



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique
Université de Blida 1

Retirer le filigrane maintenant

Faculté des Sciences de la Nature et de la vie
Département de Biologie des populations et des organismes

Mémoire de Fin d'Etudes

En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master en Sciences
Biologiques
Option : Parasitologie

Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé.

Thème

**Evaluation de la toxicité de l'huile essentielle
formulée du romarin et du champignon *Metarhizium
anisopliae* à l'égard du moustique tigre *Aedes
albopictus* (skuse, 1894)
(Diptera : Culicidae)**

Soutenues : Le 30 / 06 / 2018

Présenté par :

-Mlle BENDJAFAR Nawel

-Mlle BOUGUERNOUT Djazia

Membres du jury :

Présidente : Mme MAKHLOUF C.

MAA/USDB1

Examinatrice : Mme KARA F/Z.

PR/USDB1

Promotrice : Mme SAIGHI H.

MAA/USDB1

Co-Promotrice : Mme BENBETKA S.

Chargé d'étude IPA

2017-2018

Résumé :

Des essais de toxicité utilisant l'huile essentielle formulée du romarin à 10% et du champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* ont été conduits au laboratoire sur les stades larvaires (L3 et L4) et le stade adulte du moustique tigre, *Aedes albopictus* vecteur de nombreuses arboviroses, récolté de la région d'Oran (Algérie). Ces tests préliminaires effectués selon une méthodologie inspirée du protocole standards OMS, ont révélé l'évolution significative de la mortalité en fonction du temps et des doses ($p < 0.05$) pour les deux biopesticides. Le stade adulte est le plus vulnérable à *M. anisopliae* que les stades larvaires avec des DL_{90} de 9 g/l et 29,56 g/l respectivement. L'huile essentielle du romarin formulée possède de remarquables propriétés larvicides, elle induit 100% de mortalité 72 heures après traitement à la concentration de 0,75g/l.

Mots clés : *Aedes albopictus*, Huile essentielle formulée, Romarin, *Metarhizium anisopliae*, test de toxicité, Larves et adultes.



Abstract :

Toxicity tests using the essential oil formulated with 10% rosemary and the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* were conducted in the laboratory on the larval stages (L3 and L4) and the adult stage of the tiger mosquito, *Aedes albopictus* vector of many arboviroses, harvested from the region of Oran (Algeria). These preliminary tests, carried out according to a methodology inspired by the WHO standard protocol, revealed the significant evolution of the mortality as a function of time and doses ($p < 0.05$) for the two pesticide bios. The adult stage is the most vulnerable to *M. anisopliae* than the larval stages with LD90s of 9 g/l and 29.56 g/l respectively. Formulated rosemary essential oil has remarkable larvicidal properties, it induces 100% mortality 72 hours after treatment at a concentration of 0.75 g/l.

Key words: *Aedes albopictus*, Formulated essential oil, Rosemary, *Metarhizium anisopliae*, Toxicity test, Larvae and adults.



ملخص:

اختبارات السمية باستخدام الزيوت الأساسية مصنوعة من إكليل الجبل إلى 10٪ والفطر الممرض *Metarhizium anisopliae*، أجريت في المختبر على راحل اليرقات (L3 و L4) ورحلة الكبار من بعوضة النمر، إقالات العديد من الفيروسات، م حصادها من منطقة وهران (الجزائر). هذه الاختبارات الأولية باستخدام نهجية ستوحاة من بروكول قياسي منظمة الصحة العالمية، أهدت تغييرات كبيرة في معدل الوفيات مع مرور الوقت والجرعة ($P > 0.05$) للمبيدات العضوية المستخدمة. رحلة البلوغ هي الأكثر عرضة لـ *Metarhizium anisopliae* من راحل اليرقات مع LD90 من 9 جم / لتر و 29.56 جم / لتر على التوالي. النتائج الأكثر أهمية هي اختبار زيت إكليل الجبل المستخلص التي تمت بإغتها، وهو معدل الوفيات 100 ٪ لدى اليرقات بأعلى جرعة بعد 72 ساعة من العلاج.

كلمات مفتاحية:

اليرقات ، البعوض البالغ ، *Metarhizium anisopliae* ، زيت أساسي ركب ، إكليل الجبل ، *Aedes albopictus* ، سمية



Remerciements

Tout d'abord, nous remercions **Dieu**, notre créateur de nous avoir donné la force, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous tenons à remercier sincèrement **Mme Makhlouf** d'avoir accepté de présider notre jury. Et **Mme kara** d'avoir examiné ce travail et d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Nous voudrions adresser toute notre gratitude à notre promotrice **Mme Saighi H.**, Maître assistante A à l'université Saad Dahleb Blida, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Nos remerciements s'étendent également à **Mme Benbtka S.**, Biologiste, à l'Institut Pasteur d'Algérie. Pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche et sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce modeste travail.

Nous remercions tout particulièrement **Mr Djazouli**, professeur à la faculté de l'université BLIDA-1, pour son aide.

Nous remercions toute l'équipe du Laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations Institut Pasteur d'Algérie.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, nous remercions tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.



Dédicace

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Je dédie ce modeste travail à mon grand-père Laid, pour sa présence à mes cotes et son soutien tout au long de ma vie, pour m'avoir donné des leçons de courage jusqu'au dernier souffle.

À mes très chers parents, Chaouki et Malika, et mes grands-parents qui ont toujours été là pour moi.

À mes frères Riad, Halim et Hamza, et ma sœur Maroua, pour leur encouragement. À très spécialement mes tantes, mes oncles et mes cousines qui ont toujours été là pour moi.

Je tiens à remercier ma binôme Djazia et mes copines, pour leur amitié, leur soutien inconditionnel et leur encouragement.

Enfin, je remercie tous mes Ami(e)s, mes collègues et les membres de NSC (Natural Sciences Club) Pour leur sincère amitié et confiance, et à qui je dois ma reconnaissance et mon attachement.

Nawel

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et m'ont encouragés dans mes études, leurs soutiens dans les moments d'euphorie comme dans les moments de quiétude. Que dieu les bénissent et leur accorde une longue vie pleine de satisfaction.

Sans pour autant oublier mes grands parents pour leurs encouragements, leurs soutiens et leurs conseils. Que dieu leur accorde une longue vie.

Mes sœurs **Chahinez, Imene, Mounira** de m'avoir écouté aussi patiemment.

Ainsi que, mon binôme **Nawel** que je remercie pour **sa compétence et son perfectionnement** dans le travail et ses encouragements et patience.

Mes cousines, toute ma famille, tous mes amies et tout ceux qui ont participé et m'ont encouragé de près ou de loin.

Djazia

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 1	Les œufs d' <i>Aedes albopictus</i> .	02
Figure 2	Larve d' <i>Aedes albopictus</i> .	03
Figure 3	Nymphe d' <i>Aedes albopictus</i>	03
Figure 4	Morphologie d'un adulte d' <i>Aedes albopictus</i> .	04
Figure 5	Cycle biologique d' <i>Aedes albopictus</i> .	05
Figure 6	Répartition mondiale d' <i>Aedes albopictus</i> .	06
Figure 7	Localisations d' <i>Aedes albopictus</i> en Algérie.	07
Figure 8	(A): Coupe transversale de la feuille de <i>Rosmarinus eriocalyx</i> mettant en évidence un poil glandulaire (PG) (Gr : X 160). (B) : coupe transversale de la feuille de <i>R.eriocalyx</i> mettant en évidence les poils técteurs (PT) et sécréteur (PS) (Gr : X 160)	13
Figure 9	conidies de <i>M. anisopliae</i> .	16
Figure 10	Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes.	17
Figure 11	Insectarium de l'Institut Pasteur d'Algérie, Annexe - sidi Fredj.	20
Figure 12	Gorgement des femelles sur la souris.	20
Figure 13	Ponte des œufs.	20
Figure 14	Œufs d' <i>Aedes albopictus</i> sous loupe binoculaire.	21
Figure 15	Larves d' <i>Aedes albopictus</i> dans les bacs d'élevage.	21
Figure 16	Préparation des doses de l'huile essentielle formulée.	22
Figure 17	Dispositif expérimentale du test de toxicité.	22
Figure 18	Imprégnation du papier filtre par l'huile essentielle formulée du romarin.	23
Figure 19	Les tubes de l'OMS pour tester la sensibilité des moustiques adultes.	23
Figure 20	Doses de <i>Metarhizium anisopliae</i> .	24
Figure 21	Dispositif expérimentale du test de toxicité sur les larves.	24
Figure 22	Vue microscopique d'éclosion d'œuf d' <i>Aedes albopictus</i> .	25
Figure 23	Les stades larvaires d' <i>Aedes albopictus</i> .	25
Figure 24	Emergence d'un adulte d' <i>Aedes albopictus</i> .	26
Figure 25	Adultes (mâle et femelle) d' <i>Aedes albopictus</i> sous loupe binoculaire (G : 0,8x25)	26
Figure 26	Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des larves (L4) exposées à l'huile essentielle formulée du Romarin.	29
Figure 27	Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des adultes d' <i>Aedes albopictus</i> exposées à l'huile essentielle formulée du Romarin.	29
Figure 28	Droite de régression des doses d'huile essentielle formulée du Romarin en fonction de la mortalité des larves (L4) après 24H d'exposition.	31

Liste des figures

Figure 29	les droites des régressions de l'huile essentielle formulée du romarin dans le temps vis-à-vis des larves (L4) d' <i>Aedes albopictus</i> traitées par les différentes doses D1, D2 et D3.	32
Figure 30	Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des larves (L3 et L4) exposées au <i>Metarhizium anisopliae</i> .	34
Figure 31	Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des adultes exposées au <i>Metarhizium anisopliae</i> .	35
Figure 32	Droite de régression des doses de <i>Metarhizium anisopliae</i> en fonction de la mortalité des larves (L3 et L4) d' <i>Aedes albopictus</i> après 72H d'exposition.	36
Figure 33	Efficacité de <i>Metarhizium anisopliae</i> dans le temps vis-à-vis des larves (L3 et L4) d' <i>Aedes albopictus</i> traitées par les doses D1 et D4.	37
Figure 34	Droite de régression des doses de <i>Metarhizium anisopliae</i> en fonction de la mortalité des adultes d' <i>Aedes albopictus</i> après 24H d'exposition.	38

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Classification des moustiques adultes en individus vivants, « knocked down » ou morts.	27
Tableau 2	Logarithmes décimal des doses et les probits de mortalité.	30
Tableau 3	Equations des droites de régressions et valeurs des TL90 pour chaque dose de traitement utilisée	31
Tableau 4	Analyse de la variance	32
Tableau 5	Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).	33
Tableau 6	Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)	33
Tableau 7	Analyse de la variance	33
Tableau 8	Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).	34
Tableau 9	Logarithmes décimal des doses et les probits de mortalité.	36
Tableau 10	Equations des droites de régressions et valeurs des TL90 pour chaque dose de traitement utilisée	36
Tableau 11	Logarithmes décimaux des doses et les probits de mortalité.	37
Tableau 12	Analyse de la variance.	38
Tableau 13	Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).	39
Tableau 14	Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)	39
Tableau 15	Analyse de la variance	39
Tableau 16	Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).	40
Tableau 17	Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre en conditions contrôlés.	40

Liste des Annexes

Annexe 1 : équipements et produits utilisés au laboratoire.

Annexe 2 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles.

Annexe 3 : Fiche technique de GREEN MUSCLE.

Annexe 4 : Le kit de l'OMS (étude de la sensibilité des moustiques adultes).

Annexe 5 : Table des probits.



Liste des abréviations

- ❖ **Ae** : *Aedes*
- ❖ **CHIKV** : Le virus du Chikungunya
- ❖ **DF** : La Dengue
- ❖ **DENV** : Le virus de Dengue
- ❖ **ZIKV** : Le virus du Zika
- ❖ **TIS** : Technique de l'Insecte Stérile
- ❖ **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- ❖ **HE** : Huile Essentielle
- ❖ **HEF** : Huile essentielle formulée
- ❖ **R** : Répétition
- ❖ **ET** : Ecart type
- ❖ **DL 90** : Dose Létale qui tue 90% de la population.
- ❖ **TL 90** : Temps Létale qui tue 90% de la population.
- ❖ **ANOVA** : ANalyse Of VAriance.

Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1-Généralité sur <i>Aedes albopictus</i>	02
I.1.1- Position systématique	02
I.1.2.-Description morphologique	02
I.1.3.-Cycle de développement	05
I.1.4.-Répartition géographique	05
I.1.5. Habitats et nutrition	07
I.1.6. Nuisance et maladies	07
I.1.7. Moyens de luttés contre <i>Aedes albopictus</i>	08
I.2-les Huiles Essentielles	11
I.2.1-Définition	11
I.2.2-Méthodes d'extraction des huiles essentielles	11
I.2.3- Huile essentielle formulée	12
I.2.4- Huiles essentielles du romarin	12
I.3-Champignon Entomopathogène (<i>Metarhizium anisopliae</i>)	15
I.3.1.Généralités	15
I.3.2.Position taxonomique	15
I.3.3.Caractères morphologique de <i>Metarhizium anisopliae</i>	16
I.3.4.Modes d'infections.....	17
I.3.5.Solutions entomopathogènes	18
I.3.6. <i>Metarhizium anisopliae</i> dans le cadre de la lutte biologique.....	18
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
II.1.Objectif de l'étude	19
II.2.Matériel biologique	19
II.3.Matériel non biologique	19
II.4.Méthodes	19
II.4.1.L'élevage	19
II.4.2.Tests de toxicité	21
II.4.3.Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre	25
II.5.Méthodes d'exploitations des résultats	26

II.5.1.Mortalité observée	26
II.5.2.Evaluation de la DL90 et la TL90	27
II.5.3.Analyse statistique	28
Chapitre III : Résultats et discussion	
III.1.Toxicité de l'huile essentielle formulée du Romarin « <i>Rosmarinus officinalis</i> 10% » sur <i>Aedes albopictus</i>	29
III.1.1.-Evolution de la mortalité moyenne cumulée	29
III.1.2.Evaluation de la DL 90 et du TL 90 de l'HEF sur les larves <i>d'Aedes albopictus</i>	30
III.1.3.Analyse de la variance	32
III.2.Toxicité de <i>Metarhizium anisopliae</i> « Green muscle » sur <i>Aedes albopictus var. acridum</i> (souche IMI 330189).....	34
III.2.1.-Evolution de la mortalité moyenne cumulée	34
III.2.3.Evaluation de la DL 90 et du TL 90 de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les larves <i>d'Aedes albopictus</i>	36
III.2.4.Evaluation de la DL 90 de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les adultes <i>d'Aedes albopictus</i>	37
III.2.2.Analyse de la variance	38
III.3. Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre	40
Conclusion	41

Plusieurs espèces de moustiques (Diptera: Culicidae), appartenant notamment aux genres *Aedes*, *Culex* ou *Anopheles*, sont des vecteurs d'organismes pathogènes responsables de anthropozoonoses d'incidence médico-vétérinaire considérable (Bawin *et al.*, 2014). *Aedes albopictus* (skuse, 1894) ou « moustique tigre » est l'un des moustiques vecteurs de maladies les plus invasives et agressives dans le monde (Faraji *et al.*, 2014). Il est originaire d'Asie du sud-est et retrouvé aussi en Asie tempérée. Ce moustique a débuté sa phase d'expansion vers d'autres continents, l'Amérique, l'Afrique et l'Europe, en 2005, l'espèce est implantée dans au moins 20 pays, en particulier ceux du pourtour méditerranéen (Duvallet *et al.*, 2017). En Algérie, cette espèce a été signalé en 2011 à Tizi-Ouzou et en 2014 à Oran (Benallal *et al.*, 2016). Le succès de l'invasion d'*Ae albopictus* est lié aux caractéristiques de ses œufs. Ces derniers peuvent résister plusieurs mois à la dessiccation, permettant ainsi leur dispersion via le transport et le commerce international, De plus, en climat tempéré, les œufs peuvent opérer une dormance qui leur confère une résistance aux températures hivernales et permet un maintien des populations jusqu'au printemps suivant.

Cette espèce joue un rôle de vecteur biologique majeur, notamment d'arbovirus épidémiques (virus de la dengue, VDEN, du Chikungunya, VCHIK, et du Zika, VZIKA) (Duvallet *et al.*, 2017), La lutte contre ce moustique demeure la préoccupation de l'homme qui a voulu se protéger contre l'agression d'*Aedes albopictus*. Dans les campagnes de lutte anti vectorielle, les insecticides de synthèse constituent le seule moyen de lutte. Ces préparations, bien qu'elles soient très efficaces sur les moustiques, ils sont révélés très toxiques et leurs effets collatéraux sur les écosystèmes naturels restent inestimables vu leur large spectre d'action, souvent des organismes non cibles sont également affectés. S'ajoute aussi à ces inconvénients, le problème de développement de résistance aux insecticides chimiques, chez les insectes traités (Kemassi *et al.*, 2015). Pour ce faire, des solutions de substitution plus inoffensive pour l'homme et les animaux ont été adoptées parmi lesquelles la lutte biologique. Cette dernière se définit comme étant une procédure qui fait intervenir l'emploi d'organismes vivants ou de substances actives pour lutter contre d'autres organismes néfastes (Sellami *et al.*, 2015).

Afin d'encourager l'utilisation des bio pesticides dans la lutte biologique, notre étude a pour but principale l'étude de l'effet toxique de l'huile essentielle formulée du romarin et celle du champignon entomopathogène, *Metarhizium anisopliae* à l'égard du moustique tigre. Il est à noter que ces bios pesticides sont testés pour la première fois sur *Aedes albopictus* en Algérie.

Pour cela ce manuscrit comprend trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique traitant les généralités sur le moustique tigre, l'huile essentielle formulée du romarin et le champignon *Metarhizium anisopliae*, le deuxième chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisés lors du travail. Les résultats et leurs interprétations sont développés dans le troisième chapitre. Enfin nous terminerons ce travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus.

I.1-Généralité sur *Aedes albopictus* :

I.1.1- Position systématique :

Selon Skuse (1894), le moustique tigre *Aedes albopictus* est classé comme suit :

Phylum : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Diptera

Sous-ordre : Nematocera

Famille : Culicidae

Genre : *Aedes* (*Stegomyia*)

Espèce : *Aedes albopictus* (skuse, 1894)

I.1.2.-Description morphologique

I.1.2.1-Les œufs :

Les œufs d'*Aedes albopictus* sont de couleur noir, fusiforme, dépourvus de flotteurs latéraux et munis de petites saillies qui assurent leur stabilité sur le fond de l'eau (Lema, 2000). Ils sont entourés d'une épaisse coquille, dure et imperméable (figure 1). Les œufs peuvent résister à la dessiccation jusqu'à 6 mois (Hawley *et al.*, 1989), ces derniers peuvent opérer une dormance (diapause induite à l'automne par des variations de la photopériode) qui leur confère une résistance aux températures hivernales et permet un maintien des populations jusqu'au printemps suivant (Duvallet *et al.*, 2017).



Figure 1 : L'œuf d'*Aedes albopictus* (Original 2018).

I.1.2.2-Larve :

Les larves sont vermiformes et apodes (figure 2), elles se développent à travers quatre stades (aquatiques) avant la pupaison. Les larves utilisent un siphon respiratoire pour acquérir de l'oxygène et doivent périodiquement remonter à la surface pour le faire (Robert *et al.*, 1989). Elles se nourrissent des débris organiques et des micro-organismes (Rodhain, 1993).



Figure 2 : Larve d'*Aedes albopictus* (Original 2018).

I.1.2.3-Nymphe :

La nymphe est une pupe mobile, apode en forme de virgule. Elle est blanche, mais montre en peu de temps des changements de pigment (figure 3). Le stade nymphal est assez court et dure généralement de un à deux jours (Manorenjitha, 2006).



Figure 3 : Nymphe d'*Aedes albopictus* (Rios et Maruniak, 2004).

I.1.2.4-Adulte :

Le moustique tigre, *Aedes albopictus* présente un corps ponctué de taches blanches, des pattes rayées (Hawley, 1988), Il est reconnaissable par la présence d'une ligne médiane d'écailles blanche sur le thorax (Duvallet *et al.*, 2017) (figure 4). Le corps (de 5 à 10 mm) est subdivisé en trois parties distinctes (tête, thorax, et abdomen) recouvertes d'écailles qui aident à l'identification (Hawley, 1988).

-La tête est globuleuse et dégagée du thorax. Elle comporte une paire d'yeux très grands, réniformes et composés d'ommatidies. On retrouve une paire d'antennes implantées dans la région faciale (les antennes du mâle sont plumeuses, les antennes femelles sont glabres), les parties buccales du mâle sont modifiées pour l'alimentation du nectar.

-Le thorax est noir avec une bande blanche distinctive, il porte les ailes et les pattes, les pattes sont noires avec des écailles basales blanches sur chaque segment tarsien.

-L'abdomen est allongé et a une forme cylindrique. Il est constitué de dix segments distincts il porte l'appareil reproducteur (9^{ème} segment).



Figure 4 : spécimens d'*Aedes albopictus* (mâle et femelle) (Original 2018).

I.1.3.-Cycle de développement :

Comme pour toutes les espèces de moustiques, le cycle de vie d'*Aedes Albopictus* passe par plusieurs étapes, étape pré-imaginal comprend trois stades dépendants de l'eau (œuf, larve et pupa) et l'étape imaginaire ou le stade aérien (adulte). La durée de vie de chaque étape dépend de plusieurs facteurs, tels que la température, la disponibilité de l'eau, du support et de l'humidité. (Tran et al., 2013).

La femelle, après accouplement, stocke les spermatozoïdes dans sa spermathèque. Après un repas sanguin elle va pondre tous les 4 jours. (Valerio, 2010), Ces repas sanguins riches en protéines lui assurent la maturation des œufs. La femelle pond ses œufs de préférence à l'ombre, sur support sec, de couleur foncé et à proximité d'une collection d'eau en les dispersant habituellement en plusieurs endroits. La période de ponte s'étale du mois de mai à novembre, les œufs au nombre de 50 à 200 par oviposition, peuvent éclore en 48h dans les conditions normales (EID, 2011).

Après éclosion, les larves d'*Aedes albopictus* croissent pendant en moyenne 5 à 6 jours en passant par 4 stades larvaires. Une fois formé la nymphe donnera l'imago ou adulte après 24h à 48h heures. Ce dernier quitte le milieu aquatique et s'envole pour s'accoupler. (EID, 2011). Le développement aquatique peut durer environ 20 jours en fonction de la température et de l'humidité.

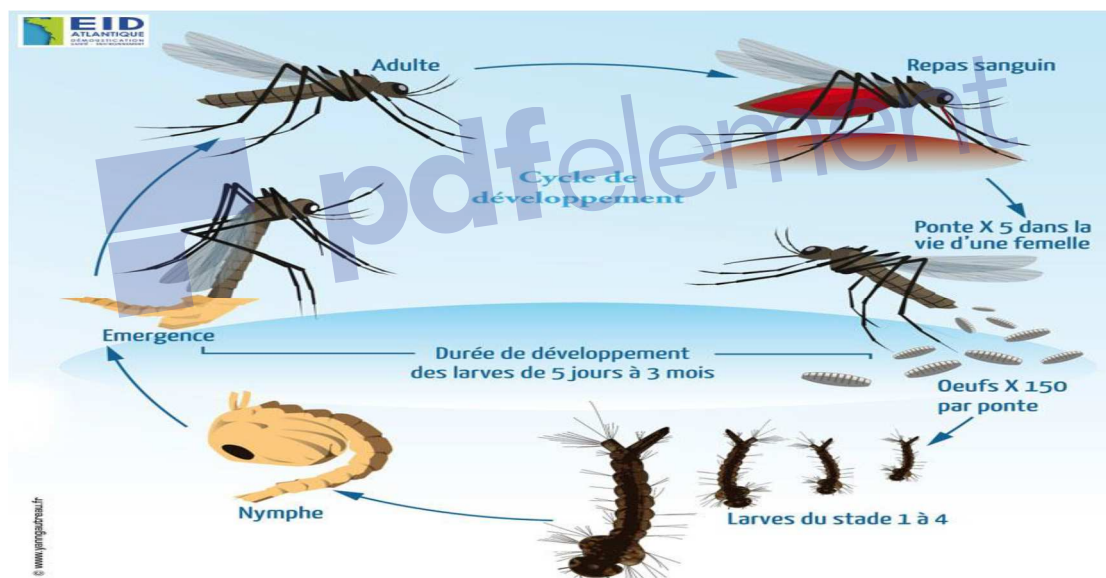


Figure 5 : Cycle biologique d'*Aedes albopictus* (EID Atlantique).

I.1.4.-Répartition géographique:

I.1.4.1-Dans le monde :

Aedes albopictus est originaire des forêts de l'Asie du Sud-Est. Cette espèce a été transportée dans le monde entier (le monde tropical, subtropical et tempéré) (figure 6), principalement par le commerce international des pneus usés (Reiter et Sprenger, 1987; Hawley, 1988).

Ae. albopictus s'est adapté pour survivre dans une plage de températures plus large et

à des températures plus froide, ce qui lui permet de persister dans des climats plus tempérés.

Ae. albopictus est largement répandu dans une zone allant du Pacifique à Madagascar et aux Seychelles dans l'océan Indien. Dans le nord, il a été trouvé à Beijing, en Chine, à Séoul, en Corée et à Sendai, au Japon (Huang, 1979). Dans les régions plus chaudes, on le retrouve dans la plus grande partie de la région de l'Asie du Sud-Est et à l'ouest jusqu'à Hawaï (Mitchell, 1995).

Il a été reporté la première fois en Europe dans sept localités d'Albanie (Adhami et Murati, 1987). Sa propagation serait due au commerce des plantes en provenance de Chine.

Ae. albopictus est présent sur presque tout le continent Américain allant des Etats-Unis jusqu'en Argentine. Le continent Africain n'est pas en reste, la colonisation de sa zone équatoriale se fait petit à petit. Après le Nigeria, le Cameroun, la Guinée Equatoriale et le Gabon (Paupy *et al.*, 2009), De même, cette dynamique de colonisation s'étend vers le nord du continent avec la présence du moustique sur le sol Algérien (Izri *et al.*, 2011).

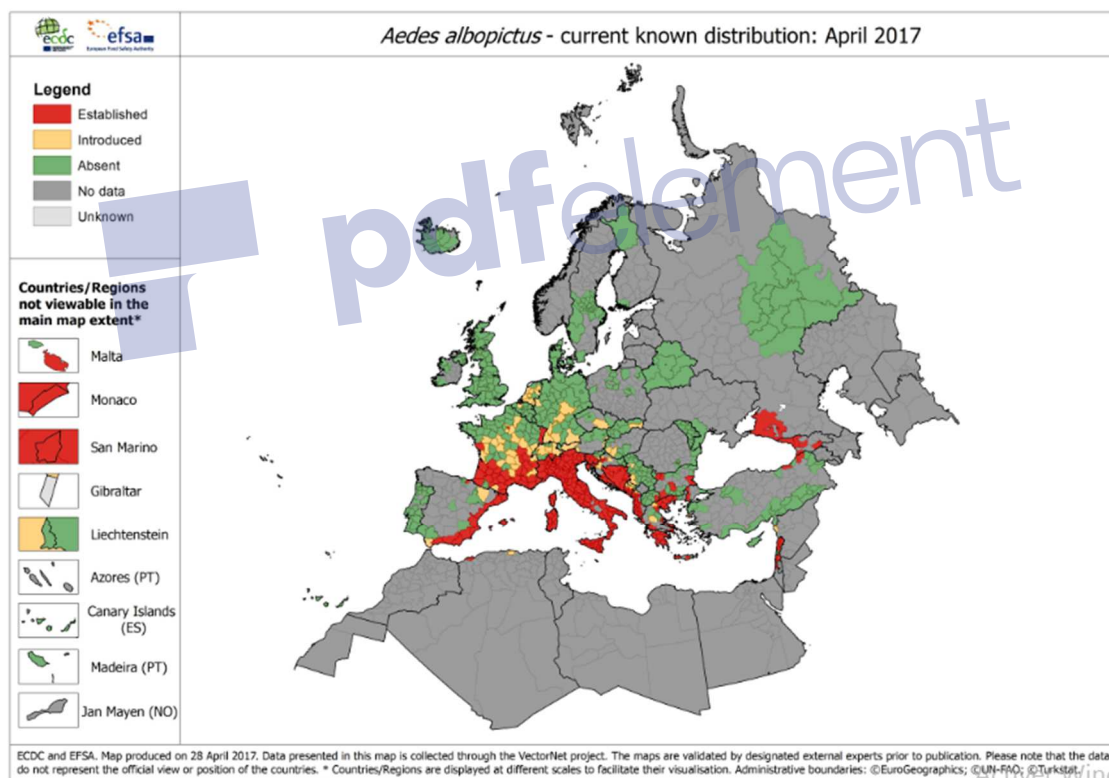


Figure 6 : Répartition mondiale d'*Aedes albopictus*, 2017 (<https://ecdc.europa.eu>).

I.1.4.2-En Algérie :

En Algérie, ce moustique a été signalé deux fois en 2011 et en 2014 (Benallal *et al.*, 2016). En août 2010, lors d'un programme entomologique ciblant les phlébotomes, dans la région de Larbaa-Nath-Iraten, Wilaya de Tizi-Ouzou (Algérie), une femelle *Aedes albopictus* a été capturée vivante et partiellement engorgée. C'est le premier rapport d'*Ae. albopictus* en Algérie et plus largement au Maghreb. (Izri *et al.*, 2011).

En décembre 2015, des spécimens d'*Ae. albopictus* (2 mâles, 3 femelles et 3 pupae) ont été récoltés suite à une prospection sur terrain dans la région de Ain Turk (Oran) dans l'ouest Algérien. C'est la première observation de ce moustique envahissant (Figure 7) qui confirme sa présence et son implantation en Afrique méditerranéenne (Benallal *et al.*, 2016).

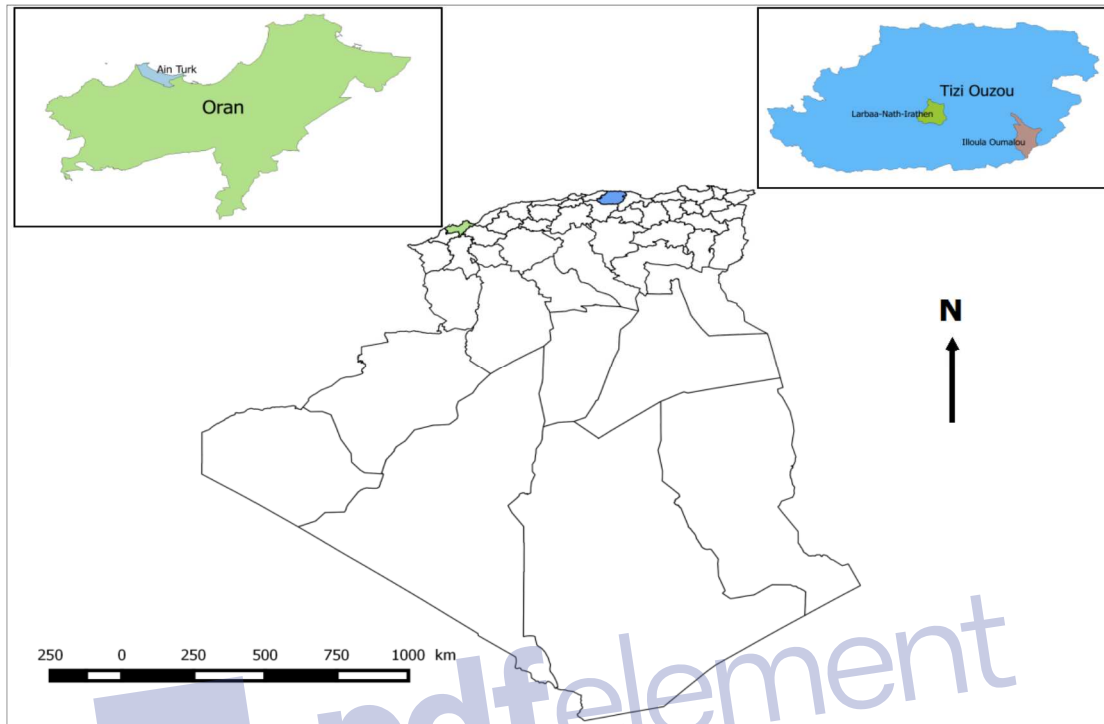


Figure 7: Localisations d'*Aedes albopictus* en Algérie. (Benallal *et al.*, 2016).

I.1.5. Habitats et nutrition :

La biologie d'*Aedes albopictus* est extrêmement variable. (Hawley, 1988). Cette espèce s'est bien adaptée aux milieux suburbains et urbains (Bonizzoni *et al.*, 2013) ainsi que dans les régions climatiques tropicales, subtropicales et tempérées (Hawley, 1988). Avec des larves qui se reproduisent dans des conteneurs artificiels (pneus, urnes de cimetière et réservoirs d'eau). *Ae. albopictus* se nourrit de façon agressive et opportuniste pendant la journée sur un large éventail d'hôtes en fonction de leur disponibilité et de l'environnement. Lorsqu'on lui offre un choix, cette espèce préfère les humains (comportement anthropophile), mais elle peut aussi se nourrir d'une grande variété d'animaux (vaches, chèvres, chiens, oiseaux, reptiles et amphibiens) (comportement zoophile). (Bonizzoni *et al.*, 2013).

I.1.6. Nuisance et maladies :

Les moustiques d'*Aedes albopictus* sont des vecteurs biologiques d'organismes pathogènes responsables d'anthropozoonoses d'incidence médico-vétérinaire considérable. Les femelles, par le biais d'un repas de sang sur un hôte vertébré, sont capables de contracter et véhiculer des virus responsables de nombreuses arboviroses (Dengue, Chikungunya, Zika) (Bawin *et al.*, 2014).

Chikungunya : La fièvre de Chikungunya est une maladie virale transmise par les arthropodes (Mahendradas et *al*

2013). Le virus du Chikungunya (CHIKV) est un arbovirus de la famille des Togaviridae. Maladie infectieuse humaine qui provoque des symptômes ressemblant au syndrome grippale (forte fièvre, arthralgies et une faiblesse marquée accompagner de manifestations cutanées). La phase fébrile aiguë est habituellement résolue en quelques jours, la douleur articulaire peut persister pendant des semaines ou des mois (Bellini et *al.*, 2012).

Dengue : La Dengue (DF) est une maladie infectieuse virale transmise par les moustiques, principalement distribuée dans les régions tropicales. Le DENV est l'un des 70 membres du genre *Flavivirus* de la famille des Flaviviridae. Il est constitué de quatre sérotypes antigéniques étroitement apparentés mais génétiquement distincts, DENV-1, 2, 3 et 4. Ces derniers sont classés à l'origine en fonction de leurs caractéristiques sérologiques. Chaque sérotype DENV provoque des anticorps neutralisants chez les humains infectés, ce qui entraîne une immunité contre le sérotype viral correspondant. Le virus DENV peut infecter divers tissus de moustiques vecteurs, en particulier l'intestin moyen et les glandes salivaires (Tsai et Teng., 2016).

L'infection par le virus de la dengue chez l'homme entraîne un éventail de maladies allant d'une maladie fébrile inapparente ou bénigne à une maladie hémorragique grave et mortelle (Gubler, 1998).

Zika : Le virus Zika (ZIKV) est un *Flavivirus* transmis par les moustiques phylogénétiquement lié aux virus de la dengue. Après son premier isolement en 1947 à partir d'un singe sentinelle placé dans la forêt de Zika en Ouganda, des enquêtes sérologiques et des isollements viraux suggèrent que le ZIKV a largement varié en Afrique et en Asie.

Les patients développent un léger syndrome pseudo-dengue, comprenant de la fièvre, des maux de tête, des éruptions cutanées, des arthralgies et une conjonctivite. Cette similitude clinique avec d'autres infections arbovirales plus fréquemment diagnostiquées telles que le chikungunya (CHIKV) et la dengue (DENV) pourrait retarder le diagnostic et / ou entraîner une sous-estimation des infections à ZIKV (Grard et *al.*, 2014).

I.1.7. Moyens de luttés contre *Aedes albopictus* :

Le contrôle des populations de vecteurs est la seule stratégie actuelle pour prévenir de nombreuses infections à arbovirus, y compris le DENV et le CHIKV, car il n'y a pas de vaccins disponibles ni de traitements pour ces pathogènes et leurs maladies (Bonizzoni et *al.*, 2013).

I.1.7.1-Lutte physique :

La base de toute lutte anti-vectorielle repose sur une gestion environnementale des populations de moustiques (Organisation mondiale de la Santé, 1982) qui passe tant

par une modification des habitats destinée à prévenir, limiter ou supprimer les gîtes larvaires potentiels (drainage de milieux humides, traitement des eaux usées, remblai) que par une adaptation du comportement humain en vue de réduire au mieux le contact hôte-vecteur (gestion des déchets, suppression ou bâchage de récipients d'eau potentiels) (Bawin et al., 2014).

I.1.7.2-Lutte chimique :

Divers composés chimiques sont utilisés pour lutter contre les larves et les adultes d'*Aedes albopictus*. Les pyréthrinoïdes sont les adulticides les plus couramment utilisés en raison de leur faible toxicité pour les mammifères (Ranson et al., 2010). Les plus couramment utilisées sont la perméthrine, la deltaméthrine, la cyperméthrine et la cyfluthrine pour les traitements par pulvérisation résiduelle et spatiale, généralement en prévision ou pendant une épidémie. Les pyréthrinoïdes sont couramment utilisés dans les serpentins anti-moustiques.

Il faut noter que certaines populations d'*Aedes albopictus* sont résistantes aux pyréthrinoïdes (Duvallet et al., 2017).

I.1.7.3-Lutte génétique :

Un contrôle génétique (c'est-à-dire par une altération ou un remplacement du matériel héréditaire) des moustiques selon deux stratégies est aussi envisageable :

-La Technique de l'Insecte Stérile (TIS), qui a permis l'éradication ou la suppression des populations de nombreux insectes nuisibles aux cultures et à l'Homme, représente un moyen de lutte prometteur contre les moustiques. Cette technique s'appuie sur le lâcher en masse de mâles stérilisés par rayonnements ionisants qui, en transférant un sperme stérile aux femelles sauvages, vont permettre une diminution progressive de la population cible (Oliva, 2012).

-Remplacement d'une population par des individus rendus non compétents vis-à-vis d'un pathogène par le biais de manipulations génétiques (et dès lors incapables de le transmettre) semble prometteuse mais pose des problèmes d'ordre éthique et légal dans la mesure où l'impact de moustiques transgéniques sur l'environnement n'a pas été évalué (persistance des moustiques, apparition de phénotypes inattendus, expansion de maladies minoritaires non-ciblées) (Bawin et al., 2014).

I.1.7.4-Lutte biologique :

Le contrôle biologique peut être défini comme « la réduction d'une population par l'utilisation de compétiteurs, prédateurs, parasites, pathogènes ou de toxines dérivées de ceux-ci » (Woodring et Davidson, 1996).

Il s'agit ainsi de maintenir une population sous un seuil acceptable en termes de nuisance et de risque épidémique (dans le cas de la lutte anti-vectorielle) par l'intermédiaire d'un organisme (dit auxiliaire) ou de substances d'origine naturelle tout en évitant des effets délétères à l'écosystème (Bawin et al., 2014).

Les entomophages : l'utilisation d'organismes prédateurs de moustiques est limitée par une production massive, difficile et coûteuse de l'entomophage de son activité

prédatrice peu spécifique, ainsi qu'un déséquilibre potentiel des écosystèmes. Notons toutefois l'utilisation réussite de Copépodes dans des récipients de stockage d'eau permettant d'éliminer les stades immatures d'*Aedes aegypti* au Vietnam. Une exception peut encore être faite des poissons prédateurs tels la gambusie (*Gambusia affinis*) et le guppy (*Poecilia reticulata Peters*), mais ils sont rarement employés dans des programmes de gestion.

Les entomopathogènes : Les organismes pathogènes ou parasites sont potentiellement plus intéressants dans le contrôle biologique des moustiques que les entomophages. Le terme de « lutte microbiologique » sera préféré car l'organisme antagoniste sera un micro-organisme: un champignon, une bactérie, un virus ou encore un protozoaire. Ces pathogènes possèdent la capacité de surpasser les défenses de l'insecte hôte et de l'infecter; ils s'y multiplient ensuite et provoquent sa mort à plus ou moins long terme que ce soit par l'émission de substances toxiques et/ou la destruction de certains tissus (Bawin et *al.*, 2014).

Les extraits des plantes : L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. Les extraits de plantes aqueux ou sous forme d'huiles essentielles contiennent des substances toxiques pouvant agir efficacement sur les moustiques. C'est des sources de molécules naturelles présentant un grand potentiel d'application contre les insectes et d'autres parasites des plantes et du monde animal (Guarrera, 1999). Au Maroc, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales. (Fanny, 2008).

I.2-Les Huiles Essentielles :

I.2.1-Définition :

Une huile essentielle est un liquide hydrophobe concentré contenant des composés aromatiques volatils de la plante. Ils sont également connus en tant qu'huiles aromatiques, huiles parfumées, huiles volatiles de vapeur, huiles étherées. Elles sont constituées de différents composés chimiques comme, les alcools, les hydrocarbures, les phénols, les aldéhydes, les esters et les cétones. Les huiles essentielles pourraient être bio synthétisées dans différents organes de la plante en tant que métabolites secondaires (Hesham *et al.*, 2016). L'huile essentielle est définie dans le contexte de la certification comme l'extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques obtenu par distillation à la vapeur d'eau. Autrement dit l'huile essentielle est l'essence distillée, l'essence étant la sécrétion naturelle élaborée au sein des organes producteurs des plantes aromatiques (Swisseo, 2005).

I.2.2-Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

A- Hydrodistillation (HD):

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus faciles pour l'extraction des huiles essentielles, L'eau et la matière végétale sont toutes deux chauffées dans un premier ballon, puis la vapeur et les extraits végétaux sont condensés dans un réfrigérant à eau et récupérés en fin de parcours dans un vase à décanter (Annexe 2)(Hesham *et al.*, 2016).

B- Distillation à la vapeur:

La distillation à la vapeur est l'une des méthodes approuvées anciennes et officielles pour l'isolement des huiles essentielles à partir de matières végétales. La vapeur s'écoule à travers le matériau (Annexe 2). Le système produit un mélange de vapeur et d'huile essentielle souhaitée. Cette vapeur est ensuite condensée davantage et l'huile essentielle est recueillie (Hesham *et al.*, 2016).

C- Hydro-diffusion par micro-ondes et gravité (MHG) :

L'hydroélectricité par micro-ondes et la gravité (MHG) Est une nouvelle technique pour l'extraction des huiles essentielles, Les performances et avantages de cette technique sont une réduction du temps et une réduction de l'impact environnemental et économie d'énergie (Annexe 1) (Hesham *et al.*, 2016).

D- Hydrodistillation assistée par micro-ondes (MAHD):

L'hydrodistillation assistée par micro-ondes est une technique d'hydrodistillation avancée utilisant un four à micro-ondes dans le processus d'extraction. Cette technique a réduit le temps d'extraction et le volume de solvant requis, minimisant l'impact environnemental en émettant moins de CO₂ dans l'atmosphère (Annexe 2) (Hesham *et al.*, 2016).

I.2.3- Huile essentielle formulée :

La formulation peut être définie comme étant l'ensemble des connaissances et des opérations mises en œuvre lors du mélange, de l'association ou de la mise en forme d'ingrédients (matières premières), d'origine naturelle ou synthétique, souvent incompatibles entre eux, de façon à obtenir un produit commercial caractérisé par son aptitude à satisfaire un cahier des charges préétabli, en évite en formulation que les produits réagissent entre eux lors du mélange, puis lors du stockage et de la préparation. La réaction doit se produire précisément au moment où le produit remplit sa fonction d'usage (Schorsch, 2000). Un produit formulé est constitué d'une molécule active (matière active) est la matière première permettant de remplir la fonction d'usage et les adjuvants qui sont des substances ajoutées en petite quantité pour améliorer certaines propriétés. Exemple : conservateurs, stabilisants, parfums, colorants. (Smith, 2006). La formulation est devenue une des branches les plus importantes de l'industrie du vivant et de l'environnement. Elle comprend l'ensemble des savoirs et savoir-faire nécessaires à la conception et à la mise au point des produits commerciaux (This, 2000).

I.2.4- Huiles essentielles du romarin :

I.2.4.1- Site de synthèse :

L'huile essentielle est produite et stockée dans les tissus sécréteurs de la plante sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (Gonzalez *et al.*, 2007). Elles sont généralement associées à la présence des structures histologique spécialisés, souvent localisée sur ou à proximité de la surface de la plante (Degryse *et al.*, 2008).

Les huiles essentielles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles qui sont les canaux sécréteurs qui existent dans des nombreuses familles (Degryse *et al.*, 2008).

Chez le romarin, les structures histologiques spécialisées dans la synthèse et l'accumulation de l'huile essentielle, sont souvent localisées sur la surface de la plante telle que les poils sécréteurs (Figure 8) (Bruneton, 1987).

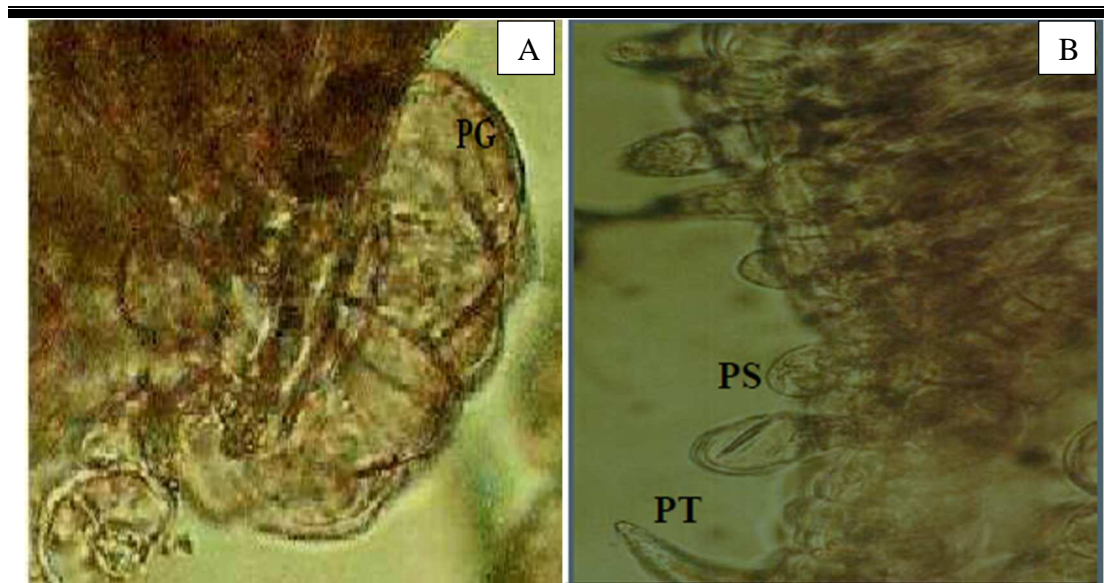


Figure 8 : (A): Coupe transversale de la feuille de *Rosmarinus eriocalyx* mettant en évidence un poil glandulaire (PG) (Gr : X 160). (B) : coupe transversale de la feuille de *R.eriocalyx* mettant en évidence les poils tecteurs (PT) et sécréteur (PS) (Gr : X 160) (Menaceur, 2011).

I.2.4.2- Caractéristiques physiques :

Rosmarinus officinalis produit une huile incolore ou jaune pâle avec la caractéristique du romarin et un goût camphoracé chaud (Gachkar et al., 2007), un aspect liquide limpide et une odeur très marquée (Hilan et al., 2006)

I.2.4.3- Composition chimique :

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de nombreuses variables. Connaître avec exactitude les constituants d'une huile essentielle est fondamental, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle, (Couic-Marinier et Lobstein, 2013). La chromatographie en phase gazeuse a révélé que l'huile essentielle du Romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l' α -pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 35%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène (Frouhat et Lahcini, 2013).

I.2.4.4- Vertus thérapeutique :

Les huiles essentielles représentent une alternative «verte» à utiliser dans les domaines cosmétique, pharmaceutique, agricole et alimentaire tout en substituant les traitements chimiques. Elle est aussi utilisée comme conservateur biologique des produits alimentaires en raison de ses propriétés antioxydants et antimicrobiennes. (Jardak, 2017), De nombreuses propriétés de *R.officinalis* lui sont conférées : anti-infectieuses, antispasmodiques, antalgiques, toniques, digestives, cicatrisantes, anti-inflammatoires (Hilan et al., 2006).

I.2.4.5- Activité insecticide :

Depuis 2006, de nombreuses études ont été réalisées sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide. La plupart de ces études ont mis en évidence des effets sur les moustiques, et notamment les *Culicidés* (Bastien, 2008). Bien que l'on ait démontré aussi qu'ils ont un effet antidépresseur, un inhibiteur de croissance ou ont des effets toxiques contre divers insectes (Ranil *et al.*, 2008).

En ce qui concerne l'huile essentielle du romarin, plusieurs bio-activités ont été documentées, dont l'effet insecticide, d'où il a déjà été démontrées que les constituants chimiques principaux de cette huile, sont le β -pinène, le verbénone et le 1,8-cinéol, qui sont probablement responsables de l'activités insecticides, aussi il a été démontrée que cette huile a une activité acaricide contre le tétranyque à deux points, *Tetranychus urticae* Koch (Martinez-Velázquez *et al.*, 2011). L'huile essentielle du Romarin s'est avéré un agent ovicide contre trois espèces de moustique (*Anopheles stephensi*, *Aedes aegyptiet*, *Culex quinquefasciatus*). Et à une activité répulsive contre les moustiques (*Aedes aegypti*) (Benikhlef, 2013).



I.3-Champignon Entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) :

I.3.1.Généralités :

De 700 à 800 espèces de champignons auraient été reconnues comme pathogènes d'insectes et d'acariens. Leur répartition taxonomique est variée : Ascomycètes, Chytridiomycètes, Oomycètes (anciennement rattachés aux champignons), ou encore Zygomycètes. Dans la recherche d'alternatives aux insecticides, il n'est pas surprenant qu'un intérêt certain se soit également porté sur les champignons entomopathogènes. Les espèces utilisées en recherche appartiennent pour la plupart aux groupes des Zygomycètes (et plus particulièrement à l'ordre des Entomophthorales) et des Ascomycètes (notamment de l'ordre des Hypocreales). Certaines espèces sont désormais utilisées principalement en agriculture. L'avantage majeur des champignons entomopathogènes est que, contrairement aux autres agents microbiens, ils ont la capacité d'infecter leur hôte par la voie transcutanée et ne nécessitent pas d'être ingérés par ce dernier. Ainsi, tous les stades de développement (œufs, larves, nymphes, adultes) peuvent être infectés (Bawin *et al.*, 2014).

La propriété entomopathogène de *Metarhizium anisopliae* a été découverte pour la première fois en 1879 par Elie Metchnikoff, Il est également connu sous le nom de champignon vert muscardine en raison de la couleur muscardine verte des colonies sporulées produites par lui. Il était autrefois connu sous le nom d'*Entomophthora anisopliae* (Zimmermann, 2007).

I.3.2.Position taxonomique :

L'espèce *Metarhizium anisopliae* a été décrite à l'origine par Metschnikoff (1879) comme *Entomophthora anisopliae* et plus tard transférée au nouveau genre *Metarhizium* par Sorokin (1883), (Zimmermann, 2007).

Selon, Sorokin (1883) *Metarhizium anisopliae* est classé comme suit :

Règne : Fungi

Embranchement : Dikarya

Sous-embranchement : Ascomycota

Classe : Pezizomycotina

Ordre : Hypocreales

Famille : Clavicipitaceae

Genre : *Metarhizium*

Espèce : *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (1883).

I.3.3. Caractères morphologique de *Metarhizium anisopliae* :

Les spores de *Metarhizium anisopliae* sont vertes olivacées, cylindriques et longues (Bukhari *et al.*, 2011). Il existe deux formes de *Metarhizium anisopliae* dont la différence se base sur la taille des conidies :

- la forme *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* à spores courtes, dont les conidies mesurent de 5 à 8 μm de longueur.
- la forme *Metarhizium anisopliae* var. *majus* à spores longues, dont les conidies mesurent de 10 à 14 μm de longueur (Zimmermann, 2007).

Metarhizium anisopliae est un champignon anamorphique appartenant au phylum Ascomycota, les structures reproductives de *Metarhizium anisopliae* (l'anamorphe, la forme la plus couramment rencontrée) comprennent des conidiophores et des conidies (figure 9). Les structures blastospores et appressoria sont produites par *Metarhizium anisopliae* par différenciation mycélienne. Les blastospores peuvent fonctionner dans certains cas comme des unités reproductrices et sont produites dans des cultures submergées et dans l'hémolymphe des hôtes d'insectes. Les appressoria, formés à l'extrémité des hyphes, peuvent être impliqués dans la pathogénicité du champignon et ont pour fonction d'initier la pénétration épicuticulaire et procuticulaire du tégument de l'insecte (Tiago *et al.*, 2014).

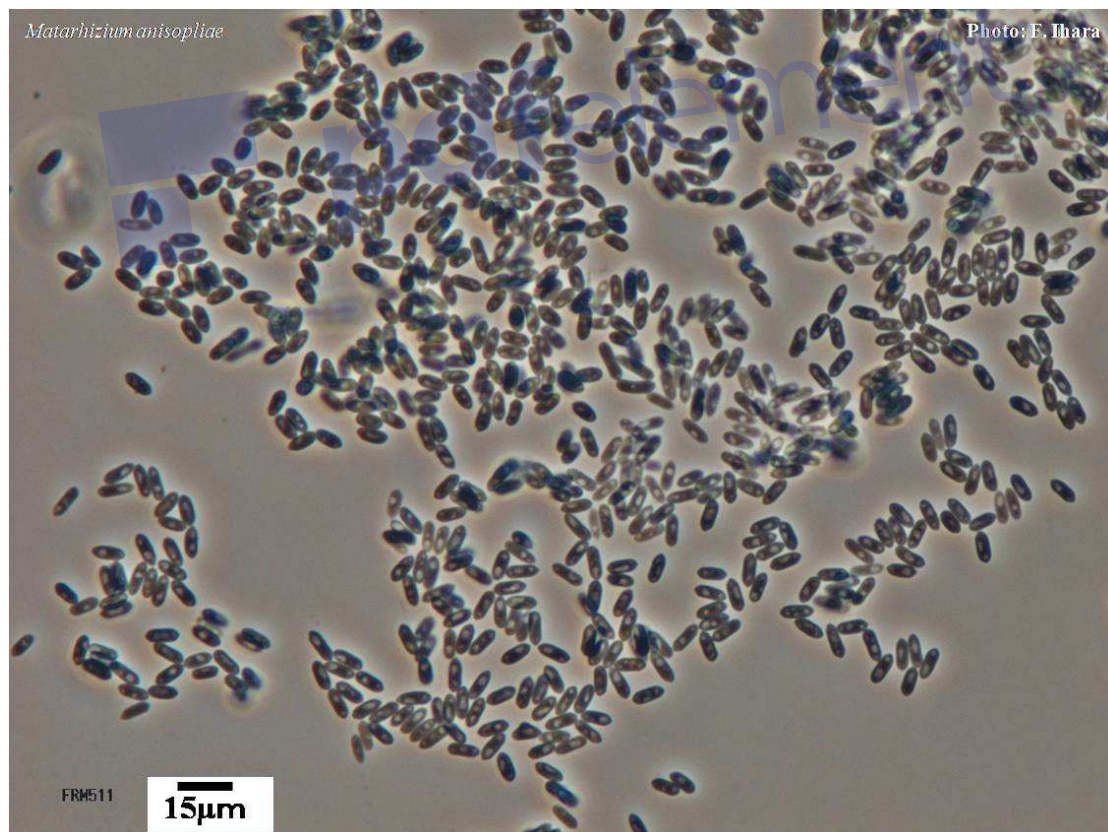


Figure 9 : conidies de *M. anisopliae* (Ihara *et al.*, 2003).

I.3.4. Modes d'infections :

La relation hôte-champignon se produit par l'adhérence et la germination des conidies à la surface de l'insecte (figure 10), suivie de la pénétration des hyphes à travers la cuticule. Le processus de colonisation de l'hôte commence après la pénétration, les hyphes pénétrants devenant plus épais et ramifiés dans le tégument et l'hémocèle de l'insecte, formant des blastospores. Les hyphes continuent de croître et d'envahir divers organes internes après la mort de l'hôte et émergeront par la suite du corps de l'insecte et produiront des conidies qui disséminent et infectent d'autres individus (Tiago *et al.*, 2014).

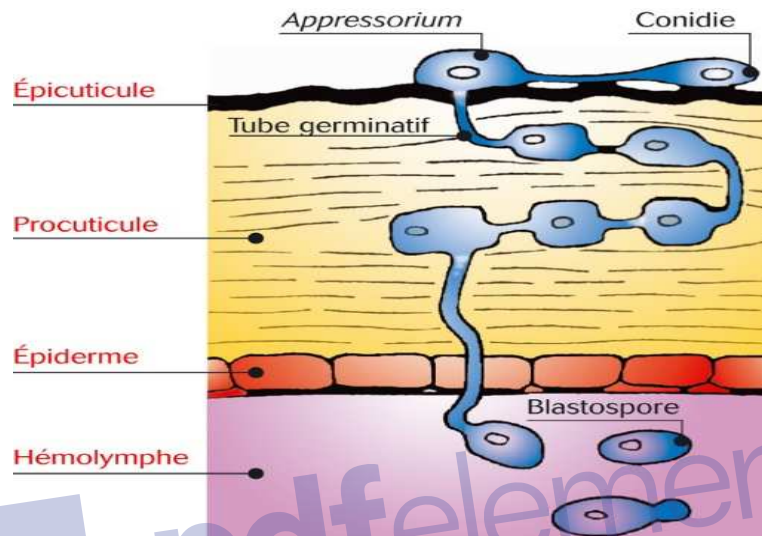


Figure 10 : Mode de pénétration des champignons entomopathogènes dans la cuticule des insectes (Clarkson et Charnley, 1996).

Mécanismes d'infections :

- L'infection des hôtes arthropodes terrestres par *Metarhizium anisopliae*, comme celle de la plupart des autres champignons entomopathogènes, suit une tendance constante.
 - Premièrement, les spores adhèrent à la surface de la cuticule hôte suivie de la germination et de la différenciation d'un appressorium à partir duquel est produite une pique de pénétration étroite qui pénètre dans la cuticule en combinant des enzymes et une force mécanique.
 - Après la colonisation de l'hémocèle, le champignon éclate à travers les membranes inter-segmentales et différencie les conidiophores et les conidies. Les principaux déterminants de la pathogénicité de *M anisopliae* comprennent des enzymes dégradant les cuticules comme Pr1 (subtilisine protease) et des peptides cycliques toxiques comme les destruxines. La virulence fongique semble être corrélée avec la production de Pr1 et de destruxine; avec hyper producteurs étant plus virulents (Butt *et al.*, 2013).
- Différentes études ont suggéré différents mécanismes d'infection de *M anisopliae* chez les hôtes aquatiques (Kimberly Moon San Aw et Seow Mun Hue, 2017), des voies d'invasion possibles ont été signalées, y compris l'entrée

via la cuticule, le siphon respiratoire ou le tube digestif, des observations microscopiques révélant l'ingestion de conidies par des larves exposées à *M. anisopliae* et la présence de conidies dans les pellets fécaux de larves de moustiques ont démontré que des conidies avaient été ingérées. Mais le mécanisme précis demeure insaisissable.

I.3.5. Solutions entomopathogènes :

Certains champignons peuvent être produits massivement et conditionnés sous forme de suspensions aqueuses de spores pour être ensuite vaporisés, parfois en combinaison avec des matériaux synthétiques destinés à augmenter leur persistance ou leur pouvoir infectieux (Bawin *et al.*, 2014).

Certains auteurs préfèrent utiliser l'huile pour formuler une solution entomopathogène dans leurs expériences. Hemour (2009) a choisi de mélanger les spores fongiques avec du pétrole plutôt qu'à de l'eau, car ils gardent non seulement leur pouvoir germinatif plus longtemps dans les conditions climatiques sèches mais aussi sont beaucoup plus infectieux et tuent les insectes dans un délai de temps plus court.

Les solutions entomopathogènes peuvent être également appliquées sous forme de suspension huileuse diluée par du pétrole, de l'huile d'arachide ou alors du gasoil et l'huile du maïs (Kaidi, 2007).

Brousseau (1994) a utilisé *Metarhizium anisopliae* à l'état pur sous forme cristallisée. Ce dernier a été mis en solution dans de l'acétone à raison de 0.1 ml pour 5.3 mg de *Metarhizium anisopliae*. La dilution de la solution mère s'est faite en ajoutant de l'eau distillée jusqu'à l'obtention de la concentration désirée.

I.3.6. *Metarhizium anisopliae* dans le cadre de la lutte biologique :

Le contrôle microbien des insectes est basé sur l'utilisation rationnelle des agents pathogènes pour maintenir des niveaux de populations de ravageurs équilibrés sur le plan environnemental, et *Metarhizium anisopliae* a été l'espèce fongique la plus étudiée et la plus utilisée à cette fin (Tiago *et al.*, 2014).

Cette espèce possède un spectre d'hôtes large incluant plusieurs arachnides et pas moins de 200 espèces d'insectes réparties dans cinq ordres différents, plusieurs études de laboratoire ont montré son potentiel en tant qu'agent de contrôle de nombreuses espèces (adultes ou larves) appartenant aux genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* (Bawin *et al.*, 2014). Les parasites cibles actuels sont les termites, les criquets et les sauterelles ou les cafards, les cercopes et autres hémiptères, les noctuelles, les insectes ravageurs du sol, tels que diverses espèces de scarabées et les curculionides, les ravageurs de serre, tels que les mouches blanches ou les thrips, ainsi que les moustiques et même les tiques (Zimmermann, 2007).

II.1. Objectif de l'étude :

Le présent travail consiste d'une part à l'évaluation de la toxicité de l'huile essentielle formulée du Romarin « *Rosmarinus officinalis* 10% » et du champignon entomopathogène « *Metarhizium anisopliae* » à l'égard du moustique tigre, vecteur d'arboviroses. Et d'autre part à l'étude de quelques paramètres biologiques de ce vecteur. L'étude s'est étalée sur une période de 5 mois « de février jusqu'au mois de juin 2018 », l'élevage ainsi que les tests de toxicité ont été réalisés au niveau de l'annexe de Sidi Fredj de l'Institut Pasteur d'Algérie, dans l'insectarium du laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations.

II.2. Matériel biologique :

a- Le moustique (*Aedes albopictus*) :

Les larves et les adultes d'*Aedes albopictus* soumises aux tests bios pesticides appartiennent à la 19^{ème} génération, issue de l'élevage d'une population collectée en 2015 à Oran à l'Ouest d'Algérie.

b- Huile essentielle formulée :

L'huile essentielle formulée du romarin « *Rosmarinus officinalis* 10% » nous a été aimablement fournie par le laboratoire de Phytopharmacie et protection des végétaux. Université SAAD DAHLEB Blida 1.

c- Champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) :

La souche de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* souche IMI 330189 a été obtenue de l'Institut National de la protection des végétaux (INPV) d'El Harrach. Ce bio pesticide est commercialisé sous forme d'une poudre fine de couleur vert marin, communément appelé « GREEN MUSCLE ». Le détail de la fiche technique ainsi que le manuel d'utilisation de ce bio pesticide est donnée en Annexe 3.

II.3. Matériel non biologique :

Tout le matériel non biologique utilisé au cours de la présente étude (outils, appareillage, produits) est consigné dans l'annexe 1.

II.4. Méthodes :

II.4.1. L'élevage :

L'élevage d'*Aedes albopictus* a été maintenu dans une chambre conditionnée à une température variant entre 23 ° et 25 ° C, une humidité relative comprise entre 42 et 60% et une photopériode de 12 heures (Figure 11).

Les femelles sont gorgées pendant 1 heure trois fois par semaine, à partir des souris préalablement anesthésiées (Figure 12), les œufs pondus (Figure 13 et 14) sont utilisés pour des nouvelles générations d'*Aedes albopictus*. Les œufs et les larves sont mis dans des bacs contenant environ 1,5 litre d'eau (Figure 13). Les larves sont nourries avec des croquettes de chat riche en protéines. Lorsque les larves atteignent le stade nymphal,

elles sont mises dans des gobelets (contenant de l'eau et papier buvard). Ces derniers sont déposés dans des cages recouvertes d'une moustiquaire où les nymphes se transformeront en adultes. Après émergence, les adultes sont nourris de jus sucré. Toutes les cages sont identifiées (espèce, date et génération).



Figure 11 : Insectarium de l'Institut Pasteur d'Algérie, Annexe - sidi Fredj (Originale, 2018).



Figure 12 : Gorgement des femelles sur la souris (Originale, 2018).



Figure 13 : Ponte des œufs (Originale, 2018).



Figure 14 : Œufs d'*Aedes albopictus* sous loupe binoculaire (G 0,8x25) (Originale, 2018).



Figure 15 : Larves d'*Aedes albopictus* dans les bacs d'élevage (Originale, 2018).

II.4.2. Tests de toxicité :

II.4.2.1. Huile essentielle formulée du Romarin

a-Test sur les larves :

Trois doses ont été testées (D1=0,25g/l ; D2=0,5g/l ; D3= 0,75g/l) (Figure 16) sur le quatrième stade larvaires (L4) d'*Aedes albopictus*. Les tests ont été conduits selon le protocole de l'OMS (2005). 10 larves ont été prélevées à l'aide d'une poire en plastique et placées dans des gobelets en plastique de 5 cm de diamètre contenant chacun 100ml d'eau distillée additionnée de la dose correspondante de la solution de « *Rosmarinus officinalis* 10% ». Trois répétitions ont été réalisées pour chaque dose. Trois gobelets témoins ont été également constitués contenant uniquement l'eau distillée et les larves (Figure 17). Le nombre des larves mortes ont été comptées à 24, 48 et 72 heures après exposition.



Figure 16 : Préparation des doses de l'huile essentielle formulée (Originale, 2018).



Figure 17 : Dispositif expérimentale du test de toxicité (Originale, 2018).

b-Test sur les adultes :

Le test est effectuée avec une série graduée de doses ($D1=0.25g/l$; $D2=0.5g/l$; $D3=0.75g/l$) de l'huile essentielle formulée du romarin 10%. Des rectangles de papier filtre de 12 x 15 cm (Whatman® n° 1 ou équivalent) sont uniformément imprégnés de 2 ml par chacune des trois doses (Figure 18). Une fois séché à l'air libre pendant 24 heures, le papier filtre est inséré dans un tube en plastique pour être exposé aux moustiques. (Le dispositif de l'OMS utilisé pour tester la sensibilité des moustiques adultes ainsi que la méthode d'essai sont décrits à l'annexe 3).

Des lots de 15 moustiques femelles non nourris au sang, âgés de 2 à 5 jours, sont introduits dans le tube d'observation (marqué d'un point vert) et maintenus pendant une heure à $25^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ et $80\% \pm 10\%$ HR. Ils sont ensuite transférés par soufflage doux dans le tube d'exposition contenant le papier imprégné d'huile essentielle (marqué d'un point rouge). Le kit est tenu verticalement pendant une heure (Figure 19). À la fin du temps d'exposition, les moustiques sont transférés délicatement dans le tube d'observation et maintenus verticalement dans les conditions d'élevage avec une solution de saccharose à 10%. Les moustiques morts sont comptés après 1 heure et 24 heures d'exposition.

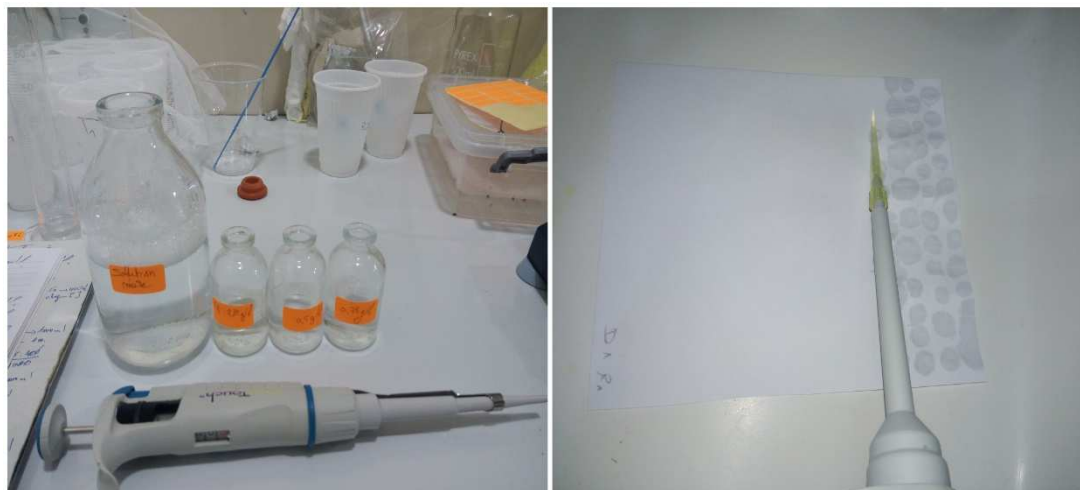


Figure 18 : Imprégnation du papier filtre par l'huile essentielle formulée du romarin (Originale, 2018).



Figure 19 : Les tubes de l'OMS pour tester la sensibilité des moustiques adultes (Originale, 2018).

II.4.2.2. *Metarhizium anisopliae* :

a-Test sur les larves :

Quatre concentrations ont été préparées (D1=0,15g/l ; D2=0,3g/l ; D3= 0,6g/l ; D4= 1,2g/l) en diluant 24mg de poudre de *Metarhizium anisopliae* « green muscle » dans 20ml d'eau distillé (Figure 20). Ces concentrations ont été testées sur le troisième et quatrième stade larvaire d'*Aedes albopictus*. 10 larves ont été prélevées et mises dans des gobelets en plastique contenant chacun 99ml d'eau distillé. Par introduction de 1ml de chaque dose dans les gobelets précédemment préparés, 3 répétitions ont été réalisées pour chaque dose. 3 gobelets témoins ont été également constitués, contenant que de l'eau et les larves (Figure 21).



Figure 20 : Doses de *Metarhizium anisopliae* (originale2018).



Figure 21 : Dispositif expérimentale du test de toxicité sur les larves (originale 2018).

b-Test sur les adultes :

Quatre concentrations ont été préparées (D1=0.15g/l ; D2=0.3g/l ; D3= 0.6g/l ; D4= 1,2g/l) de *Metarhizium anisopliae* « Green muscle ». Le protocole suivi pour ce test est le même que celui d'huile essentielle du romarin.

La différence entre les deux produits est qu'il faut agiter les solutions de champignon avant chaque utilisation afin d'obtenir une solution homogène.

II.4.3. Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre :

Nous avons choisis 1 couple d'adulte à partir d'une grande cage et les ont mis en élevage séparément avec les mêmes conditions.

À partir de ce couple, nous avons évalué la fécondité qui est le nombre d'œufs pondus après avoir pris un repas sanguin, la fertilité qui nous permet de savoir quel est le nombre d'œuf éclos par rapport aux œufs pondus et l'émergence des adultes à partir des nymphes dans des conditions contrôlées (Figure 22, 23, 24 et 25).



Figure 22 : Vue microscopique d'éclosion d'œuf d'*Aedes albopictus* (Originale, 2018).



Figure 23 : Les stades larvaires d'*Aedes albopictus* (Originale, 2018).



Figure 24 : Emergence d'un adulte d'*Aedes albopictus* (Originale, 2018).

Figure 25 : Adultes (mâle et femelle) d'*Aedes albopictus* sous loupe binoculaire (G : 0,8x25) (Originale, 2018).

II.5.Méthodes d'exploitations des résultats :

II.5.1.Mortalité observée

Nous avons calculé la mortalité dans l'échantillon testé en sommant le nombre de moustiques morts dans l'ensemble des tests d'exposition répliqués et en exprimant cette somme sous forme de pourcentage par rapport au nombre total de moustiques exposés. Le même taux a été calculé pour les témoins

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{Nombre total de moustiques morts}}{\text{Effectif total de l'échantillon}} \times 100$$

Si le taux de mortalité observée est $\geq 20\%$ chez les témoins, les résultats du test devront être écartés. Lorsque ce dernier est compris entre 5% et 20%, la mortalité observée doit être corrigée à l'aide de la formule d'Abbott de la façon suivante :

$$\text{Mortalité corrigée} = \frac{(\% \text{ mortalité observée} - \% \text{ mortalité chez les témoins})}{(100 - \% \text{ mortalité chez les témoins})} \times 100$$

Si la mortalité chez les témoins est $< 5\%$, aucune correction n'est nécessaire sur les résultats de test.

Remarque : Cas particulier pour le test des adultes :

À la fin des tests biologiques portant sur les insecticides, la définition de l'état de knock-down et de la mort fait intervenir non seulement l'état de l'insecte, mais aussi le moment où l'observation est faite. Un moustique est classé comme « mort » ou « knocked down » (en état de choc) s'il est immobile ou incapable de se lever ou de s'envoler. La distinction entre l'état de choc et la mort ne dépend que du moment de l'observation. On pourra tapoter un peu le récipient d'observation avant la détermination finale. La

mortalité des moustiques témoins devra être mesurée sur la même période de récupération (OMS 2017).

La classification des moustiques adultes en individus vivants, « knocked down » ou morts dans le cadre des tests biologiques est résumée ci-après (OMS 2017) :

Tableau 1 : Classification des moustiques adultes en individus vivants, « knocked down » ou morts

VIVANT	Knocked down ou mort après exposition	
	MORIBOND	MORT
Peut se lever et volet de manière coordonnée	<ul style="list-style-type: none"> • Ne peut de lever (ne possède plus qu'une ou deux pattes, par ex.) • Ne peut voler de manière coordonnée • Reste couché sur le dos, en bougeant les pattes et les ailes, incapable de s'envoler • Peut se lever et s'envoler brièvement, mais retombe rapidement. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas de signe de vie • Immobile • Ne peut se lever

II.5.2.Evaluation de la DL90 et la TL90 :

Un insecticide est d'autant plus puissant à l'égard d'une population d'insectes donnée si la dose utilisée est faible pour détruire un pourcentage de cette population. Cette dose d'insecticide nécessaire pour obtenir un pourcentage donné de mortalité est appelée dose létale.

DL90 : dose nécessaire et suffisante pour tuer 90% d'une population exposée.

Pour calculer la DL 90, une transformation en probit des pourcentages de mortalité est nécessaire. L'analyse des données se fait par la méthode gaussienne arithmétique habituellement utilisée pour les tests insecticides. Elle permet de tracer des droites de régression probit en dressant le taux de mortalité en fonction de la concentration en insecticide.

L'équation de la droite est de type $y = ax+b$

Où

y = probit 90 pour chercher DL90 ($y = 6.28$).

a = la pente.

x = logarithme de dose.

b = valeur de l'axe des ordonnées.

TL90 : le temps léthal au bout duquel on obtient 90% de mortalité.

Pour calculer la TL 90, une transformation en probit de temps d'exposition est nécessaire. L'analyse des données se fait par la méthode gaussienne arithmétique habituellement utilisée pour les tests insecticides. Elle permet de tracer des droites de régression probit en dressant le taux de mortalité en fonction de temps.

II.5.3. Analyse statistique :

Pour mieux interpréter nos résultats nous avons opté pour les tests statistiques et mathématiques tel que l'analyse de la variance, pour prouver l'efficacité des facteurs étudiés. Et le test Newman Keuls au seuil de 5%, ce dernier sert à classer les moyennes des facteurs en groupes homogènes et hétérogènes. En utilisant le logiciel SPSS.



III.1.Toxicité de l'huile essentielle formulée du Romarin « *Rosmarinus officinalis* 10% » sur *Aedes albopictus* :

III.1.1.-Evolution de la mortalité moyenne cumulée

A- Résultats :

Les résultats de l'évolution de la mortalité moyenne cumulée des larves et des adultes d'*Aedes albopictus* en fonction des doses croissantes de l'huile essentielle formulée du *Rosmarinus officinalis* et de la durée d'exposition sont présentés par la figure 26 et la figure 27.

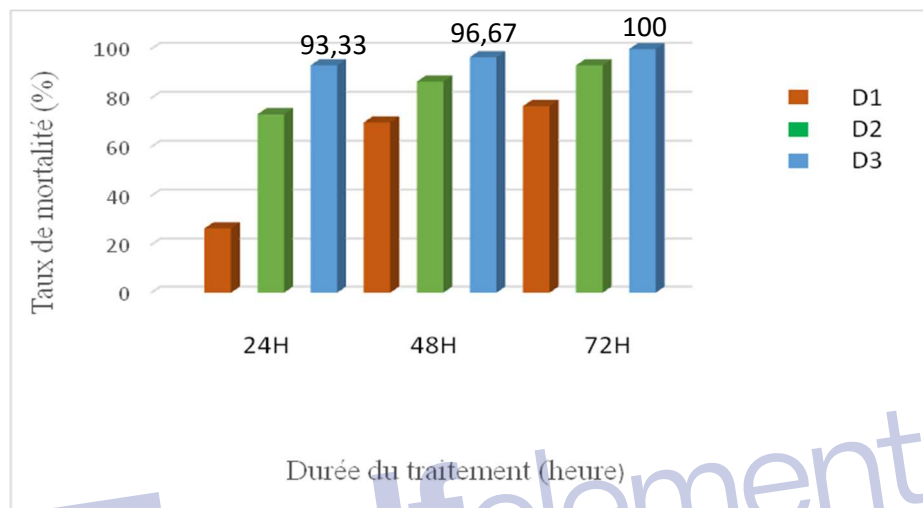


Figure 26 : Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des larves (L4) exposées à l'huile essentielle formulée du Romarin.

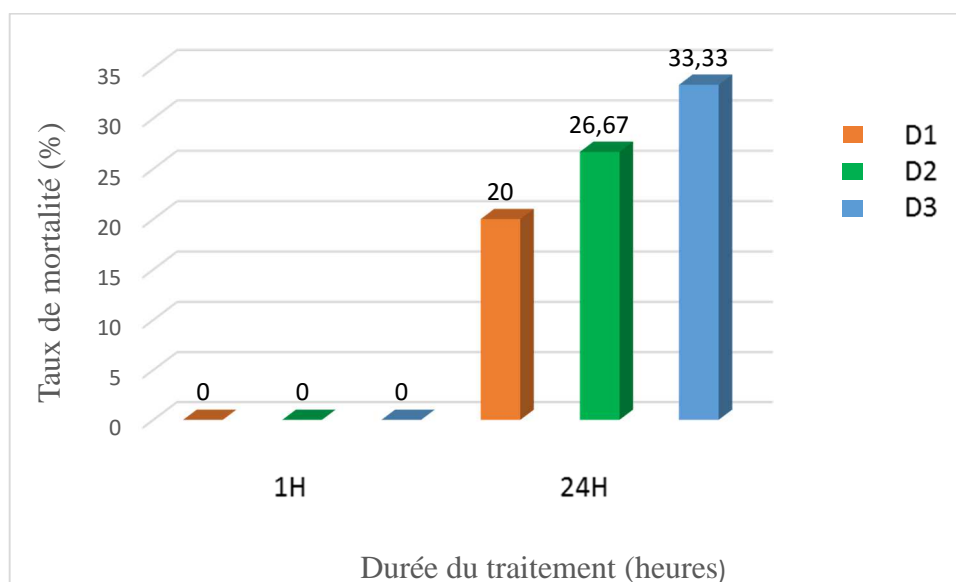


Figure 27 : Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des adultes d'*Aedes albopictus* exposées à l'huile essentielle formulée du Romarin.

B-Discussion :

À la lecture des résultats (Fig. 26, 27), nous notons que la mortalité du moustique tigre induite par l'essence formulée du romarin varie significativement ($P < 0.05\%$) en fonction du temps et de la dose. Chez les larves du quatrième stade (L4), 72 heures après traitement, nous avons enregistré des taux de mortalité de 76,67 %, 93,33 % et 100% respectivement pour les doses D1= 0,25 g/l, D2= 0,50 g/l et D3= 0,75g/l. L'absence de mortalité dans le témoin fait déduire que l'huile essentielle formulée du romarin a un effet toxique sur le quatrième stade larvaire du moustique tigre. Aucune mortalité n'a été notée après 1 heure de traitement chez les adultes pour les trois doses testés. Mais nous avons remarqué une baisse de mouvement à la dose (D3=0,75 g/l). La mortalité la plus forte (33,33%) a été enregistrée 24 H après traitement avec la plus grande dose (D3=0,75 g/l). Cependant la même dose et le même temps a induit une mortalité dépassant les 80 % chez les stades larvaires. Le fort pouvoir insecticide de cette essence est probablement lié à la nature du tégument, en effet Isman (2000) a montré que Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des arthropodes à corps mous.

L'activité larvicide de l'HE du romarin a déjà été montrée par Berrah et Ahcene (2016) sur les larves du quatrième stade de *Culex pipiens*. De même l'huile essentielle de *R. officinalis* a été rapportée pour ses activités biologiques comme niticide contre *Pediculus humanus capitis* par Lahlou et Berrada (2003), insecticide contre *Ceratitis capitata* par Passino *et al.* (1999) et Moretti *et al.* (1998), anti appétant, répulsif et inhibiteur de décontamination contre *Myzus persicae* (Hori, 1998 ; 1999). L'activité adulticide de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* a été également montré par les travaux de Bouchikhi *et al.*, (2008) à l'égard de la mite *Tineole bisselliella*, 24 heure après traitement. Selon Gleiser *et al.* (2011). Toutes les huiles essentielles testées étaient significativement répulsives contre *Ae. aegypti* par rapport aux témoins non traités.

III.1.2.Evaluation de la DL 90 et du TL 90 de l'HEF sur les larves d'*Aedes albopictus* :

- Le calcul des DL 90 d'huile essentielle formulée du Romarin à 10% rapporté au temps d'exposition, nous renseigne sur le degré de toxicité de cette substance. Les logarithmes décimaux des doses ont été portés en abscisse et les probits des pourcentages de mortalité en ordonnées, ils sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Logarithmes décimal des doses et les probits de mortalité.

	Log Doses	Probits
log D1	-0,60	4,39
log D2	-0,30	5,61
log D3	-0,12	6,48

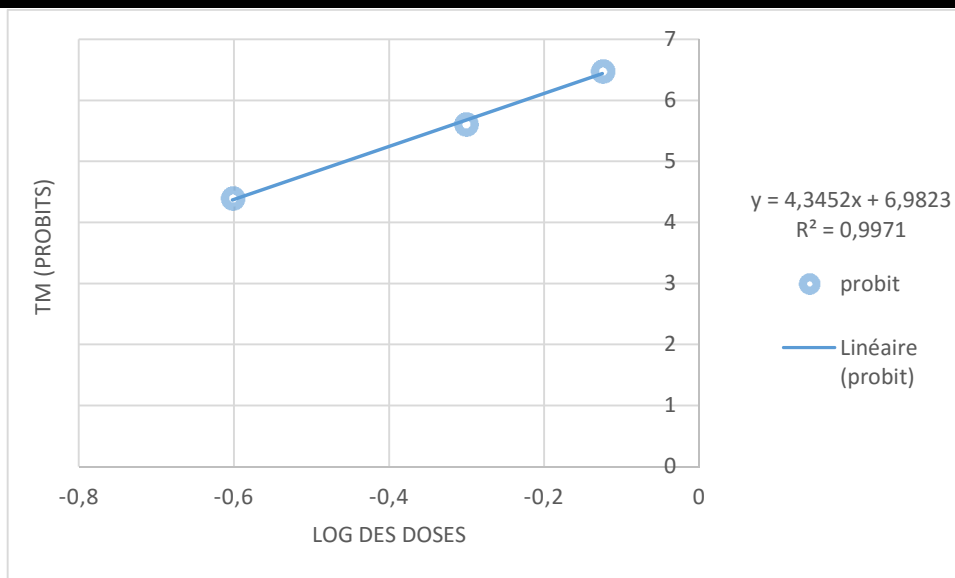


Figure 28 : Droite de régression des doses d’huile essentielle formulée du Romarin en fonction de la mortalité des larves (L4) après 24H d’exposition.

Dans cette étude, la DL90 de l’huile essentielle formulée de *Rosmarinus officinalis* sur les larves (L4) d’*Aedes albopictus* a été calculée. La droite de régression après une exposition de 24H est de la forme : $y = 4,3452x + 6,9823$ avec un coefficient de corrélation (R^2) = 0,9971, sa DL90 est de 0,69 g/l.

- Le calcul des TL90 (temps léthal au bout duquel on obtient 90% de mortalité) d’huile essentielle formulée du Romarin sur les larves L4 d’*Aedes albopictus*, nous renseigne sur la variation du temps provoqué par la variation de la dose. Les résultats concernant les valeurs du TL90 des 3 doses sont rapportés dans la figure 29.

Le tableau suivant regroupe les équations de droites de régression nous avons déduit les valeurs du TL90 relatifs à chaque dose.

Tableau 3 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL90 pour chaque dose de traitement utilisée :

Doses	Equations des droites de régressions	R^2	TL90 (jours)
D1 = 0,25 g/l	$y = 2,975x + 4,4531$	0,9554	4,111
D2 = 0,50 g/l	$y = 3,1972x + 5,0527$	0,9818	2,415
D3 = 0,75 g/l	$y = 1,8293x + 6,4405$	0,9538	0,818

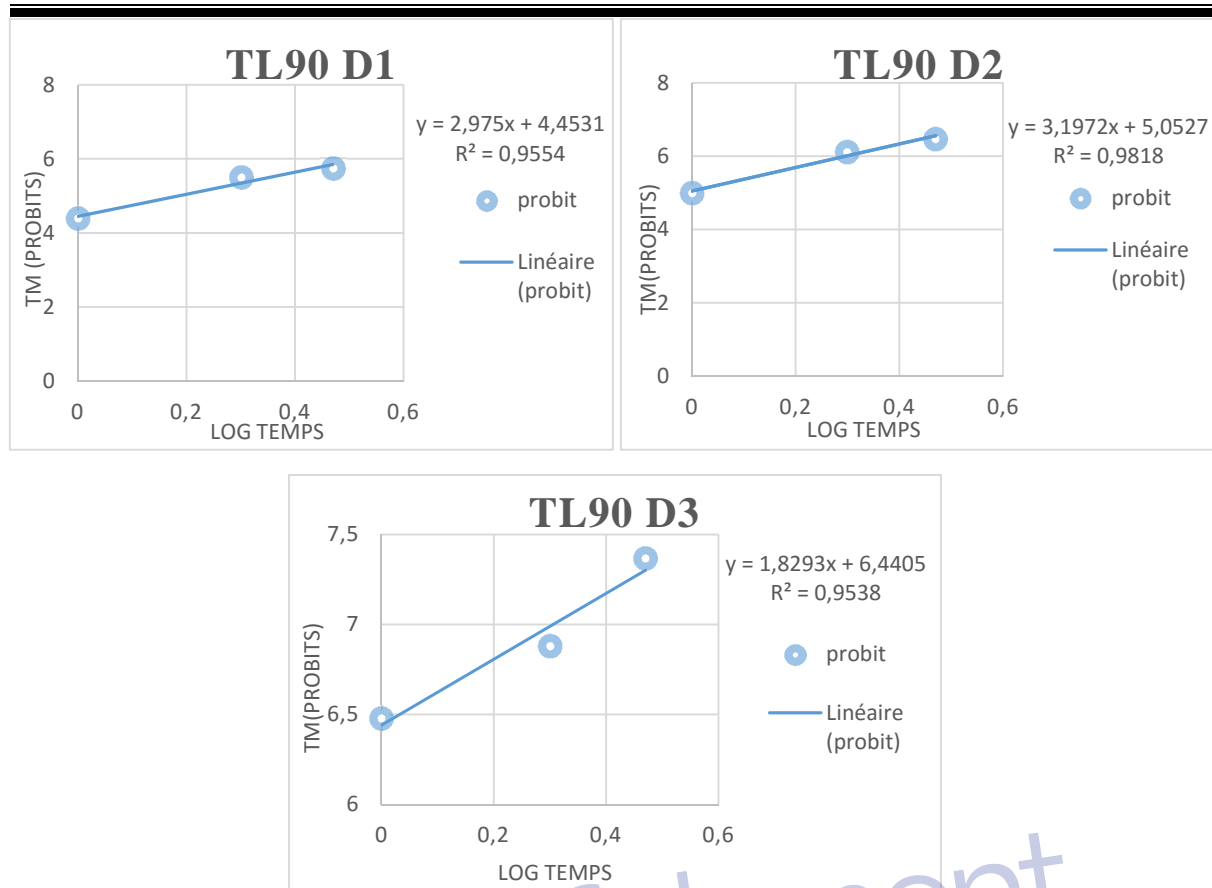


Figure 29 : les droites des régressions de l’huile essentielle formulée du romarin dans le temps vis-à-vis des larves (L4) d’*Aedes albopictus* traitées par les différentes doses D1, D2 et D3.

La figure 29 montre que la TL90 de la plus faible dose (D1= 0,25g/l) est de 4,111 jours, D2 et D3 sont de 2,415 et 0,818 respectivement.

III.1.3. Analyse de la variance :

➤ **Cas des larves**

Pour interpréter nos résultats, nous nous sommes appuyés sur l’analyse de la variance à deux critères de classification : Facteur 1 : Doses avec 3 niveaux (D1= 0,25g/l, D2= 0,50g/l, D3=0,75g/l), Facteur 2 : Temps avec 3 niveaux (24H, 48H, 72H).

Tableau 4 : Analyse de la variance

Source de la variation	Sommes des carrée	DDL	Moyenne des carrée	F	P
Modèle corrigé	550,306 ^a	11	50,028	94,789	,000
Intercepter	1284,028	1	1284,028	2432,895	,000
temps	24,389	2	12,194	23,105	,000
dose	499,194	3	166,398	315,281	,000
temps * dose	26,722	6	4,454	8,439	,000
Erreur	12,667	24	,528		
Totale	1847,000	36			
Total corrigé	562,972	35			

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle (Tableau 2) une différence très hautement significative pour les deux facteurs (doses et temps).

- **Test de Newman keuls :**

- ✓ **Facteur dose**

Tableau 5 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).

Doses	N	Sous-groupes			
		1	2	3	4
Témoin	9	,0000			
D1=0,25g/l	9		5,7778		
D2= 0,5 g/l	9			8,4444	
D3= 0,75 g/l	9				9,6667

À travers le test de Newman Keuls au seuil de 5%, le classement des moyennes de mortalités des larves révèle 3 groupes significativement différents.

- ✓ **Facteur temps**

Tableau 6 : Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)

temps	N	Sous-groupes	
		1	2
24h	12	4,8333	
48h	12		6,3333
72h	12		6,7500

Pour le facteur (Temps) le test révèle 2 groupes homogènes (Tableau 4), le groupe 1 comporte la moyenne 4,83 correspondante à 24H. Le groupe 2 comporte les moyennes correspondantes à 48H et 72H. Ce qui explique que le taux de mortalité moyen cumulé induit par l'HE formulée du romarin sur les larves du moustique est le même taux après 48 h et 72 h après traitement.

- **Cas des adultes**

Tableau 7 : Analyse de la variance

Source de la variation	Sommes des carrée	DDL	Moyenne des carrée	F	P
Modèle corrigé	91,167 ^a	7	13,024	24,044	,000
Intercepter	60,167	1	60,167	111,077	,000
temps	60,167	1	60,167	111,077	,000
dose	15,500	3	5,167	9,538	,001
temps * dose	15,500	3	5,167	9,538	,001
Erreur	8,667	16	,542		
Totale	160,000	24			

Total corrigé	99,833	23			
---------------	--------	----	--	--	--

L'analyse de la variance à 2 critères de Classification (Tableau 5) révèle une différence hautement significative entre les différentes mortalités enregistrées pour les adultes traitées et les témoins, à différents niveaux de temps et à différentes doses.

- Test de Newman & Keuls :
 - ✓ Facteur dose

Tableau 8 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).

Dose	N	Sous-groupes	
		1	2
Témoin	6	,3333	
D1=0,25g/l	6		1,5000
D2= 0,5 g/l	6		2,0000
D3= 0,75g/l	6		2,5000

Le classement des moyennes de mortalités des adultes (tableau 6), révèle un seul groupe homogène, comportant les trois doses testées. Ce qui explique l'effet similaire de ces trois doses sur la mortalité.

III.2.Toxicité de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (souche IMI 330189) « Green muscle » sur le moustique *Aedes albopictus* :

III.2.1.Evolution de la mortalité moyenne cumulée

A- Résultats :

Les résultats de l'évolution de la mortalité moyenne cumulée des larves et des adultes d'*Aedes albopictus* en fonction des doses croissantes du champignon *Metarhizium anisopliae* et de la durée d'exposition sont représentés par la figure 30 et la figure 31.

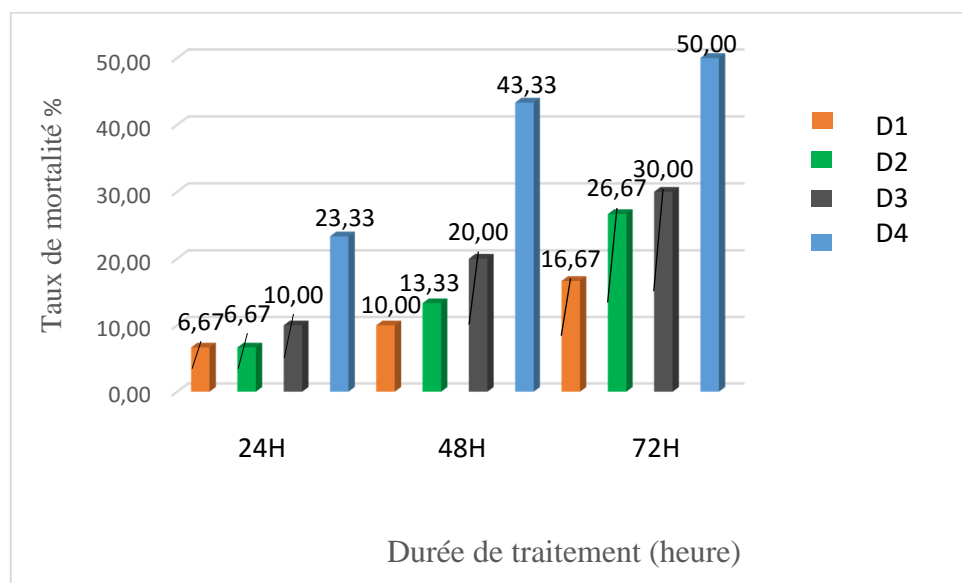


Figure 30 : Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des larves (L3 et L4) exposées au *Metarhizium anisopliae*.

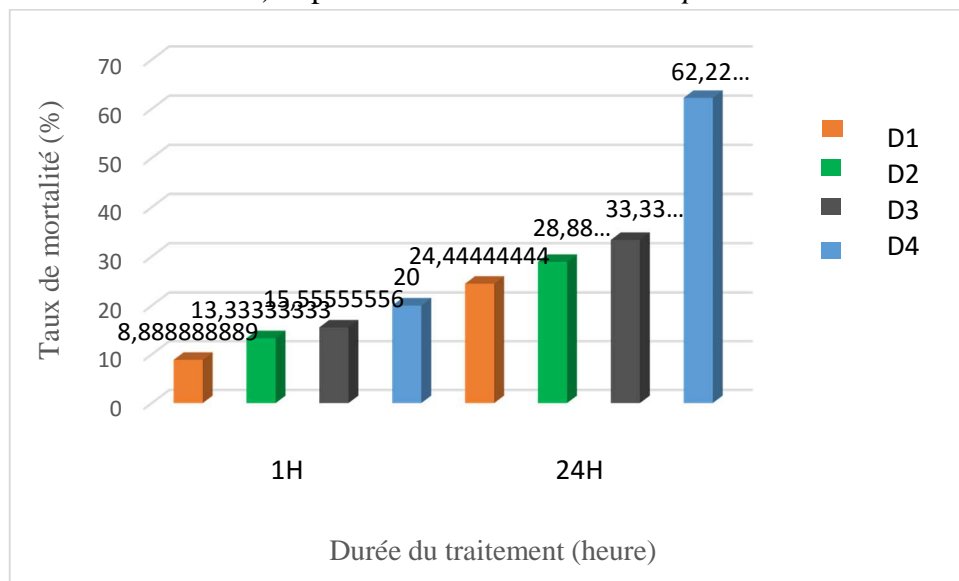


Figure 31 : Représentation graphique du taux de mortalité moyen cumulé des adultes exposées au *Metarhizium anisopliae*.

B-Discussion :

Selon les résultats de la figure (30 et 31), nous remarquons que la mortalité des larves et des adultes du moustique tigre évolue en fonction du temps et des doses testées. Chez les stades larvaires, à la dose (D1=0,15g/l), un taux de mortalité de 16,67 % est enregistré au bout de 72H, suivi de la dose D2, D3 et D4 avec des taux de mortalité de 26,67%, 30% et 50% respectivement. Chez les adultes, le champignon engendre une mortalité de 24,44% au bout de 24H avec la plus faible dose (D1=0,15g/l), ce qui laisse supposer que les stades adultes sont plus sensible à cet entomopathogène par rapport aux stades larvaires.

L'absence de mortalité dans le témoin fait déduire que le champignon a un effet toxique sur le vecteur. La faible activité immédiate larvicide de *Metarhizium anisopliae* a été déjà rapporté par Bukhari *et al.*, (2011) vis-à-vis des larves d'*Anopheles*. Ainsi que par Tamaloust (2007) et Benserraj (2014) sur les larves de *Culex pipiens*, en effet, le 100% de mortalité n'a été obtenu qu'après 10 jours de traitement avec la plus forte dose. D'après Kimberly Moon San Aw et Seow Mun Hue (2017), *M. anisopliae* provoque une mortalité significativement plus élevée chez les adultes d'*Anopheles spp.* et d'*Aedes spp.* par rapport aux témoins. L'effet de ce champignon a été déjà montré par Mohamedi-Bouzina (2013) sur les adultes de *Culex pipiens*. Où il a atteint 61,53% de mortalité après 24H avec la plus grande dose (D= $1,55 \times 10^7$ spores/ml), ce qui va dans le même sens de nos résultats.

III.2.2.Evaluation de la DL 90 et du TL 90 de *Metarhizium anisopliae* sur les larves d'*Aedes albopictus* :

- Le calcul des DL 90 de *Metarhizium anisopliae* rapporté au temps d'exposition, nous renseigne sur le degré de toxicité de cet entomopathogène. Les logarithmes décimaux des doses ont été portés en abscisse et les probits des pourcentages de mortalité en ordonnées, ils sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 9 : Logarithmes décimal des doses et les probits de mortalité.

	Log Doses	Probits
log D1	-0,82	4,05
log D2	-0,52	4,39
log D3	-0,22	4,48
log D4	0,079	5

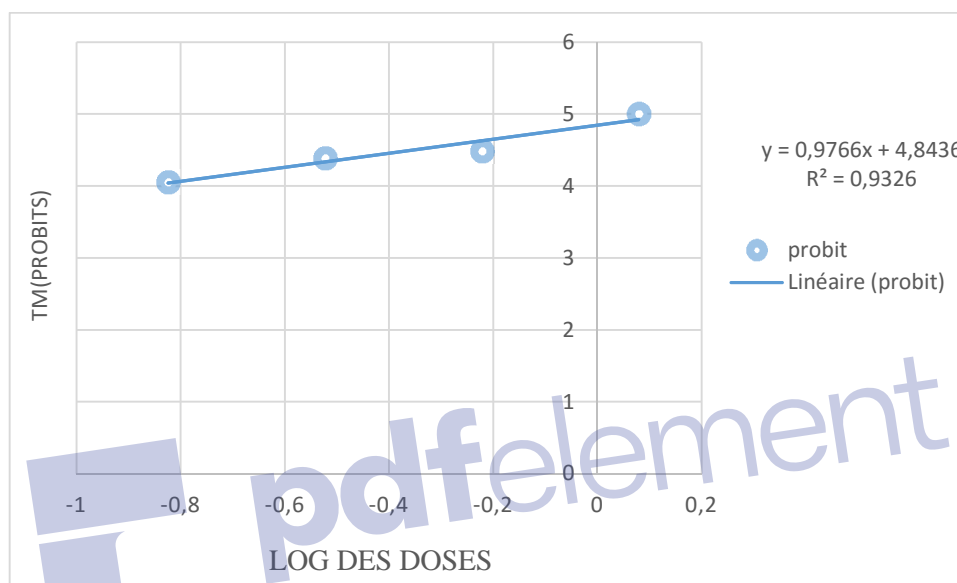


Figure 32 : Droite de régression des doses de *Metarhizium anisopliae* en fonction de la mortalité des larves (L3 et L4) d'*Aedes albopictus* après 72H d'exposition.

La DL90 de *Metarhizium anisopliae* sur les larves (L3 et L4) d'*Aedes albopictus* a été calculée. La droite de régression après une exposition de 72H est de la forme : $y = 0,9766x + 4,8436$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,9326$, la DL90 est de 29,56 g/l.

- Le calcul des TL90 (temps léthal au bout duquel on obtient 90% de mortalité) de *Metarhizium anisopliae* sur les larves (L3 et L4) d'*Aedes albopictus*, nous renseigne sur la variation du temps provoqué par la variation de la dose. Les résultats concernant les valeurs du TL90 des 4 doses sont rapportés dans la figure 33.

Le tableau suivant regroupe les équations de droites de régression nous avons déduit les valeurs du TL90 relatifs à la plus faible et la plus forte dose.

Tableau 10 : Equations des droites de régressions et valeurs des TL90 pour chaque dose de traitement utilisée :

Doses	Equations des droites de régressions	R^2	TL90 (jours)
D1 = 0,15 g/l	$y = 1,0747x + 3,4875$	0,9132	396,27

D4 = 1,2 g/l	$y = 1,608x + 4,2806$	0,9832	17,498
--------------	-----------------------	--------	--------

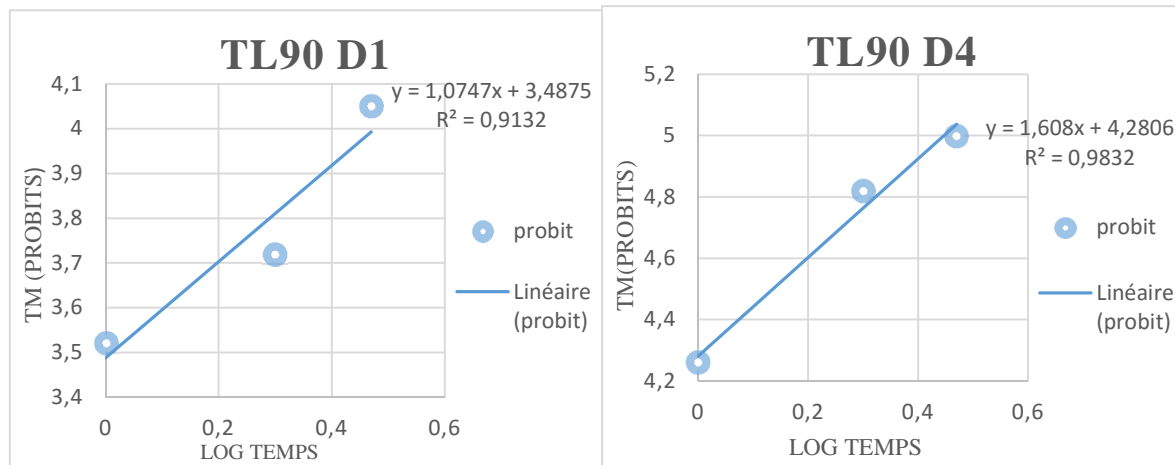


Figure 33 : Efficacité de *Metarhizium anisopliae* dans le temps vis-à-vis des larves (L3 et L4) d'*Aedes albopictus* traitées par les doses D1et D4.

La figure montre que pour dose (D1= 0,15g/l) le TL90 est de 396,27 jours, et pour la dose (D4= 1,2g/l) le TL90 est de 17,498 jours.

III.2.3.Evaluation de la DL 90 de *Metarhizium anisopliae* sur les adultes d'*Aedes albopictus* :

- Le calcul des DL 90 de *Metarhizium anisopliae* rapporté au temps d'exposition, nous renseigne sur le degré de toxicité de ce champignon. Les logarithmes décimaux des doses ont été portés en abscisse et les probits des pourcentages de mortalité en ordonnées, ils sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 11 : Logarithmes décimaux des doses et les probits de mortalité.

	Log Doses	Probits
log D1	-0,82	4,2
log D2	-0,52	4,45
log D3	-0,22	4,5
log D4	0,079	5,31

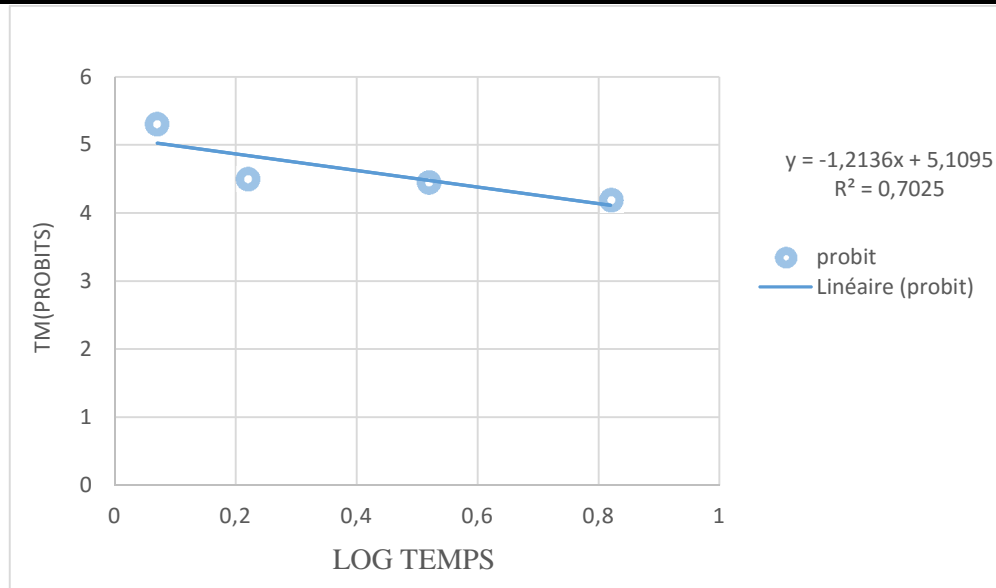


Figure 34 : Droite de régression des doses de *Metarhizium anisopliae* en fonction de la mortalité des adultes d'*Aedes albopictus* après 24H d'exposition.

La DL90 de *Metarhizium anisopliae* sur adultes d'*Aedes albopictus* a été calculée. La droite de régression après une exposition de 24H est de la forme : $y = -1,2136x + 5,1095$ avec un coefficient de corrélation $R^2 = 0,7025$, la DL90 est de 9 g/l.

III.2.4. Analyse de la variance :

➤ Cas des larves

Pour interpréter nos résultats, nous nous sommes appuyés sur l'analyse de la variance à deux critères de classification : Facteur 1 : Doses avec 4 niveaux (D1= 0,15g/l, D2= 0,30g/l, D3=0,60g/l, D4= 1,2 g/l), Facteur 2 : Temps avec 3 niveaux (24H, 48H, 72H).

Tableau 12 : Analyse de la variance

Source de la variation	Sommes des carrées	DDL	Moyenne des carrées	F	P
Modèle corrigé	98,578 ^a	14	7,041	9,319	,000
Intercepter	131,756	1	131,756	174,382	,000
temps	73,244	4	18,311	24,235	,000
dose	17,644	2	8,822	11,676	,000
temps * dose	7,689	8	,961	1,272	,295
Erreur	22,667	30	,756		
Totale	253,000	45			
Total corrigé	121,244	44			

L'analyse de la variance à deux critères de classification révèle (Tableau 9) une différence très hautement significative pour les deux facteurs (doses et temps).

- Test de Newman keuls :
 - ✓ Facteur dose

Tableau 13 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).

dose	N	Sous-groupes		
		1	2	3
témoin	9	,00		
D1= 0,15g/l	9		1,11	
D2= 0,3 g/l	9		1,56	
D3= 0,6 g/l	9		2,00	
D4= 1,2 g/l	9			3,89

À travers le test de Newman Keuls au seuil de 5%, le classement des moyennes de mortalités des larves révèle 2 groupes homogènes, Groupe 1 comporte la dose D1, D2 et D3, le groupe 2 comporte la dose D4, Ce qui explique l'effet similaire des doses (D1, D2 et D3) sur la mortalité des larves.

- ✓ Facteur temps

Tableau 14 : Classement des moyennes pour le facteur2 (Temps)

temps	N	Sous-groupes		
		1	2	3
24h	15	,93		
48h	15		1,73	
72h	15			2,47

Pour le facteur (Temps) le test révèle 3 groupes significativement différents (Tableau 11), le groupe 1 comporte la moyenne 0,93 correspondante au 24H. Le groupe 2 comporte la moyenne correspondant au 48H et le groupe 3 comporte la moyenne correspondant au 72H.

- Cas des adultes

Tableau 15 : Analyse de la variance

Source de la variation	Sommes des carrée	DDL	Moyenne des carrée	F	P
Modèle corrigé	205,367 ^a	9	22,819	7,692	,000
Intercepter	288,300	1	288,300	97,180	,000
temps	118,200	4	29,550	9,961	,000
dose	56,033	1	56,033	18,888	,000
temps * dose	31,133	4	7,783	2,624	,065
Erreur	59,333	20	2,967		
Totale	553,000	30			
Total corrigé	264,700	29			

L'analyse de la variance à 2 critères de Classification (Tableau 12) révèle une différence hautement significative entre les différentes mortalités enregistrées pour les adultes traitées et les témoins, à différents niveaux de temps et à différentes doses.

- Test de Newman & Keuls :
 - ✓ Facteur dose

Tableau 16 : Classement des moyennes pour le facteur1 (Dose).

dose	N	Sous-groupes		
		1	2	3
témoin	6	,00		
D1= 0,15g/l	6		2,50	
D2= 0,3 g/l	6		3,17	
D3= 0,6 g/l	6		3,67	
D4= 1,2 g/l	6			6,17

Le test révèle 2 groupes homogènes. Groupe 1 comporte la dose D1, D2 et D3, le groupe 2 comporte la dose D4. Ce qui explique l'effet similaire des doses (D1, D2 et D3) sur la mortalité.

III.3. Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre :

Les résultats de la fécondité, la fertilité, ainsi que le taux d'émergence des adultes sont consignés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Etude de quelques paramètres biologiques du moustique tigre en conditions contrôlés.

Paramètres biologique	Nombre d'œufs pondus	Nombre d'œufs éclos	Fertilité en %	nymphose (Nymphe)	Emergence (adulte)	Taux d'émergence
	222	104	46.84%	35	32	91.42%

À la lecture du tableau, nous notons que la fécondité par femelle est de 222 sur ce nombre d'œufs émis, 104 ont éclos, soit une fertilité de 46.84 %. Quant au taux d'émergence, nous avons noté 91.42% d'adultes émergés sur 35 nymphes.

Au terme de ce travail, essentiellement consacré à l'évaluation de la toxicité de l'huile essentielle formulée du romarin et du champignon entomopathogène (*Metarhizium anisopliae*) à l'égard du moustique tigre, vecteur d'arboviroses, il nous paraît intéressant de dégager les principaux résultats aux quels nous avons abouti.

- La mortalité induite par les deux bios pesticides testés (huile essentielle formulée du romarin et le champignon, *Metarhizium anisopliae* sur les stades larvaires et adultes du moustique tigre, varie significativement en fonction des doses et du temps ($P=0.000$).
- L'absence de mortalité enregistrée dans le témoin fait déduire que les deux bios pesticides sont toxiques sur les larves du quatrième stade larvaire et sur les adultes.
- L'huile essentielle formulée du romarin a révélé une activité insecticide plus importante sur les stades larvaires (L4) que sur les adultes. En effet avec la plus forte dose (D3= 0,75 g/l), la mortalité chez les adultes n'a pas dépassé les 50% après 24.
- La dose létale de l'huile essentielle formulée du romarin qui tue 90% des larves a été estimée à 0,69 g/l, et le temps léthal nécessaire pour tuer 90% des larves a été évalué à 8h18min pour la plus forte dose (D3= 0,75 g/l).
- Le *Metarhizium anisopliae* a révélé une activité insecticide plus importante sur les stades adultes que sur les stades larvaires (L3 et L4). En effet avec la plus forte dose (D4= 1,2 g/l), la mortalité chez les larves est de 23.33 % après 24 heures de traitement, alors que chez les adultes, elle est de 62,22%.
- Le stade adulte est le plus vulnérable à *M. anisopliae* que les stades larvaires avec des DL₉₀ de 9 g/l et 29,56 g/l respectivement.
- La fécondité d'une femelle d'*Aedes albopictus* gorgée une seule fois après fécondation est de 222 œufs.

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour l'application de l'huile essentielle formulée du romarin et le *Metarhizium anisopliae* à l'égard du moustique tigre dans le cadre de la lutte biologique. L'efficacité de l'huile essentielle formulée du romarin sur les larves nous encourage de tester d'autres espèces végétales non testées vis-à-vis ce vecteur.

Références bibliographiques

- Adhami J. et Murati N. (1987) -Présence du moustique *Aedes albopictus* en Albanie. *Revista Mjekesore*, 1, 13–16.
- Bastien F. (2008) -Effet larvicide des Huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion. *Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat*. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 78P.
- Bawin T., Seye F., Boukraa S., Zimmer JY., Delvigne F. et Francis F. (2014) -La lutte contre les moustiques (Diptera: Culicidae): diversité des approches et application du contrôle biologique, *Entomological Society of Canada*, 476-500.
- Bellini R., Medici A., Calzolari M., Bonilauri P. et Cavrini F. (2012) -Impact of Chikungunya Virus on *Aedes albopictus* Females and Possibility of Vertical Transmission Using the Actors of the 2007 Outbreak in Italy. doi.org/10.1371/journal.pone.0028360.
- Benallal KE., Allal-Ikhlef A., Benhamouda K., Schaffner F. et Harrat Z. (2016) -First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Oran, West of Algeria. *Acta Tropica*, 164: 411–413.
- Benikhlef A. (2013) -Comparaison entre les huiles essentielles et leurs effets antibactériens sur *Rosmarinus officinalis* de la région de Bechar et Ouargla, Mémoire Master, Université Abou Bakr Belkaid-Tlemcen, 36 P.
- Benserradj O. (2014) -Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques, Mémoire Doctorat, Université Constantine 1. 166 P.
- Berrah F. et Ahcene H. (2016) -Etude préliminaire de l'effet larvicide d'une plante du genre *Rosmarinus* à l'égard de *Culex pipiens*, Mémoire Master, PP. 70.
- Bonizzoni M., Gasperi G., Chen X et Anthony A J. (2013) -The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives *Trends Parasitol.* 29(9): 460–468.
- Brousseau C B S. (1994) -Utilisation des destruxines, toxines du champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*, contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette *Choristoneura fumiferana* Clemens, seules ou en présence de *Bacillus thuringiensis var. kurstaki*, Mémoire présenté à l'Université du Québec à Trois-Rivières, 10 P.
- Bukhari T., Takken W. et Koenraadt JM. (2011) - Development of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* formulations for control of malaria mosquito larvae, Laboratory of Entomology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. *Parasites & Vectors* 4:23.
- Butt TM., Greenfield BPJ., Greig C., Maffei TGG., Taylor JWD., Piasecka J., Dudley E., Abdulla A., Dubovskiy I M., Garrido-Jurado I., Quesada-Moraga E., Penny M W. et Eastwood D C. (2013) -*Metarhizium anisopliae* Pathogenesis of Mosquito Larvae: A Verdict of Accidental. *PLoS ONE* 8(12): e81686. doi:10.1371/journal.pone.0081686.

Références bibliographiques

-
- Clarkson J.M. et Charnley A.K. (1996) -New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects, Trends Microbiol. 4:197-204.
 - Clélia O. (2012) - Etudes biologiques et comportementales de deux espèces de moustiques (*Aedes albopictus* et *Anopheles arabiensis*) vectrices de maladies en vue du développement de la Technique de l'Insecte Stérile (TIS) contre ces vecteurs à l'île de la Réunion. Agricultural sciences. Université de la Réunion. Mémoire Master. PP. 63.
 - Couic-Marinier F. et Lobstein A. (2013) -Composition chimique des huiles essentielles, Les huiles essentielles à l'officine, Actualités pharmaceutiques n° 525. 4 P.
 - Degryse A.C., Delfa I. et Voinier M.A. (2008) -Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique. 94, 8-11.
 - Duvallet G., Fontenille D. et Robert V. (2017) -Entomologie médicale et vétérinaire, Institut De Recherche Pour Le Développement, éditions Quae 667 P.
 - Fanny B. (2008) -Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion., Thèse Docteur vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 87 P.
 - Faraji A., Egizi A., Fonseca DM., Unlu I. et Crepeau T. (2014) -Comparative Host Feeding Patterns of the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus*, in Urban and Suburban Northeastern USA and Implications for Disease Transmission. PLoS Negl Trop Dis 8(8): e3037.
 - Frouhat Z. et Lahcini B. (2013) -Lutte biologique par l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, Mémoire Master académique, université Kasdi Merbahi Ouargla, 72 P.
 - Gachkar L., Yadegari D., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Alipoor Astaneh S. et Rasooli I. (2007) -Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils, Volume 102, Issue 3, PP 898-904.
 - Gasper F. et Jeeke G. (2004) -Essential oil from *Origanum vulgare* L. ssp. *virens* (HOFFM. and LINK) IETSWAART: Content, Composition and Distribution within the Bracts. J. Essent. Oil Res., 16, pp. 82-84.
 - González-trujano M E., Pena E I., Martinez A L., Moreno J., Guevara-Ferer P., Déciga-Campos M. et Lopez-Munoz F J. (2007) -Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. Using three different experimental models in rodents *J theopharmacol.* 111:476-482.
 - Grard G., Caron M., Mombo I M., Nkoghe D. et Ondo S M. (2014) -Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*, PLoS Negl Trop Dis 8(2): 2681.
 - Guarrera PM. (1999) - Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. Journal of Ethnopharmacology. Volume 68, Issues 1–3, 15 December 1999, PP.183-192.
 - Gubler D J. (1998) -Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever, Clinical microbiology reviews, July 1998, p. 480–496.

Références bibliographiques

-
- Hawley W A., Pumpuni C B., Brady R H. et Craig G., (1989) -Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *J Med Entomol*, 26(2): 122-9.
 - Hawley WA. (1988) -The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl* 1: 1-39.
 - Hemour M S. (2009) - Effet du bio pesticide « Green Muscle » (*Metarhizium anisopliae* var *acridum* IMI 330189) sur la reproduction du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk., 1775) (Acrididae, Cyrtacanthacridinae) en conditions contrôlées. Mémoire Magister, INPV d'El Harrach. 128 P.

 - Hesham H A R., Abdurahman H N. et Rosli M Y. (2016) -Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.*, 10(16): 117-127.
 - Hilan C., Sfeir R., Jawish D. et Aitour S. (2006) -Huile essentielle de certaines plantes médicinales libanaises de la famille des Lamiaceae, *Lebanese Science Journal*, Vol. 7, No. 2, 10 P.

 - Hori M. (1998) -Repellency of rosemary oil against *Myzus persicae* in a laboratory and in a greenhouse. *J. Chem. Ecol.* 24, 1425–1432.

 - Hori M. (1999) -Antifeeding, settling inhibitory and toxic activities of labiate essential oils against the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 34, 113–118.

 - Huang Y M. (1979) -Medical entomology studies – XI. The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Oriental region with keys to the species (Diptera: Culicidae), *Contributions of the American Entomological Institute*, 15, 1–76.
 - Isman. (2000) - Plant essential oils for pest and disease management. Faculty of Agricultural Sciences, University of British Columbia, Suite 248, 2357 Main Mall, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z4, *Crop Protection* 19

 - Izri A., Bitam I. et Charrel R N. (2011) -First entomological documentation of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894) in Algeria. *Clin Microbiol Infect* 17(7): 1116-111.

 - Jang YS., Baek B R., Yang Y C., Kim M K. et Lee H S. (2008) – Larvicidal activity of leguminous seeds and grains against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 18 (3): 210–213p.

 - Jardak M., Elloumi-Mseddi J., Aifa S. et Mnif S. (2017) -Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia.

 - Kaidi N. (2007) -Essais de lutte biologique aux moyens de champignons entomopathogènes : *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, Mémoire Magister, INPV d'El Harrach, 137 P.

 - Kemassi A., Boukhari K., Cherif R., Ghada K., Bendaken N., Bouziane N., Boual Z., Bouras N., Ould elhadj-khelili A. et Ould elhadj M.D. (2015) -Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae), *Revue ElWahat pour les Recherches et les Etudes* Vol.8 n°1 (2015) : 44 – 6.

Références bibliographiques

-
- Kimberly Moon San Aw et Seow Mun Hue. (2017) -Mode of Infection of *Metarhizium spp.* Fungus and Their Potential as Biological Control Agents *J. Fungi*, 3, 30; doi: 10.3390/jof3020030.
 - Lahlou M. et Berrada R. (2003) -Niticidal activity against *Pediculus humanus capitis*. *Flavour Frag. J.* 18, 124–127.
 - Lema E. (2000) -Etude qualitative de la faune Culicidienne et son influence sur la prévalence plasmodiale en milieu urbain et périurbain de Yaoundé. Mémoire D.I.P.E.S II. ENS: 41.
 - Linley J. (1989) -Comparative structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae. aegypti* and *Ae. Bahamensis* (Diptera: Culicidae) *JMed Entomol*, 26(6): S 10-521.
 - Mahendradas P., Avadhani K et Shetty R. (2013) -Chikungunya and the eye: a review, Mahendradas *et al.* *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, 3:35
 - Manorenjitha. (2006) -The ecology and the biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (field strain) against organophosphates in Penang, Malaysia. Mémoire Master. P125.
 - Martinez-Velazquez M., Rosario-Cruz R., Castillo-Herrera G., Flores-Fernandez J M., Alvarez A H. et Lugo-Cervantes E. (2011) -Acaricidal Effect of Essential Oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Entomological Society of America, Journal of Medical Entomology*, 48(4):822-827. 6 P.
 - Mitchell C J. (1995) -The role of *Aedes albopictus* as an *arbovirus* vector. *Parassitologia*, 37, 109–113.
 - Mohamedi-Bouzina A. (2013) -Evaluation de l'efficacité d'un champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff, 1880) sur des populations de *Culex pipiens* (Linné, 1758) et comparaison avec la cyperméthrine en conditions contrôlées, Mémoire Master, Université Blida-1. 57P.
 - Moretti MDL., Bazzoni E., Passino GS. et Proto R. (1998) -Antifeedant effects of some essential oils on *Ceratitis capitata* Wied. (Diptera: Tephritidae). *J. Essential Oil Res.* 10, 405–412.
 - OMS. (2017) -Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme – seconde édition, ISBN: 978 92 4 251157 4. P55.
 - Passino GS., Bazzoni E., Moretti MDL. et Prota R. (1999) -Effects of essential oil formulation on *Ceratitis capitata* Wied (Dipt. Tephritidae) adult flies. *J. Appl. Entomol.* 123, 145–149.
 - Paupy C., Delatte H., Bagny L. et Corbel V D. (2009) -*Aedes albopictus*, an *arbovirus* vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11(14-15): 1177-1185.

Références bibliographiques

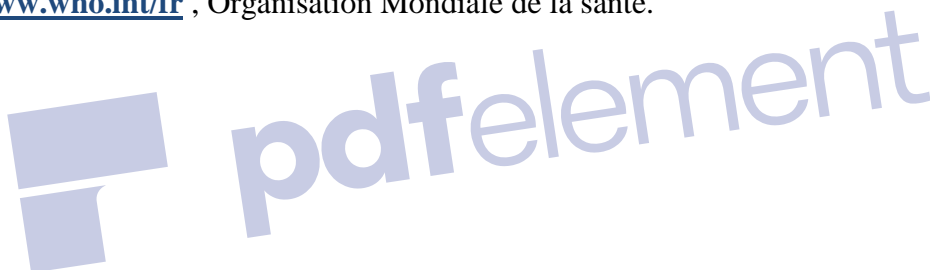
-
- Ranil W., Kennedy C J. et Lowenberger C A. (2008) -Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). 8P.
 - Ranson H., Burhani J., Lumjuan N. et Black WC. (2010) -Insecticide resistance in dengue vectors. *Tropica net journal*.
 - Reiter P. et Sprenger D. (1987) -The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 3:494-501.
 - Rios L. et Maruniak J E., (2004) -Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse) (Insecta: Diptera: Culicidae), Department of Entomology and Nematology, UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611.
 - Ristorcelli D.Tomic F. et Casanova J. 1998 -C-NMR as a tool for identification for major terpens exemplified by the essential oil of *Lavandula stoechas L.*, *Flavour and Fragrance Journal* .Vol.13,PP.154-158.
 - Robert L J K. (1989) -Susceptibility of female *Aedes albopictus* from Texas to commonly used adulticides. *J Am Mosq Control Assoc* 5(2): 251-253.
 - Rodhain F. (1993) -*Aedes albopictus* in Europe: a real threat. *Bull Soc Pathol Exot* 86(1): 3.
 - Schorsch G. (2000) -La formulation : de l'art à la science du compromis. In *Actualité chimique* .PP. 20-24.
 - Sellami S., Tounsi S. et Jamossi K. (2015)- La lutte biologique, alternative aux produits phytosanitaires chimiques, Centre de Biotechnologie de Sfax, Laboratoire des Biopesticides, B .P. "1177" 3018. Sfax, Tunisie, ISSN 2286-5314.
 - Smith S. (2006) -Série de manuels de formation sur l'utilisation des pesticides au Canada, chapitre 1 renseignements généraux, volume 1 : 1-19 .
 - Swisseo. (2005) -Plantes aromatiques et médicinales. Cahier des charges. Institut Suisse des huiles essentielles. Certification des huiles essentielles Ed. 11. 174p.
 - Tamaloust N. (2007) –bioécologie des nématocères dans l'algérois. Essai de lutte biologique par *Metarhizium anisopliae* contre les larves de *Culex pipiens* Linné, 1758 (Nematocera, Culicidae). Mémoire Magister, Institut National Agronomique El-Harrach-Alger. 132PP.
 - This H. (2000). *La gastronomie moléculaire: la chimie n'oublie pas le citoyen qui cuisine* Ed. *Actualité chimique*.pp.58-60.
 - Tiago P V., Neiva T., Elza A. et Alves L. (2014) -Biological insect control using *Metarhizium anisopliae*: morphological, molecular, and ecological aspects, *Ciência Rural*, Santa Maria, V.44, N.4, p.645-651.
 - Tran A., Grégory L., Guillaume L., Benoit R., Demarchi M., Cros M., Cailly P., Aubry-Kientz M., Balenghien T. et Ezanno P. (2013) -A Rainfall and Temperature Driven Abundance Model for *Aedes albopictus* Populations, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 1698-1719; doi: 10.3390/ijerph10051698.

Références bibliographiques

-
- Tsai P et Teng H. (2016) -Role of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes albopictus* (Skuse) in local dengue epidemics in Taiwan, Tsai and Teng BMC Infectious Diseases 16:662.
 - Valerio LFM. (2010) -Host feeding patterns of *Aedes albopictus* (Dipteria: culicidae) in urban and rural contexts within Roma province, Italy. Vector-borne and zoonotic diseases, 10 (3), 291-294.
 - Woodring J. et Davidson EW. (1996) -Biological control of mosquitoes. The biology of disease vectors. Sous la direction de B.J. Beaty et W.C. Marquardt. University Press of Colorado, Boulder, Colorado, Les États-Unis d'Amérique. P. 530–548.
 - Zimmermann G. (2007) -Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontr.Sci.Technol .17 :879-920.

Liens consultés :

- EID méditerranée. (2010)-Suivi de l'initiation naturelle de la diapause d'*Aedes albopictus* (skuse 1894). (<http://www.eid-med.org/page/recherche-et-developpement>).
- <https://ecdc.europa.eu> , European Centre for Disease Prevention and Control.
- <http://www.naro.affrc.go.jp> , National Agriculture and Food Research Organization.
- <http://www.who.int/fr> , Organisation Mondiale de la santé.



Annexe 1 : équipements et produits utilisés au laboratoire

Outils de laboratoire :

- Aiguillé pour l'injection.
- Des bacs référencié.
- Trousse à dissection composée :
Scalpels, pinces, aiguilles lancéolées, 2 paires de ciseaux, 1 sonde cannelée et 1 spatule pour peser.
- Des cages.
- Le kit insecticide de l'OMS
- Gobelets en plastique.
- Aspirateur à bouche.
- Verrerie.
- Pipettes en plastique.
- Papier buvard.
- Micropipette.

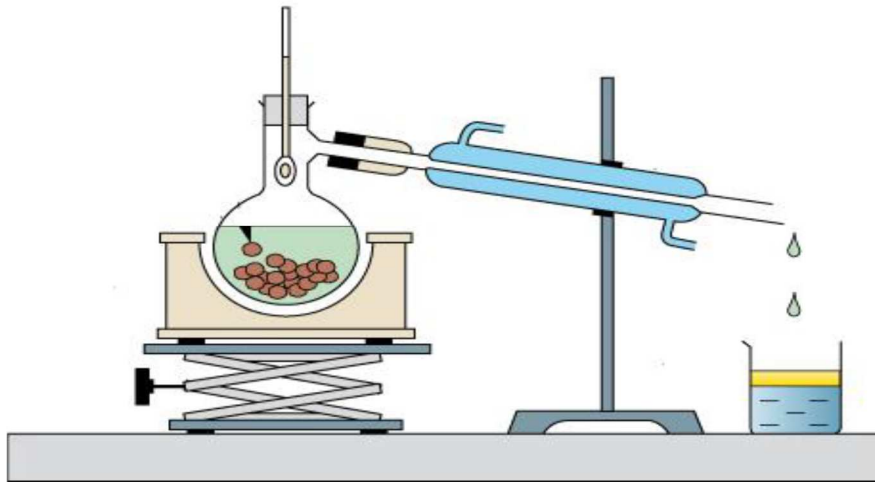
Appareillage :

- Humidificateur.
- Thermo-hygromètres : permettent de mesurer très facilement la température et le taux d'humidité de l'air.
- Loupe binoculaire.
- Microscope optique.
- Une balance.

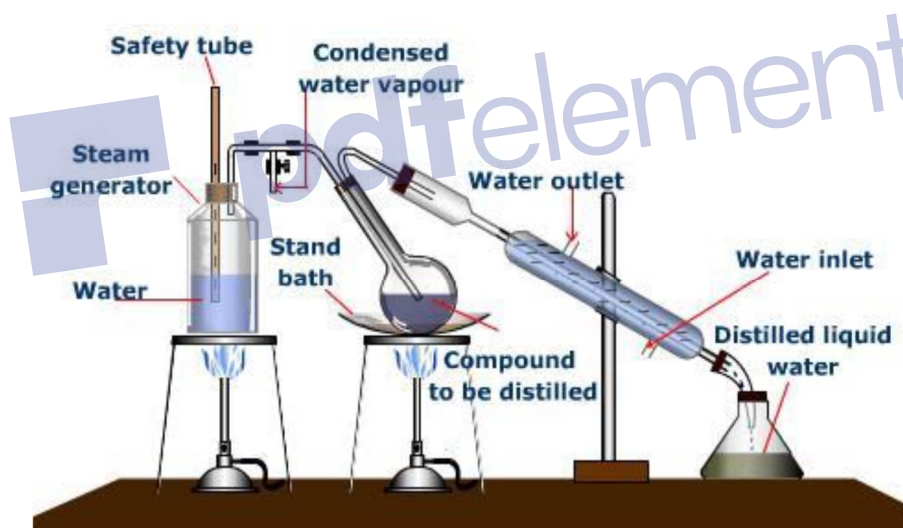
Produits :

- Anesthésiant : IMALGENE 1000: solution injectable (0.4 μ), anesthésiant Kétamine sous forme de chlorhydrate.
- Croquette de chat
- Eau distillée
- Jus sucré à 10%

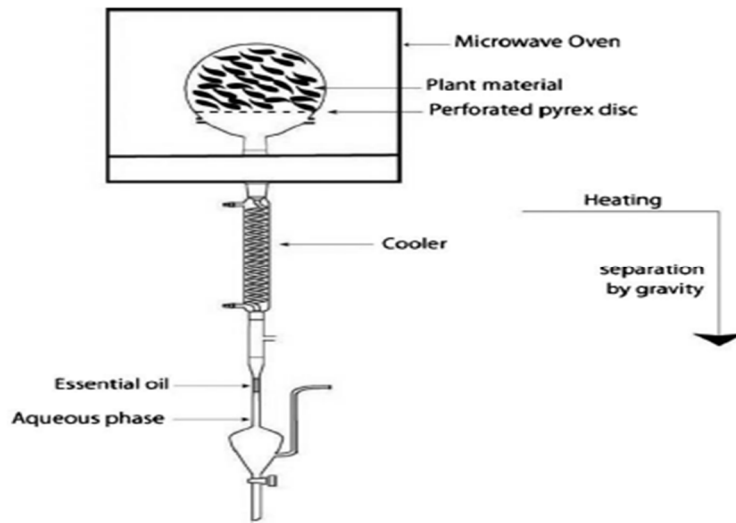
Annexe 2 : Méthodes d'extraction des huiles essentielles



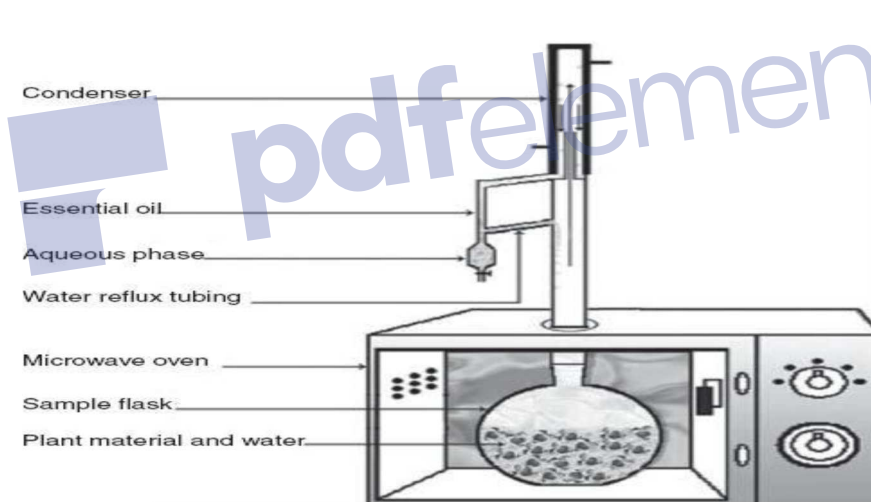
L'appareil de subventionnement schématique pour l'hydrodistillation (Hesham et *al.*, 2016).



L'appareil schématique de subventionnement pour la distillation à la vapeur (Hesham et *al.*, 2016).



Hydro-diffusion par micro-ondes et gravité (MHG) (Hesham et *al.*, 2016).



Hydrodistillation assistée par micro-ondes (Hesham et *al.*, 2016).

Annexe 3 : Fiche technique de GREEN MUSCLE

Information Générale

- **Nom commercial du produit:** GREEN MUSCLE
- **Catégorie d'usage:** Biopesticide (acridicide)
- **Domaine d'application :** Lutte biologique antiacridienne
- **Ravageurs cibles:** Les criquets de l'infra-ordre Acrididea (Orthoptera).
- **Cultures:** Toutes cultures attaquées par les criquets

Matière active

- **Matière active :** Matériel biologique
- **Nom scientifique de l'agent biologique :** *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* souche IMI 330189
- **Stade de développement :** Conidies (spores).
- **Nature de l'organisme :** un champignon pathogène appartenant au groupe des champignons mitosporiques, qui sont des anamorphes (stades asexués) de champignons dans l'embranchement Ascomycota. Il est très spécifique aux criquets. Parce que les criquets ont la capacité de détoxifier les toxines des autres champignons entomopathogènes, *M. acridum* a développé une autre stratégie pour tuer son hôte et dans le processus a perdu les gènes pour la synthèse de toxines.
- **Contenu en matière active :** $\pm 5 \cdot 10^{10}$ spores sèches par g
- **Viabilité à l'issue de l'usine :** Au moins 90%
- **Impuretés :** moins d'1%
- **Contenu en eau :** moins de 6%
- **Taille des particules :** moins de 60 μm

Méthode d'analyse :

- Culture sur milieu artificiel et examen des structures sporogènes afin de vérifier l'identité du champignon
- Analyse d'ADN et/ou d'isozymes afin de vérifier la souche (marqueur disponible).

Formulation

- **Type de formulation:** TC
- **Liquide de mélange :** Gasoil ou une autre huile appropriée, par ex. 70% pétrole lampante plus 30% huile végétale.
- **Dose recommandée :** 50 g/ha dans 1 L (application aérienne) ou 2 L (application terrestre) de gasoil.
- **Doses appliquées :** 25 à 100 g/ha : selon la densité de la végétation et la viabilité des spores.
- **Efficacité au champ:** Une dose de 50 g/ha dans 1-4 L de gasoil (en fonction de la densité de la végétation) ou une autre huile appropriée réduit les populations par au moins 80% dans 3 semaines (ou moins dans la présence d'ennemis naturels tels que des oiseaux).

Propriétés physico-chimiques :

- **Apparence** : Poudre fine de couleur vert marin.
- **Odeur** : sans odeur particulière
- **Stabilité** : Durée de stockage > 5 ans à 4°C.
- **Incompatibilités** : Incompatible avec la plupart des fongicides
- **Compatibilité avec d'autres pesticides** : compatible avec certains pesticides utilisés dans la lutte antiacridienne, par ex. les pyréthriinoïdes.
- **Stabilité en stockage** : Des données expérimentales montrent que des conidies sèches ($\leq 5\%$ contenu en eau) peuvent être stockées jusqu'à 2 ans à $\pm 20^\circ\text{C}$ et pendant plus de 3 ans à $< 10^\circ\text{C}$. Des modèles de stockage indiquent qu'une viabilité des conidies de $> 80\%$ peut être maintenue pendant > 10 ans, si le matériel technique est stocké dans des sachets imperméables sous réfrigération ($< 10^\circ\text{C}$). Sous des conditions de stockage tropicales, une durée de vie de > 2 ans peut être attendue à des températures de nuit/jour de $20 - 30^\circ\text{C}$ et approximativement 6 mois sous un régime de $30 - 40^\circ\text{C}$.

Toxicité et pathogénicité

- **Toxicité acute orale (rat)** : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif
- **Toxicité acute dermique (rat)** : $DL_{50} > 2$ g/kg poids vif
- **Toxicité acute inhalation (rat)** : $CL_{50} > 17,25$ mg/kg poids vif
- **Toxicité intrapéritonéale (rat)** : $DL_{50} > 100$ mg/kg poids vif
- **Irritation œil (lapin)** : Oui
- **Irritation peau (lapin)** : Oui, mais exposition doit dépasser 24 h
- **Sensibilisation** : Très rare
- **Toxicité envers les poissons** : CL_{50} de 96 heures > 100 mg/L
- **Toxicité envers les abeilles** : $DL_{50} > 100$ μg /individu (mortalité dans test au laboratoire due à la pathogénicité, pas la toxicité ; tests dans des ruches n'ont pas montré des signes d'intoxication ni de pathogénicité)
- **Toxicité envers les vers de terre** : $CL_{50} > 1$ g/kg de sol sec.
- **Toxicité envers les oiseaux** : Non toxiques dans des tests d'alimentation contaminée.
- **Phytotoxicité**: La matière active n'est pas phytotoxique. Le mélange dans les épandeurs n'est pas phytotoxique non plus si le volume d'application ne dépasse pas 5 L/ha.

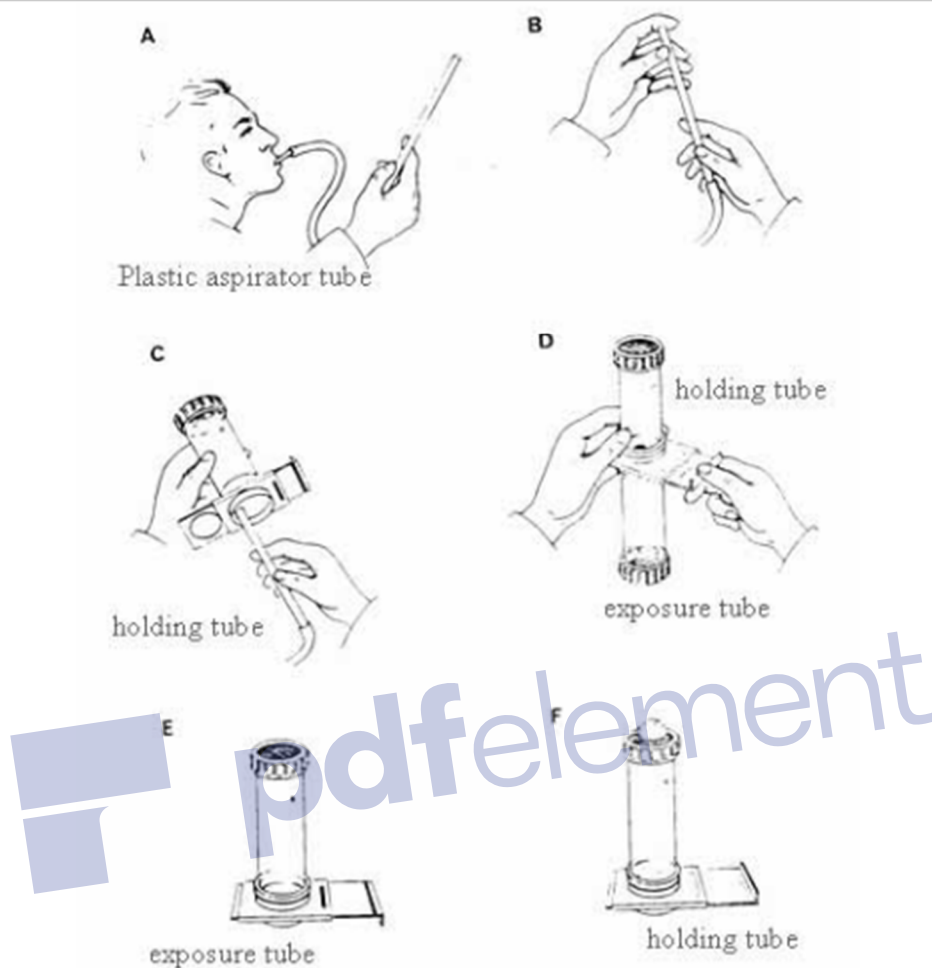
ANNEXES



Le biopesticide Green Muscle (IMI 330139) (a), le manuel d'utilisateur (b) et la fiche technique (c) (Originale).

Annexe 4 : Le kit de l'OMS (étude de la sensibilité des moustiques adultes).

Description et procédure d'essai :



Le kit de test de l'OMS se compose de deux tubes en plastique (125 mm de longueur, 44 mm de diamètre), chaque tube étant équipé à une extrémité d'un tamis de 16 mailles. Un tube (tube d'exposition) est marqué avec un point rouge, l'autre (tube de maintien) avec un point vert. Le tube de maintien est vissé sur une unité coulissante avec un trou de 20 mm dans lequel un aspirateur s'adapte pour introduire les moustiques dans le tube de maintien. Le tube d'exposition est ensuite vissé de l'autre côté de l'unité coulissante. Glisser la cloison dans cette unité ouvre une ouverture entre les tubes de sorte que les moustiques peuvent être soufflés doucement dans le tube d'exposition pour commencer le traitement, puis soufflé dans le tube de maintien après l'exposition chronométrée (généralement une heure). Les papiers filtres sont maintenus en place contre les parois des tubes par quatre pinces à ressort: deux pinces en acier pour fixer le papier ordinaire aux parois du tube de maintien et deux pinces en cuivre pour fixer le papier insecticide à l'intérieur du tube d'exposition.

Annexe 5 : Table de probits.

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09