



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة باجي مختار – عنابة



Université BADJI Mokhtar Annaba
Faculté des Sciences
Département de Biologie
Laboratoire de Biologie Animale et appliquée

MEMOIRE DE MAGISTER

Filière : Biologie animale
Option : Ecotoxicologie

Thème:

Evaluation de l'acide borique par injection sur l'histologie du
tube digestif et les enzymes de détoxification
(acétylcholinestérase, glutathionS-transférase, et le glutathion)
chez un insecte à intérêt médical : *Blatella germanica*.

Présenté par : *M^{me}. Boussatha Anissa*

Jury de soutenance :

Directrice de thèse : Habes DahbiaM.C Université B.M.A
Président : Daas TPr. Université B.M.A
Examineurs : Aribi N.Pr. Université B.M.A
Rehimi N.M.C Université B.M.A

Année universitaire :
2011 | 2012

Remerciements

Je tiens à adresser mes remerciements à **M^r T.DAAS** Professeur à l'université d'Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Toute ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements vont à **Mme D.Habes**, Docteur au département de Biologie, pour sa disponibilité, son aide, ainsi que pour ses précieux conseils.

Comme je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Mes dames **N. Aribi** et **N.Rehimi**, pour avoir accepté de juger ce travail.

Toute ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur **N. Soltani**, directeur du laboratoire de Biologie Animale et Appliquée pour m'avoir accueillie et ouvert les portes de son laboratoire.

Un grand merci à **M^r Lankar** responsable du laboratoire d'anatomie et pathologies cellulaires au CHU Ibn Rochd de m'avoir permis de réaliser les coupes histologiques et leurs photos au sein de son laboratoire. Egalement **D^r Kaddem** pour tout l'aide qu'il m'a porté pour me faciliter l'intégration au sein de ce même laboratoire.

Enfin, mes profonds remerciements à tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

SOMMAIRE

1. Introduction	1
2. Matériel et méthodes	
2.1Présentation du matériel biologique	5
2.1.1Présentation de l'insecte	5
2.1.2. Cycle biologique de <i>B.germanica</i>	6
2.1.3Morphologie des différents stades de développement	7
2.1.4Elevage en laboratoire	9
2.2Presentation de l'insecticide	9
2.3Traitement	9
2.4Technique histologique	11
2.5Dosage enzymatique	12
2.5.1 Extraction et dosage de la glutathion	12
2.5.2 Extraction et dosage de la glutathion-s-transférase	13
2.5.3 Extraction et dosage Dosage de l'acétylcholinestérase	15
2.5.4 Dosage des protéines	17
2.6Analyse statistique	17

CHAPITRE1 :

Effet de l'acide borique sur les activités de quelques enzymes de détoxification

1. Introduction	18
2. Résultats	
2.1 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion	20
2.2 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion-S-transférase	22
2.3 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase	32

3. Discussion

3.1 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion	42
3.2 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion-s-transférase	43
3.3 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase	44

CHAPITRE2 :

Effet de l'acide borique sur l'histologie du tube digestif

1. Introduction	46
2. Résultats	48
2.1. Effet de l'acide borique sur l'intestin antérieur	48
2.3. Effet de l'acide borique sur l'intestin moyen	48
3. Discussion	49
4. Conclusion	50
3. Conclusion et perspectives	53
4. Résumé	54
5. Abstract	56
6. ملخص	57
7. Références bibliographiques	58

Liste des tableaux

Tableau	Titre	page
1	Dosage des proteines :réalisation de la gamme d'étalonnage	17
2	Dosage des proteines: réalisation de la gamme d'étalonnage (pour le dosage de la GSH)	20
3	Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur le taux de GSH ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuvies($m\pm s;n=3$).	21
4	Dosage des proteines : Réalisation de la gamme d'étallonage (pour la GST).	22
5	Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteine) chez les adultes,témoins de <i>B.germanica</i> :Absorbances en fonction du temps($m\pm s ;n=3$).	23
6	Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteine) chez les adultes,traités de <i>B.germanica</i> à la DL50:Absorbances en fonction du temps($m\pm s ;n=3$).	24
7	Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur l'activité spécifique de la GST($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuvies($m\pm s;n=3$).	26
8	Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteine) chez les adultes,témoins de <i>B.germanica</i> à la DL90:Absorbances en fonction du temps($m\pm s ;n=3$).	27
9	Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteine)chez les adultes témoins de <i>B.germanica</i> pour la DL90: Absorbances en fonction du temps($m\pm s ;n=3$).	28
10	Effet de l'acide borique (DL90) par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuvies($m\pm s;n=3$).	30

11	Effet de l'acide borique par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes de <i>B.germanica</i> en fonction de l'âge : analyse de la variance à deux critères de classification.	31
12	Dosage des proteins realization de la gamme d'étalonnage (pour l'AchE).	32
13	Effet de l'acide borique (DL50) par injection :Dosage de l'AchE($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes témoins de <i>B.germanica</i> : Absorbances en fonction du temps ($m\pm s$).	33
14	Effet de l'acide borique (DL50) par injection :Dosage de l'AchE($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes traités de <i>B.germanica</i> : Absorbances en fonction du temps ($m\pm;n=3$).	35
15	Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuvies($m\pm s;n=3$).	36
16	Effet de l'acide borique (DL90) par injection :Dosage de l'AchE($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes témoins de <i>B.germanica</i> : Absorbances en fonction du temps ($m\pm s;n=3$).	37
17	Effet de l'acide borique (DL90) par injection :Dosage de l'AchE($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes traités de <i>B.germanica</i> : Absorbances en fonction du temps ($m\pm;n=3$).	39
18	Effet de l'acide borique (DL90) par injection sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuvies($m\pm s;n=3$).	40

19	Effet de l'acide borique par injection sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de <i>B.germanica</i> en fonction de l'âge : analyse de la variance à deux critères de classification.	41

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Cycle biologique de <i>B.germanica</i> d'après (Cornwell,1968).	6
2	Morphologie des different stades de <i>B.germanica</i> (X=6,8) d'après (Hutchinson,1999).	8
3	Elevage en laboratoire de <i>B.germanica</i>	10
4	Structure chimique de l'acide borique.	10
5	Adulte nouvellement exuviés(0jour)	11
6	Injection de l'acide borique à0jour	11
7	Processus biochimique mis en oeuvre pour métaboliser les substances toxiques absorbées par l'insecte.	19
8	Dosage quantitatif des proteines :droite de regréssion exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine(μg).	20
9	Taux de glutathion ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de protéine) dans le corps entier des adultes de <i>B.germanica</i> dès l'émergence à différents âges (de 1 à 5jours) ($m\pm s$).	22
10	Dosage quantitatif des protéines : droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg).	23
11	Dosage de la GST chez les adultes témoins (1à 5jours) de <i>B.germanica</i> pour la DL50 : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m\pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).	24

12	Dosage de la GST chez les adultes traités à la DL50 de 1 jusqu'à 5 jours, de <i>B.germanica</i> : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).	25
13	Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur l'activité spécifique de la GST($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de prteine) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuviés.	26
14	Dosage de la GST chez les adultes témoins de <i>B.germanica</i> pour la DL90: courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).	28
15	Dosage de la GST chez les adultes traités à la DL 90 de <i>B.germanica</i> : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).	29
16	Effet de l'acide borique par injection (DL90) sur l'activité spécifique de la GST($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protein) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuviés.	31
17	Dosage quantitatif des protéines : droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg).	32
18	Dosage de l'AchE chez les adultes témoins de <i>B.germanica</i> pour la DL50: courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 :coefficient de détermination).	34

19	Dosage de l'AchE chez les adultes traités à la DL50 de <i>B.germanica</i> : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 :coefficient de détermination).	35
20	Effet de l'acide borique par injection (DL50) sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de <i>B.germanica</i> nouvellement exuviés.	37
21	Dosage de l'AchE chez les adultes témoins pour la DL90 de <i>B.germanica</i> : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 :coefficient de détermination).	38
22	Dosage de l'AchE chez les adultes traités à la DL90 de <i>B.germanica</i> : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 :coefficient de détermination).	39
23	Effet de l'acide borique par injection (DL90) sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de <i>B.germanica</i> . nouvellement exuviés	41
24	Différentes parties du tube digestif de <i>B. germanica</i>	47
25	Coupes histologiques de l'intestin antérieur (jabot) des adultes de <i>B. germanica</i> .	49
26	Coupes histologiques de l'intestin moyen des adultes de <i>B. germanica</i> .	50

--	--	--

18

32

1. Introduction

Les blattes ou cafards sont des insectes qui suivent l'homme depuis l'antiquité (Grandcolas, 1998). Ces dernières appelées aussi cancrelats sont des insectes Dictyoptères descendant des Aptérygotes, sous-classe primitive dépourvue d'ailes qui sont apparues à l'époque silurienne (Elie, 1998). Plusieurs milliers d'espèces sont connues de par le monde. En effet on dénombre 4000 à 5000 espèces de blattes et probablement autant qui ne sont pas encore découvertes (Garfield, 1990 ; Blanc, 1996). La plupart d'entre-elles habitent les zones équatoriales et tropicales car ces insectes affectionnent tout particulièrement la chaleur et l'humidité.

Cette étonnante persistance à travers les siècles, le cafard la doit tout d'abord à sa grande facilité d'adaptation alimentaire car omnivore, il s'accommode à tous les régimes (Grandcolas 1998) ; sa minceur ainsi que l'excellente protection conférée par une cuirasse chitineuse couvrant la partie antérieure de son corps, ont aussi permis à cet insecte de survivre aux cataclysmes géologiques (Koheler & Petterson, 1987) ..

Par ailleurs, ces espèces cosmopolites se caractérisent par une photophobie, une résistance aux conditions difficiles (faim, soif, submersion) (Rivault *et al.*, 1995) et un important pouvoir de fécondité (Grandcolas, 1998). Cependant, elles ne peuvent ni se développer, ni s'alimenter ni se reproduire au froid (Grandcolas, 1998).

Les blattes provoquent une détérioration des denrées alimentaires et constituent une nuisance psychologique (Porcar *et al.*, 2006), elles peuvent transporter des agents pathogènes pour l'homme et transmettre aussi des maladies infectieuses comme l'hépatite, le choléra et la tuberculose (Gordon, 1996 ; Tokouda *et al.*, 2008). Les blattes se trouvent souvent à l'origine d'allergies (Mindykowski *et al.*, 2010 ; Peden & Reed, 2010 ; Sheehan *et al.*, 2010)

En général nos habitations n'hébergent que 4 des 4000 espèces connues : *Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Blatta orientalis* et *Supella longipalpa* (Grandcolas, 1998 ; Wattiez et Beys, 1999). Parmi ces derniers, *B. germanica* est la plus répandue elle cause à elle seule jusqu'à 90% des infestations (Bell, 1990 ; Elie, 1998), et se rencontre dans les maisons, les entrepôts, les commerces, les hôpitaux et les immeubles chauffés en hiver où elles trouvent

suffisamment d'humidité et de nourriture (Ebeling,1978 ; Burgess,1984 ; Ross *et al.* ,1984 ;Rivault *et al.* ,1995 ;Hasche et Zumofen,1999).

Pour contrôler ces insectes, l'homme déploie des efforts considérables et recherche de nouvelles méthodes de lutte afin de limiter leur prolifération. De nombreux moyens de lutte ont été utilisés tels que : la lutte biologique qui a recours à certains hyménoptères parasites des œufs de blattes et le lâcher de mâles stériles (Grandcolas, 1998), la lutte physique qui consistent en l'utilisation des pièges à glue (Lyon ,1997 ; Kim *et al.* 2000) et, enfin, la lutte chimique qui nécessite l'utilisation de différents groupes de pesticides (Schal & Hamilton, 1990 ; Strong *et al.*, 2000).

Les pesticides se classent en fonction de leur structure chimique ou de leur origine, en insecticides organiques de synthèse, insecticides organiques d'origine végétale, les régulateurs de croissance et les insecticides non organiques. Ces insecticides sont absorbés par contact, ingestion, inhalation ou par combinaison (Matsumura, 1985)

Les insecticides organiques de synthèse, d'une forte toxicité pour l'homme et l'environnement (Strange & Klungsoyr, 1997) regroupent les organochlorés, les organophosphorés, les pyréthrénoïdes et les carbamates. Les organochlorés (aldrine, chlordane, lindane, dicamba, dieldrine et DDT) très peu volatiles, non solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques, sont des modulateurs des canaux sodium et dépresseurs des systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire (Mary et Amdur, 2000). Les organophosphorés (parathion, malathion et scharban) dérivés de l'acide phosphorique, agissent par contact sur les liens synaptiques du système nerveux (Mary et Amdur, 2000). Les pyréthrénoïdes (deltaméthrine, cyperméthrine et cyfluthrine) dérivés du pétrole, se rapprochant des pyréthrines, source naturelle, utilisée par l'homme depuis des siècles, sont des modulateurs des canaux sodium (effet sur la transmission axonale) et sont spécifiques aux insectes (Mary et Amdur, 2000; Fulton et Key, 2001). Les carbamates comme le carbaryl, le méthyle, le propoxure et récemment le benfuracarbe, de moindre toxicité sont susceptibles de provoquer des perturbations comportementales affectant plus particulièrement la locomotion et l'équilibre (Zinkl *et al.*, 1991; Saglio *et al.*, 1996). Ils agissent comme inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (l'AchE).

Néanmoins, leur utilisation prolongée, leur non spécificité ainsi que leur rémanence ont provoqué d'énormes perturbations de l'environnement par des effets toxiques indésirables pour l'homme et les espèces non visée (Ishaaya et Horowitz, 1998 ; Gagne *et al.*, 1999) et ont conduit à l'apparition de souches résistantes (Dong *et al.*,1998 ;Wei *et al.*,2001).

Cette résistance a été attribuée à la réduction des taux de pénétration cuticulaire (Scott,1990 ; Siegfried et Scott,1992a ; Bull et Petterson,1993), à l'altération des cibles cibles tel que l'acétylcholinestérase (Hemingway *et al.* ,1993 ; Guedes *et al.*,1997 ; Jensen,1998 ; Ribeiro *et al.*,1999 ; Charpentier *et al.*,2000 ; Ishaaya,2001 ; Siegfried et Scharf,2001) et aux enzymes de détoxification (Granfton-Cardewell *et al.*,1998,1999 ; Hemingway,2000 ;Vantas *et al.* ,2000 ; Siegfried et Scharf,2001 ; Sun *et al.*,2001). Pour éviter cette résistance et suite à l'intérêt grandissant pour la protection de l'environnement, des composés alternatifs aux pesticides conventionnels sont développés, plus spécifiques, et moins toxiques, capables d'interférer spécifiquement sur le développement de l'insecte (Dhadialla *et al.* , 2005). Parmi lesquels les régulateurs de croissance des insectes (IGRs) agissant sur des processus physiologiques et biochimiques spécifiques aux organismes visés. Ce sont des produits de synthèse stimulant l'action de l'hormone juvénile(JH) ou de l'éclysteroïde, les deux hormones dont les rôles principaux sont de contrôler la croissance, le développement et la reproduction chez les insectes (Dhadialla *et al.* ,1998, 2005) ou encore des molécules inhibitrice de la synthèse de la chitine composé majeur de la cuticule (Ishaaye ,1990). Les analogues de l'hormone juvénile (méthoprène, fénoxycarbe, pyriproxifène...) ont pour principaux effets de produire chez les individus traités un stade surnuméraire, des larves permanentes ou des intermédiaires larve-pupe (Gadenne *et al.* ,1990). Et plus récemment les agonistes et les antagonistes de l'hormone de mue (éclysteroïdes) (Smaghe *et al.*,1999 ; Soltani et Berguiche, 2001 ; Soltani *et al.* ,2001 ; Soltani-Mazouni *et al.*,2001 ; Dadhialla *et al.*, 2005; Aribi & *al.*, 2006). Par ailleurs, les neonecotinoïdes, insecticides d'origine végétale (imidaclopride, thimrthomaxan et acétamipride) sont aussi efficace et agissent via les récepteur de l'acétylcholine nicotinym (nAChR) sur le système nerveux périphérique et centrale des insectes (Kiryama *et al.*,2003 Nauen *et al.* , 2003 ; Salgado & Saar,2004). L'azadirachtine, antagoniste de la JH et le spinosad (Salgado *et al.* ,1998 ;Schneider *et al.* ,2004) sont des insecticides d'origine naturelle à action neurotoxique , ils ont également prouvé leurs efficacités (Vinuela *et al.*,2000 ;Breuer *et al.*,2003 ;Shafeek *et al.*,2004).

Les insecticides inorganiques, reconnus depuis fort longtemps comme non polluants, retrouvent un regain d'intérêt, comme les produits arsenicaux, les composés soufrés, l'acide cyanhydrique et l'acide borique. L'arsenic constitue un insecticide d'ingestion particulièrement utile contre les insectes broyeur (Fabre, 1954). Le soufre en poudre est un insecticide peu actif mais cependant préconisé dans la lutte contre les acariens (Winteringham, 1952). L'acide cyanhydrique est un gaz très toxique qui agit par inhalation et s'applique uniquement sur les arbres recouverts d'une bâche (Mullins, 1955).

L'acide borique, insecticide très efficace par sa rémanence, sa non répulsion, sa non volatilité et son innocuité à l'égard de l'environnement et la santé humaine (Rust *et al.*, 1995). Il agit par ingestion et contact; son utilisation pour la lutte chimique contre les blattes a fait l'objet de divers travaux, surtout sur le plan toxicologique (Fort & *al.*, 2000; Gore & Schal, 2004; Morakchi & *al.*, 2005; Habes & *al.*, 2001, 2006) et plusieurs modes d'actions ont été proposés tels que l'abrasion de la cuticule, par la perte prématurée de l'oothèque chez la femelle, et un faible taux d'éclosion des œufs (Gore *et al.*, 2004), une perte de la coordination locomotrice par empoisonnement du système nerveux central (Steinbrink, 1976; Habes, 2006), une modification des hydrocarbures cuticulaires (Kilani-Morakchi *et al.*, 2005) ou encore la désorganisation de l'intestin moyen (Cochran, 1995; Habes *et al.*, 2006). Toutefois, le mécanisme d'action de l'acide borique reste inconnu et nécessite des recherches approfondies.

Dans le but de bien élucider le mode d'action de ce composé notre étude nous a permis dans un premier temps à évaluer la neurotoxicité et la mise en place du système de détoxification qui fera l'objet du premier chapitre. Dans un deuxième temps une étude histologique du tube digestif de *B.germanica* constitue le deuxième chapitre.

CHAPITRE 1

1. Introduction

La détoxification est un phénomène très important dans l'adaptation des organismes aux agressions environnementales endogènes ou exogènes. Le changement de l'activité des enzymes de détoxification est considéré comme un indice rapide et pronostique de la réponse aux stress environnementale et utilisé pour prédire les effets des xénobiotiques sur les populations et les écosystèmes. Les protéines de détoxification sont une classe de protéines pour la dégradation et / ou l'élimination des toxines endogènes et exogènes ou de médicaments, ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par ces matériaux. La plupart de ces protéines sont produites en réponse à la stimulation des toxines ou des médicaments. Elles sont essentielles pour le dédouanement des substances nuisibles et de maintien de l'équilibre physiologique dans les organismes.

De nombreuses toxines possèdent un caractère lipophile et peuvent devenir hydrosolubles par biotransformation dans les insectes, et par ce fait plus facilement excrétables. Les possibilités qu'ont les insectes de dégrader les insecticides sont associés aux systèmes enzymatique de détoxification (figure 7) (Haubruge et Hamichot., 1998). Les enzymes impliquées, se divisent en :

- enzymes de phase I dite de fonctionnalisation (oxydases, réductases, hydrolases) permettant de démasquer les éléments électrophiles ou nucléophiles du xénobiotique.
- enzymes de phase II dite de conjugaison, qui fixent des dérivés endogènes hydrophiles (glutathion, glucoside, phosphate, sulfate ou acide glycuronique) sur les groupements fonctionnels révélés en Phase I. Ces enzymes de conjugaison sont des transférases dont les plus connues sont les GSTs (Cassier et al, 1997).

Parmi les xénobiotiques, les insecticides carbamates et organophosphorés altèrent la transmission de l'influx nerveux en réduisant l'activité catalytique de l'enzyme synaptique qui est l'acétylcholinestérase (AChE), membre de la famille des enzymes de la sérine hydrolase responsable de l'hydrolyse du neurotransmetteur cholinergique universel acétylcholine (Casey *et al.*, 2010). Cette enzyme est un site cible des divers insecticides à action neurotoxique (Zinkl *et al.*, 1991; Siegfried et Scharf, 2001; Morakchi *et al.*, 2005). La glutathion (GSH), antioxydant important joue un rôle dans la détoxification des composés électrophiles et peroxydes par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase (GPx) et ou par la glutathion-S-transférase (Townsend *et al.*, 2003).

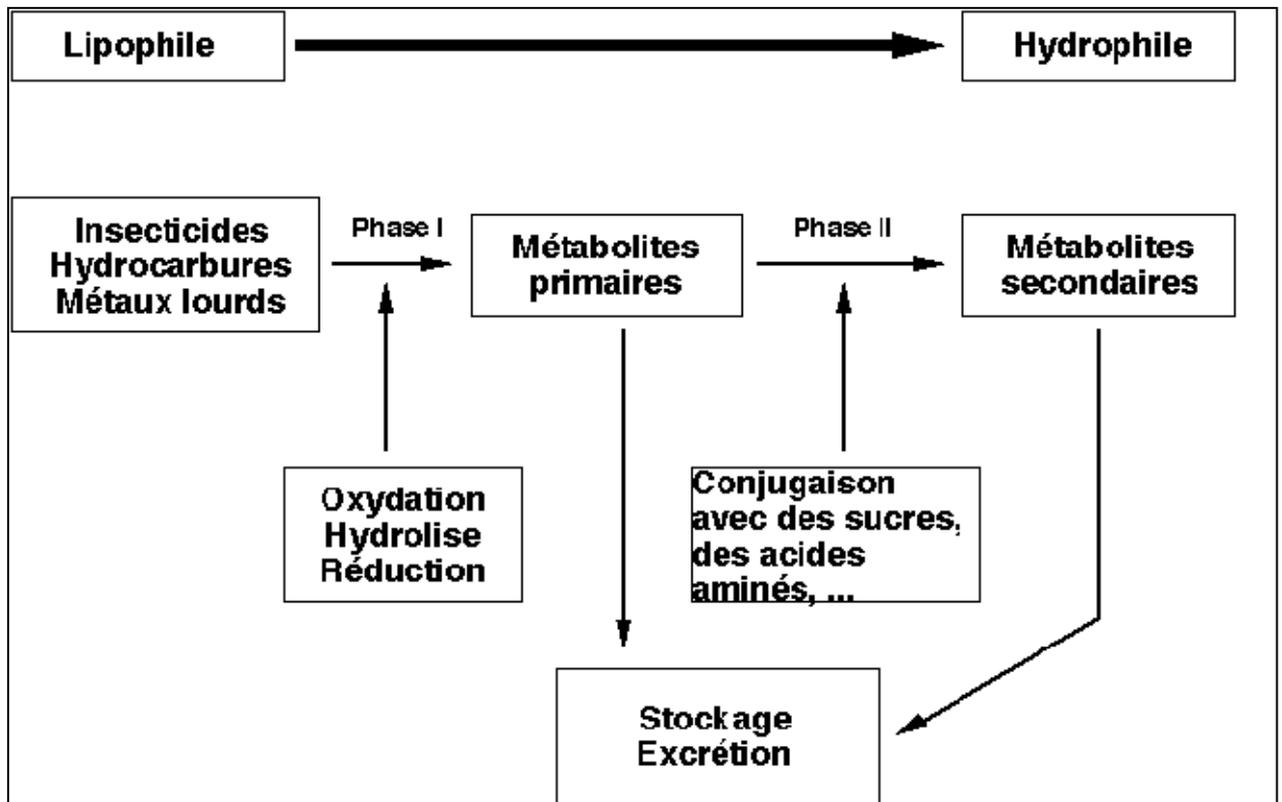


Figure 7. Processus biochimiques mis en œuvre pour métaboliser les substances toxiques absorbées par l'insecte (Haubruge et Amichot., 1998)

2. Résultats

2.1 Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion

La quantification des protéines a été faite à partir d'une courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité du standard d'albumine. La droite de régression a été déterminée comme suit : $Y = ax + b$ avec un coefficient de détermination : R^2 .

Tableau2 : Dosage des protéines : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,167	0,363	0,479	0,651	0,764

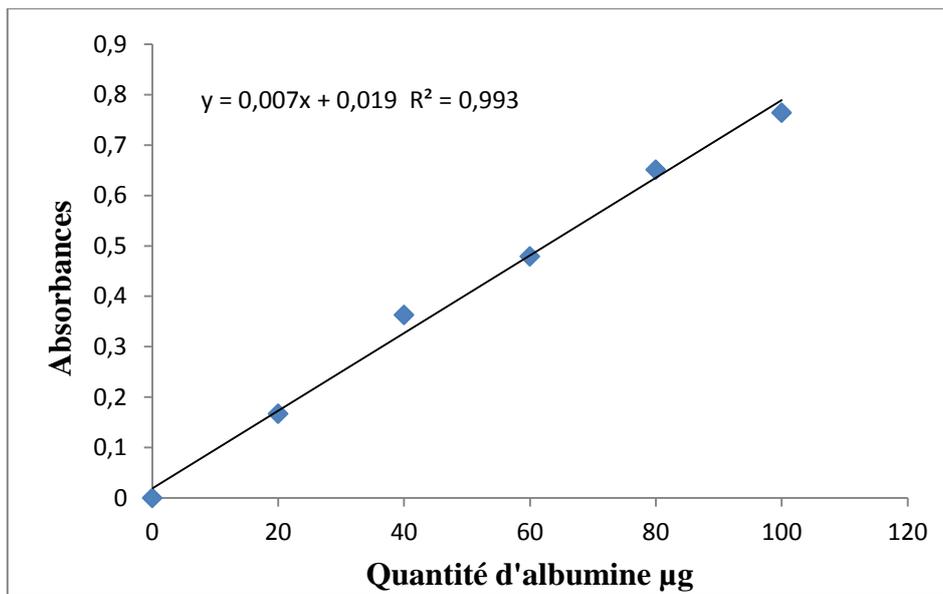


Figure 8. Dosage quantitatif des protéines : droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg).

Le taux de glutathion (GSH) corporel chez les adultes traités à une dose (DL50=77,62µg/insecte) augmente significativement à partir de 4 jours (p=0.01). La comparaison entre les séries témoins et traités montre une augmentation hautement significative à partir de 3jours (p=0.001) et très significative à 4 et 5 jours (p=0.004 ; p=0.002) respectivement (Tableau3 ; Figure 9). Cependant ce taux reste comparatif chez les séries témoins à différents âges.

Tableau 3: Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur le taux de la GSH (µmol /mg de protéine) chez les adultes de *B.germanica*, nouvellement exuvies (m±s ; n=3) :

Age (jours)	Témoins	Traités
1	0.11±0.01 a A	0.20±0.007 a A
2	0.12±0.01 a A	0.43±0.004 a A
3	0.22±0.02 a A	0.45±0.01 b A
4	0.25±0.06 a A	0.65±0.07 b B
5	0.20±0.03 a A	0.75±0.04 b C

- Les moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (p≤0.05).

-Les lettres en minuscule comparent les moyennes entre les séries pour un même temps ; les lettres en majuscule comparent les valeurs d'une même série entre différents temps.

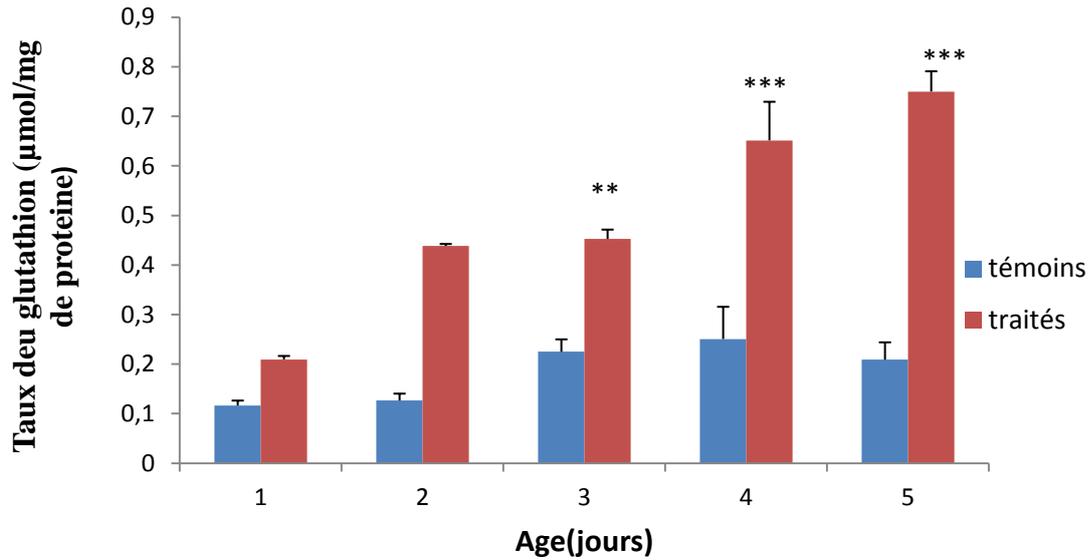


Figure 9. Taux de glutathion ($\mu\text{mol/mg}$ de protéine) dans le corps entier des adultes de *B.germanica* dès l'émergence à différents âges (de 1 à 5 jours) ($m \pm s$).

*Différences significatives pour les valeurs entre les séries d'un même temps.

2.2. Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion-s-transférase

La quantification des protéines a été faite à partir d'une courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité du standard d'albumine. La droite de régression a été déterminé comme suit : $Y=ax+b$ avec un coefficient de détermination : R^2 .

Tableau4 : Dosage des protéines : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Quantité d'albumine (μg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,172	0,295	0,420	0,553	0,671

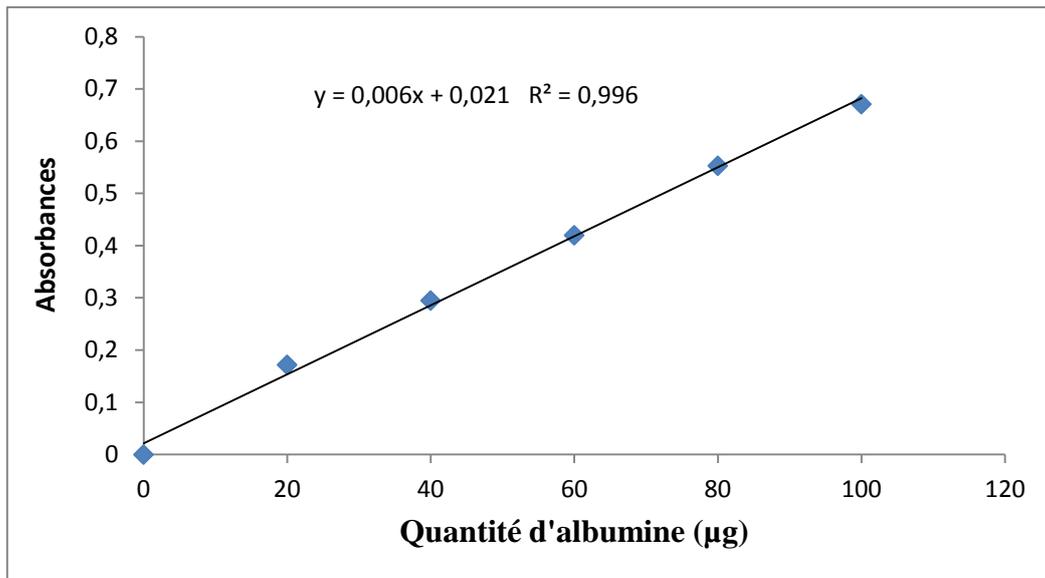


Figure 10. Dosage quantitatif des protéines : droite de régression exprimant l’absorbance en fonction de la quantité d’albumine (µg).

L’activité spécifique de la glutathion -S- transférase a été estimée chez les adultes témoins de *B. germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l’absorbance en fonction du temps (Tableau5 ; Figure11).

Tableau 5 : Dosage de la GST (µMol/min/mg de protéine) chez les adultes, témoins de *B.germanica* : absorbances en fonction du temps (m±s, n=3).

		Absorbances					
		0	1	2	3	4	5
Temps (min)	Age (Jours)						
1	1	0,156±0,07	0,236±0,02	0,326±0,04	0,403±0,03	0,461±0,05	0,506±0,04
2	2	0,196±0,03	0,313±0,05	0,362±0,08	0,437±0,07	0,480±0,01	0,528±0,009
3	3	0,195±0,09	0,290±0,02	0,446±0,06	0,568±0,03	0,682±0,07	0,777±0,07
4	4	0,259±0,06	0,500±0,01	0,573±0,08	0,690±0,01	0,77±0,06	0,899±0,02
5	5	0,228±0,001	0,411±0,07	0,572±0,08	0,677±0,06	0,789±0,07	0,915±0,06

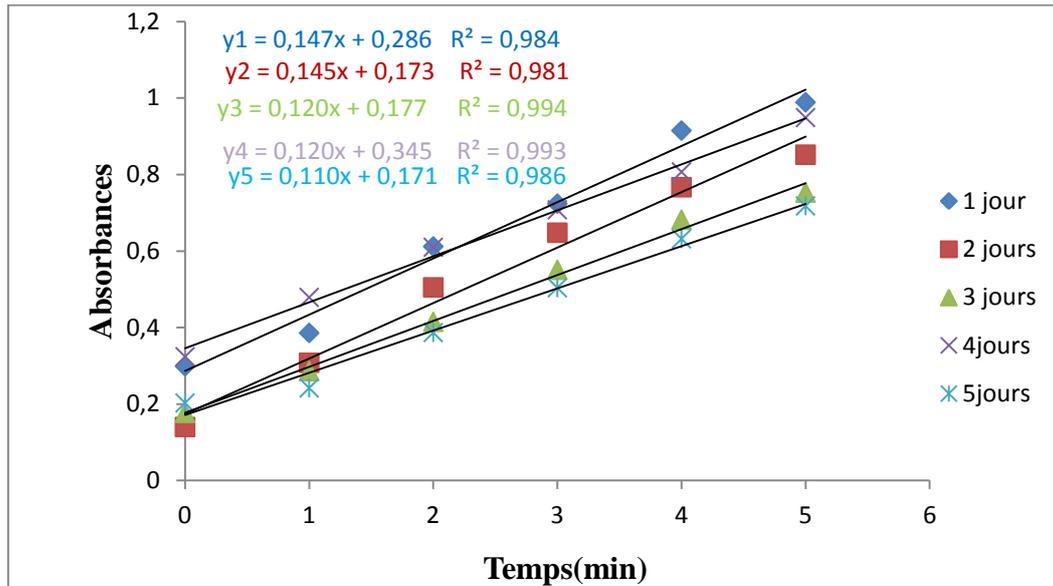


Figure11. Dosage de la GST chez les adultes témoins (1à 5jours) de *B.germanica* pour la DL50 : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps (m±s ; n=3). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L'activité spécifique de la glutathion –S- transférase a été estimée chez les adultes traités de *B. germanica* à la dose DL50 en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps (Tableau6 ; Figure 12)

Tableau6: Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes traités de *B.germanica* à la DL50: absorbances en fonction du temps (m±s, n=3).

		Absorbances					
Temps (min)		0	1	2	3	4	5
Age (Jours)							
1		0,299±0,03	0,386±0,01	0,612±0,04	0,724±0,03	0,915±0,02	0,989±0,04
2		0,140±0,03	0,308±0,02	0,505±0,01	0,648±0,03	0,767±0,01	0,852±0,009
3		0,195±0,09	0,290±0,02	0,446±0,06	0,568±0,03	0,682±0,07	0,777±0,07
4		0,324±0,06	0,479±0,01	0,610±0,08	0,708±0,01	0,807±0,06	0,949±0,02
5		0,203±0,001	0,242±0,07	0,387±0,08	0,504±0,06	0,632±0,07	0,718±0,06

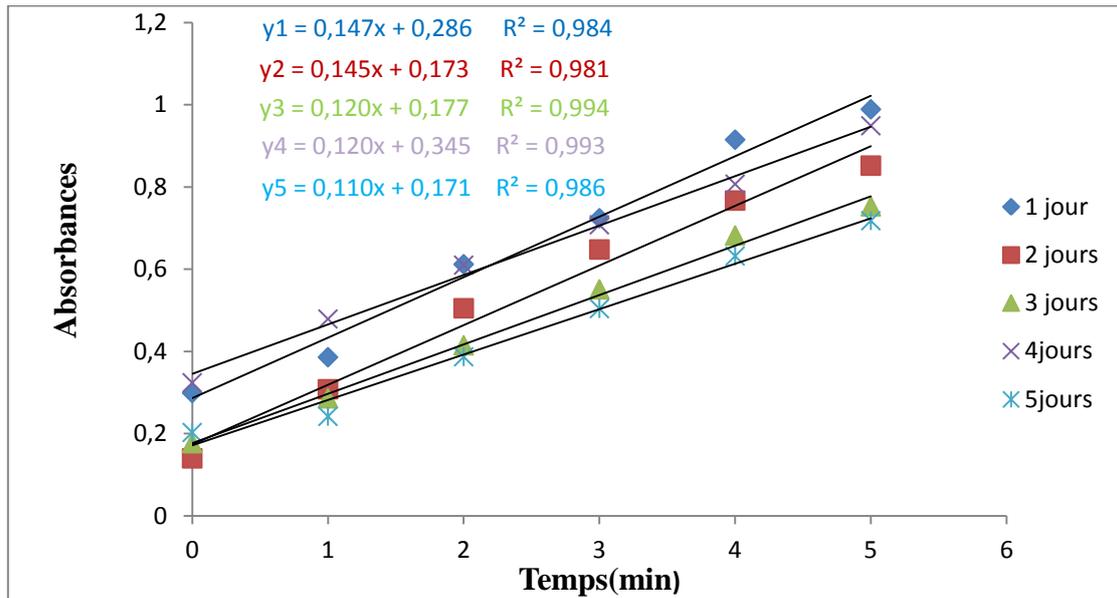


Figure12. Dosage de la GST chez les adultes traités à la DL50 de 1 jusqu'à 5 jours, de *B.germanica* : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L'estimation de l'activité spécifique de la GST chez les adultes de *B.germanica* nouvellement exuvie a été réalisée à une dose ($DL50=77,62\mu g/insectes$) d'acide borique et à différents âges (1 à 5 jours). L'activité spécifique de la GST chez les séries témoins montre une augmentation significative au 5^{ème} jour ($p \leq 0,05$). Chez les séries traitées, l'acide borique provoque une augmentation significative de l'activité de la GST à différents âges (2,3 4 et 5 jours). La comparaison entre séries témoins et traités montre une augmentation significative de l'activité de la GST à 1,2 et 3 jours ($p \leq 0,05$), après 3 jours d'exposition à l'acide borique, l'activité spécifique de la GST croit très hautement à 4 et 5 jours ($p \leq 0,001$). L'analyse de la variance à deux critères de classification montre qu'il y a un effet âge et dose.

Tableau7: Effet de l'acide borique (DL50) appliqué par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B.germanica*, nouvellement exuvies ($m\pm s$; $n=3$).

Age (jours)	Témoins	Traités
1	0,08 \pm 0,00 a A	0,11 \pm 0,01b A
2	0,08 \pm 0,01 a A	0,12 \pm 0,00 b B
3	0,112 \pm 0,00 a A	0,223 \pm 0,00 b C
4	0,127 \pm 0,00 a A	0,296 \pm 0,02 b D
5	0,156 \pm 0,00 a B	0,373 \pm 0,03 b E

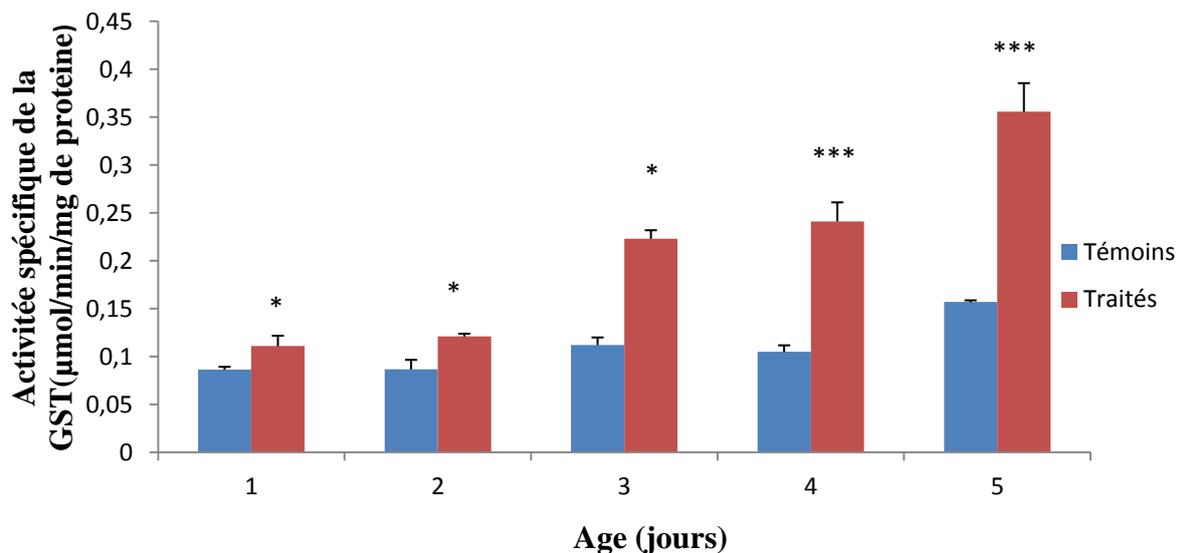


Figure13. Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B.germanica* nouvellement exuvies .

L'activité spécifique de la glutathion –S- transférase a été estimée chez les adultes témoins *B. germanica* pour la DL90 en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps (Tableau8 ; Figures 14).

Tableau8 : Dosage de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes, témoins de *B.germanica* pour la DL90 : absorbances en fonction de temps ($m \pm s, n=3$).

		Absorbances					
Temps (min)	Age (Jours)	0	1	2	3	4	5
1		0,2355 \pm 0,01	0,3425 \pm 0,005	0,535 \pm 0,06	0,6695 \pm 0,09	0,811 \pm 0,06	0,9305 \pm 0,06
2		0,199 \pm 0,04	0,380 \pm 0,08	0,503 \pm 0,07	0,5765 \pm 0,09	0,7025 \pm 0,09	0,791 \pm 0,09
3		0,260 \pm 0,02	0,384 \pm 0,01	0,486 \pm 0,01	0,6465 \pm 0,02	0,7365 \pm 0,01	0,851 \pm 0,005
4		0,1235 \pm 0,08	0,1715 \pm 0,06	0,194 \pm 0,07	0,220 \pm 0,07	0,2415 \pm 0,06	0,2575 \pm 0,06
5		0,194 \pm 0,07	0,250 \pm 0,05	0,317 \pm 0,07	0,350 \pm 0,08	0,401 \pm 0,09	0,431 \pm 0,05

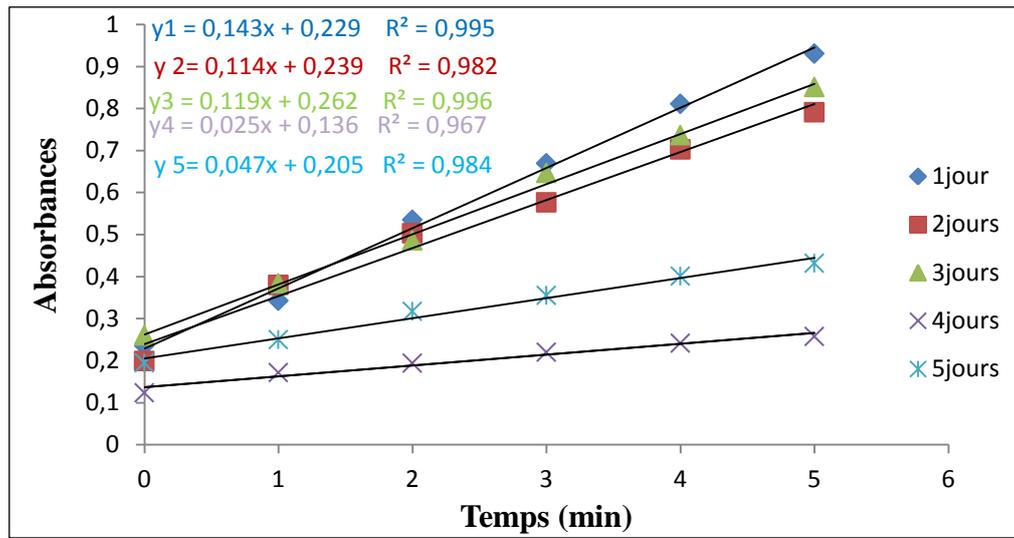


Figure14. Dosage de la GST chez les adultes témoins de *B.germanica* pour la DL90: courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps (m±s ; n=3).Exemple des droites de régression (R² : coefficient de détermination).

L'activité spécifique de la glutathion –S-transférase a été estimée chez les adultes traités à la dose DL90 de *B. germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps (Tableau9 ; Figures 15).

Tableau 9: Dosage de la GST (µmol/min/mg de protéine) chez les adultes, témoins pour la DL90 de *B.germanica* : absorbances en fonction du temps (m±s,n=3).

		Absorbances					
Temps (min)		0	1	2	3	4	5
Age (Jours)							
1		0,201±0,01	0,438±0,005	0,610±0,06	0,723±0,09	0,851±0,06	0,936±0,06
2		0,425±0,04	0,470±0,08	0,563±0,07	0,640±0,09	0,679±0,09	0,53±0,09
3		0,191±0,01	0,346±0,03	0,473±0,03	0,567±0,05	0,691±0,06	0,756±0,05
4		0,103±0,08	0,181±0,06	0,209±0,07	0,281±0,07	0,321±0,06	0,375±0,06
5		0,154±0,014	0,193±0,005	0,235±0,02	0,290±0,03	0,330±0,02	0,371±0,05

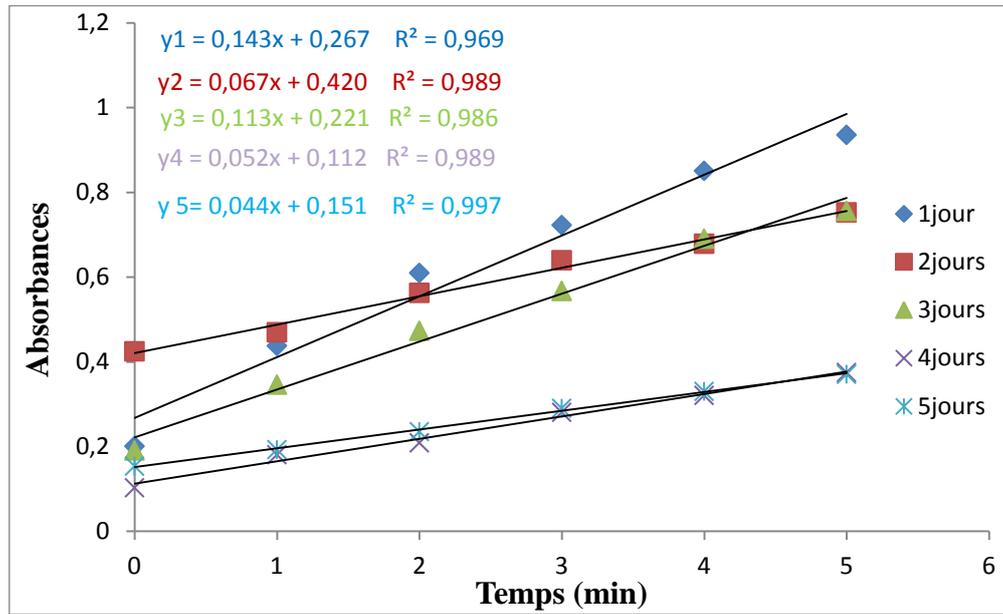


Figure 15. Dosage de la GST chez les adultes traités à la DL 90 de *B. germanica* : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L'estimation de l'activité spécifique de la GST chez les adultes de *B. germanica*, nouvellement exuvies été réalisée à la dose (DL90=194,98 μ g/insecte) d'acide borique à différents âges (de 1 à 5 jours) ;(Tableau 10, Figure 16).

L'activité spécifique de la GST chez les séries témoins ne montre aucune différence significative entre les différents âges. Chez les séries traités, l'acide borique provoque une augmentation significative de l'activité de la GST à 2 jours, cette augmentation est non significative pour les autres âges. La comparaison entre les séries témoins et traités montre qu'il n'y a pas de différences significatives.

Tableau10 : Effet de l'acide borique (DL90) par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B.germanica*, nouvellement exuvies ($m \pm s$; $n=3$).

Age (jours)	Témoins	Traités
1	0,267 \pm 0,03 a A	0,216 \pm 0,02 a A
2	0,310 \pm 0,06 a A	0,253 \pm 0,01 a B
3	0,282 \pm 0,04 a A	0,267 \pm 0,02 a B
4	0,274 \pm 0,05 a A	0,305 \pm 0,07 a B
5	0,253 \pm 0,04 a A	0,416 \pm 0,10 a B

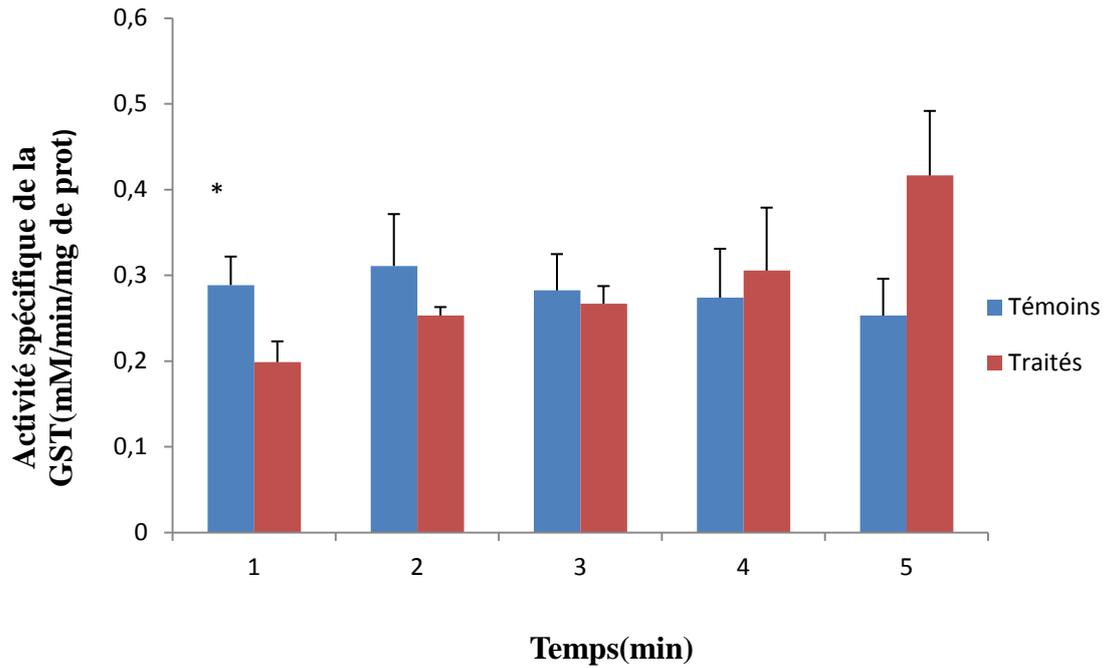


Figure 16. Effet de l'acide borique (DL90) par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B. germanica* nouvellement exuvies.

Tableau 11 : Effet de l'acide borique par injection sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes de *B. germanica* en fonction de l'âge : analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de la variance	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Dose	3	0,31846	0,104615	51,96	0,000
Age	4	0,108681	0,027170	13,50	0,000
Interaction dose-âge	12	0,143528	0,011961	5,94	0,000
Erreur	40	0,080530	0,002013	-	-
Total	59	0,646585	-	-	-

2.3. Effets de l'acide borique sur l'activité spécifique de l'acétylcholinesterase

La quantification des protéines a été faite à partir d'une courbe d'étalonnage exprimant l'absorbance en fonction de la quantité du standard d'albumine (Tableau11 ; Figure 17). La droite de la régression a été déterminée comme suit : $Y=ax+b$ avec un coefficient de détermination R^2 .

Tableau12 : Dosage des protéines : Réalisation de la gamme d'étalonnage.

Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100
Absorbances	0	0,203	0,434	0,626	0,826	0,999

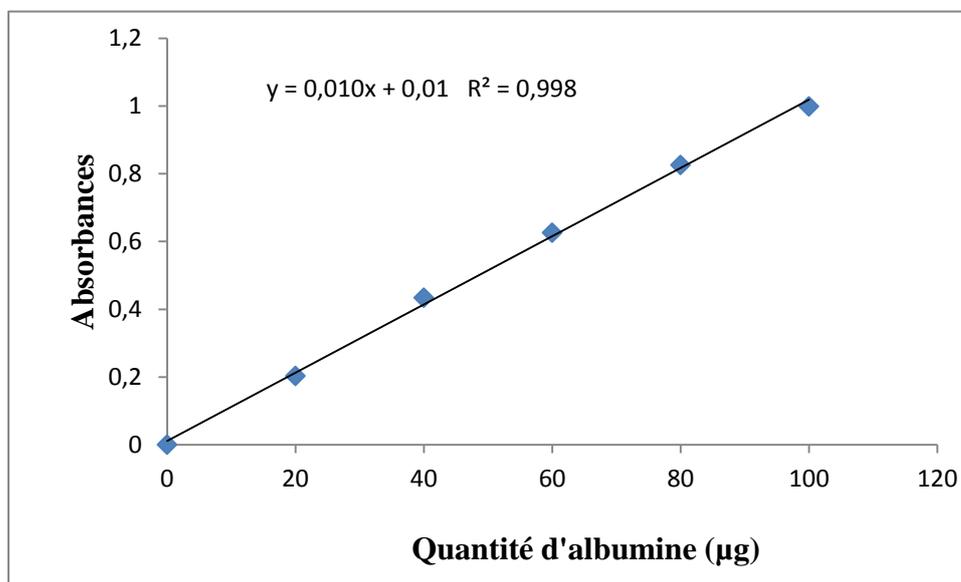


Figure17. Dosage quantitatif des protéines : droite de régression exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (µg).

L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été estimée chez les séries témoins de *B. germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l'absorbance en fonction du temps (Tableau12 ; Figure19).

Tableau 13: Effet de l'acide borique par injection (DL50): Dosage de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes témoins de *B.germanica* : absorbance en fonction du temps ($m \pm s$; $n= 3$).

		Absorbances					
		0	4	8	12	16	20
Age (Jours)	Temps (min)						
	1		0,10±0,06	0,18±0,1	0,25±0,14	0,33±0,2	0,42±0,28
2		0,12±0,04	0,19±0,06	0,303±0,08	0,417±0,11	0,527±0,13	0,644±0,16
3		0,113±0,02	0,118±0,02	0,136±0,02	0,156 ±0,01	0,173± 0,01	0,194±0,02
4		0,160±0,00	0,200±0,03	0,346±0,05	0,450 ± 0,1	0,558± 0,11	0,714±0,03
5		0,149±0,09	0,290±0,09	0,420±0,07	0,506± 0,11	0,670± 0,12	0,743±0,09

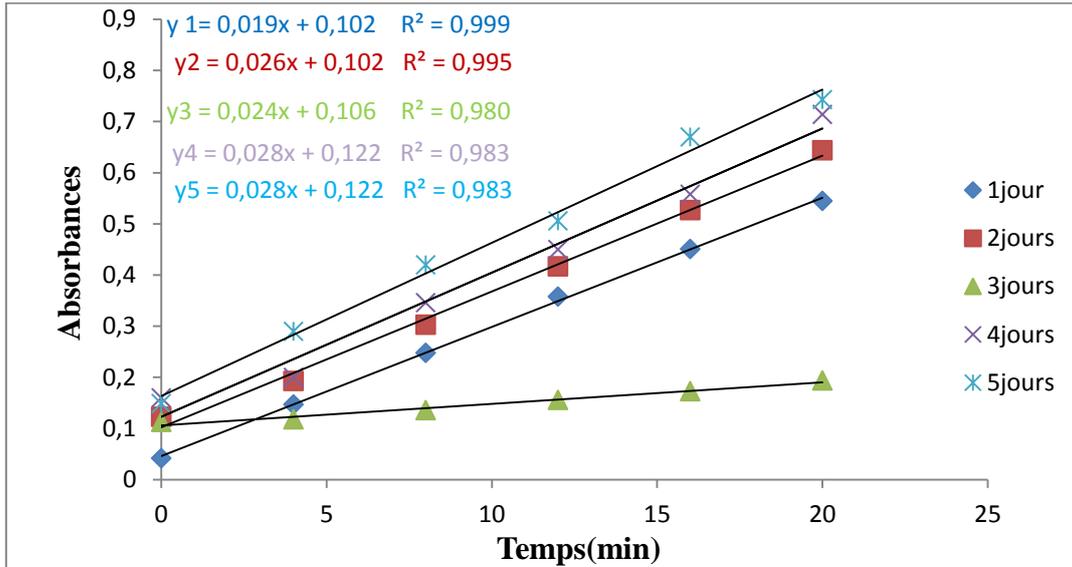


Figure18. Dosage de l’AchE chez les adultes témoins de *B.germanica* pour la DL50: courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L’activité spécifique de l’acétylcholinestérase a été estimée chez les séries traités de *B.germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l’absorbance en fonction du temps (Tableau13 ; Figure20).

Tableau 14: Effet de l'acide borique administré par injection : Dosage de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes traités à la DL50 de *B.germanica* : absorbance en fonction du temps ($m \pm s$; $n= 3$).

		Absorbances					
Age (Jours)	Temps (min)	0	4	8	12	16	20
	1		0,11±0,008	0,269±0,02	0,404±0,02	0,536±0,05	0,659±0,01
2		0,066±0,02	0,192±0,06	0,316±0,10	0,440±0,13	0,545±0,17	0,558±0,2
3		0,14±0,07	0,24 ± 0,01	0,297±0,03	0,322± 0,05	0,441±0,02	0,478± 0,09
4		0,106±0,04	0,233±0,05	0,339±0,06	0,432±0,07	0,548±0,08	0,590±0,08
5		0,123±0,01	0,236±0,02	0,318±0,05	0,377± 0,09	0,494± 0,01	0,534± 0,07

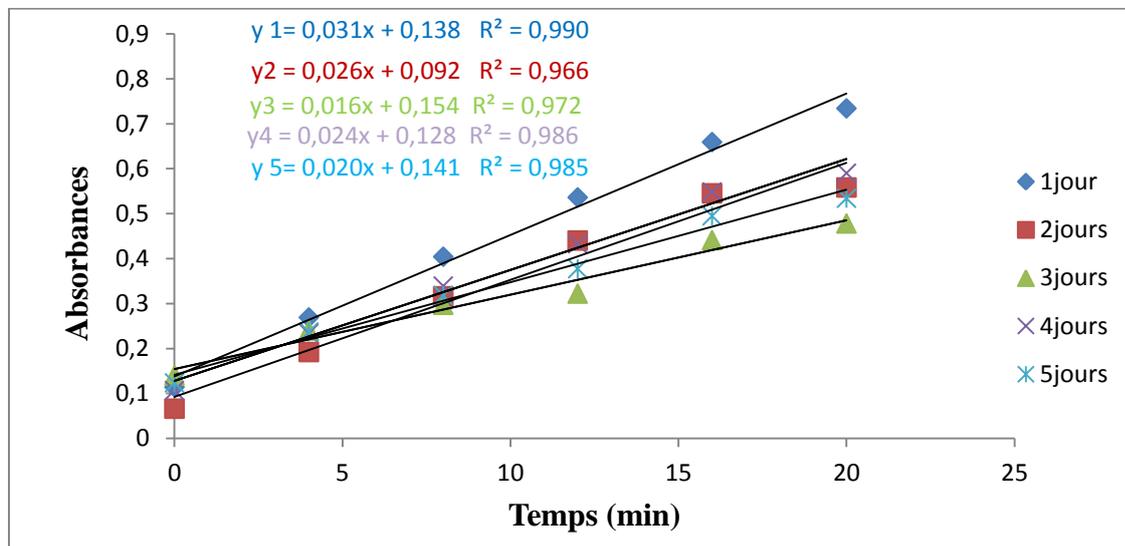


Figure 19. Dosage de l'AchE chez les adultes traités à la DL50 de *B.germanica* : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L'estimation de l'activité spécifique de l'AchE chez les adultes de *B.germanica* nouvellement exuvies traités à une dose (DL50=77,62µg/insecte) d'acide borique et à différents âges (1à 5jours). (Tableau 14 ; Figure 21).

Chez les témoins, l'activité spécifique de l'AchE reste constante au cours du temps d'exposition ($p \geq 0,05$). Chez les séries traités, on observe une diminution significative de l'activité spécifique de l'enzyme à tous les âges de traitement ($p \leq 0,05$) sauf à 5 jours. L'acide borique affecte l'activité spécifique de l'AchE et provoque une diminution ($p \leq 0,001$) hautement significative chez les traités comparativement aux témoins à tous les ages.

Tableau15 : Effet de l'acide borique (DL50) par injection sur l'activité spécifique de l'AchE (µmol /min/mg de protéine) chez les adultes de *B.germanica*, nouvellement exuvies (m±s ;n=3) .

Age (jours)	Témoins	Traités
1	25,31±0,7 a A	19,73±1,12 b A
2	28,14±2,17 a A	14,04±0,64 b B
3	27,63±0,32 a A	13,9±1,43 b C
4	27,4±0,41 a A	9,92±0,66 b D
5	29±1,31 a A	9,25±0,22 b D

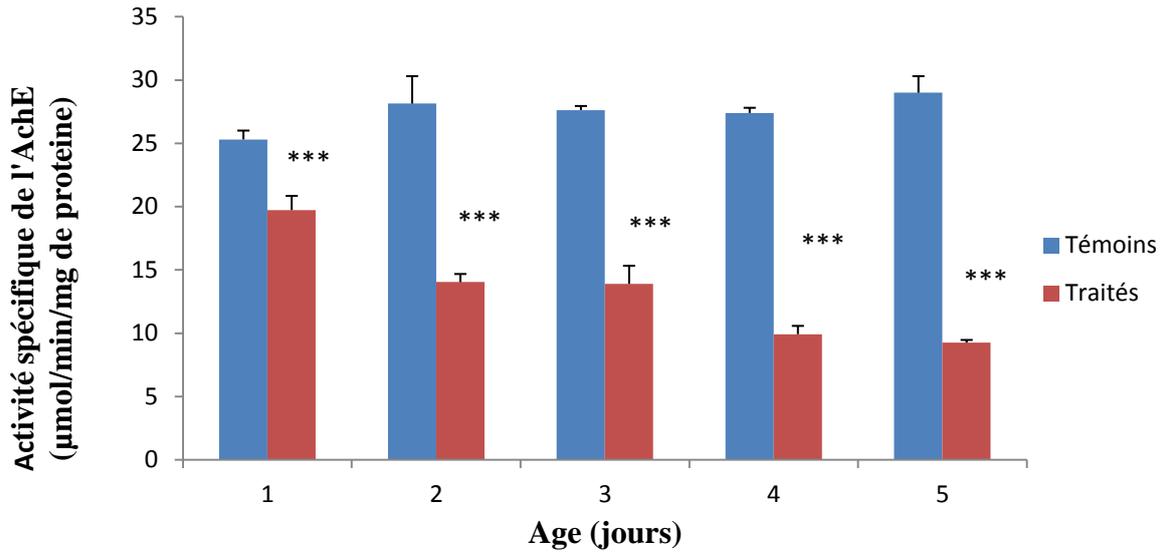


Figure 20. Effet de l’acide borique (DL50) par injection sur l’activité spécifique de l’AChE (µmol/min/mg de protéine) chez les adultes de *B. germanica* nouvellement exuvies.

L’activité spécifique de l’acétylcholinestérase a été estimée chez les séries témoins de *B. germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l’absorbance en fonction du temps (Tableau 15 ; figure 21)

Tableau 16: Effet de l’acide borique administré par injection (DL90): Dosage de l’acétylcholinestérase (µmol/min/mg de protéines) chez les adultes témoins de *B. germanica* : absorbance en fonction du temps (m ± s ; n= 3).

		Absorbances					
		0	4	8	12	16	20
Age (Jours)	Temps (min)						
	1		0,113±0,0	0,204±0,09	0,280±0,00	0,363±0,07	0,443±0,07
2		0,133±0,01	0,211±0,02	0,307±0,05	0,346±0,06	0,376±0,07	0,619±0,07
3		0,166±0,01	0,227±0,02	0,275±0,04	0,360 ±0,06	0,474± 0,03	0,592± 0,08
4		0,149±0,00	0,219±0,00	0,291±0,02	0,253 0,03	0,425± 0,01	0,60 ± 0,03
5		0,183±0,09	0,303±0,05	0,382±0,07	0,406± 0,01	0,465± 0,02	0,532± 0,05

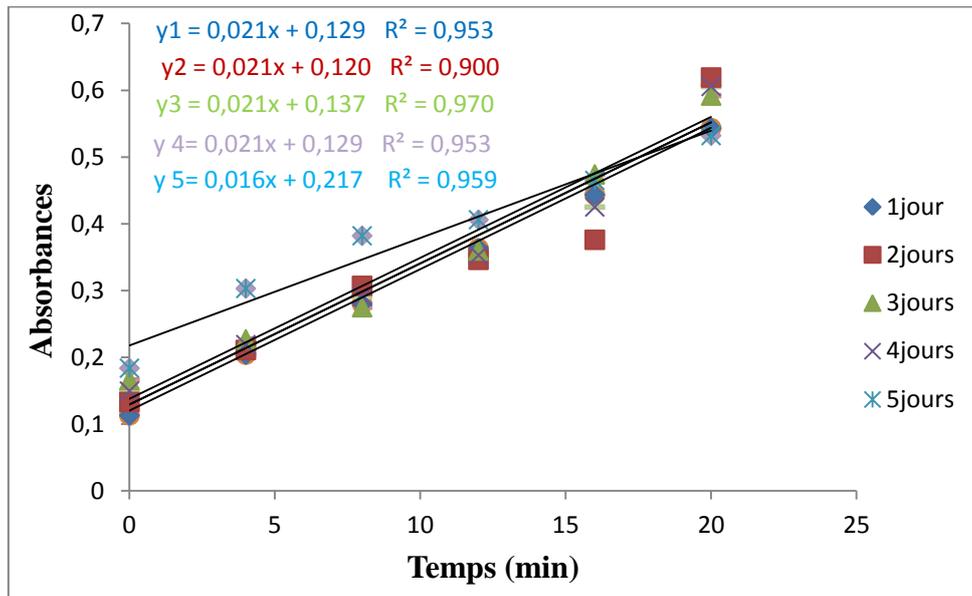


Figure 21. Dosage de l’AChE chez les adultes témoins pour la DL90 de *B.germanica* : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$).Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L’activité spécifique de l’acétylcholinestérase a été estimée chez les séries traités de *B.germanica* en utilisant les pentes des droites de régression exprimant l’absorbance en fonction du temps (Tableau16 ; Figure23)

Tableau 17: Effet de l'acide borique administré par injection : Dosage de l'acétylcholinestérase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les adultes traités à la DL90 de *B.germanica* : absorbance en fonction du temps ($m \pm s$; $n= 3$).

		Absorbances					
Age (Jours)	Temps (min)	0	4	8	12	16	20
	1		0,147±0,00	0,273±0,09	0,359±0,00	0,412±0,07	0,486±0,07
2		0,209±0,01	0,312±0,02	0,376±0,05	0,462±0,06	0,603±0,07	0,697±0,07
3		0,188±0,01	0,216±0,02	0,250±0,04	0,322 ±0,06	0,393± 0,03	0,47 ± 0,08
4		0,229±0,00	0,337±0,00	0,396±0,02	0,461± 0,03	0,495 ± 0,01	0,49 ± 0,03
5		0,208±0,09	0,288±0,05	0,340±0,07	0,41 ± 0,01	0,497 ± 0,02	0,55 ± 0,05

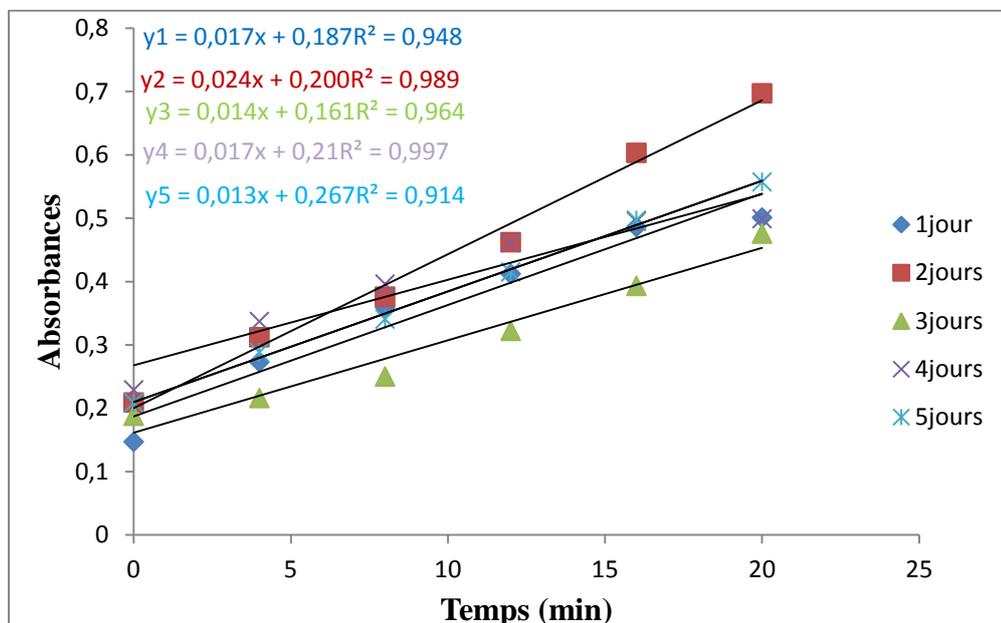


Figure 22. Dosage de l'AchE chez les adultes traités à la DL90 de *B.germanica* : courbe de référence exprimant les absorbances en fonction du temps ($m \pm s$; $n=3$). Exemple des droites de régression (R^2 : coefficient de détermination).

L'estimation de l'activité spécifique de l'AchE chez les adultes de *B.germanica* nouvellement exuvies traités à une dose (DL90=194,98µg/insecte) d'acide borique et à différents âges (de 1 à 5jours). (Tableau 17, Figure 24).

Chez les témoins, l'activité spécifique de l'AchE reste constante au cours du temps d'exposition ($p \geq 0,05$). Chez les séries traités, l'activité spécifique de l'AchE diminue significativement à 2 et 3 jours ($p \leq 0,05$), puis reste comparable à 4 et 5 jours. L'acide borique affecte l'activité spécifique de l'AchE et provoque une diminution chez les traités comparativement aux témoins à partir de 3 jours de traitement ($p \leq 0,001$). L'analyse de la variance à deux critères de classification montre qu'il ya une interaction dose-réponse.

Tableau18: Effet de l'acide borique(DL90) par injection sur l'activité spécifique de l'AchE ($\mu\text{mol /min/mg}$ de protéine) chez les adultes de *B.germanica*, nouvellement exuvies ($m \pm s ; n=3$).

Age (jours)	Témoins	Traités
1	16,89±1,2 A	15,56±0,45 a A
2	17,92±0,01 A	13,5±0,08 a B
3	18±1,91 A	12,18±0,74 b C
4	20,57±0,71 A	12,45±0,91 b D
5	16,5±1,47 A	12,71±0,94 b D

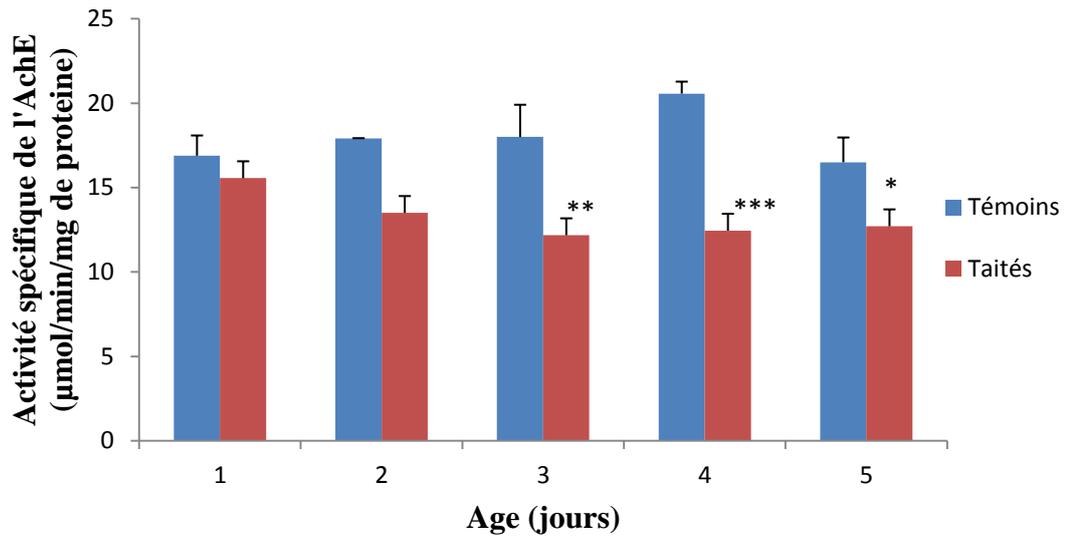


Figure 23. Effet de l'acide borique (DL90) par injection sur l'activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B. germanica* nouvellement exuvies ($m \pm s$; $n=3$)

Tableau 19 : Effet de l'acide borique par injection sur l'activité spécifique de l'AChE ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les adultes de *B. germanica* en fonction de l'âge : analyse de la variance à deux critères de classification.

Source de la variance	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Dose	3	2008,17	669,39	307,50	0,000
Age	4	42,18	10,55	4,84	0,003
Interaction dose-âge	12	243,29	20,27	9,31	0,000
Erreur	40	87,07	2,18	-	-
Total	59	2380,72	-	-	-

3. Discussion

3.1. Effet de l'acide borique sur le taux de glutathion

Bien que le glutathion ait été découvert en 1888, ce n'est que dans les années 1970 que son rôle détoxiquant a été reconnu. Il joue un rôle critique non seulement chez les humains et les mammifères, mais chez tous les vertébrés, insectes, plantes et micro-organismes (Bonus *et Gold*., 1991). C'est l'une des plus abondantes petites molécules non protéiques thiols dans les tissus des mammifères, en particulier dans le foie (Zhao Hong Mei *et al.*, 2011).

Le glutathion est un tri peptide qui a une capacité de donner facilement un électron lié à la présence d'un groupement thiol (-SH), cette capacité ainsi que sa grande concentration intracellulaire lui procurent un important pouvoir réducteur et font de cette protéine un cofacteur important des enzymes antioxydants. (Saxena, 2011).

Une déficience du GSH provoque un risque de dégâts oxydatifs pour la cellule se traduisant par des troubles pathologiques tels que le cancer, les désordres neuro-dégénératifs et les fibroses cystiques (Townsend *et al.*, 2003).

Notre étude révèle une augmentation du taux de GSH chez les séries traitées de *B. germanica* à la DL50 (77,62 µg/insecte). Des résultats similaires par l'action de la cyfluthrine ont été observés chez *Musca domestica* et chez *Tribolium castaneum* (Reidy *et al.*, 1990 ; Ugaki *et al.*, 1985), chez certains poissons exposés au plomb (Thomas et Juedes., 1992) et chez les rats traités au mercure méthylé (Woods et Ellis., 1995). Des résultats non similaires, montrant une diminution du taux de GSH ont été observés chez les moules exposés au mercure et au cuivre (Canesi *et al.*, 1999), chez les femelles de *Gambusia affinis* traitées en continu par le dimilin (Draredja-Beldi et Soltani, 2001), chez les rats exposés au lindane (Videla *et al.*, 1991) et chez les carpes à grosse tête (*Aristichthys nobilis*), traitées par injection à la microcysteine-LR (Dawen Zhang *et al.*, 2011).

3.2. Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de la glutathion-S-transférase

Le glutathion-S-transférase (GST) représente une famille multi génique d'enzymes qui jouent un rôle important dans la protection des tissus contre les éventuels composés toxiques et cancérigènes d'origine exogènes et endogènes (Vlaykova *et al.*, 2008 ; Sue *et al.*, 2006) . Ce sont des isoenzymes de la phase II du mécanisme de détoxification, catalysant la conjugaison du glutathion avec plusieurs composés électrophiles (Banrjee et Goswami, 2010). Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules des corps gras et des muscles alaires (Franciosa et Bergé, 1995).

L'activité spécifique de la GST, chez *B. germanica* traitée par injection à l'acide borique à deux différents doses (DL50 et DL90) ; montre une augmentation significative pour la DL50 à différents âges par rapport aux témoins. Nos résultats sont en accord avec ceux de Habes *et al.*, 2006 chez la même espèce utilisant l'acide borique par ingestion à deux doses différentes (DL50=8,20%,DL90=49,62%). De même, Le propoxur, le chlorpyripos et la cyalothrine par application topique entraînent une augmentation de l'enzyme de détoxification chez *P.americana* ,*B.germanica*, *B.orientalis* (Valles *et al.*, 1999) Des résultats similaire sont notés chez cette même espèce traitée par un pyréthrianoïde, la cyperméthrine (Valles *et al.*, 2000) et par le benfuracarbe et l'acétamipride (Messiad *et al.*, 2006). Chez d'autres espèces traitées par les pyréthrianoïdes, notamment chez *Cydia pomonella* (Bouvuer *et al.*, 2002) et *Helicoverpa armigra* (yang *et al.*, 2004) traitées avec la déltamétrine. *Drosophila melanogaster* exposée au phénol, présente une résistance à ce produit par une élévation de l'activité enzymatique de la GST (Shen *et al.*, 2003), une augmentation de l'activité enzymatique de la GST est signalée également chez les larves de *Spodoptera litura* exposés à des doses croissantes de nickel (1 à 20 mg/kg) dans l'alimentation (Xong Xia Sun *et al.*, 2008) ; chez *Anguilla anguilla* exposée au naphthalène (NAP) à différentes concentrations et à différents temps d'exposition (Teles *et al.*, 2003) ou encore chez la souris traitée par le NAP (Mitchell *et al.*, 2000). Une très grande résistance au carbaryl et au méthyl parathion a été observée chez *Spodoptera frugiperda* ; l'activité spécifique de la GST est plus élevée dans les corps gras chez la souche résistante de *S.frugiperda* et elle est plus importante dans l'intestin moyen et l'abdomen de la souche sensible (Yu *et al.*, 2003 ; Yu, 2004) ,

l'induction de la GST est également rapportée chez *Pyrausta sticticais* (Leonova et Slynko, 2004), *Lygus linolaris* (Zhou *et al.*, 2007), chez *Ochlerotatus cataphylla* (Boyer *et al.*, 2006) et chez *Oreochomis mossambicus* (Rao, 2006).

Toutefois, des diminutions significatives dans l'activité de la GST ont été rapportées chez la mouche domestique *Musca domestica*, traitée au fenitrothion (Ahmed et Wilkins, 2002). Chez les larves de *Chironomus tentans* traités par un herbicide et un insecticide organophosphoré provoque la réduction de l'activité de la GST (Kun *et al.*, 2007).

Les travaux de Feng *et al.*(2001) révèlent chez les larves de *Choristoneura fumiferana* , une augmentation de l'activité GST après traitement avec le RH5992(agoniste des ecdystéroïdes) mais une inhibition de cette même activité lors du traitement au difluobenzuron, inhibiteur de la synthèse de la chitine .Par contre les travaux de Shojaet Hissaki (2005) ont montré une augmentation de l'activité de la GST chez *Plutella xylostella* traitée au chlorfluazuron, autre inhibiteur de la synthèse de la chitine. Il a été montré que chez plusieurs espèces d'insectes différents mécanismes de résistance peuvent exister chez différentes souches. De plus différents mécanismes de résistance peuvent coexister chez le même individu (Siegfried et Scott, 1992).Chez *B. germanica*, la GST ne semble pas exercer d'effet sur le phénomène de résistance au cyperméthrine et au chlorpyrifos (Schraff *et al.*,1998) .

3.3. Effet de l'acide borique sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase (AChE) est la protéine la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates, qu'ils inhibent de manière non réversible (Cassenelli *et al.*,2006 ; Allout *et al.*,2007). Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques. Son rôle est de finaliser l'action du neurotransmetteur qui est l'acétylcholine et de l'hydrolyser. L'inhibition de l'AChE entraîne une accumulation de l'acétylcholine, par conséquent, une stimulation continue des récepteurs nicotiques et muscariniques (Casey *et al.*,2010) ; la membrane post synaptique reste polarisée et la transmission synaptique est inhibé conduisant ainsi à une paralysie puis à la mort (Haubruge et Amichot.,1998). L'enzyme acétylcholinestérase des Diptères est plus sensible aux insecticides organophosphorés et carbamates que l'acétylcholinestérase des Hyménoptères ou coléoptères, en particulier chez *Musca Domestica* (Boublik *et al.*,2002). Au cours de la liaison de ces insecticides à l'enzyme, l'AChE des insectes est inactivée par phosphorylation ou carbamylation des résidus de la sérine dans le site actif (Mastumura, 1985).

Le traitement par injection de l'acide borique à des adultes de *B. germanica* affecte l'activité de l'acétylcholinestérase par une diminution significative avec un effet pour les différents âges d'exposition. Cet effet a été observé chez cette même espèce traité par l'acide borique par ingestion (Habes.,2006 ; Sifi.,2002) , par le dichlorophos (Valles et al.,1996) et par le benfuracarbe et l'acétamipride (Rouibi, 2002; Maïza et al., 2004; Morakchi et al., 2005). L'inhibition de l'AchE comme site cible a été en premier rapportée chez les mites traitées aux organophosphorés (Smisseart, 1964) et chez les Arthropodes (Fournier et Mutero,1994) . En effet, l'inhibition de l'AchE a été observée chez *Diabrotica virgifera virgifera* (Gao et al.,1998) et *Drosophila melanogaster* (Charpentier et al.,2000) traitées par différents organophosphorés essentiellement le chlorpyrifos-éthyl-oxon et le coumaphosoxon . L'AchE a été aussi inhibée chez les carpes *Cyprinus carpio* traité par les organophosphates et les carbamates (Gruber et Munn.,1998) .Chez la cochenille *Aonidiella auranti* par le di(p-allyl-N-méthylaminophenyl)pentane-3-1(Yerushalmi et Cohen.,2002) .Chez *Bectrocera olea* traité par l'omethoate à 0,03mM la baisse est plus marquée chez les individus de la souche sensible par rapport à ceux de la souche résistante (Vontas et al.,2002).Kun Yan Zhu (2006) a testé l'effet de trois xénobiotiques différents, atrazine (herbicide), DDT (insecticide organochloré), et chlorpyrifos (insecticide organophosphoré) chez les moucheron aquatique *Chironomus tentans* sur les activités de l'AchE, general esterase (GE), glutathione S-transferase (GST), et le cytochrome P450 monooxygenase (P450) .L'exposition de moucheron à l'atrazine à 30 et 150 mg / l pendant 20 jours (à partir du premier au quatrième stade larvaire) n'a pas changé significativement l'activité de l'AChE, également l'exposition similaires au DDT à 0,01 et 0,05 mg / l n'a pas affecté significativement AChE, cependant l'exposition de moucheron au chlorpyrifos à 0,10 g / l pour 20 j réduit l'activité de l'AChE de 59,8% (Kimberley et al.,2009)

D'autres espèces présentent également une inhibition :*Eupolathrus nudicornis* (Benamara,2010) *Helix aspersa* (Coeurdassier et al.,2001). *Achantina fulica* (Chandran et al.,2005) ;*Mytilus galloprovincialis* (Box et al.,2007) et *Cepae nemoralis* (Notten et al.,2006).

Récemment plusieurs études ont prouvé que l'inhibition de l'Acétylcholinestérase peut être un indicateur de la pollution des organismes marins aux métaux lourds (Sokolova et al., 2005, Soltani et al .,2007).

2. Matériels et méthodes

2.1. Présentation du matériel biologique

2.1.1. Présentation de l'insecte

B. germanica (L.) de l'ordre des Dictyoptères et de la famille des Blattellidae (Guillaumin & al, 1969), est une espèce domestique, cosmopolite, nocturne, à développement hétérométabole. Le corps des adultes est aplati, ovale mesurant 11 à 12 mm de longueur avec une couleur qui varie de brun pâle à noire; le pronotum porte deux bandes longitudinales (Gordon, 1996).

La position systématique est la suivante :

- Embranchement** : Arthropoda
- Sous embranchement** :Mandibulata
- Classe** : Insecta
- Sous classe** : Pterygota
- Section** :Polyneoptera
- Ordre** :Dictyoptera
- Sous ordre** :Blattaria
- Super famille** : Blaberoidae
- Famille** : Blattellidae
- Sous famille** : Blattellinae
- Genre** : *Blattella*
- espèce** :*germanica* (L.)

2.1.2. Cycle biologique de *B. germanica*

Huit jours après la mue imaginale la femelle forme au cours de différents cycles gonadotrophiques 6 à 8 oothèques comportant 36 à 48 œufs (Gordon, 1996), la durée de l'évolution embryonnaire est d'environ 17 jours. Le développement larvaire de 6 mois environ présente 5 à 7 stades successifs séparés par des mues (Wattiez et Beys, 1999); les larves du dernier stade dont la durée de vie est en moyenne de 40 jours pour le mâle et de 41

jours pour la femelle, subissent enfin la mue imaginale (Fig. 1). L'adulte a une longévité qui est de 128 jours pour le mâle et de 153 jours pour la femelle (Cornwell, 1968).

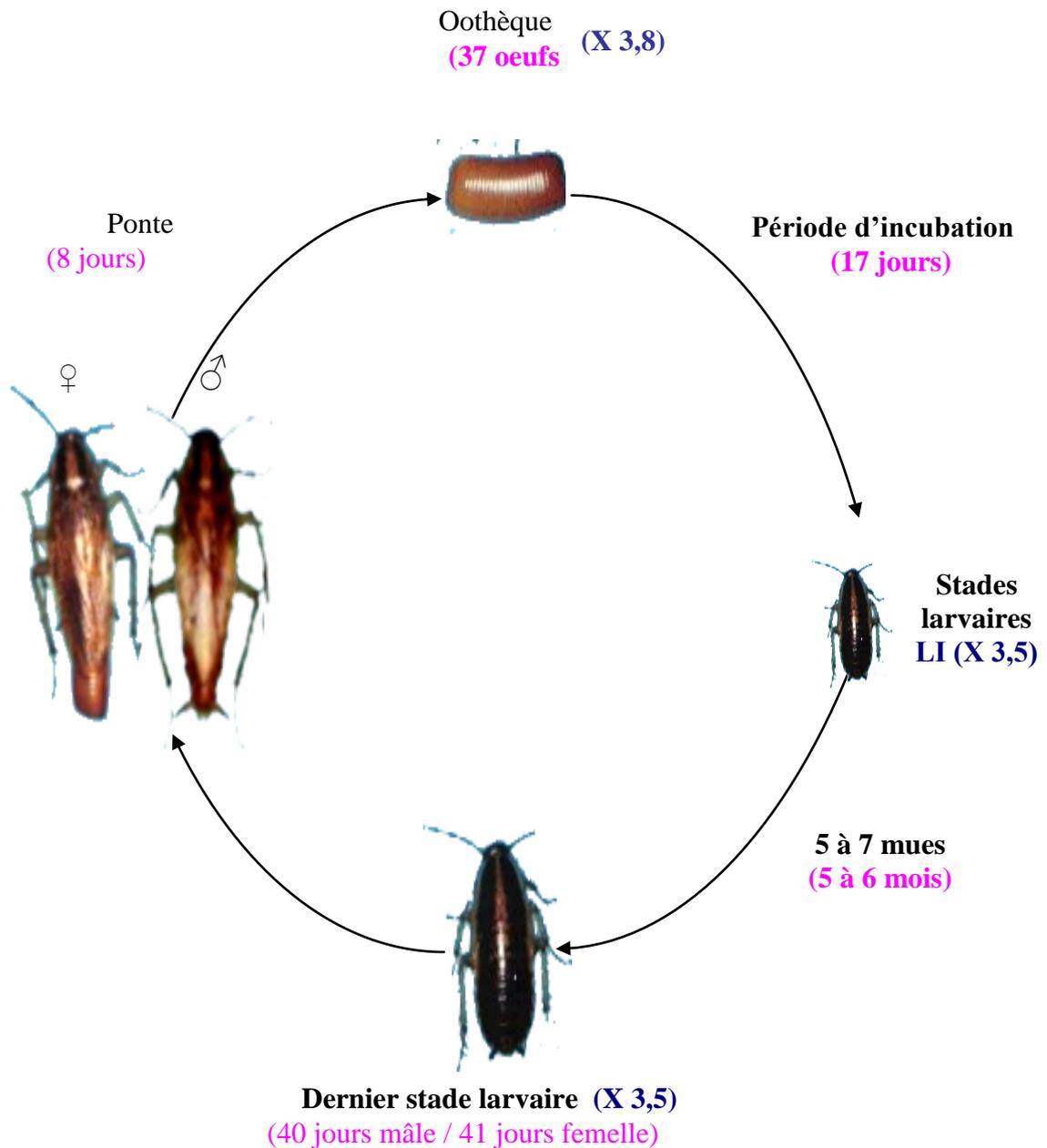


Figure 1. Cycle biologique de *Blattella germanica* d'après (Cornwell , 1968).

2. 1. 3. Morphologie des différents stades

- **Le stade œuf** : Il commence à la fertilisation des œufs et se termine à l'éclosion. Les œufs sont réunis dans une capsule de consistance cornée appelée oothèque qui se forme et arrive à faire saillie à l'extérieur pendant la ponte (Tanaka, 1976). De forme et de taille variable, l'oothèque possède sur la face dorsale une crête denticulée au niveau de laquelle se fera l'éclosion. Les œufs sont disposés verticalement de chaque côté d'une cloison médiane qui divise l'oothèque dans le sens de la longueur (Tanaka, 1976) (Fig. 2 : **A**).
- **Le stade larvaire** : la femelle dépose l'oothèque, peu avant l'éclosion et des larves vermiformes en sortent. Les principaux changements du développement larvaire s'effectuent au niveau de la taille et la pigmentation; les larves de dernier stade ressemblent aux adultes mais sont aptères (Rust *et al.*, 1995 ; Elie, 1998) (Fig. 2 : **B1-B5**).
- **Le stade adulte** : commence à la mue imaginale (adulte 0 jour). L'adulte possède alors 2 paires d'ailes, des antennes longues et filiformes, des pattes robustes et épineuses permettant une course rapide et des pièces buccales broyeuses (Wigglesworth, 1972). Les adultes mâles possèdent un corps mince, à abdomen effilé et un pygidium non recouvert par les ailes (Fig. 2: **C**); les femelles de couleur plus sombre présentent un corps trapu et robuste avec un abdomen arrondi recouvert par les ailes (Rust *et al.*, 1995) (Fig. 2 : **D**).

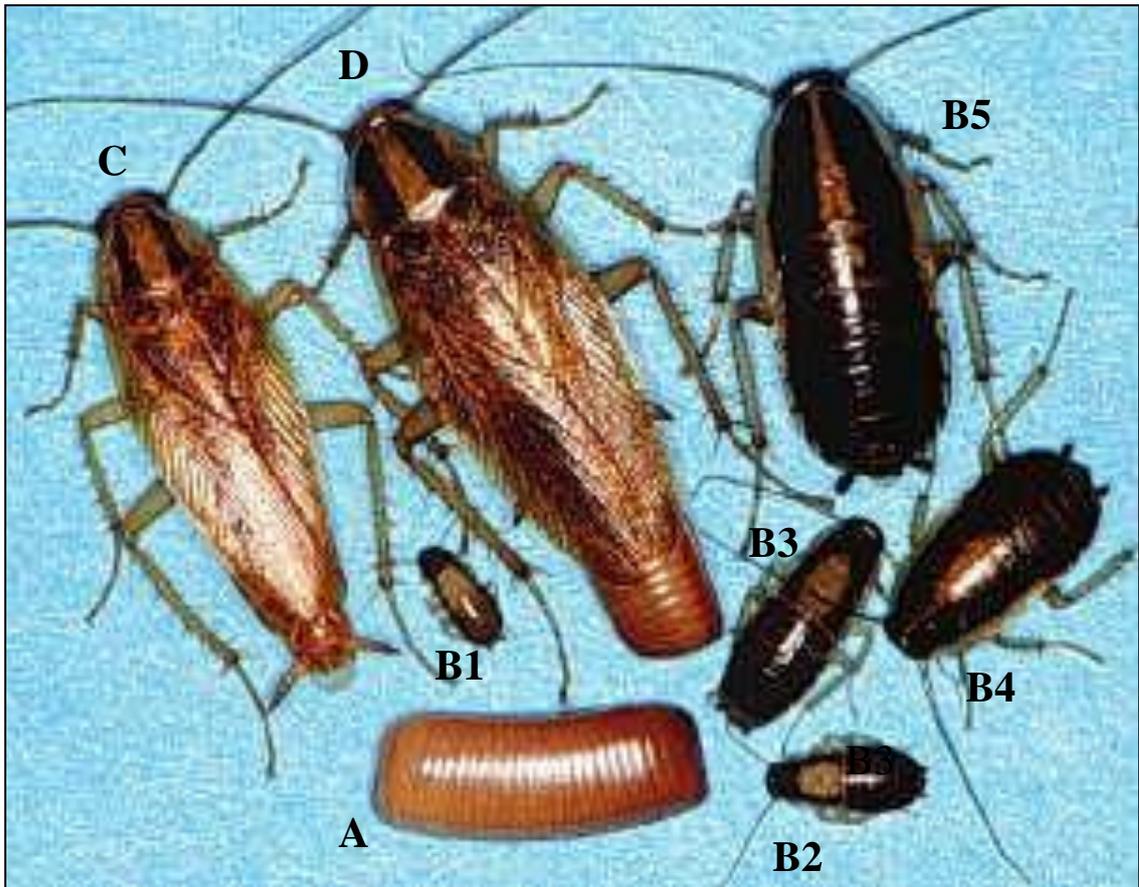


Figure 2. Morphologie des différents stades de *Blattella germanica* (X 6,8) d'après (Hutchinson, 1999).

A : Oothèque.

B1 : Premier stade larvaire.

B2 : Deuxième stade larvaire.

B3 : Troisième stade larvaire.

B4 : Quatrième stade larvaire.

B5 : Cinquième stade larvaire.

C : Mâle Adulte.

D : Femelle adulte.

2.1.4. Elevage en laboratoire

Les prélèvements des Blattes se font à différents endroits de la ville (hôpitaux, structures commerciales, université et logements). L'élevage au laboratoire s'effectue dans des boîtes en plastique aérées contenant des emballages alvéolés d'œufs qui servent d'abris. Les Blattes sont nourries de biscuits et abreuvées de coton imbibé d'eau. L'élevage est maintenu à une température de 25 à 28°C, une hygrométrie de 70 à 80% et une photopériode de 12 heures de lumière. (Fig. 3).

2.2. Présentation de l'insecticide

L'acide borique ou orthoboracique est un insecticide inorganique de formule chimique H_3BO_3 (Fig. 4) faiblement soluble dans l'eau et soluble dans les solvants inorganique et dans l'eau bouillante ce qui lui confère une grande stabilité avec un effet résiduel relativement long (Hubbard, 1998). Il est incolore, inodore, très peu répulsif, très peu volatile.

Cet insecticide est commercialisé sous forme de cristaux incolores ou poudre blanche (Merck), il a un poids moléculaire de 61,83g et un point de fusion de 171°C.

2.3. Traitement

L'acide borique (2µl) a été administré par injection sur la face latéro-ventrale de l'abdomen à des adultes mâles et femelles de *B.germanica* nouvellement exuvies (Fig. 5) à l'aide d'une micro seringue à deux doses : DL50 (77,62µg/insecte) et DL90 (194,98µg/insecte). Les témoins reçoivent une injection d'eau distillée. (Fig. 6).



Figure 3. Elevage en laboratoire de *B. germanica*.

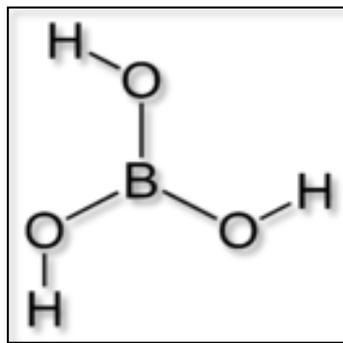


Figure 4. La structure chimique de l'acide borique(H_3BO_3).



Figure 5 : adulte nouvellement exuvie (0jour)



Figure 6 : injection de l'acide borique.

2.4 .Techniques histologiques

L'étude histologique a été réalisée selon les indications de Martoja et Martoja (1967).Après microdissection sous binoculaire les différentes parties du tube digestif (intestin antérieur ,moyen et postérieur) des individus mâles et femelles des séries témoins et traités sont fixés dans le Bouin alcoolique pendant 48 heures, déshydratés dans un bain d'alcool 95° (2x24h), puis un bain de butanol qui est à la fois un liquide d'attente et un excellent ramollisseur. Les pièces après imprégnation et inclusion à la paraffine, sont débitées en coupes de 7 μ m d'épaisseur à l'aide d'un microtome, étalées à l'eau gélatinée puis séchées dans une étuve à 37°C .Avant la coloration, les pièces subissent un déparaffinage par deux bains de toluène (2x15min),un bain de collodion (30sec) ,deux bains d'alcool 95°C (2x3min) et un bain d'alcool /formol (9V/1V)(1min). Les pièces sont finalement colorés à l'hémalun-Erythrosine-Safran (H.E.S). La coloration est achevée par une déshydratation avec 2 bains successif d'alcool 95° et 100 °(1min). Le montage des coupes se fait avec du merkoglass.

2.5. Dosage enzymatique

2.5.1 Extraction et dosage de la glutathion

Le glutathion est dosé selon la méthode de Weck Berker&Cory (1988) qui repose sur la mesure de l'absorbance de l'acide 2-nitro 5-mercapturique résultant de la réduction de l'acide 5-5- dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman) par les groupements thiol (-SH) du glutathion. Les corps sans tête de *B. germanica* âgés de 1 à 5 jours des séries témoins et traités sont homogénéisés dans 1ml d'une solution EDTA (acide Ethylene Diamine Tetra Acétique) à 0,02M (7,4448g EDTA et 1000ml d'eau distillée) à l'aide des ultrasons. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une dépolarisation par l'acide Sulfosalicylique 0,25% (0,25g SSA, 100ml d'eau distillée) 0,8ml de l'homogénat sont additionnées à 0,2ml d'acide Sulfosalicylique. Le mélange est vortexé et laissé pendant 15min dans un bain de glace puis centrifugé (1000tours/min pendant 15min). Le surnageant est utilisé pour la mesure de la concentration du glutathion selon les étapes suivantes :

-prélever 0,5ml du surnageant.

-ajouter 1ml du tampon tris EDTA (0,02M ; PH 9,6)

-63,04g Tris +7,4448g EDTA+1000ml d'eau distillée

-ajouter 0,025ml DTNB (0,01M)

-3,96g DTNB+1000ml méthanol absolu.

-laisser le mélange pendant 5 min à température ambiante.

-mesurer la densité optique par spectrophotométrie à 412nm

Le taux de glutathion est estimé selon la formule suivante :

$$\text{GSH} = \frac{\text{DO} \times 1 \times 1,525}{13,1 \times 0,8 \times 0,5 \times \text{mg de protéine}}$$

Do : densité optique.

1 : volume total des solutions utilisée dans la déprotéinisation (0.2 ml ASS+0.8ml homogénat).

1.525 : volume total des solutions utilisées dans du GSH (0.025ml DTNB+0.5ml du surnageant+1 ml Tris EDTA).

13.1 : coefficient d'absorbance (concernant le groupement -SH à 12nm).

0.8 : volume de l'homogénat utilisé en ml.

0.5 : volume du surnageant utilisé en ml.

mg de protéines : les protéines en mg.

2.5.2. Extraction et dosage de la glutathion-s- transférase (GST)

La mesure de l'activité des GSTs consiste à fournir à l'enzyme un substrat en général du chlorodinitrobenzène (CDNB) qui réagit facilement avec de nombreuses formes de GST et du glutathion. La réaction de conjugaison de ces deux produits entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340nm de longueur d'onde. La valeur de la densité optique mesurée à 340nm est directement proportionnelle à la quantité du conjugué formé elle même liée à l'intensité de l'activité GST.

La méthode utilisée pour doser la GST est celle de Habig *et al.* (1974). Elle consiste à faire réagir les GSTs contenues dans le cytosol sur un mélange GSH+CDNB (1mM) à 25°C et à

Ph7. La variation de la densité optique due à l'apparition du complexe GSH-CDNB est mesurée à 340nm. Les adultes mâles et femelles de *B.germanica* traités à deux doses (DL50=77,62µg/insecte et DL90=194,98µg/insecte) sont prélevés à différents âges (1à 5 jours) décapités puis broyés dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1M ; PH6) grâce à un homogénéisateur à ultrasons (Sonifère B-30). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (1300 tours/min à 4°C pendant 30 minutes), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité des GST.

Trois répétitions sont réalisées pour chaque âge, une série témoin est réalisée en parallèle.

Le dosage a été effectué comme suit : 0,2 ml du surnageant sont additionnés à 1,2 ml du mélange (CDNB 1mM,GSH 5 mM) ;{20,26mg CDNB ;153 ,65mg GSH,1ml éthanol, 100ml tampon phosphate (0,1M ;ph6), parallèlement un blanc est préparé avec 0,2ml d'eau distillée remplaçant la quantité du surnageant . La lecture des absorbances a été établie toutes les minutes pendant 5 minutes dans un spectrophotomètre (SHIMADZI-UV-1202) à une longueur d'onde de 340nm et à une température ambiante.

L'activité spécifique des GSTs est exprimée en µMol/min/mg de protéine. Elle est déterminée d'après la formule suivante:

$$\text{GST} = \frac{\Delta\text{DO} \times \text{Volume totale de la cuve}}{9,6 \times E \times \text{volume du surnageant} \times \text{mg de protéine}}$$

ΔDO : pente de la droite de régression de densités optiques obtenues à 340nm.

Volume totale de la cuve : 1,4ml {1,2ml du mélange CDNB-GSH+0,2ml du surnageant}.

9,6 Mm⁻¹Cm⁻¹ : coefficient d'extinction du mélange GSH-CDNB (à340nm).

E : épaisseur de la cuve=1cm.

Volume du surnageant en ml : 0,2ml.

mg de protéine : quantité des protéines exprimée en mg.

2 .5.3. Extraction et dosage de l'acétylcholinestérase

La méthode de dosage de l'AchE la plus courante (Elman *et al.*, 1961) consiste à fournir à l'enzyme (AchE) un substrat artificiel l'acétylcholine, dont l'hydrolyse catalysée libère la thiocholine et de l'acide acétique.

La quantité de thiocholine obtenue est proportionnelle à l'activité enzymatique on la révèle grâce à la méthode colorimétrique faisant intervenir union le DTNB (acide 5-5 dithio-bis-2-nitrobenzoïque qui se lie avec la thiocholine pour former un complexe de couleur jaune le DTNB (acide 5-thio-2- nitrobensoïque que l'on dose .En vue de l'estimation de l'activité spécifique de l'AchE, les têtes de adultes mâles et femelles des séries témoins et traités à différents âges (1 à 5jours) sont homogénéisées dans 1ml de solution détergente¹et trois répétitions sont réalisées pour chaque âge. L'homogénat est centrifugé à 5000 tours/min pendant 5 minutes et le surnageant est récupéré puis servira comme source d'enzyme.

Le dosage est réalisé comme suit :

-100µl de surnageant sont additionnés de 100µl de DTNB dans un tampon tris (0.1M ; PH7)² et 1ml de tampon tris (0.1M ; PH7).Après 3à5 minutes de repos nécessaire pour épuiser la réaction spontanée ; 100µl de substrat acétylcholine³ (préparé extemporanément) sont ajoutés .La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 minutes pendant 20 minutes par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc⁴.

1 :38.03mg éthylène glycol tris beta aminoéthyl éther NNN'N' (EGTA) +1ml tritonx100%+5.845g Nacl+80ml tampon tris (10MmPH7).

2 : *39.6mg DTNB
 *15mg CO₃HNa
 *1ml de tampon Tris (0.1M ; PH7)
 Dilués dans10ml de tampon Tris (0.1M ; PH7).

3 : 118mg acétylcholine+5mleau distillée.

4 : 100µl de la solution détergente+100µl DTNB+1ml tampon Tris (0.1M ; PH7) +100µl de substrat acétylcholine.

L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase est exprimée en µmol/min/mg de protéine elle est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{AchE} = \frac{\Delta\text{DO}/\text{min}}{1.36 \times 10^4} \times \frac{1}{\frac{\text{Volume du surnageant}}{\text{Volume totale de la cuve}} \times \text{mg de protéine}}$$

-AchE : mole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéine (µmol/min/mg de protéine).

-ΔDO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

-1,36x10⁴Mol : coefficient d'extinction molaire du DTNB.

-Volume du surnageant : 100µl.

-Volume total de la cuve : 1300µl (100µl de surnageant+100µl DTNB+1000µl tampon tris+100µl d'Acétylcholine).

-mg de protéine : quantité des protéines exprimé en mg.

2.5.4. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford qui consiste à additionner une fraction aliquote de 100µl du surnageant ou de la gamme étalon, 4ml de réactif BBC (50mg de BBC dans 25ml d'éthanol 95°. agitation 2heures).

On ajoute 50 ml d'acide ortho phosphorique à 85% et on complète à 500ml avec de l'eau distillée.

La présence de protéine dans l'échantillon se révèle par une coloration bleue.

L'absorbance est lue au spectrophotomètre à 595 nm.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de bœuf BSA titrant 1mg /ml.

Tableau1 : dosage des protéines : réalisation de la gamme d'étalonnage.

tubes	1	2	3	4	5	6
Quantité de BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (µl)	4	4	4	4	4	4

2.6. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont représentés par la moyenne suivie de l'écart type ($m \pm s$). L'analyse statistique a été réalisée grâce au logiciel Minitab (Weinberg, 1985). Différents tests ont été effectués tels que la régression linéaire, le test « t » de Student, et l'analyse de la variance à deux critères de classification.

Chapitre2

1. Introduction

Le tube digestif est composé de trois régions: le stomodeum, le mésentéron et le proctodeum. Le stomodeum et le proctodeum sont tous deux bordés de cuticule et le contenu du mésentéron est contenu dans une membrane péritrophique qui empêche le contact direct des aliments avec la muqueuse de l'intestin moyen. L'œsophage devient un jabot, un sac élargi qui s'étend dans l'abdomen. Là où le jabot se rétrécit brusquement, il devient le gésier ou proventricule qui est une courte région durcie. Le proventricule marque la jonction entre le stomodeum et le mésentéron. La région antérieure du mésentéron est aussi indiquée par la présence de huit excroissances tubulaires qui se terminent en sac appelés diverticules gastriques. Ces poches du mésentéron sont impliqués dans des fonctions digestives spécialisées. Le mésentéron est le site principal de la sécrétion enzymatique et de l'absorption des aliments. La partie postérieure du mésentéron débute au point de jonction avec les tubules de Malpighi.

Après la jonction avec les tubules de Malpighi commence le gros intestin ou colon. Le rectum, qui est court et qui se distingue par des striations longitudinales est localisé à l'extrémité la plus postérieure du proctodeum. Il s'ouvre vers l'extérieur par l'anus.

Chez *B. germanica*, la longueur totale du tube digestif est de 3 à 4 cm. L'intestin antérieur et l'intestin postérieur, comme chez tous les insectes, possèdent une cuticule et seul l'intestin moyen en est dépourvu. L'intestin antérieur, plus ou moins rectiligne est constitué par le pharynx, l'œsophage, le jabot et le gésier. A l'arrière du gésier se trouve une valvule œsophagienne qui délivre à l'intestin moyen les aliments à un certain rythme et assure ainsi la régulation du transit. L'intestin moyen fait une grande boucle. Il possède à la partie antérieure une couronne de caecums dont le nombre varie de 4 à 12 chez la même espèce. Une membrane péritrophique empêche le contact direct des aliments avec la muqueuse de l'intestin moyen. A la limite de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur se trouvent les tubes de Malpighi (8 à 10). L'intestin postérieur est également rectiligne, comporte l'iléon suivi du colon et se termine par une ampoule rectale (Fig.26).

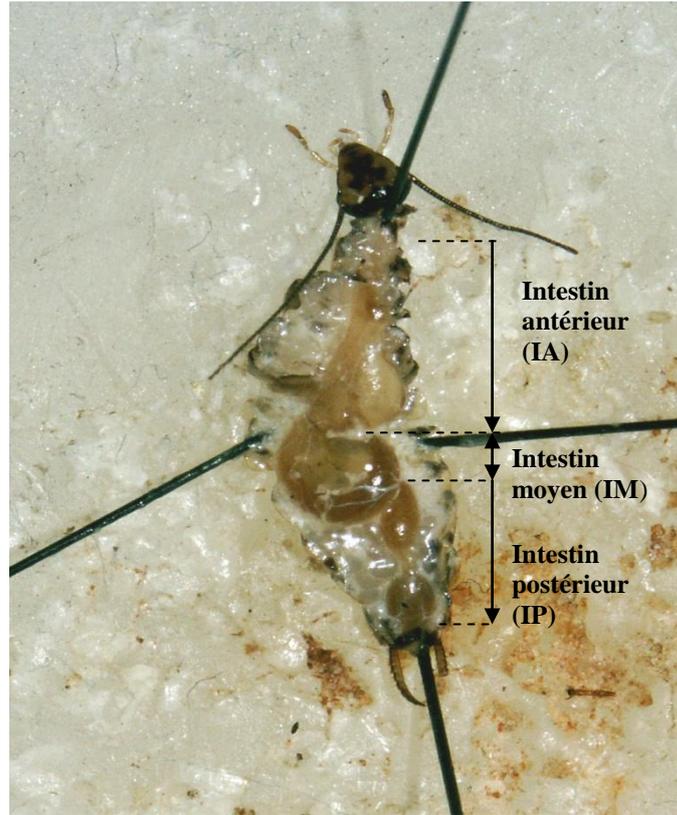


Figure 24. Différentes parties du tube digestif de *B. germanica* (x 5) (Habes *et al*, 2006).

2 .Résultats

2.1. Effet de l'acide borique sur l'intestin antérieur

Chez les insectes témoins, le jabot présente un épithélium intestinal, surmonté d'un intima cuticulaire qui est constitué de cellules épithéliales, généralement cubiques avec des noyaux arrondis. La lame basale est peu distincte du tissu conjonctif sous-jacent qui forme avec les muscles longitudinaux internes et les muscles circulaires externes une gaine musculo-conjonctive (Fig 27 : A, B).

L'acide borique administré aux adultes de *B. germanica*, par injection provoque une dilatation du jabot qui se manifeste, a la dissection par la présence de bulles d'air. L'intestin antérieur (jabot) présente une altération structurale au niveau de l'épithélium intestinal ; en effet, un relâchement de l'épithélium est observé par rapport aux témoins. Les cellules épithéliales s'élargissent, l'intima cuticulaire disparaît. Par ailleurs, la lame basale et la gaine musculo-conjonctive semblent intactes (Fig. 27 : C, D)

2.2. Effet de l'acide borique sur l'intestin moyen

L'observation des coupes transversales de l'intestin moyen des séries témoins âgées de 3 jours montre un épithélium intestinal formé de cellules épithéliales simples pourvues d'un noyau central. A la partie apicale, ces cellules présentent une bordure en brosse. Les cellules de régénération sont plaquées contre la lame basale, apparaissent petites, isolées ou groupées en nids. Dans la lumière intestinale, se trouve une membrane péritrophique qui isole les aliments ingérés des microvillosités. Côté milieu intérieur, l'intestin moyen est pourvu d'une gaine musculo-conjonctive (Fig.28 : A, B).

L'acide borique administré par injection affecte la structure de l'intestin moyen. Les cellules épithéliales deviennent plus grandes et leurs noyaux migrent, les espaces intracellulaires sont plus importants, les cellules se désagrègent, la membrane péritrophique est altérée. L'épaisseur de l'épithélium est également affectée ; on observe une augmentation de son épaisseur.

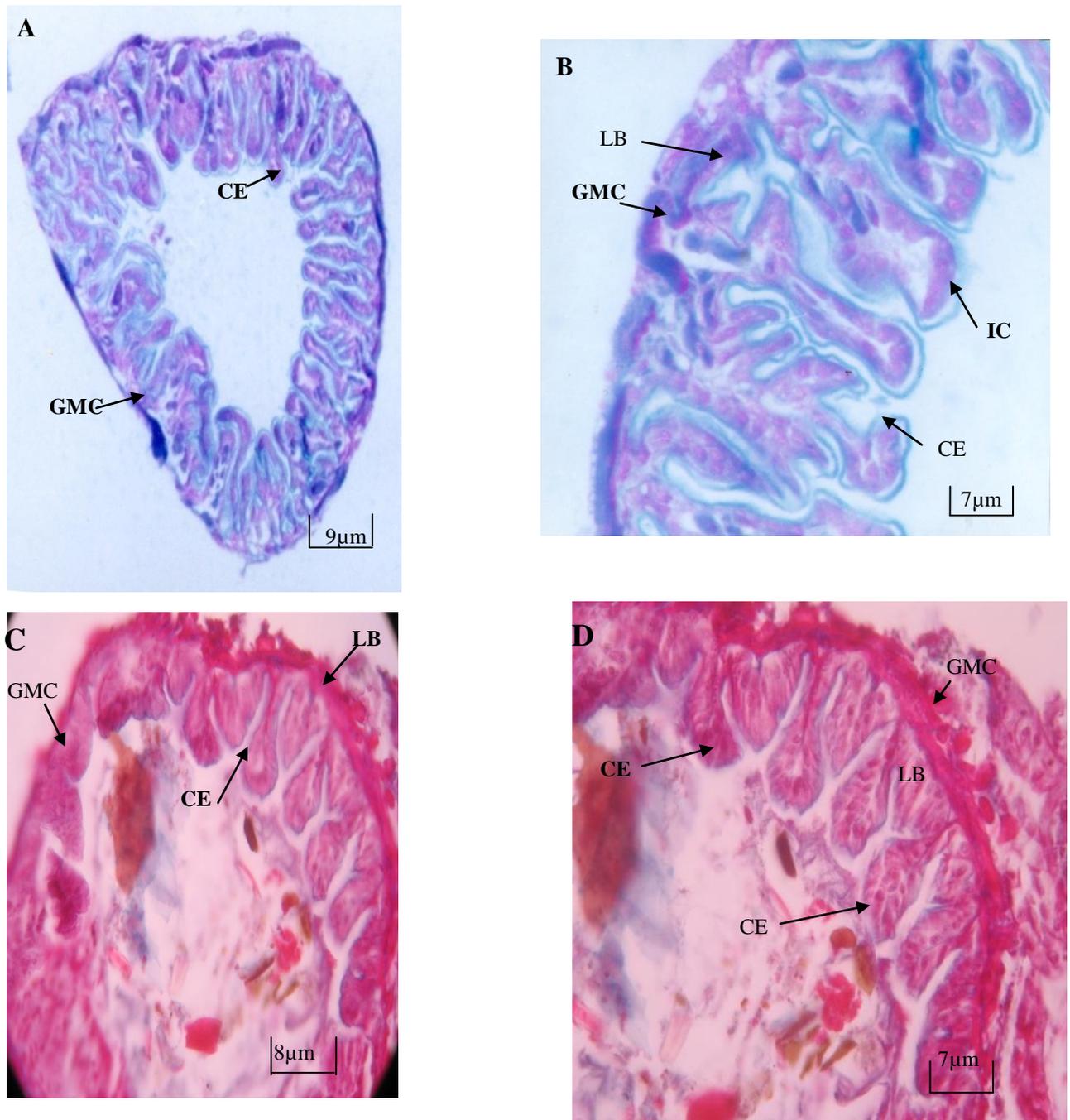


Figure 25. Coupes histologiques de l'intestin antérieur (jabot) des adultes de *B. germanica*. Témoins A :Vue d'ensemble; B :Détaillée traités à l'acide borique à la DL90 3j ,C :Vue d'ensemble ;D :Détaillée (CE: cellules épithéliales; N: noyau; GMC: gaine musculo-conjonctive; LB: lame basale).

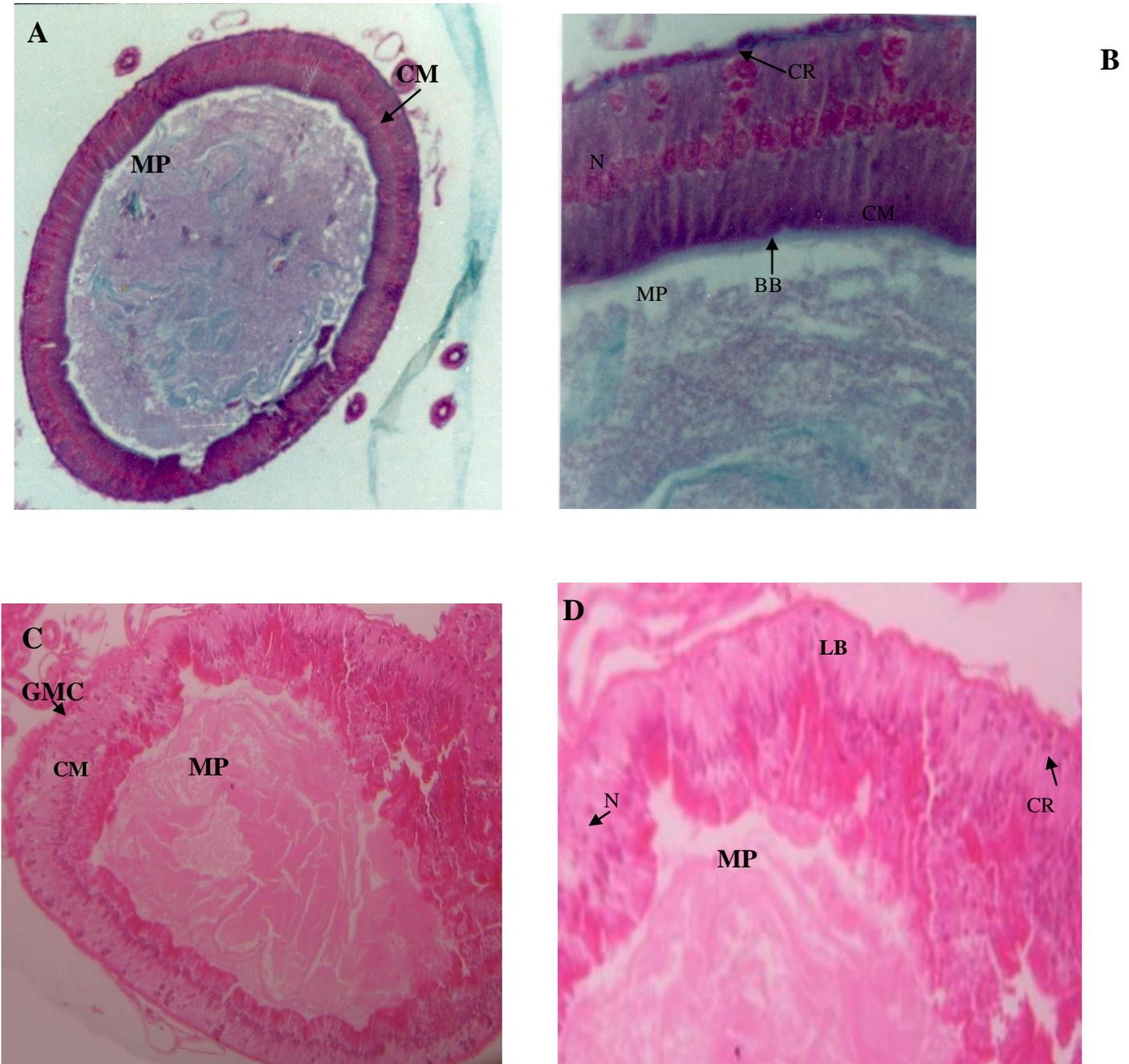


Figure 26. Coupes histologiques de l'intestin moyen des adultes de *B.germanica* Témoin **A** : Vue d'ensemble ;**B**: détaillé : traité à la DL90 3jours, **C** :Vue d'ensemble ; **D** :Détaillée (MP: membrane péritrophique ; BB: bordure en brosse ; N: noyau ; CM: cellule mésentérique ; CR: cellules de régénération ; LB : lame basale ; GMC: gaine musculo-conjonctive.

3. Discussion

Les insecticides entrent dans le corps des insectes par divers voies et franchissent plusieurs barrières avant d'atteindre la cible. Ils peuvent être réversiblement absorbés par tous les types de tissus, détoxifiés et finalement excrétés (Ishaaya, 2001). Parmi ces barrières, le tube digestif paraît être la voie principale d'entrée (Cochran, 1998). L'acide borique a été d'abord appliqué contre les blattes comme insecticide de contact sous forme de poussière, ce n'est qu'en 1918 que Walter conclut que l'acide borique est plus efficace comme poison stomacale.

les observations réalisées sous binoculaire des coupes des différentes parties du tube digestif des adultes de *B.germanica*, traités par injection par l'acide borique à une dose correspondant à la DL90, mettent en évidence une désorganisation de l'épithélium de l'intestin antérieur qui se traduit par un détachement et une séparation des cellules épithéliales les unes des autres. Ces effets ont été rapportés par Cochran (1995) chez les nymphes de la même espèce abreuvée d'eau contenant 2% d'acide borique et 2% de sucre (poids/volume) ainsi que chez des nymphes traitées par une dose de 20% d'acide borique administré sous forme de mélange alimentaire. Nos résultats sont également en accord avec ceux observés par Habes *et al* (2006), qui ont également observé une destruction de la cuticule chez des adultes de *B.germanica* âgés de 3 jours traités avec de l'acide borique administré par ingestion sous forme de mélange alimentaire à la DL50 = 8,20% et DL90 = 49,62% avec une désorganisation puis destruction des cellules épithéliales. Cependant contrairement à nos résultats Sifi (2002) n'a pas observé une destruction de la couche cuticulaire chez les adultes de *B.germanica* traités oralement par l'acide borique sous forme d'un mélange alimentaire à une dose de 39,67%. Cette différence pourrait s'expliquer par le temps d'exposition la dose et surtout la voie de pénétration de l'acide borique.

Au niveau de l'intestin moyen, l'injection de l'acide borique provoque une destruction de l'épithélium intestinal, Les cellules épithéliales deviennent plus grandes, une prolifération des cryptes de régénération, une désagrégation de la membrane péritrophique. Des résultats similaires ont été rapportés chez les adultes de *B.germanica* traités à l'acide borique par voie orale à différentes doses ; 8,20% et 49,62% (Habes 2006) et 39,67% (Sifi, 2002). L'altération de la structure de l'intestin moyen a été observée chez les larves du quatrième stade de *Thaumotopeae.pityocampa* traités par voie orale au Thuricide HP une formulation commerciale à base de *Bacillus thuringiensis* à une dose de 1% (Habes et Soltani, 1992) ;

chez des adultes de *Locusta migratoria* traités par un pyréthrianoïde, administré par voie orale à différentes doses (Acheuk ,2000).

4. Conclusion

L'étude de la structure du tube digestif chez *B.germanica*, montre que l'administration de l'acide borique par injection provoque une altération de l'épithélium intestinal. En effet, les cellules de l'intestin antérieur et de l'intestin moyen présentent d'importantes anomalies.

Conclusion générale et perspectives

Le travail réalisé nous a permis d'évaluer chez *B.germanica*, l'effet d'un insecticide inorganique l'acide borique par injection à deux doses la DL50= 77,62 µg/insecte et la DL90=194,98 µg/insecte sur l'activité de deux enzymes de détoxification ; la glutathion-S-transférase (GST), le glutathion (GSH), l'activité d'une neuroenzyme, l'acétylcholinestérase (AChE) et sur la structure du tube digestif.

Les résultats montrent que l'acide borique affecte les biomarqueurs et provoque une augmentation du taux de GSH et de l'activité spécifique de la GST à la faible dose (DL50) chez les séries traités de *B.germanica*, à différents âges, indiquant ainsi la mise en place d'un mécanisme de détoxification. A la forte dose (DL90) on observe une augmentation à 2 jours. Cependant, la diminution significative de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les adultes de *B.germanica* après traitement aux différents âges pour les doses testées (DL50 et DL90) confirme que l'acide borique est neurotoxique.

L'observation microscopique des coupes histologiques semi-fine des différentes parties du tube digestif (intestin antérieur et moyen) présente une altération structurale de l'épithélium intestinal .Au niveau de l'intestin antérieur, l'acide borique affecte la structure de l'épithélium intestinal par un élargissement des cellules épithéliales. L'intestin moyen présente une désorganisation très importante, les cellules se désagrègent, les espaces intracellulaires sont prononcés, la hauteur des cellules épithéliale est très importante, les noyaux des cellules épithéliales migrent ou disparaissent. L'acide borique est considéré comme un poison stomacale.

A l'avenir il serait intéressant de compléter ce travail par une étude plus ciblée sur la détermination de l'effet de cet insecticide sur d'autres mécanismes de résistance essentiellement les enzymes de détoxification tels que les monooxygénases à cytochrome p450, les estérases et les réductases. Il serait également intéressant d'utiliser des techniques de biologie moléculaire, de réaliser un dosage des excréments et un dosage des glandes endocrines, pour mieux comprendre la mise en place du mécanisme de résistance et le devenir de l'acide borique

Abstract

Cockroaches are pathogens and are also responsible for a deterioration of sanitary conditions. In Algeria, *Blattella germanica* most widespread species is a pest to the urban environment and human health. Several conventional insecticides were used to control their infestations. However, their use has developed in populations of cockroaches resistance. Boric acid inorganic compound, slightly harmful to the environment, was used in the control of cockroaches for several years but its mode of action remains unknown. This study includes:

A biochemical study was performed in order to assess the effect of the acid on glutathione levels and different biomarkers (acetylcholinesterase and glutathione S-transferase) Boric acid was administered by injection to adult *B. germanica* newly exuviae at different doses (LD50 = 77.62 g / insect LD90 = 194.98 g / insect) after an exposure time ranging from 1 to 5 days. The extraction and determination of acetylcholinesterase was performed according to the method of Ellman et al, (1961); glutathione was extracted and assayed according to the method Weckberker & Cory (1988) and finally the glutathione S-transferase was assayed according to the technique of Habig et al (1974)

The results show that boric acid causes depending on the dose and age, a significant increase of glutathione (GSH) and a highly significant increase in the specific activity of glutathione-S-transferase (GST. However there was a significant decrease in the activity of acetylcholinesterase (AChE) for both doses and all ages

A histological study of the various fragments of the digestive tract of *B. germanica* aged 3 days was performed according to the technique and Martoja Martoja (1967), after microdissection under binocular different parts of the digestive tract (foregut, midgut and hindgut) were fixed in Bouin's alcoholic, dehydrated in an alcohol bath 95 ° and bath butanol. Parts after impregnation and inclusion in paraffin, are cut into cut 7µm thick with a microtome. Sections stained with Masson's trichrome, observed by light microscopy showed that the boric acid LD90 affects the structure of the intestinal epithelium of the foregut and midgut. Indeed, the epithelial cells are disorganized, the intra cellular spaces are important.

Keywords: *B.germanica*, Boric acid, injection, Structure of the intestine, Biomarkers.

Résumé

Les blattes sont des agents pathogènes et sont également responsables d'une détérioration des conditions d'hygiène. En Algérie, *Blattella germanica* espèce la plus répandue, est un insecte nuisible pour l'environnement urbain et la santé humaine. Plusieurs insecticides conventionnels ont été utilisés pour contrôler leurs infestations. Cependant, leur utilisation a développé au sein des populations des blattes une résistance. L'acide borique composé inorganique, peu nocif pour l'environnement, a été utilisé dans le contrôle des blattes depuis plusieurs années mais son mode d'action reste inconnu. Cette étude comporte :

Une étude biochimique a été effectuée pour permettre d'évaluer l'effet de cet acide sur le taux du glutathion et les différents biomarqueurs (acétylcholinestérase et la glutathion-S-transférase)

L'acide borique a été administré par injection aux adultes de *B. germanica* nouvellement exuviés à différentes doses (DL50 = 77,62µg /insecte, DL90=194,98µg/insecte) après un temps d'exposition variant de 1 à 5 jours. L'extraction et le dosage de l'acétylcholinestérase a été réalisé selon la méthode d'Ellman *et al*, (1961) ; le glutathion a été extrait et dosé selon la méthode de Weckberker & Cory (1988) et enfin la glutathion-S-transférase a été dosée selon la technique de Habig *et al*, (1974).

Les résultats montrent que l'acide borique provoque en fonction de la dose et de l'âge, une augmentation significative du taux du glutathion (GSH) et une augmentation hautement significative de l'activité spécifique de la glutathion-S-transférase (GST). Cependant on note une diminution significative de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) pour les deux doses et tous les âges

Une étude histologique des différents fragments du tube digestif de *B. germanica* âgés de 3 jours a été réalisée selon la technique de Martoja et Martoja (1967), après microdissection sous binoculaire les différentes parties du tube digestif (intestin antérieur, moyen et postérieur) sont fixés dans le Bouin alcoolique, déshydratés dans un bain d'alcool 95° puis un bain de butanol. Les pièces, après imprégnation et inclusion à la paraffine, sont débitées en coupe de 7µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Les coupes colorées au trichrome de Masson, observées au microscope photonique montrent que l'acide borique à la DL90 affecte la structure de l'épithélium intestinal de l'intestin antérieur et de l'intestin

moyen. En effet, les cellules épithéliales sont désorganisées, les espaces intra cellulaires sont importants.

Mots clés : *B.germanica*, Acide borique, injection, Structure de l'intestin, Biomarqueurs.

ملخص

الصراصير هي مسببات الأمراض، كما أنها مسؤولة عن تدهور الأوضاع الصحية. في الجزائر، *Blattella germanica* الأنواع الأكثر انتشارا هو آفة على البيئة وصحة الإنسان في المناطق الحضرية. واستخدمت المبيدات الحشرية التقليدية للسيطرة على تفشي العديد بهم. ومع ذلك، يسبب استخدامها المقاومة من الصراصير. تم استخدام مركب غير عضوي حمض البوريك، في السيطرة على الصراصير لعدة سنوات ولكن وضع عملها ما زال مجهولا. هذه الدراسة تشمل ما يلي:

دراسة الكيمياء الحيوية وأجري من أجل تقييم تأثير الحمض على مستويات الجلوتاثيون والمؤشرات الحيوية المختلفة (أستيل والجلوتاثيون-S-ترانسفيراز).

كانت تدار عن طريق الحقن حمض البوريك إلى الكبار الجرمانى سلخ حديثا في جرعات مختلفة (DL50=62,77 مغ / الحشرات و LD90 =194.98 مغ/ الحشرات) بعد وقت التعرض تتراوح بين 1 إلى 5 أيام. تم إجراء استخراج وتحديد أستيل وفقا لطريقة Ellman وآخرون، (1961)؛ تم استخراج الجلوتاثيون ويعاير وفقا لطريقة Weckberker وكوري (1988) وأخيرا الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز ويعاير وفقا لأسلوب Habig وآخرون (1974).

فقد بينت النتائج أن حمض البوريك يسبب اعتمادا على الجرعة والعمر، زيادة كبيرة من الجلوتاثيون (GSH) وزيادة كبيرة للغاية في نشاط معين من الجلوتاثيون-S-ترانسفيراز GST. ومع ذلك كان هناك انخفاض ملحوظ في نشاط أستيل (أستيلكولينستراز) لكل من الجرعات وجميع الأعمار.

دراسة نسيجية للشظايا مختلفة من الجهاز الهضمي من الجرمانى الذين تتراوح أعمارهم بين 3 أيام وفقا لأسلوب Martoja et Martoja (1967)، بعد تسليخ مجهرى تحت مجهر أجزاء مختلفة من الجهاز الهضمي (المعى الأمامي، المعى المتوسط والمعى المؤخر) تم إصلاحها في بويين المجففة، والكحولية في حمام الكحول 95 درجة و حمام بيوتانول. يتم قطع أجزاء بعد التبييض وإدراجها في البارافين، في قطع سميكة 7µm مع مشراح. أظهرت مقاطع ملطخة ماسون ثلاثي الألوان، والتي لاحظها المجهر الضوئي أن حمض البوريك (DL90) يؤثر على هيكل ظهارة الأمعاء من المعى الأمامي والمعى المتوسط. في الواقع، غير منظمة في الخلايا الظهارية، والمساحات داخل الخلوية.

كلمات البحث: *B.germanica*، حمض البوريك، والحقن، وهيكل الأمعاء، العلامات الحيوية.

- Appel A. G., 1990. Laboratory and field performance of consumer bait products for German cockroaches (*Dictyoptera : Blattellidae*) *Control. J. Entomol.*, **83**(1): 153-159.
- Aribi N., Smagghe G., Lakbar S., Soltani-Mazouni N. & Soltani N., 2006. Effects of pyriproxyfen, a juvenile hormone analog, on development of the mealworm *Tenebrio molitor*. *Pest. Biochem. Physiol.*, **84**: 55-62.
- Aribi N., Quennedy A., Soltani N., Delbecq J.P., 1999. L'initiation de la métamorphose chez *Zophobas atratus* (Coléoptera : Tenebrionidae): effets des ligatures et des régulateurs de croissance. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, **35**(Suppl): 59-64.
- Bell R.A., 1996, Manipulation of diapause in the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) by application of KK-42 and precocious chilling of eggs. *J. Insect Physiol.*, **42**(6): 557-563.
- Blanc N., 1996. La nature dans la cite. Thèse (dir. N. Mathieu), *Uni. Paris.I.SL* chez l'auteur, 400.
- Bouvier J. C., Boivin T., Beslay D. & Sauphanor B., 2002. Age-dependent response to insecticides and enzymatic variation in susceptible and resistant codling moth larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **51**: 55-66.
- Bull D. L., & Patterson R. S., 1993. Characterization of pyrethroid resistance in a strain of the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.*, **86**: 20-25.
- Canesi L., Ciacci C., Piccoli G., Stocchi V., Viarengo A. & Gallo G., 1998. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp. Biochem. Physiol.*, **120**: 261-268.
- Casey.M.,Sherry.R.,2010.Improving the catalytic activity of hyperthermophilic *Pyrococcus* prolidases for detoxification of organophosphorus nerve agents over a broad range of temperatures,**87**:315-326.
- Cassier P., Lafont R., Descamps M., Porchet M. & Soyez D., 1997. La reproduction des invertébrés: stratégies, modalités et régulation. *Edition Masson*, 354.

- Charpentier A., Menozzi P., Marcel V., Villatte F. & Fournier D., 2000. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Analytical Biochemistry.*, **285**: 76-81.
- Cornwell P.B., 1968. The cockroach, Vol I. *A laboratory insect and an industrial pest.* 116p.
- Cornwell P.B., 1976. The cockroach, Vol II. Insecticides and cockroach control. *St Martins Press. Newyork*, 140p.
- Dhadialla T. S., Retnakaran A. & Smagghe G., 2005 Insect growth- and development-disturbing insecticides, *in*: L.I. Gilbert, K. Latrou, S.S. Gill (Ed), *Compreh. Mol. Insect S, Elsevier- Pergamon, Oxford, UK*, **vol. 6**, PP. 55-115.
- Dhadialla T.S., Carlson C.R. & Le D. F., 1998. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.*, **43**: 545-569.
- Dong K., Valles S. M., Schart M. E., Zeichner B. & Bennett G.W., 1998. Knockdown resistance (Kdr) mutation in pyrethroid-resistant German cockroaches. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **60**: 195-200.
- Drardja-Beldi, H., & Soltani, N. (2001). Laboratory evaluation of dimilin on growth and glutathion activity in mosquito fish, and target species. *Comm. Agri. Appl. Bio. Sci.*, **68(4a)**, 299-305.
- Ebeling W., 1978. Urban Entomology. *University of California Division of Agricultural Science. Berkeley.*
- Elie M. P., 1998. Blattes: Une vie cachée. *Magazine Québec science.* 40p.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology and Physiology.*, **38**, 84-90.
- Fabre R., 1954. Toxicité des produits insecticides, annales des épiphyties, **p.** 177.

- Fort D. G., Stover E. L., Bantle J. A., Dumont J. N. & Finch R., 2000. Evaluation of a reproductive toxicology assay using *Xenopus laevis*: boric acid, cadmium and ethylene glycol monomethyl ether. *J. App. Toxicology.*, **21**: 41-52.

- Fulton M. H. & key P. B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxic and Chemistery.*, **20(1)**: 37-45.

- Gadenne C., Grenier S., Plantevin G. & Mauchamp B., 1990. Effects of juvenile hormone mimetic, Fenoxycarb, on post-embryonic development of the European corn borer. **77(4)**: 963-1032.

- Gagne F., Pardos M. & Blaise C, 1999. Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**: 723-730.

- Garfield E., 1990. The cockroach connection. Ancient, seemingly indestructible *Pest. Part 2. Population contol. Current comments.*, **46**: 5-13.

- Gordon D. G., 1996. The compleat cockroach: a comprehensive guide to the most despised and Least Understood. Creature on Earth. *Ten speed pressm Berkely.* **178p**.

- Gore J. C. & Schal C., 2004. Laboratory evaluation of boric acid- Sugar solution as based for management of German Cockroach infestatious. *J. Econ. Entomol.*, **97(2)**: 581-587.

- Grandcolas P., 1998. Les blattes. Organisation mondiale de la santé. Bureau régional de l'Europe. **24 p**.

- Guedes R. N. C., Zbu K. Y., Kambhampti S. & Dover B. A., 1997. An altered acetylcholinesterase conferring negative cross insensitivity to different insecticidal inhibitors in organophosphate-resistant lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica*. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, **58**: 55-62.

- Guthrie D. M. & Tindall A. R., 1968. The biology of the cockroach. London: Edward Arnold. 408 p.
- Habes D., Kilani-Morakchi S., Aribi N., Farine J.P. & Soltani N., 2006. Boric acid toxicity of the German cockroach, *Blattella germanica*: Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activity. *Pestic. Biochem. Physiol.* **84** : 17-24.
- Habig W. H., Pabst M.J. & Jakoby W. B., 1974. Glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.* **249** : 7130.
- Hasche J. J. & Zumofen M., 1999. Notions d'hygiène hospitalière. **pp 210**.
- Haubruge E. & Amichot M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 2(3): 161-174.
- Hemingway J., Small G. J. & Monro A. G., 1993. Possible mechanisms of organophosphorus and carbamates insecticide resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) from different geographical areas. *J. Econ. Entomol*, **86**: 1623-1630.
- Ishaaya I., 1990. Benzoylphenyl-urea and other selective control agent, mechanism and application. *In: Cassida J.E. (Ed). Pesticide and alternatives*, **pp. 365-376**. Elsevier Sciences, Amsterdam.
- Ishaaya L., 2001. Biochemical sites of insecticide action and resistance. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*, **pp. 293-321**.
- Jebali.J.,Bnni.M.,Gurbej.H.,Boussetta.H.,2006.Effects of malathion and cadmium on acétylcholinestérase activity and mallathionein levels in the fish *Seriola dumerilli*,**32**:93-98.
- Jensen S. E., 1998. Acetylcholinesterase activity associated with methiocarb resistance in a stain of western flower thrips, *Frankliniella accidentalis* (pergande). *Pesticide biochemistry and physiology.*, **61**: 191-200.

- Kaakeh W. Bennett G. W., 1997. Evaluation of trapping and vacuuming compared with low impact insecticide tractics for managing German cockroaches in residences. *J. Econ. Emomol.*, **90(4)**: 976-982.

- Kimberley.S.,Beltran.,Glorina.N.,2009.Acétylcholinesterase activity in *Corbicula fluminea* Mull.,as biomarker of organophosphate pesticide pollution in Pinacanan River :Philippine,**165**:331-340.

- Koehler P. G. & Patterson R. S., 1987. The Asian roach invasion. *Natur. Hist*, **96(11)**: 28 -35.

- Kun Yan Zhu.,Marry.L.,Troy.D.,2007.Sublethal effects of three pesticides of selected target and detoxification enzymes in the aquatic Midge,*Chironomus tentans.*,**51**:360-366.

- Lee K. Y. & Denlinger D., L., 1997. A role for ecdysteroids in the induction and maintenance of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Insect. Physiol.*, **43** (3): 289 – 296.

- Machreki Adjemi.M.,Ketata.I.,Ladhar-Chabouni.R.,Hamza-Chaffai.A.,2007.The effect of in situ cadmium contamination on some biomarkers on *Cerastoderma glaucum*,**17**:1-11.

- Maiza A., 2004. Activité insecticide de deux compoés (Benfuracarbe, Acétamipride) chez *Blattella germanica*: Biométrie et biochimie des ovaries et activités enzymatiques (AchE, LDH). Thèse de Magistère. *Université d'Annaba. Algérie*. 180 p.

- Maiza A., Kilani-Morakchi S., Farine J.P., Smagghe G., Aribi N., Soltani N., 2004. Hormone analogue methoprene and carbamate benfurcarb. *Comm. Appl. Biol. Ghent University*. **69/3**. 257.

- Mary O. & Amdur., 2000. Casarett and Doull's toxicology. The basic Science of poisons, *Pergamon Press. Inc. History of Agriculture*.

- Messiad R., 2006. Effets d'un régulateur de croissance, l'azadirachtine chez *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae): Physiologie, Activités enzymatiques et comparaison de la détoxification avec d'autres groupes de pesticides. Thèse de Magistère. *Université d'Annaba. Algérie*, P 94.
- Mindykowski B., Jaenick E., Tenzer S., Cirak S., Schweikardt T., Schild H., et Decker H., 2010. Cockroach allergens Per a 3 are oligomers. *Dev. Comp. Immunol.*, **34**(7): 99-722.
- Morakchi S., Maiza A., Farine J. P., Aribi N. & Soltani N., 2005. Effects of a neonicotinoid insecticide (acetamipride) on acetylcholinesterase activity and cuticular hydrocarbons profil in german cockroache. *Comm. Appl. Biol. Sci, University*, 70/4.
- Mullins L., 1955. Structure et toxicité des isomers du HCH, *Sciences*, p 118.
Ostrinia nubilalis Hbs., Experientia., **46**: 744-745.
- Peden D. & Reed C.E., 2010. Enviromental and occupational allergies. *J.Allergy.Clin Immunol.*, 125 (2 suppl 2): S60-150.
- Reddy G.R., Madhusudhana L., Shafeek A. & Chetty C.S., 2001. Azadirachtin and cypermethrin induced alteration in electrophysiological properties of sensory an interneurons in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **67**: 828-833.
- Reid B. L., Bennett G. W. & Barcay S. J., 1990. Topical and oral toxicity of sulfuramid on delayed action insecticide, against the German cockroach (*Dictyoptera: Blattellidae*). *J. Econ. Entomol.*, **83**: 148 – 152.
- Ribeiro S., Guilbermino L., Sousa J. P. & Soares A. M., 1999. Novel Bioassay based on acetylcholesterase and lactate dehydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicology and Environmental Safet.*, **44**: 287-293.
- Rivault C., Cloaree A. & Le Guyader A., 1993. Bacterial contamination of food by Cockroaches. *J. Environ. Health.*, **55**: 21-22.

- Rivault C., Cloarec A., Mathieu N. & Blanc N., 1995. Les Blattes en milieu urbain. Rapport. Ministère de l'environnement, *Programme Ecologie Urbain*, n°93070, 101p.
- Ross M. H., Bret B. L. & Keil C. B., 1984. Population growth and behavior of *Blattella germanica* (Orthoptera: Blattellidae) in experimentally established shipboard infestations. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **77**: 740 – 752.
- Rouibi A., 2002. Evaluation d'un mimétique des ecdystéroïdes (RH-0345) sur *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae): Aspects morphométriques et biochimiques. Thèse de Magister en Biologie Animale. *Université d'Annaba. Algérie*.
- Rust M. K. & Reiersen D. A., 1991. Chlorpyrifos Resistance in German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) from restaurants. *Econ. Entomol.*, **84**: 736.
- Rust M. K., Owens J. M. & Reiersen D. A., 1995. Understanding and Controlling the German Cockroach. *New York Oxford. Oxford University Press.*, p 265.
- Saglio P., Trlisse S. & Azam D., 1996. Behavioral effects of waterborne carbofenuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**: 232-238.
- Saxena Anju., Saxena Anjali., 2011. Bioaccumulation and glutathione mediated detoxification of copper and cadmium in *Sphagnum squarrosum* Crome Samml.011-2246-9.
- Sheehan W.J., Rangsitienchai P.A., Wood R.A., Rivard D., Chinratanapist S., Perzanowski M.S., Chew J.M., Seltzer J.M., Matsui E.C., Phipatanakul W., 2010. Post and allergen exposure and abatement in inner-city asthma : a work group report of the American Academy of Allergy, immunology indoor allergy/Air pollution Committee. *J.Allergy .Clin.Immunol*, **125(3)**: 81-575.
- Siegfried B. D. & Scott J. G., 1991. Mechanisms responsible for propoxur resistance in German cockroach, *Blattella germanica* (L.). *Pestic. Set.*, **33**: 133-138.

- Siegfried B. D. & Scharf M. E., 2001. Mechanisms of organophosphate resistance in insects. Departement of Entomology, 202 Plant Industry Bldg, *University of Nebraska. Lincoln ME, USA*. **PP**: 269-291.
- Sifi K., 2002. Evaluation de l'effet d'un xénobiotique, l'acide borique sur la structure du tube digestif, l'inhibition d'un site cible, l'acétylcholinestérase et l'activité d'une enzyme de détoxification, la lactate dehydrogenase chez *Blattella germanica*. Thèse de Magister en Biologie Animale. *Université d'Annaba*.
- Smagge G., Vinuela E., Van Limbergen H., Budia F. & Tirry L., 1999c. Nonsteroidal moulting hormone agonists: effects on protein synthesis and cuticle formation in Colorado potato beetle. *Entomol. Exp. Appl.*, **93**: 1-8.
- Soltani- Mazouni N., Taibi F., Berghiche H., Smagge G. & Soltani N., 2001. RH- 0345 restored partly the effects induced by KK- 42 on reproductive event in Mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **66/2a**: 437 –444.
- Soltani- Mazouni N., Taibi F., Berghiche H., Smagge G. & Soltani N., 2001. RH- 0345 restored partly the effects induced by KK- 42 on reproductive event in Mealworms. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, **66/2a**: 437 –444.
- Soltani N., Aribi N., Berghiche H., Lakbar C. & Smagge G., 2002. Activity of RH-0345 on ecdysteroid production and cuticle secretion in *Tenebrio molitor* pupa *in vivo* and *in vitro*. *Pesti. Biochem and Phsiol.*, **72**: 83-90.
- Strange K. & Klungsoyr J., 1997. Organochlorine contaminants in fish and polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Barents sea. *ICES J. Mar. Sci.*, **54**: 318-332.
- Strong C. A., Koehler P. G. & Patterson R. S., 2000. Oral toxicity and repellency of borates to German cockroach (Dictyoptera : Blattellidae). *Journal of Economic Entomology.*, **86(5)**: 1458-1463.

- Sun, CN., Huang, SY., Hu, NT., & Chungn WY. (2001). Glutathione S-transferase and insect resistance to insecticides. In: Isaac Isshaaya, editor. Biochemical sites of insecticide action and resistance. *Berlin, Heidelberg:Spring-Verlag.*, 239-254.
- Tanaka A., 1976. Stages in the embryonic development of the German cockroach. *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Kontyn (Tokyo).*, **44**: 512-225.
- Teles M., Pacheco M. & Santos M. A., 2003. *Anguilla anguilla*, liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicol Environ. Safety.*, **55(1)**: 98-107.
- Thomas, D.J., & Judes, M.J. (1992). Influence of lead on the glutathione status of the Atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology.*, **23**, 11-30.
- Tokuda G., Lo N., Takase A., Yamada A., Hayashi Y., Watanabe H., 2008. Purification and partial genome characterization of the bacterial endosymbiont *Blattabacterium cuenoti* from the fat bodies of cockroaches. *Bmc. Res. Notes*, **1**: 1-9.
- Valles S. M., 1999. Stage dependent bendiocarb tolerance in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *J. Econ. Entomol.*, **33**: 313-315.
- Valles S. M., Dong K. & Brenner R. J., 2000. Mechanisms responsible for cypermethrin resistance in a strain of German cockroach, *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **66**: 195-205.
- Vlaykova T, Gulubova M, Vlaykova D, Cirovski G, Yovchev Y, Julianov A., 2008. Expression of the xenobiotic- and reactive oxygen species-detoxifying enzymes, GST-pi, Cu/Zn-SOD and Mn-SOD in primary hepatocellular carcinoma. *Trakia J Sci.*, **6**:14–21.
- Wattiez C. & Beys B., 1999. Pas de pesticides à la maison solution sans danger pour le contrôle de Bestioles indésirables. *Pest. Action. Network (Pan) Belgium. Yip.*

- Weckberker, G., & Cory, G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia 1210 cells *in vitro*. *Cancer Letters.*, **40**, 257-264.
- Wigglesworth V. B., 1972. The principles of insect physiology. Seventh Edition. Chapman and Hall 827 p.
- Winteringham F., 1952. Quelques aspects biochimiques des insecticides. *Sciences*, **p** 140.
- Yang Y., Wu Y., Chen S., Devine G.J., Denholm I., Jewess P. & Moores G.D., 2004. The involvement of microsomal oxidases in pyrethroid resistance in *Helicoverpa amigera* from Asia. *Insect. Bioch. Molecul. Biol.*, **34**: 763-773.
- Yu S. J., Nguten S. N., Abd- Elghar G. E., 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pest. Biochem. Physiol.*, **77**: 1-11.
- Zinkl J.G., Lockhart W.L., Kenny S.A. & Ward F. J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. *In " Chemical in Agriculture" (P. Mineau, Ed), Vol. 2: 233-253.*