

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université M'hamed Bougara Boumerdes

جامعة امحمد بوقرة بومرداس



Faculté des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Biologie des Populations et des Organismes (BPO)

Sous le thème

*Evaluation de l'activité insecticide des
polyphénols, extrait aqueux et alcaloïdes du
Buis « Buxus sempervirens » à l'égard de
Galeria mellonela*

Réalisé par : M^{elle} :ZITOUNI Rabab & M^{elle}:KHALDI Meriem

Soutenu le 15/06/2017, devant le jury :

Président : Mr MOHAMMEDI A.

M.C.A (FS/UMBB)

Promotrice : Mme AIT KAKI S.

M .C.A (FS/UMBB)

Co-Promotrice : Mme MOHAND KACI H.

M.C.A (FS/UMBB)

Examinatrice : Mme ROUANE A .

M.A.B(FS/UMBB)

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

En premier lieu, nous remercions ALLAH de nous avoir donné la volonté et le courage afin d'achever notre modeste travail.

Nos sincères remerciements s'adressent à notre promotrice

Mme AIT KAKI S.

et notre Co-promotrice Mme MOHANDKACI H

d'avoir acceptées de nous encadrer, et qui ont contribué à ce travail, par leurs soutiens et la qualité de leurs conseils apportés, ainsi qu'une grande Compétence et beaucoup de gentillesse.

Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de jury : le

Président Mr MOHAMMEDI A. et l'examinatrice Mme RAOUANE A, d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous tenons également à remercier :

les techniciennes de laboratoire : Dalila et Nadia pour leur encouragement.

Nous remercions tout particulièrement nos familles pour leurs soutiens et leurs encouragements durant ce parcours.

Il est toujours délicat de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Que ceux qui ne sont pas mentionnés ne nous en tiennent pas rigueur.

Rabab et Meriem

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes chers parents, ma mère et mon père

**Pour leur patience, leur amour, leur soutien et surtout pour leurs
encouragements**

A mes très chères sœurs

Amina et son mari Mohamed et leur fils Iyad

Amira et son mari Oussama

Ibtissem et la petite Marwa

A mon chère Frère Fares

Et bien sûr mes grandes-mère et mon grand-père

Et toute ma famille

Sans oublier mes chères amies Yasmine, Ahlem, Houria, Latifa

Hayet, Salima, Hadda et Nedjema

**A mon binôme Meriem pour les sympathiques moments qu'on a
passé ensemble**

A mes collègues de travail, sur tout Ms Hissous, Ftaha, Lamia

**A mes collègues de la promo BPO 2015-2016, Fadhila, Karima,
Sabrina et Malika et de la promo 2016-2017, Nesrine, Sahra,
Soumia, Amina et Fatima**

**Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du
moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.**

ZITOUNI Rabab.

Dédicace

Au nom d'Allah Le tout puissant, qui nous a permis de mener à

Bien cemoeste travail .Je dédie ce travail

**A ma très chère mère qui m'a apporté son appui durant toutes
mes années d'étude, pour son sacrifice et son soutien qui m'ont
donné confiance, courage et sécurité**

**A mon très cher père qui m'a appris le sens de la persévérance
tout au long de me études, pour son sacrifice ses conseils et ses
encouragements.**

**IL me tient énormément à cuore de vous dire merci bien que ce
simple mot n'égalera jamais**

Tout ce que vous avez fait pour moi.

Je le dédit également ;

A mes chères frères et sœur khadidja, hadjer, Mohamed,

Abd al rahim, Rabah et leur fis fidaa

Et bien sur ma chère fiancée salim

Ma tonte Rebiha et toute ma famille

Sans oublier mes chères amies Khaoula,

karima, Wahida, Nesrine, Sarah, soumia, fatima

**A mon binôme Rabab pour les sympathiques moments qu'on a
passé ensemble**

**Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du
Moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur.**

KHALDI Meriem.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales activités biologique des composées phénolique.....	17
Tableau 2 : La gamme étalonnage de BSA utilisé pour le dosage de protéines.....	35
Tableau 3 : La gamme d'étalonnage de glucose pour le dosage des glucides.....	36
Tableau 4 : La gamme d'étalonnage de vanilline pour le dosage des lipides.....	36
Tableau 5 : Caractérisation phytochimiques de la poudre des feuilles de <i>Buxus sempervirens L</i>	38
Tableau 6 : Rendement de l'extraction des polyphénols de la poudre du buis.....	42
Tableau 7 : Rendement de l'extraction des alcaloïdes de la poudre du buis.....	43
Tableau 8 : Analyse de la variance du traitement par les polyphénols du Buis.....	44
Tableau 9 : Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et les valeurs de TL50des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par les polyphénols du Buis.....	45
Tableau 10 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par les polyphénols du buis.....	45
Tableau 11 : Analyse de la variance du traitement par l'extrait aqueux du buis.....	46
Tableau 12 : Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et valeurs de TL50des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par l'extrait aqueux du Buis.....	47
Tableau 13 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par l'extrait aqueux du Buis.....	47
Tableau 14 : Analyse de la variance du traitement par des alcaloïdes du buis	48

Tableau 15: Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et valeurs de TL50 des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par les alcaloïdes du Buis.....	49
Tableau 16: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> traitées par les alcaloïdes du Buis.....	49
Tableau 17 : Résultats d'évolution du poids d'une larve dans le temps.....	51
Tableau 18 : Résultats d'évolution du poids d'une larve dans le temps.....	52

Liste Des Figures :

Figure1 : Cycle de développement de <i>Galleria mellonella</i>	4
Figure2 : Amas des œufs de la grande fausse teigne	5
Figure3 : Larves de <i>Galleria mellonella</i>	6
Figure4 : Pupa de <i>Galleria mellonella</i>	6
Figure 5 : Adultes de <i>Galleria mellonella</i> , (A) mâle, (B) femelle.....	7
Figure 6 : Copulation de la fausse teigne	8
Figure7 : Cadre attaqué par <i>Galleria mellonella</i>	8
Figure 8 : Buis « <i>Buxus sempervirens L.</i> »	14
Figure 9 : Feuilles du Buis.....	14
Figure 10 : Structure de buxine.....	19
Figure 11 : Schéma récapitulatif de différentes étapes du travail.....	22
Figure 12 : préparation de l'infusé à 20%	23
Figure 13 : schéma simplifié du protocole d'extraction des composés phénoliques	25
Figure 14 : Préparation des extraits phénoliques.....	26
Figure 15 : Préparation de l'extrait aqueux.....	26
Figure 16 : Extraction des alcaloïdes.....	27
Figure 17 : schéma simplifié du protocole d'extraction des composés phénoliques.....	28
Figure 18 : Elevage des larves de <i>Galleria mellonella</i>	29
Figure 19 : Différents substrats alimentaires donner aux larves	31
Figure 20 : Préparation des différentes doses D1, D2, D3.....	31
Figure 21 : Préparation des lots.....	32
Figure 22 : Injection des polyphénols dans l'extrémité abdominale de la larve de <i>Galleria mellonella</i>	34
Figure 23 : Taux de la mortalité corrigée chez les individus de <i>Galleria mellonella</i> Traités les polyphénols de Buis.....	43

Figure 24 : Taux de mortalité journalière corrigé chez les larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> Traitées par l'extrait aqueux du Buis.....	46
Figure 25 : Taux de mortalité journalière corrigé chez les larves L5 de <i>Galleria mellonella</i> Traitées par les alcaloïdes du Buis.....	48
Figure 26 : Concentrations en protéines hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.....	50
Figure 27 : Concentrations en glucides hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.....	50
Figure 28 : Concentrations en lipides hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.....	51
Figure 29 : Résultats d'évolution du poids d'une larve dans le temps.....	52

Liste des abréviations

Ad : Adule

B : Boîte

BBC : Bleu de coomassie

BSA : Sérum Albumine Bovine

C : Concentration

D : Dose

DL₅₀ : Dose létale pour 50% de mortalité des individus

Do : Densité Optique

ET : Ecart type

G : Galleria

H : Heures

J : Jours

L₅ : Larves de cinquième stade

M : Moyenne

MC : Mortalité Corrigées

Mi : Milieu

NL : Nombre de larves

P : Poids

Pu : Pupa

R : Répétition

R² : Coefficient de Corrélations

T : Témoin

TL₅₀ : Temps létale pour 50 % de mortalité des individus

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I- Données bibliographiques sur La fausse teigne	3
I-1-Généralités.....	3
I-2-Classification.....	3
I-3-Biologie et caractères morphologiques	4
I-3-1- le cycle de développement.....	4
I-3-2-Accouplement.....	7
I-4- Les symptômes et Les dégâts de la fausse teigne	8
I-5-Lutte contre la fausse teigne.....	9
I-5-1-Méthodes préventives.....	9
I-5-2-Méthodes techniques et physiques.....	9
I-5-3-Méthodes chimiques.....	10
I-5-4-Méthodes biologiques.....	10
II- Données bibliographiques sur le Buis « <i>Buxus sempervirens L.</i>».....	12
II-1 Historique de Buis.....	12
II-2- Systématique.....	12
II-3- Origine du nom et nomenclature.....	13
II-4- Répartition géographique.....	13
II-5- Description botanique.....	13
II-6-Les variétés du Buis.....	15
II-7- Usage et utilisations du buis	15
II-8-Composition chimique	16
II-8-1-Les polyphénols.....	16
II-8-1-1-Activités biologiques des polyphénols.....	17
II-8-1-2-Activité antioxydant	18
II-8-1-3-Activité insecticide.....	18
II-8-1-4-Intérêt diététique des polyphénols.....	18

II-8-2-Les alcaloïdes	18
II-8-2-1-Les alcaloïdes stéroïdiens.....	19
II-9- Toxicité du Buis	20
Chapitre II : Matériels et méthode	
I-Matériels.....	21
I-1-Matériel Biologique.....	21
I-1-1- Matériel végétal.....	21
I-1-2- Choix de l'espèce d'insecte.....	21
I-2- Matériel non biologique.....	21
II- Méthode de récolte, séchage, broyage et conservation.....	21
II-1-Récolte.....	21
II-2-Séchage.....	21
II-3- broyage et conservation.....	21
III- Screening phytochimique.....	23
III-1- Préparation de l'infusé à 20%.....	23
III-2- La phytochimie.....	23
III-3- Extraction des composés phénoliques.....	25
III-3-1- Extraction des polyphénols	25
III-3-2- Préparation de l'extrait aqueux.....	26
III-3-3- Extraction des alcaloïdes.....	27
III-3-4- Récupération des alcaloïdes.....	29
IV-Evaluation de l'activité insecticide des composés phénolique	29
IV-1-Elevage des larves	29
IV-2- Effet de la nutrition larvaire sur le développement de <i>G. mellonella</i>	30
IV-3- Evaluation de l'activité biologique de buis sur les larves de <i>G. mellonella</i>	31
IV-3-1- Préparation des différentes doses.....	31
IV-3-2- Préparation des lots.....	32
IV-3-3- Mode d'application des traitements.....	32
IV-3-4- Paramètres étudiés.....	32
IV-4- Dosage des métabolites hémolymphatiques.....	34
IV-4-1- Dosage quantitatif des protéines.....	34
-Principe	34
-Technique de dosage.....	34
IV-4-2-Dosage quantitatif des glucides.....	35

-Principe.....	35
-Technique de dosage.....	35
IV-4-3- Dosage quantitatif des lipides	36
- principe.....	36
-Technique de dosage.....	36
IV-5- Analyse statistique.....	37
Chapitre III : résultats et discussions	
I-Screening phytochimique.....	38
II- Extraction des composés phénolique	42
II-1- Rendement de l'extraction des polyphénols.....	42
II-2- Rendement de l'extraction des Alcaloïdes.....	42
III-Etude de la toxicité du Buis sur les larves L5 de <i>Galleria mellonella</i>.....	43
III-1-Effet des polyphénols.....	43
III-1-1-Taux de mortalité.....	43
III-1-2-TL50.....	44
III-1-3- DL50.....	45
III-2- Effet d'extraits aqueux du buis	46
III-2-1-Taux de mortalité.....	46
III-2-2-TL50.....	47
III-2-3- DL50.....	47
III-3- Effet des alcaloïdes du buis	48
III-3-1- Taux de mortalité.....	48
III-3-2-TL50.....	49
III-3-3- DL50.....	49
IV-Etude de l'effet du Buis sur les métabolites hémolympatiques des larves L5 de <i>Galleriamellonella</i>.....	50
V-Effet du substrats alimentaires sur le développement de <i>Galleria mellonella</i>	51
VI-Discussion générale.....	53
Conclusion et Perspectives.....	55
Références bibliographique.....	57
Annexe	
Résumé	



Introduction

Introduction

L'abeille est un insecte social qui intervient dans la pollinisation et qui assure la production du miel, de la gelée royale, de la cire et de la propolis (**Gallia et al., 2009**).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs témoignages et articles de presse ont rapporté un affaiblissement et une mortalité inhabituels des colonies d'abeilles dans plusieurs pays du monde (**Boucher, 2009**). Parmi les facteurs de destruction des ces précieux insectes, leurs ennemis naturels tel que : les fourmis, les oiseaux, les lézards, le varroa et la fausse teigne ...etc.

Cette dernière appelée aussi la mite de cire (*Galleria mellonela*) est largement distribuée dans le monde entier, causant des problèmes sérieux dans les régions d'apiculture tempérées, tropicales et subtropicales ou la température chaude favorise son développement rapide (**Spangler, 1989**). En effet, la mite endommage la cire seulement pendant ses stades larvaires, il à été signalé que les larves obtiennent leurs substances nutritives à partir du miel (**Adel-Naby et al., 1983 ; Mohamed,1983 ; Gulati et Kaushik,2004**).

A part la destruction de la cire, les teignes adultes et leurs larves peuvent transmettre les agents pathogènes de maladies graves pour les abeilles tel que : la loque américaine (**Hansen et Brodsgaar, 1999**).

Pour lutter contre la fausse teigne, on utilise des pesticides (**Borchert, 1966**), bien que ces fumigations soient efficaces et économiques, ils ont conduit à des effets secondaires inattendus tels que l'épuisement de l'ozone, la pollution environnementale, la résistance des ravageurs et la nocivité pour l'organisme. Au cours de ces dernières décennies, l'application abusive et non raisonnée de pesticides synthétiques a entraîné aussi l'apparition d'insectes résistants (**Georghiou, 1990**).

Tous ces problèmes liés à la nocivité des insecticides synthétiques ont abouti à la nécessité de trouver des alternatives plus efficaces et plus saines. Ainsi les insecticides naturels de plantes, présentent plusieurs avantages par rapport aux composés synthétiques à cause de leur biodégradation rapide et la réduction des risques pour l'environnement (**Park, 2003 ; Andréa, 2011**).

Le buis est une plante ornementale et toxique, qui appartenant à la famille des *Buxaceae* est contient des alcaloïdes principalement la buxine, qui lui donnent cette toxicité. et une action insecticide (Nedelec, 1993).

Dans ce cadre la présente étude est centrée sur la recherche d'un produit insecticide naturel à partir de l'extrait du Buis « *Buxus sempervirens L.* ».

L'objective principale est l'évaluation de l'activité insecticide des polyphénols, des alcaloïdes et de l'extrait aqueux du Buis « *Buxus sempervirens L.* » à l'égard de *Galleria mellonella*.

Pour mener à bien notre étude, il semble nécessaire de présenter trois parties: la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique sur la fausse teigne *Galleria mellonella*, la présentation de la plante étudiée « *Buxus sempervirens L.* » ainsi que les métabolites secondaires tels que les polyphénols et les alcaloïdes. La seconde partie concerne la partie expérimentale.

Enfin la troisième partie regroupe les résultats trouvés et les discussions relatives à chaque paramètre étudié.

Chapitre I



Synthèse bibliographique

I- Données bibliographiques sur La fausse teigne

I-1-Généralités

La fausse teigne (*Galleria mellonella*) est un insecte lépidoptère de la famille des pyralidae. Elle est aussi appelée « gallérie ». C'est la seule espèce du genre *Galleria*. Ce papillon volant de Mai à Octobre a une envergure de 30 à 41 mm. La larve pose problème aux apiculteurs car elle se nourrit des rayons de cire des ruches (Von Frish, 2011).

Ces insectes se développent dans les zones sombres, chaudes mal ventilées et qui ne sont pas bien défendues par les abeilles (Paddock, 1918 ; wiliams, 1997 ; Gillard, 2009 ; Ellis et al.,2013). Les larves émergées des oeufs sont par conséquent les ravageurs importants des rayons de cire, en particulier dans les colonies stressées, et peut protégées (Chase, 1921 ;Smith, 1965 ; Eischen et Dietz, 1987 ; Dessalegn, 2001). En faisant des tunnels à travers et détruisent les cellules en forme de peigne.

I-2-Classification

Selon Fernandez et Coineau (2007), Cet insecte est classé comme suit :

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Lepidoptera

Sous-ordre : Ditrysia

Super-famille : Pyraloidea

Famille : Pyralidae

Sous-famille : Galleriinae

Genre : *Galleria*

Espèce : *Galleria mellonella*

I-3-Biologie et caractères morphologiques

Il existe deux types de fausses teignes, grande taille (*Galleria mellonella*) et l'autre de petite taille (*Achroea grisella*). La grande fausse teigne *Galleria mellonella* cause des problèmes économiques aux abeilles mellifères (*A. mellifera*) et ils sont très répandus en particulier à basse altitude et dans les régions tempérées (Allan, 2000). Lorsque la température est trop basse (moins de 10 °C), le développement s'interrompt pour ne reprendre que lorsqu'elle dépasse 9°C. Le développement est maximal à partir de 29°C. et le cycle de développement peut durer de 6 semaines à 6 mois (Charrière et Imdorf, 1999).

Si les conditions sont idéales, le cycle ne dure que 6 semaines soit 4 à 6 générations par année. La femelle de la grande fausse teigne peut pondre plus de 20000 œufs dans sa vie (Warren et Huddleston, 1962).

I-3-1- le cycle de développement de *Galleria mellonella* : il est constitué par les stades suivants: œuf, larve (Chenille), puppe (chrysalide) et adulte (Fernandez et Coineau, 2007)(Figure 1).



Figure 1 : Cycle de développement de *Galleria mellonella* (Charrière et Imdorf, 1999).

- **Œuf**

Les oeufs de *Galleria mellonella* sont de couleur blanc nacré au rose pâle et de 0.5mm de diamètre (**Charrière et Imdorf, 1997**). Ils ont une texture rugueuse en raison de lignes ondulées en cours d'exécution en diagonale à intervalles réguliers. La texture de surface supérieure des œufs de grande fausse teigne diffère de celle des autres œufs des parasites de la cire (**Williams, 1997**).

Dans la plupart des cas, la grande fausse teigne femelle pond de 50 à 150 œufs, ces œufs se développent rapidement à des températures comprises entre 29°C et 35°C, et lentement (d'environ 30 jours) à la température de 18°C (**Williams, 1997**) (**Figure 2**).



Figure 2 : Amas des œufs de la grande fausse teigne (Williams, 1997).

- **Larves**

Les grappes d'œufs éclosent après 5 à 8 jours et les minuscules larves commencent immédiatement à se nourrir de miel, de cire et de pollen. Au cours du développement et dans les dix premiers jours, les larves peuvent doubler leur poids tous les jours grâce aux conditions favorables de la nourriture, ce qui permet de multiplier les dégâts occasionnés à la ruche (**Razafindrazaza, 2010**).

Les larves matures tissent des cocons blancs qu'elles cimentent dans une cavité creusée dans la paroi du corps de la ruche ou des hausses ou sous le couvercle. Dans le cocon, la larve se transforme en puppe (**Razafindrazaza, 2010**) (**Figure 3**).



Figure 3 : Les larves de *Galleria mellonella* (Razafindrazaza, 2010).

- La Puppe

Le stade de développement de la puppe de grandes fausses teignes varie selon la saison et la température de 6 à 55 jours (**Williams, 1997**). Le temps de développement de larves des grandes fausses teignes en pupes dans les plages de cocon est de 3,75 jours à 6,4 jours selon la température. A l'intérieur du cocon, la chrysalide nouvellement formée est blanche et devient jaune après 24 heures (**Paddock, 1918**). Après quatre jours elle devient brune claire qui assombrit progressivement, devenant brune foncée à la fin de la nymphose, ils sont de 12 à 20 mm de long et 5 à 7 mm de diamètre (**Williams, 1997**) (**Figure 4**).



Figure 4 : Puppe de *Galleria mellonella* (Photo originale).

- L'adulte

La grandeur et la couleur des adultes peuvent fortement varier en fonction du type de nourriture consommée par la larve et durée des différents stades de développements. Les femelles sont plus grandes que les mâles (**Shimanuki, 1981**). La femelle commence à pondre ses œufs entre le 4ème et le 10ème jour après l'émergence du cocon (**Shimanuki, 1981**). C'est à la tombée de la nuit que la femelle cherche à pénétrer dans les ruches pour y pondre ses oeufs. Si la colonie est forte et qu'elle n'y parvient pas, elle dépose ses œufs à l'extérieur dans les fontes du bois. Les deux sexes de *Galleria mellonella* son représentés sur la **Figure 5**.



Figure 5 : Adultes de *Galleria mellonella*, (A) mâle, (B) femelle (Ellis *et al.*, 2013).

I-3-2-Accouplement

La reproduction des papillons débute en général par l'accouplement provoqué par les femelles qui s'éloignent très peu de leur zone d'éclosion et qui émettent des signaux chimiques (phéromones) pour attirer les mâles vers elle. En revanche, pour le papillon « fausse teigne » ce sont plutôt les mâles qui émettent des ultrasons et usent de leurs phéromones pour charmer et attirer les femelles vierges qui sortent de la ruche au crépuscule pour s'accoupler. Après l'accouplement et à la tombée de la nuit, les femelles retournent dans les ruches pour y pondre (**Fernandez et Coineau, 2007**) (**Figure 6**).



Figure 6 : Copulation de la fausse teigne, femelle à droite et mâle à gauche (Charrière et Imdorf, 1999).

I-4- Les symptômes et Les dégâts de la fausse teigne

Les fausses teignes adultes ne provoquent pas les dégâts. Seules les larves se nourrissent et détruisent les rayons, par contre les adultes et leurs larves transmettent les agents pathogènes de maladies graves pour les abeilles tel que la loque américaine (**Bourchert, 1966**) (Figure 7).



Figure 7 : Cadre attaqué par *Galleria mellonella* (Photo originale).

Les larves de la grande fausse teigne se nourrissent de rayons de cire, peaux larvaires exprimés, pollen, et un peu de miel (**Shimanuk et al ., 1992**). Une fois que les larves de fausse teigne ont finies leur alimentation, ils recherchent un endroit où attacher leurs cocons, certaines larves sont capables de percer dans le bois et créer une zone pour la fixation de cocon (**Williams,1997**).

L'attaque se caractérise également par le soulèvement des nymphes d'abeilles qui apparaissent non operculées. Un blocage de ponte d'abeilles et une destruction du couvain existent si les galeries faites par les teignes sont nombreuses. Les larves de *Galleria mellonella* prennent d'abord possession des cadres abandonnés par la colonie puis elles attaquent les autres et enfin tous les cadres sont recouverts des soies (**Razafindrazaza, 2010**).

I-5-Lutte contre la fausse teigne

Il existe différentes méthodes pour contrôler la fausse teigne :

I-5-1-Méthodes préventives

La fausse teigne peut s'installer facilement dans une ruche d'abeille, et pour l'éviter la colonie d'abeille doit être forte et un volume de ruche en adéquation avec la taille de la colonie sont indispensables (**Hummel et Feltin, 2014**). Sur les ruches infectées, il faut éliminer les cadres infectés par le feu et resserrer la colonie sur ruches seulement quelque cadre sain (**Hummel et Feltin, 2014**).

D'autre part avant de stocker les hausses et les corps des ruches vides, il est indispensable de les désinfecter à la flamme et les stocker en les empilant sur une hauteur minimale de deux mètres pour créer un courant d'air ascendant naturellement. Et il faut nettoyer périodiquement les déchets sur les plateaux de fond grillagé et renouveler régulièrement les rayons (**Charrière et Imdorf, 1999**).

I-5-2-Méthodes techniques et physiques

-La luminosité et la ventilation

Les fausses teignes n'aiment pas la lumière et le vent. Donc, au besoin, on peut empiler les hausses sur le côté dans un endroit éclairé et exercer une ventilation mécanique avec un ventilateur.

On peut éviter les attaques de fausses teignes en plaçant les cadres dans un endroit ventilé, frais (**Adam, 2012**).

-Le froid

Le développement de la fausse teigne cesse dès que la température approche les 5 degrés Celsius. Le traitement par le froid est relativement efficace pour détruire tous les stades vivants (**Shimanuki, 1981**). Si un cadre est attaqué, on peut éliminer la fausse teigne en congelant le cadre à (-15 °C) pendant 45 minutes au minimum (**Adam, 2012**).

1-5-3-Méthodes chimiques

On peut lutter chimiquement contre la fausse teigne par :

-l'acide acétique qui tue rapidement les œufs et les papillons, les cadres doivent être traités immédiatement après le retrait des colonies, avant que les œufs ne deviennent des larves (**Charrière et Imdorf, 1999**).

- L'acide formique peut aussi être utilisé avec succès contre la fausse teigne. Le mode d'action est comparable à ce dernier (**Charrière et Imdorf, 1999**).

-l'anhydride sulfureux (SO₂) permet d'éliminer les traces de la fausse teigne (**Adam, 2012**).

1-5-4-Méthodes biologiques

-Trichogrammes

Depuis longtemps les trichogrammes sont utilisés pour lutter contre la pyrale du maïs. Ils ont la capacité de parasiter les œufs des teignes pour les convertir en larve de trichogramme au lieu de larve de teigne. Cet agent auxiliaire a été utilisé comme moyen de lutte contre la fausse teigne pour la première fois en Allemagne en 1996 (**Bollhalder, 1997**).

-Spore de *Bacillus thuringiensis*

Le B401 est un insecticide biologique spécialement sélectionné et mis au point pour protéger les cadres contre la fausse teigne. La matière active est un complexe de spores vivantes et de cristaux de delta endotoxine de *Bacillus thuringiensis*. Cette bactérie est

inoffensive pour les vertébrés, et les abeilles et ne laisse aucun résidu dans la cire ou le miel (**Charrière et Imdorf, 1999**).

-Nématodes entomopathogènes

Les nématodes peuvent causer des mortalités chez les larves de la fausse teigne en les infectants. Des techniques peuvent être utilisés pour tester le temps de l'exposition, la dose de nématodes (souvent mesurée en nématodes "JI" ou Juvéniles infectieux), la température de l'exposition, et de nombreux autres facteurs sur l'infection de taux de la mortalité chez la fausse teigne (**Ellis *et al.*, 2013**).

II- Données bibliographiques sur le Buis « *Buxus sempervirens* L.»

II-1 Historique de Buis

Connu de toute l'antiquité et estimé dès l'époque néolithique pour son bois aux usages variés et souvent plus lourd que l'eau, le buis a été mentionné par de nombreux écrivains grecs et latins. On le cultivait dans les jardins et les parcs au temps de l'Empire romain ; de même, au moyen âge dans les jardins des monastères et des châteaux. Dès cette époque, il jouait un rôle médicinale. Sainte Hildegarde (XIIe siècle) le recommande comme dépuratif et antidartreux. Albert le Grand, au siècle suivant en décrit les deux races principales, la naine et la grande (**Bruneton, 2005**).

Au XVIe siècle beaucoup de monde contestait encore son utilité médicale et Matthioli protesta là-contre, en affirmant que la lessive de buis, utilisée pendant un certain temps, rend les cheveux roux et rapportant que la râpure de même bois, au dire de certains, coupe les diarrhées, enfin en mentionnant son emploi comme succédané de Gaïac. Depuis lors, nombreux sont les médecins qui l'ont préconisé de même, entre autre Brassavole, de l'Obel, Gardel, Gilibert, Roques Bodard,..... etc., Cazin en a obtenu de bons résultats comme antiarthritique, Artaut de Vevey (1914-1916) comme fébrifuge et cholagogue, bâillon comme sudorifique. L'homéopathie en utilise une « essence » (**Bruneton, 2005**).

II-2- Systématique

Selon Linné 1753

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Euphorbiales</i>
Famille	<i>Buxaceae</i>
Genre	<i>Buxus</i>
Espèce	<i>Buxus sempervirens</i> L.,

II-3- Origine du nom et nomenclature

Le Bui doit son nom à son fruit : le latin *buxus* est tiré du *puxos*, le nom grec de cet arbuste, lui-même dérivé de *puxis*, signifiant « Boite » (l'anglais box a la même origine).

Il se rapporte à la forme complexe du fruit qui évoque un coffret sophistiqué. *Sempervirens* « toujours vert » fait allusion au feuillage persistant (Delpart, 2007).

Plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante :

Nom scientifique : *Buxus sempervirens*

Autres noms scientifiques : *Buxus wallichiana*, *Buxus suffruticosa*, *Buxus myrtifolia*, *Buxus hyrcana*, *Buxus colchica*, *Buxus arborescens*, *Buxus sempervirens var. suffruticosa*, *Buxus sempervirens var. arborescens*

Noms vernaculaires arabe et berbère : الشمشار , شجرة البقس, ivkis azazou (Delille, 2007).

Noms vernaculaires anglais : box, box tree, boxwood (Frohne et Pfander, 2005)
Bexhill, Hill, commun box (Vernier, 1997).

Noms vernaculaires français : Bois béni, Bois d'Artois, Buis, Buis commun, bois arborescent (Lelong, 2008).

II-4- Répartition géographique

Les Buis sont des arbrisseaux compacts ou des arbustes distribués depuis les régions méditerranéennes jusqu'en Extrême-Orient en passant par le Caucase.

Le genre comprend 45 espèces dont certaines vivent aux Antilles, en Afrique, en Asie et en Amérique centrale (Élisabeth et Jullien, 2010). L'Europe n'héberge qu'une seule espèce, le buis commun, qui vit dans l'ouest, le sud et le centre de continent.

On le retrouve sporadiquement dans le sous-bois des forêts mixtes, où il forme souvent des fourrés, ainsi dans les lieux secs et rocailleux ; il pousse de la plaine jusqu'en montagne, de préférence sur sol calcaire (Bertrand, 2001).

II-5- Description botanique

Le buis est un arbuste de la famille des Buxacées à bois très dur, la hauteur moyenne de cette arbre est de 1 à 5m, et peuvent atteindre 8m (Stichmann et Stichmann-maruy, 2000), avec de jeunes rameaux tétragones, les feuilles sont persistantes, opposées décussée à limbe coriace et à pétioles très court, ovales ou oblongue, de 3 à 6 cm de long, à dessus

convexe, la couleur des feuilles est d'un vert sombre brillant sur la face supérieure, vert jaunâtre sur la face inférieure. Les fleurs sont petites, assemblées en inflorescences condensées, unisexuées (plante monoïque) périanthe réduit à des sépales blanc crème, les fleurs mâles petites blanchâtres en glomérules entourent une fleur femelle centrale, rappelant que la floraison se fait en mars-avril (Nedelec, 1993).

Les fruits sont des capsules se séparant en trois valves à chacune deux cornes et deux graines (Somon et Botineau, 2007).

Sa multiplication est aisée ; elle s'effectue de septembre à mars au moyen de boutures ligneuses sur une couche chaude ou en serre, la croissance de buis est très lente (Bertrand, 2001).



Figure 8 : Le Buis « *Buxus sempervirens L.* » (Photo originale)



Figure 9 : Les feuilles du Buis (photos originales)

II-6- Les variétés du Buis

Il existe quatre variétés de *Buxus* les plus cultivées :

- *Buxus sempervirens* ' « Suffruticosa » arbuste naturellement nain, de 50 à 70 m, c'est celui qui est utilisé pour les bordures basses dans les jardins à la française (**Godet, 2007**).
- *Buxus sempervirens* « Rotundifolia » à feuilles rondes, si utiles pour les formes en boule ou en cône, est également le plus utilisé en haie (**Pereire, 1994 ; Godet, 2007**).
- *Buxus sempervirens* « Pyramidalis », idéal pour la conduite en boule ou en cône, ces feuilles sont vertes (**Miolane, 2008**).
- *Buxus balearica* ou Buis de Mahon, devient un petit arbre de 5 m en culture. Il est beaucoup plus haut dans son pays d'origine, les Baléares. Ses fleurs sont vraiment jaunes au printemps et son feuillage plus plat et plus joli que celui de *Buxus sempervirens*, mais il est moins rustique (**Godet, 2007**).

II-7- Usage et utilisations du buis

Dans la nature, le Buis commun peut vivre 500 ans. Son port est assez variable, on peut trouver des arbrisseaux compacts hauts de 1 m que des arbustes de 6 m à silhouette élancée. Très résistant, il pousse parfois dans des endroits très secs et supporte bien la pollution atmosphérique. Il est très utilisé dans les jardins à la française où l'on façonnait sa silhouette à volonté ; à cette effet, on emploie souvent le cultivar bas « Suffruticosa ».

Les haies de Buis commun sont des barrières efficaces contre le bruit et les odeurs. Il est connu aussi pour son bois très dense dont on sert pour fabriquer des manches d'outils ; il est également très prisé en sculpture sur bois et en ébénisterie (**Bertrand, 2001**).

Les feuilles de buis utilisées dans les traitements de l'épilepsie et pour améliorer la circulation sanguine ; stimulant la vésicule biliaire.

Le buis était employé aussi pour soigner les rhumatismes chroniques, la goutte et les accidents syphilitiques. Il était réputé pour traiter avec succès les fièvres d'origine paludéenne et les affections intestinales et hépatiques .Il est encore traditionnellement utilisé pour arrêter les maladies de type viral comme la grippe (**Couplan, 2009**). Comme purgatif on emploie les feuilles, soit en infusion (30 à 60 g par litre), soit en poudre après dessiccation (2 à 4 g par litre suivant l'effet à obtenir, dans du miel, du sucre ou du sirop de gomme).En médecine vétérinaire les feuilles du Buis sont utilisées comme

purgatif,seulement il ya lieu de proportionner la dose à la taille des animaux afin d'éviter les effets toxiques (**Fournier, 2010**).

On cosmétique les extraits de buis sont employés pour le soin des peaux grasses.

L'ensemble de ces propriétés font des extraits de buis un bon actif dans :

- Des produits de soin du visage (crèmes astringentes pour peaux normales à grasses, peaux mixtes et peaux acnéiques)
- Produits de soin capillaire (shampooings pour cheveux normaux et cheveux gras) on en lotionne les cheveux pour les fortifier.
- Les feuilles de buis servaient traditionnellement à laver les lainages noirs de nos grand-mères (**Couplan, 2009**).

II-8-Composition chimique :

Les compositions chimiques sont des molécules issues du métabolisme des végétaux (ou des animaux), on distingue deux classes: métabolites primaires et métabolites secondaires.

- **Les métabolites primaires:** sont caractérisés par leur propriété nécessaire et vitale à la survie de la cellule ou de l'organisme. Ils sont divisés en trois groupes; les glucides, les lipides et les acides aminées (**Kone, 2009; Badiaga, 2012**).
- **Les métabolites secondaires:** ne sont pas vitaux pour la cellule ou l'organisme, ces molécules sont présentes en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire.
- Il est impossible de montrer une fonction commune à l'ensemble des métabolites secondaires, mais on peut remarquer de nombreuses interactions entre les plantes qui les élaborent et les autres organismes vivants. Ces métabolites sont divisés en trois groupes; les composés phénoliques, les terpénoïdes et stéroïdes et les composés azotés ou alcaloïdes (**Guignard et al., 1985; Badiaga, 2012**).
- **II-8 -1-Les polyphénols :**
Dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire (**Huang et al.,2008 ; Japon-Lujan et al., 2008**).On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (**Keys et al., 1975**). Contribuant ainsi à la survie de l'organisme

dans son écosystème. Le terme « phénol » englobe approximativement 10000 composés naturels identifiés (Keys *et al.*,1981 ; Gerber *et al.*, 1994).

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones, auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Lesage-Meessen *et al.*, 2001; Bouaziz *et al.*,2008)

II-8-1-1-Activités biologiques des polyphénols

Les composées phénoliques sont dotés d'activités diverses, le tableau suivant, englobe les activités des polyphénols les plus importantes

Tableau 1 : Principales activités biologiques des composées phénoliques.

Classes de polyphénols	Activités	Références
Acides phénoliques	- Anti carcinogènes et anti mutagènes - Anti oxydantes	- Ferguson (2001) - Sarni-Manchado et Chenyier (2006)
Stilbénes	- Inhibent l'oxydation des LDL et l'agrégation des plaquettes - Anti carcinogènes Anti mutagènes	- Sarni-Manchado et Chenyier (2006) - Ferguson (2001)
Coumarines	- Anti carcinogènes et anti mutagènes - Digestibilité des protéines	- Ferguson (2001) - Lazoui <i>et al.</i> (2006)
Flavonoïdes	- Anti carcinogènes et anti mutagènes - Anti oxydantes	- Ferguson (2001) - Sarni-Manchado et Chenyier (2006)
Anthocyanes	- Coloration et Anti oxydants	- Alothane <i>et al.</i> (2009)
Tanins	- Anti oxydants et anti tumoral - Digestibilités des protéines	- Mousavinejade <i>et al.</i> (2009) -Lazoui <i>et al.</i> (2006)

II-8-1-2-Activité antioxydant

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres découlant aussi bien des réactions d'oxydations de différents nutriments que de celles de l'organisme. Ce sont des antioxydants primaires et radicalaires, qui peuvent ralentir la formation de radicaux libres et interrompre la chaîne autocatalytique (**Rolland, 2004**).

II-8-1-3-Activité insecticide des polyphénols

Certains polyphénols ont une action insecticide qui se manifeste surtout par un effet attractif accompagnée d'une immobilisation. A cette activité insecticide directe (toxicité sur l'adulte) s'ajoute une activité anti-nutritionnelle, ainsi qu'une inhibition de la reproduction par diminution de la fécondité et un effet ovicide et larvicide limitant le renouvellement des générations. L'ensemble des effets se conjugue pour amoindrir le flux des insectes et améliorer leur contrôle. Parmi ces poly-phénols, on peut citer des flavanones, les flavones, les flavanonols, les flavonols, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide gallique, et autres acides phénols dérivés de l'acide ou de l'acide benzoïque, la catéchine, la quercétine, la rutine et la maringine (**Regnault-Roger et al., 1994**)

II-8-1-4-Intérêt diététique des polyphénols

Ces composés sont également impliqués dans la prévention de nombreux cancers à différents stades (**Calabresse, 2003 ; Morelle, 2003**). Ils peuvent également exercer des effets protecteurs contre les maladies hormonodépendantes telle que l'ostéoporose en modulant la réponse aux œstrogènes et aux androgènes (**Guignard, 2000**). Enfin, les polyphénols possèdent des propriétés antivirales, antiprolifératives, anti-âge, antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires (**Scalbert et al., 2002; Morelle ; 2003 Farkas et al., 2004**).

II-8-2-Les alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine végétale, azotées et à caractère alcalin possèdent presque tous une molécule azotée (-NH₂) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées c'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea* syn. *Catharanthus roseus*) employé pour traiter certain types de cancer. D'autres

alcaloïdes, comme la buxine présente dans la Buis « *Buxus sempervirens L.* » ont une action directe sur le corps : utilisé pour arrêter les maladies de type viral comme la grippe.

On divise les alcaloïdes en trois genres (**Bruneton, 1987 ; Bruneton, 2009**) :

- ✓ Les alcaloïdes vrais : qui représente le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activité biologique.
- ✓ Les pseudo-alcaloïdes : présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. Les alcaloïdes astéroïdaux et les purines sont les représentants principaux de cette classe d'alcaloïdes.
- ✓ Les protoalcaloïdes : sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique.

II-8-2-1- Les alcaloïdes stéroïdiens : Les alcaloïdes stéroïdiens sont un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (lipides à 30 atomes de carbones), ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe partiellement ou totalement hydrogène. Habituellement, les carbones C₁₀, C₁₃ sont liés à un groupe méthyle -CH₃ et le carbone C₁₇ à un groupe alkyle (**Brid *et al.*, 1971**)

✓ **Buxine :**

La Buxine est un alcaloïde stéroïdiens existe dans toutes les parties de la plante ; elle est de couleur rougeâtre, mais on peut la rendre presque blanche ; la buxine provoque l'éternuement, elle est peu soluble dans l'éther, soluble dans l'alcool, insoluble dans alcalis (**Peschier et Jacquemin, 1829**).

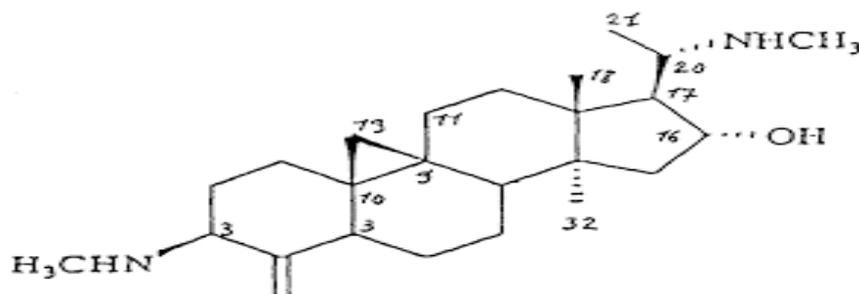


Figure 10:Structure de buxine (Peschier et Jacquemin, 1829).

II-9- Toxicité du Buis

Si le Buis est conseillé dans certains ouvrages en tant que « dépuratif », voir fébrifuge et cholagogue, il faut savoir que toute la plante contient des alcaloïdes stéroïdiques, responsables d'intoxications particulièrement chez les herbivores, surtout les bovins chez qui elles peuvent être fatales, Il semble donc peu raisonnable de le conseiller en usage interne chez l'homme, même si les accidents sont exceptionnels. Quant à l'usage externe, préconisé certaines affections dermatologiques, il ne présente guère d'intérêt (**Botineau, 2007**).

Chapitre II



Matériels et méthodes

L'objectif de ce travail est de faire l'extraction des principes actifs du Buis « *Buxus sempervirens* L. » dans le but d'évaluer leurs activités insecticides vis-à-vis de la fausse teigne de ruches *Galleria mellonella*.

Les différentes manipulations ont été réalisées grâce à la contribution du Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique (VALCOR) et du laboratoire de Biologie des Populations et des Organismes (BPO), tous deux sis à la Faculté des sciences de l'université de M'Hamed Bougara de Boumerdes (UMBB).

I- Matériel

I-1- Matériel Biologique

I-1-1- Matériel végétal

Une espèce végétale de la famille des *Buxaceae* a été choisie pour la présente étude il s'agit du Buis « *Buxus sempervirens* L. ».

I-1-2- Choix de l'espèce d'insecte

L'insecte choisi pour cette étude est la fausse teigne des ruches *Galleria mellonella* élevée au laboratoire d'apiculture (VALCOR).

I-2- Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé pour réaliser cette étude est composé de verreries, d'équipement, d'appareils et d'un ensemble de réactifs et produits chimiques (**Annexe 1**).

II- Méthode de récolte, séchage, broyage et conservation

II-1-La récolte

La récolte des feuilles de Buis « *Buxus sempervirens* L. » est réalisée durant le mois de Mars 2017 au niveau du jardin de la faculté des sciences de université M'Hamed Bougara de Boumerdes (UMBB).

II-2- Le Séchage

L'étape de séchage a pour but d'abaisser la teneur en eau des feuilles récoltées afin d'éviter toute réaction d'altération et de prolifération des microorganismes. Les parties récoltées sont séchées à l'air libre et à l'abri de la lumière.

II-3- Le broyage et de Conservation

Les feuilles séchées sont réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique à hélice (de type WARING). Afin de garantir une bonne conservation, les techniques de dessiccation sont variables (**Paris, 1976**):

- ✓ Au soleil et à l'air libre pour les écorces et racines.
- ✓ A l'abri de la lumière pour les fleurs.
- ✓ A une température de séchage bien choisie pour éviter une altération de la composition chimique.

Les étapes de travailles sont résumées par le schéma suivant:

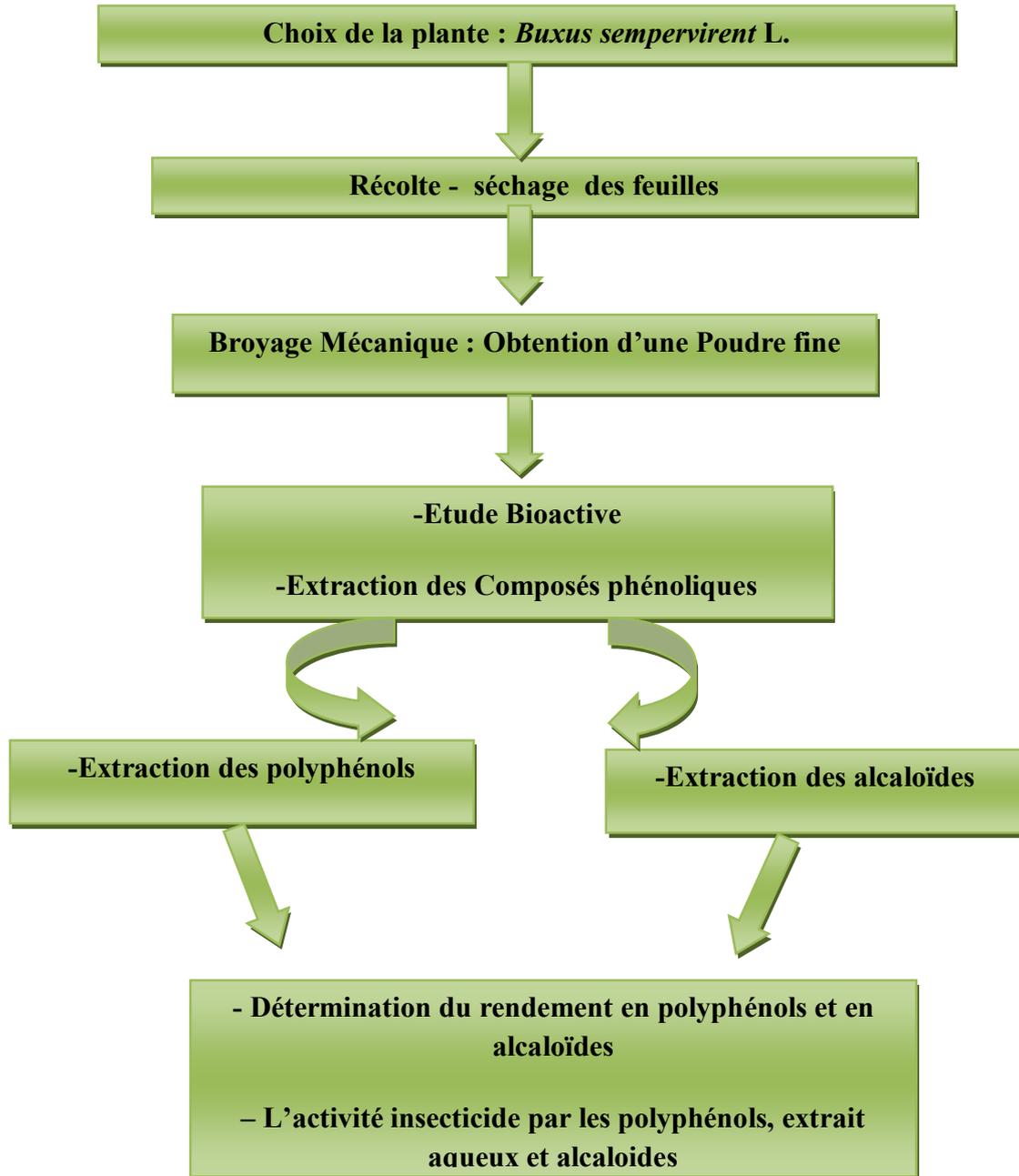


Figure 11 : Schéma résumant de différentes étapes du travail.

III- Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un test qualitatif qui permet de déterminer les différents composés chimiques présents dans la plante par des réactions de coloration et de précipitation, tels que les polyphénols (tanins, flavonoïdes, anthocyanes,...) les alcaloïdes, les saponosides,...etc. ces tests peuvent s'effectuer soit sur la poudre soit sur l'infusé à 20%. La méthode utilisée est celle adoptées par **Tona *et al.*, (1998)** et **Longaga *et al.*,(2000)**.

III-1- Préparation de l'infusé à 20%

La poudre du végétal est composé des parties aériennes (feuilles et sommités fleuris) du Buis « *Buxus sempervirens* L.»

Nous avons versé 100 ml de l'eau distillée chaude dans 20 g de la poudre de la plante.

Après refroidissement pendant 15 mn de temps et filtration, le filtrat obtenu est complété par l'eau distillée jusqu'à 100 ml (**Figure 12**).

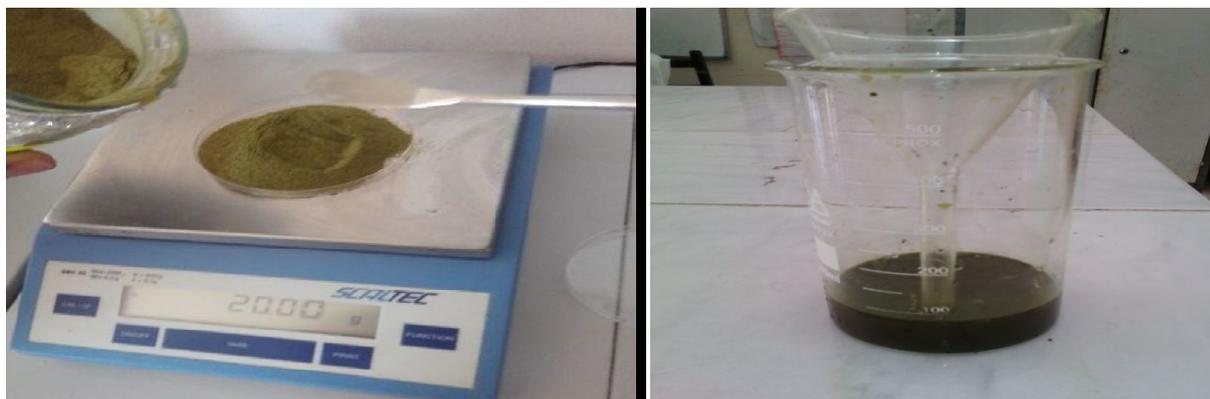


Figure 12 : préparation de l'infusé à 20 % (photos originales).

III-2- La phytochimie

Les tests de caractérisation phytochimique effectués sur la partie aérienne du Buis, sont résumés si dessous :

✓ **Identification des tanins totaux**

Quelques gouttes de FeCl_3 à 5% ont été ajoutés à 5 ml de l'infusé. L'apparition d'une coloration bleu noire indique que le test est positif.

✓ **Identification des tanins galliques**

A 5 ml d'infusé on ajoute 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl_3 . En présence de tanins gallique la coloration est bleu foncée.

✓ **Identification des tanins catéchiques**

À 15 ml d'infusé, on ajoute 10 ml du formol à 40% (40 ml du formol+60 ml d'eau distillé) avec 5 ml d'HCL concentré, une réaction positive se traduit par une coloration rouge.

✓ **Identification des anthocyanes**

A 5ml d'infusé on ajoute quelques gouttes d'HCL (Acide chlorhydrique). Si la coloration devient rouge, cela signifie la présence d'anthocyanes.

✓ **Identification des leuco-anthocyanes**

5 ml de l'infusé additionnées de quelques gouttes d'HCL provoque l'apparition de coloration rouge ou violacée en cas de présence des leuco-anthocyanes.

✓ **Identification des saponosides**

A 2 ml d'infusé, on additionne quelques gouttes d'acétate de plomb. La formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

✓ **Identification des alcaloïdes**

Pour ce test, faire macérer 5g de poudre végétale humectée avec l'ammoniaque (50%), puis on rajoute 50ml d'un mélange éther/chloroforme (3v/v) et on laisse macérer pendant 24 h. après la filtration le filtrat est épuisé par l'acide chlorhydrique 2N.

Des réactions de précipitations sont réalisées sur la solution chlorhydrique.

Enfin on ajoute quelques gouttes de réactif de dragendorff (annexe 2), la présence d'alcaloïde se traduit par la formation d'un précipité rouge.

✓ **Identification d'amidon**

A 2g de poudre végétale, on rajoute quelques gouttes d'iode, la présence de coloration bleu violette implique que le test est positif.

✓ **Identification des flavonoïdes**

Dans un tube à essai, on mélange 5 ml d'infusé avec 5 ml d'HCL puis on ajoute un coupon de Mg et 1ml d'alcool isoamylique. la présence de flavonoïde est indiquée par la coloration rouge orangée.

✓ **Identification des mucilages**

Introduire 1ml d'infusé dans un bécher auquel on ajoute 5 ml d'éthanol absolu. L'obtention d'un précipité floconneux après 10 à 15 minutes d'agitation indique la présence de mucilages.

✓ **Identification des glucosides**

Quelques gouttes de H₂SO₄ ont été rajoutées à 2g de poudre, la présence de glucoside est indiquée par une coloration rouge brique ensuite violette.

III-3- Extraction des composés phénoliques

III-3-1- Extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques à partir de la plantes étudiées (buis) passe par les étapes suivantes (Revilla *et al.* 2001 et Ojeil *et al.* 2010) :

Etape 1 : 20 g de la poudre végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 3 jours,

Etape 2 : nous avons procédé à la séparation du solvant (méthanol) de la poudre par filtration.

Etape 3 : le filtrat récupéré est mis dans un Rotavapor à 70°C pendant 20 mn afin d'éliminer le méthanol (Figure 13 et 14).

L'extrait des polyphénols est obtenu au fond du ballon sous forme d'extrait sec.

Le calcul du rendement en polyphenols dans l'extrait méthanolique est déduit par la formule suivante :

$$R\% = (M - M_0 / M_t) \times 100$$

Tels que :

R% : taux de la matière extraite

M : masse du ballon avec l'extrait

M₀ : masse du ballon vide

M_t : masse du ballon avec l'extrait après séché.

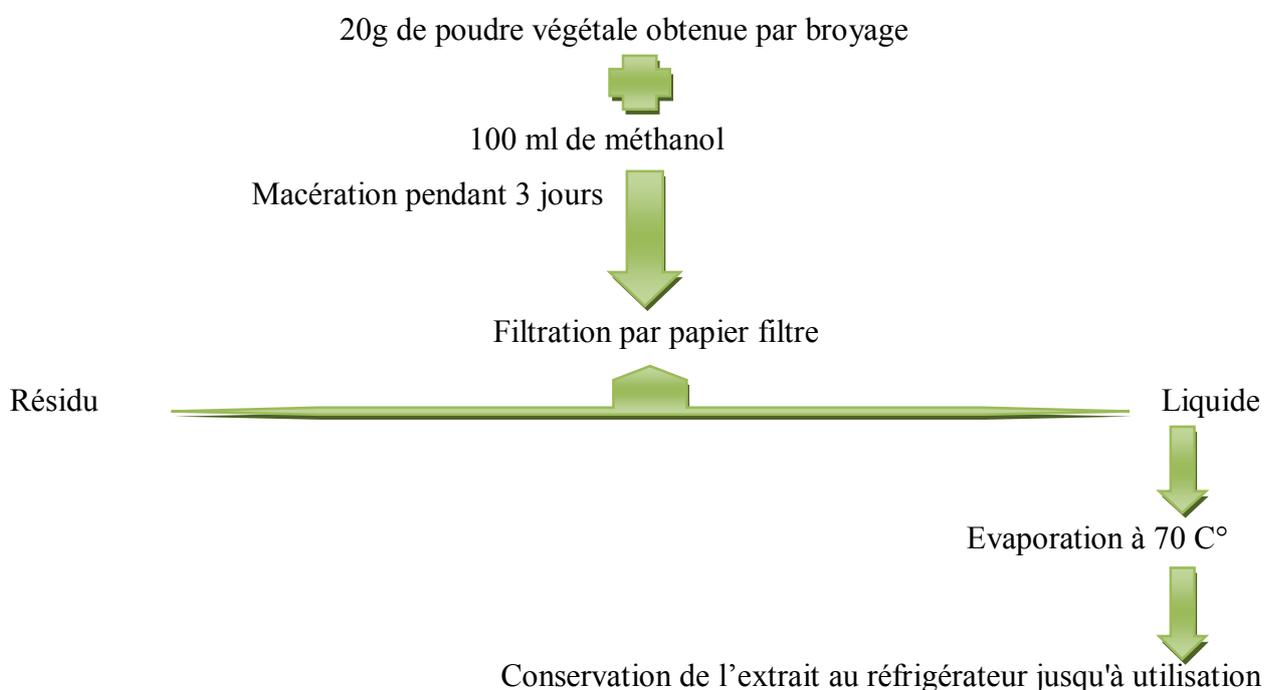


Figure 13 : schéma simplifié du protocole d'extraction des composés phénoliques.



Figure 14 : Préparation des extraits phénoliques (photos originales)

III-3-2- Préparation de l'extrait aqueux :

Le procédé de préparation de l'extrait aqueux à partir des feuilles du buis est comme suit :

- 1- Introduire 50g de matière végétale dans un erlenmeyer de 500 ml, et verser 300 ml de l'eau distillé.
- 2- Agiter et laisser macérer 24 h à température ambiante puis filtrer sur gaz abonde stérile.
- 3- le filtrat récupéré (extrait aqueux) est transvasés dans des piluliers ombrés, en verre. Ils sont ensuite stockés dans un réfrigérateur et à l'abri de la lumière (Figure 15).



Figure 15 : Préparation de l'extrait aqueux (photos originales)

III-3-3- Extraction des alcaloïdes

Le procédé d'extraction des alcaloïdes à partir des feuilles du buis est comme suit :

(Bfaye , 1998 ;Huber , 1998 ; Vercautern, 2001).

1- Introduire 30g de matière végétale pulvérisée dans un erlenmeyer de 250 ml, et verser 125 ml de H₂SO₄ à 10%.

2- Agiter et laisser macérer 24 h à température ambiante puis filtrer

3- Alcalinisation à pH=9 par NaOH à 30% (l'alcalinisation permettant de déplacer les alcaloïdes bases).

4-Traverser le contenu dans une ampoule à décanter puis procéder à une extraction liquide-liquide par deux fois 40 ml de chloroforme (solvant organique apolaire).

5-Les phases organiques réunis sont séchées sur sulfate de sodium anhydre puis filtrer.

6-Evaporer le solvant de la solution restante sous réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif

(Figure 16)



Figure 16 : Extraction des alcaloïdes (photos originales)

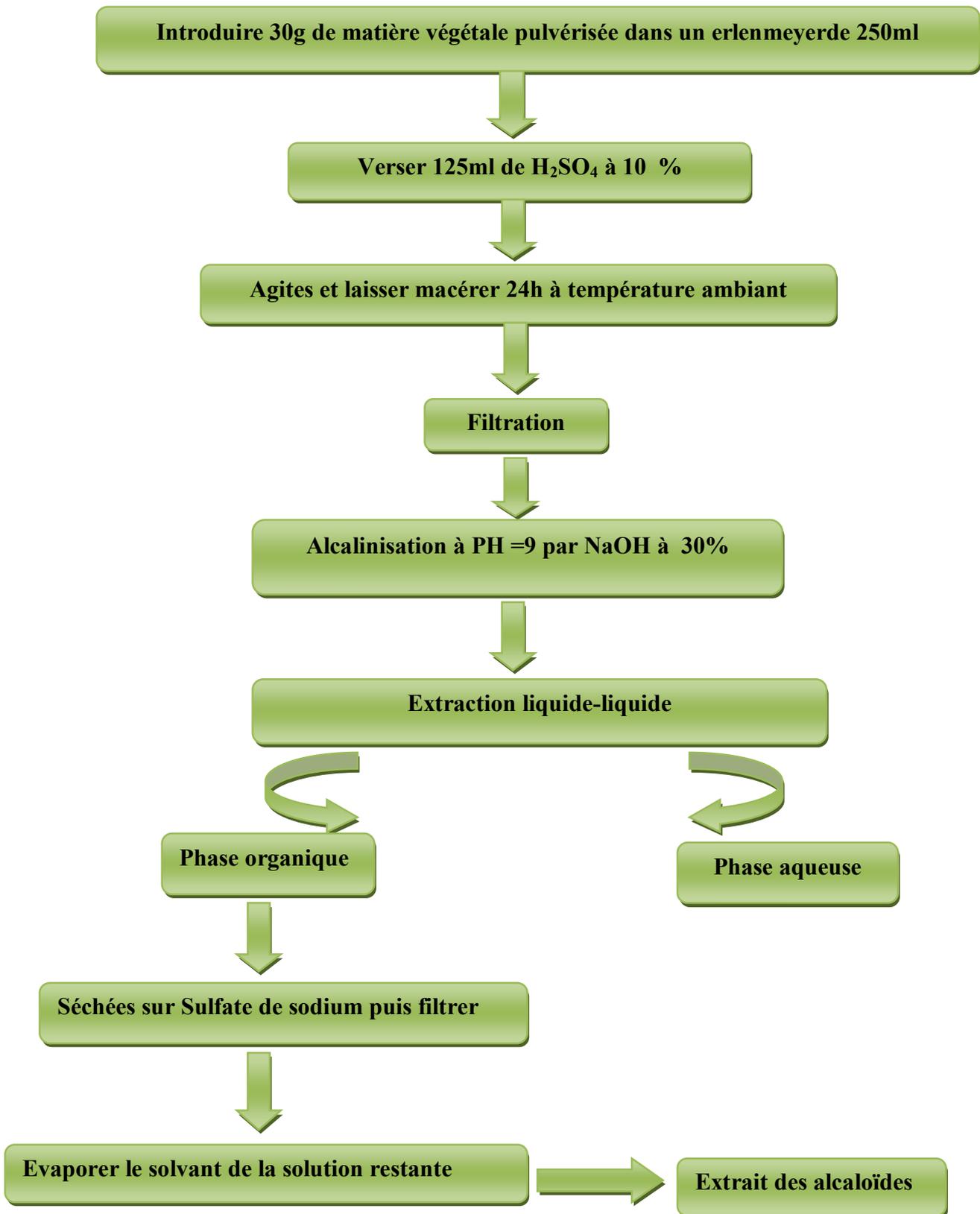


Figure 17 : Schéma simplifié du protocole d'extraction des composés phénoliques

III-3-4-Récupération des alcaloïdes

Après la pesée des ballons contenant les extraits, ces derniers sont récupérés à l'aide d'une spatule. Puis, ils sont transvasés dans des piluliers ombrés, en verre. Ils sont stockés ensuite dans un réfrigérateur à 4 °C.

Le calcul du rendement en alcaloïdes dans l'extrait méthanolique est déduit par la formule suivante :

$$R\% = (M - M_0 / M_t) \times 100$$

Tels que :

R% : taux de la matière extraite

M : masse du ballon avec l'extrait

M₀ : masse du ballon vide

M_t : masse du matériel végétal utilisé.

IV- Evaluations de l'activité insecticide des composés phénoliques

IV-1- Elevage des larves de *Galleria mellonella*

L'élevage a été fait au niveau du laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources biologiques (VALCOR) à partir d'octobre 2016, en utilisant un cadre infecté provenant du rucher du laboratoire d'apiculture. En effet quelques larves de *Galleria mellonella* ont été récupérées et introduites dans des boucaux en verre, ces derniers ont été mis dans une étuve réglée à 32°C en présence d'un bac à eau pour créer une certaine humidité, les larves sont nourries en plus de la cire d'une poudre du pollen (**Figure 18**).

Après émergence, les papillons sont récupérés et transférés dans d'autres boucaux en verre qui ont été couverts d'un papier plissé pour l'accouplement et la ponte des œufs.



Figure 18 : Elevage des larves de *Galleria mellonella* (photos originale).

IV-2- Effet de la nutrition larvaire sur le développement de *Galleria mellonella*.

Dans le but de faciliter l'élevage de l'insecte et afin de déterminer l'effet du substrat alimentaire sur la survie et la mortalité des larves de la fausse teigne, 4 régimes alimentaires ont été choisies. Les jeunes larves ont été réparties dans des lots à raison de 15 larves par régime jusqu'au stade adulte.

Différents substrats alimentaires testés

Régime 01:

Un mélange de pollen finement broyé et mélange avec une solution miellée 50/50, dans la proportion 2/3, 1/3. on obtient une pâte que l'on réduit en boules (**Pouvreau et Marilleau, 1973**) (**Figure 19**).

Régime 02:

C'est un mélange constitué de :

- 300 ml de miel liquide
- 150 ml de glycérine
- 200 g de lait en poudre
- 200 g de farine entière farine grossière
- 100 g de levure de bière inactive
- 400 g de semoule de maïs
- 250 g de son de blé (**Ellis et al, 2013**) (**Figure 19**)

Régime 03:

C'est un mélange constitué de :

- 40 g de farine entière farine grossière
- 20 g de semoule de maïs
- 20 g de lait en poudre
- 10 g de levure de bière séchée (non active)
- 300 ml de miel liquide
- 150 ml de glycérine (**Ellis et al, 2013**) (**Figure 19**)

Régime 04: C'est un mélange constitué de déchet récupéré de la ruche, du laboratoire (**Figure 19**)



Figure 19 : Les différents substrats alimentaires donner aux larves (photo original).

IV-3- Evaluation de l'activité biologique de buis sur les larves de *G. mellonella*.

IV-3-1- Préparation des différentes doses

Trois doses des polyphénols, l'extrait aqueux et des alcaloïdes ont été préparées.

La 1^{er} dose (D1) est de 15 μ l/ml, la 2^{eme} dose (D2) est de 30 μ l/ml et la 3eme dose (D3) est de 60 μ l/ml (Figure 20) Les déliant utilisées dans la préparation des doses et le traitement des témoins sont :

- le méthanol pour les polyphenol.
- l'eau distillée pour l'extrait aqueux.
- le twine 80 Pour les alcaloïdes

Les trois préparations sont mise dans des petites boites de Pétri ouvertes jusqu'à élimination totale du méthanol (les polyphénoles) et l'excès d'eau et de tween 80 utilisés comme diluants pour l'extrait aqueux et les alcaloïdes.



Figure 20 : Préparation des différentes doses D1, D2, D3 (photo original).

IV-3-2- Préparation des lots

Pour chaque extrait, 12 boîtes de Pétri ont été préparées pour chacune des trois concentrations choisies, les 3 boîtes restantes sont préservées pour le témoin.

Dans chaque boîte on met 5 larves (L5) de la fausse teigne. Après traitement les boîtes sont fermées et déposées à l'étuve (**Figure 21**).

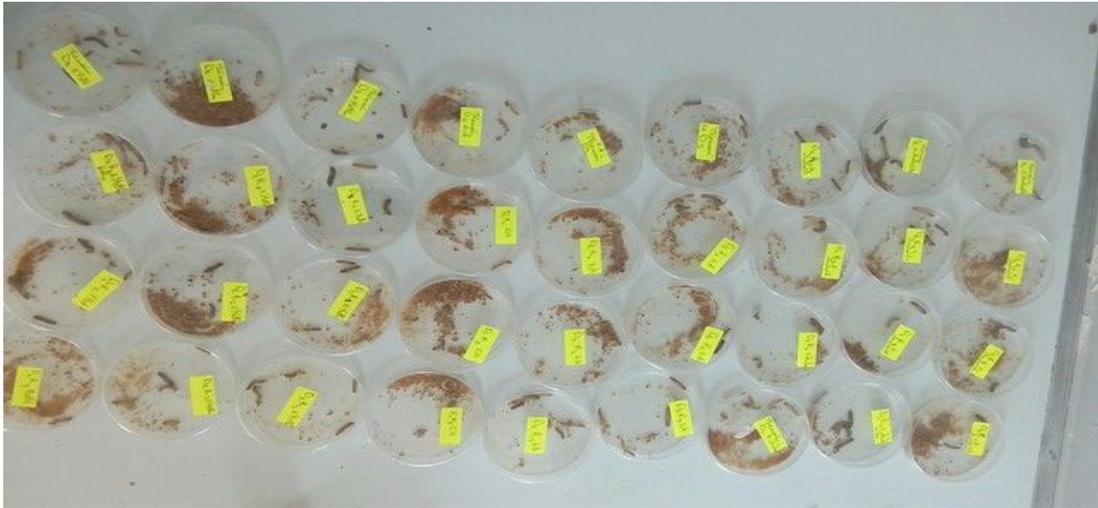


Figure 21 : Préparation des lots (photo original)

IV-3-3- Mode d'application des traitements

Les larves ont été plongées pendant quelque secondes dans les différentes solutions de Polyphénol, extrait aqueux et les alcaloïdes, préalablement préparées. Puis ces dernières ont été mise dans les boîte de pétri.

IV-3-4- Paramètres étudiés

L'observation des résultats consiste à déterminer les paramètres suivants :

- ✓ **Le taux de mortalité observée** : le taux de mortalité journalière a été évalué chez les témoins et les traités pendant 10 jours pour polyphénols et extrait aqueux et pendant 5 jours pour les alcaloïdes.
- ✓ **Calcul des mortalités corrigées.**

Le pourcentage de mortalité observée est corrigé par rapport au témoin selon la formule d'ABBOT (1925).

$$MC\% = \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100$$

Tel que :

M1 : Pourcentage de mortalité chez les témoins.

M2 : Pourcentage de mortalité chez les traitées.

MC% : Pourcentage de mortalité corrigée.

✓ **Calcul des TL50**

Pour calculer les TL50 (temps létal pour 50% des individus) pour chaque concentration D1 ; D2 et D3, on a transformé le temps en logarithmes décimaux et les valeurs de mortalité corrigée en probits en se servant de la table des probits (**Annexe 3**).

Ceci nous permet d'obtenir des équations de droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : Probit de mortalité corrigée.

X : Logarithme décimal du temps.

a : La pente.

Le TL50 sera égale à anti-Log10, avec $x = \text{Log}_{10}$ de temps correspondant au probit 5 sur le graphe, ou bien à partir des équations en remplaçant Y par le probit de 50 qui égale à 5.

✓ **Calcul des DL50 :**

Pour calculer les DL50 (concentration nécessaire pour tuer la moitié d'une population) pour chaque traitement, on a transformé les concentrations utilisées (D1, D2 et D3), en logarithmes décimaux et les valeurs de pourcentages de mortalité en probits en se servant de la table des probits. Ceci nous permet d'obtenir des équations de droites de régression de type :

$$Y = ax + b$$

Y : Probit de mortalité corrigée

X : Logarithme décimal de la concentration

A : La pente

A partir de ces équations, on a pu déterminer les DL50 et les TL50. Pour les trois types de traitement, (les polyphénols, extrait aqueux et alcaloïdes de la plante étudiée la Buis « *Buxus sempervirens L.* »).

IV-4- Dosage des métabolites hémolymphatiques

Les larves (L5) ont reçu un volume de 20 µl de la solution testée par injection directe dans l'hémolymph, ce dernier a été prélevé, 2h, 4h et 8h après injection (**Figure 22**).



Figure 22 : Injection de l'extrait aqueux dans l'extrémité abdominale de la larve de *G.mellonella* (photo originale).

IV- 4-1- Dosage quantitatif des protéines

✓ Principe de la méthode de Bradford

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976), dont le principe est basé sur l'utilisation d'un colorant, le bleu de Coomassie brillant G-250, qui forme un Complexe coloré, présentant un maximum d'absorption à 595 nm. La fixation de ce colorant aux protéines s'effectue très rapidement et le complexe protéine-colorant reste stable pendant une heure environ. Il faut souligner que la réaction n'est linéaire que dans une certaine gamme de concentration (**Bertrand, 2007**)

✓ Technique de dosage

a) Préparation de réactif de Bradford (BBC)

On dissout 10 mg de bleu de Coomassie G-250 dans 5 ml d'éthanol à 95° et on le laisse agiter pendant 2h. Après agitation, on ajoute 10 ml d'acide ortho phosphorique à 85% et on complète à 100 ml avec de l'eau distillé. On note que la préparation de ce réactif doit être effectuée dans un flacon enveloppé avec du papier aluminium pour éviter sa détérioration suite à son contact avec la lumière.

b) Gamme étalon

Pour la préparation de la solution mère de sérum albumine bovine (BSA) de 1g/l, on dissout un gramme de BSA dans un litre d'eau distillée et c'est à partir de cette solution mère que des dilutions à volume identique (100 ml) mais qui contiennent des concentrations croissantes et connues sont préparées afin de réaliser la courbe de référence (**Tableau 2**).

Tableau 2 : La gamme étalonnage de BSA utilisé pour le dosage de protéines.

BSA (μ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μ l)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

c) L'échantillon à doser

Nos échantillons sont congelés, à (-20) °C dès leur sortie du congélateur, on les place dans des Récipients contenant de l'eau fraîche afin de les décongeler puis, dans une série de tube, un volume de 5 μ l de l'hémolymphe est versé, puis on complète le volume à 100 μ l par addition de 95 μ l de l'eau distillé. Par la suite, un volume de 4 ml de réactif de Bradford (BBC) est ajouté dans les deux séries de tubes qui seront après mélangées au vortex et incubées pendant 10 minutes à l'obscurité. On procède à la mesure de l'absorbance à 595 nm et en fin on trace la courbe d'étalonnage DOF [BSA] et on déduit la concentration des protéines de chaque échantillon à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.

IV-4-2-Dosage quantitatif des glucides**✓ Principe**

la méthode colorimétrique de dosage des glucides par l'antrone repose sur le principe suivant : dissoute en milieu sulfurique concentré, l'antrone apparaît de couleur jaune claire et donne avec les solutions de glucides selon leur concentration une gamme assez lumineuse allant de vert au bleu-vert (**Bachelier et Gavinelli, 1966**).

✓ Technique de dosage :**- a) Préparation des solutions**

Pour cela il faut dissoudre 0.15g d'antrone dans 75 ml d'acide sulfurique, puis ajouter 25 ml de l'eau distillé et en suite préparer une solution mère de glucose (1g/l) comme standard.

- **b) Gamme d'étalonnage**

Calculer les volumes à prélever de la solution mère de glucose et d'eau distillée pour faire une gamme étalon de 0, 20, 40, 60, 80, et 100 µl de glucose (**Tableau 3**).

Tableau 3 : La gamme d'étalonnage de glucose pour le dosage des glucides.

Glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4

- **c) Echantillon à doser :**

- On verse 5 µl de l'hémolymphe et on complète par 95 µl d'eau distillé.
- On ajoute 4 ml d'anthrone dans les deux séries de tubes.
- Agiter au vortex.
- Incuber 10 minutes au bain marie à 80°C.
- Mesurer l'absorbance à 625 nm

IV-4-3- Dosage hémolympatique des lipides

✓ **Le principe**

le dosage des lipides hémolympatique a été effectué selon Goldsworthy *et al.*, (1972). En utilisant le réactif sulfophosphanillinique.

✓ **Technique de dosage :**

- **a) Préparation des solutions :** pour cela il faut dissoudre 0.38g de vanilline dans 195 ml d'acide orthophosphorique à 85% puis ajouter 55 ml d'eau distillée en suite prépare une solution mère de lipides (2,5 mg/ml) comme standard.
- **b)- Gamme d'étalonnage :** Calculer les volumes à prélever de la solution mère de lipides et Solvant chloroforme/méthanol (µl) pour faire une gamme étalon de 0, 20, 40, 60, 80, et 100 µl de vanilline (**Tableau 4**).

Tableau 4: La gamme d'étalonnage de vanilline pour le dosage des lipides.

Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant chloroforme/méthanol (µl)	100	80	60	40	20	0
Vanilline (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5

- c)- L'échantillon à doser :

L'échantillon est additionné 1 ml d'acide sulfurique (98%), après agitation, les tubes sont chauffés un bain marie (100°C pendant 10 min), de chaque tube 200 µl sont ensuite prélevés et il est ajouté 2,5 ml de réactif. Les absorbances sont lues après 30 mn d'obscurité à une longueur d'onde de 530 nm

IV-5-Analyse statistique

Pour confirmer l'efficacité des traitements biologiques effectués, les résultats obtenus sont soumis aux tests de l'analyse de la variance. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives. Nous avons appliqué en outre le test de Tukey ou test de la différence significative qui permet de vérifier la significativité de la variable d'intérêt entre toutes les combinaisons des modalités. Le logiciel utilisé est le STATISTICA.

Chapitre III



Résultats et discussion

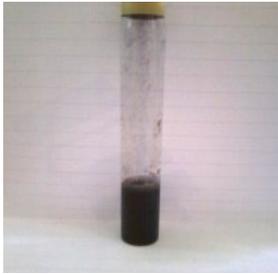
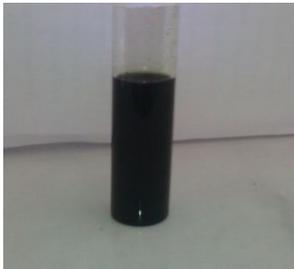
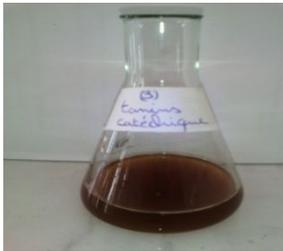
Résultats et discussions

Dans cette partie, seront exposés les résultats concernant le screening phytochimique, les rendements d'extractions des extraits polyphénolique et alcaloïdes et enfin, l'évaluation de l'activité insecticide de l'extrait aqueux, polyphénols et alcaloïdes vis-à-vis de *Galleria mellonilla*.

I-Le Screening phytochimique

L'ensemble des résultats du screening phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé du buis sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 5: Caractérisation phytochimique de la poudre des feuilles de *Buxus sempervirens L.*

Substances recherchées	Résultats prévus	Résultats obtenus
Tanins totaux	Coloration bleue noire	 + + +
Tanins galliques	Coloration bleu foncé	 +++
Tanins catéchiques	coloration rouge	 + + +

<p>Anthocyanes</p>	<p>Coloration rouge</p>	 <p style="text-align: center;">+</p>
<p>Leuco-anthocyane</p>	<p>Coloration rouge ou violacé</p>	 <p style="text-align: center;">- - -</p>
<p>Saponosides</p>	<p>Précipité blanc</p>	 <p style="text-align: center;">+++</p>
<p>Alcaloïdes</p>	<p>Précipité rouge</p>	 <p style="text-align: center;">+ + +</p>

<p>Amidon</p>	<p>Coloration bleue violette</p>	 <p style="text-align: center;">- - -</p>
<p>Flavonoïdes</p>	<p>Coloration rouge orange</p>	 <p style="text-align: center;">+ +</p>
<p>Mucilage</p>	<p>Précipité floconneux</p>	 <p style="text-align: center;">+++</p>
<p>Glucosides</p>	<p>Coloration rouge brique</p>	 <p style="text-align: center;">+++</p>

- (-) : absence de substances.
- (+) : faible teneur en substances.
- (++) : moyenne teneur en substances.
- (+++) : forte teneur en substances.

Les testes phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé.

D'après le tableau n°04, les feuilles du buis sont très riches en alcaloïde, résultats confirmés par le travail de **Benai et Chellali, (2013)** et celui de **Belaidi et Boudiaf (2014)**, mais également en tanins, en mucilages, en saponosides et en glucosides. Moyennement riche en flavonoïdes avec une faible teneur en anthocyane. Comme elle est également dépourvue d'amidon

La présence des tanins a été déterminée avec une solution diluée à 5% de chlorure ferrique qui réagit avec ces composés pour donner une coloration bleue foncée (tanins gallique) ou coloration rouge (tanins catéchiques).

L'échantillon analysé présente une teneur élevée en alcaloïdes, ces derniers ont été recherchés à l'aide du réactif de Dragendorff sur la solution aqueuse d'acide sulfurique. Ces composés polyphénoliques sont des substances reconnues pour leur pouvoir insecticides, ils sont présents dans plusieurs espèces telles que *Retama sphaerocarpa* confirmé par **Larbi et Mahfouf (2008)**.

Elles sont responsables de l'activité insecticide de la plante qui les contient, et sont toxiques pour les animaux à sang froid, ils provoquent une irritation cellulaire à l'origine de propriétés diurétiques (**Gestem et al, 2001**).

La mise en évidence des saponosides a été effectuée par la formation d'un précipité blanc après l'ajout à 2 ml d'infuser de quelques gouttes d'acétate de plomb.

L'échantillon analysé présente aussi une forte teneur en mucilage ce qui confère à la plante la capacité à retenir l'eau, ces substances ont un rôle de réservoirs. Dans les infusions et les décoctions, les mucilages des plantes médicinales ont pour effet de réduire l'irritation tant physique que chimique. Elles exercent donc une action favorable contre les inflammations des muqueuses, notamment celles des voies respiratoires et digestives, et atténuent les douleurs des contusions, et assouplissent la peau lors d'applications de cataplasmes (**Fournier, 2010**).

II-Extraction des composés Bioactives :

II-1-Extraction des polyphénols

Le résultat de l'extraction des polyphénols de la poudre du Buis (20 g), est caractérisé par un rendement calculé selon une formule et représenté dans le tableau 6 suivant :

Tableau 6 : Rendement de l'extraction des polyphénols de la poudre du Buis.

M	M ₀	MT	R% = (M-M ₀ /Mt) x 100
68.27g	62.46g	20g	29.05 %

Tels que :

R% : taux de la matière extraite

M : masse du ballon avec l'extrait

M₀ : masse du ballon vide

Mt : masse du matériel végétale utilisé.

Le résultat du rendement en composés phénolique de l'extrait méthanolique obtenus à partir de 20g de la poudre des feuilles du Buis (*Buxus sempervirens* L.) est de 29.05 % , en comparons avec d'autres rendement en composés phénolique de l'extrait méthanolique de d'autres espèces tel que la poudre de feuilles de *Rubus fruticosus* L. à partir de 5 g le R% est de 33.60% (**Paoloni et al., 2004**), en utilisant 5g de poudre végétale macérée dans de l'éthanol ont trouvé un rendement nettement inférieure, soit de 7.4%. **Yakhlef, (2010)** et **Halouane et Geunoune, (2012)**, ont notés respectivement un rendement de 6.24% et 43.93% en utilisant 10g de poudre végétale dans le méthanol et l'éthanol.

La comparaison des différents rendements, fait ressortir la richesse de notre extrait en composés phénoliques.

Cette différence est en relation directe avec la nature du sol, le climat, l'âge de la plante, la période de récolte et la nature du solvant d'extraction (**Iserin, 2001**).

II-2-Extraction des alcaloïdes

Le résultat de l'extraction des alcaloïdes de la poudre du Buis (30 g), est exprimé par un rendement calculé selon une formule et illustré dans le tableau comme suite :

Tableau 7: Rendement de l'extraction des alcaloïdes de la poudre du buis.

M	M ₀	MT	R% = (M-M ₀ /Mt) x100
63.17g	62.46g	30g	2.36 %

Tels que :

R% : taux de la matière extraite

M : masse du ballon avec l'extrait

M₀ : masse du ballon vide

Mt : masse du matériel végétale utilisé.

Le rendement en alcaloïdes est variable d'une plante à une autre, on compare avec d'autre rendement en alcaloïdes de l'extrait chloroformique de d'autre espèces tel que la poudre de feuille de *Borago officinalis* L. à partir de 30 g le R% est de 29.06 %. **Boudjebieur, (2014)**

Cette différence est en relation directe avec la nature du sol, le climat, l'âge de la plante, la période de récolte et la nature du solvant d'extraction (**Iserin, 2001**).

III-Etude de la toxicité du Buis (*Buxus sempervirens L.*) sur les larves L5 de *Galleria mellonella*

III-1-Effet des polyphénols

III-1-1-Taux de mortalité

Les taux de mortalité obtenue après traitements des larves L5 de *Galleria mellonella* par les polyphénols de Buis sont représentés sur la **Figure 23**.

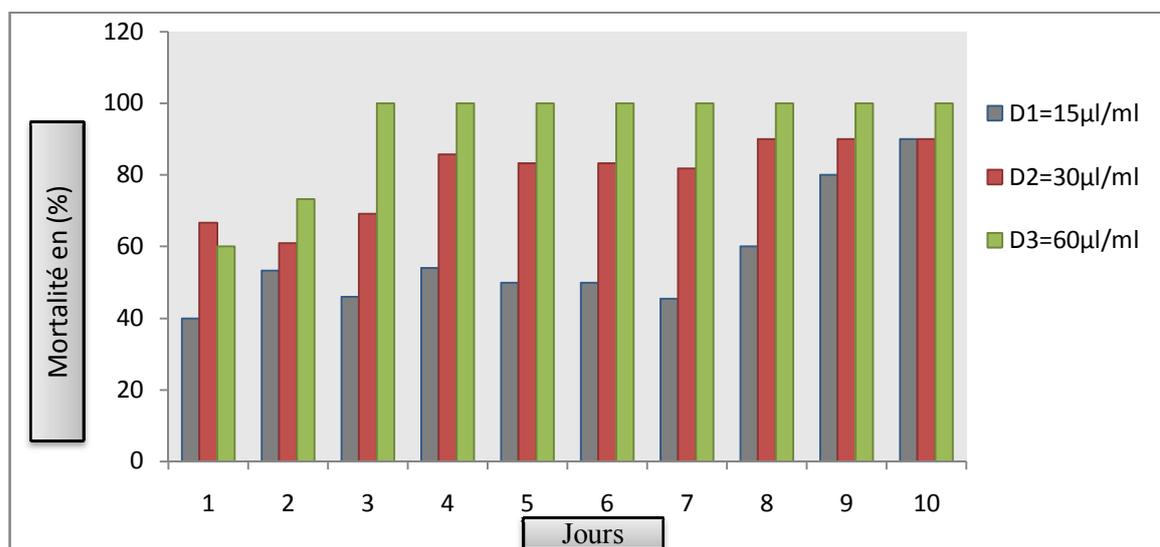


Figure 23 : Taux de mortalité corrigée chez les individus de *Galleria mellonella* traités les polyphénols de Buis.

On observe sur la figure, une mortalité élevée chez les individus traités dès le 1er jour pour les trois doses, avec presque 40% pour la D1, plus de 60% pour la D2 et D3 24h après traitements La mortalité varie selon la concentration et augmente avec le temps pour atteindre 100% après traitement par la dose D3, le 3^{ème} jour après traitement (**Annexe 5**).

✓ **Analyse statistique**

On a fait appel à l'analyse de la variance à 3 niveaux de classification suivie du test du tukey pour la comparaison des moyennes.

Tableau 8: Analyse de la variance du traitement par les polyphénols du Buis

	SC	Derg .De	MS	F	P
Dose	100173,3	3	33391,11	4,877985	0,003613
Temps	15333,3	9	1703,70	0,248888	0,985703
Temps* dose	4426,7	27	163,95	0,023951	1,000000
Erreur	554466,7	81	6845,27		

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent une différence significative au seuil de 5% ($p < 0,0000$) entre les doses y compris le témoin, il n'est ya pas une différence significative au seuil de 5% entre les temps ($p < 0,0000$). L'application du test de tukey montre une différence significative pour les combinaisons (T et D2), (T et D3) (**Annexe 7**).

La matrice de corrélation révèle que la paire (Mortalité*Dose) est moyennement corrélé, (≥ 0.5) et la paire (Mortalité*Temps) est faiblement corrélé (≤ 0.5) (**Annexe 7**).

III-1-2-TL50

Nous avons procédé au calcul des taux létaux au bout des quelles 50% des larves de *Galleria mellonella* sont mortes suite au traitement par les polyphénols de Buis. Alors on a transformés en probits les valeurs des pourcentages de mortalité corrigée et les jours en logarithmes décimaux (**Annexe 6**). A l'aide de ces valeurs on a tracé les droites de régression (**Annexe 8**).

Par la suite, les équations des droites de régression obtenues sont utilisées pour le calcul des TL50.

Tableau 9 : Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et les valeurs de TL50 des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les polyphénols du Buis.

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	TL50
D1= 15µl/ml	$y = 0.906x + 4.586$	$R^2 = 0.323$	2.86 Jours
D2= 30µl/ml	$y = 3.007x + 5.585$	$R^2 = 0.724$	0.63 Jours
D3= 60µl/ml	$y = 0.790x + 5.437$	$R^2 = 0.701$	0.27 Jours

L'examen des TL50 montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées par les polyphénols du Buis présentent pour les trois doses D1, D2 et D3 des TL50 qui sont respectivement 2.86 Jours, 0.63 Jours et 0.27 Jours. Le R2 est compris entre 0 et 1, la corrélation est dite positive ainsi que la mortalité et la dose sont moyennement corrélées pour la D2 et D3, faiblement corrélées pour la D1.

III-1-3- DL50

Nous avons procédé au calcul des DL50 chez les larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les polyphénols de buis après des délais de 2^{ème} jours et 5^{ème} jours après traitements.

Tableau 10 : Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL50 des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les polyphénols du buis.

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	DL50
2 ^{ème} jours	$y = 0.880x + 4.223$	$R^2 = 0.424$	7.637µl/ml
5 ^{ème} jours	$y = 1.577x + 4.015$	$R^2 = 0.09$	4.21 µl/ml

L'examen des DL50 montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées par des polyphénols du Buis présentent des DL50 de 7.637 µl/ml au 2^{ème} jour, et une DL50 de 4.21µl/ml au 5^{ème} jour. Le R² est compris entre 0 et 1, la corrélation est dite positive ainsi que la Mortalité et la dose est faiblement corrélées pour le 2^{ème} jour et 5^{ème} jour.

III-2- Effet de l'extrait aqueux du Buis

III-2-1- Taux de mortalité

Les taux de mortalité obtenue après traitements des larves L5 de *Galleria mellonella* par l'extrait aqueux du Buis sont comme suit :

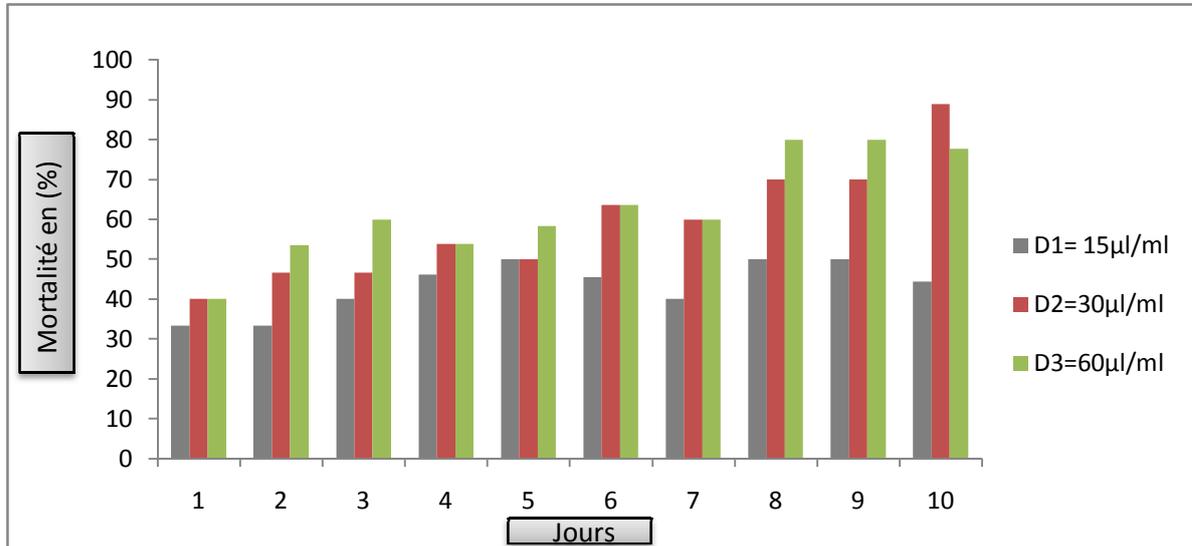


Figure 24 : Taux de mortalité journalière corrigée chez les larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par l'extrait aqueux du Buis.

On observe des mortalités dès le 1^{er} jour pour les trois doses mais le taux sont moins importants comparativement au traitement par les polyphénols de la même plante (Buis), on remarque pour le premier jour après traitement par la D1 un taux de mortalité de (33%) qui atteint (50%) le 5^{ème} jour. Pour la D2 et la D3 des mortalités moyennes sont observées respectivement à partir de 2^{ème} et 4^{ème} jour après traitement. La mortalité varie selon la concentration. Après le 8^{ème} jour de traitement, toutes les larves restantes sont passées au stade nymphal (**Annexe 5**).

✓ Analyse statistique

On a fait appel à l'analyse de la variance suivie du test du tukey pour la comparaison des moyennes. les résultats sont comme suit :

Tableau 11 : Analyse de la variance du traitement par l'extrait aqueux du buis.

	SC	Derg .De	MS	F	P
Dose	43236,7	3	14412,22	2,917478	0,039099
Temps	22563,3	9	2507,04	0,507502	0,865103
Temps* dose	1663,3	27	61,60	0,012471	1,000000
Erreur	400136,7	81	4939,96		

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent une différence significative au seuil de 5% ($p < 0,0000$) entre les doses y compris le témoin, il n'est pas une différence significative entre les Temps. L'application du test de tukey montre une différence significative pour les combinaisons (T et D1), (T et D2), (D1 et D3) (**Annexe 7**).

La matrice de corrélation révèle que la paire (Mortalité*doses) est faiblement corrélé, ainsi que la paire (Mortalité*Dose) (**Annexe 7**).

III-2-2-TL₅₀

Les résultats obtenus sont comme suit :

Tableau 12 : Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et valeurs de TL₅₀ des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par L'extrait aqueux du Buis.

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	TL ₅₀
D1= 15µl/ml	$y = 0.749x + 4.272$	$R^2 = 0.718$	9.35 Jours
D2= 30µl/ml	$y = 1.095x + 4.538$	$R^2 = 0.655$	2.638 Jours
D3= 60µl/ml	$y = 0.983x + 4.690$	$R^2 = 0.721$	2.06 Jours

L'examen des TL₅₀ montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées par l'extrait aqueux du Buis présentent des TL₅₀ proche pour les deux doses D2 et D3 qui sont respectivement 2.638 Jours, 2.06 Jours. La D1 présente un TL₅₀ élevé (9,35 jours).

III-2-3-DL₅₀

Les résultats des calculs des DL₅₀ sont consignés sur le tableau ci dessous :

Tableau 13: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL₅₀ des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par l'extrait aqueux du Buis.

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	DL ₅₀
2^{ème} jours	$y = 0.830x + 3.746$	$R^2 = 0.967$	32.422 µl/ml
5^{ème} jours	$y = 0.166x + 4.788$	$R^2 = 0.75$	18.92 µl/ml

L'examen des DL₅₀ montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées par de l'extrait aqueux du Buis présentent des DL₅₀ élevé pour le 2^{ème} jour (32.422 µl/ml) et plus faible le 5^{ème} jour est (18.92µl/ml).

III-3- Effet des alcaloïdes du Buis

III-3-1- Taux de mortalité

Les taux de mortalité obtenu après traitement des larves L5 de *Galleria mellonella* par les alcaloïdes du Buis sont comme suit :

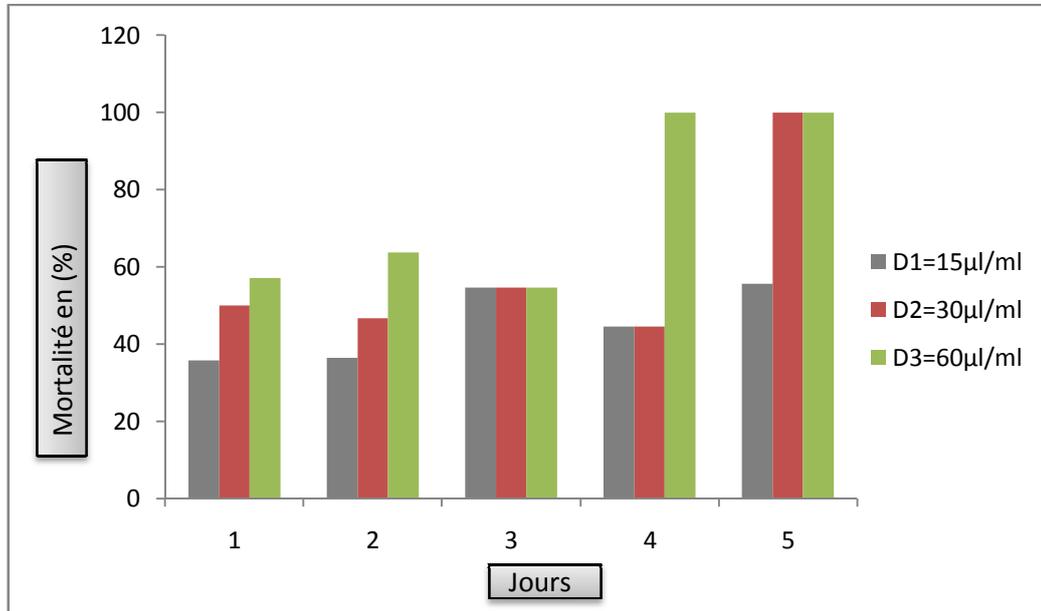


Figure 25 : Taux de mortalité journalière corrigé chez les larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les alcaloïdes du Buis.

Les résultats affichés sur le graphique montrent une mortalité forte dès le 1er jour pour les trois doses, on remarque pour la D1 avec un taux de mortalité de 33% qui atteint 50% le 3^{ème} jour.

Le 4^{ème} jour après traitement par la D3 avec un taux de mortalité de 100% à été enregistré avec un même taux obtenu le 5^{ème} jour pour D2.

✓ Analyse statistique

Les résultats enregistrés sont comme suit :

Tableau 14 : Analyse de la variance du traitement par des alcaloïdes du buis.

	SC	Derg .De	MS	F	P
Dose	21813,3	3	7271,111	1,340448	0,274480
Temps	16066,7	4	4016,667	0,740483	0,569887
Temps* dose	2120,0	12	176,667	0,032569	1,000000
Erreur	222400,0	41	5424,390		

Les résultats de l'analyse de la variance révèlent que il n'est y a pas une différence significative au seuil de 5%($p < 0,0000$) entre les doses y compris le témoin, ainsi que pour les temps ($p < 0,0000$) (Annexe 7).

III-3-2- TL₅₀

Les résultats obtenus sont comme suit :

Tableau 15 : Equations des droites de régression, coefficient de corrélation et valeurs de TL₅₀ des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les alcaloïdes du Buis

Doses	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	TL ₅₀
D1= 15µl/ml	$y = 0.713x + 4.589$	$R^2 = 0.618$	3.76 Jours
D2= 30µl/ml	$y = 2.848x + 4.417$	$R^2 = 0.317$	1.60 Jours
D3= 60µl/ml	$y = 4.404x + 4.538$	$R^2 = 0.597$	1.27 Jours

L'examen des TL₅₀ montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées les alcaloïdes du Buis présentent des TL₅₀ proche pour les deux doses D2 et D3 qui sont respectivement de 1.60 jours et 1.27 jours. La D1 présente un TL₅₀ de 3.76 jours. Le R² est compris entre 0 et 1, la corrélation est dite positive ainsi que la mortalité et la Dose sont moyennement corrélées pour la D1 et D3, faiblement corrélées pour la D2.

III-3-3-DL₅₀

Les résultats des calculs des DL₅₀ sont consignés sur le tableau dessous :

Tableau 16: Equations des droites de régression, coefficients de corrélation et les valeurs des DL₅₀ des larves L5 de *Galleria mellonella* traitées par les alcaloïdes du Buis.

Temps	L'équation de la droite de régression	Coefficient de corrélation	DL ₅₀
2^{ème} jours	$y = 1.195x + 3.206$	$R^2 = 0.983$	31.71 µl/ml
5^{ème} jours	$y = 4.883x - 0.103$	$R^2 = 0.75$	11.09 µl/ml

L'examen des DL₅₀ montre que les larves de *Galleria mellonella* traitées par les alcaloïdes du Buis présentent des DL₅₀ différents pour le 2^{ème} jour et le 5^{ème} jour avec respectivement 31.71µl/ml et 11.09µl/ml.

IV-Etude de l'effet du Buis sur les métabolites hémolymphatiques des larves L5 de *Galleria mellonella*.

Les Figure ci- après regroupent les résultats des différentes concentrations en protéines, glucides et lipides hémolymphatiques obtenus chez les individus témoins (T) et traités par l'extrait aqueux, le prélèvement de l'hémolymphe à eu lieu 2h, 4h et 8h après injection de l'extrait aqueux.

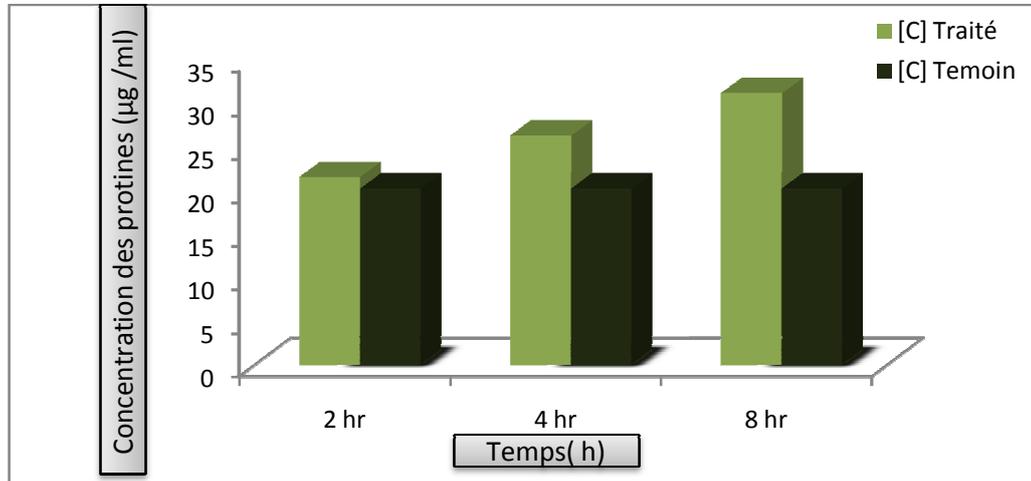


Figure 26 : Les concentrations en protéines hémolymphatiques chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.

La Figure 26 représente l'ensemble des résultats relatifs à l'effet de la dose ($D_2 = 30 \mu\text{l/ml}$), de l'extrait aqueux du buis sur les protéines hémolymphatiques.

On remarque que, la concentration des protéines hémolymphatiques chez les larves traitées a augmenté 2h après traitement par rapport au témoin, Puis peu à peu à 4h. En fin, 8h après traitement on a enregistré une hausse augmentation de la concentration en protéine sous l'effet du traitement (**Annexe 10**).

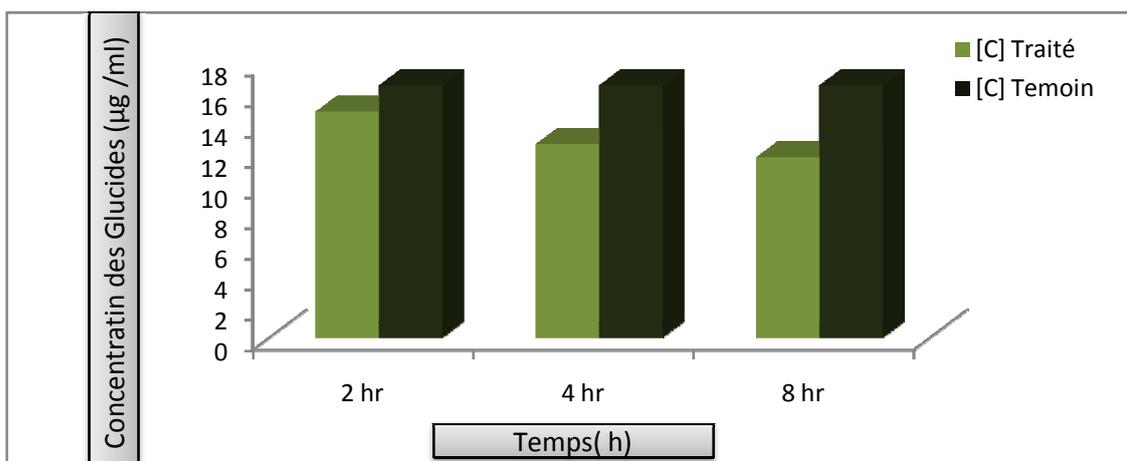


Figure 27: Les concentrations en glucides hémolymphatiques chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.

La Figure 27 représente l'ensemble des résultats relatifs à l'effet de la dose (D2= 30µl/ml), de l'extrait aqueux du buis sur les glucides hémolympatiques. On remarque que, la concentration des glucides hémolympatiques chez les larves traitées a diminué légèrement par rapport au témoin (**Annexe 10**).

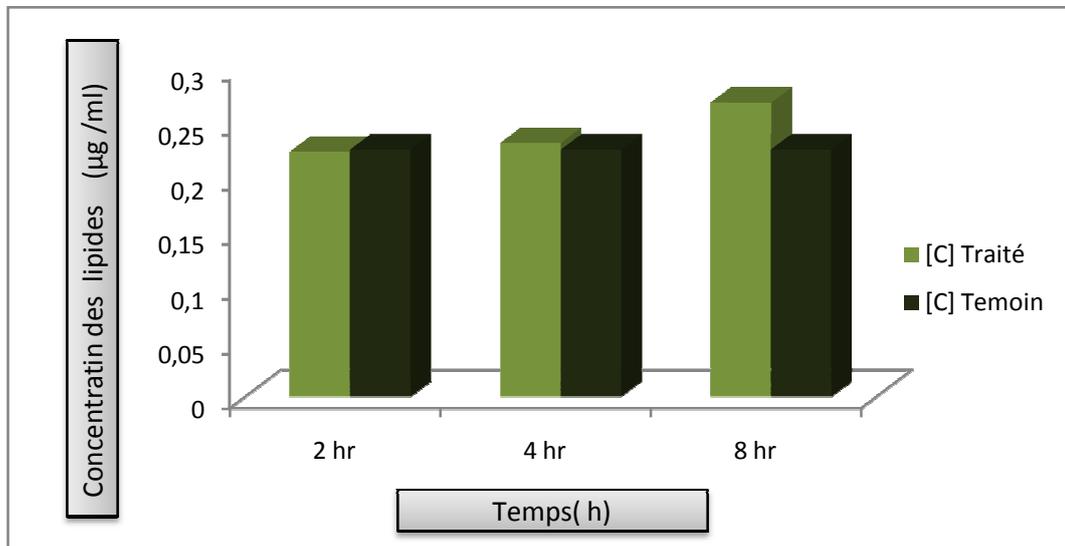


Figure 28 : Les concentrations en lipides hémolympatiques chez les individus traités par l'extrait aqueux du Buis.

La Figure 28 représente l'ensemble des résultats relatifs à l'effet de la dose (D2= 30µl/ml), de l'extrait aqueux du buis sur les lipides hémolympatiques. On remarque que, la concentration des lipides hémolympatiques chez les larves traitées est la même par rapport au témoin après 2h, augmenter légèrement après 4h et plus après 8h (**Annexe 10**).

V-Effet du substrat alimentaire sur le développement de *Galleria mellonella*

- Pendant 15 jours d'essai, notre étude a montré que les larves de *Galleria mellonella* se sont adaptées dans tous les milieux et ont continué leur cycle de vie naturellement dans les différents substrats alimentaires utilisés avec une différence constatée dans le poids des larves testées.

Tableau17: Résultats de l'évolution du poids larvaire dans le temps

Milieux / Jour	J 1	J 2	J 8	J 12	J 15
Mi 1	1,22	1,86	2,48	3,53	3,84
Mi 2	1,26	2,46	3,91	3,77	3,28
Mi 3	1,244	2,04	3,55	3,97	3,53
Mi 4	1,244	2,13	3	3,91	2,6

J: jour, Mi: Milieu

Les résultats de l'évolution du poids larvaire dans le temps révèlent une augmentation du poids de chaque larve dans les différents substrats alimentaires testés avec une large augmentation du poids le 8^{ème} jour pour le milieu 2 (synthétique a base de miel liquide et semoule de maïs) avec 3.91 mg, 3.55 mg pour le milieu 3 (synthétique a base de miel liquide et farine entière grossière), 3 mg pour le milieu 4 (naturel a base de déchet récupéré de la ruche) et 2.48 mg pour le milieu1(naturel a base de pollen). Puis une diminution de poids a été constatée lorsque les larves ont commencé leur stade nymphal.

On a montré que les milieux synthétiques sont les plus préférés pour les larves par rapport aux milieux naturels cela est confirmé par la **Figure 29**

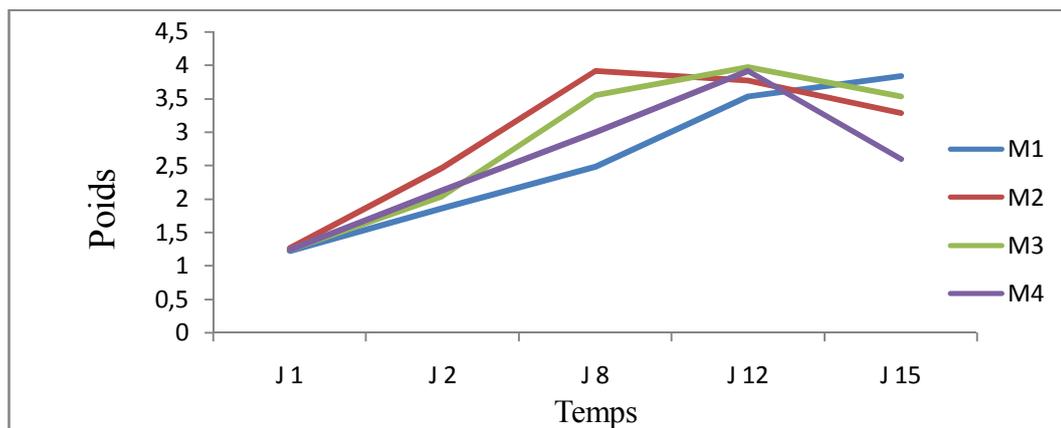


Figure 29 : Résultats d'évolution du poids d'une larve dans le temps

Les résultats obtenus, montrent aussi que la durée moyenne de stade nymphal est de 8 jours, dans ce stade, le poids des pupes a progressivement diminuée par rapport au stade larvaire (**Annexe 4**).

- Le taux journalier d'évolution des larves est exprimé par le tableau suivant

La répartition des individus selon leur stade de développement (larve, nymphe, adulte) durant 15 jours d'essai est exprimée par le tableau suivant :

Tableau 18 : La répartition des individus testés sur les différents milieux selon leur stade de développement

	1J			J5			8J			12J			15J		
	L	Pu	Ad	L	Pu	Ad	L	Ad	Ad	L	Pu	Ad	L	Pu	Ad
Mi 1	100%	0%	0%	100%	0%	0%	86,66%	13,33%	0%	86,66%	13,33%	0%	80%	6,66%	13,33%
Mi 2	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	73,33%	26,66%	0%	53,33%	26,66%	20%
Mi 3	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	80%	20%	0%	53,33%	26,66%	20%
Mi 4	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	93,33%	6,66%	0%	60%	26,66%	13,33%

L : Larve, Pu : Puppe, Ad : Adulte, J : jour, Mi : Milieu

Le tableau confirme les résultats précédant indiquant que les milieux synthétiques sont les plus favorables pour les individus et leurs durées de développements. En effet, le passage au stade adulte est plus rapide chez les larves alimentées par les milieux synthétiques (M2etM3), dans ces deux milieux le taux d'émergence est de 20% au bout de 15jours. Par contre pour la même durée, un taux d'émergence de 13.33% est atteint pour les deux autres milieux naturels (M1et M4).

VI-Discussion générale

Les résultats des tests phytochimiques effectués dans la présente étude montrent la présence majoritaire des tanins totaux, tanins gallique, tanins catéchique, saponosides, alcaloïdes, mucilage et glucoside. Moyennent riche en flavonoïdes et elle renferme des anthocyanes en très faible quantité. En fin les résultats montrent l'absence des amidons et leuco-anthocyanes.

Nos résultats confirmés par ceux de **(Belaidi et Boudiaf, 2014)** pour la même plante le Buis« *Buxus sempervirens L.* ». Ces substances actives des plantes présentent un large spectre d'action et n'épargnent pas les organismes non cibles **(Barbouche et al., 2001)**, et ne cause pas le développement de résistance chez les insectes traités comme les insecticides chimiques, **(Georghiou et al., 1975 ; Sinigre et al., 1977)**.

La présence de ces métabolites secondaires notamment les tanins et les alcaloïdes nous a incités à étudier l'activité insecticide de la plante

L'utilisation d'extraits des plantes comme insecticide est connue depuis longtemps. En effet, le pyrèthre, la nicotine, la roténone ont déjà été utilisés comme agents de la lutte contre les insectes **(Crosby, 1966)**. Les polyphénols ainsi que les alcaloïdes sont des métabolites toxique utilisés comme insecticide dans la lutte contre les insectes **(Raymond et al., 2011)**.

les alcaloïdes induisent des effets toxiques vis-à-vis des insectes **(bouchelta et al., 2005)**.

Le traitement des larves de *Galleria mellonella* des doses croissantes de polyphénols, extraits aqueux et alcaloïdes du buis « *Buxus sempervirens L.* », a résulté des taux de mortalité élevés surtout pour la forte dose (60 µl/ml) avec un taux de 100 % aû bout de 3 jours pour les polyphénols, de 80 % en 8 jours pour l'extrait aqueux et de 100% en 4 jours pour les alcaloïdes. La toxicité de l'extrait est d'autant plus élevée lorsque les doses sont importantes. Les résultats trouvés par **Baba-Aissa et Badaoui, (2016)** montrent que les bios tests réalisés avec l'extrait polyphénolique des feuilles de faux fenouil et la coriandre ont donné 100 % de mortalité chez les

larves de *Galleria mellonella* dans un délai de 3 à 4 jours. L'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de **Jang et al.(2002)**.

Le traitement effectué par les alcaloïdes et polyphénols a apporté des résultats intéressants avec un pouvoir larvicide importante cette activités insecticides vis-à-vis *Galleria mellonella* est plus importante que celle des extrait aqueux pour du Buis« *Buxus sempervirens L.* »

Les résultats des TL50 obtenus pour la dose la plus forte montrent des valeurs du TL50 de 2.06 jours, 0.27 jours et 1.27 jours de l'extrait aqueux, polyphénols et alcaloïdes respectivement. Les résultats des DL50 obtenus 2 jours après traitement montrent une valeur de (32.42µl/lm) pour l'extrait aqueux, (7.63µl/ml) pour les polyphénols et de (31.71µl/lm) pour les alcaloïdes.

L'injection de l'extrait aqueux dans l'hémolymphe de l'insecte a mené par conséquence, une augmentation de la concentration des protéines hémolyphatiques des larves traitées comparant aux larves témoins, ce qui signifie qu'ils ont un impact sur le métabolisme biochimique de l'insecte. En effet, une étude réalisée par Oulebsir-Mohankaci (2012) sur l'effet des bactéries *Bacillus sp.*(HE799656) et *Bacillus sp.*(HE805963) sur les protéines hémolympatiques du criquet migrateur *Locusta migratoria*, a révélé une augmentation du taux des protéines, l'auteur a attribué cette augmentation au fait que l'individu traité sécrète des substances de nature protéique comme forme de défense ou en cas de stress.

Chez les insectes, la présence des protéines du stress a été mise en évidence (**Gourdon et al., 1998**). Une diminution de la concentration des glucides hémolyphatiques chez les larves traitées comparant aux larves témoins a été constatée cela peut être du aux dépenses énergétique des individus traitées pour se défendre contre la molécule bioactive injectée (**Soltani, 1990**).

Contrairement à ces résultats, la concentration des lipides dans l'hémolymphe ne semble pas affectée par l'injection de l'extrait aqueux pendant les deux premiers temps, par contre une augmentation de taux des lipides a été constatée 8h après traitement.

Enfin, après avoir mené cette étude, on note que le buis « *Buxus sempervirens L.* » contiennent des substances actives qui présentent un effet insecticide à l'égard de *Galleria mellonella*, cela a été prouvé statistiquement, cet effet est nettement corrélé et significatif avec les dose et le temps.

D'après **Jacobson (1989)**, plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées, la protection des cultures contre les insectes ravageurs par des extraits végétaux a été étudiée aussi bien sur des larves de lépidoptères (**Lee et al., 2002**) que sur des larves d'acridiens (**Barbouche et al., 2001**).



Conclusion

Conclusion générale

Conclusion et perspectives

Les plantes sont capables de produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires (les sucres, les lipides et les protéines en quantité élevée), ils accumulent des métabolites dits secondaires en faible quantité parmi les quelles, les tanins, les polyphénols, les alcaloïdes, les huiles essentielles et les mucilages, très utilisées par l'homme dans différents domaines.

Notre étude réalisée au sein des laboratoires de la faculté des sciences (U.M.B.B.) sur le Buis « *Buxus sempervirens* L. », une des plantes de la flore Algérienne, permis de mettre en évidence la présence de différents groupes chimiques dans la poudre des feuilles, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique de cette dernière.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité biologique de Buis « *Buxus sempervirens* L. » à l'égard de la fausse teigne des ruches (*Galleria mellonella*), les substances utilisées sont les polyphénols, l'extrait aqueux et les alcaloïdes.

L'analyse phytochimique de Buis « *Buxus sempervirens* L. » a mis en évidence la présence des tanins, des alcaloïdes, des saponosides, des glucosides et des mucilages, avec l'absence de l'amidon, antocyane et leucoanthocyane ce qui a été confirmé lors des réactions de caractérisation.

Le plus fort rendement a été obtenu avec l'extrait polyphénolique qui est de 29.05%. Cependant l'extrait des alcaloïdes présentent un rendement de 2.36%.

Dans le but de réussir l'élevage de *Galleria mellonilla* utilisé dans nos biotests les résultats de l'effet des différents substrats alimentaires sur son développement on plus que les larves de *Galleria mellonilla* s'adapte bien et continuent leur cycle de vie normalement dans tous les substrats alimentaire testés mais avec des préférences au milieu synthétique a base de miel liquide.

A la lumière des résultats obtenus, il s'est avéré que le traitement a apporté des résultats importants, notamment pour les polyphénols et les alcaloïdes par rapport à l'extrait aqueux. En effet, un taux de mortalité très élevé a été enregistré pour les deux premiers (polyphénols

Conclusion générale

et alcaloïdes). Contrairement au deuxième (extrait aqueux) qui a occasionné un taux de mortalité moins important.

D'autre part, l'injection de l'extrait aqueux dans l'hémolymphe de l'insecte a mené par conséquence, une augmentation de la concentration des protéines et des lipides hémolympatiques, une diminution de la concentration des glucides hémolympatique des larves traitées comparant aux larves témoins.

Les polyphénols, l'extrait aqueux ainsi que les alcaloïdes sont des substances naturelles d'origine végétale que l'on trouve dans l'alimentation quotidienne et qui sont efficaces sur quelques insectes ravageurs et atoxiques pour les mammifères. Ils sont aussi biodégradable ce qui les favorise des produits chimique en contenant une composition insecticide qui ne porte pas atteinte à l'environnement.

Des perspectives ressortent de ce travail de recherche prometteur :

- Il faudrait envisager de conduire au préalable des essais dans les conditions naturelles sur les ruches infectées en vue d'évaluer l'efficacité réelle de ces extraits dans la lutte contre *Galleria mellonella*, et l'identification précise des composés responsables de l'activité larvicide des polyphénols, extrait aqueux et des alcaloïdes.
- s'assurer que ces extraits phénoliques n'apportent pas un danger pour l'apiculture et l'environnement, et qu'ils ont un impact minimal sur l'ensemble des composantes de la ruche et de l'agroécosystème.
- Etudier de façon approfondie le mécanisme d'action des polyphénols et des alcaloïdes sur métabolisme biochimique l'insecte.
- sachant que les extraits de plantes perdent leur activité biologique sous le rayonnement solaire, les modes d'action, les modalités d'application et l'impact des facteurs physiques sur la dégradation des composés botaniques testés, doivent aussi être étudiés.



*Références
bibliographique*

Référence :

A

- ✓ **Adam G., 2012.** pathologie apicole. Ecole d'apiculture des ruchers du sud-luxemburg, 24p.
- ✓ **Adel-Naby A.A., Atallah M.A., Mourad M.G. and Mohamed A.A. 1983.** Effect of different temperatures , relative humidity and light on the immature stages of the greater wax Nutrition and développement of *Galleria Mellonella* 54 moth (*Galleria Mellonella*). Proceeding of 5th Arab Pesticides Conference, Tanta University 1 : 94-103p.
- ✓ **Allan L., 2000.** Wax Moth and its Control. Département of Agriculture Western Australia. <http://www.agric.wa.gov.au/agency/pubns/farmnote/2000/f00697.htm>

B

- ✓ **Badiaga M. 2011-** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia Smith*, une plante médicinale africaine récoltée au mali. Thèse de doctorat. Ecole Doctorale des Sciences Fondamentales Mali. 127p.
- ✓ **Barbouche N., Hajjem B., Lognay G. et Ammar M., 2001.** Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (*Solanaceae*) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2), p. 8590.
- ✓ **Beenakers, A.M.th., Van Der Host, D.G. and van Marrewijk, W.J.A. (1985).** Insect lipids and lipoproteins and they role in physiological processes. *Prog. Lipid. Res.*, 24 : 19-67.
- ✓ **Bertrand A., 2007.** Travaux pratiques. Détermination des activités endon. Et exo. B glucanases, étude de l'activité pectine méthylestérase, dosage des protéines, INRA UCBNEVA, 15p.
- ✓ **Bfaye F. 1998-** Contribution à l'étude des principes actifs de *Tinospora bakis* : Activité cholérétique de la fraction bases tertiaires. Thèse de doctorat .Université Cheik Anta Diop de Dakar.
- ✓ **Bird C.W , Lynch J. M. , Pirt F J., and Reid .**
The nomenclature of stéroïdes recommendations 1971, vol.230(5294) :473-474.

- ✓ **Bollhalder F., (1997).** Trichogrammes dans la lutte contre la fausse teigne.
- ✓ **Bouaziz H., Fki I., Jemai H., Ayadi M., Sayadi S. (2008).**Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidant from Chemlali olive leaves. Food Chemistry. 108: 253–262.
- ✓ **Bouchelta A., Boughdad A. et Blenzar A., 2005.** Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae). Biotechnol Agron Soc Environ 2005; 9: 21-30.
- ✓ **Boucher Y , D Arseneault, L Sirois, 2009** Forest ecology and management 258 (7), 1359-1368
- ✓ **Bruneton J. 1987-**Elément de phytochimie et de pharmacognosie. Ed. Tec & Doc, Paris, 65P.
- ✓ **Bruneton J.,(1999)-** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3^e édition TEC & DOC, Paris 1999.
- ✓ **Bruneton J., 2005-** Plantes toxique végétales dangereuses pour l’homme et les animales .3eme Ed. Lavoisier. 618p.
- ✓ **Bruneton J., 2009-** Menthe in: pogharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. Tec et Doc. Paris. 631-638p
- ✓ **Botineau M. 2007-** Guides des plantes toxiques et allergisantes .Ed. Belin. 236p.
- ✓ **Bourchert A., (1966).** Die Krankheiten und Schädlinge Der Honigbiene. Hizrel Verlag Leipzig.

C

- ✓ **Charriere J. D. and Imdorf A., 1997.** Protection of honeycombs from Dietemann, V; Nazzi, F; Martin, S J; Anderson, D; Locke, B; Delaplane, K S; Wauquiez, Q; Tannahill, C; Frey, E; Ziegelmann, B; Rosenkranz, P; Ellis, J D (2013) Standard methods for varroa research. In V. Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume II: standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research. Journal of Apicultural Research 52(1): <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09> Doc, Paris, 1335 pp.
- ✓ **Charrière J. D. and Imdorf A., 1999.** Protection of Honey Combs from Wax Moth Damage. American Bee Jour., 139(8): 627-630 p.
- ✓ **Calabrese E. J. 2003-**Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. Science and Society: S37–S40.

- ✓ **Chase R. W. 1921.** The length of the life of the larva of the wax moth, *Galleriamellonella*L.,
- ✓ **Crosby D. G., 1966.** Natural pest control agents. *In* Gould, R.F. Ed. Natural Pest Control Agents. *Adv. Chem. Ser.* 53, p. 1-16
- ✓ **Couplan F .2009-** Le régal végétale, plantes sauvages comestibles, encyclopédie des plantes sauvages comestibles et toxiques de l'Europe. Ed. sang de la terre. Paris. 527p.

D

- ✓ **Desalegne B., 2001.** Origin and characterization of honeybee (*A. mellifera*) pollen source around Utrecht University, the Netherlands. M.sc thesis, Utrecht University, Faculty of Biology, Department of behavioural social insect unit
- ✓ **Delille. 2007-** Les plantes médicinales d'Algérie. 240p.

E

- ✓ **Elisabeth A. et Jullien J. 2010-** Guides écologique des arbustes, Ornement, Fruitier, Exigences, cultures, Maladies ravageurs et Protection biologique. Ed-Eyrolles, 525p
- ✓ **Eischen F.A. and Dietz A., 1987.** Growth and survival of *Galleriamellonella*(Lepidoptera:Pyralidae) larvaefeddietscontaininghoneybee-collected plant resins. *Annals of theEntomological Society of America* 80: 74-77.
- ✓ **Ellis J.D., Graham J.R. and Mortensen A., 2013.** Standard methods for wax mothresearch,*Journal of ApiculturalResearch* **52**(1): (2013).DOI 10.3896/IBRA.1.52.1.10.Ethnoplants, L'Atropa Belladonna « Belladone », Copyright © 2004/2010.

F

- ✓ **Fernandez N. et Coineau Y., 2007.** Maladie, parasites et autres ennemis de l'abeille mellifère.Ed. Atlantica, Biarritz, 1 vol, Paris. 498 p.

- ✓ **Fournier P.V. 2010**-Dictionnaire des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. Omnibus. Paris. 1047p.
- ✓ **Frohne D. et Pfander H.J. 2005** - Poisonous plants, A handbook for doctors, pharmacists, toxicologist, biologist and veterinarians. 2nd edition- Masion publishing, Londres, 469p

G

- ✓ **GallaiN , Salles JM, Vaissières BE, 2009***Bull. Tech. Apic. 36(3) : 110-116 p.*
- Georghiou G. P., Ariaratnam V., Pasternak M.E. and Lin C. S., 1990.** Organophosphorus multiresistance in *Culex quinquefasciatus* in California. *J. Econ. Entomol.* 68, p. 461-467.
- ✓ **Gerber M. (1994).** Olive oil and cancer. In: Hill MJ, Giacosa A, Caygill CPG, eds. *Epidemiology of Diet and Cancer*. Chichester, Ellis Horwood. 263-275.
- ✓ **Ghesten A., Seguin E., Paris M. et Orechioni A. 2001-** Le préparateur en pharmacie, dossier 2 : Botanique - pharmagnosie – phytothérapie – phytothérapie - homéopathie. Ed Techniques et documentation, Paris, 275p
- ✓ **Gillard G., 2009.** MyFriend, the Wax Moth, *Amer. Bee J.* Vol. 149 no. 6, 559-562p
- ✓ **Godet J.D. 2007-** Arbres et arbustes aux quatre saisons, les guides de naturaliste. 2^{ème} édition Delachaux et Nestlé. 215p
- ✓ **Gourdon I., Guerin M.C. et Torreilles J., 1998.** Mécanismes cellulaires et moléculaires de la réponse aux stress chez les bivalves marins = Cellular and molecular mechanisms of the stress response from marine bivalvia. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiale.* 192 (4): 749-774
- ✓ **Guignard J., 1985.** Biochimie végétale. Lavoisier, Paris, 175-192 P.
- ✓ **Gerber M. (1994).** Olive oil and cancer. In: Hill MJ, Giacosa A, Caygill CPG, eds. *Epidemiology of Diet and Cancer*. Chichester, Ellis Horwood. 263-275.

H

- ✓ **Hansen H. and brodsgaard C.A., 1999**. American foulbrood : a review of its biology, diagnosis and control, *BeeWorld*, 80(1), 5-23 p.
- ✓ **Huang C.L., Sumpio B.E. (2008)**. Mediterranean diet and cardiovascular health. *American College of Surgeons*. 207 (03): 408–416.
- ✓ **Huber U. 1998-** Analysis of Atropine in Belladonna extract (*Atropa Belladonna*) by HPLC, Agilent Technologies. Publication Number 5968-2975, 1998.
- ✓ **Hummel R. et Feltin M., 2014**. Reconnaître les maladies des abeilles quand on est apiculteur débutant.

I

- ✓ **Iseri P., 2001-** Encyclopédie des plantes médicinales. Ed-larousse, Paris, 427p.

J

- ✓ **Jang Y. S., Kim M. K., Ahn Y. J. and Lee H.S., 2002**. Larvicidal activity of Brazilian plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera : Culicidae). *Agric. Chem. Biotechnol.* 45 (3), p. 131–134.

K

- ✓ **Keys A., Keys M. (1975)**. How to Eat Well and Stay Well, the Mediterranean Way. Garden City: Doubleday and Co. p: 325.
- ✓ **Kone** Décret n° 09-157/P-RM du 9 avril 2009

L

- ✓ **Lesage-Meessen L., Navarro D., Maunier S., Sigoillot J.-C., Lorquin J., Delattre M., Simon J.-L., Asther M., Labat M. (2001)**. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*. 75: 501–507

- ✓ **Longaga A.O., Vercruyse A. et foriers A., 2000** - contribution to the ethnobotanical ,phytochemecal and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the tretment of dysentery and diarrhea in lomola area , Democratic Republic of Congo. J. Ethnopharmacol, 71: 411-423pp.

M

- ✓ **Miolan P. 2008-** *Le Truffaut, encyclopédie pratique illustrée du jardin.* Ed. Larousse. Paris. 256p.
- ✓ **Morell, G. (2003).** From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. Ball SG(1), **2003**;54:207-33.

N

- ✓ **Nedelec P. 1993-** *Larousse du jardin .Ed. Larousse. Paris. 60p*

P

- ✓ **Paddock F. B., 1918.** The beemoth or waxworm. Texas Agricultural ExperimentStation; USA.44 pp
- ✓ **Park I.K. ,Lee S.G. , Choi D.H. , Park J. D. and Ahn Y. J., 2003.** StoredProd. Res. 39 , 375-384 p.
- ✓ **-Pereire A. 1994-** Encyclopédie pratique du jardin, Ed-Hachette, Paris, 279p
- ✓ **-Peschier et Jacqufmin, 1929 :** ANALYSE DE DIFFERENTES **PABTIES** de L'anagyrsfoitida du cytisis la buraum, et ducoronillavaria ; par **MM.PES-CHIER** et **JACQUFMIN** ,(troinmsdorf,Neues,Journal des pharmacie ; Tom,XXI ,2^{er} cah.,P.44.)

- ✓ **Paoloni S. Email author; J. Hein; T. Töpfer; H.G. Walther; R. Sauerbrey; D. Ehrt; W. Wintzer. 7 janv. 2004 - February 2004 ,**
Volume 78, Issue 3, pp 415–419 .

R

- ✓ **Razafindrazaza A. D., 2010.** Potentialités et contraintes de la filière apicole dans le district De Manakara Région Vatovavy Fitovinany. Université de D'Antananarivo. 54 p.485R. Revilla et al. / *Neuropharmacology* 41 (2001)480–485
- ✓ **Reynaud J., 2011-** La flore du pharmacien, édition TEC & DOC, Paris.
- ✓ **Rolland Yohan** Burgundy Botanical Extracts, Actiparc de Pont de Vaux, Les Chapelles Sud, 01190 Reysouze - France OCL VOL. 11 N° 6 NOVEMBRE-DE'CEMBRE 2004

S

- ✓ **Scalbert A., Morand C., Manach C., Rémésy C. 2002-**Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002 : 56(6):276-82.
- ✓ **Smith T. L., 1965.** External morphology of the larva, pupa and adult of the wax moth *Galleria mellonella* L. *Journal of the Kansas Entomological Society* 38: 287-310
- ✓ **Sinégre G., Jullien J.L. and Gaven, G., 1977.** Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens* (L) dans le midi de la France. *Parassitologia.* 17,79-94.
- ✓ **Shimanuki H., 1981.** Contrilling the greater wax moth. USDA publication. 11p.
- ✓ **Soltani., 1990.** Action de duflubenzuron et de la 20-hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolympatique chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L. *Annale Société Entomologie de France.* 26 (4) : 575-584.
- ✓ **Spangler H.G., 1989.** The role of ultrasound and pheromone communication of greater and lesser wax moths. *Bee World* 70(3): 132-133 p.

- ✓ **Stichman W., Stichmann M.U. 2000-** Guide Vigot de la flore d'Europe. Ed. Vigot. Paris. 447p.

T

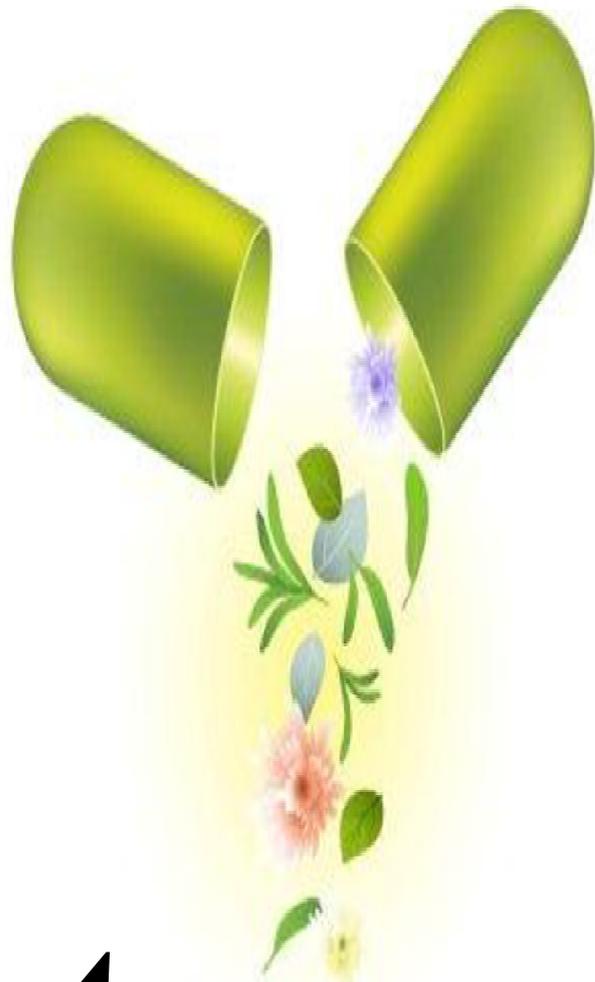
- ✓ **Tana L., Kambu K., Ngimbi N., Cimanga K. et Vlietinck A.J., 1998 –** Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, 61(1) : 57-65pp

V

- ✓ **Vernier F. 1997-** Le Buis (*Buxus sempervirens*) en Lorraine, plante vraisemblablement introduite par l'homme. *Bulletin des académies et sociétés* N°03.
- ✓ **Vercauteren J. 2007-** Pharmacognosie Spéciale-Drogue à mévalonates-Drogue à terpénoïdes-Drogues à hétérosides saponosidiques-Généralités-Plan-Formules, Plan du cours de pharmacognosie-Formation commune de base, édition 2007.
- ✓ **Von Frish K., 2011.** Vie et Mœurs des abeilles. [Perso.fundp.ac.be/jvandyck/homage/books/mathis/.../A12.shtm](http://perso.fundp.ac.be/jvandyck/homage/books/mathis/.../A12.shtm)

W

- ✓ **Warren J. and Huddleston P., 1962.** Life history of the greater wax moth, *Galleria Mellonella* L., in Arkansas. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 35: 212-216 p.
- ✓ **Williams J. L., 1997.** Insectes: Lepidoptera (moths). In R Morse; K Flottum (Eds). Honeybeepests, predators, and diseases. The AI Root Company; Ohio, USA. 121-141 p.



Annexes

Annexes

Annexe 1

Tableau 1 : matériel non biologiques utilisé.

Appareillages et équipements	Verreries et consommable	Réactifs
Broyeur électrique Agitateur Etuve Plaque chauffante Spectrophotomètre Balance analytique Rota-vapeur Bec-benzène Réfrigérateur Bain-marie Congélateur	Bécher Eprouvette Tube à essai Papier aluminium Papier filtre Entonnoirs Gant Boite de pétri Erlenmeyers Spatule Flacon Pinces Pipettes pasteur Pipette gradué Micropipette Disque de papier wattmen	Chloroforme Méthanol Eau distillé FeCl ₃ a 5% Formol a 40% HCL Acétate de plomb Ether Ether de pétrole Ether di-éthylique Acide chlorhydrique Magnésium Iode Alcool iso-amylque Ethanol absolu H ₂ O Ammoniaque Acide sulfurique Acide ortho-phosphorique Réactif de dragendroff

Annexe 2 :

Tableau 2 : préparations de réactif de dragen-droff

Réactif de dragen-droff
-Solution A : 0,85 g de nitrate de bismuth + 40 ml d'eau distillé +10 ml d'acide acétique. -Solution B : 8 g d'iode de potassium + 2 ml d'eau distillé. -On mélange A+B. - 15 ml de mélange + 20 ml d'acide acétique puis compléter a 100 ml par l'eau distillée.

Annexes

Annexe 3 :

Transformation of percentages to probits										
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,5	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,8	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,30	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
—	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
99	7,33	7,37	7,41	7,40	7,51	7,58	7,65	7,75	7,88	8,09

Annexes

Annexe 4 :

Tableau 3 : les différents substrats alimentaires

milieux	boîtes	NL	P(mg)	MP(mg)	J	NL	P(mg)	MP(mg)	J	NL	P(mg)	MP(mg)	J	NL	P(mg)	MP(mg)	J	NL	P(mg)	MP(mg)	J
1	B1	5L	18	18,33	1	5L	27	28	5	4L+1Pu	41	37,33	8	4L+1Pu	75	53	12	4L+1Pu	98	57,66	15
	B2	5L	18			5L	22			4L+1Pu	33			4L+1Pu	46			4L+1 Ad	52		
	B3	5L	19			5L	35			5L	38			5L	38			4L+1 Ad	23		
2	B1	5L	18	19	1	5L	39	37	5	5L	57	58,66	8	3L+2Pu	56	56,66	12	3L+2Ad	57	49,33	15
	B2	5L	20			5L	33			4L+1Pu	62			1L+2Pu+1Ad	54						
	B3	5L	19			5L	39			4L+1Pu	56			3L+2Pu	37						
3	B1	5L	19	18,66	1	5L	30	30,66	5	5L	54	55,33	8	5l	79	59,66	12	4Pu+1Ad	72	53	15
	B2	5L	19			5L	34			4L+1Pu	65			4L+1Ad	64						
	B3	5L	18			5L	28			3L+2Pu	35			4L+1Ad	23						
4	B1	5L	18	18,33	1	5L	34	32	5	5L	44	45	8	4L+1Pu	54	58,66	12	4L+1Ad	48	39	15
	B2	5L	19			5L	28			4L	53			2L+2Pu	35						
	B3	5L	18			5L	34			5L	69			3L+2Pu	34						

B : Boîte, **P** : Poids, **J** : Jour, **NL** : Numéro de Larves, **MP** : Moyenne de Poids,

Annexes

Annexe 5 :

Tableau 4 : taux de mortalité journalière chez les larves L5 de *G.mellonella* traitées par les polyphénols du buis

jours	Témoins					D1 = 15 µl/ml						D2=30 µl/ml						D3 = 60 µl/ml					
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	MC	R1	R2	R3	M	ET	MC	R1	R2	R3	M	ET	MC
1	0	0	0	0	0	0	20	100	40	52,92	40	40	60	100	66,67	30,55	66,66	40	40	100	60	34,64	60
2	0	0	0	0	0	20	40	100	53,33	41,63	53,3	3	80	100	61	51,22	61	60	60	100	73,3	23,09	73,33
3	0	40	0	13,33	23,1	20	40	100	53,33	41,63	46	40	80	100	73,33	30,55	69,22	100	100	100	100	0	100
4	0	20	0	6,667	11,5	20	40	100	53,33	41,63	54	60	100	100	86,67	23,09	85,72	100	100	100	100	0	100
5	0	20	40	20	20	40	40	100	60	34,64	50	60	100	100	86,67	23,09	83,33	100	100	100	100	0	100
6	0	20	40	20	20	40	40	100	60	34,64	50	60	100	100	86,67	23,09	83,33	100	100	100	100	0	100
7	0	40	40	26,67	23,1	40	40	100	60	34,64	45,5	60	100	100	86,67	23,09	81,81	100	100	100	100	0	100
8	0	60	40	33,33	30,6	60	60	100	73,33	23,09	60	80	100	100	93,33	11,55	90	100	100	100	100	0	100
9	0	60	40	33,33	30,6	80	80	100	86,67	11,55	80	80	100	100	93,33	11,55	90	100	100	100	100	0	100
10	0	60	40	33,33	30,6	100	80	100	93,33	11,55	90	80	100	100	93,33	11,55	90	100	100	100	100	0	100

R : Répétition, M : Moyenne, ET : Ecart Type

Annexes

Tableau 5 : taux de mortalité journalière chez les larves L5 de (G.mellonella) traitées par l'extrait aqueux du buis

jours	Témoins					D1 = 15 µl/ml						D2=30 µl/ml						D3 = 60 µl/ml					
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	MC	R1	R2	R3	M	ET	MC	R1	R2	R3	M	ET	MC
1	0	0	0	0	0	0	0	100	33,33	57,74	33,33	0	20	100	40	52,92	40	0	20	100	40	52,92	40
2	0	0	0	0	0	0	0	100	33,33	57,74	33,33	20	20	100	46,67	46,19	46,67	20	40	100	53,33	41,63	53,53
3	0	0	0	0	0	20	0	100	40	52,92	40	20	20	100	46,67	46,19	46,67	40	40	100	60	34,64	60
4	20	0	20	13,33	11,55	40	20	100	53,33	41,63	46,15	40	40	100	60	34,64	53,85	40	40	100	60	34,64	53,85
5	20	0	40	20	20	40	40	100	60	34,64	50	40	40	100	60	34,64	50	60	40	100	66,67	30,55	58,33
6	20	0	60	26,67	30,55	40	40	100	60	34,64	45,45	60	60	100	73,33	23,09	63,63	60	60	100	73,33	23,09	63,63
7	20	20	60	33,33	23,09	40	40	100	60	34,64	40	60	60	100	73,33	23,09	60	60	60	100	73,33	23,09	60
8	20	40	40	33,33	11,55	40	60	100	66,67	30,55	50	80	60	100	80	20	70	80	80	100	86,67	11,55	80
9	20	40	40	33,33	11,55	40	60	100	66,67	30,55	50	80	60	100	80	20	70	80	80	100	86,67	11,55	80
10	40	40	40	40	0	40	60	100	66,67	30,55	44,45	80	100	100	93,33	11,55	88,88	80	80	100	86,67	11,55	77,78

R : Répétition, M : Moyenne, ET : Ecart Type

Annexes

Tableau 6 : taux de mortalité journalière des larves L5 de (*G.mellonella*) traitées par les alcaloïdes du buis

jours	Témoins					D1 = 15 µl/ml						D2=30 µl/ml						D3=60 µl/ml					
	R1	R2	R3	M	ET	R1	R2	R3	M	ET	MC%	R1	R2	R3	M	ET	MC%	R1	R2	R3	M	ET	MC%
1	0	0	20	6,667	11,55	20	60	40	40	20	35,72	40	40	60	46,67	11,55	50	80	60	40	60	20	57,14
2	40	20	20	26,67	11,55	40	60	60	53,33	11,55	36,36	40	60	60	53,33	11,55	46,66	80	60	40	60	20	63,65
3	40	20	20	26,67	11,55	60	80	60	66,67	11,55	54,54	60	80	60	66,67	11,55	54,54	80	80	40	66,67	23,09	54,54
4	40	40	40	40	0	60	80	60	66,67	11,55	44,45	100	80	80	86,67	11,55	44,45	100	100	100	100	0	100
5	40	40	40	40	0	80	100	100	93,33	11,55	55,55	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	0	100

: Répétition, **M** : Moyenne, **ET** : Ecart Type

Annexes

Annexe 6 :

Tableau 7 : Probit de pourcentages de mortalités corrigées MC% et logarithmes décimaux des temps chez les larves L5 (*G. mellonella*) traités par les Polyphénols du Buis.

			D 1		D 2		D 3	
			MC%	Probit	MC%	Probit	MC%	Probit
log T1	1	0	40	4,75	66,66	5,44	60	5,25
log T2	2	0,301	53,33	5,08	61	5,88	73,33	5,61
log T3	3	0,4771	46	4,9	69,22	5,5	100	8,09
log T4	4	0,6021	54	5,1	85,72	6,08	100	8,09
log T5	5	0,699	50	5	83,33	5,95	100	8,09
log T6	6	0,7782	50	5	83,33	5,95	100	8,09
log T7	7	0,8451	45,45	4,61	81,81	5,92	100	8,09
log T8	8	0,9031	60	5,25	90	6,28	100	8,09
log T9	9	0,9542	80	5,84	90	6,28	100	8,09
log T10	10	1	90	6,28	90	6,28	100	8,09

Tableau 8 : Probits de pourcentages de mortalités corrigées MC% et logarithmes décimaux des temps chez les larves L5 (*G. mellonella*) traités par l'extrait aqueuse du Buis

			D 1		D 2		D 3	
			MC%	Probit	MC%	Probit	MC%	Probit
log T1	1	0	33,33	4,26	40	4,75	40	4,75
log T2	2	0,30103	33,33	4,26	46,6667	4,92	53,53	5,1
log T3	3	0,47712	40	4,75	46,6667	4,92	60	5,25
log T4	4	0,60206	46,15	4,9	53,85	5,1	53,85	5,1
log T5	5	0,69897	50	5	50	5	58,33	5,1
log T6	6	0,77815	45,45	4,87	63,63	5,36	63,63	5,36
log T7	7	0,8451	40	4,75	60	5,25	60	5,25
log T8	8	0,90309	50	5	70	5,52	80	5,84
log T9	9	0,95424	50	5	70	5,52	80	5,84
log T10	10	1	44,45	4,85	88,88	6,23	77,78	5,77

Tableau 9: Probits de pourcentages de mortalités corrigées MC% et logarithmes décimaux des temps chez les larves L5 (*G. mellonella*) traités par les alcaloïde du Buis.

			D 1		D 2		D 3	
			MC%	Probit	MC%	Probit	MC%	Poribt
log T1	1	0	35,72	4,64	50	5	57,14	5,18
log T2	2	0,301	36,36	4,64	46,7	4,92	63,65	5,36
log T3	3	0,477	54,54	5,13	54,5	5,13	54,54	5,13
log T4	4	0,602	44,45	4,87	44,5	4,87	100	8,09
log T5	5	0,699	55,55	5,15	100	8,09	100	8,09

Annexes

Annexe 7 :

Tableau 10 : Test de tukey du traitement par les polyphénols du Buis

	Dose	T	D1	D2	D3
T	0		0,070219	0,002300	0,000510
D1	15	0,070219		0,641108	0,350424
D2	30	0,002300	0,641108		0,963643
D3	60	0,000510	0,350424	0,963643	

Tableau 11 : Matrice de la corrélation du traitement par les polyphénols du Buis

	Mortalité	Dose	Temps
Mortalité	1,00	0,68	0,29
Dose	0,68	1,00	0,00
Temps	0,29	0,00	1,00

Tableau 12 : Test de tukey du traitement par de l'extrait aqueux du Buis

	Dose	T	D1	D2	D3
T	0		0,000353	0,000137	0,000137
D1	15	0,000353		0,470283	0,243125
D2	30	0,000137	0,470283		0,973824
D3	60	0,000137	0,243125	0,973824	

Tableau 13 : Matrice de la corrélation du traitement par gavage de l'extrait aqueux du Buis

	Mortalité	Dose	Temps
Mortalité	1,00	0,45	0,38
Dose	0,45	1,00	0,00
Temps	0,38	0,00	1,00

Tableau 14 : Matrice de la corrélation du traitement par gavage de l'extrait aqueux du Buis

	Mortalité	Dose	Temps
Mortalité	1,00	0,58	0,58
Dose	0,58	1,00	0,00
Temps	0,58	0,00	1,00

Annexes

Annexe 8 : TL50

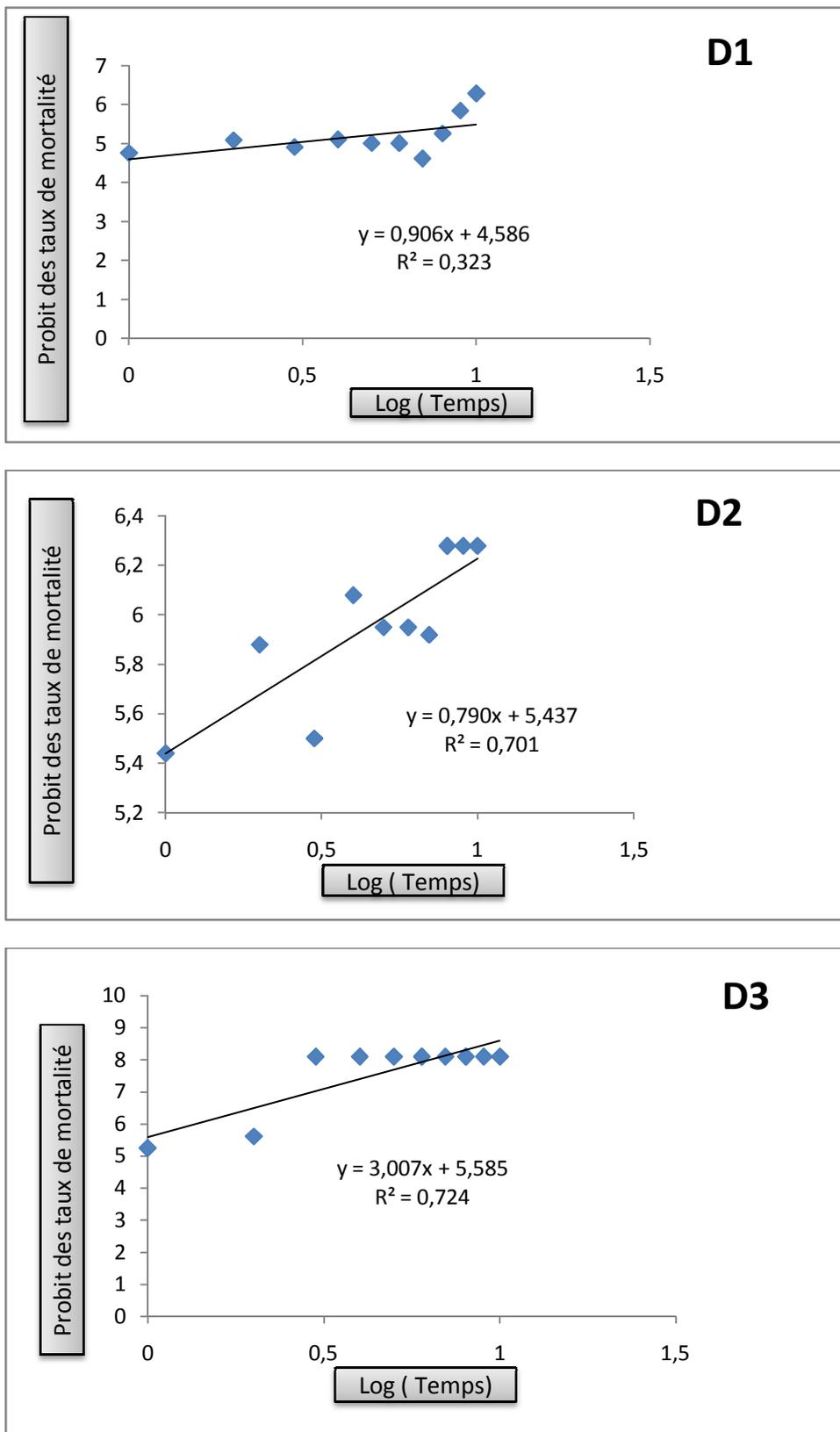


Figure 1 : Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement par les polyphénols du buis.

Annexes

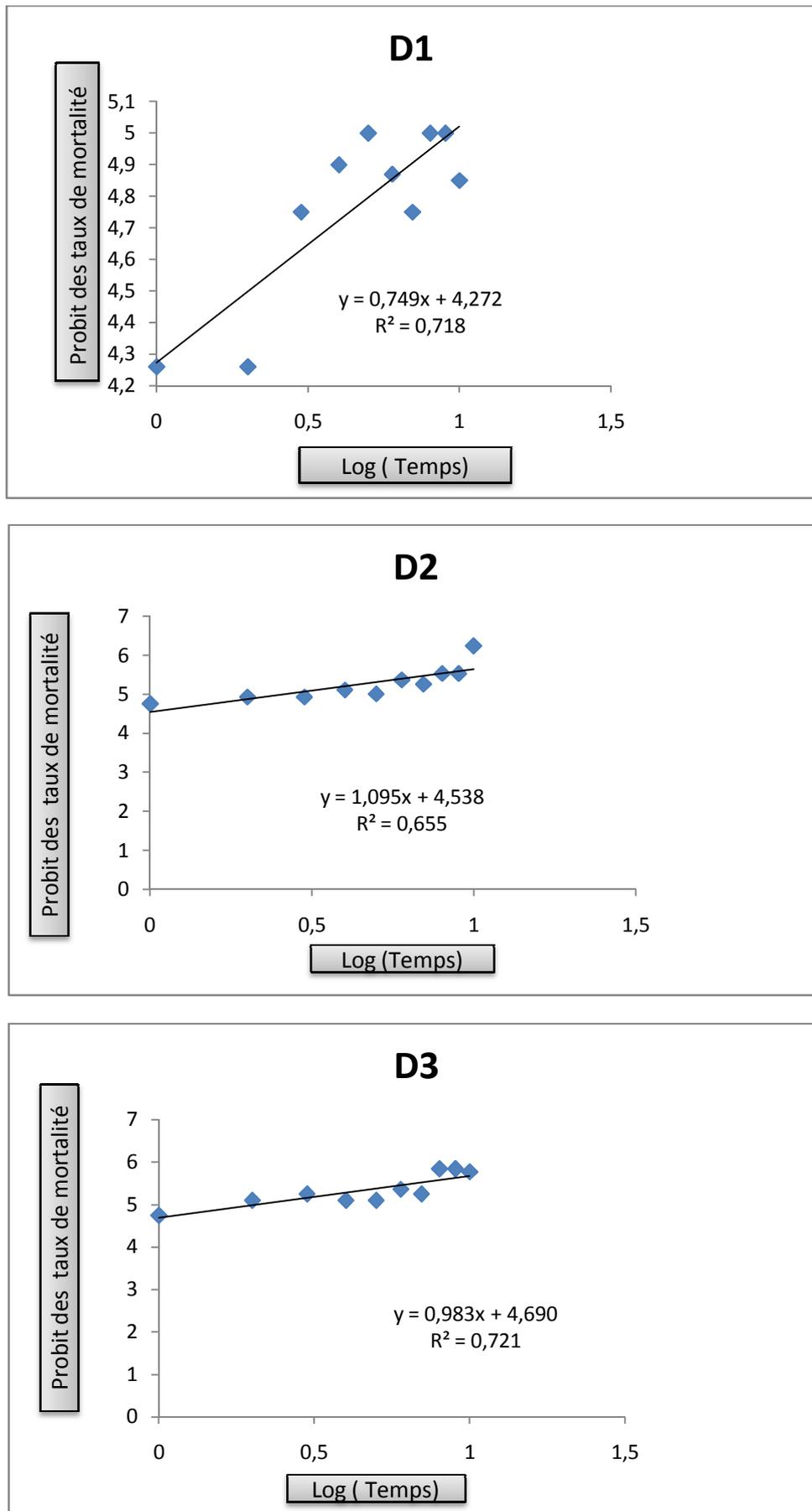


Figure 2 : Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement par l'extrait aqueux du buis.

Annexes

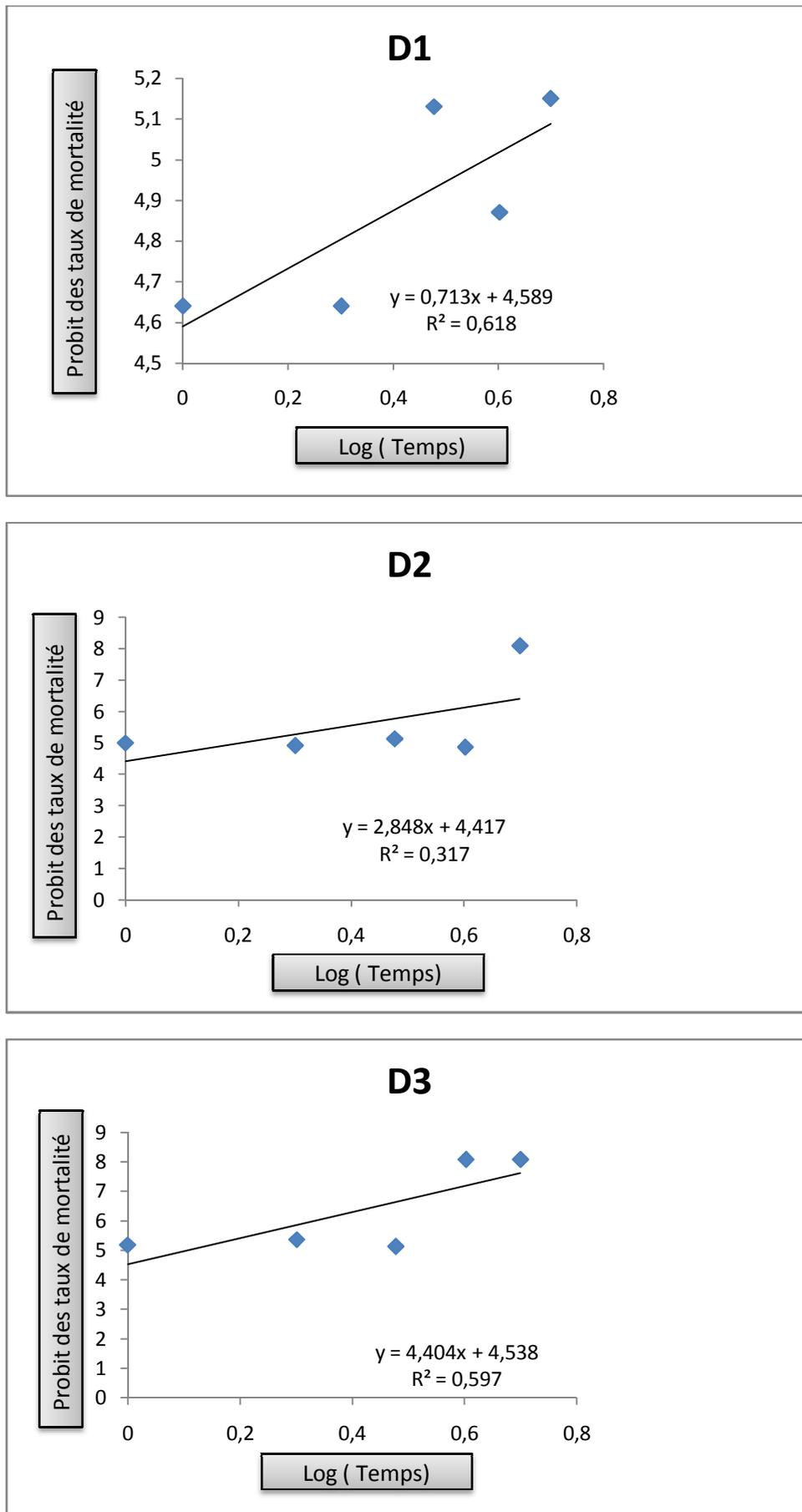


Figure 3 : Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement les alcaloïdes du buis.

DL50

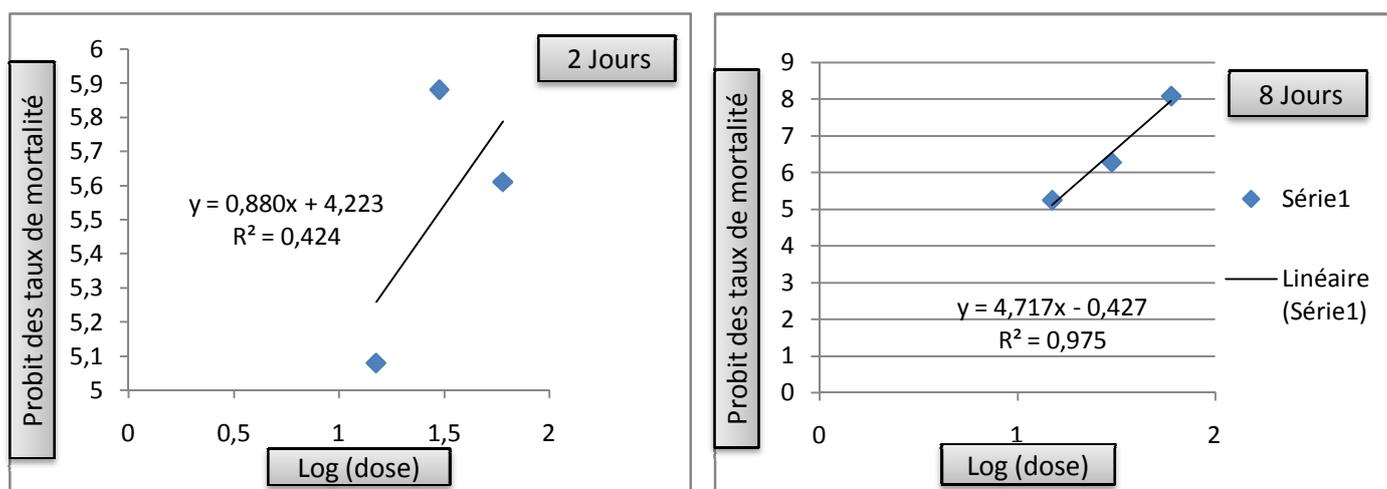


Figure 4 : Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement par les polyphénols du Buis

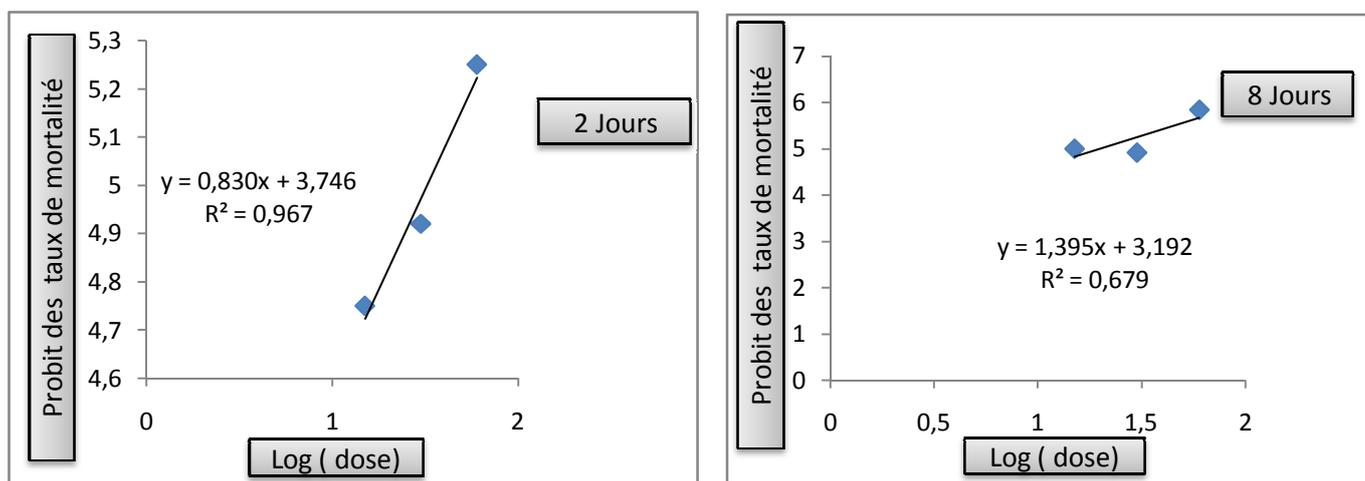


Figure 5: Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement par l'extrait aqueux du Buis

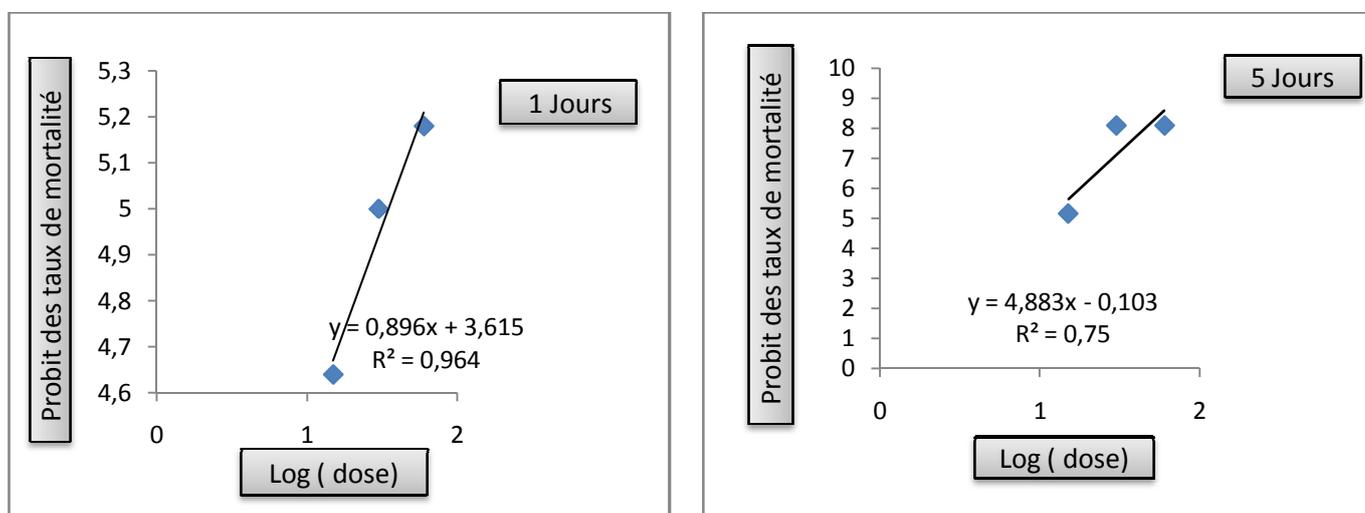


Figure 6: Droites de régression exprimant l'évaluation des taux de mortalité des larves L5 de *Gallaria mellonella* qui ont subi un traitement par les alcaloïdes du Buis

Annexes

Annexe 9 :

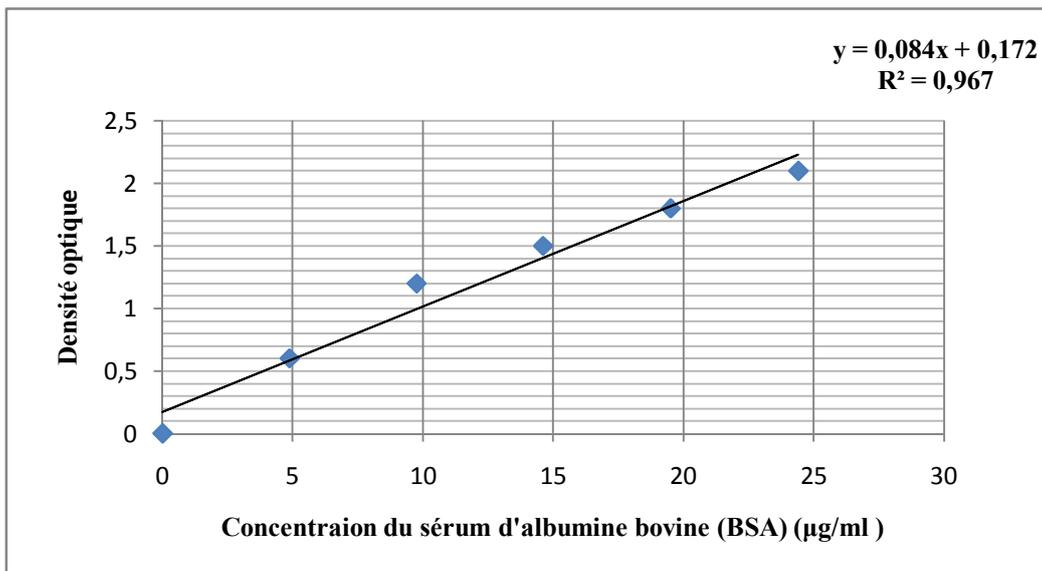


Figure 7: La gamme étalonnages des protéines hemolymphtiques.

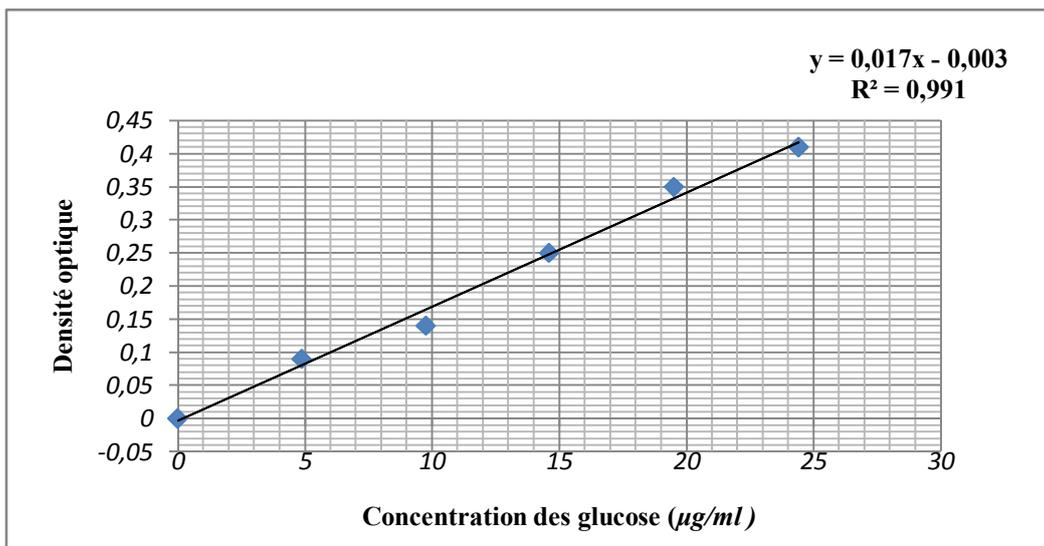


Figure 8: La gamme étalonnages des glucides hemolymphtiques.

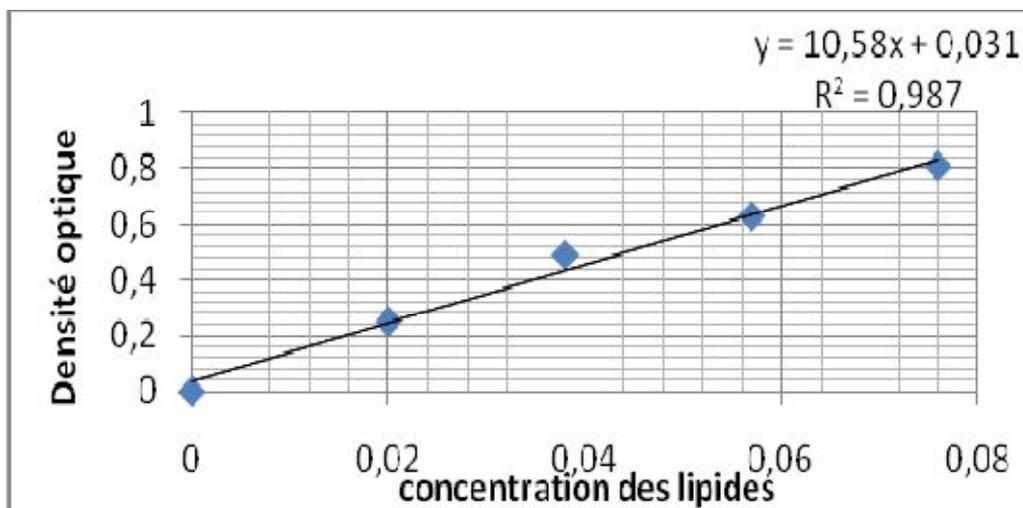


Figure 9: La gamme étalonnages des Lipides hémolymphtiques.

Annexes

Annexe 10 :

Tableau 15 : Les concentrations en protéine hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du buis

	Traité		Temoin	
	[C]	DO $\lambda=595$	[C]	DO $\lambda=595$
2 h	21,52	1,98	20,2	1,87
4 h	26,28	2,38	20,2	1,87
8 h	31,16	2,79	20,2	1,87

Tableau 16: Les concentrations en glucides hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du buis

	Traité		Temoin	
	[C]	DO $\lambda=600$	[C]	DO $\lambda=600$
2 h	14,82	0,249	16,52	0,251
4 h	12,7	0,213	16,52	0,251
8 h	11,82	0,198	16,52	0,251

Tableau 17: Les concentrations en lipide hémolympatique chez les individus traités par l'extrait aqueux du buis

	Traité		Temoin	
	[C]	DO $\lambda=600$	[C]	DO $\lambda=600$
2 h	0,224	2,399	0,226	2,429
4 h	0,232	2,537	0,226	2,429
8 h	0,269	2,468	0,226	2,429

Résumé

L'objectif de notre travail consiste dans un premier temps à réaliser une étude phytochimique d'une plante de la famille des *Buxaccées*, connu sous l'appellation du buis (*Buxus Sempervirens L.*). Dans un second temps, nous avons procédé à l'évaluation de l'activité biologique des extraits des feuilles de cette plante (polyhéonls, extrait aqueux et alcaloïdes) sur les larves de la fausse teigne des ruches, les doses appliquées sont les suivantes : 15,30 et 60 µl/ml. Enfin, nous avons testé l'effet de l'extrait aqueux sur les compositions chimique de l'hémolymphe de ces larves.

Les résultats obtenus sont positifs pour tous les paramètres testés. En effet on a constaté que les substances bioactives étudiées présentent une activité insecticide intéressante. En parallèle, une augmentation significative de la concentration des protéines et lipides et une diminution de la concentration des glucides dans l'hémolymphe, ont été enregistrés après l'injection de l'extrait aqueux du buis. De ce fait, les extraits du Buis testés engendrent une perturbation du métabolisme biochimique et de la physiologie de l'insecte.

Mots clés : Buis, fausse teigne, activité biologique, extrait,

Summary

The objective of our work consists in a phytochemical study of a plant of the family *Buxaccées*, known under the name of box wood (*Buxus Sempervirens L.*). Secondly, we evaluated the biological activity of extracts of the leaves of this plant (polyheonals, aqueous extract and alkaloids) on larvae of the hiveworm of hives, the doses applied are as follows: 30 and 60 µl / ml. Finally, we tested the effect of the aqueous extract on the chemical compositions of the haemolymph of these larvae. The results obtained are positive for all the parameters tested. Indeed, it has been found that the bioactive substances studied have an interesting insecticidal activity. In parallel, a significant increase in the protein and lipid concentration and a decrease in carbohydrate concentration in the haemolymph were recorded after the aqueous extract of the box wood was injected. As a result, the extracts of the box wood tested cause a disturbance of the biochemical metabolism and the physiology of the insect.

Key words : Box wood, moth, biological activity, extract,

ملخص

الهدق من عملنا هذا في الخطوة الاولى هو تقديم دراسة كيميائية لنبات من عائلة البوقاساسي و المعروف باسم خشب البقس. في الخطوة الثانية قمنا بتقييم نشاط المركبات المستخلصة من اوراق هذا النبات (البوليفينول، المستخلص المائي و الالكالويد)، ومدى سميتها على يرقات العثة (دودة الشمع)، الجرعات التي تم تطبيقها هي كالتالي: 15,30 و 60 ميكرو لتر. واخيرا تاثير المستخلص المائي على التركيب الكيميائي الحيوي للمف الدموي لهذه الحشرة وكانت النتائج ايجابية لجميع المعلمات التي تم اختبارها و بالفعل فقد وجد ان لهذه المركبات نشاطا مبيدا للحشرات مثيرا للاهتمام وبالتوازي مع ذلك تم تسجيل ارتفاع في تركيز البروتينات و الليبيد و انخفاض في تركيز الغلوسيدات في المف الدموي بعد حقن المستخلص المائي مما يدل على ان هذا المستحضر يؤدي الى اختلال الايض البيولوجي الحيوي و الفيزيولوجي للحشرة. كلمات البحث: خشب البقس، دودة الشمع، والنشاط البيولوجي، المستخلص .