptide. Ce formulaire est abondant pour AChE dans système nerveux central des mammifères.

Formes à queue de collagène ou formes asymétriques : ceci la forme est caractérisée par la présence d'un collagène queue pour ancrage à la lame basale. Il est formé par la triple structure hélicoïdale de trois sous-unités collagéniques Q, chacun associé à un (A4), deux (A 8) ou trois (A12) Les tétramères des cholinestérasés. Il est plus abondant pour ACHE que BChE dans les jonctions nerveuses-musculaires.

Forme tétramère soluble (G4): Composé de quatre monomères identiques et stabilisés par hydrophobe Interactions d'acides aminés hydrophobes au niveau du terminal C des monomères.

Cette forme est abondante pour BChE dans Fluides corporels et dans la fraction soluble de Homogénats de tissus (fig 2)(NESE ÇOKUGRAS, 2003).

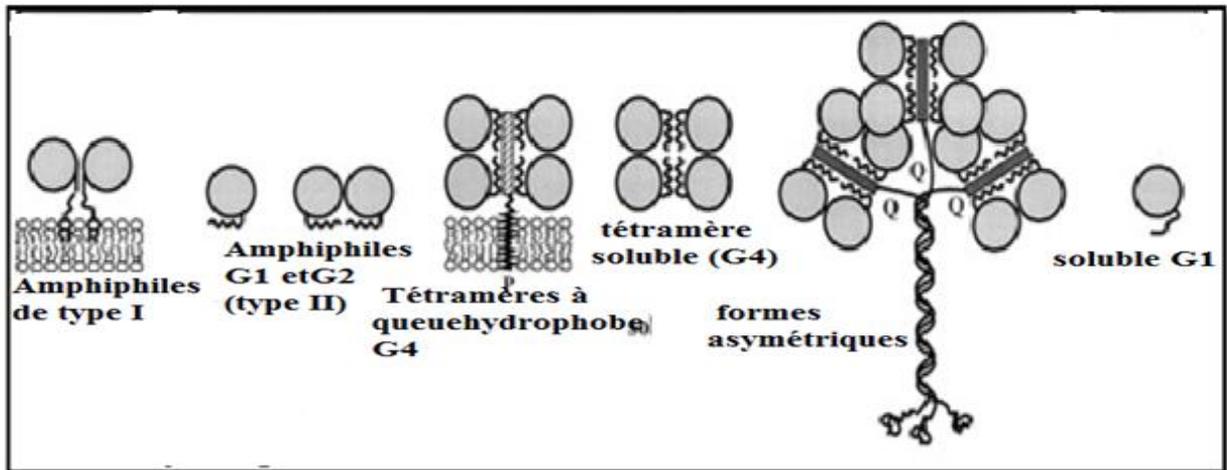


Figure 2: formes moléculaires des sous unités ACHET de l'acétylcholinestérase
(MASSOULIE *et al*, 1999)

I.1.5.- Site actif de l'acétylcholinestérase

Le site actif, région particulière de l'enzyme où se déroule la réaction enzymatique, possède une taille restreinte par rapport à la taille globale de l'enzyme. Ce site actif de l'AChE possède un site catalytique qui peut être décomposée en 2 parties :

le site estérasique, contenant la triade catalytique Ser200, His440 et Glu327 (numérotation d'après la séquence de l'AChE de *Torpedo californica* qui est la première structure tridimensionnelle résolue), Cette triade est localisée à la base d'une gorge étroite de 20 Å de profondeur et qui est alignée de 14 résidus aromatiques. Dans un premier temps, la partie acétyle de la molécule d'ACh se fixe et forme un intermédiaire tétrahédrique. Le trou oxyanion favorise la formation de cette intermédiaire en accueillant l'oxygène négativement chargé du carbonyle de l'ACh. L'His 440 joue un rôle important en se comportant comme un catalyseur pour la formation et la décomposition de l'intermédiaire. Au sein du sous-site estérasique se trouve une petite cavité hydrophobe appelée, poche acyle, qui stabilise le groupement méthyle de la partie acétate et confère un rôle de sélectivité du substrat. La mutagenèse dirigée a montré que le remplacement des résidus impliqués dans la poche acyle induisait une spécificité plus large de substrat. (BENZIANE AHMED, 2014).

le site anionique : est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330. Bien que le Glu199 contribue de manière électrostatique à la stabilisation de la charge positive de l'ACh, celle-ci est essentiellement assurée par les électrons π du Trp84, ainsi que ceux de la Phe330 dans une moindre mesure. 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. 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-trifluoroacétophène (TMTFA) est 10^{10} fois plus élevée que celle de l'ACh. Ce site joue également un grand rôle dans la spécificité de l'AChE (SANSON, 2009).

En plus de ce site, l'enzyme possède également un second site actif, appelé "site périphérique anionique" comportant des groupements périphériques secondaires qui permettent la fixation de ligands (BENZIANE AHMED, 2014).



Figure 3 :Le site actif de la TcAChE. Les résidus de la triade catalytique, du trou oxyanion, du site anionique et de la poche acyle sont représentés par des bâtonnets jaunes, orange, cyan et vert, respectivement. Les liaisons hydrogène qui assurent le maintien de la triade catalytique sont représentées par des tirets noirs. (SANSON, 2009).

I.1.6.- Rôle physiologique des cholinestérases

L'AChE est exprimée dans de nombreux tissus. Mais c'est à la jonction neuromusculaire ou dans les synapses reliant certains neurones qu'elle remplit son rôle le mieux connu.

Une synapse cholinergique fonctionne schématiquement en quatre temps. Le neurotransmetteur, l'ACh, est d'abord libéré, diffuse à travers la fente synaptique, se lie réversiblement au récepteur nicotinique et est finalement hydrolysé (Fig5). C'est lors de cette dernière étape qu'intervient l'AChE. Elle remplit sa fonction cholinergique en assurant la terminaison de la transmission de l'influx nerveux au sein des jonctions neuromusculaires et des synapses cholinergiques (SILMAN et SUSSMAN, 2005). Son principal rôle biologique est la fin de **terminaison d'impulsion transmission** aux synapses cholinergiques par hydrolyse rapide du neurotransmetteur ACh à l'acétate et à la choline. L'AChE a une remarquablement haute activité

catalytique spécifique, spécialement pour une hydrolase de la sérine, chaque molécule d'AChE dégrade au sujet de 25000 molécules d'ACh par seconde (MIRJANA, 2013).

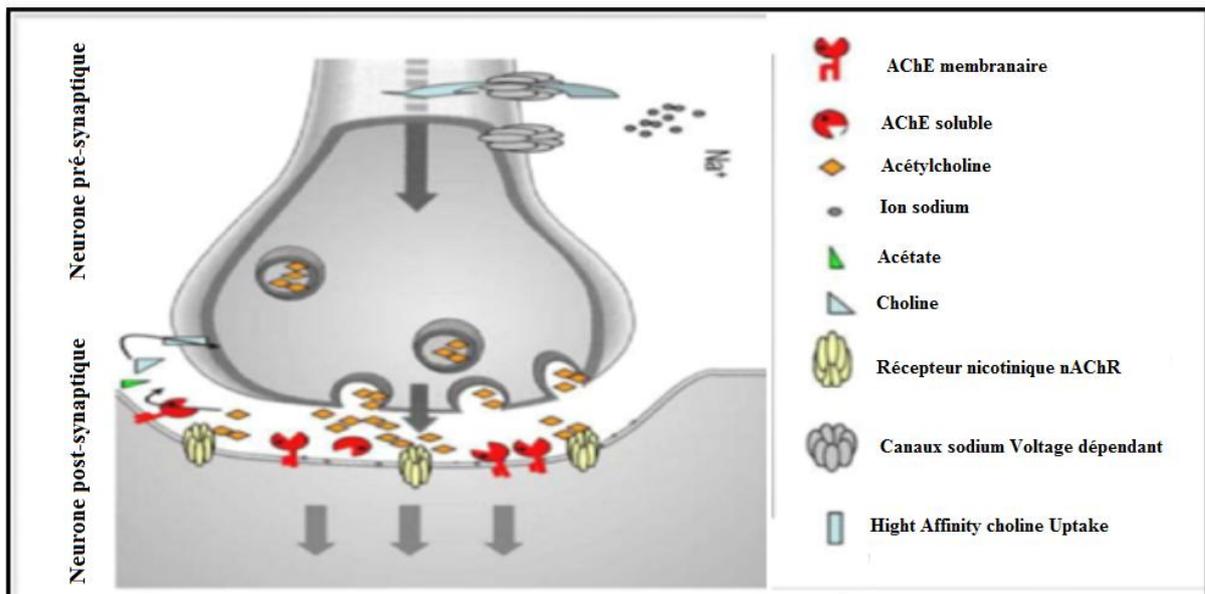


Figure 4: Hydrolyse de l'acétylcholine par l'AChE au niveau de la synapse cholinergique (BENZIANE AHMED, 2014).

Le rôle physiologique de la Butyrylcholinestérase demeure incertain: elle pourrait participer à l'hydrolyse du neurotransmetteur pendant la différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire, à la transmission nerveuse lente ou encore à la régulation de la concentration plasmatique de la choline (HUYNH-MOYNOT *et al*, 2013).

I.2.- L'acétylcholine

L'ACh est distribuée largement au sein du système nerveux, au niveau périphérique, elle est impliquée au niveau des plaques motrices, des ganglions périphériques et du système nerveux autonome parasympathique. C'est également un neurotransmetteur majeur au sein de SNC. La transduction de l'information cholinergique implique les récepteurs nicotiniques (N, à activité rapide) et muscariniques (M, à activité plus lente) (BROWN, 2006). Elle est l'ester acétique de choline, (GUILLET, 2007), synthétisée, stockée et sécrétée à partir des synapses cholinergiques (MEDJBER, 2012).

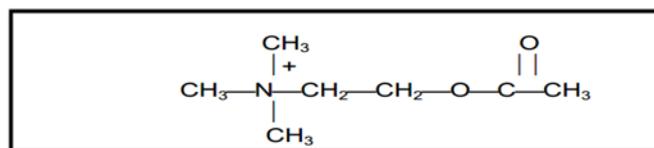


Figure 5: Structure moléculaire de L'acétylcholine (GUILLET, 2007).

I.2.1.- Synthèse et stockage:

L'acétylcholine est synthétisée dans la terminaison axonales à partir de la choline et de l'acétylcoenzyme A (Acétyl CoA). La choline est captée par les terminaisons axonales cholinergiques par le transporteur de choline (ChT) via un mécanisme de transport actif Na^+ dépendant (facteur limitant de la vitesse de synthés de l'acétylcholine) à haute affinité, saturable et localise spécifiquement au niveau des cholinergiques. La choline de à une origine à la fois exogène par l'alimentation et endogène par biosynthèse a partir de la glycine. Acétyl CoA est présent dans les mitochondries ; il provient du métabolisme des glucides (WEISS, 2006). **La synthèse** de l'acétylcholine est catalysée par la choline acétyltransférase (ChAT) enzyme cytoplasmique selon la réaction suivante :

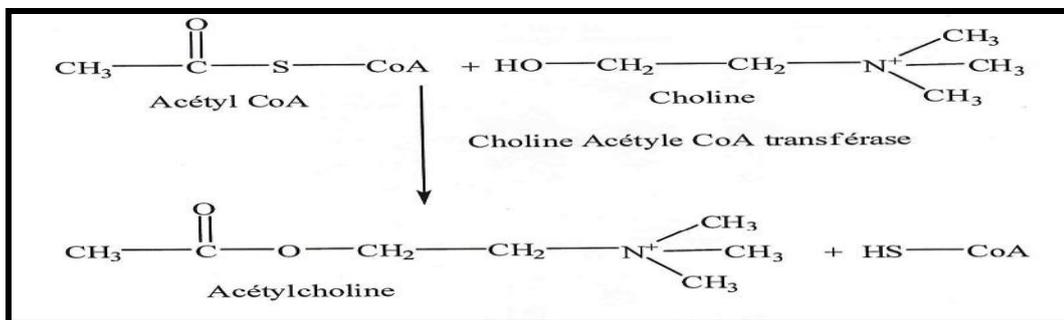


Figure 6: Biosynthèse de l'acétylcholine (GHENABZIA, 2009).

L'acétylcholine, synthétisée dans le cytoplasme des terminaisons axonales, est transportée activement dans des vésicules synaptiques ou elle est stockée, grâce au Transporteur de l'Acétylcholine Vésiculaire (VACHT) qui utilise l'énergie du gradient de protons H^+ , dans les terminaisons axonales, l'acétylcholine est présent dans les vésicules et dans le cytoplasme, ces deux compartiment étant en équilibre l'un avec l'autre. On estime à 300 000 le nombre de vésicules d'une terminaison présynaptique, contenant chacune environ 5000 molécules d'ACh (WEISS, 2006).

I.2.2.- Libération

L'ACh est libérée dans l'espace synaptique, sous forme des quantités. L'ACh exerce son action via des récepteurs muscariniques métabotropiques (mAChRs) et nicotiques (nAChRs) localisée sur les éléments pré-synaptique post-synaptique. Dès sa libération, environ la moitié de ACh libérée est tout de suite hydrolysée par l'acétylcholinestérase (AChE) présent à la membrane postsynaptiques, en acétate et en choline (fig 8) (WEISS, 2006).

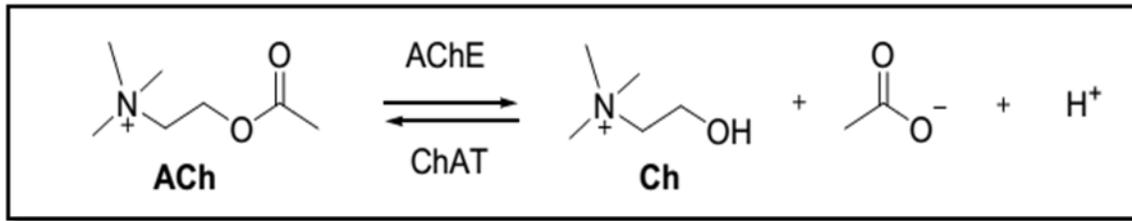


Figure 7: Libération de la choline à partir de l'acétylcholine (SONOIS, 2007).

La choline est ensuite capturée via un transporteur de choline à haute affinité (ChT1) et est recyclée à l'intérieur de la cellule pour être réutilisée (MEDJBER, 2012). Le temps d'inactivation de l'AChE est très rapide, de l'ordre de 100 msec pour une molécule d'ACh. Cette hydrolyse permet l'arrêt de la réponse postsynaptique dans le cas des récepteurs nicotiques se désensibilisant lentement (WEISS, 2006).

I.2.3.- Récepteurs de l'acétylcholine

L'acétylcholine interagit avec 2 classes de récepteurs cholinergiques qui se distinguent par les molécules naturelles qui les activent, à savoir la muscarine pour les récepteurs muscariniques et la nicotine pour les récepteurs nicotiniques (MEDJBER, 2012).

I.2.3.1.- Récepteurs Nicotiniques de l'Acétylcholine (nAChRs)

Les nAChRs sont des récepteurs canaux situés au niveau des synapses cholinergiques. Ils contribuent, avec l'acétylcholinestérase (AChE), à réguler l'intensité et la durée du signal. Ils sont des pentamères composés de sous-unités homologues qui s'arrangent symétriquement autour d'un axe perpendiculaire à la membrane.

Ils sont présents à la fois dans le système central et le système périphérique. (ALEXANDRE, 2004).

I.2.3.2.- Récepteurs muscariniques de l'Acétylcholine (mAChRs)

Les récepteurs muscariniques (mAChRs) sont des récepteurs métabotropiques appartenant à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (MEDJBER, 2012). Ils sont des récepteurs membranaires de l'acétylcholine, présent au niveau de certaines synapses du système nerveux central, des ganglions du système nerveux végétatif et au niveau des effecteurs du système parasympathique (GUILLET, 2007). Ils sont constitués d'une extrémité extracellulaire qui fixe le ligand, de 7 domaines transmembranaires et d'une extrémité intracellulaire couplée aux protéines G (G_{α_s} , $G_{\alpha_{i/o}}$, G_{α_q} et $G_{\alpha_{12}}$). Le couplage des mAChRs à ses effecteurs cellulaires se fait par l'intermédiaire des protéines G. Leur activation par l'ACh, induit la contraction du muscle lisse bronchique (MEDJBER, 2012).

I.3.- cholinestérase chez les insectes :

Chez l'insecte, l'AChE est une protéine complexe qui possède un site de liaison anionique, un site estérasique, une multitude de sites périphériques et de nombreux domaines hydrophobes (FUKUTO, 1990). Le site actif de l'enzyme contient le site anionique, qui fixe les groupements cationiques du substrat (OPS et carbamates) et le site estérasique (qui possède une sérine), dont le groupement OH est acylé pendant la réaction d'hydrolyse (Figure 9)(MOHAMED, 2011).

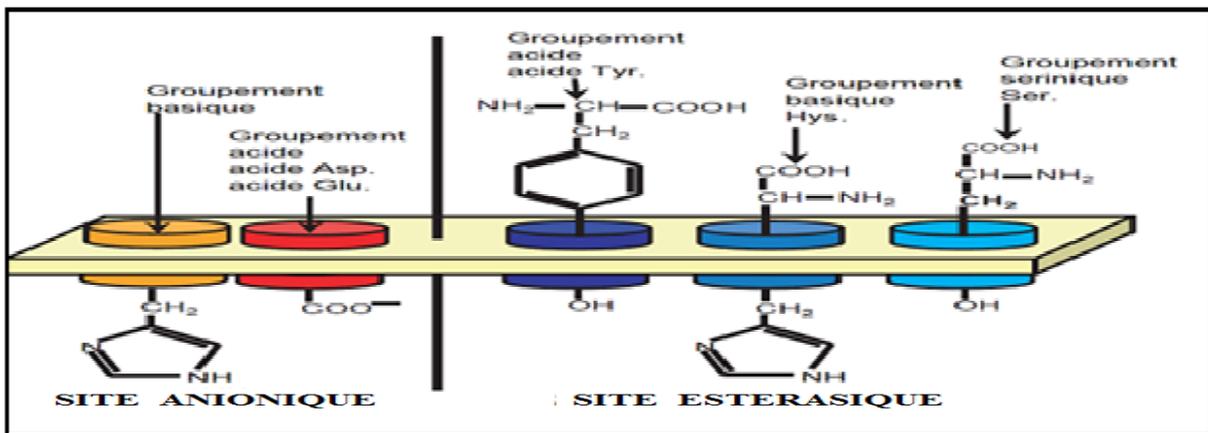


Figure 8 : Structure de l'AChE chez les insectes. Asp. : aspartique ; Glu. : Glutamique ; Tyr. : Tyrosine ; His. : Histidine ; Ser.: sérine (MOHAMED, 2011).

Le site anionique contient des charges négatives, qui proviennent du groupement COO^- des chaînes latérales des acides aminés aspartique ou glutamique. Ce site anionique permet la fixation des charges positives portées par l'ammonium quaternaire de l'ACh. L'AChE est une sérine hydrolase essentielle pour réguler l'effet du neurotransmetteur excitateur ACh dans le SNC des mammifères et des insectes. Chez les insectes, l'AChE est principalement localisée dans le SNC où elle est présente sous une seule forme moléculaire, un dimère amphiphile ancré dans la membrane par un glycolipide glycosylphosphatidylinositol (GPI). L'AChE est largement distribuée dans le cerveau, les segments thoraciques et abdominaux et les ganglions abdominaux. Les distributions préférentielles incluent les neuropiles du SNC tels que neuropiles protocérébral et tritocérébral, le lobule et la moelle des lobes optiques, l'organisme central, l'intérieur des calices et les glomérules antennaires (MOHAMED, 2011).

I.4.- Toxicité et cholinestérase

I.4.1.- Définition de la toxicité

Une substance est dite toxique lorsque, après pénétration dans l'organisme par quelque voie que ce soit, à une dose plus ou moins élevée, en une ou plusieurs fois très rapprochées, ou par petites doses longtemps répétées, elle provoque de façon passagère ou durable, des troubles d'une

ou de plusieurs fonctions. Des troubles pouvant aller jusqu'à leur suppression complète, et par la suite entraîner la mort, la toxicité ou propriétés d'une substance toxique, est donc étroitement liée à la dose ayant pénétré dans l'organisme en une ou plusieurs fois, mais aussi au mode de pénétration dans l'organisme (GHNABZIA, 2007).

Pour tout être vivant, il faut distinguer trois voies principales de pénétration d'une toxine :

-Voie digestive: l'intoxication peut se produire après la consommation d'aliments contenant des substances toxiques ou ayant été en contact avec des substances toxiques.

-Voie pulmonaire: l'intoxication peut être provoquée par produits volatiles ou ayant une tension de vapeur élevée, ou par des particules sous formes de poussières ou encore par des gouttelettes de liquides finement pulvérisés appelés aérosols, pendant les manipulations .ces risques de toxicité par inhalation sont d'autant plus grands que la température est élevée .les particules de poudre les plus tenus lors des traitements "par atomisation" ou "par nébulisation "sont particulièrement dangereuses (BOURON ,1977).

-Voie cutanée : Certaines substances peuvent traverser l'épiderme et gagner la circulation sanguine .c'est le cas d'un nombre d'insecticides organiques de synthèse solubles dans les graisses que la peau renferme en quantités suffisantes .le contact avec est muqueuses est encore plus dangereux (BOURON ,1977).

I.4.2.- Différentes formes d'intoxication

I.4.2.1.- Toxicité aigue

Ses effets de produisent après pénétration dans un organisme d'une substance vénéneuse, à une dose relativement élevée en une seule ou plusieurs fois très rapprochées est la plus connue, et celle qui est plus souvent envisagée, puisque ses effets apparaissent peu de temps après l'absorption de la substance responsable (BOURON, 1977).

La toxicité aigüe est aussi qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après l'administration de la substance active. Cette étude décrit les symptômes observés, y compris les phénomènes locaux.

I.4.2.2.- Toxicité à long terme

C'est l'exposition à de très faibles concentrations, parfois même infimes, à des substances dont la répétition d'effets cumulatifs finit par provoquer des troubles beaucoup plus insidieux et irréversibles (BOUSSAHEL, 2011).Il est à signaler que des troubles de toxicité se manifestent

souvent après une longue imprégnation de l'organisme. Des essais de toxicité par administration chez l'animal sont toujours effectués lorsqu'une molécule présente un éventuel intérêt thérapeutique.

La toxicité à **long terme** diffère de la précédente (toxicité aiguë) par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication, bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques se produisant à court terme sur des organes cibles, parfois réversibles et découlant de l'absorption répétée du toxique, mais à des doses plus faibles que celle de la toxicité aiguë (BOUSSAHEL, 2011).

I.4.3.- Inhibiteurs de cholinestérase

D'après le mode d'action, les inhibiteurs de la ACh peuvent être divisés en deux groupes: et réversible et **irréversibles** (MIRJANA *et al*, 2013).

I.4.3.1.- Inhibiteurs réversibles

Les inhibiteurs réversibles, qui inhibent l'enzyme d'une façon transitoire, tant que leur concentration est suffisante sont utilisés en thérapeutique, et pour la plupart d'entre eux connus depuis longtemps (LAOUAR, 2015).

I.4.3.2.- Inhibiteurs irréversibles

Les organophosphates sont des inhibiteurs irréversibles de l'AChE. Ils créent une lésion biochimique en phosphorylant le site estérasique de l'enzyme, s'opposant à l'hydrolyse de l'acétylcholine. Par conséquent, une liaison covalente est formée entre le groupement phosphate et le résidu Ser 200 du site actif de l'enzyme. Dans un deuxième temps, une déalkylation va rendre irréversible cette phosphorylation entraînant le vieillissement de l'enzyme ce qui correspond à une inactivation quasi-définitive (LAOUAR, 2015).

I.4.4.- Mécanisme d'action des inhibiteurs de cholinestérase

I.4.4.1.- Cas des organophosphorés

L'inhibition de l'AChE se fait en deux étapes. Dans un premier temps, l'OP se fixe à la sérine catalytique, en résultat d'une attaque nucléophile de type SN₂, avec départ concomitant du groupement partant, et inversion de la stéréochimie de l'OP.

Dans un second temps, l'un des substituants de l'OP est clivé (cela correspond en général à une déalkylation). Cette seconde réaction aboutit à une enzyme « vieillie » : l'AChE est alors irréversiblement inhibée. La létalité des OP provient de la ressemblance entre la réaction

catalytique et la réaction d'inhibition par les OP : en quelque sorte, cette dernière est une hydrolyse incomplète. Aucune molécule connue ne permet de réactiver une AChE vieillie.

L'AChE peut toutefois être réactivée avant le vieillissement (fig 11). En pratique, l'inhibition de l'AChE par les OP aboutit à l'accumulation d'ACh dans les synapses cholinergiques et les jonctions neuromusculaires, et provoque en conséquence la réponse exagérée des récepteurs cholinergiques (nicotiniques et muscariniques). (SANSON, 2009).

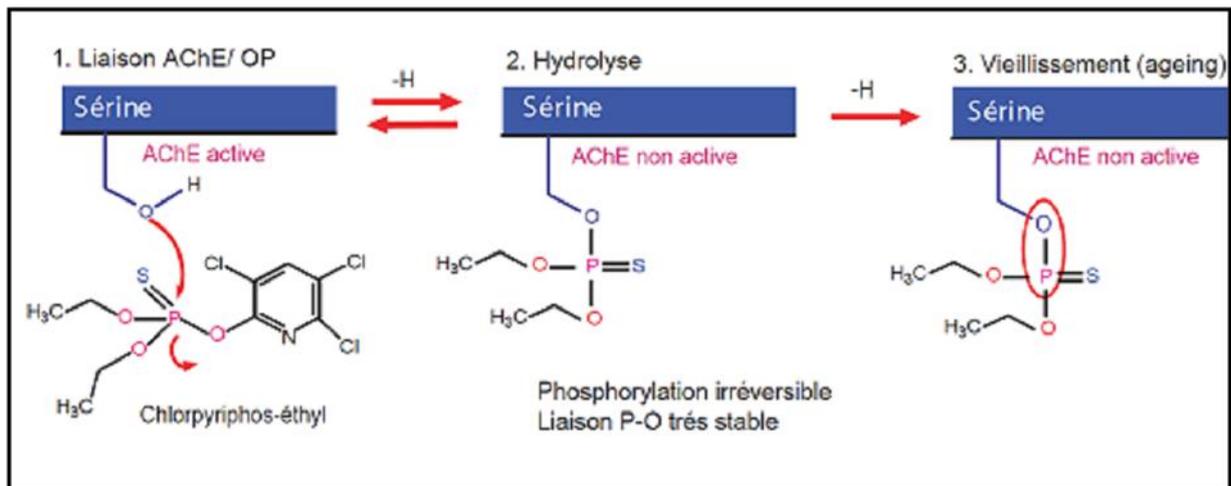


Figure 9: Mécanisme d'action d'un organophosphate sur l'activité de l'AChE (LAOUAR, 2015).

I.4.4.2.- Cas des carbamates

Les carbamate possèdent un effet neurotoxique, aussi bien chez les insectes. Ils inhibent l'enzyme vitale ; l'acétylcholinestérase (AChE) dans le système nerveux. Dans les conditions normales, l'acétylcholinestérase hydrolyse rapidement et efficacement l'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique des neurones cholinergiques (MOHAMED, 2011).

L'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase par les carbamates résulte par des niveaux accrus d'acétylcholine. En conséquence perturbant la fonction synaptique normale du nerf.

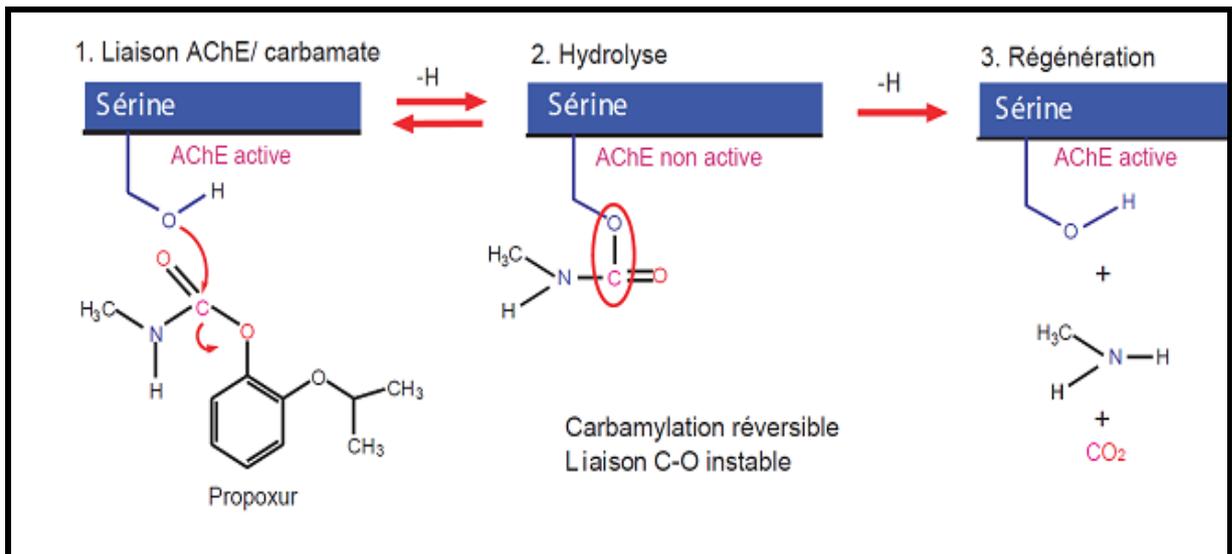
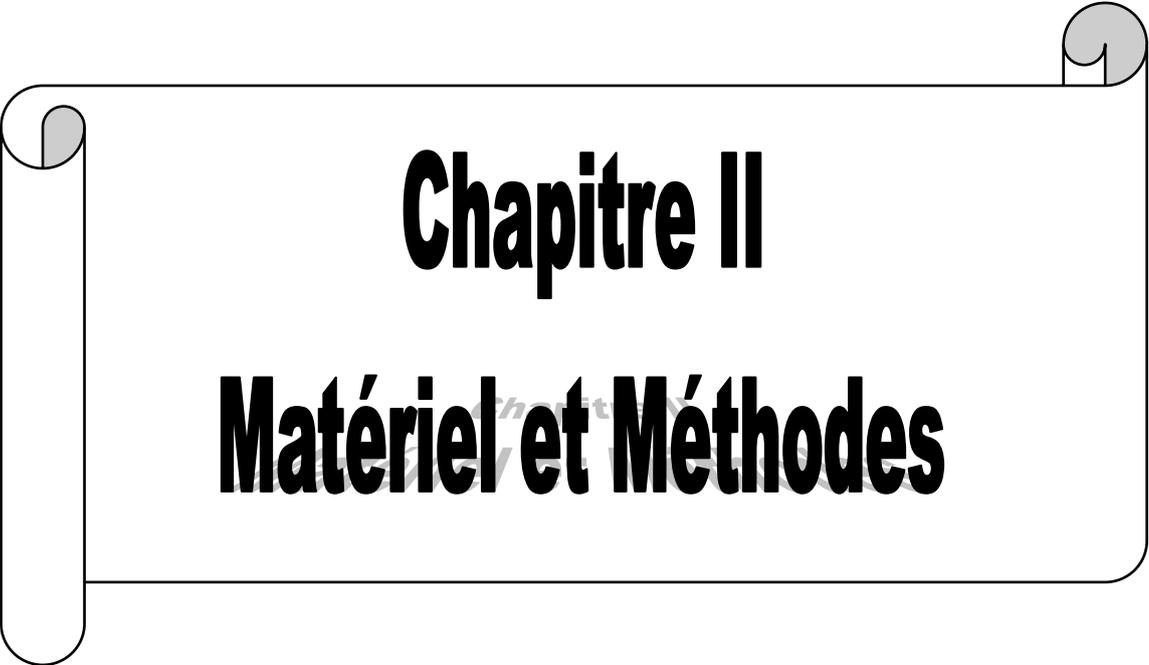


Figure 10: Mécanisme d'action d'un carbamate sur l'activité de l'AChE (MOHAMED, 2011).



Chapitre II

Matériel et Méthodes

II.- Matériel et Méthodes

II.1.- Principe adopté

Notre étude a pour but de déterminer les effets toxiques des extraits foliaires aqueux de *Peganum harmala* L sur quelques paramètres physiologiques et biochimiques notamment sur l'activité d'enzyme cholinestérase, chez les adultes de la *Drosophile Melanogaster*, qui est abondante dans la région de SEBSEB, wilaya de Ghardaïa.

II.2.- Matériel

II.2.1.-Matériels de laboratoire : (Annexe-I)

II.2.2.- Matériel biologiques

Le matériel biologique de notre étude se compose del'insecte *Drosophile Melanogaster* et de la plante *Peganum harmala* L.

II.2.2.1.- Choix de la matière végétale

L'étude porte sur la plante *Peganum Harmala* L, la récolte est réalisée dans la région de Hay ELJADR (SEBSEB)de la wilaya de Ghardaïa au mois de Novembre (photo01).



Photo1:*Peganum harmala* L. (Hay ELJADR Sebseb, Ghardaïa.

II.2.2.1.1.- Présentation de la région d'étude

SEBSEB est située dans la wilaya de GHARDAIA à 60 km du chef-lieu. Elle est limitée au Nord par la commune de METLILI CHAANBA, au Sud par la commune d'AIN BEIDA relevant de la wilaya d'OUARGLA, à l'Ouest par la commune de BRIZINA

relevant de la wilaya d'EL BAYADH et enfin à l'Est par la commune de MANSORAH (HOUICHITI, 2009)(Figure 11).

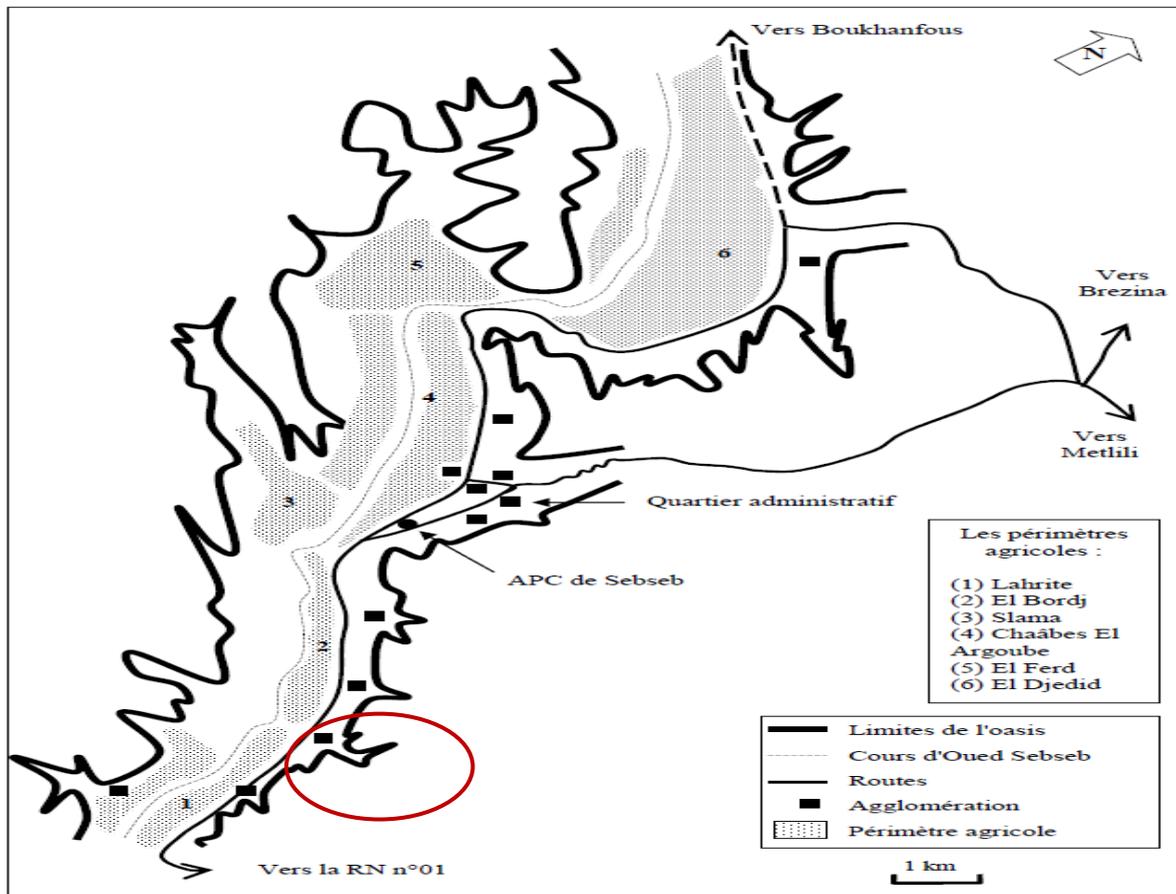


Figure 11 : Carte de l'oasis de Sebseb, Wilaya de Ghardaïa (HOUICHITI, 2009).

II.2.2.1.2.-Présentation et description de la plante

Peganum harmala L. est une plante herbacée glabre et pluriannuelle qui peut atteindre 70 cm d'hauteur. Elle est caractérisée par des tiges très rameuses et des feuilles divisées en étroite lanière (photo2) Cette espèce a plusieurs noms vernaculaires. Comme 'Harmel' ou 'Harmal El sahari' en Algérie et en Afrique du Nord, 'Rue sauvage' en France, 'African rue' ou 'Syrian rue' en Etats Unis et 'Espand' en Iran 'Harmel'.

L'Harmel est une plante vivace à tige ascendante. Ses feuilles alternes, sessiles, disséquées irrégulièrement en lanière étroitement linéaire aiguës. Ses grandes fleurs sont blanches avec 5 sépales linéaires, 5 pétales ovales ou elliptiques et fleurissent de février à juin. Le fruit capsulaire déprimé mesuré de 6 à 7 mm de longueur. Il contient des petites

graines anguleuses, grisâtres. L'odeur de cette plante est forte et désagréables, sa saveur amère (BOUZIANE, 2012).



Photo 2: Différentes parties de l'espèce *Peganum harmala* L
(IMAMI et TOUIRAT, 2016).

II.2.2.1.3.- Classification botanique

Règne :	Plante
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dieotylédones
Sous classe :	Malvides
Ordre :	Sapindales
Famille :	Nitrariacées
Genre :	<i>Peganum</i>
Espèce :	<i>Peganum harmala</i> L(OZANDA, 1991);(BOUZERIDA <i>et al.</i> , 2016)

II.2.2.1.4.-Répartition géographique (habitat)

Espèce cosmopolite très commune sur les sols sableux et un peu nitrés, Elle pousse en Europe australe et austro-orientale, Asie mineure, Tibet, Iran, Turkestan, Syrie, Arabie, Egypte et en Afrique du Nord. En Algérie, *P. harmala* L. est commune aux hauts plateaux, au

Sahara septentrional et méridional, et aux montagnes du Sahara central. Il est réputé pour les terrains sableux, dans les lits d'oued et à l'intérieur des agglomérations (BOUZIANE, 2012).

II.2.2 .1.5.-Composition chimique de *Peganum harmala*

Peganum harmala contient des acides aminés (valine, proline, thréonine, histidine, acide glutamique, l'aniline, N-phénylformamide, et N-acétylaniline phénylalanine), des carbohydrates, des flavonoïdes, des coumarines, des bases volatiles, des tanins, des stérols, et des triterpènes (TAHROUCH *et al.*, 1998).

Une recherche sur les qualités organoleptiques de l'huile des graines de *Peganum harmala* a montré qu'elle était comestible, Cette huile, composée majoritairement d'acide oléique, linoléique et palmitique constitue 10 à 12% des graines. Par ailleurs, la recherche sur les substances volatiles et les pigments reste très limitée (TAHROUCH *et al.*, 1998). Cette plante est réputée pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes particulièrement dans les graines et racines [2–7%] (FRISON *et al.*, 2008) par rapport aux tiges [0,36 %] et feuilles [0,52 %]. Ces alcaloïdes sont de type b-carbolines [Harmaline ou harmidine ($C_{13} H_{14} N_{20}$), Harmine ou banistéline ($C_{13} H_{12} N_{20}$), Harmalol ($C_{12} H_{12} N_{20}$), et Harmane ($C_{12} H_{10} N_2$), et des dérivés quinazolines [vasicine $C_{13}H_{15}ON_2$ (peganine) et vasicinone $C_{11}H_{10}O_2N_2$] (MAHMOUDIAN *etal.*, 2002).

Leur teneur s'élève brusquement en été, durant la phase de mûrissement du fruit, au moment de la récolte de la graine. L'harmaline est un méthoxy-harmalol et une dihydroharmine, elle constitue les 2/3 des alcaloïdes totaux de la graine (TAHROUCH *etal.*, 2002).

II.2.2.1.6.-Toxicité de *P. harmala*

Toutes les parties de la plante sont toxiques. L'injection intraveineuse d'harmine et d'harmaline (9 mg / kg) dans des effets toxiques tels que l'accélération de la respiration et le pouls et les spasmes musculaires cloniques MAHMOUDIAN *et al.*, (2002).

II.2.2.1.7.-Intérêt socioéconomique

Parmi les différentes espèces du genre *Peganum*, l'harmal est utilisé par les populations locales en fumigation pour dissiper les troubles et traite les convulsions des enfants; en décoction et pommade pour le traitement des fièvres et en frictions pour soigner

les rhumatismes. *P.harmala* présente des propriétés anthelminthique, antipaludique, antispasmodique, enivrante et sudorifique (BOUZIANE, 2012). Ainsi la plante *Peganum harmala* est très utilisée en médecine traditionnelle algérienne et maghrébine pour traiter différents troubles Gynécologiques (emménagogue, abortif, stérilité féminine), Généraux (hypnotique, antipyrétique, antalgique, et antitussif), digestifs (coliques, troubles digestifs), Cutanés (antiseptique, cicatrisant, contre les dermatoses (eczémas), brûlures, conjonctivites purulentes, blépharites, et alopécie), Infectieux (tétanos néonatal; anthelminthique (ascaris, ténia) et autres troubles sudorifiques, dépuratifs...etc(AITFELLA,2012).

Les graines de *Peganum harmala* ont fait l'objet de nombreux travaux mettant en évidence des activités variées; La majorité d'entre elles sont concernées surtout des effets: Anti-nociceptive Hypoglycémiant, Antifongique, Antibactérienne, Antiparasitaire, Cytotoxique, Antioxydante, Vaso-relaxante (CHOPRA *et al.*, 1960).Les extraits de cette plante sont utilisés pour le traitement du diabète et l'hypertension artérielle (AITFELLA ,2012). Ils possèdent une activité anti inflammatoire, antioxydant, hypothermique, analgésique, anti tumorale, vasodilatatrice, antispasmodiques, abortive, antidépressive, et surtout des effets hallucinogènes (FAROUK *et al.*, 2008).

Les alcaloïdes sont connus pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, et antivirales (MAHMOUDIAN *et al.*,2002).Ils possèdent également une activité anti-protozoaire notamment contre la leishmaniose, la theileriose méditerranéenne et tropicale, le paludisme, ainsi qu'un pouvoir insecticide sur *Schistocerca Gregaria* et nématocide contre *Meloidogynessp.*, nématodes à galles (AITFELLA ,2012 ; KEMASSI, 2008)

II.2.2.2.- Choix de l'insecte

L'insecte utilisé au cours de l'expérimentation se compose des adultes femelles et mâles de la *Drosophila melanogaster* issus d'un élevage de masse réalisé au laboratoire pédagogique de l'université de Ghardaïa (Algérie).Les souches étudiées sont obtenues après un piégeage des individus à l'intérieur des boîtes remplies de vinaigre et de pommes pourries dans une palmeraie dans la région de Ghardaïa.

II.2.2.2.1.- Choix des stades de la *Drosophila melanogaster*

Le choix des individus adultes se justifie, car c'est le stade où l'insecte est le plus à craindre à cause de l'amplitude de ses déplacements et pour des raisons de commodité au laboratoire, les adultes sont d'usage facile et pratique (OULD EL HADJ *et al.*, 2006).

Drosophila melanogaster (Meigen, 1830) est un organisme modèle pour l'étude de nombreux mécanismes développementaux et cellulaires; son cycle de reproduction court, la drosophile est néanmoins capable de comportements complexes, tels que la parade nuptiale, la synchronisation de ses cycles jour/nuit (rythmes circadiens), et bien évidemment la mémoire. Son système nerveux est composé de cellules gliales et de neurones dont le fonctionnement est très proche de celui des mammifères. Par ailleurs, une grande majorité des neurotransmetteurs, impliqués dans la communication entre les neurones sont identiques et près de 50% des gènes humains comptent un candidat orthologue chez la drosophile (JULIEN, 2009).

II.2.2.2.2.-Cycle de vie de la drosophile

D. melanogaster (Meigen, 1830), est un insecte diptère holométabole, son développement comprend un stade embryonnaire, trois stades larvaires, un stade pupal avant éclosion de la mouche adulte. Ainsi, après la fertilisation de l'ovocyte (AF), l'embryon, d'une taille de 500 µm, va se développer pendant 20 à 22 heures avant d'éclore et donner une larve de premier stade. La larve va se nourrir et grandir continuellement. Elle subira deux mues successives pour donner le deuxième (2 jours AF) puis le troisième stade larvaire (4 jours AF). Enfin, à 6 jours AF la larve s'immobilise et forme une prépupe. Ce stade prépupal dure environ 12 heures pendant lesquels de nombreux organes larvaires sont hystolysés avant le stade pupal qui se poursuit alors pendant 6 jours et est caractérisé par la formation des organes adultes de la drosophile qui va éclore 10 jours AF. Ces jeunes mouches seront fertiles 6 heures après leur éclosion. Les durées indiquées pour ce cycle sont valables pour un développement à 25°C mais à 18°C, la durée de chaque étape du cycle de vie est doublée (SCHAERLINGER, 2004)

Les femelles sont plus grandes que les mâles ainsi l'abdomen de la femelle est de forme pointue, avec des segments terminaux de couleur claire. L'abdomen du mâle est plus arrondi, avec des segments terminaux très foncés (Photo 4).

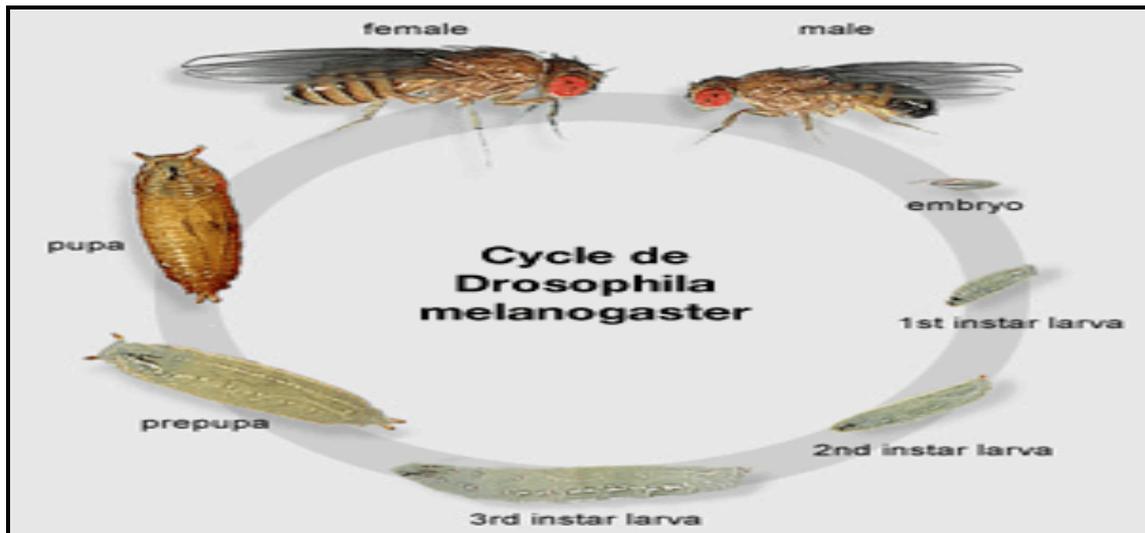


Photo 3: Cycle de vie de la drosophile (SCHAERLINGER, 2004).

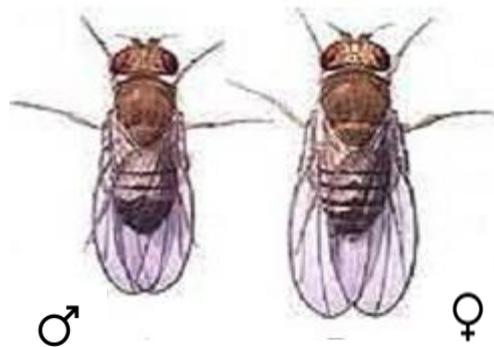


Photo 4: *D.melanogaster* (Meigen, 1830) adulte : femelle et mâle (BOUHOUHOU et CHORFI, 2016)

II.2.2.2.3.-Position systématique

Règne :	Animalia
Embranchement :	Arthropodes
Classe :	Insecta
Ordre :	Diptera
Sous-ordre:	Brachycera
Famille :	Drosophilidae
Sous-famille :	Drosophilinae
Genre :	<i>Drosophila</i>
Espèce :	<i>Melanogaster</i> (BOUHOUHOU et CHORFI, 2016)

II.2.2.2.4.-Elevage

La drosophile s'élève facilement en laboratoire sur un milieu artificiel; l'élevage des drosophiles en laboratoire est réalisé à une température de 25°C et une hygrométrie comprise entre 60% et 70%. Le milieu nutritif artificiel préparé au niveau de notre laboratoire est un milieu gélosé à base de farine de maïs (33,3g), de l'Agar-agar(4,8 g), de la levure de bière(33,3g), de vinaigre rouge (5ml) et d'eau distillée (623ml),le mélange est porté à ébullition pendant 1h, en agitant sans arrêt pour ne pas accrocher au fond de bicher , après un refroidissement avant de déposer les souches de la drosophile. Les drosophiles sont élevées dans des flacons en plastiques et bouchés par un tissu très fin (photo5).



Photo5: Elevage de la *Drosophila melanogaster* au laboratoire

II.3.- Préparation des extraits végétaux

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de feuilles de *Peganum harmala* L. Nous avons coupé les plantes à 5 cm du sol à l'aide d'un ciseau à arbre. La plante recueillie présente un feuillage très dense et porte des fruits verts de différentes tailles. Nous avons remarqué que les espèces associées avec *P. harmala* sont très rares, si elles existent, elles sont de petites tailles. Les échantillons ont été rincés et étalés dans une chambre aérée sur du papier pendant 45 à 60 jours. Lorsque les feuilles sont complètement séchées, nous avons séparé les feuilles et les graines de *P.harmala* L. Nous avons éliminé aussi les feuilles qui portent des signes d'attaques par les ravageurs ou les microorganismes. Nous avons initialement coupé les tiges, feuilles et les graines de *P. harmala* en petits morceaux afin de faciliter leur broyage. Le broyage a été réalisé avec un broyeur puis le broyat obtenu

est conservé dans des flacons hermétiques jusqu'à l'utilisation, chaque flacon porte le nom, la date et le lieu de récolte. Le broyat constitue le matériel végétal final que nous avons utilisé pour la préparation des extraits aqueux.

II.3.1.-Extraction par reflux

II.3.1.1.-Principe de l'extraction

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).

II.3.1.2.-Mode opératoire

Les extraits aqueux sont obtenus par solubilisation des fractions actives dans de l'eau distillée et de méthanol. 100 grammes de la poudre végétale est misent dans un ballon de 1000 ml de capacité, sur monté d'un réfrigérant, avec un mélange hydro alcoolique (Méthanol / eau ; 500 / 250 ; 2 V / V). Le mélange est porté à ébullition à 50°C pendant 6heures (photo 6) Les vapeurs hétérogènes sont condensées en contact de la paroi refroidi (une surface froide) tout les composés sont refluant dans le ballon (BONYS, 2013).

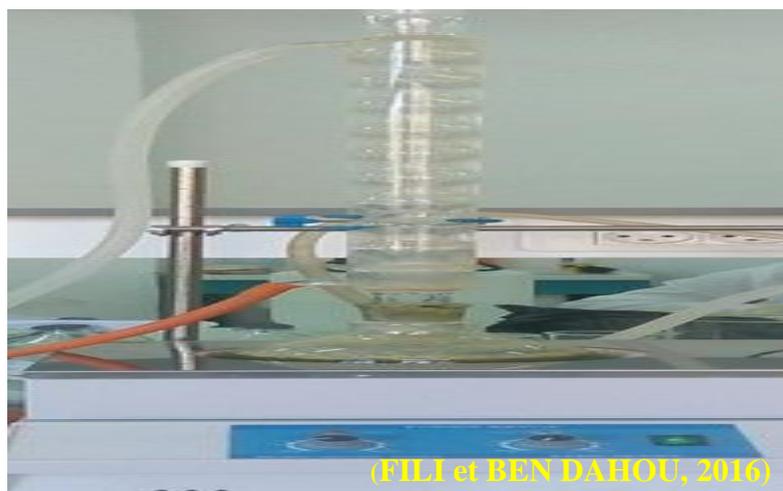


Photo6 : Montage d'extraction à reflux

L'homogénat est refroidi et filtré à l'aide d'un papier filtre. Pour éliminer le méthanol, le filtrat est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température de 55°C pendant 2 à 3 heures (**photo 7**). Le produit obtenu, est un extrait aqueux qui servira par la suite aux tests biologiques.



Photo 7: Montage de rota vapeur pour l'élimination du solvant.

Les solutions (les extraits aqueux des feuilles) sont conservées dans des bouteilles bien fermées et étiquetées, nous avons noté sur chaque bouteille le nom de l'espèce et la date de préparation.

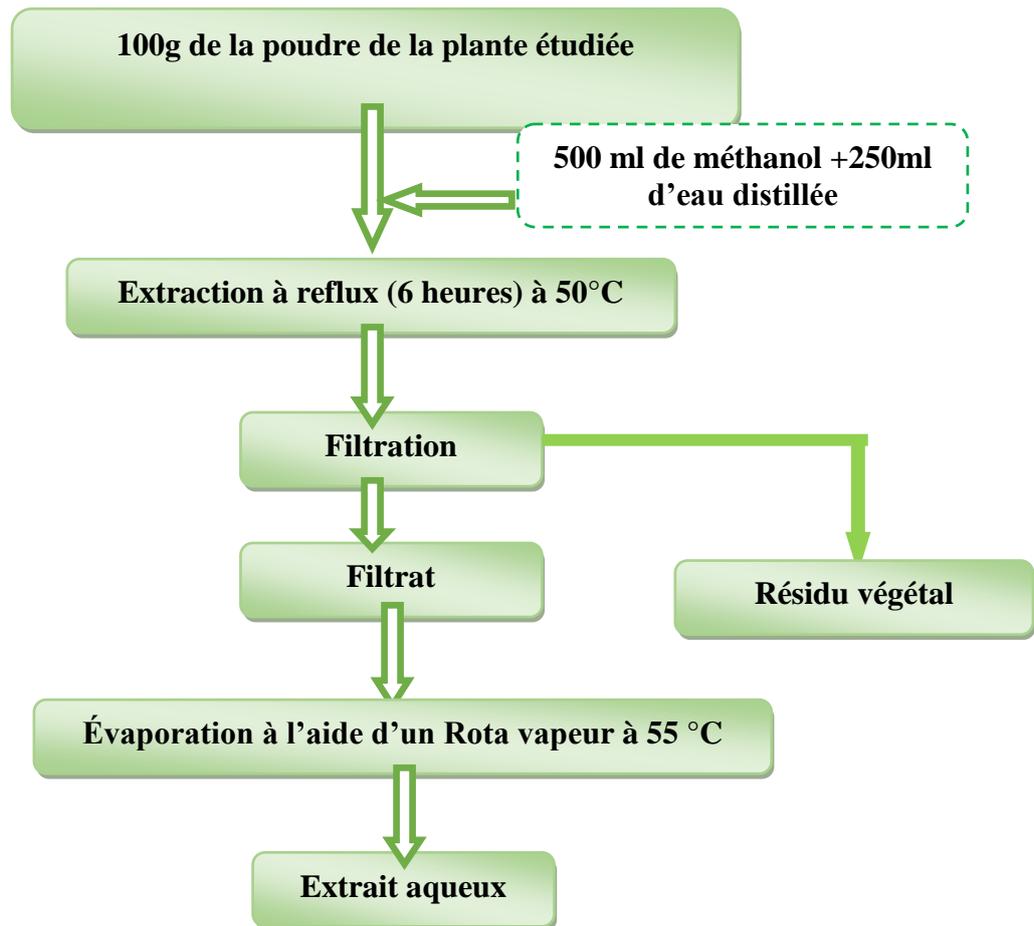


Figure 12 :Protocole utilisé pour l'extraction du principe actif à partir des parties aériennes de la plante *Peganum Harmala* L.(Originale)

II.4.- Etude de la toxicité

Chez un organisme vivant, généralement l'exposition à une substance toxique peut produire des effets biochimiques, histologiques ou morphologiques, se traduisant par des altérations spécifiques d'un organe, d'un système ou d'une fonction (fonctions de reproduction par exemple), ou d'un processus biochimique ou biologique (la mue, la digestion, etc.). Ces effets varient selon l'intensité, la voie, la fréquence et la durée de l'exposition mais aussi en fonction de l'espèce, du sexe, de l'âge et du stade de développement de l'espèce. Ils peuvent être réversibles ou irréversibles, immédiats ou différés (KEMASSI, 2014).L'étude de la toxicité permet d'évaluer l'effet toxique d'un extrait aqueux récupéré par une méthode d'extraction à reflux de la plante *P.harmala* sur la *D. Melanogaster* ; pour cela deux modes in vivo de traitement sont utilisés, l'un par contact et l'autre par ingestion, de même des mesures biochimiques in vitro sont réalisés à fin d'évaluer l'effet toxique des substances actives issues de la plante sur l'activité cholinestérasique, le

taux de protéines et l'activité spécifique. Au cours de l'expérimentation les individus témoins et les individus traités sont manipulés dans les mêmes conditions de température, humidité...

II.4.1.-Etude in vivo

Les extraits de *P.Harmala* sont pulvérisés directement sur les adultes de *D.Melanogaster*, afin d'étudier leurs actions par contact et inhalation. Pour évaluer l'action de l'extrait foliaire par ingestion, il est mélangé avec le milieu nutritif. L'étude est suivie jusqu'à la mort des individus.

II.4.1.1.-Toxicité par contact

Pour cette étude 108 individus sont utilisés, soit six lots contenant six individus adultes de la *Drosophila melanogaster*, dont un lot témoin qui ne reçoit que 500 µl d'eau distillée et cinq lots des individus traités par 500 µl d'extrait aqueux de *Peganum harmala*, soit pur 100% ou dilué à 80%, 60%, 40% et 20%. Pour cette expérimentation trois répétitions sont préparées (figure 13).

Le fond de chaque lot est tapissé d'un papier filtre pour absorber le liquide en excès, à fin d'éviter la noyade des individus.

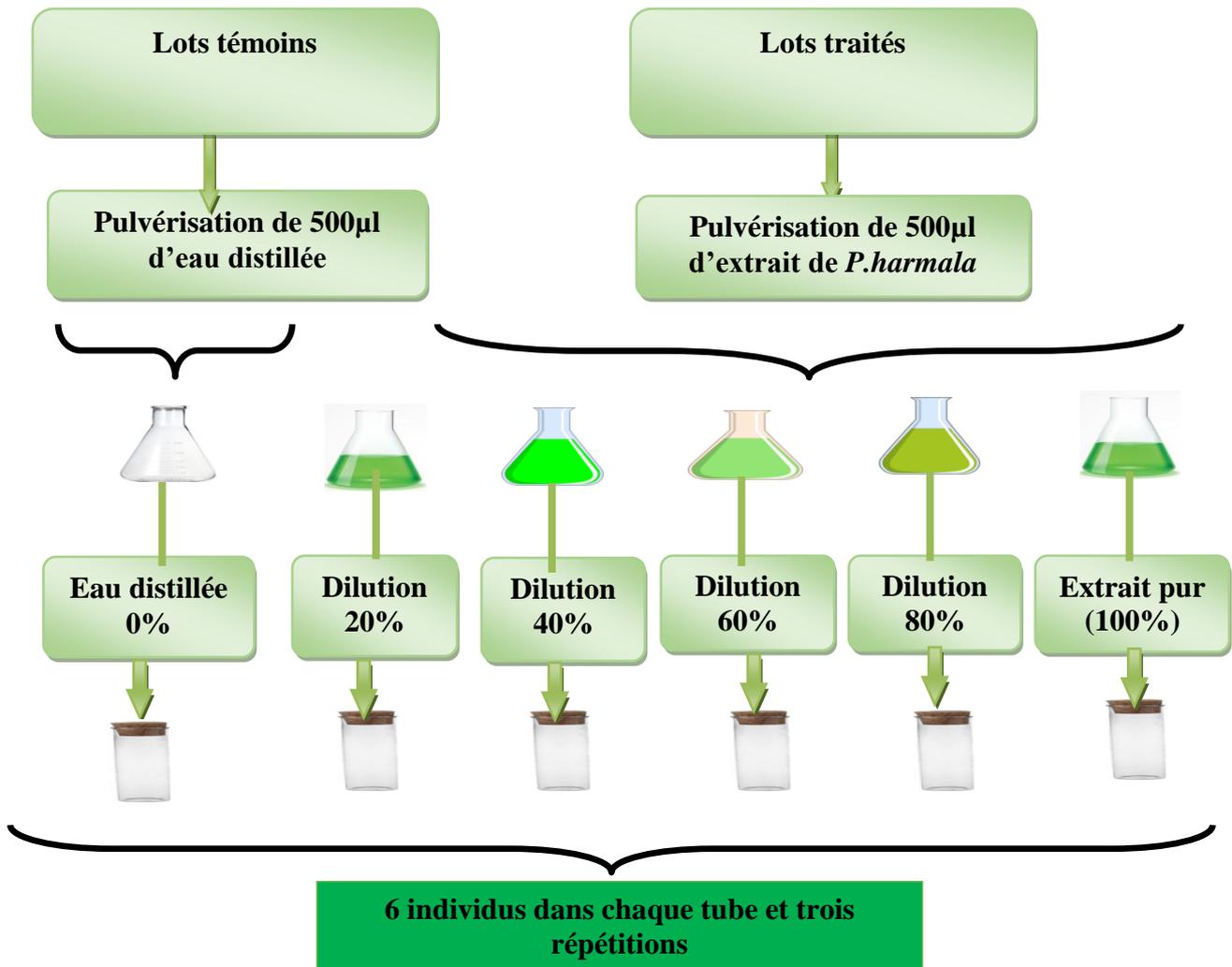


Figure 13: Protocole d'étude de la toxicité par contact (Originale).

II.4.1.2.- Toxicité par ingestion

L'étude de la toxicité par ingestion a nécessité 108 individus, soit six lots contenant six individus adultes de la *Drosophila melanogaster*, dont un lot témoin qui ne reçoit que 500 µl d'eau distillée et cinq lots d'individus traités par 500 µl d'extrait aqueux de *Peganum harmala*, soit pur 100% ou dilué à 80%, 60%, 40% et 20%. Pour cette expérimentation trois répétitions sont préparées, l'extrait de plante pour les individus traités et l'eau distillée pour les individus témoins sont mélangés avec 1g de milieu nutritif.

II.4.2.-Etude in vitro

Pour l'étude in vitro chaque individu de la *Drosophila melanogaster* est soumis à une extraction, à fin d'obtenir un surnageant contenant les biomolécules à étudier, le surnageant préparé à partir du lot témoin est mélangé avec 500µl d'eau distillée puis incubé pendant 1heure, mais le surnageant des lots traités est incubé avec 500µl de l'extrait aqueux de *P.harmala*, soit pur à 100% ou dilué à 80%, 60%, 40% et 20% respectivement, chaque lot contient six individus, soit un ensemble de 36 individus pour cette expérimentation (Figure 14)

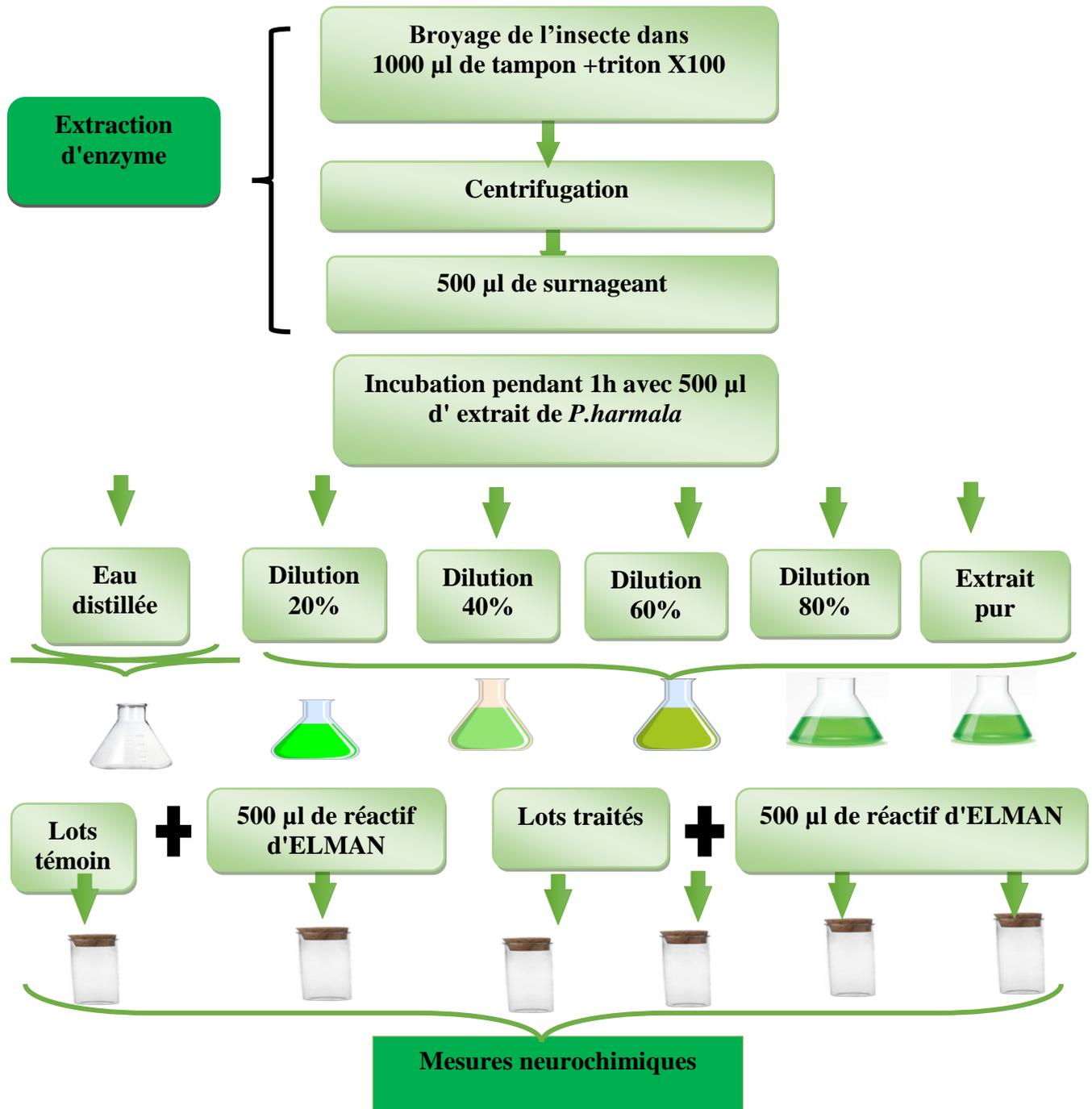


Figure 14: Protocole d'étude de la toxicité in vitro (Originale)

II.4.2.1.-Préparation de l'homogénat

L'extraction est réalisée selon la méthode décrite par Liu *et al.*, (2007). Les étapes doivent être réalisées à froid afin d'éviter l'altération l'hydrolyse de l'enzyme au cours de l'extraction. Pour la préparation de l'AChE, les individus sont broyés et homogénéisé manuellement dans du tampon phosphate 0,1 M (PH 7,5, contenant 0,1% [v / v] de Triton X-100). Tous les procédures ont été effectuées sur de la glace. Homogénat a été centrifugés à 10

000 g pendant 20 min à 4 ° C en utilisant une centrifugeuse. Les surnageant ont ensuite été utilisés pour déterminer l'activité totale et l'activité spécifique de l'enzyme AChE et pour déterminer la teneur en protéine.

II.4.2.2.-Dosage de protéines

II.4.2.2.1-Principe de dosage

Le taux de protéine est déterminé selon la méthode de Bradford (1976), une méthode qui implique l'agglutination de Commassie G-250 Bleu brillant à la protéine. L'agglutination de la teinture à protéine cause un changement dans le maximum de l'absorption de la teinture de 465 à 595 nm, et c'est l'augmentation dans absorption à 595 nm qui sont dirigés. Cet essai est très reproductible et rapide avec la teinture processus obligatoire pratiquement complet dans approximativement 2 min avec bonne stabilité de la couleur pour 1 hr.

La lecture de la coloration est faite à 595 nm pour le maximum de sensibilité, l'intensité de couleur développée, mesurée spectrometriquement, est proportionnelle à la concentration en protéines. La teneur en protéines est exprimée en µg /ml est obtenue grâce à une courbe d'étalonnage réalisée (annexII), en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) dans les mêmes conditions expérimentales.

II.4.2.2.2-Mode opératoire

200 µl de l'échantillon à doser (contenant au maximum 50 µg de protéines) est ajouter à 500µlde réactif au bleu de Commassie (Annexe-III), la lecture des absorbances est réalisée à la longueur d'onde 595 nm après 2mn. Le taux de protéines est déterminé à l'aide d'une gamme étalon (0à100µg de protéines) avec le sérum albumine bovin (BSA) (Annexe-VI)

II.4.2.3.-Mesure de l'activité de cholinestérase

II. 4.2.3.1.-Principe de la méthode

La mesure de l'activité enzymatique de cholinestérase repose sur la méthode d'ELLMAN *et al.* (1961) par spectrophotomètre, le substrat de l'enzyme dont on veut mesurer l'activité est constitué de l'acétylcholine, et d'un DTNB, dans une réaction d'oxydoréduction consécutive à la réduction enzymatique de l'acétylcholine en thiocholine et acétate .le groupement thiol de la thiocholine réduit le chromogène DNTB en TNB (acide 5-thio(2-nitrobenzoïque),composé jaune qui possède une absorbance maximale entre 412-415

nm. L'augmentation de la coloration dans le temps indique la formation de thiocholine qui est le reflet de l'activité de l'enzyme.

Selon la méthode d'ELLMAN l'activité cholinestérasique moyenne des témoins sont considérée comme un taux de base car le niveau d'activité est considéré comme 100%.(GHENABZIA, 2009).

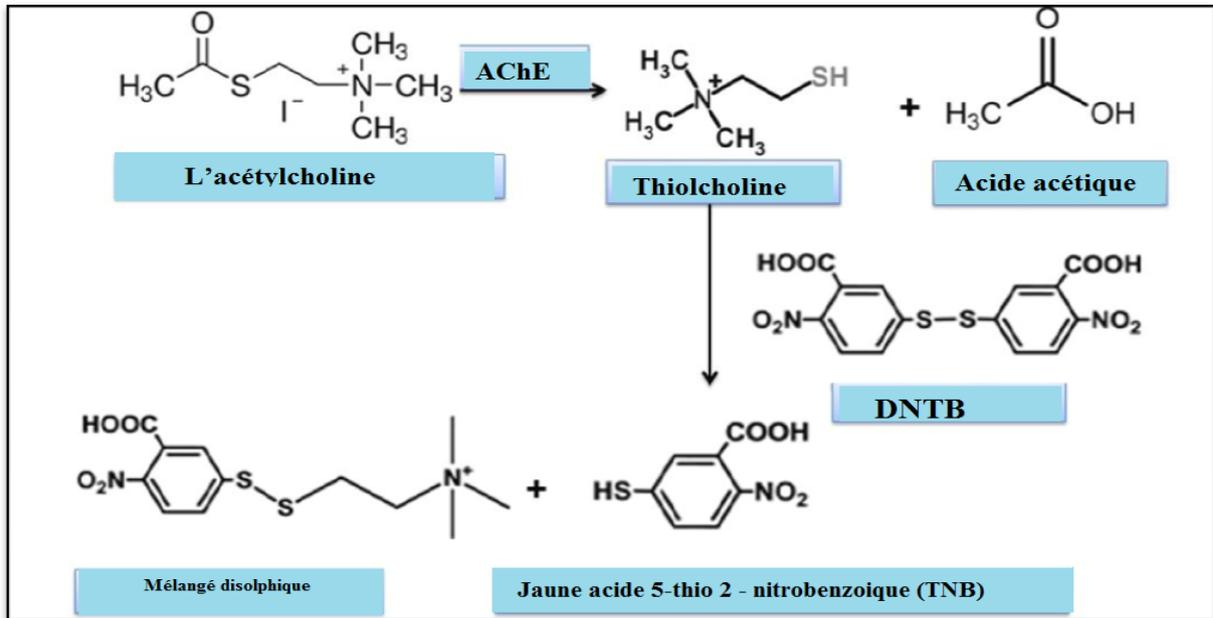


Figure 15: Réaction d'Ellman (ELLMAN *et al.* 1961)..

II.4.2.3.2.-Mode opératoire

Le mélange réactionnel est réalisé directement dans la cuve de dosage. l'activité est évaluée contre un blanc à 25°C, dans un tampon phosphate de sodium (0.1 mol⁻¹, p H 7.4) en présence d'un volume de substrat et de DNTB (500µl) et d'un volume d'échantillon (500µl).l'absorbance est mesurée à 412 nm pendant 10 mn avec un intervalle de **60 S** entre chaque mesure sur un spectrophotomètre. L'activité enzymatique se calcule par la formule suivante

$$A = \frac{\Delta DO.V}{(t_2 - t_1).\epsilon.d.x}$$

ΔDO : variation de la densité optique à 412 nm

t_1 : temps initial de lecture

t_2 : temps final de lecture après un intervalle de 60 s

ϵ : Coefficient d'extinction spécifique de l'acide dithiobis-nitrobenzoïque à 412 nm pour une réponse en nanomoles transformés, estimé à $13,6.10^3 \text{ mol}^{-1} .\text{cm}^{-1}$.

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 nanomoles .min⁻¹.ml⁻¹.

L'activité enzymatique spécifique qui désigne l'activité cholinestérasique par rapport à la quantité de protéines dans le milieu se calcule suivant l'équation :

$$As = A / P$$

As: Activité enzymatique spécifique en nanomoles .min⁻¹.μg de protéine.

A: Activité enzymatique en nanomoles .min⁻¹.ml⁻¹.

P : concentration en protéine (μg/ml).

II. 5. Méthode exploitation des résultats

II. 5.1.- Taux de mortalité

La mortalité est le premier critère de jugement de l'efficacité d'un traitement chimique ou biologique. Le pourcentage de la mortalité observée chez les adultes témoins et traités par l'extrait végétal, est estimé en appliquant la formule suivante:

$$\text{Mortalité observée} = [\text{Nombre de morts} / \text{Nombre total des individus}] \times 100$$

(OULD EL HADJ *et al.* , 2006).

II. 5.2.- Temps de mortalité (TL₅₀)

Le temps létal 50 (TL₅₀), correspond au temps nécessaire pour que 50% des individus d'une population morte suite à un traitement par une substance quelconque. Il est calculé à partir de la droite de régression des probits correspondants au pourcentage de la mortalité corrigée en fonction des logarithmes du temps de traitement. Il y est utilisé, la formule de SCHNEIDER et la table des probits (KEMASSI, 2014)

Formule de SCHNEIDER: $MC = [M2 - M1 / 100 - M1] \times 100$

- MC :% de mortalité corrigée;

- M2 : % de mortalité dans la population traitée;

-M1: % de mortalité dans la population témoin.

II. 5.3.- Dose l'étale (DL₅₀)

Les lettres DL₅₀ désignent la « Dose létale », la DL₅₀ est la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50% (la moitié) d'un groupe traité.

La CE50 est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière. Pour la présente étude, la méthode des probits est suivie (KEMASSI, 2014)



Chapitre III

Résultats et discussion

III.- Résultats et discussion

Le présent travail vise à étudier l'effet insecticide des extraits aqueux obtenus par une extraction à reflux des feuilles de *P. harmala*. Les paramètres mesurés sont la mortalité, la dose létale 50 (DL₅₀) et les temps létaux 50 (TL₅₀) de l'extrait. Le travail réalisé porte aussi l'étude de l'activité de cholinestérase, l'activité spécifique et le taux de protéines.

III.1.-Etude de la toxicité par contact d'extrait aqueux de *P.harmala*

III.1.1.-Effet de l'extrait aqueux sur la mortalité

Le taux de la mortalité cumulée observée de *D. Melanogaster* témoins et traités par les extraits de *P. harmala*, est présenté dans le tableau 2. Il apparait une variation de taux de mortalité entre les lots traités par différentes concentrations testées soit 100% ,80%, 60%,40% 20%, par rapport aux témoins.

Tableau 1- Taux de mortalité cumulée observé chez les adultes de *D.melanogaster* témoin et traitées par l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala*.

Temps (heurs)	Lots expérimentaux					
	Témoins	<i>D.melanogaster</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux de <i>P. harmala</i>				
		Doses				
		20%	40%	60%	80%	100%
1	0	0	0	0	0	16.66
2	0	0	0	0	0	16.66
3	0	0	0	16,66	0	33.33
4	0	0	0	16,66	0	44.44
5	0	0	16.66	33,33	16,66	50
6	0	0	44.44	55.55	16,66	100
7	0	0	44.44	55.55	33.33	100
8	0	0	50	66.66	33.33	100
9	0	44.44	50	72.22	50	100
10	0	66.66	50	72.22	72.22	100
11	0	77.77	66.66	83.33	94.44	100
12	0	100	83.33	100	100	100
13	0	100	100	100	100	100

Ainsi en vue des résultats, il est noté que les valeurs rapportées pour le lot témoin sont plus faible que celles notées pour les lots traités. Aucune mortalité n'est notée au niveau du lot témoin avant six heures. L'extrait aqueux de *P.harmala* engendre une mortalité totale (100%) chez les adultes *D.melanogaster*, pour les lots traités par l'extrait aqueux pur des feuilles de *P.harmala*. Les autres lots traités, montrent un pourcentage de mortalité qui augmente en fonction de la concentration en extrait appliqué, un pourcentage de mortalité de 55,55 %, 44,44% et 16,16% respectivement est noté au niveau du lot traité par l'extrait des feuilles à 80%, 60% et 40% de concentration et aucune mortalité n'est notée au niveau du lot traité par l'extrait des feuilles à 20% de concentration avant six heures.

De même les résultats relatifs à la cinétique de mortalité selon différentes doses dans le temps révèlent un taux de mortalité maximale 100% chez les individus adultes de *D.melanogaster* traités par les extraits aqueux non dilués (100%) (figure16).

En effet les taux de mortalité des adultes augmentent chaque heure pour atteindre un taux 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 6 heures.

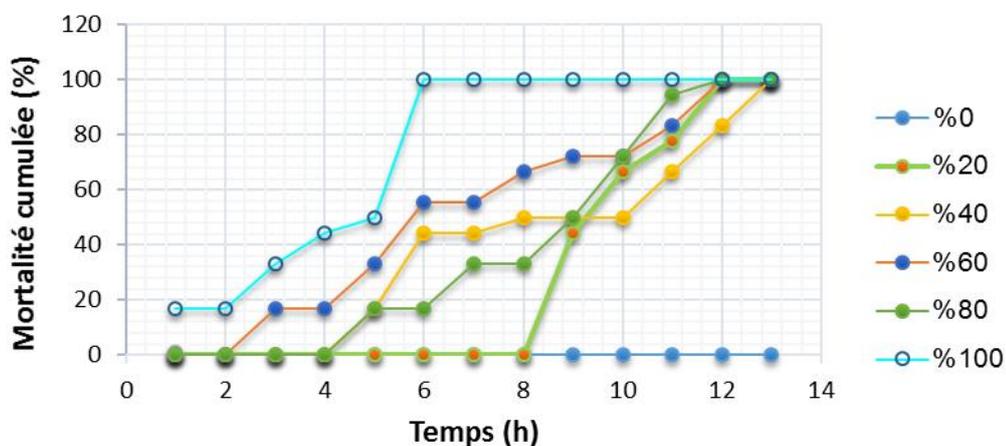


Figure 16 : Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les adultes de *D.melanogaster* témoin et traités par l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala*.

III.1.2.-Dose létale (DL50) d'extrait foliaire de *P. harmala* sur les adultes de *D.melanogaster*

Pour estimer la dose létale 50 (D50) à partir duquel on obtient 50% de la mortalité, il a été procédé à la transformation des pourcentages des mortalités corrigées en probits, et à la transformation en logarithme décimale des doses appliquées (tableau 2): Ces transformations nous

permettent d'établir des équations des droites de régression des probits en fonction de log de la dose (tableau 3, figure 17) (CAVELIER, 1976).

Tableau 2- Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué

Doses			Mortalité corrigée	
Pourcentage (%)	Concentration (mg/ml)	Log [$C_{mg/ml}$]	Pourcentage (%)	Probits
100	0,053	-1,2757	100	7,614
80	0,042	-1,3768	55.55	5.13826
60	0,031	-1,5086	44.44	4.84926
40	0,021	-1,6778	16.16	4.0264
20	0,01	-2	0	-

Tableau 3- Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de *P.harmala*

Organe	Equation de régressions	Coefficients de régressions	Dose létale 50
			[mg /ml] DL ₅₀ %
Feuilles	$y = 7.8529x + 16.87$	$R^2 = 0,781$	0,030

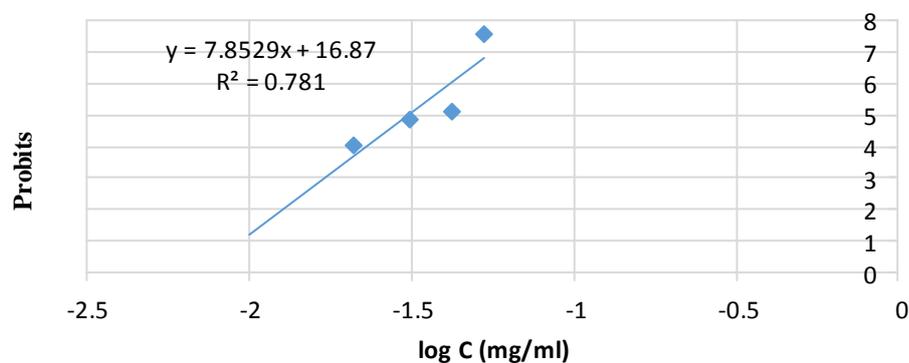


Figure 17 : Relation entre la mortalité corrigée de *D.melanogaster* et la dose de l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala*.

Les tests de l'effet des extraits de *P.harmala* ont été effectués sur les adultes de *D.melanogaster*, afin d'estimer les doses entraînant une mortalité de 50% d'individus selon le

modèle des Probits. Au vu des résultats, il ressort que les concentrations qui cause la mortalité de 50% des adultes par l'extrait aqueux des feuilles sont de l'ordre $DL_{50} = 0,030$ mg/ml.

III.1.3.-Temps léthal 50 (TL₅₀) d'extrait foliaire de *P. harmala* sur les adultes de *D.melanogaster*

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 s'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 4, ainsi les droites de régressions correspondants sont illustrés dans le tableau 5.

Tableau 4- Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez *D.melanogaster* traitées par l'extrait aqueux *P .harmala* à différentes concentration.

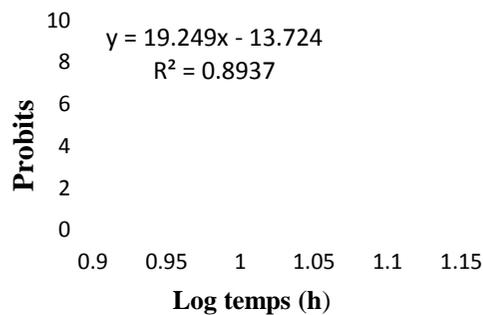
Probits de pourcentages de la mortalité corrigée chez les <i>D.melanogaster</i> traitées par l'extrait de <i>P .harmala</i> à différentes concentration						
Log de temps	Doses					
	100%	80%	60%	40%	20%	
1	0	4,0264	-	-	-	-
2	0,30	4,0264	-	-	-	-
3	0,47	4,5603	4,0264	-	-	-
4	0,60	4,8493	4,0264	-	-	-
5	0,69	5,0000	4,5603	4,0264	4,0264	-
6	0,77	7,6140	5,1383	4,8493	4,0264	-
7	0,84	7,6140	5,1383	4,84926	4,56028	-
8	0,90	7,6140	5,4262	5	4,56028	-
9	0,95	7,6140	5,5833	5	5	4,84926
10	1,00	7,6140	5,5833	5	5,5833	5,42628
11	1,04	7,6140	5,9544	5,42628	6,55586	5,75534
12	1,07	7,6140	7,6140	5,95440	7,6140	7,61400

13	1.11	7.6140	7.6140	7.61400	7.6140	7.61400
----	------	--------	--------	---------	--------	---------

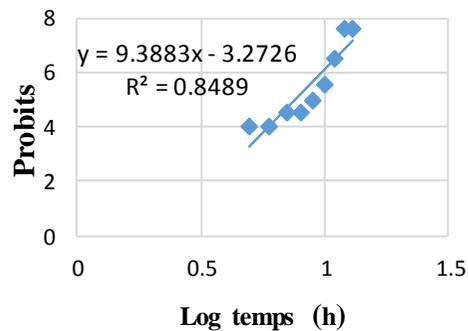
Tableau 5- Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL50 évaluées pour les cinq concentrations de l'extrait aqueux

Concentration (%)	Equation de régression	Coefficient de régression	Temps létal 50 (TL50) (en heure)
100	$y = 5.318x + 2.271$	$R^2 = 0.816$	2,67
80	$y = 5.286x + 0.952$	$R^2 = 0,804$	5,82
60	$y = 5.805x - 0.125$	$R^2 = 0.658$	7.64
40	$y = 9.388x - 3.272$	$R^2 = 0,848$	7.52
20	$y = 19,24x - 13,72$	$R^2 = 0,893$	8.80

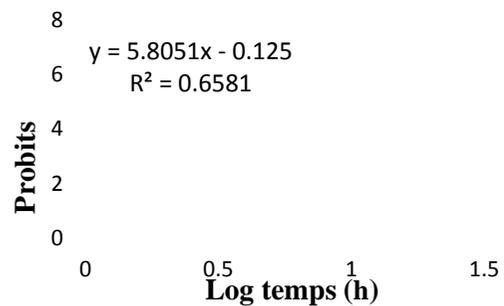
Au vu des valeurs de la TL50 de chaque concentration en extrait aqueux végétal de *Peganum harmala* présenté dans la figure 19 et la droite de régression des probits en fonction du logarithme des durées de traitement présenté dans la Figure 18, il apparaît que les extraits foliaires de *P.harmala* à 100% et 80 % présentent une valeur minimale de TL50 avec respectivement 2,67 et 5,83, donc semblent les plus toxiques que les autres concentrations. Cela signifie une rapidité d'action particulière vis-à-vis les adultes de *D.melanogaster*. Pour les autres concentrations le temps létale pour 50% des individus augmentent avec la diminution de la dose, il est de 7,64 pour la dose 60% , de 7,52 pour la dose 40%, cependant la valeur maximale de TL50 correspond à la dose la plus faible de l'extrait aqueux de 20% soit 8,80



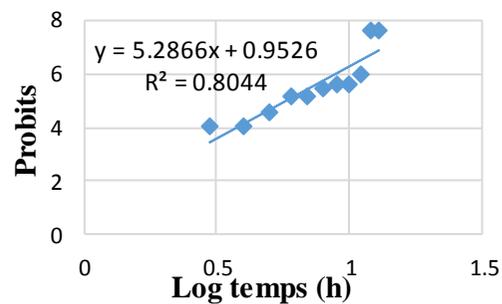
A-Action de l'extrait à la dose 20% dans le temps



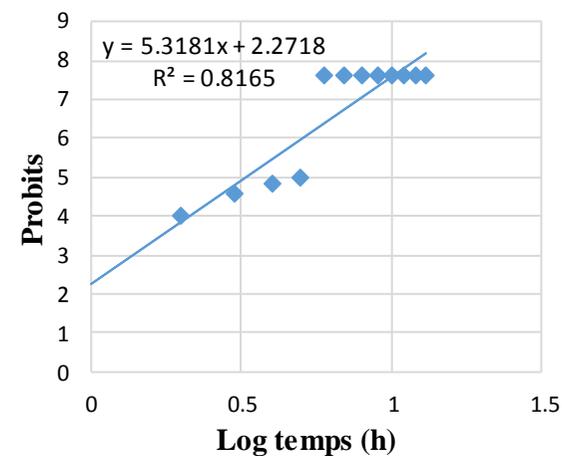
B-Action de l'extrait à la dose 40% dans le temps



C-Action de l'extrait à la dose 60% dans le temps



D-Action de l'extrait à la dose 80% dans le temps



E-Action de l'extrait à la dose 80% dans le temps

Figure 18 A, B, C, D, E Action de l'extrait des feuilles de *P.Harmala* sur les adultes de *D.melanogaster*

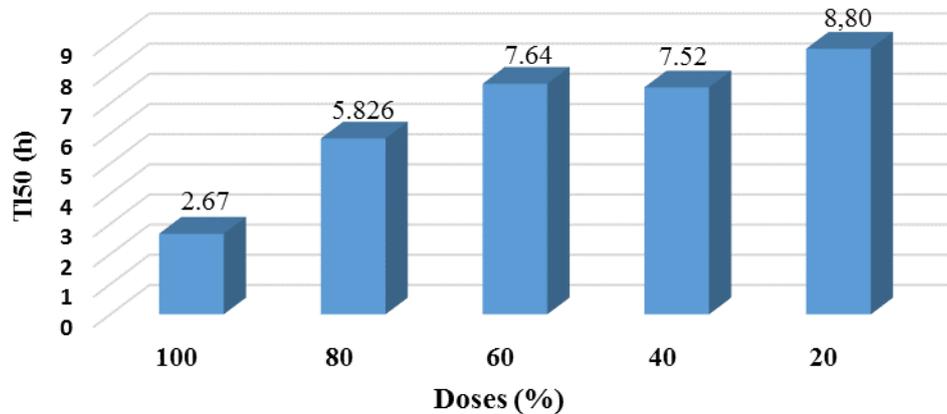


Figure 19 : Temps létale de 50% des individus (LT50) à différentes doses de l'extrait aqueux de *Peganum harmala*

III.1.4.- Discussion

D'après BOUNECHADA et ARAB (2011), la poudre de *P. harmala* a donné un bon résultat pour sa toxicité sur les individus de *Tribolium castaneum*, cette efficacité est confirmée par la mort des larves et des adultes de ce ravageur. La mort de la totalité des individus (100%) est attribuée à la dose 30% pour les deux stades de développement.

Les résultats enregistrés montrent que la mortalité est significative avec les différentes concentrations de traitement par rapport au témoin. Le pouvoir insecticide de cette plante serait dû à la présence des alcaloïdes indoliques de type β -carbolines (la harmine, harmaline et harmol), qui ont été identifiés dans les extraits alcooliques des feuilles de *Peganum harmala* par ABBASSI *et al.*, (2005) et dans les extraits huileux par Idrissi Hassani *et al.*, 2002. L'effet insecticide de *P.harmala* sur *Triboliumcastaneum* est confirmé par JBILOU *et al.*, (2006) qui ont utilisé des extraits méthanolique de cette plante. *P. harmala* est très réputé pour sa richesse exceptionnelle en alcaloïdes surtout au niveau des fruits et des racines (MAHMOUDIAN *et al.*, 2002). Il est à signaler que les graines mûres sont plus riches en alcaloïdes par rapport aux immatures (MAHMOUDIAN *et al.*, 2002). L'action dans le temps d'une substance vis-à-vis d'un organisme vivant, varie en fonction de la dose, la fréquence et le mode d'application, l'espèce test et son stade de développement (SANCHEZ-BAYO, 2009).

III.2.-Etude de la toxicité par ingestion d'extrait aqueux de *P.harmala*

III.2.1.- Action sur la mortalité

Le taux de la mortalité cumulée observée chez *D.melanogaster* témoins et traités par les extraits de *P.harmala* sont présentés dans le tableau 6. Il apparaît une variation de taux de mortalité entre les lots traités par différentes concentrations testées soit 100%, 80%, 60%, 40% et 20%, par rapport aux témoins.

Tableau 6- Taux de mortalité cumulée observé chez les adultes de *D.melanogaster* témoin et traités par l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala*.

Temps (heures)	Lots expérimentaux					
	<i>D.melanogaster</i> témoins et traités par l'extrait aqueux de					
	<i>P.harmala</i>					
		Doses				
	Témoins	100%	80%	60%	40%	20%
6	0	16.16	16.16	16.16	16.16	16.16
12	0	27.6	27.6	27.6	21.88	21.88
24	16.16	33.16	44.44	27.6	27.6	27.6
36	21.88	33.33	50	38.88	44.44	44.44
48	38.89	66.66	66.66	49.99	50	50
60	38.89	88.88	77.77	72.22	66.66	61.1
72	55.55	94.44	94.44	72.22	88.88	83.33
84	77.77	100	100	94.44	88.88	83.33

Au vu des résultats de taux de la mortalité noté pour les adultes de *D.melanogaster* traités par l'extrait aqueux des feuilles, il est noté que le taux de la mortalité varie selon les concentrations. Les valeurs rapportées pour le lot témoin (77,77%) sont plus faibles que celles notées pour les lots traités. Ainsi il apparaît que le taux de la mortalité maximal 100% est rapporté pour les extraits 100% et 80% après 84 heures.

De même la cinétique de la mortalité cumulée présentée dans la figure 20 signale que les taux de mortalité des adultes augmentent chaque 6 heures pour atteindre un taux maximal (effet cumulatif, la mort se produit après l'accumulation d'une certaine quantité de l'extrait dans le corps des insectes). Ainsi il ressort que pour les autres lots de traitement, les pourcentages de mortalité augmentent en fonction de la concentration et de temps d'exposition, pour la concentration 60 % ; 40 % ; 20%, un taux de mortalité est atteint au bout de 84 heures 94.44% ; 88.88% ; 83.33% respectivement.

L'étude de la toxicité comparée entre la toxicité par contact d'extrait aqueux de *P.harmala* et par ingestion, a fait ressortir leur action sur la mortalité. Il est noté que les individus étudiés par ingestion possèdent un taux de mortalité (100%) dans un temps plus long arrive à 84 heures par rapport aux individus traités par contact qui enregistrent (100%) de mortalité au bout de 6 heures.

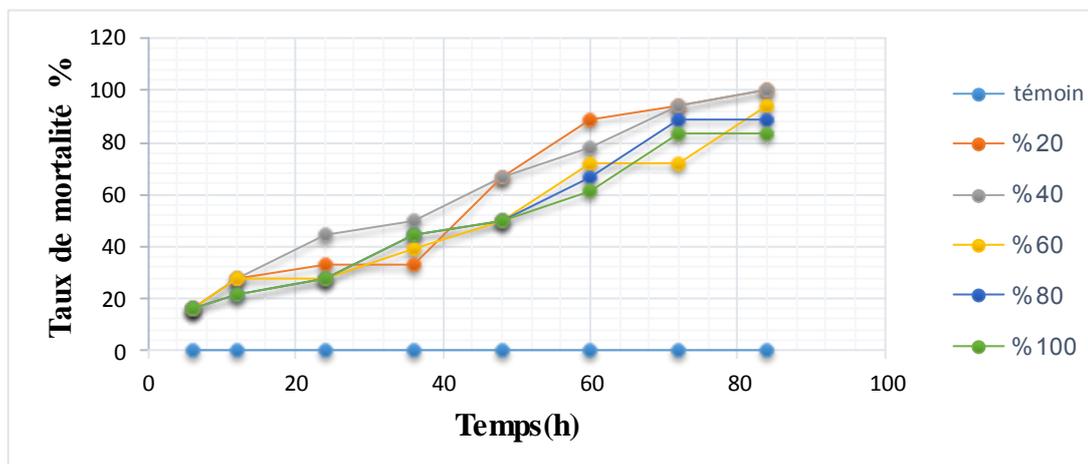


Figure 20 : Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les adultes de témoins et traités par de l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala* à différentes concentrations.

III.2.2.- Dose létale 50 (DL₅₀) d'extrait aqueux de *P. harmala* sur les individus adultes de *D.melanogaster*

Pour estimer la dose létale 50 (DL₅₀) à partir duquel on obtient 50% de la mortalité, il a été procédé à la transformation des pourcentages des mortalités corrigées en probits, et à la transformation en logarithme décimale des doses appliquées (tableau 7). Ces transformations nous permettent d'établir des équations des droites de régression de log de la dose en fonction des probits (tableau 8) (CAVELIER, 1976).

Tableau 7- Mortalités corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué

Doses			Mortalité corrigée	
Pourcentage %	Concentration [mg /ml]	Log [C _{mg/ml}]	Pourcentage %	Probits
100	0,053	-1,2757	100	7.614
80	0,042	-1,3768	94.44	7.614
60	0,031	-1,5086	94.44	6.55586
40	0,021	-1,6778	88.88	6.20152
20	0,01	-2	83.33	5.9544

Tableau 8- Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL50 pour l'extrait aqueux de *P.harmala*

Organe	Equation de régressions	Coefficients de régressions	Dose létale [mg /ml] DL50%
Feuilles	$Y=2.4988x + 10.706$	$R^2 = 0.8238$	0.005

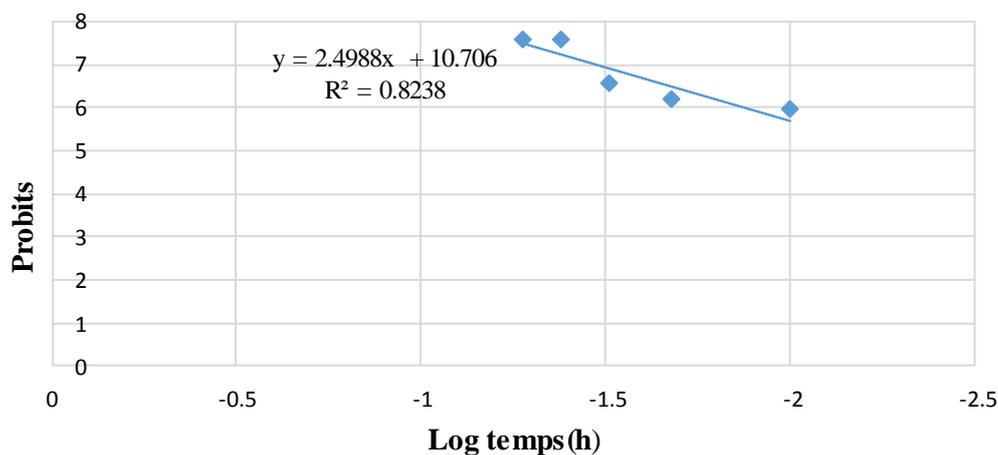


Figure 21: Relation entre la mortalité de la *D.melanogaster* et la dose de l'extrait aqueux des feuilles de *P.harmala*

Selon les résultats obtenus, la dose létale pour 50 pour cent des individus (DL₅₀), notée dans l'étude de la toxicité par ingestion, est de 0,005 mg/ml, cette valeur apparait moins que la DL₅₀ enregistrée dans l'étude de la toxicité par contact soit 0,030 mg/ml.

III.2.3.- Temps léthal 50 (TL₅₀) d'extrait foliaire de *P. harmala* sur les adultes de *D. melanogaster*

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.

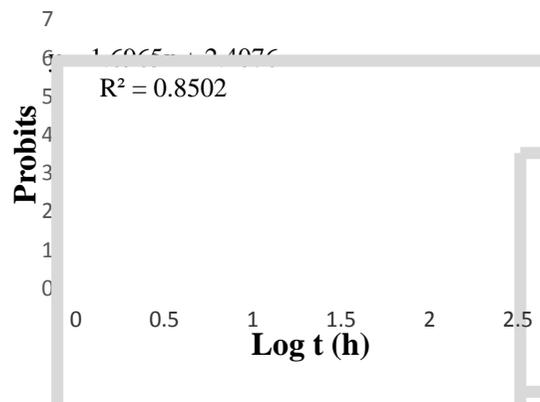
Le temps qui s'écoule entre le début du traitement et la date de la dernière observation est étudiée. À la dernière heure du comptage le nombre de survivants, est noté. Les mortalités et les probits correspondants sont illustrés dans tableau 9, qui présente les valeurs de la TL₅₀ d'extrait végétal testé et la droite de régression des probits en fonction du logarithme des durées de traitement.

Tableau 9- Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez *D.melanogaster* traitées par l'extrait aqueux de *P .harmala* à différentes concentrations

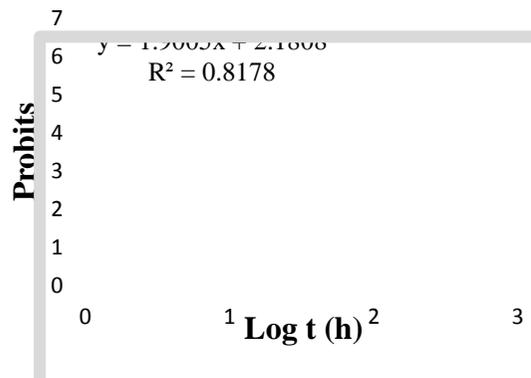
Probits de pourcentages de la mortalité corrigée chez les <i>D.melanogaster</i> traitées par l'extrait de <i>P .harmala</i> à différentes concentrations						
Log de temps	Log de temps	concentration				
		Doses				
		100%	80%	60%	40%	20%
6	0	4.0264	4.0264	4.0264	4.0264	4.0264
12	0,30	4.4023	4.4023	4.4023	4.21134	4.21134
24	0,47	4.56028	4.84926	4.4023	4.4023	4.4023
36	0,60	4.56028	5	4.70826	4.84926	4.84926
48	0,69	5.42628	5.42628	4.98775	5	5
60	0,77	6.20152	5.75534	5.5833	5.42628	5.27926
72	1.85	6.55586	6.55586	5.5833	6.20152	5.9544
84	1.92	7.614	7.614	6.55586	6.20152	5.9544

Au vu des valeurs de la TL₅₀ de chaque concentration en extrait végétal des tiges testé (Figure22) (22, 31 ; 22,62 ; 30,04; 30,69 ; 33,73) et la droite de régression des probits en fonction

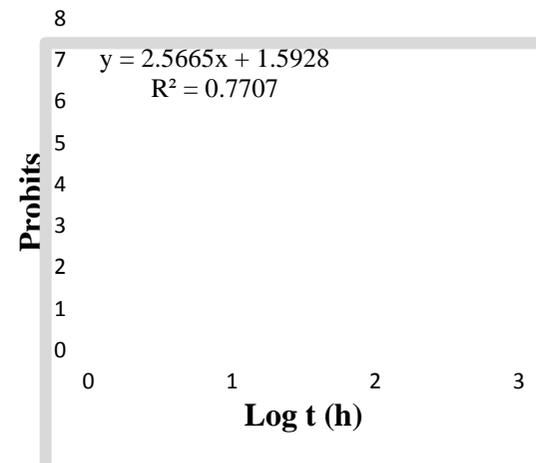
du logarithme des durées de traitement (Figure 21 A, B, C, D,E), il apparaît que l'extrait de *P.harmala* à 100%, 80 % semble plus toxique que les autres concentrations. Montrent que l'extrait de *P.harmala* à 100, 80, % montre une rapidité d'action particulière vis-à-vis les imagos de *D.melanogaster*. pour les autres concentrations, il apparaît que les résultats il est de l'ordre 60% avec 30,04 et 40 % avec 30,69, pour la dernière concentration soit 20% le TL50 rapporté est de 33,73h.



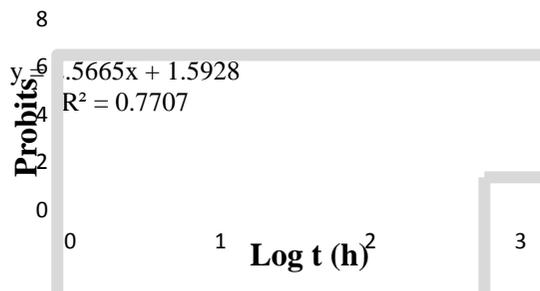
A- action de l'extrait à concentration de 20% dans le temps



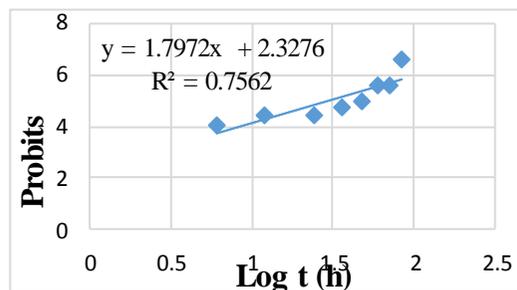
B- action de l'extrait à concentration de 40% dans le temps



C- action de l'extrait à concentration de 100 % dans le temps



D- action de l'extrait à concentration de 60% dans le temps



E- action de l'extrait à concentration de 80% dans le temps

Figure 21: A, B, C, D, E Action de l'extrait des feuilles de *P.Harmala* sur les adultes de *D.melanogater*

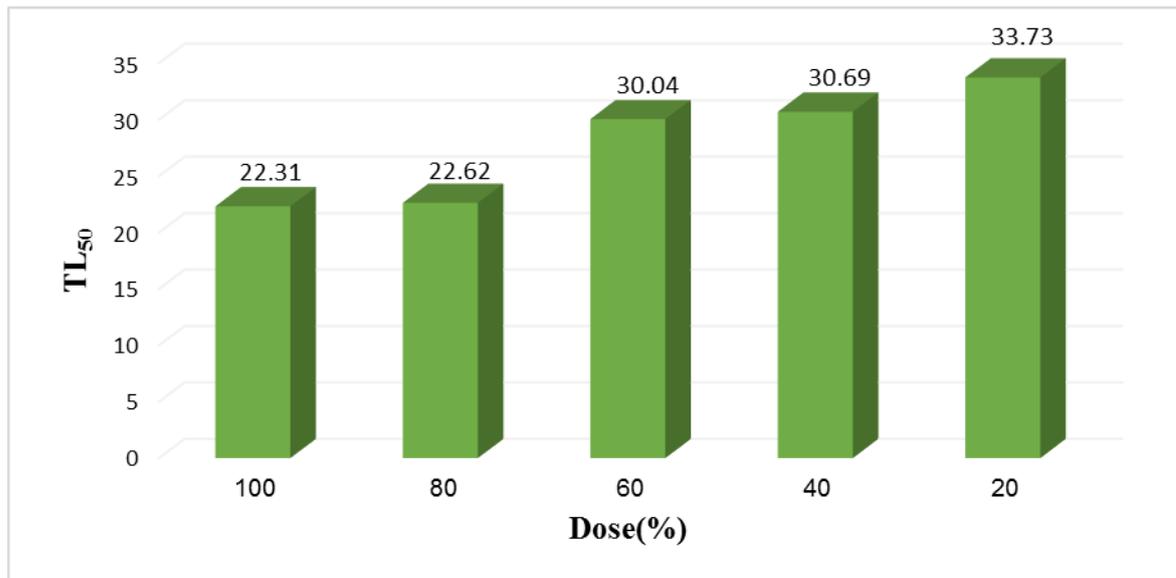


Figure 22 : Courbe de TL₅₀ pour le test de toxicité par ingestion

III.2.4.- Discussion

Les tests de l'effet des extraits aqueux de *P.harmala* ont été effectués sur les individus adultes de *D.melanogaster*, afin d'estimer les doses entraînant une mortalité de 50% d'individus selon le modèle des probits. Au vu des résultats de (tableau 9) et la (figure 21), il est noté que les concentrations qui cause la mortalité de 50% des imagos par l'extrait aqueux des feuilles sont de l'ordre DL₅₀ = 0,005 mg/ml.

L'évaluation des temps létaux 50 (TL₅₀), montre que l'étude par contact est plus sensible à l'effet toxique que l'étude par ingestion. Les TL₅₀ de ces derniers sont plus court que l'étude par ingestion.

On fait comparé notre résultat par des études de même que notre objectif, HABBACHI *et al* (2013) note que les extraits de *P. Harmala* provoquent une mortalité chez les larves de *D. melanogaster*. Cette mortalité est fonction de la dose et du temps d'exposition. Ces extraits aqueux perturbent fortement la durée de développement des larves de *D. melanogaster* et ce qui influe sur le nombre de pupes. Il est enregistré un blocage total des mues imaginale. Les extraits de graines et de feuilles présentent également une toxicité non négligeable pour les larves du dernier stade des *Drosophiles*.

BOUNECHADA et ARAB (2011) ont étudié l'Effet insecticide de *Peganum harmala* sur *Tribolium castaneum*. ont rapporté que la poudre de *P. harmala* a donné un bon résultat pour sa toxicité sur les individus de *Tribolium castaneum*, cette efficacité est confirmée par

la mort des larves et des adultes de ce ravageur. La mort de la totalité des individus (100%) est attribuée à la dose 30% pour les deux stades de développement. Le temps létal 50 (TL₅₀) le plus court est enregistré après 3,9 jours chez les larves et 4,3 jours de traitement chez les adultes.

Les analyses statistiques ont montré que la mortalité est significative avec les différentes concentrations de traitement par rapport au témoin. Le pouvoir insecticide de cette plante serait dû à la présence des alcaloïdes indoliques de type β -carbolines (la harmine, harmaline et harmol).

KEMASSI (2008) à étudier l'effet toxique de différentes plantes acridifuges sur les adultes et les larves L5 de *S. gregaria*, rapporte que les individus nourris par des feuilles extraits de feuilles de *Peganum harmala*, une mortalité de 16,66% est atteinte à partir du 14^e jour de traitement chez les larves L5. Elle est de l'ordre de 16,66% au bout de 12^e jour, pour les adultes. ABBASSI *et al.* (2003), dans leurs études sur l'effet de l'extrait éthanolique de *Peganum harmala* au stade fructification sur les adultes du Criquet pèlerin, rapportent que l'extrait alcaloïdique de *Peganum harmala* cause une mortalité imaginale chez *S. gregaria* de 37% au bout de 30 jours.

BOUZIANE (2012) rapporté que les larves L5, alimentées par des feuilles de *B. oleacera* traitées par l'extrait acétonique de *Peganum harmala*, une amélioration progressive de poids est rapportée. Il est signalé qu'aucune mortalité n'est enregistrée chez les larves L5, alors que chez les adultes, un taux de mortalité moyen est noté.

Selon LAOUIRA (2014) confirmé l'effet insecticide des poudres des feuilles de quatre plantes testées, dont laurier rose est classé premier de point de vue toxicité, suivit respectivement par l'Eucalyptus, l'Ortie et le Faux poivrier. Les résultats indiquent que les poudres des feuilles de ces plantes se sont avérées trop toxiques vis-à-vis des adultes de *Drosophila melanogaster* avec des taux de mortalité très élevés par rapport au myrte et à l'olivier, qui pour notre cas, se sont avérés sans effet significatif sur la mortalité des adultes de *Drosophila melanogaster*.

Par ailleurs, La valeur de TL₅₀ la plus courte est enregistrée chez *Drosophila melanogaster* nourrie par la poudre de Laurier rose soit 14,21 heures. Elle est suivit par les poudres du Faux poivrier, d'Eucalyptus et de l'Ortie respectivement avec des durées de 17,38 heures, 17,56 heures et 28,93 heures. Alors que le TL₅₀ le plus long s'observe pour la poudre du myrte avec 56,83 heures, soit 2 jours et 10 heures, suivit en fin, par la poudre d'olivier représentée par 120,82 heures, soit 5 jours et 2 heures. Ainsi l'analyse de la variance à deux facteurs (temps et dose),

montre des différences significatives aussi bien pour le facteur temps ainsi que pour le facteur dose.

III.3-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de *P.harmala* sur l'activité d'enzyme cholinestérase

Les résultats de l'action de différentes doses d'extrait de *P.harmala* sur l'activité cholinestérasique chez les individus adultes de *drosophile melanogaster* sont illustres dans la figure23. Il semble que la diminution de l'activité d'enzyme cholinestérase est inversement proportionnelle à la dose de l'extrait.

Ainsi il apparait des variations très importantes de l'activité cholinestérasique entre les individus témoins qui sont de 3.39 ± 1.24 nanomole /mn/ml et les individus traités. Les valeurs sont de 0.12 ± 0.04 nanomole /mn/ml pour les individus traités par la dose 20%, de 0.1 ± 0.09 nanomole /mn/ml pour les individus traités par la dose 40% , de 0.05 ± 0.02 nanomole /mn/ml pour les individus traités par la dose 60% et de 0.04 ± 0.04 nanomole /mn/ml, pour les individus traités par la dose 80%, l'activité cholinestérasique la plus faible est de 0.03 ± 0.02 enregistré pour la dose 100%.

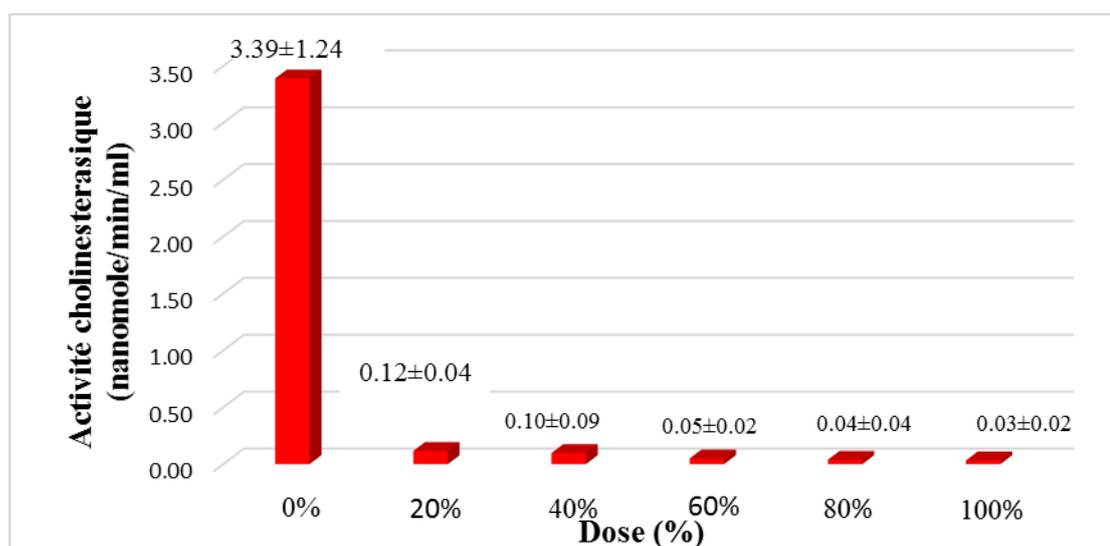


Figure 23 : Activité cholinestérasique chez les individus adultes de *D.melanogaster* témoins et traités par différentes dose d'extrait de *P.harmala*

Les mesures neurochimiques laissent apparaître que l'inhibition de la cholinestérase, dépend du temps d'exposition, de la dose de l'extrait de *P.harmala* appliquée ainsi que les conditions du milieu. Les extraits traités à différentes doses de l'extrait, montrent une diminution plus importante à la dose la plus forte, la diminution de la cholinestérase à différentes concentrations, est plus marquée chez les individus traités à concentrations basse de 20%.

La protéine la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates est l'acétylcholinestérase. Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques. Chez les insectes, elle se trouve essentiellement dans le système nerveux central.

Les travaux de HAMID OUDJANA (2009) observés, 24h après traitements à différentes doses chez les individus de *S.gregaria*, apparaît semblable aux valeurs notées avant 24 h, une activité de $24,81 \pm 4,91$ nanomole/min/ml chez les individus femelles et un taux moyen de cholinestérase de $28,99 \pm 8,00$ nanomole/min/ml chez les individus mâles ayant reçu la dose de 2g de Malatox EC50/1 de pesticide, un insecticide organophosphorés.

L'intoxication comporte une phase d'hyperexcitation suivie que l'activité cholinestérasique augmente au début avant d'arriver au stade de diminution qui résulte d'une inhibition irréversible d'enzyme. Les enzymes de détoxification comme les estérases, les oxydases ou les transférases semble encore actifs et capables de dégrader l'insecticide après 30min d'exposition avant l'arrivée du toxique aux cholinestérases (HAMID OUDJANA, 2009).

GHNABZIA (2009) montre différentes doses de Kiuk 200SL (inhibiteur de type carbamate), entraînent une inhibition de l'acétylcholinestérase, chez le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*). L'activité cholinestérasique pour la dose 8g de Kiuk 200SL est de 3.81 ± 3.68 nmole/min/ml pour les individus males et 5.6 ± 5.98 nmole/min/ml pour les femelles par rapport aux individus témoins males et femelle avec respectivement 43.65 ± 13.69 nmole/min/ml et 84.73 ± 24.26 nmole/min/ml; l'inhibition persiste 24 heures après traitement.

ERIC et MARCEL (1998) identifient que le rôle de l'acétylcholinestérase est d'hydrolyser l'acétylcholine ce qui permet la fermeture des canaux associés au récepteur du neurotransmetteur. Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée. Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine. L'accumulation de l'ACh dans la région synaptique provoque une hyperexcitation des liaisons cholinergiques causant finalement la mort de l'insecte.

Chez certains insectes comme *Culex pipiens*, de fortes concentrations d'organophosphorés et de carbamates, avoisinant parfois même la limite de solubilité, n'inhibent plus l'AChE. Ce mécanisme a été également identifié chez d'autres acariens et insectes : *Musca domestica*, *Spodoptera littoralis*, *Anopheles albimanus*, *Drosophila melanogaster*, *Leptinotarsa decemlineata* et *Rhyzopertha dominica*

D'après MIRJANA, *et al* (2013). Les insecticides organophosphoré et carbamate sont de forts inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, mais D'autres produits chimiques peuvent entraîner une inhibition *in vitro* (extrait de *P. harmala* un de ces produits)

Le mécanisme de l'action des insecticides OP est basé sur l'inhibition irréversible d'AChE dans un corps d'insecte, résultant dans la transmission neuronale interrompue et la conséquence décès. Cependant, les OP ne sont pas sélectifs pour les espèces d'insectes, Mais ils ont le même mécanisme d'action pour les organismes du sang chaud, y compris les humains qui peuvent aussi être vivre. En fait, les OP inhibent de manière irréversible l'AChE humaine.

BENALI (2007) obtient une résultats plus élevée de l'AChE qui est de 43.61 nmole/min/ml est retrouvée au niveau des branchies des moules sauvages de Kristel, tandis que la valeur minimum 5.52 nmole/min/ml ; globalement les concentration de l'AChE Varient de 9.89 nmole/min/ml à 43.61 nmole/min/ml au niveau de branchie et 5.52 à 14.99 au niveau de l'homogénat .

EN-BO, *et al* , (2003) montré que l'inhibition de l'activité enzymatique par certains substrats à des concentrations plus élevées sont typiques phénomène pour AChE et est probablement dû à la liaison du substrat en excès au site anionique périphérique pour former un complexe enzyme-substrat. Comme dans de nombreux autres insectes, Acétylthiocholine iodée à des concentrations plus élevées a montré une importance.

Une telle inhibition s'est produite à des concentrations relativement faibles pour AChE. Ces résultats a indiqué que AChE a été purifiée à partir du HUANGHUA Et les populations de poulets PINGSHAN étaient significativement différentes en fonction de différentes concentrations de substrats.

III.4-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de *P.harmala* sur le taux de protéines

Les résultats relatifs aux taux de protéines chez les individus adultes de drosophiles témoins et traités à différentes concentration de l'extrait foliaire de *P. harmala* sont présentés dans la figure 24. Les individus témoin enregistré un taux de protéines égal à $49.9 \pm 35.28 \mu\text{g/ml}$.

Il apparait une diminution du taux de protéines chez les individus traités, les valeurs sont de $10.5 \pm 6.71 \mu\text{g/ml}$ à la dose 100%, de $16.1 \pm 10.81 \mu\text{g/ml}$ à la dose 80% ,de $20.1 \pm 13.75 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 60%, et de $29.4 \pm 20.50 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 40% et de $20,79 \pm 14.55 \mu\text{g/ml}$

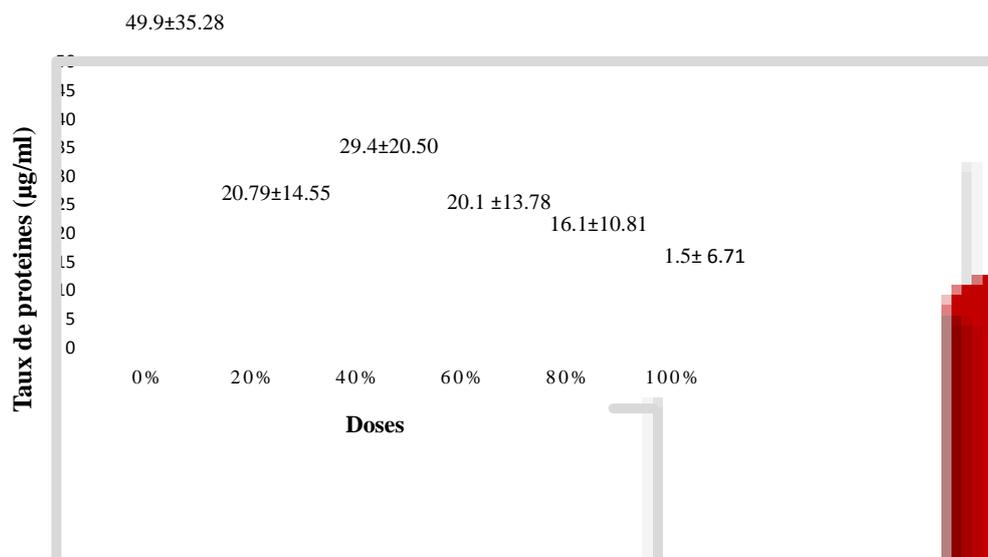


Figure 24: Taux de protéines chez la *D.melanogater* traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de *P.harmala*

L'intensité de ces processus est en relation avec l'état physiologique de l'insecte qui dépend de plusieurs facteurs dont la température favorable chez l'insecte et la dose d'insecticide (HAMID OUDJANA, 2009)

Selon MORETAU, (1991) la toxicité des insecticides organophosphorés semble être à l'origine d'une altération des protéines. Le mode d'action du lindane qui est un insecticide de synthèse neurotoxique, chez le criquet migrateur *Locusta migratoria*, se traduit par des altérations importantes touchant, le réticulum endoplasmique lisse et des altérations ultra structurales observées au niveau des feuillettes des glandes suggèrent. Le lindane, lors d'une intoxication aiguë, provoque une inhibition de l'activité glandulaire.

HAMID OUDJANA (2009) rapport que l'intensité des processus d'altération des protéines est en relation avec l'état physiologique de l'insecte qui dépend de plusieurs facteurs dont la température favorable chez l'insecte et la dose d'insecticide et le référendum thermique, semble être un optimum en dessus ou en dessous duquel les réactions biochimiques subissent des perturbations chez l'insecte.

III. 5.- Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de *P.harmala* sur l'activité Spécifique

Les résultats de l'action de différentes doses d'extrait de *P.harmala* sur l'activité cholinestérasique spécifique chez les individus adultes de *drosophile melanogaster* sont illustres dans la figure25.

Il apparait des variations de l'activité entre les individus témoins qui sont respectivement de 0.068 ± 0.048 nanomole /mn/ μ g. Après traitement par l'extrait de *P.harmalaa* à la dose 20%, l'activité spécifique est de 0.004 ± 0.138 nanomole /mn/ μ g, la dose 40% l'activité spécifique est de 0.003 ± 0.280 nanomole /mn/ μ g, la dose 60% 80%, l'activité spécifique est de 0.002 ± 0.422 et 0.002 ± 0.564 prospectivement nanomole /mn/ μ g, pour la dose 100% l'activité est 0.003 ± 0.704 nanomole /mn/ μ g. L'activité spécifique est inversement proportionnelle à la dose de l'extrait.

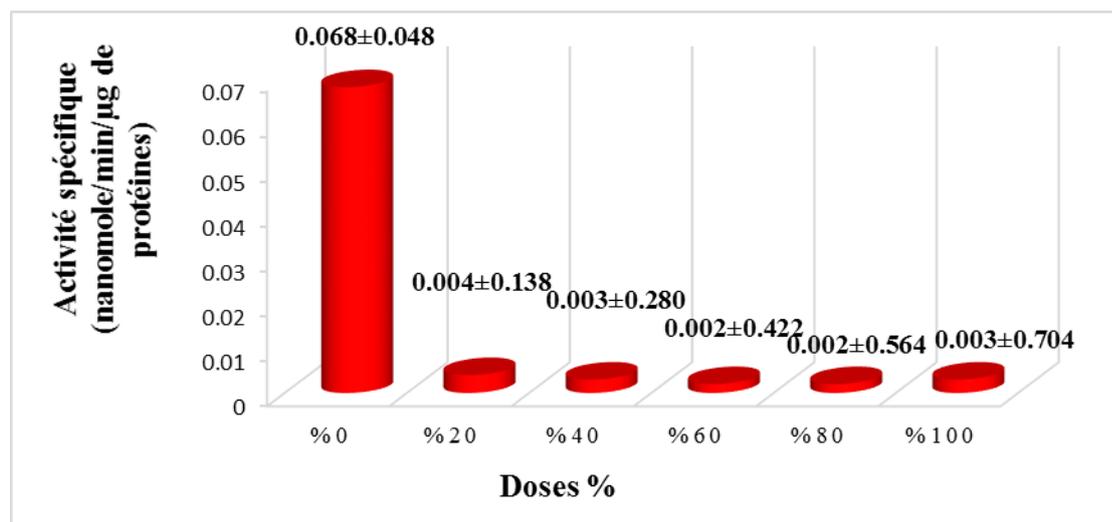


Figure 25.: Cinétique de l'activité spécifique cholinestérasique chez les *D.melanogater* traités à différentes doses de extraits des feuilles de *P.harmala*

Selon HAMID OUDJANA (2009) l'activité spécifique semble être liée au taux de protéines et à l'activité cholinestérasique qui est inversement proportionnelle à la dose de la toxine, GALGANI *et al.*, (1983) montre que l'inhibition d'enzyme ainsi que l'altération de protéines peuvent induire une chute d'activité spécifique.

GHNABZIA (2009) constaté que la diminution de l'activité spécifique coïncide avec la chute de l'activité cholinestérasique cérébrale, l'inhibition de l'acétylcholinestérase provoque une accumulation anormale de l'acétylcholine dans les tissus, les récepteurs étant saturés en acétylcholine, la membrane demeure dépolarisée ce qui a pour effet de stopper la transmission nerveuse dans la portion cholinergique de système nerveux.



Conclusion Générale

Conclusion générale

Ce modeste travail de recherche a pour but l'étude de la toxicité des extraits foliaires de *Peganum harmala* récoltée à la région Sebseb wilaya de Ghardaïa sur les adultes des mouches de vinaigres *Drosophiles melanogaster*.

Chez les *D. melanogaster* le taux de mortalité cumulée varie selon les concentrations, au niveau des lots traités par l'extrait aqueux par un traitement en contact de *P.harmala*, le taux de mortalité noté est de 100% au cours du temps. Les pourcentages de mortalité observés diminuent en fonction de la concentration en extrait appliquée, un pourcentage de mortalité de 55.55 % est noté au niveau du lot traité par l'extrait à 80% de concentration, alors que pour les deux autres concentrations soit 60% et 40% il est de 44.44% et 16.66% respectivement et pour l'extrait aqueux de cette plante saharienne, un pourcentage de mortalité de 0 % est noté au niveau des lots traités par l'extrait à 20% de concentration. Le traitement par ingestion montre une mortalité totale chez les individus traités à la dose 100% et 80%. Pour les autres lots traités, les pourcentages de mortalité observés diminuent en fonction de la concentration en extrait appliquée, un pourcentage de mortalité de 94.44 % est noté au niveau du lot traité par l'extrait à 60% de concentration, alors que pour les deux autres concentrations soit 40% et 20% il est de 88.88% et 83.33% respectivement. La toxicité par ingestion semble plus longue que la toxicité par contact avec l'extrait de *P.harmala*.

Le temps létal 50 (TL₅₀) le plus court est enregistré chez les individus traités par la dose 100%, pour le traitement par contact, avec une dose létale 50 (DL₅₀) de 0.03 mg/ml. De même la dose 100% présente un temps létal 50 (TL₅₀) plus court pour le traitement par ingestion 22.31h. avec une dose létale 50 (DL₅₀) de 0.005mg/ml respectivement.

L'augmentation de la dose entraîne une diminution du taux de mortalité, alors que ce temps est beaucoup plus court à la toxicité par contact, qu'à la toxicité par ingestion. L'extrait aqueux des feuilles de *Peganum harmala* L montre un effet inhibiteur sur l'enzyme cholinestérase.

Les mesures neurochimiques : l'activité cholinestérasique et l'activité spécifique et le taux de protéines laissent apparaître que l'inhibition de la cholinestérase, dépend de la dose de l'extrait de *P.harmala* appliquée sur l'extrait brut de la drosophile. Les individus traités à différentes doses de l'extrait de *P.harmala*, montrent une diminution plus importante à la dose la plus forte (0.03±0.02 nanomole /mn/ml pour la dose 100%) .

Parallèlement, le taux de protéines enregistre une diminution pour toutes les doses appliquées avec un maximum de diminution à la dose 100%, de: 10.5 ± 6.71µg/ml. De même les

Conclusion générale

activités spécifiques montrent une variation inversement proportionnelle à la dose de l'extrait administré, cette valeur est de 0.003 ± 0.704 nanomole /mn/ μ g ,à la dose 100%.

En perspective, pour une meilleure poursuite de la recherche des molécules actives de plantes de Sahara septentrional Algérien, de la présente étude, il est souhaitable de :

- Utiliser d'autres parties d'extrait végétal de *P.harmal*
- Chercher l'effet toxique de *P.harmal* sur d'autres insectes nuisibles
- Utiliser des solvants organiques à polarité différente pour l'extraction afin d'augmenter le rendement d'extraction.
- Passer à l'étude in vivo de l'effet inhibitrice des extraits aqueux.



Références bibliographiques

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABBASSI K., ATAY-KADIRI Z. et GHAOUT S., 2003- Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. The Royal Entomological Society, Physiological Entomology, (28): 232-236.

AITFELLA, R. (2012). Etude de l'activité anticoccidienne des extraits de *Peganum harmala*, *Retamasphaerocarpa* et grains de pollen. Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas –Setif I, Sétif : 48p.

ALEXANDRE, M (2004). Structure et Dynamique du Récepteur Nicotinique, Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur Strasbourg I, Strasbourg, 7-8 p.

BENALI, I.(2007). utilisation de l'activité de l'acétylcholinesterase chez *Mytilus gallprovincialis* (Lmk, 1819, transplantée en baie d'Oran: biomarqueurs d'exposition à la contamination marine côtière. Mémoire de magister. Université d'ORAN ES-SENIA. 69p

BENZIANE AHMED ,D. (2014). Effet d'un régime enrichi en chlorpyrifos chez le rat Wistar : étude de l'activité enzymatique des cholinestérases comme indicateur biologique. Mémoire de master, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. 18 p.

BONYS, N.F. (2013). Stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires, Thèse de doctorat, Université De Paris-Sud, Paris. 68 p.

BOTTI S., FELDER C., LIFSON S., SUSSMAN J., SILMAN.,(1999). A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase . Journal of biophysique, vol.77, Etats-Unis: 2430-2431.

BOTTI, S., FELDER, C., LIFSON, S., SUSSMAN, J., SILMAN, I . (1999). A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinesterase. Journal of biophysique, vol 77, Etats - Unis: 2430 -2431.

BOUHOUHOU, Y. CHORFI, M. (2016). Evaluation Des Effets d'un Biopesticide Sur *Drosophila Mélanogaster*. mémoire de master . Université des Frères Mentouri .Constantine. 10-11p

BOUNECHADA M. et ARAB R. (2011). Effet insecticide des plantes *Melia azedarach* L. et

BOURON, H. (1977). Défense des cultures horticoles. Ed. Bailliere, Paris.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUSSAHEL S. (2011). Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif. Mémoire de Magister. Université Ferhat Abbes-Sétif I, Sétif. 17-19p

BOUZERIDA K. MANDI R. LAHLOUH B. (2016). La lutte biologique contre les insectes nuisibles : Utilisation des plantes et des extraits de plantes. . Mémoire de master. Université des Frères Mentouri, Constantine. P38

BOUZIANE, N. (2012). Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbiaguyoniana* Boiss. & Reut. (Euphorbiaceae) et de *Peganumharmala* L. (Zygophyllaceae) récoltés au Sahara Septentrional Est algérien sur les larves et les adultes de *Schistocercagregaria* (Forskål, 1775). 72 p.

BRADFORD, 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, 248-254

BROWN, D. A. (2006). Acetylcholine , British Journal of Pharmacology, 147: 120-126.

CHIANÉA, D., ADAM, F., CAPRON, J, et CORBÉ , H.(2001) , Adaptation of a colorimetric method for auto-mated measurement of cholinesterase activity In plasma and whole blood hemolysate, Annales de Toxicologie Analytique, vol. XIII ,n°1 , 41-48.

CHOPRA, I. C., ABROL, B. K et K. L. HAND, A (1960).Les plantes médicinales des régions arides. Unesco. Oberthur, Rennes. Paris-7.

DJEFFAL, A. (2014). Evaluation de la toxicité d'un insecticide carbamate «méthomyl» chez le rat Wistar : Stress oxydant et exploration des effets protecteurs de la supplémentation en sélénium et/ou en vitamine C, Université Badji Mokhtar, Annaba. 37 p.

ELBAH D, HABBACHI W, Ouakid M et Tahraoui A. (2016), Sublethal effects of *Peganum harmala*(Zygophyllaceae) on sexual behavior and oviposition in fruit fly *Drosophila melanogaster*(Diptera: Drosophilidae), Entomology and Zoology Studies ; 4(6): 638-642.

ELLMAN .G.L., COURTNY k.d., ANDRES, V et FEATHERSTONE, R. M., (1961).A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochimical Pharmacology and hysiology ,38,84-90.

EN BO, M, YAN-PING, H et KUN YAN, Z. (2003). Comparative studies of acetylcholinesterases purified from two field populations of the oriental migratory locust (*Locusta migratoria manilensis*): implications of insecticide resistance. 78 :66-77.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

EZZAHER, A., HAJMOUHAMED, D., MECHRI, A., NEFFATI, F., DOUKI, W., GAHA, L. et NAJJAR, M. F. (2012). Étude de l'activité pseudocholinestérasique chez des patients bipolaires de type 1. *Ann Bio lClin* ; 70(1) : 25-31.

FAROUK, L, LAROUBI, A, ABOUFATIMA, R, BENHARREF, A, AND CHAIT, A. (2008).Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. *J. Ethnopharmacol*, 115, 449–454.

FRISON, G, FAVRETTO, D, ZANCANARO, F, FAZZIN, G AND FERRARA, S. D (2008).A case of b-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. *Forensic. Sci. Int*, 179, 37–43.

GALGANI, F.F., BENYAMNI, Y., WORMHOUDT, A., et CECCALDI, H. (1983).Variations des activités digestives en fonction des facteurs du milieu chez les crustacés ,IFREMER Actes de Colloques ,n°1 ,Montpellier :277-292

GHENABZIA, I. (2009). Cholinestérase et toxicité par les carbamates chez *schistocercagregaria*(Forskael, 1775).Thèse de Magister, Université Kasdi Merbah, Ouargla :5-6 p.

GUILLET, P. (2007). La prescription de traitements à activité parasympholytique chez le sujet de soixante-quinze ans et plus en pratique de médecine générale : Etude préliminaire, Thèse de doctorat, Université de Nantes : 7 p

HABBACHI W., BENHISSEN S., OUKID M. L., FARINE J. P. (2013). Effets biologiques d'extraits aqueux de *Peganum harmala* (L.) (Zygophyllaceae) sur la mortalité et le développement larvaire de *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae), *Algerian journal of arid environment* vol. 3, n° 1: 82-88 .

HARRY, M. G., HAY, D., ISRAEL, S.,et JOEL, L. S. (2003).Acetylcholinesterase,*Journal of Molecular Neuroscience*, 20,369–383.

HOUICHITI, H (2009). Caractérisation d'un agrosystème saharien dans une perspective de développement durable : Cas de l'Oasis de SEBSEB (Wilaya de GHARDAIA). Mémoire Magister, Université Kasdi Merbah, Ouargla : 31-32 p

HUYNH-MOYNOT, S., MOYNOT, J. C., THILL, C., COMMANDEUR, D., OULD-AHMED, M ET DROUILLARD, I (2013).Curarisation prolongée après injection de succinylcholine sur déficit congénital en butyrylcholinestérase et potentialisée par un traitement au lithium : à propos d'un cas, *Ann Biol Clin*, 71(4) : 485-488.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

IMAMI, L et TOUIRAT, A.(2016). contribution à l'étude phytochimiques (les polyphénols) de deux espèces *Pimpinelle anisum* L.et *Peganum hamala* L.memoire de master . Université des Frères Mentouri ,Constantine.6p.

ISHAAYA, I. (2001). Biochemical sites of insecticide action and resistance .Ed.Springer, Germany: 220-240.

JBILOU R., AMRI H., BOUAYAD N., GHAILANI N., ENNABILI A. et SAYAH F. (2008). "Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, a-amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae)". *Bioresource Technology*, 99, 959–964.

JULIEN, S. (2009) .Dynamique des phases de mémoire et réseaux neuronaux chez *Drosophilamelanogaster*.memoire de doctorat. Université Pierre Et Marie Curie, Paris.12p

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). Mémoire de Magister en Agronomie Saharienne, université Kasdi Merbah-Ouargla, 168 p.

LAOUAR, I. (2015). Etude des interactions Enzyme-Ligand. Cas Des Inhibiteurs De L'acétylcholinestérase, Thèse De Master,Université d'EL-Oued, EL-Oued : 38-39p.

LUI H , YI M, SHI X, LIANG P et GAO X.(2007).Substrate specificity of brain acetylcholinesterase and its sensitivity to carbamate insecticides in *Carassius auratus*.*Fish PhysiolBiochem* 33:29–34.

MAHMOUDIAN, M., JALILPOUR, H and SALEHIAN, P. (2002).Toxicity of *Peganumharmala*: Review and a Case Report.Iranian. *J. Pharmacol. Ther*, 1, 1, 1 -4.

MASSOULIE, J., ANSELMET, A., BON, S., KREJCI, E., LEGAY, C., MOREL, N., ET SIMON, S. (1999). The polymorphism of acetylcholinesterase: post-translational processing, quaternary associations and localization. *Chemico-biological interactions*, 119, 29-42.

MEDJBER K. (2012). Etude de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans le développement des cancers pulmonaires non à petites cellules,Thèse de doctorat,Université de Reims Champagne-Ardenne, 39 p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MIRJANA, B., DANIJELA, Z., TAMARA, D., ALEKSANDRA, M and VESNA, M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology, Current Neuropharmacology, 11: 315-335.

MOHAMED, A. A. (2011). Étude du mode d'action neurotoxique d'un répulsif, le dé et utilise seul et en association avec un insecticide sur l'acétylcholinestérase des neurones d'un insecte la blatte *Periplaneta americana*, thèse de doctorat, Université d'Angers, France, 25 :44-45 p.

MORETAU, B. (1991)- Etude de certains aspects de la physiotoxicologie d'insecticides de synthèse chez le Criquet migrateur: *Locusta migratoria*. Ed. aupelf-uref, Paris : 167-178

NEŞE ÇOKUĞRAŞ. A. (2003), Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance, Turk J Biochem, 28 (2); 54-61.

OULD EL HADJ M. D., TANKARI DAN-BADJO A., HALOUANE F. et DOUMANDJI S., (2006)- Toxicité comparée des extraits de trois plantes acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera Cyrtacanthacridinae). Sécheresse, vol. 17(3): 407-414.

OZANDA, P. (1991). Flore et végétation du Sahara. (3ème édition, augmentée). Ed. CNRS, Paris: 662 p.

Peganum harmala L. sur *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera:Tenebrionidae). (1).6p.

REZZAGUI, A. (2012). Evaluation de l'effet toxique de l'extrait brut et de l'activité antioxydant des différents extraits des graines de *peganum harmala* L, une perspective de développement durable : Cas de l'Oasis de SEBSEB (Wilaya de GHARDAIA). 90 p.

SANSON, B. (2009). Dynamique structurale de l'acétylcholinestérase étudiée par cristallographie aux rayons X et par une méthode spectroscopique complémentaire Thèse de doctorat de l'Université Joseph Fourier – Grenoble I.

SCHAERLINGER, B. (2004). Rôle de la sérotonine dans le développement embryonnaire précoce de *Drosophila melanogaster* : Etude d'un mutant ponctuel du récepteur 5-HT2Dro. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur .STRASBOURG .47p

SHOWLER. A.T et POTTER. C.S. (1991). The desert locust : agricultural and environment impacts, pp. In : Zartman I.-W., Tunisia: *the political economy of reform*. Edition. Lynne Reinner Publishers, London, 153-165.

SILMAN, I et SUSSMAN, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non classical' functions and pharmacology. Current Opinion in Pharmacology, 5: 293–302

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

SONOIS, M. V. (2007).Rôle des métaux et des membranes sur la structure et la réactivité des peptides β β β -amyloïdes liés à la maladie d'Alzheimer,Thèse de doctorat,Université Paul Sabatier Toulouse Iii (Sciences) :15 p.

TAHROUCH, S., RAPIOR, S., BELAHSEN, Y., BESSIERE, J. M, and ANDARY, C. (1998).Volatile constituents of *Peganum harmala* (Zygophyllaceae). Société Botanique de France, Acta bot. Gall, 2 (145) : 121 -124.

TAYLOR P, (1991).The Cholinesterase.Biological Chemis;266 (7):4025-4028.

WEISS, S. (2006). Phénotype Nicotinique Des Souris Dépourvues Du Transporteur De La Dopamine Ou De La Protéine Stop : Modèles D'étude Symptômes Psychiatriques, Thèse De Doctorat, Université De Paris XII-VAL de Marne U. F. R. De Sciences, Paris : 38-39 p.



Annexe

Annexe I : Matériels de laboratoire

Tableau 10: Matériels et produits utilisés dans le laboratoire.

Matériels	Produits
Ballon , Becher , Fiole , Eprouvette , une pince, Papier filtre ,magnétique , Coupant de disque , Etuve , une balance de précision pour peser , Spatule , Papier aluminium , Flacon , Tubes a essai , Montage de l'extraction à reflux ,Montage d'évaporation rotative spectrophotométrie,	Eau distillée, Ethanol, DNTB, acétylcholine, Titron -X100-, acide citrique, phosphate disodique, Commassie Brillant Bleu, éthanol, acide phosphorique (H ₃ PO ₄), d'acide phosphorique ,

Annexe II : Extraction d'enzyme :

1-Réactifs :

- Détergent : Triton X-100
- Tampon phosphate: acide citrique**2.10g**, phosphate disodique**7.16g**

2- Mode opératoire:

- L'extraction est réalisée par les étapes doivent être réalisées à froid afin d'éviter l'altération de l'enzyme. Les têtes sont amputées et homogénéisées dans un mortier porté à l'avance dans un congélateur.
- L'homogénat est récupéré avec 0,5 ml d'eau glace et 1 ml d'un mélange de **0,1M** 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 pendant 20 mn dans une centrifugeuse. Le surnageât renfermant l'enzyme est récupéré à l'aide d'une micropipette.

*** Tampon phosphate de sodium: pH=7.4**

A) **2.10g** d'acide citrique($C_6H_8O_7$)(0.1M) dans 100ml d'eau distille

B) **7.16g** de phosphate disodique ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (0.2M) dans 100ml d'eau distille

Annexe III : Dosage des protéines par méthode de Bradford(BSA)

1-Réactifs:

- Coomassie Brilliant Bleu **10mg**, éthanol **5ml**, acide phosphorique (H_3PO_4) **10ml**
 - dissoudre 10mg de Coomassie Brilliant Bleu G-250 dans 5ml d'éthanol à 95%
 - agiter énergiquement pour favoriser la dissolution du colorant.
 - ajouter ensuite 10ml d'acide phosphorique à 85%
 - ajuster le volume à 100ml avec l'eau distillée.
 - filtrer pour éliminer le colorant non dissout .la solution est stable 1à2 semaine au froid.

2- Mode opératoire:

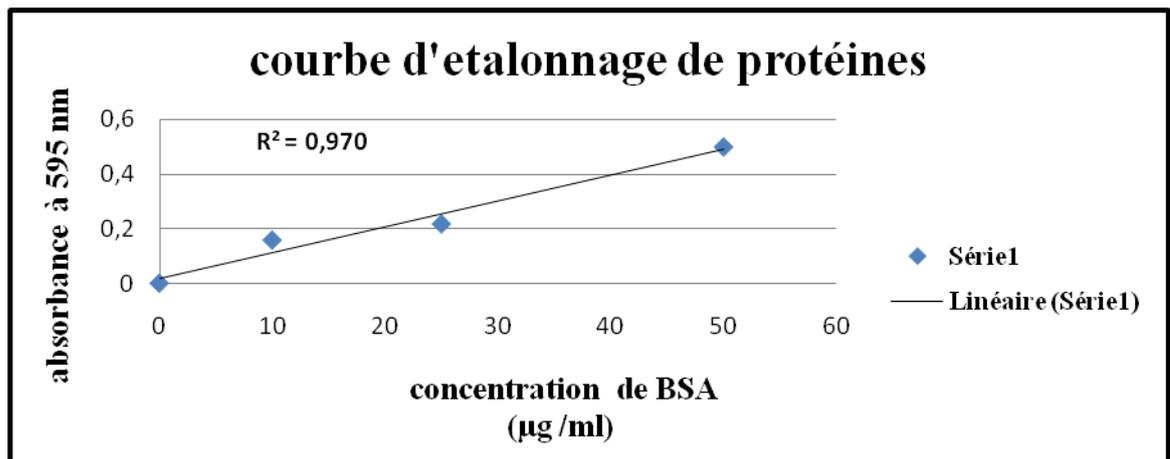
- réaliser une gamme étalon (0à100µg de protéines) avec le sérum albumine bovin (BSA)
- prélever 0.2ml de l'échantillon à doser (contenant au maximum 50 µg de protéines)
- ajouter 5ml de réactif au bleu de Coomassie et lire l'absorbance à 595 nm après 2mn.

Annexe VI : Gamme d'étalonnage

Tableau 11: Gamme d'étalonnage de protéines

Tube n°	0	1	2	3	4	5	échantillon
Étalon (100 µg /ml)	0	0.02	0.025	0.1	0.175	0.2	
Eau distillée (ml)	0.2	0.180	0.175	0.1	0.025	0	
Concentration finale (µg /ml)	0	10	25	50	75	100	
Bleu de Commassie				5			
Temps de repos				2mn			
A ₅₉₅	0	0.158	0.217	0.499	0.524	0.525	

Annexe V : Courbe étalonnage



Annexe VI : Activité enzymatique : méthode d'ELLMAN

1- Principe de la méthode :

L'acétylcholinestérase hydrolyse l'acétylcholine iodée en thiocholine et acétate. La thiocholine réagit avec DNTB et le produit de la réaction prend une coloration jaune pouvant être mesurée au spectrophotomètre à 412 nm ; le taux auquel la couleur est produite représente l'activité de l'acétylcholine

2- Réactifs:

Acétylcholine **1g**, DNTB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)).

3- Mode opératoire:

➤ **préparation des réactifs (milieu d'ELLMAN)**

- iodure d'acétylcholine (P.M.289.18).

Dissoudre 0.5 g dans 12.5 ml d'eau.

Faire de 0.5 ml.

- DNTB (P.M.396.35)

Dissoudre 0.4 g dans 20ml de tampon phosphate 0.25M, pH 7

Faire des aliquotes de 1 ml

Mélange réactionnel d'ELLMAN

- 0.5 ml de solution d'acétylcholine
- 1ml de solution de DTNB
- 10ml de tampon phosphate 0.5 M pH 7
- Compléter à 100ml d'eau distillé.

Le mélange réactionnel est réalisé directement dans la cuve de dosage. L'activité est évaluée contre un blanc à 25°C, dans un tampon phosphate de sodium (0.1 mol/l, pH 7.4) en présence d'un volume de substrat et de DNTB (500µl) et d'un volume d'échantillon (500µl). L'absorbance est mesurée à 412 nm pendant 10 mn avec un intervalle de 60s entre chaque mesure sur un spectrophotomètre

Activité enzymatique :

L'activité enzymatique se calcule par la formule suivante $A = \frac{\Delta DO.V}{(t_2 - t_1).\epsilon.d.x}$

Annexe VII: Extraction des feuilles de *Peganum harmala* L.

Le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé dans l'extraction, les conditions de séchage, le contenu de chaque espèce en métabolites (de son métabolisme) et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité.

Les rendements d'extraction correspondent au pourcentage du principe actif dissout dans le solvant organique utilisé pour l'extraction par rapport au poids du végétal utilisée pour l'extraction. (KEMASSI, 2014)

L'extraction des feuilles de *P. harmala* a été réalisée par le méthanol 80% et par l'eau distillée. Après l'extraction et l'élimination de toute trace de solvant.

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage du poids net de l'extrait sec par rapport au poids net de matériel végétal soumis à l'extraction, le rendement est calculé selon la formule ci-dessous et le résultat obtenu est présentés dans le tableau12.

Tableau 12:Rendement d'extraction en métabolites secondaires de *P. harmala*.

Extraite	Feuilles
Rendement (%)	5.3

$$(R\%) = \frac{m}{m_0} 100$$

Avec :

R(%): le rendement

m: la masse d'extrait obtenu en g.

m₀:poids de la biomasse végétale en g.