

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biotechnologie



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de :

Master 2

SPÉCIALITÉ : phytopharmacie et protection des végétaux

Par :

HADJ MEHDI SANAA

Valorisation d'un insecticide à base d'un biopolymère pour la protection biologique

Soutenue le 15 Juillet 2025 devant le jury :

Président (e) :	Amara Nacera	MCA	U.Blida 1
Examineur(trice) :	Kheddar Reguia	MBC	U.Blida 1
Promoteur (trice)	Allal Benfekih Leila	PR	U.Blida 1
Co-Promoteur(trice):	Ayachi Nabila	MCA	U.Blida 1

Mme Kheddar R

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1
Faculté des Sciences de la nature et de la vie
Département de biotechnologie



THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de :

Master 2

SPÉCIALITÉ : phytopharmacie et protection des végétaux

Par :

HADJ MEHDI SANAA

Valorisation d'un insecticide à base d'un biopolymère pour la protection biologique

Soutenue le 15 Juillet 2025 devant le jury :

Président (e) :	Amara Nacera	MCA	U.Blida 1
Examineur(trice) :	Kheddar Reguia	MBC	U.Blida 1
Promoteur (trice)	Allal Benfekih Leila	PR	U.Blida 1
Co-Promoteur(trice):	Ayachi Nabila	MCA	U.Blida 1

Remerciements

"At times our own light goes out and is rekindled by a spark from another person. Each of us has cause to think with deep gratitude of those who have relit the flame within us."

À l'issue de ce parcours, je ressens le besoin profond d'exprimer ma gratitude à celles et ceux qui ont été ma lumière dans les moments sombres, ma force dans les instants de doute, et mon refuge dans les tempêtes. Je tiens tout d'abord à remercier du fond du cœur tous mes proches, qui m'ont entourée d'un amour inconditionnel et d'un soutien indéfectible.

Merci à mes parents pour les sacrifices silencieux, les encouragements constants et les valeurs qu'ils m'ont transmis : la patience, la dignité, le respect et la persévérance et je lui suis sincèrement reconnaissante, Leur confiance en moi a été la boussole qui m'a guidée à travers chaque étape de ce projet.

Je tiens à remercier ma promotrice **Mm Allal Benfekih Leila** pour ses interventions ses conseils son aide et pour sa confiance et ma co-promotrice **Mm Ayachi**, sa bienveillance, son encouragement. Par sa présence constante, m'apporter un réel soutien à chaque étape de ce travail

À mes amis proches, qui ont su m'écouter, m'encourager, me faire rire parfois quand je pensais ne plus en être capable votre bienveillance et votre énergie ont été essentielles. Vous avez su être cette étincelle qui rallume la flamme.

Je n'oublie pas non plus toutes les personnes, croisées sur ce chemin qui m'ont offert un regard bienveillant, un mot juste ou une aide inattendue. Leur générosité a laissé une empreinte durable.

Enfin, je tiens à me remercier moi-même. Pour n'avoir pas abandonné. Pour avoir continué à croire, même quand c'était difficile. Pour chaque pas accompli avec détermination, chaque page écrite avec passion. Ce mémoire est l'aboutissement d'un engagement personnel et d'une volonté sereine de réussir.

À tous, merci infiniment.

Dédicace

À mes parents,

Pour leur amour silencieux, leur patience infinie et leur confiance en moi, même dans les moments où moi-même j'en doutais. Ce travail est le fruit de votre éducation, de vos sacrifices et de vos prières.

À mes frères,

Pour leur présence discrète mais rassurante, leur soutien et leur affection qui, même dans le silence, m'ont toujours portée.

À ma meilleure amie,

Loin des yeux mais toujours si proche de l'âme, ton écoute et ton aide ont été d'un soutien inestimable.

À ma famille, et tous ceux qui, par un mot, un geste ou une prière, m'ont apporté la force et le courage d'avancer.

À toutes celles et ceux qui m'ont portée, inspirée ou simplement crue capable.

Résumé

Dans le cadre de la lutte biologique contre les ravageurs des denrées stockées, cette étude vise à développer une formulation naturelle à base de chitosane extrait de larves de *Hermetia illucens*, combiné à une huile essentielle de menthe, afin de contrôler *Tribolium castaneum*, un insecte nuisible majeur du blé stocké. Le chitosane a été extrait selon un protocole simplifié en laboratoire, puis caractérisé par spectroscopie FTIR et rhéologie, révélant un bon degré de désacétylation (85–90 %) et un comportement viscoélastique adapté à la formulation. Une microcapsule chitosane/HE a ensuite été préparée et testée in vitro sur des adultes de *T. castaneum*. Les résultats ont montré que la formulation combinée induit des mortalités significativement plus élevées que le chitosane ou l'huile seule, avec un effet synergique confirmé par l'analyse des LT_{50} , des mortalités corrigées et des régressions probit. Ce travail valorise une biomasse entomologique locale dans une perspective de biocontrôle durable, efficace et respectueux de l'environnement.

Mots clés :

1. Chitosan
2. *Hermetia illucens*
3. Peppermint essential oil
4. *Tribolium castaneum*
5. Bioinsecticide

Abstract

In the context of biological control of stored-product pests, this study aimed to develop a natural insecticide formulation based on chitosan extracted from *Hermetia illucens* larvae, combined with peppermint essential oil, to control *Tribolium castaneum*, a major insect pest of stored wheat. Chitosan was extracted through a simplified laboratory protocol and characterized by FTIR spectroscopy and rheological analysis, revealing a high degree of deacetylation (85–90%) and a viscoelastic behavior suitable for formulation. A microcapsule combining chitosan and essential oil was then formulated and tested in vitro on adult *T. castaneum*. Results showed that the combined formulation induced significantly higher mortalities than chitosan or essential oil alone, with a synergistic effect confirmed through corrected mortality rates, probit regression, and LT_{50} values. This study highlights the potential of insect-derived biopolymers as effective, eco-friendly alternatives to chemical insecticides in sustainable pest management.

Keywords :

1. Chitosane
2. *Hermetia illucens*
3. Huile essentielle de menthe
4. *Tribolium castaneum*
5. Bioinsecticide

الملخص

في إطار مكافحة الآفات الحيوية التي تصيب الحبوب المخزنة، تهدف هذه الدراسة إلى تطوير تركيبة طبيعية (، ممزوجة بزيت *Hermetia illucens* تعتمد على الكيتوسان المستخرج من يرقات ذبابة الجندي الأسود) ، وهو من أهم الحشرات الضارة بالقمح المخزن. *Tribolium castaneum* النعناع العطري، للسيطرة على تم استخراج الكيتوسان باستخدام بروتوكول مبسط في المختبر، وتمت دراسته بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة (والتحليل الريولوجي، مما أظهر درجة نزع أستلة مرتفعة (85%–90%) وسلوكاً مرناً FTIR تحت الحمراء) ولزجاً مناسباً للتركيبة.

بعد ذلك، تم تحضير كبسولات دقيقة من الكيتوسان والزيت العطري واختبارها مخبرياً على الحشرات البالغة. أظهرت النتائج أن التركيبة المركبة تسببت في نسب وفيات أعلى بكثير مقارنة بالكيتوسان أو الزيت العطري كل على حدة، مع وجود تأثير تآزري واضح، وفقاً لنتائج معدلات الوفيات المصححة، وتحليل الانحدار، والقيم LT_{50} الزمنية المميتة)

تُبرز هذه الدراسة أهمية الكيتوسان كملمر طبيعي مستخرج من الحشرات في تطوير مبيدات حيوية فعالة وصديقة للبيئة، ضمن منهج الزراعة المستدامة.

○ الكلمات المفتاحية

- الكيتوسان
- ذبابة الجندي الأسود
- زيت النعناع العطري
- خنفساء الدقيق *Tribolium castaneum*
- مبيد حيوي

Listes des figures

Figure 1. Morphologie de la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) (Oliveira *et al.*, 2016).

Figure 2 : Position systématique d'*Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758).

Figure 3 : Morphologie de la mouche-soldat noire adulte. (Oliveira *et al.*, 2016).

Figure 4 : Distribution géographique de *Hermetia illucens* en Afrique. Modifié à partir de GBIF.

Figure 5 : Cycle de développement de la mouche-soldat noire

Figure 6 Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine (**Kumirska, 2011**)

Figure 7 Schémas des structures moléculaires de la chitine et du chitosane (**Update on Chitin and Chitosan from Insects, 2021**).

Figure 8. Activité du chitosane dans le domaine biomédical (Md Minhajul Islam *et al.*, 2020),

Figure 9 : les larves sécher et broyer de *Hermetia illucens* (Originale)

Figure 10 (A et B) : L'huile essentielle de *Mentha Spicata* obtenu du laboratoire d'extraction BioExtraPAMAL

Figure 11 : Schéma du processus d'extraction du chitosane

Figure 12 : Les étapes de déminéralisation et rinçage (originale)

Figure 13 : Les étapes de déprotéinisation et séchage (originale)

Figure 14 : Les étapes de blanchiment (originale)

Figure 15 : Les étapes de déacétylation (originale)

Figure 16 : Aspect du chitosane obtenu G400 sous loupe binoculaire (Originale)

Figure 17 : le spectrophotomètre FTIR utilisée dans cette analyse (Originale)

Figure 18 : Spectre FTIR du chitosane extrait (avec un cycle de désacétylation).

Figure 19 : Spectre FTIR du chitosane extrait (avec deux cycles de désacétylation)

Figure 20 : Test de viscoélasticité de l'essai A(Chitosane)

Figure 21 : Courbe d'écoulement Essai A (chitosane)

Figure 22 : La préparation des trois doses de chitosane

Figure 23 : Disposition expérimentale des boîtes pétri pour l'essai in vitro

Figure 24 : Variation temporelle des mortalités observées chez l'adulte de *T. castaneum* chez les lots traités et témoins.

Figure 25. Moyennes des pourcentages de mortalités observées de *T. castaneum* selon les traitements réalisés.

Figure 26 : Évolution des mortalités corrigées des adultes de *T. castaneum* selon le traitement utilisé

Figure 27 : Effets comparatifs des bioproduits testés en fonction du temps d'exposition et de l'interaction temps * bioproduit.

Figure 28 : Droites de régression des probits de mortalités corrigées en fonction du logarithme du temps d'exposition de *T. castaneum* aux bioproduits testés (CH et He+ tween).

Figure 29 : Temps létaux (50 et 90) estimés en jours sur *T. castaneum*

Liste des tableaux :

Tableau 1. Composition en acides gras des larves de la mouche soldat noire (g/kg de matière sèche) (Lu *et al.*, 2022)

Tableau 1 : Tableau de matériel utilisé dans l'expérimentation

Tableau 2 : Bandes FTIR caractéristiques du chitosane

Tableau 3 : Les paramètres expérimentales de doses de chitosane

Tableau 4 : Les paramètres expérimentales des témoins

Tableau 5 : Les paramètres expérimentales des traitements

Tableau 6 : Bandes FTIR caractéristiques du chitosane

Listes des abréviations :

BSF = *Black Soldier Fly* (mouche soldat noire)

CH = Chitosane

HE = Huile essentielle

FTIR = Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

DD = Degré de désacétylation

LT₅₀ / LT₉₀ = Temps létal pour 50 % / 90 % de mortalité

T. castaneum = *Tribolium castaneum*

Table des matière

Introduction

Chapitre I : Synthèse bibliographique	15
1.1. Généralités sur <i>Hermetia illucens</i> et son potentiel biotechnologique	16
1.1.1. Morphologie de <i>Hermetia illucens</i> (Mouche soldat noire)	16
1.1.2. Classification	17
1.1.3. Distribution géographique et habitat	17
1.1.4. Éthologie et cycle de développement	18
1.2. Rôle écologique et environnemental de <i>Hermetia illucens</i>	20
1.2.1. Dégradation des matières organiques	20
1.2.2. Réduction des émissions de gaz à effet de serre	20
1.2.3. Effet sur les populations d'insectes nuisibles	20
1.3. Valorisation des larves de <i>Hermetia illucens</i>	20
1.3.1. Source de nutrition animale	21
1.3.2. Utilisation en compostage et bioénergie	21
1.4. Composition biochimique des larves de <i>Hermetia illucens</i>	21
1.4.1. Protéines	21
1.4.2. Lipides	22
1.4.3. Minéraux	22
1.4.4. Chitine et chitosane	23
1.5. Chitine et chitosane	23
1.5.1. Structure physique de la chitine	23
1.5.2. Structure physique du chitosane	24
1.5.3. Fonctionnalités et applications	25
1.6. Le chitosane comme agent bioactif	27
1.7. Préservation des céréales stockées : enjeux et stratégies	27
1.7.1. Pertes post-récolte causées par les insectes	27
1.7.2. Utilisation des huiles essentielles et du chitosane dans la lutte contre	28
<i>Tribolium castaneum</i>	
1.7.3. <i>Tribolium castaneum</i> : biologie et impact	28
1.7.4. Identification de <i>Tribolium castaneum</i>	29
1.7.5. Cycle de vie et dégâts	29
1.7.6. Préservation des céréales stockées : une priorité stratégique	29
Chapitre II : Matériel et Méthodes	19 30

1. Objectif de l'étude	19	31
2. Matériel et méthode		31
2.1. Matériel biologique		31
2.1.1. Larves de <i>Hermetia illucens</i>	20	31
2.1.2. Huile essentielle de menthe (<i>Mentha spicata</i>)	20	32
2.1.3. <i>Tribolium castaneum</i>	21	33
2.2. Matériel de laboratoire	21	33
3. Méthodes	21	33
3.1. Extraction du chitosane	22	33
3.1.1. Déminéralisation	22	35
3.1.2. Déprotéinisation	22	36
3.1.3. Décoloration (blanchiment)	22	37
3.1.4. Première déacétylation	23	38
3.1.5. Deuxième déacétylation	23	39
3.2. Caractérisation du chitosane	24	40
3.2.1. Analyse FTIR	24	40
3.2.2. Après la première déacétylation	24	41
3.2.3. Après la deuxième déacétylation	25	42
3.3. Étude rhéologique	25	42
3.3.1. Comportement viscoélastique	25	43
3.3.2. Courbe d'écoulement	26	44
4. Protocole expérimental des tests in vitro	26	44
4.1. Préparation des formulations bioactives	26	44
4.2. Préparation des témoins	27	45
4.3. Conditions des essais in vitro	27	46
Chapitre III : Résultats et Discussion	28	48
1. Résultats	28	49
1.1. Les rendements des étapes d'extraction du chitosane	28	49
1.2. Rendement en chitosane (après double déacétylation)	28	50
1.3. Résultat d'analyse FTIR	29	51
1.4. Résultats de la rhéologie	30	53
1.5. Bandes FTIR caractéristiques du chitosane	31	53
1.6. Analyse des courbes de mortalité et paramètres de létalité	31	57
1.7. Étude statistique des effets des bioproduits sur <i>Tribolium castaneum</i>	32	58

2. Discussion	33	60
3. Conclusion		63
4. Perspectives		64
5. Annexes		

Introduction

Introduction

Dans un contexte mondial où la maîtrise des pertes post-récolte constitue un enjeu fondamental pour assurer la sécurité alimentaire (Hengsdijk & de Boer, 2017), la conservation durable des céréales stockées apparaît aujourd'hui comme une priorité stratégique. Consciente de cet enjeu, l'Algérie a inscrit la sécurité alimentaire parmi les axes majeurs du développement scientifique à travers le **Programme National de Recherche (PNR)**, défini par le **décret exécutif n°21-89 du 1er mars 2021**, en application de la **loi n°15-21 du 30 décembre 2015** relative à l'orientation de la recherche scientifique et du développement technologique (MERS, 2022). Cette orientation traduit une volonté politique affirmée de mobiliser la recherche nationale pour répondre aux besoins essentiels du pays et anticiper les défis structurels liés à la durabilité et à la souveraineté alimentaire. Parmi les principaux obstacles rencontrés par la filière céréalière algérienne figure l'infestation des grains stockés par des insectes ravageurs (Karima & Hocine, 2017), notamment *Tribolium castaneum*, un coléoptère responsable de pertes considérables sur les plans quantitatif et qualitatif (Zhu et al., 2022). Le recours traditionnel aux insecticides chimiques de synthèse, bien qu'efficace à court terme, soulève plusieurs problématiques : apparition de résistances, accumulation de résidus toxiques, risques pour la santé humaine et effets néfastes sur l'environnement.

Face à ces limites, la recherche scientifique s'oriente de plus en plus vers des alternatives naturelles et respectueuses de l'environnement. Parmi elles, les **huiles essentielles** issues de plantes aromatiques se distinguent par leurs propriétés insecticides, répulsives et antifongiques, démontrées contre de nombreux ravageurs des denrées stockées (Naimi et al., 2025). Cependant, leur efficacité demeure souvent restreinte par leur forte volatilité, qui entraîne une évaporation rapide et limite la persistance de leur action en conditions réelles de stockage.

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail, qui vise à valoriser un **bio-insecticide naturel** associant une huile essentielle à un **biopolymère stabilisant**, le **chitosane**. Ce polymère, dérivé de la chitine, se distingue par sa biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa capacité à former des films protecteurs capables d'encapsuler et de libérer progressivement pour objectif de réduire la volatilité du composé aromatique, d'améliorer la persistance de son effet insecticide et d'assurer une protection biologique durable des céréales stockées contre *Tribolium castaneum* (Mohan et al., 2024)

Chapitre I

Synthèse bibliographique

1. 1. Généralités sur *Hermetia illucens* et son potentiel biotechnologique

1.1.1. Morphologie d'*Hermetia illucens* (Mouche soldat noire)

La mouche soldat noire (*Hermetia illucens*), connue en anglais sous le nom de « Black Soldier Fly » (BSF) (Figure 1), est un insecte appartenant à l'ordre des diptères et caractérisé par une métamorphose complète au cours de son cycle de vie. Elle se distingue par des fémurs et des tibias de couleur noire, tandis que les extrémités de ses pattes (tarses) présentent une teinte jaunâtre. Ses antennes, longues et droites, dépassent légèrement de la tête et sont protégées lors de l'enfouissement dans le substrat alimentaire par un coussinet antennaire large et solide (Bonelli et al., 2020).

Les adultes mesurent généralement entre 15 et 22 mm (Sheppard et al., 2002). La femelle, souvent plus grande que le mâle, se reconnaît à son abdomen rougeâtre, tandis que celui du mâle présente une teinte bronze (Oliveira et al., 2016). Le deuxième segment abdominal comporte deux petites zones translucides. Les individus adultes sont de grande taille, avec une longueur moyenne comprise entre 12 et 17 mm

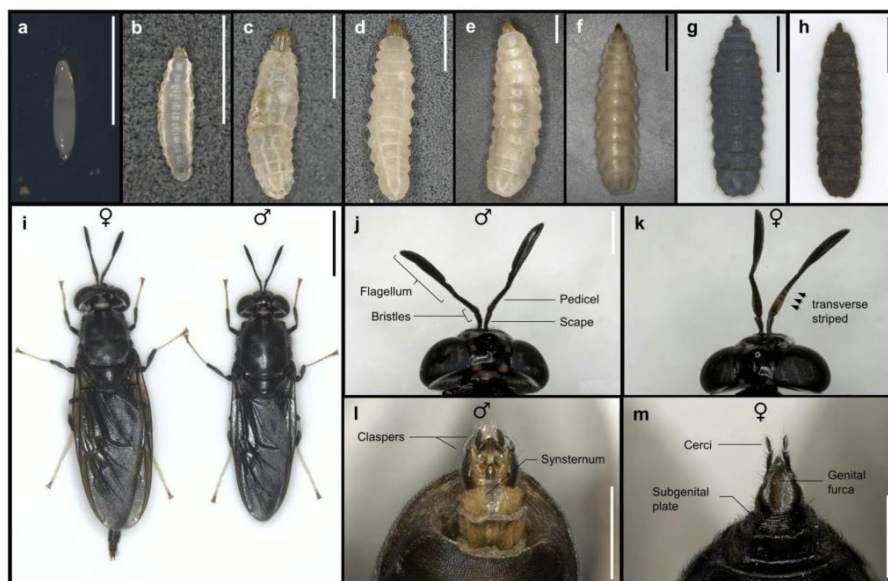


Figure 1. Morphologie de la mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) (Oliveira et al., 2016).

1.1.2. Classification

La mouche soldat noire est un diptère qui appartient à la famille des Stratiomyidae. Sa classification est comme suit (Linnaeus, 1758) :

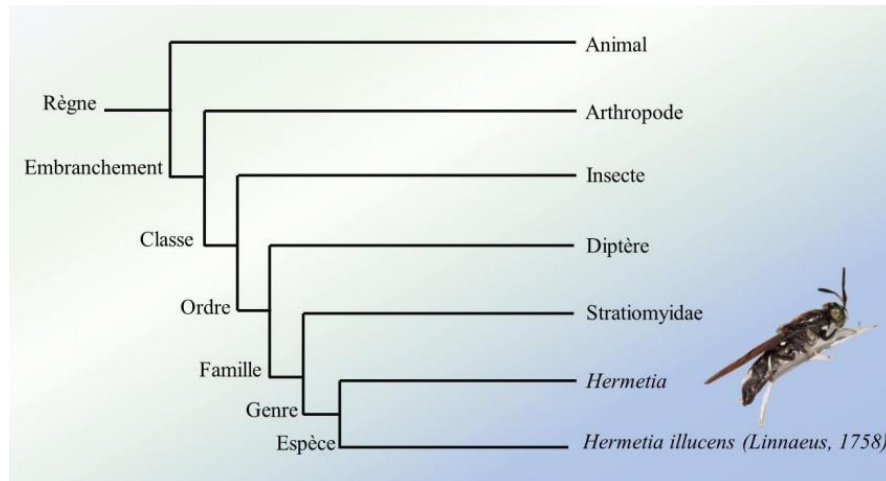


Figure 2 : Position systématique d'*Hermetia illucens* (Linnaeus, 1758).



Figure 3 : Morphologie de la mouche-soldat noire adulte. (Oliveira *et al.*, 2016).

1.1.3. Distribution géographique et habitat

Des analyses génétiques basées sur des marqueurs microsatellites et le gène mitochondrial CO1 ont permis de retracer l'origine de *Hermetia illucens* (Kaya et al., 2021 ; Gabriel et al., 2002). Ces travaux indiquent que l'espèce est native d'Amérique du Sud, où sa diversité génétique est la plus élevée, avant de se disperser vers l'Amérique du Nord, l'Europe, l'Asie, l'Océanie et l'Afrique, principalement par les échanges commerciaux et le transport maritime

(Guilliet et al., 2021). En Afrique, cette mouche est présente dans plusieurs régions, notamment au sud-est, à l'ouest (Bénin) et à l'est du continent (Figure 4)

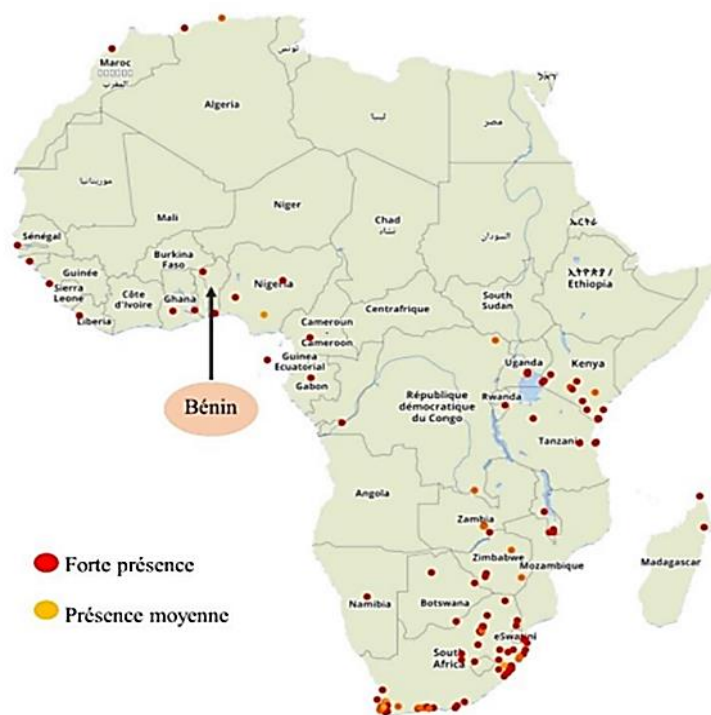


Figure 4 : Distribution géographique de *Hermetia illucens* en Afrique. Modifié à partir de GBIF.

1.1.3. Éthologie et cycle de développement :

Le cycle de développement de *Hermetia illucens* (Figure 5) comporte cinq stades : œuf, larve, prépupe, puppe et imago. Sa durée dépend de facteurs biologiques tels que l'origine de la population, ainsi que de paramètres environnementaux comme la température, l'humidité, la luminosité et la qualité du substrat (Caruso et al., 2014).

Après l'accouplement, les femelles pondent entre 320 et 620 œufs dans de petites cavités situées à proximité de matières organiques, puis meurent peu après (Tomberlin et al., 2002). L'éclosion survient après 3 à 4 jours d'incubation, à des conditions optimales de 26 à 27 °C et une humidité relative de 60 à 70 % (Sheppard et al., 1994).

Les larves, qui traversent cinq stades séparés par des mues, se nourrissent de substrats humides riches en matière organique. Leur développement dure en moyenne de 12 à 20 jours selon la

qualité et la quantité de nourriture disponible (Barragan-Fonseca et al., 2017). À la fin du cinquième stade, elles deviennent brun foncé et entrent dans la phase de prépupe. Elles cessent alors de s'alimenter et quittent le substrat humide pour un milieu sec, où elles se transforment en pupes immobiles à cuticule rigide (Diener et al., 2011).

Après environ une semaine, les adultes émergent et s'accouplent dans les deux jours suivant leur sortie. Comme les prépupes, les imagos ne se nourrissent pas et survivent grâce aux réserves accumulées durant la phase larvaire (Newton et al., 2005).

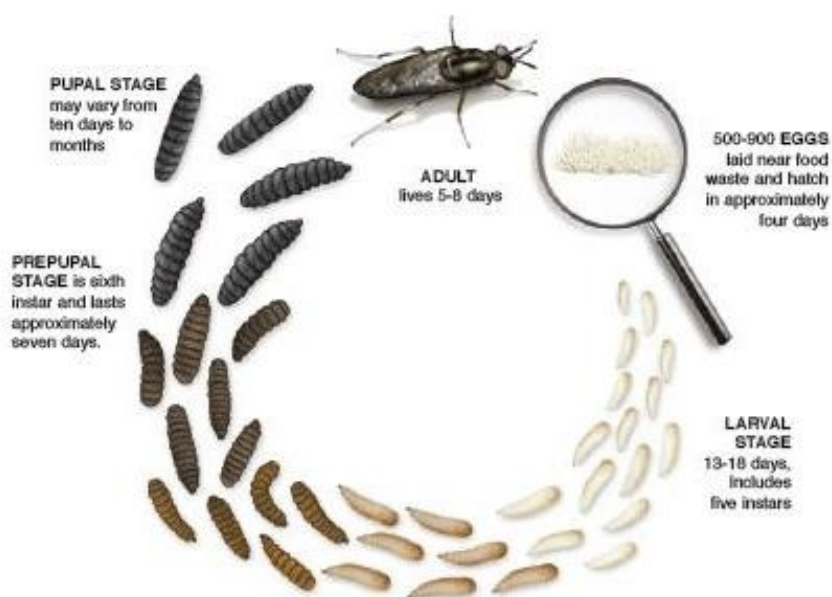


Figure 5 : Cycle de développement de la mouche-soldat noire

1. 2 Rôle écologique et environnemental de *Hermetia illucens*

1.2.1 Dégradation des matières organiques

Les larves de *Hermetia illucens* se distinguent par leur capacité à décomposer efficacement une large gamme de matières organiques. Elles consomment divers substrats tels que les restes alimentaires, les déchets végétaux, le fumier, le lisier ou encore les boues issues des stations d'épuration. Cette activité saprophage favorise une réduction rapide du volume des déchets, pouvant atteindre près de 60 % en moins d'une semaine (Diener et al., 2009). Grâce à leur métabolisme intense, ces larves convertissent la matière organique en biomasse utile, tout en accélérant le processus de biodégradation. Elles représentent ainsi une solution biologique prometteuse pour une gestion durable et écologique des déchets.

1.2.2 Réduction des émissions de gaz à effet de serre

L'utilisation d'*Hermetia illucens* dans le traitement des déchets organiques permet de réduire considérablement les émissions de gaz à effet de serre (GES). L'élevage des larves produit très peu de GES et s'accompagne d'une émission presque nulle d'odeurs désagréables. Surendra et al. (2016) ont montré que le traitement des biodéchets par *H. illucens* réduit jusqu'à 95 % les émissions de méthane par rapport aux procédés de méthanisation conventionnels. Cette approche s'inscrit dans une stratégie durable visant à diminuer l'empreinte carbone liée à la gestion des déchets

1.2.3 Effet sur les populations d'insectes nuisibles

L'espèce *Hermetia illucens* joue un rôle écologique important en limitant le développement d'insectes nuisibles, notamment les mouches domestiques (*Musca domestica*). Elle sécrète des composés antimicrobiens et modifie les conditions du substrat (pH, température), rendant ainsi l'environnement défavorable aux pathogènes et aux espèces concurrentes. Erickson et al. (2004) ont montré une diminution notable des populations de mouches nuisibles dans les élevages de volailles où des larves de *H. illucens* ont été introduites. Ce potentiel de lutte biologique indirecte représente un atout supplémentaire pour la gestion intégrée des ravageurs.

1.3 Valorisation des larves de *Hermetia illucens*

Les larves d'*Hermetia illucens* présentent un fort potentiel de valorisation économique et agricole. Leur biomasse, riche en nutriments, ainsi que les sous-produits issus de leur élevage, en font une ressource stratégique pour la nutrition animale, l'agriculture durable et la production de bioénergie. Ces applications s'intègrent dans une démarche d'économie circulaire, où les déchets sont transformés en intrants à forte valeur ajoutée

1.3.1 Source de nutrition animale

Les larves d'*Hermetia illucens* sont particulièrement riches en protéines (35–55 %) et en lipides (15–35 %), ce qui en fait une alternative intéressante aux farines de poisson et de soja utilisées dans l'alimentation animale. Elles renferment également des acides aminés essentiels, des minéraux tels que le calcium et le phosphore, ainsi que des acides gras lauriques connus pour leurs propriétés antimicrobiennes. Makkar et al. (2014) et Van Huis et al. (2013) ont montré que l'incorporation de farines à base de larves n'affecte ni la croissance ni la qualité des produits animaux

1.3.2 Utilisation en compostage et bioénergie

Le résidu généré lors de l'élevage des larves, connu sous le nom de « frass », peut être valorisé comme compost organique de haute qualité. Ce sous-produit est riche en azote (N), phosphore (P) et potassium (K), éléments essentiels à la croissance des plantes ; il améliore aussi la structure du sol et sa capacité de rétention d'eau. Son utilisation en agriculture biologique stimule la vie microbienne du sol et favorise une fertilisation plus durable.

Par ailleurs, les lipides extraits des larves peuvent être exploités pour la production de biodiesel, offrant ainsi une source d'énergie renouvelable à faible impact environnemental. D'après Surendra et al. (2016), la teneur en lipides des larves varie entre 28 et 30 %, ce qui confirme leur potentiel pour la production de biocarburants de deuxième génération

1.4 Composition biochimique des larves de *Hermetia illucens*

Les larves de *Hermetia illucens* présentent une composition biochimique riche et variée (Tab1), qui leur confère un intérêt particulier dans de nombreuses applications industrielles, agricoles et pharmaceutiques.

1.4.1 Protéines

Les larves de la mouche soldat noire contiennent entre 37 et 63 % de protéines, selon les conditions d'élevage et le stade de développement. Cette teneur varie principalement en fonction du régime alimentaire et de l'âge larvaire. D'après Queiroz et al. (2021), la proportion de protéines augmente après l'éclosion, atteint environ 38 à 39 % au quatorzième jour, puis s'élève progressivement jusqu'à 45–46 % au stade de prépupe et à près de 56–57 % chez les pupes

Amino Acids	BSF Larvae ¹	BSF Prepupae ²	Soybean meal ³	Fishmeal ⁴
Alanine	8.8	7.4	5.3	6.3
Arginine	6.1	5.8	5.7	6.1
Aspartic acid	12.5	10.5	7.0	9.0
Cysteine	0.1	0.7	0.9	1.0
Glutamic acid	13.5	12.3	11.9	13.0
Glycine	NR	6.7	11.1	6.2
Histidine	4.5	3.9	3.0	3.6
Isoleucine	5.6	5.2	4.0	4.8
Leucine	8.4	8.5	8.0	7.8
Lysine	8.0	6.9	5.4	7.9
Methionine	2.4	2.2	1.1	2.5
Phenylalanine	5.6	5.0	6.0	4.1
Proline	7.7	6.6	8.9	4.5
Serine	4.2	4.6	7.4	4.0
Threonine	4.8	4.7	4.8	4.4
Tryptophane	0.5	1.7	1.7	1.0
Valine	9.1	7.4	4.3	5.2

¹ [Makkar et al. \(2014\)](#).

² [Spranghers et al. \(2017\)](#).

³ [Joseph et al. \(2008\)](#).

⁴ [Al-Qazzaz & bin Ismail \(2016\)](#).

Tableau 1. Composition en acides gras des larves de la mouche soldat noire (g/kg de matière sèche) (Lu *et al.*, 2022)

1.4.2 Lipides

Les lipides constituent environ 15 à 35 % de la matière sèche des larves, selon le stade de développement et le type de substrat utilisé. Ils sont majoritairement composés d'acides gras saturés et mono-insaturés, dont l'acide laurique (C12:0), connu pour ses propriétés antimicrobiennes. Le profil lipidique varie en fonction du régime alimentaire, ce qui fait des larves d'*Hermetia illucens* une source lipidique modulable et adaptée à divers usages industriels (Spranghers *et al.*, 2017)

1.4.3 Minéraux

Les larves présentent une fraction minérale importante, représentant environ 5 à 10 % de leur matière sèche. Elles sont particulièrement riches en minéraux, notamment en calcium, phosphore, potassium, magnésium, zinc et fer, ce qui renforce leur intérêt nutritionnel pour l'alimentation animale. La teneur minérale varie selon la composition du substrat de culture, permettant ainsi une optimisation ciblée de leur valeur nutritive (Finke, 2013)

1.4.4 Chitine et chitosane

La cuticule externe des larves d'*Hermetia illucens* est riche en chitine, un polymère naturel composé d'unités de N-acétylglucosamine, représentant environ 5 à 10 % de la matière sèche. Cette chitine est généralement extraite à partir de la cuticule ou des exuvies, puis convertie en chitosane par un procédé de désacétylation en milieu alcalin.

Même si la chitine issue de *H. illucens* est présente en moindre quantité que celle des crustacés, elle se distingue par une plus grande pureté, liée à sa faible teneur en minéraux et protéines résiduelles. Le chitosane obtenu présente des propriétés antibactériennes, antifongiques, filmogènes et biodégradables, le rendant utile dans divers domaines tels que l'agriculture, l'emballage alimentaire, la médecine et la cosmétique (Hahn et al., 2018)

1.5 Chitine et chitosane

1.5.1 Structure physique de la chitine

La chitine est un polysaccharide linéaire constitué d'unités de N-acétyl-D-glucosamine, dont la structure chimique est proche de celle de la cellulose. Elle se distingue par la présence de groupements acétamides, qui lui confèrent des propriétés biologiques remarquables telles que la biocompatibilité et la biodégradabilité, ce qui en fait un matériau fonctionnel d'un intérêt croissant (Rinaudo, 2006).

La chitine se présente sous trois formes cristallines principales — α , β et γ — (Noishiki et al., 2003), qui se différencient par l'agencement des chaînes polysaccharidiques et la nature des liaisons hydrogène (Brugnerotto et al., 2001 ; Minke & Blackwell, 1978). La forme α , la plus stable et la plus abondante, présente une organisation antiparallèle compacte, typique des crustacés et des champignons. Elle montre une faible solubilité dans les solvants usuels, mais peut être dissoute dans des milieux spécifiques tels que le N,N-diméthylacétamide (DMAc) en présence de LiCl, ou dans des solutions contenant des dérivés fluorés (Kurita, 2001).

La γ -chitine, observée notamment dans les cocons d'insectes, se caractérise par un empilement mixte de chaînes parallèles et antiparallèles. Moins fréquente, elle présente des propriétés intermédiaires proches de celles de la β -chitine, notamment une certaine flexibilité structurale attribuée aux groupements N-acétyl jouant le rôle d'espaces moléculaires (Raabe et al., 2005 ; Sugiyama et al., 1999).

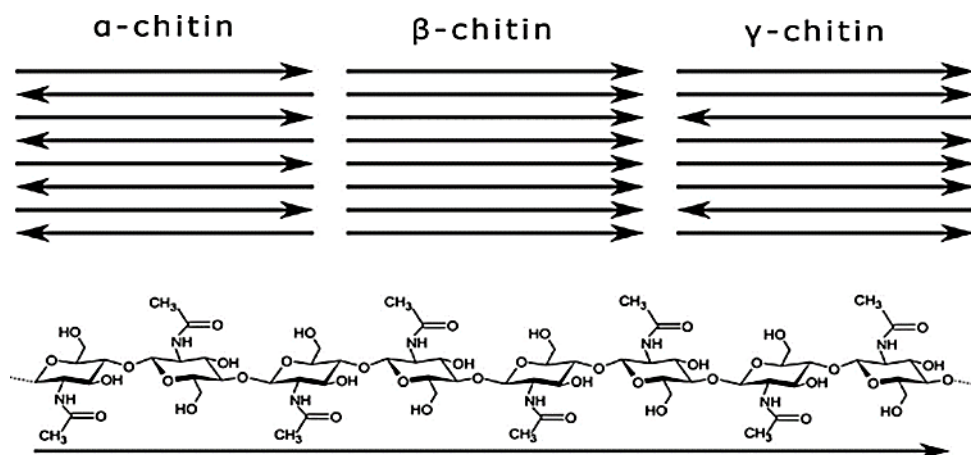


Figure 6 : Schémas simplifiés des trois formes cristallines de la chitine (Kumirska, 2011)

1.5.2 Structure physique du chitosane

La structure du chitosane suscite un intérêt croissant en raison de ses nombreuses applications, bien que la chitine, plus abondante dans la nature, ait été davantage étudiée (Rinaudo, 2006). L'étude de sa structure demeure complexe (figure 7), car elle dépend des conditions de préparation et des caractéristiques du matériau initial.

En pratique, la forme α de la chitine sert le plus souvent de matrice pour la désacétylation, tandis que l'utilisation de la forme β peut conduire à des structures cristallines distinctes (Ogawa et al., 1991). Quatre conformations cristallines principales ont été décrites, la plus fréquente étant celle du cristal hydraté (Lavall et al., 2007).

La désacétylation de la chitine entraîne la rupture de certaines liaisons hydrogène, notamment entre les protons amides et les groupements carbonyles, ce qui augmente la flexibilité des chaînes et renforce leurs interactions avec les molécules d'eau, améliorant ainsi la solubilité du chitosane (Rinaudo, 2006)

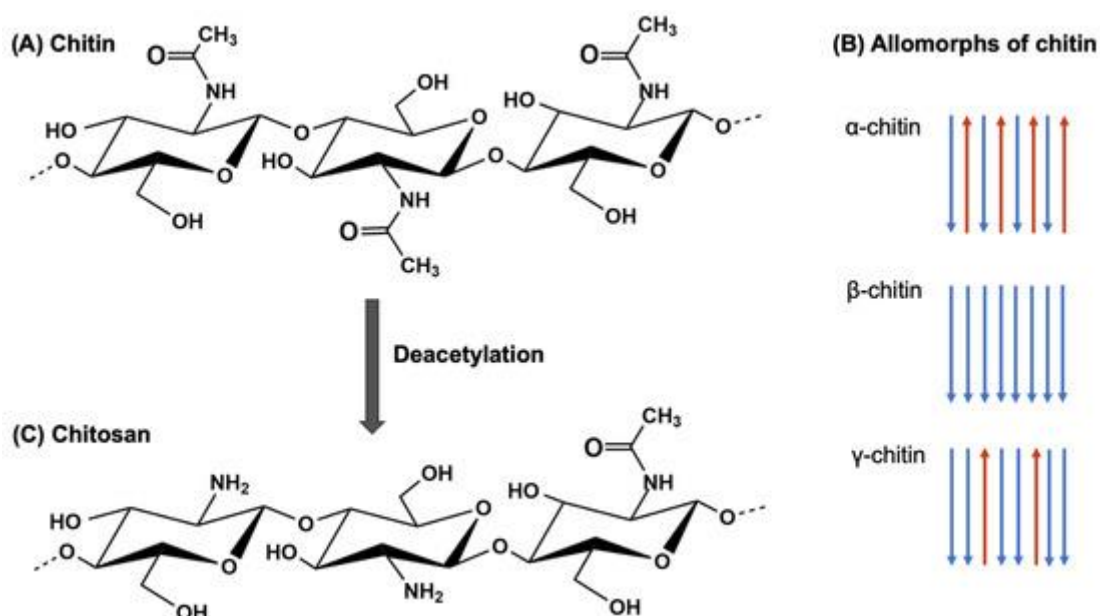


Figure 7 : Schémas des structures moléculaires de la chitine et du chitosane (Update on Chitin and Chitosan from Insects, 2021).

1.5.3 Fonctionnalités et applications de la chitine et du chitosane

La chitine et son dérivé, le chitosane, présentent une large gamme de propriétés physico-chimiques et biologiques qui expliquent leur intérêt croissant dans de nombreux domaines d'application. Grâce à leurs liaisons $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre unités glucosidiques, ces biopolymères possèdent une structure filmogène favorisant la formation de films perméables (Rinaudo, 2006).

Contrairement à la majorité des polysaccharides, le chitosane présente un caractère polycationique en solution acide, dû à la protonation de ses groupements amines, ce qui lui permet d'interagir avec des molécules chargées négativement telles que les acides gras, les protéines ou certaines impuretés aqueuses (Muzzarelli, 1996 ; Rinaudo, 2006).

Son fort pouvoir chélatant lui permet de fixer les métaux lourds même à très faibles concentrations, ce qui en fait un excellent agent pour le traitement des eaux usées (Kurita, 1998). Il présente également d'importantes propriétés floculantes, efficaces à la fois pour les particules organiques, minérales et les micro-organismes, ce qui le rend utile dans les procédés de clarification en agroalimentaire et en environnement (Ravi Kumar, 2000).

Dans le domaine agricole, la chitine et le chitosane agissent à de très faibles doses comme éliciteurs des défenses naturelles des plantes contre les agents pathogènes. Ils favorisent

également la croissance racinaire et renforcent la tolérance au stress abiotique, contribuant ainsi à une amélioration notable des rendements (El Hadrami et al., 2010 ; Badawy & Rabea, 2011). Le chitosane possède en outre des effets fongicides directs.

Dans l'industrie papetière, leur utilisation améliore la rétention des charges et la résistance à l'état humide, notamment lorsque le chitosane est désacétylé à plus de 95 %, tout en facilitant la recyclabilité des papiers (Rinaudo, 2006).

En agroalimentaire, il est employé pour la désacidification des jus et extraits, la conservation des denrées, la séparation des déchets colloïdaux, ainsi que pour l'immobilisation d'enzymes ou de cellules destinées à des applications de biocatalyse ou de clarification (Knorr, 1991 ; Shahidi et al., 1999).

Sur le plan biomédical et pharmaceutique (figure 8), la chitine et le chitosane sont reconnus pour leur biocompatibilité, leur non-toxicité et leur bioactivité. Ils sont utilisés comme agents cicatrisants, antifongiques, bactériostatiques, hémostatiques, ou pour la conception de films, pansements, prothèses et peaux artificielles (Jayakumar et al., 2011 ; Dash et al., 2011). Ces effets bénéfiques sont attribués à la capacité du chitosane à stimuler les fibroblastes, favoriser la synthèse du collagène de type III et accélérer la régénération épidermique.



Figure 8 : Activité du chitosane dans le domaine biomédical (Md Minhajul Islam *et al.*, 2020)

1.6 Le chitosane comme agent bioactif

Le chitosane est reconnu pour ses nombreuses propriétés bioactives, qui en font une molécule d'un grand intérêt en protection des végétaux. En agriculture, il est principalement valorisé pour ses effets antifongiques, antibactériens et insecticides. Lorsqu'il est appliqué sur les plantes, il peut stimuler une réponse immunitaire locale ou systémique, connue sous le nom de résistance systémique induite (ISR) (El Hadrami et al., 2010).

Le chitosane joue également un rôle clé dans la formulation de biopesticides, en agissant comme agent structurant et vecteur de substances actives naturelles. Sa capacité à former des gels, films ou matrices colloïdales améliore la stabilité, la rémanence et l'efficacité d'extraits végétaux, d'huiles essentielles ou d'autres composés bioactifs. Par exemple, son association avec des huiles essentielles — telles que celles de thym ou d'eucalyptus — permet non seulement de prolonger l'activité insecticide, mais aussi de réduire les pertes par évaporation (Younes & Rinaudo, 2015).

De plus, sa nature adhésive favorise une bonne fixation sur les surfaces foliaires, rendant les traitements plus performants même dans des conditions environnementales difficiles (Elsabee & Abdou, 2013). Le chitosane peut ainsi être incorporé dans diverses formulations — suspensions concentrées, gels ou poudres mouillables — selon les besoins agronomiques. Cette polyvalence en fait un outil prometteur pour la conception de biopesticides de nouvelle génération

1.7 Préservation des céréales stockées : enjeux et stratégies contre les infestations économiques

1.7.1 Les pertes post-récolte causées par les insectes

Les pertes post-récolte constituent un enjeu majeur pour la sécurité alimentaire mondiale. Selon la FAO, entre 20 et 30 % des denrées stockées sont perdues à cause des infestations d'insectes, notamment dans les pays en développement. Ces pertes ne se limitent pas à une diminution quantitative (poids, volume), mais s'accompagnent aussi d'une dégradation qualitative liée à la contamination des produits par les excréments, fragments d'insectes, phéromones ou microorganismes associés. Des espèces telles que *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais* et *Rhyzopertha dominica* sont responsables de la détérioration directe des grains et de la perte de leur valeur marchande, nutritive et sanitaire.

1.7.2 Utilisation des huiles essentielles et du chitosane dans la lutte contre *Tribolium castaneum*

Les huiles essentielles (HE) présentent une large activité biologique contre *Tribolium castaneum*, en agissant par effet répulsif, par toxicité de contact ou d'inhalation, et par inhibition enzymatique (AChE, GST, SOD, etc.) (Chaudhari et al., 2021 ; Zhang et al., 2021). Des HE comme celles de clou de girofle, d'ail ou de citron provoquent une forte mortalité et une répulsion marquée. Elles perturbent également plusieurs fonctions physiologiques chez l'insecte, entraînant un stress oxydatif, une altération des systèmes enzymatiques et un déséquilibre énergétique.

Toutefois, leur forte volatilité limite leur efficacité directe (Arthur, 2022). Pour surmonter cette contrainte, elles sont aujourd'hui incorporées dans des formulations modernes telles que les microémulsions, les films comestibles ou la nanoencapsulation, souvent élaborées à base de chitosane. Ce biopolymère naturel joue un rôle essentiel en stabilisant les HE, en contrôlant leur libération et en prolongeant leur activité insecticide (Soppelsa et al., 2023).

Par exemple, des films à base de chitosane combinés à des HE de cannelle ou de menthe ont démontré une efficacité prolongée contre les ravageurs des denrées stockées et les moisissures post-récolte, tout en induisant des réponses défensives chez les plantes hôtes (Soppelsa et al., 2023). L'huile essentielle de menthe, riche en menthol, est particulièrement reconnue pour ses effets insecticides et répulsifs contre *T. castaneum*, surtout lorsqu'elle est encapsulée dans des matrices de chitosane, constituant ainsi une alternative prometteuse pour le traitement post-récolte (Chaudhari et al., 2021).

1.7.3 *Tribolium castaneum* : biologie et impact

Tribolium castaneum, coléoptère ravageur des denrées stockées, se développe rapidement sous des conditions chaudes. L'adulte, de 3 à 4 mm de longueur, présente des élytres lisses, une coloration brun-rougeâtre et possède la capacité de voler, contrairement à *T. confusum* (Rees, 2004). Il infeste principalement la farine et les céréales, libérant des composés toxiques, notamment des quinones, aux effets allergènes et répulsifs.

Son cycle biologique comprend quatre stades — œuf, larve, nymphe et adulte — et peut s'achever en 4 à 5 semaines à une température de 30–35 °C. Chaque femelle pond jusqu'à 500 œufs, favorisant ainsi une infestation rapide (Campbell et al., 2012). Les larves creusent les grains, provoquant des pertes physiques, chimiques et microbiologiques

1.7.4 Identification de *Tribolium castaneum*

Tribolium castaneum, ou ténébrion rouge de la farine, est un petit coléoptère brun-rougeâtre de 3 à 4 mm, appartenant à la famille des Tenebrionidae. Il se distingue de *T. confusum* par ses élytres lisses, ses antennes en massue et sa capacité à voler. Espèce cosmopolite, il infeste couramment les céréales et produits dérivés stockés, constituant un ravageur majeur des denrées alimentaires (Rees, 2004).

1.7.5 Cycle de vie et dégâts

Le développement de *Tribolium castaneum* est fortement influencé par la température, avec un optimum compris entre 30 et 35 °C, et comporte quatre stades : œuf, larve, nymphe et adulte. Le cycle complet peut s'achever en 4 à 5 semaines, et une femelle peut pondre jusqu'à 500 œufs. Tant les larves que les adultes creusent les denrées stockées, entraînant des pertes physiques (poussières, fragments), chimiques (quinones toxiques) et biologiques (favorisation de champignons et bactéries). Ces altérations rendent les produits impropres à la consommation, particulièrement lorsque le stockage est chaud et mal ventilé (Campbell et al., 2012).

1.7.6 Préservation des céréales stockées : une priorité stratégique

Tribolium castaneum, ou ténébrion rouge de la farine, est un petit coléoptère brun-rougeâtre de 3 à 4 mm, cosmopolite, qui infeste les céréales et produits dérivés stockés (Rees, 2004). Il se développe en quatre stades (œuf, larve, nymphe, adulte) avec un cycle complet de 4 à 5 semaines à une température optimale de 30–35 °C, et une femelle peut pondre jusqu'à 500 œufs. Les larves et adultes causent des pertes physiques, chimiques et biologiques, rendant les produits impropres à la consommation (Campbell et al., 2012).

Ces infestations entraînent des pertes économiques, dégradent la qualité sanitaire des denrées et compliquent les exportations. La résistance croissante aux insecticides rend leur gestion difficile. Dans ce contexte, l'utilisation combinée d'huiles essentielles et de chitosane constitue une approche durable et efficace pour protéger les stocks tout en réduisant le recours aux produits chimiques (Soppelsa et al., 2023).

Chapitre II

Matériel et méthode

1. Objectif

Ce chapitre vise à décrire l'ensemble des moyens méthodes et techniques expérimentales mis en œuvre dans le cadre de cette étude. Il s'agit principalement de l'extraction de chitosane à partir de larves séchées de *Hermetia illucens* (mouche soldat noire), ainsi que la formulation d'un gel à effet répulsif et insecticide destiné à lutter contre *Tribolium castaneum*, un insecte ravageur des denrées stockées.

Ce travail a également pour but de caractériser d'une manière physico-chimique le chitosane obtenu. Les principes et les conditions opératoires des différentes analyses utilisées dans cette étude (tests, mesures de pH, tests de solubilité, et analyses spectroscopiques FTIR) seront également décrits, tout en procédant à une évaluation de l'activité biologique de la formulation à travers des tests in vitro, en étudiant notamment son pouvoir répulsif et son effet insecticide.

2. Matériel et méthode

2.1 Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude comprend :

2.1.1 Larves de *Hermetia illucens*



Figure 9 : les larves sécher et broyer de *Hermetia illucens*

Les larves de mouche soldat noire (*Hermetia illucens*) constituent la matière première utilisée pour l'extraction du chitosane ; Ces larves ont été sélectionnées pour leur richesse en matière organique, en particulier en chitine le composant principal de leur cuticule. Ils ont été achetés déjà mortes et séchées auprès d'un éleveur local spécialisé dans la production d'insectes destinés à des usages agroalimentaires et agronomiques. Selon les

informations communiquées par ce dernier, les larves ont été préalablement séchées dans une étuve à 40 °C pendant 48 heures, immédiatement après leur récolte et nettoyage avec de l'eau. Ce séchage doux permet de préserver les propriétés structurales de la cuticule et d'éviter toute dégradation thermique des composés d'intérêt, notamment la chitine. Les larves, livrées sous forme entière et sèche, ont été stockées à température ambiante à l'abri de l'humidité jusqu'à leur utilisation Au laboratoire. Avant les étapes d'extraction, elles ont été simplement broyées à l'aide d'un moulin de laboratoire pour obtenir une poudre fine homogène.

2.1.2 L'huile essentielle de menthe

Elle a été fournie par le laboratoire d'extraction BioExtraPAMAL, situé à Oued Alleug (Blida, Algérie). Ce laboratoire procède à l'importation de la plante de *Mentha Spicata* cultivée dans la région de Meghnia, au sein de la wilaya de Tlemcen. L'extraction a été réalisée en avril 2025 par des méthodes d'entraînement à la vapeur dans un alambic en inox de 500 litres, conforme aux normes alimentaires 304L. Cette huile essentielle a été intégrée dans la formulation d'une émulsion gélifiée.

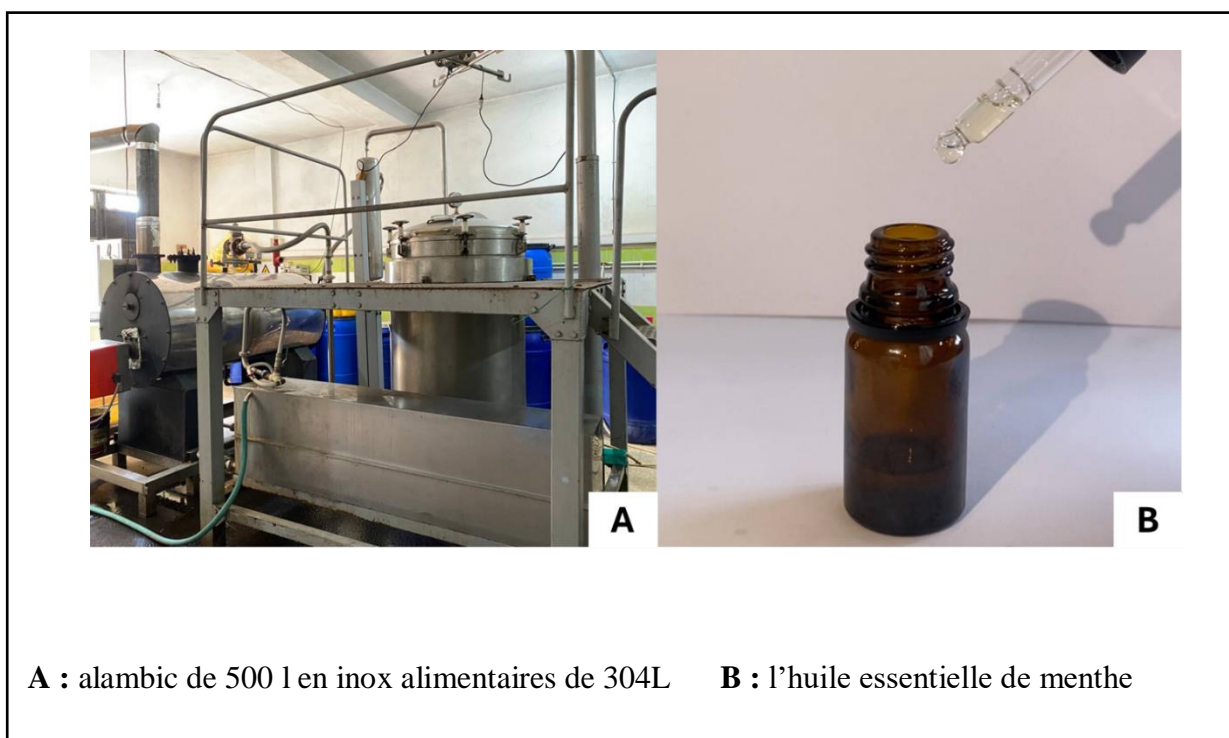


Figure 10 (A et B) : L'huile essentielle de *Mentha Spicata* obtenu du laboratoire d'extraction BioExtraPAMAL

2.1.3 Le Tribolium rouge de la farine *Tribolium castaneum*

Le matériel entomologique utilisé dans cette étude est constitué de spécimens de *Tribolium castaneum* (Coléoptère, Tenebrionidae), une espèce connue pour sa capacité à infester les produits céréaliers stockés. Les insectes ont été obtenus à partir d'un échantillon de farine de blé contaminée, collecté au niveau de la station expérimentale de l'Université de Blida 1 – Saad Dahlab.

2.2 Matériel de laboratoire

Le matériel utilisé dans le laboratoire est énuméré dans le tableau suivant :

Matériel utilisé au laboratoire	
Grands bécchers (1 L à 2 L)	Papier aluminium
Bécchers gradués de 250 ml	Des entonnoirs
Agitateur magnétique chauffant	Étuve réglée
PH ruban et pH-mètre électronique	Boîtes de Petri
Pompe sous vide de filtration	Thermomètre de laboratoire
Équipement de sécurité (gants, lunettes, blouse)	Papier Filtres
Micropipette 1000µl	Tamis
Micropipette 100µl	Des barreaux magnétiques
Spatule	Papier cellophane

Tableau 2 : Tableau de matériel utilisé dans l'expérimentation

3. Méthodes

Le processus d'extraction du chitosane à partir des larves de *Hermetia illucens* est le suivant :

3.1 Extraction du chitosane

L'extraction de la chitine a été réalisée selon le protocole de Witono et al. (2024), avec une légère modification portant uniquement sur l'étape de préparation initiale des larves.

Contrairement au protocole original qui préconise un nettoyage à l'eau distillée suivi d'un séchage à l'étuve, cette étape n'a pas été effectuée dans notre cas, car les larves de *Hermetia illucens* utilisées étaient déjà achetées sous forme sèche. En revanche, toutes les autres étapes du protocole, y compris la décoloration (ou blanchiment), ont été rigoureusement respectées afin de garantir une extraction efficace et conforme.

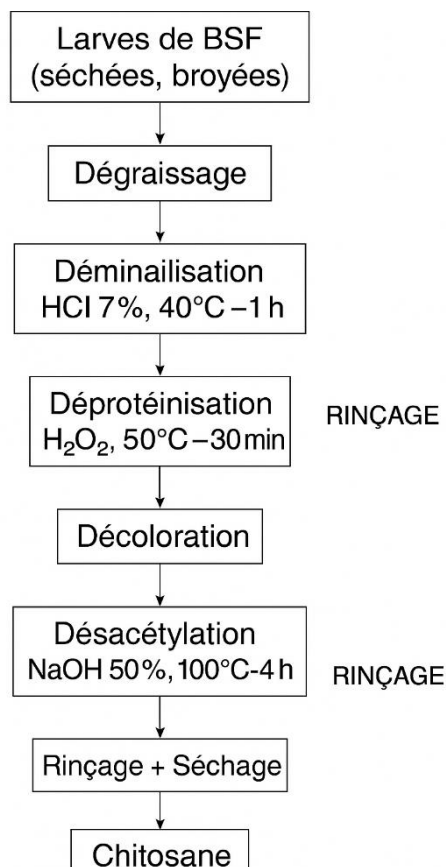


Figure 11 : Schéma du processus d'extraction du chitosane

3.1.1 Déminéralisation

La déminéralisation a constitué la première étape cruciale dans l'extraction de la chitine. Ce processus a été réalisé à partir de 250 g de larves sèches de *Hermetia illucens*, en employant une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 37 %, diluée dans un rapport de 1:10 (m/v) afin d'atteindre une concentration finale de 1 mol/L, conformément aux recommandations de Witono et al. (2024).

La suspension acide a été maintenue sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique, à une température comprise entre 25 et 30 °C, pendant 1 heure. Cette étape visait à solubiliser les minéraux, principalement les carbonates de calcium présents dans la cuticule des larves, par libération de dioxyde de carbone sous forme de bulles visibles.

Après traitement, le mélange a été filtré à l'aide d'une pompe sous vide pour récupérer la phase solide, qui a ensuite été rincée abondamment à l'eau distillée jusqu'à ce que le pH du filtrat soit neutre (pH \approx 7), garantissant ainsi l'élimination complète de l'excès d'acide et des ions dissous.

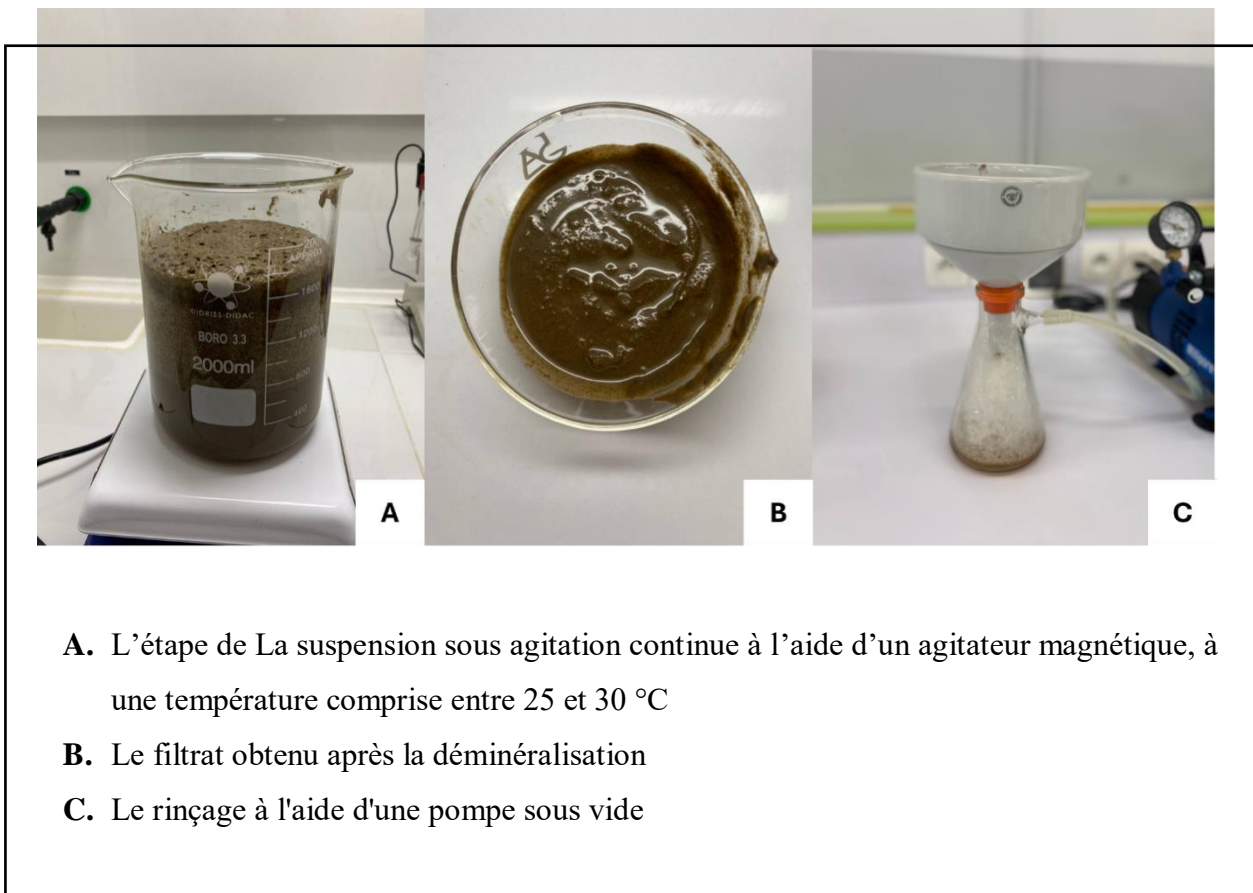


Figure 12 : Les étapes de déminéralisation et rinçage (originale)

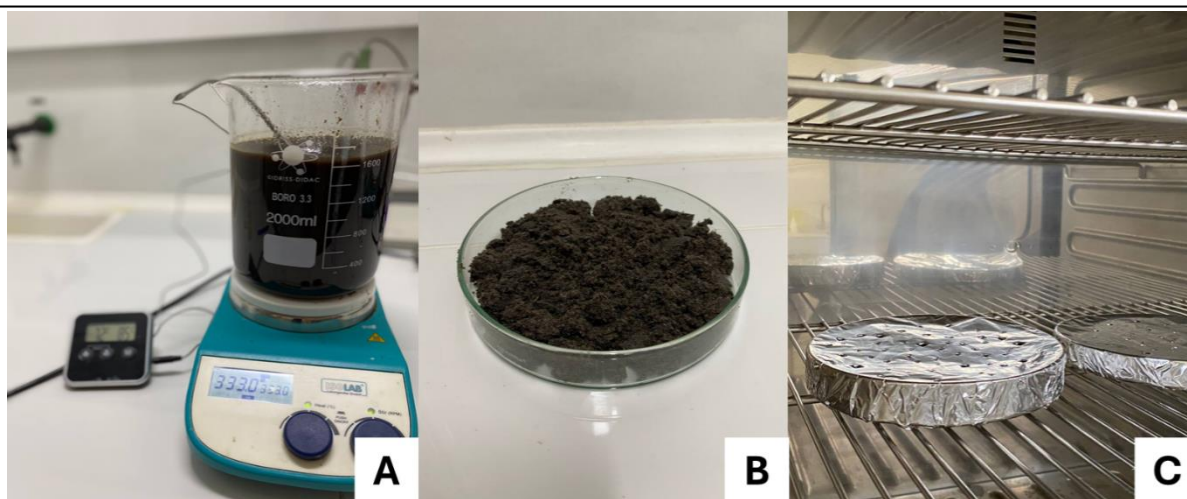
À l'issue de cette étape :

La biomasse déminéralisée obtenue présentait un poids humide de 254,41 g, ce qui servira de base pour l'étape suivante de déprotéinisation.

3.1.2 Déprotéinisation

La matière déminéralisée obtenue (poids humide: 254,41 g) a ensuite été soumise à une déprotéinisation, dans le but d'éliminer les protéines associées à la chitine. Cette opération a été réalisée à l'aide d'une solution de soude (NaOH) à 1,1 mol/L, dans un rapport volumique adapté à la masse de matière traitée, le mélange a été maintenu sous agitation continue pendant une heure à température constante de 80 °C.

Ce traitement alcalin permet la solubilisation des protéines par hydrolyse, facilitant leur séparation de la fraction chitineuse. À la fin du traitement, la suspension a été filtrée, puis le résidu solide a été lavé abondamment à l'eau distillée jusqu'à neutralité ($\text{pH} \approx 7$), afin de garantir l'élimination complète de l'excès de NaOH et des sous-produits puis sécher dans une étuve à 102°C pendant 24h.



- A. Déprotéinisation sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique, à une température comprise entre 70 et 80 °C
- B. Le filtrat obtenu après la déprotéinisation après rinçage
- C. Séchage à l'étuve à 102 °C

Figure 13 : Les étapes de déprotéinisation et séchage (originale)

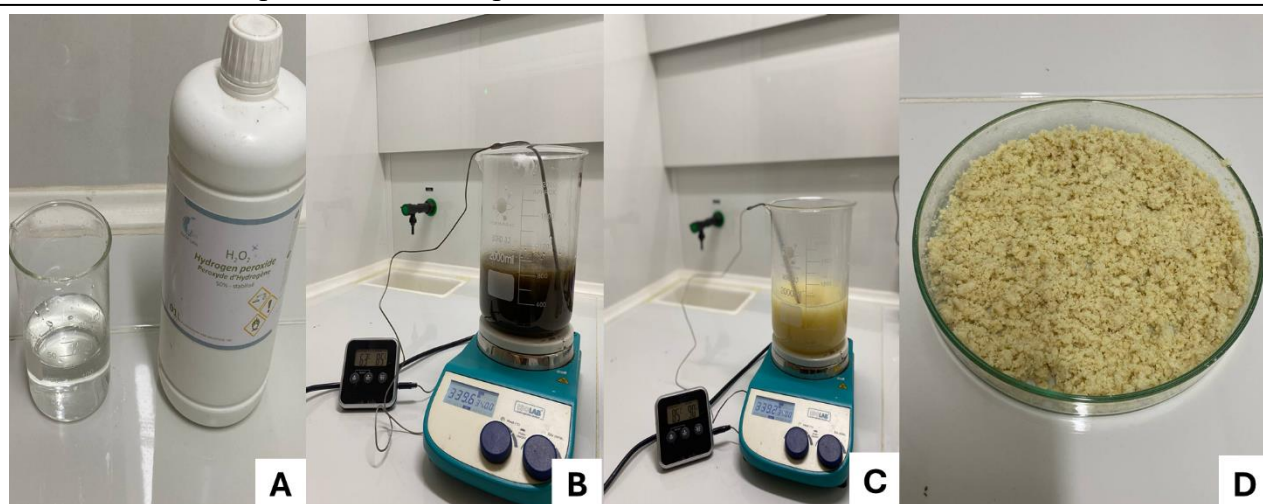
À l'issue de cette étape:

- Le poids humide du résidu a été réduit à 64 g, tandis que le poids sec de la matière extraite s'élevait à 14,1 g.

3.1.3 Décoloration (Blanchiment)

Afin d'éliminer les pigments résiduels tels que la mélanine et les composés associés, une étape de décoloration (ou blanchiment) a été réalisée sur la chitine obtenue après déprotéinisation, cette étape vise à améliorer l'aspect visuel et la pureté du polymère.

Un échantillon de 14,1 g de chitine sèche a été traité avec une solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 5 %, à raison d'un volume suffisant pour immerger complètement l'échantillon. Le mélange a été placé sous agitation continue à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant, maintenu à une température de 90 °C pendant 60 minutes.



- A. La solution de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 5 %
B. Le début de blanchiment
C. Après 60 min de blanchiment
D. La chitine blanchie obtenue après l'étape de décoloration

Figure 14 : Les étapes de blanchiment

À la fin du traitement, la suspension a été filtrée, puis le résidu solide a été lavé abondamment à l'eau distillée jusqu'à neutralité ($pH \approx 7$), afin de garantir l'élimination complète de l'excès de H_2O_2 et puis sécher dans un étuve à 102°C pendant 24h.

À l'issue du traitement:

La matière a été filtrée et soigneusement rincée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le résidu obtenu présentait les caractéristiques suivantes:

- Poids humide: 22 g
- Poids sec: 10,34 g

3.1.4 Première déacétylation

La chitine obtenue a été transformée en chitosane par un traitement alcalin fort. Une masse de 10g de chitine a été soumise à une déacétylation à l'aide d'une solution de soude (NaOH) concentrée à 12 M, sous hotte aspirante en raison de la dangerosité de la **réaction exothermique**. Le mélange a été chauffé à 120 °C pendant 6 heures sous agitation constante.

À la fin du traitement, le produit a été soigneusement filtré, puis rincé abondamment à l'eau distillée jusqu'à neutralité (pH ~7), afin d'éliminer tout résidu de soude.

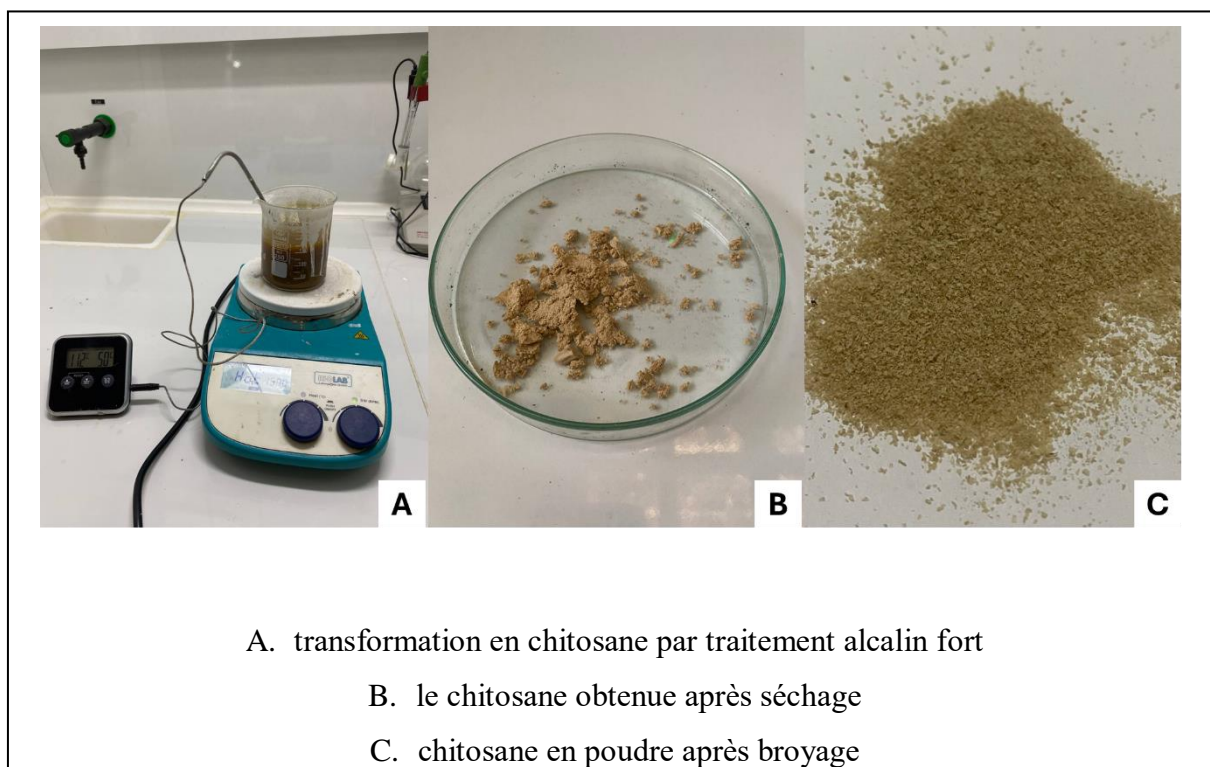


Figure 15 : Les étapes de déacétylation (originale)

Le rendement de chitosane brut obtenu est le suivant:

- Poids humide: 6,33 g
- Poids sec après séchage à 60 °C: 3,24 g

3.1.5 Deuxième déacétylation

Étant donné que le degré de déacétylation obtenu après la première étape était relativement faible (compris entre 52 et 58 %), une deuxième déacétylation a été réalisée afin d'augmenter le taux de déacétylation du chitosane. Pour cela, 3 g de chitine (séchant de la première étape) a été remise en suspension dans une solution de soude concentrée (NaOH 12 M). La suspension a été maintenue sous agitation constante pendant 4 heures supplémentaires à l'aide d'un agitateur magnétique.

Remarque : L'ensemble de la manipulation a été exécuté sous hotte afin de garantir la sécurité, en raison de la forte alcalinité de la solution.

Suite au traitement, le chitosane a été méticuleusement rincé à l'eau distillée à plusieurs reprises jusqu'à atteindre la neutralité (pH ~7), puis il a été laissé à sécher dans des tubes en verre placés dans une étuve à 102 °C pendant 24 heures. Une fois complètement desséché, le produit a été réduit en une poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon.

Les poids suivants ont été enregistrés:

- Poids humide: 2,75 g
- Poids sec: 1,128 g

Cette seconde étape a permis d'obtenir un chitosane ayant un meilleur degré de déacétylation, adapté aux formulations insecticides ultérieures.

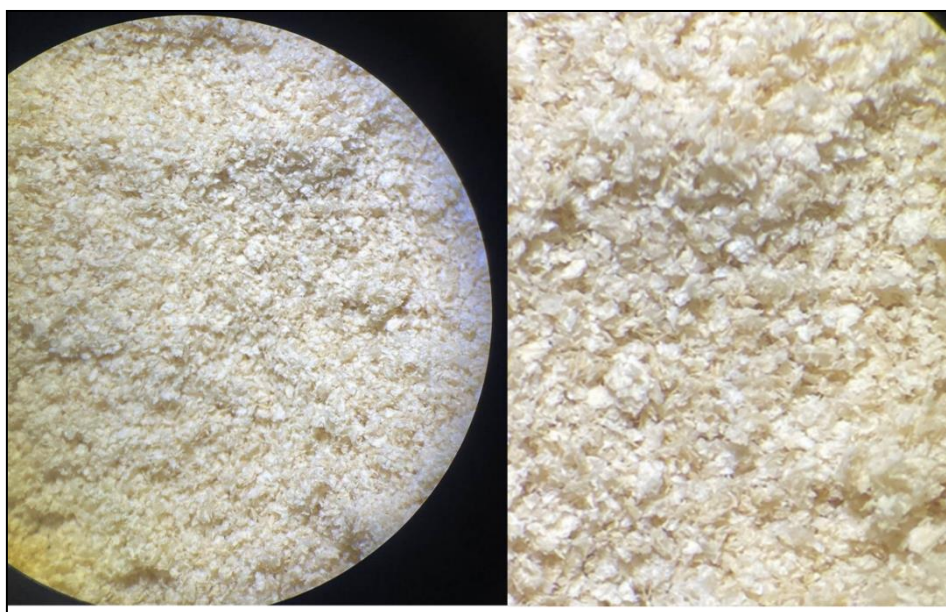


Figure 16: Aspect du chitosane obtenu G400 sous loupe binoculaire

3.2 Caractérisation du chitosane

3.2.1 Analyse de FTIR

Afin de vérifier la qualité du chitosane extrait et de contrôler l'efficacité des étapes de traitement, une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été réalisée.

Cette analyse a été conduite au sein du Laboratoire de Recherche du Département 22 – de Génie des Procédés, à l'aide d'un spectrophotomètre FTIR. Le spectre a été enregistré dans la plage des longueurs d'onde allant de 4000 à 400 cm^{-1} . Les échantillons secs ont été préparés sous forme de pastilles de BRK au niveau de département de chimie 13.

La spectroscopie FTIR est une méthode utilisée pour identifier les groupes fonctionnels présents dans une molécule, en mesurant l'absorption des radiations infrarouges. Elle permet notamment de mettre en évidence les liaisons caractéristiques de la structure chimique du chitosane, ce qui est utile pour le contrôle de qualité et pour estimer indirectement le degré de déacétylation.



Figure 17: le spectrophotomètre FTIR utilisée dans cette analyse

3.2.2 Après la première déacétylation

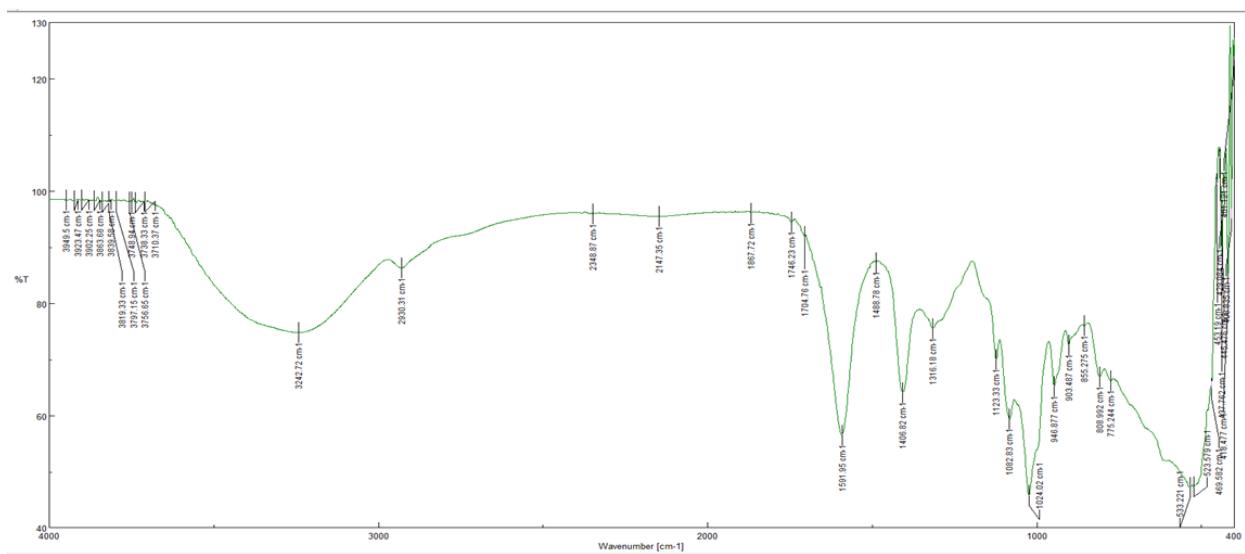


Figure 18: Spectre FTIR du chitosane extrait (avec un cycle de désacétylation).

3.2.3 Après la deuxième déacétylation

Le profil spectroscopique IR de l'extrait testé

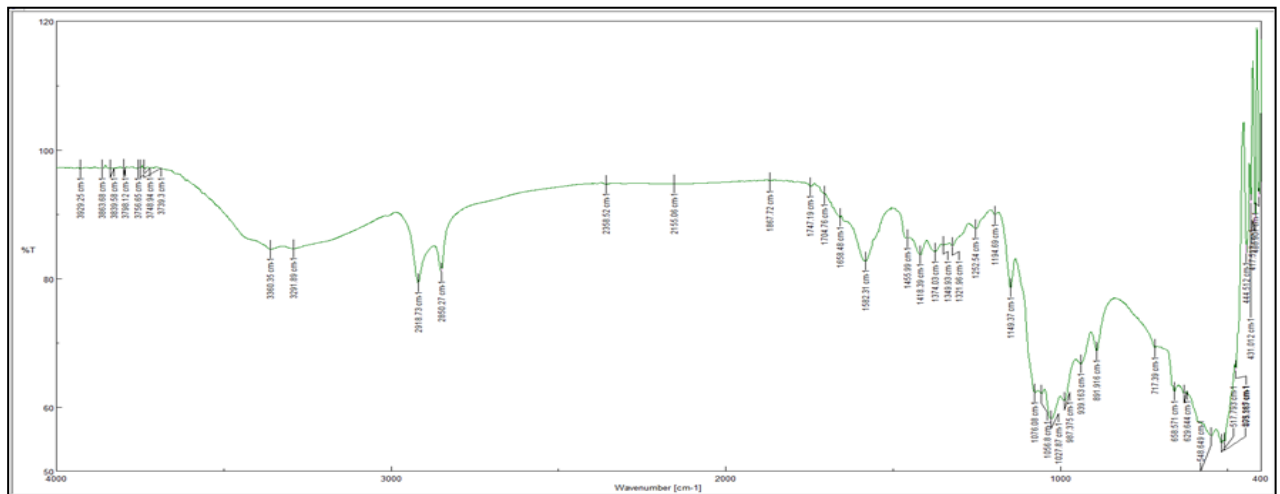


Figure 19: Spectre FTIR du chitosane extrait (avec deux cycles de désacétylation)

V. La rhéologie:

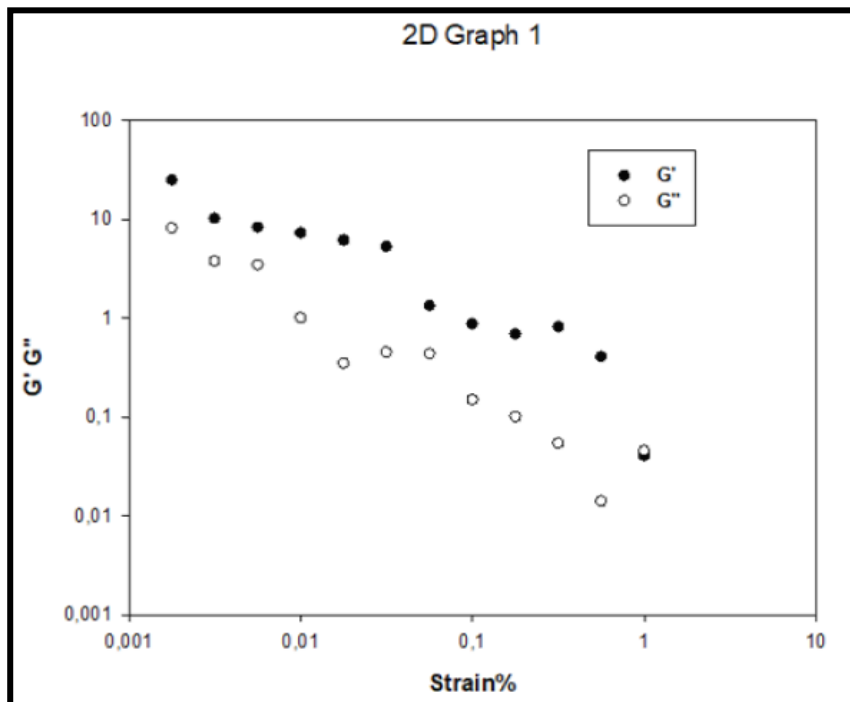


Figure 20 : Test de viscoélasticité de l'essai A(chitosan)

2D Graph 3

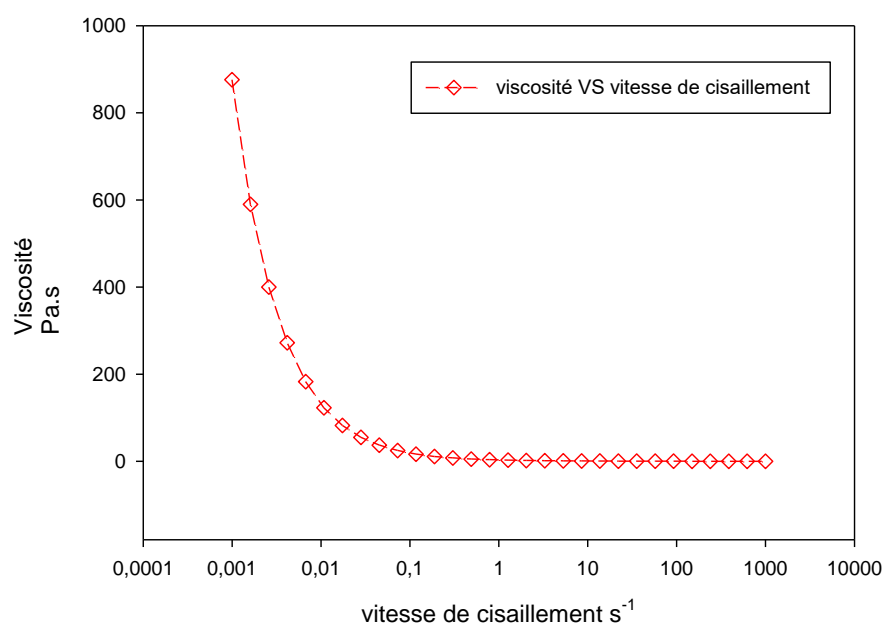


Figure 21 : Courbe d'écoulement Essai A (chitosane)

Numéro d'onde (cm^{-1})	Attribution	Signification
~3200–3500	O–H / N–H élongation	Groupes hydroxyles et amines primaires
~2918, ~2850	C–H élongation	Groupes méthyles et méthylènes
~1655	Amide I (C=O)	Groupe acétyle (chitine résiduelle)
~1580	Amide II (N–H déformation)	Amine secondaire
~1420–1375	C–H déformation	Squelette carboné
~1320–1250	C–N vibration	Lien amine – sucre
~1150–1020	C–O–C vibration	Ponts glycosidiques du polysaccharide
~890–600	C–H hors-plan / cycles pyranosiques	Conformation du squelette glucosaminique

Tableau 3 : Bandes FTIR caractéristiques du chitosane

4. Protocole expérimental de test in vitro de l'effet d'un bioinsecticide à base de chitosane et l'huile essentielle de *Mentha Spicata*

4.1 Objectif

Cette étude a pour but évaluer l'effet de différentes doses d'une formulation expérimentale à base de chitosane, d'huile essentielle de *Mentha Spicata*, sur la mortalité de *Tribolium castaneum* en conditions contrecollées in vitro.

4.2 Préparation des formulations bioactives à base de chitosane et d'huile essentielle de *Mentha Spicata*

Trois formulations différentes ont été préparées en variant la concentration de chitosane, afin d'évaluer leur effet comparatif. Pour chaque formulation, le chitosane a été dissous dans de l'acide acétique dilué (0,5 à 1 % v/v), préparé dans de l'eau distillée tiède (environ 40 °C). La dissolution a été assurée par agitation magnétique prolongée, jusqu'à obtention de solutions homogènes. Les trois doses de chitosane utilisées étaient respectivement 10mg, 25 mg et 30 mg, chacune diluée dans un volume final de 50 mL.



Figure 22 : La préparation des trois doses de chitosane

Dose de chitosane	Quantité	Concentration finale
Faible	10 mg	0,02%
Moyenne	25 mg	0,05%
Forte	30 mg	0,06%

Tableau 4 : Les paramètres expérimentales de doses de chitosane

Parallèlement, une émulsion huile essentielle / agent tensioactif a été préparée en mélangeant 1 mL d'huile essentielle (soit 2 % du volume total) avec 4 mL de Tween 20. Ce mélange a été homogénéisé à l'aide d'un agitateur magnétique pendant quelques minutes. L'émulsion HE + Tween a ensuite été incorporée goutte à goutte à l'aide d'une micropipette dans chaque solution de chitosane sous agitation continue, afin d'assurer une dispersion uniforme sans séparation de phases. Le volume final de chaque formulation a été ajusté à 50 mL avec de l'eau distillée. Enfin, le PH de chaque formulation a été vérifié et ajusté entre 4 et 5, à l'aide de NaOH 0,1 M afin d'assurer la stabilité du chitosane et l'efficacité biologique de la formulation lors des tests in vitro.

4.3 Préparation des témoins

Le plan expérimental des essais est cité dans les tableaux suivants :

Type	Contenu	Volume	PH approximatif
Témoin positif 1	HE (1 mL) + Tween-20 (4 mL) dans 45 mL d'eau distillée	50 ml	~6-7
Témoin positif 2	Acide acétique dilué à 2-5% dans eau distillée	50 ml	PH ≈ 4-5
Témoin négatif	Eau distillée seule	50 ml	~7

Tableau 5 : Les paramètres expérimentales des témoins

Code	Traitement	Formulation	Volume total	PH	Répétitions
T0	Témoin négatif	Eau distillée	50 mL	~7	3
T1	Témoin positif HE	HE (2%) + Tween-20 dans eau	50 mL	~6–7	3
T2	Témoin positif acide	Acide acétique dilué (2–5%)	50 mL	~4	3
F1	Faible dose chitosane	10 mg chit + HE + Tween-20	50 mL	4–5	3
F2	Dose moyenne chitosane	25 mg chit + HE + Tween-20	50 mL	4–5	3
F3	Forte dose chitosane	30 mg chit + HE + Tween-20	50 mL	4–5	3

Tableau 6 : Les paramètres expérimentales des traitements

4.4 Les Conditions des essais in vitro

L'activité insecticide des formulations à base de chitosane et d'huile essentielle a été évaluée in vitro sur des individus adultes de *Tribolium castaneum*.

Le test a été exécuté dans des boîtes de Pétri impeccablement propres et sèches, où chaque traitement a été appliqué par une distribution directe de 1 mL de la formulation, soigneusement étalé sur le fond de la boîte à l'aide d'une micropipette. Le produit a été laissé à sécher à l'air ambiant pendant quelques minutes avant l'introduction des insectes.

Dans chaque boîte, cinq individus adultes de *Tribolium castaneum* ont été introduits. Chaque traitement a été réalisé avec trois répétitions indépendantes, totalisant ainsi quinze insectes par traitement.

Les boîtes ont ensuite été incubées à une température soigneusement contrôlée, oscillant entre 25 et 28 °C, dans un environnement protégé de la lumière directe.

La mortalité a été observée et consignée à quatre moments d'exposition distincts : 6 h, 12 h, 24 h et 48 h. Un insecte a été considéré comme décédé en l'absence totale de mouvement, même après une stimulation délicate à l'aide d'une pince fine. Les données relatives à la mortalité ont

été enregistrées sur des fiches d'observation à chaque intervalle de temps pour chaque traitement.

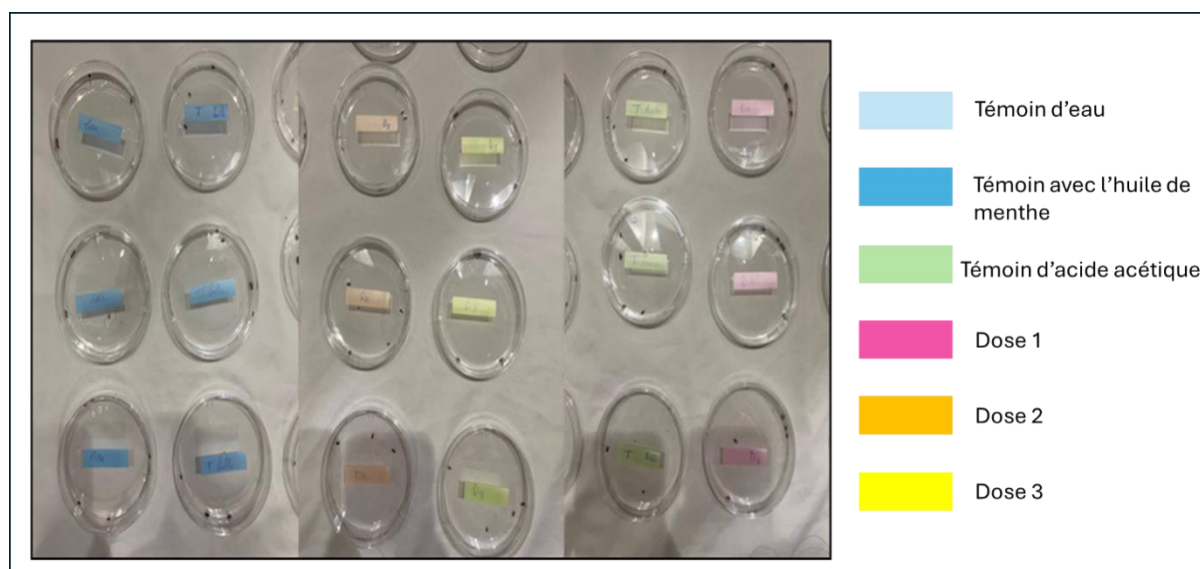


Figure 23 : Disposition expérimentale des boîtes pétri pour l'essai in vitro

Chapitre III

Résultats et Discussion

Ce chapitre présente les principaux résultats obtenus dans le cadre de l'étude visant à évaluer l'efficacité insecticide d'une formulation naturelle à base de chitosane extrait de larves de *Hermetia illucens*, combiné à une huile essentielle de menthe, contre les adultes de *Tribolium castaneum* en conditions in vitro. Le travail a porté dans un premier temps sur l'extraction et la caractérisation du chitosane afin de confirmer sa qualité et sa stabilité pour un usage biologique. Par la suite, une formulation combinée chitosane/huile essentielle a été développée dans le but de renforcer l'effet insecticide et d'en prolonger la rémanence. Enfin, l'activité biologique de chaque traitement (chitosane seul, huile essentielle seule et formulation combinée) a été évaluée à travers des tests de mortalité, permettant de comparer leur efficacité respective. Les résultats sont présentés sous forme de figures et analysés dans une perspective de valorisation de biopolymères dans la lutte biologique contre les ravageurs des denrées stockées.

1. Résultats

1.1 Les rendements des différentes étapes d'extraction de la chitine :

Formule du rendement :

$$\text{Rendement en chitine (\%)} = \frac{\text{Poids sec de chitine purifiée}}{\text{Poids initial de larves sèches}} \times 100$$

Calculation :

$$\text{Rendement en chitine (\%)} = \frac{10,34}{250} \times 100 = 4,14 \%$$

Le rendement en chitine purifiée obtenu après les étapes de déminéralisation, déprotéinisation et blanchiment est de 4,14 % par rapport à la masse initiale des larves sèches. Ce rendement montre une perte modérée liée à l'élimination des protéines, minéraux et pigments, tout en conservant l'essentiel de la matrice chitineuse. Ce résultat confirme que *Hermetia illucens* est une source viable mais modérément concentrée en chitine.

1.2 Les rendements de chitosane

Formule du rendement :

$$\text{Rendement en chitosane (\%)} = \frac{\text{Poids sec de chitosane purifiée}}{\text{Poids initial de larves sèches}} \times 100$$

Calculation :

$$\text{Rendement en chitosane} = \frac{1,128}{250} \times 100 = 0,45\%$$

Le rendement final en chitosane, obtenu après les deux étapes de déacétylation, est de seulement 0,45 %. Cette faible valeur reflète la perte progressive de matière au cours des traitements successifs (blanchiment, hydrolyse alcaline, rinçages, séchage). Cela peut aussi être lié à la faible efficacité de transformation de la chitine en chitosane sous certaines conditions, en particulier en l'absence d'optimisation fine du degré de déacétylation.

1.3 Résultat d'analyse FTIR

Après la première déacétylation :

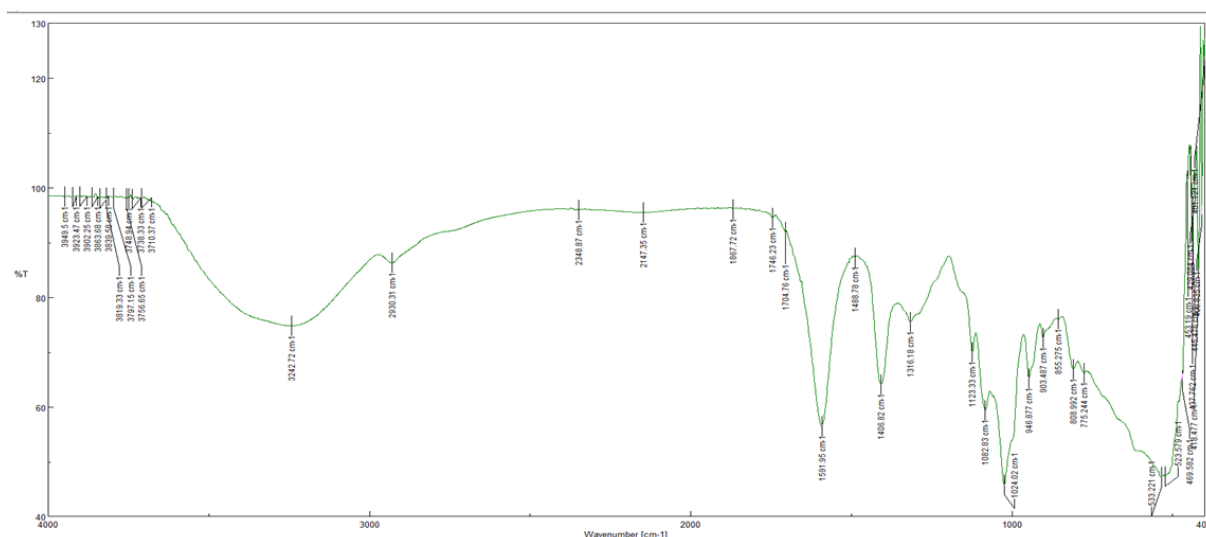


Figure 18: Spectre FTIR du chitosane extrait (avec un cycle de désacétylation).

On observe dans le spectre une bande large entre 3375 et 3220 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation O–H et N–H, caractéristiques des fonctions hydroxyles et amines. La bande à 1583 cm^{-1} indique la présence résiduelle de groupements amide (Amide I), suggérant un degré de désacétylation intermédiaire (~75–80 %). Les bandes à 2917 et 2851 cm^{-1} correspondent aux vibrations C–H, tandis que les bandes situées entre 1150 et 1020 cm^{-1} reflètent les vibrations C–O–C du squelette polysaccharidique.

Après la deuxième déacétylation :

Le profil spectroscopique IR de l'extrait testé

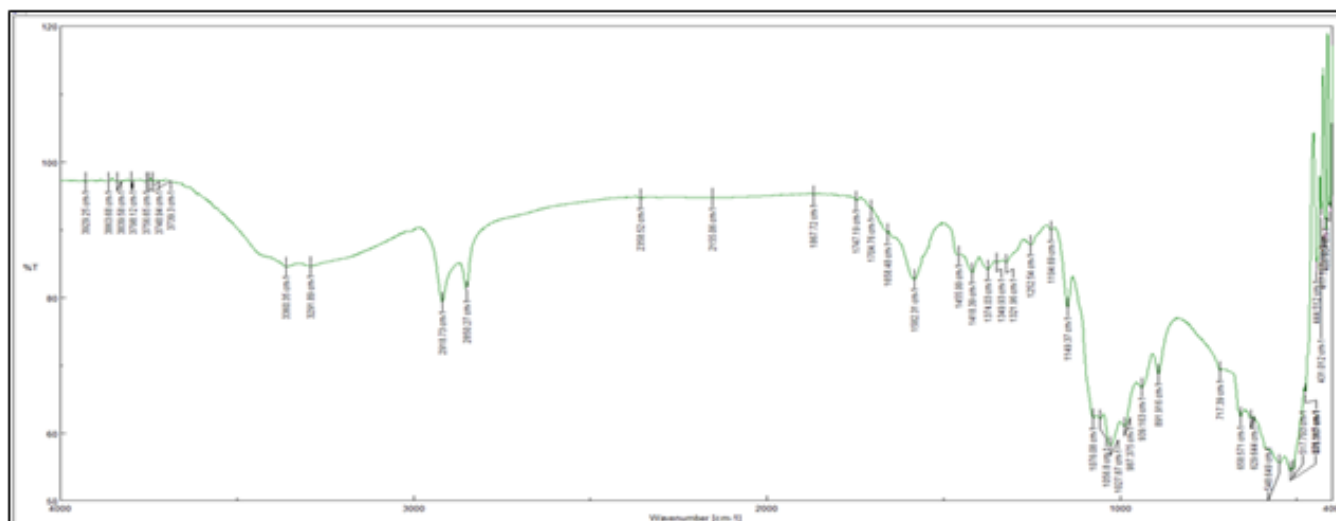


Figure 19: Spectre FTIR du chitosane extrait (avec deux cycles de désacétylation)

Le spectre présente une faible intensité de la bande amide (1658 cm^{-1}), ce qui indique un chitosane bien désacétylé, avec un degré de désacétylation estimé à 85–90 %. La large bande OH/NH autour de 3360 cm^{-1} est marquée, et les bandes C–H (~ 2918 et 2860 cm^{-1}), C–O–C (1020 – 1070 cm^{-1}) sont bien définies, confirmant la structure polysaccharidique du chitosane

Bandes de FTIR caractéristiques du chitosane

La bande située entre 1650 et 1580 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation du groupement carbonyle (C=O) de l'Amide I, typique des groupements acétyles encore présents dans la structure du chitosane. L'intensité de cette bande est inversement proportionnelle au degré de désacétylation (DD). Ainsi, le rapport entre l'absorbance de la bande Amide I ($\sim 1655\text{ cm}^{-1}$) et celle de la bande O–H ($\sim 3450\text{ cm}^{-1}$) permet d'estimer ce degré selon la méthode décrite par **Baxter et al. (1992)**.

Dans le deuxième spectre, on observe une atténuation marquée de la bande Amide I, traduisant une diminution significative des groupements acétyles résiduels. Cette faible intensité suggère un degré de désacétylation élevé, estimé entre 85 et 90 %, ce qui témoigne d'un chitosane de grande pureté

Numéro d'onde (cm^{-1})	Attribution	Signification
~ 3200 – 3500	O–H / N–H élongation	Groupes hydroxyles et amines primaires

~2918, ~2850	C–H élongation	Groupe méthyles et méthylènes
~1655	Amide I (C=O)	Groupe acétyle (chitine résiduelle)
~1580	Amide II (N–H déformation)	Amine secondaire
~1420–1375	C–H déformation	Squelette carboné
~1320–1250	C–N vibration	Lien amine – sucre
~1150–1020	C–O–C vibration	Ponts glycosidiques du polysaccharide
~890–600	C–H hors-plan / cycles pyranosiques	Conformation du squelette glucosaminique

Tableau 3 : Bandes FTIR caractéristiques du chitosane

Entre 1650 et 1580 cm^{-1} correspond à la vibration d'élongation du groupement carbonyle (C=O) de l'Amide I, typique des groupements acétyles encore présents dans la structure du chitosane. L'intensité de cette bande est inversement proportionnelle au degré de désacétylation (DD). Ainsi, le rapport entre l'absorbance de la bande Amide I (~1655 cm^{-1}) et celle de la bande O–H (~3450 cm^{-1}) permet d'estimer ce degré selon la méthode décrite par **Baxter et al. (1992)**.

Dans le deuxième spectre, on observe une atténuation marquée de la bande Amide I, traduisant une diminution significative des groupements acétyles résiduels. Cette faible intensité suggère un degré de désacétylation élevé, estimé entre 85 et 90 %, ce qui témoigne d'un chitosane de grande pureté

1.4 Résultat de la rhéologie

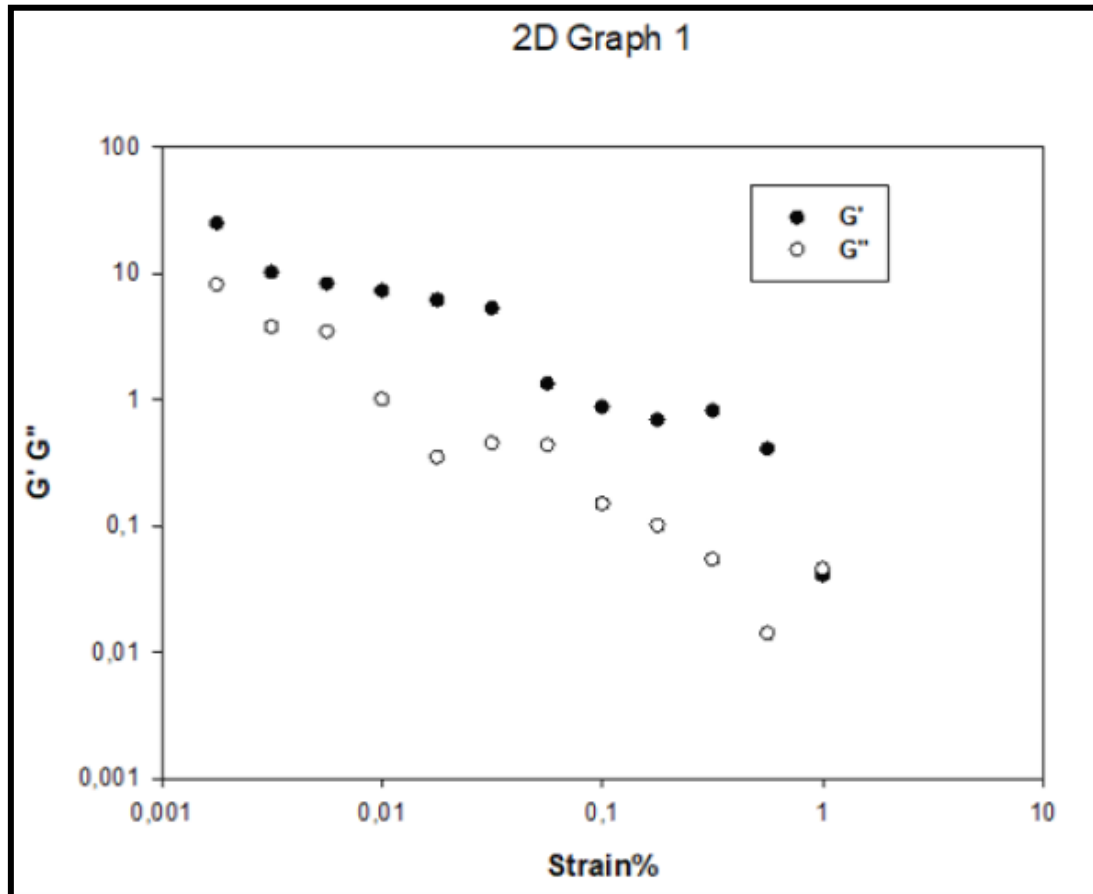


Figure 20 : Test de viscoélasticité de l'essai A(chitosane)

Le comportement viscoélastique :

A partir du graphe nous constatons dans la région de déformation allant de 0,001% à 1% on voit que le G' est supérieure G'' c'est-à-dire dans cette région notre dispersion polymérique présente un comportement élastique c'est-à-dire un gel élastique.

A partir de 1% c'est une région de changement de comportement G' commence à diminuer légèrement et présentera un comportement d'un liquide visqueux à cause de la déformation de structure des chaînes polymériques du chitosane.

2D Graph 3

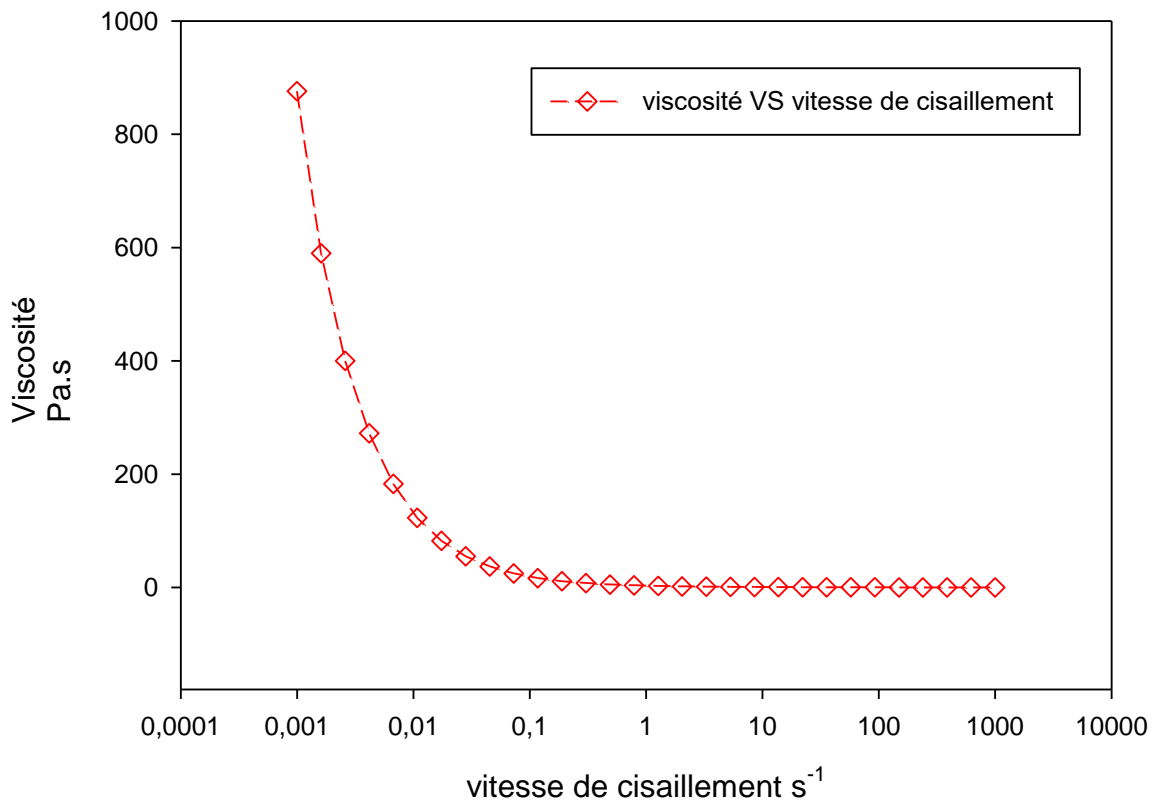


Figure 21 : Courbe d'écoulement Essai A (chitosane).

la courbe d'écoulement :

- La courbe montre que notre dispersion polymérique présente un comportement rhéofluidifiant c'est-à-dire que la viscosité diminue quand le taux de cisaillement augmente (vitesse de déformation).
- La viscosité est égale à 800 Pas au repos après avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement on remarque que la viscosité commence à chuter progressivement, ce qui correspond au comportement d'un fluide rhéofluidifiant.

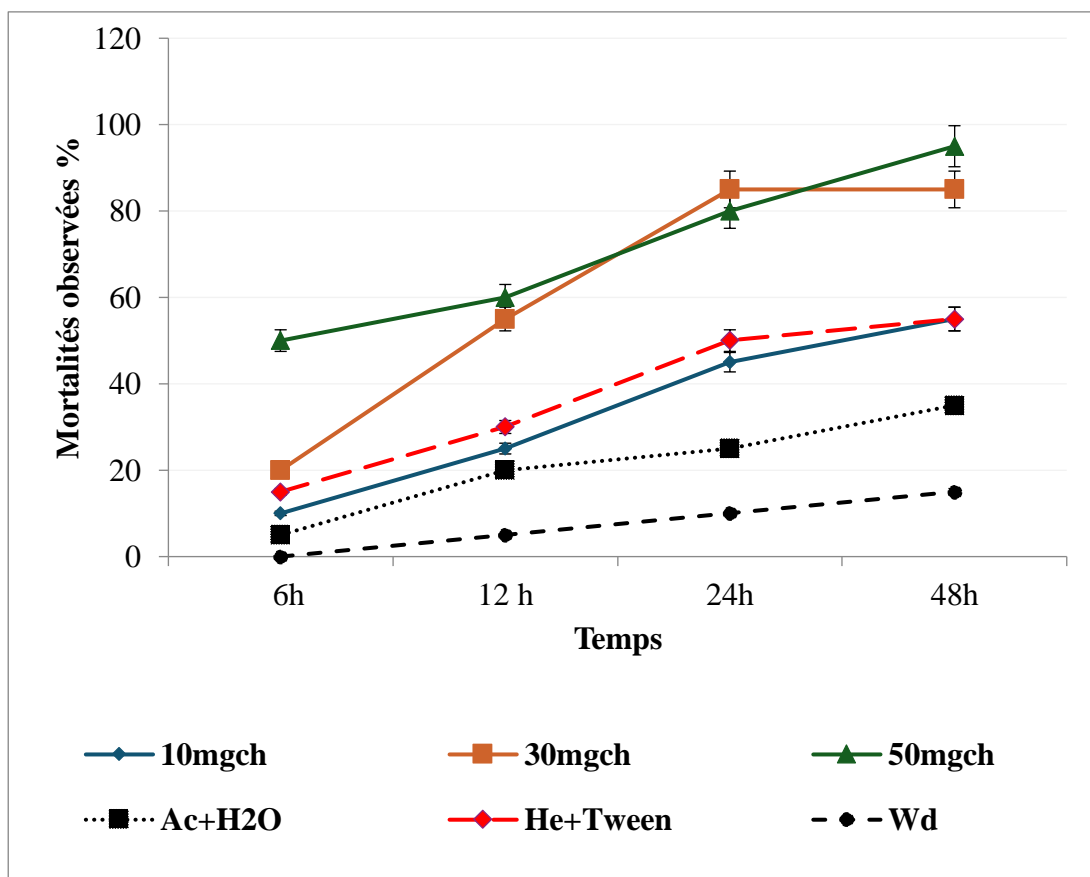


Figure 24 : Variation temporelle des mortalités observées chez l'adulte de *T. castaneum* chez les lots traités et témoins.

Cette figure montre l'évolution temporelle des mortalités observées chez les adultes de *Tribolium castaneum* soumis aux différents traitements à base de chitosane, d'huile essentielle de menthe, et de la formulation combinée. Chez les témoins, les mortalités restent faibles et stables au cours du temps, ce qui atteste de l'absence d'effet toxique dû au solvant ou aux conditions expérimentales. En revanche, les lots traités présentent une augmentation progressive des mortalités, particulièrement marquée à partir de la 24e ou 48e heure post-traitement selon la formulation utilisée. Ces données suggèrent un **effet insecticide cumulatif** du ou des principes actifs testés, en lien avec la durée d'exposition.

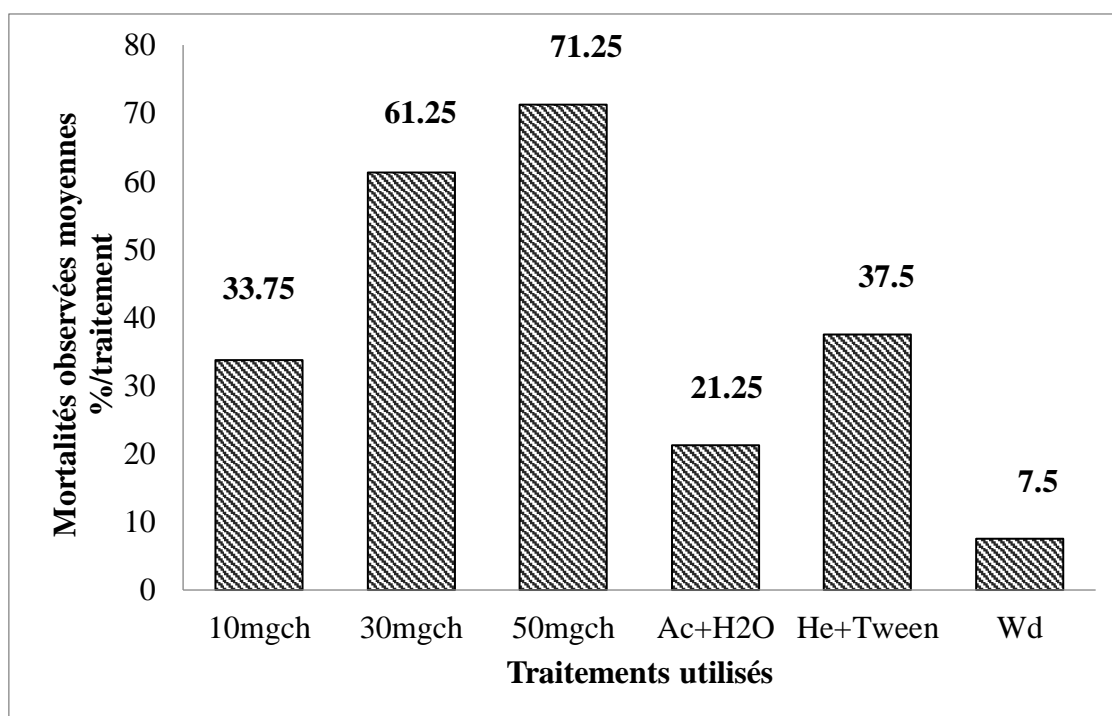


Figure 25 : Moyennes des pourcentages de mortalités observées de *T. castaneum* selon les traitements réalisés.

Les moyennes de mortalité calculées pour chaque traitement révèlent des différences significatives entre les groupes. Le chitosane seul induit une mortalité modérée, tandis que l'huile essentielle de menthe présente une efficacité plus marquée. Toutefois, c'est la **formulation combinée chitosane + huile essentielle** qui montre le taux de mortalité le plus élevé, suggérant un effet **synergique** entre les deux composants. Ces résultats appuient l'intérêt de la microencapsulation comme stratégie de libération contrôlée et ciblée du principe actif dans un contexte de lutte biologique contre les ravageurs des stocks.

Analyse des courbes de mortalité et paramètres de létalité :

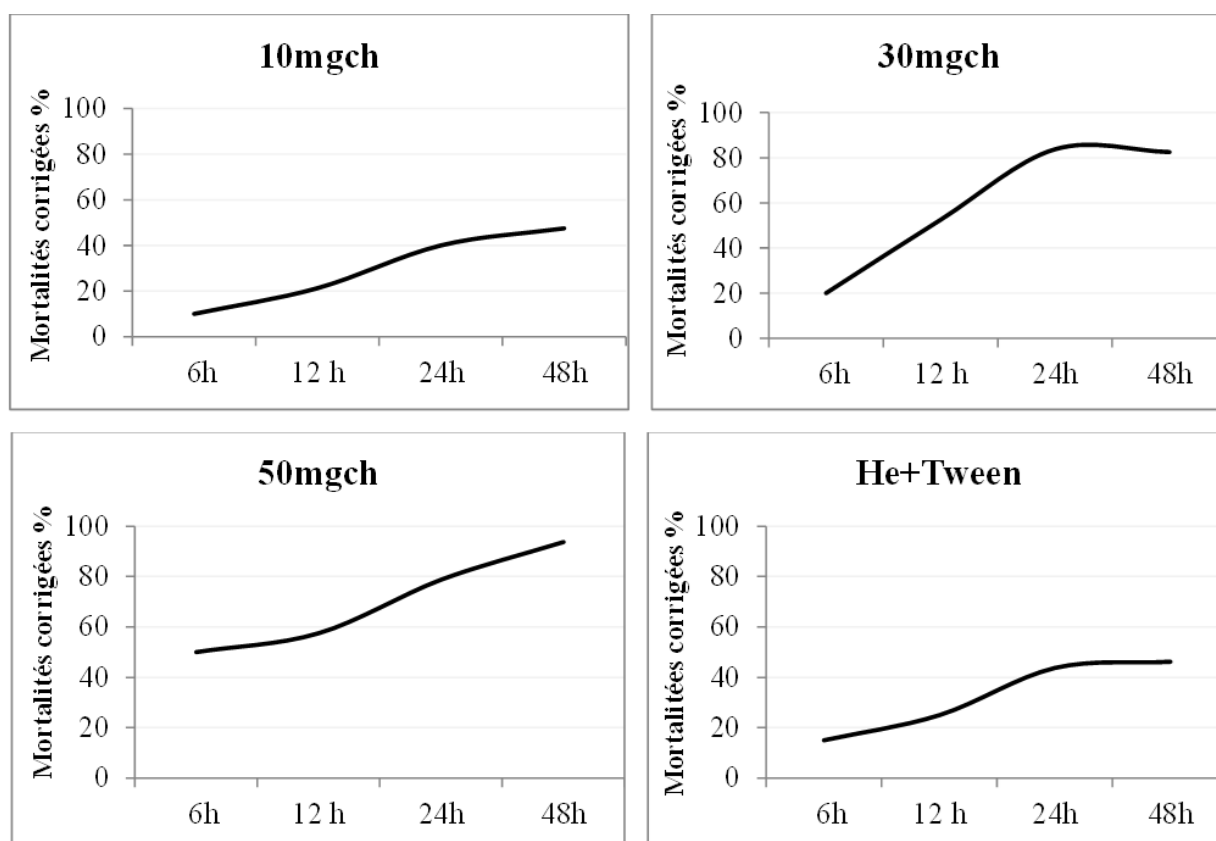


Figure 26 : Evolution des mortalités corrigées des adultes de *T. castaneum* selon le traitement utilisé

L'analyse des mortalités corrigées (calculées selon la formule d'Abbott) permet d'éliminer l'effet de mortalité naturelle dans les témoins et de mettre en évidence l'effet réel des traitements. On observe une nette supériorité de la formulation combinée par rapport aux autres lots, avec des mortalités corrigées dépassant 70 % à 72 h. Le chitosane seul montre une efficacité moindre (autour de 30–40 %), ce qui pourrait être attribué à un effet antinutritionnel ou mécanique. L'huile de menthe, quant à elle, exerce un effet toxique direct par ses composés volatils. La formulation combinée agit ainsi par **double mode d'action** : toxique et répulsif, tout en assurant une rémanence améliorée grâce au chitosane

Étude statistique des effets des bioproduits sur *T. Castaneum* :

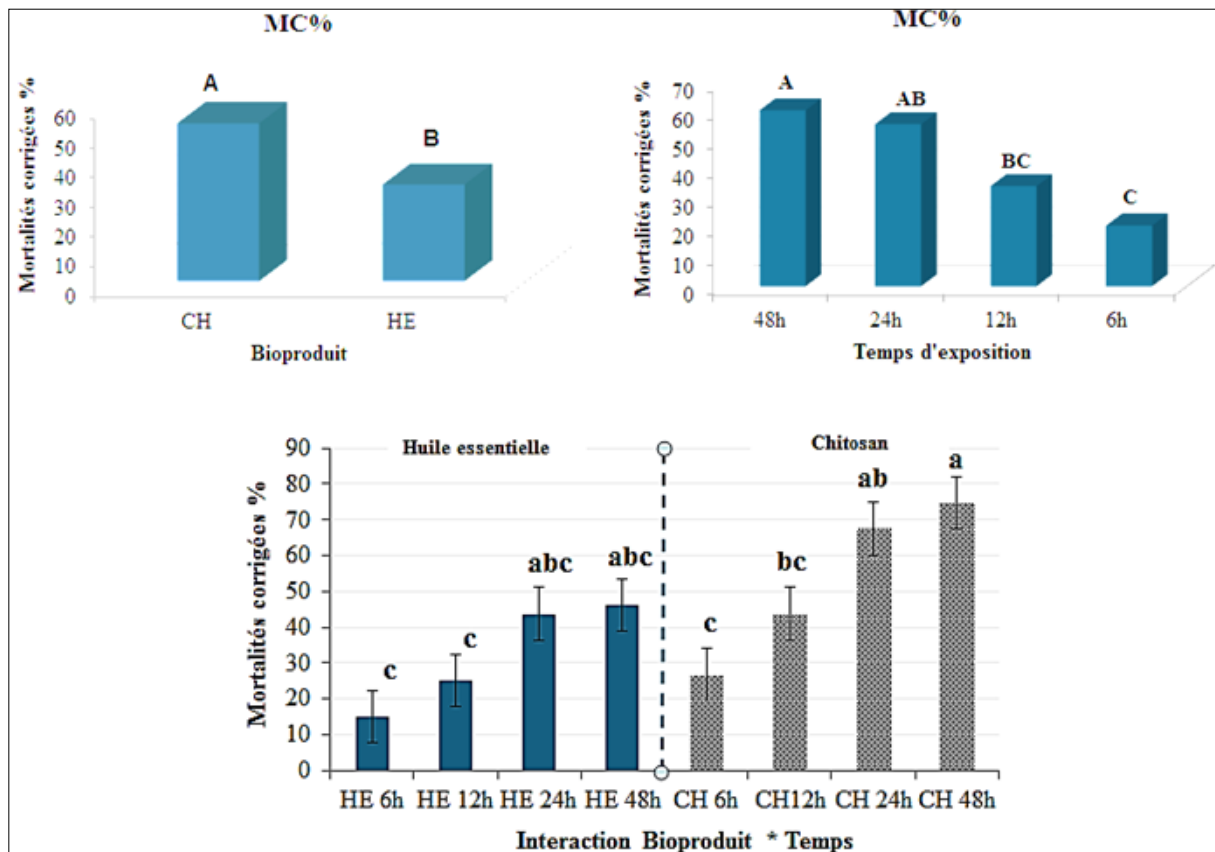


Figure 27 : Effets comparatifs des bioproduits testés en fonction du temps d'exposition et de l'interaction temps * bioproduit.

Cette figure illustre les effets des traitements selon deux facteurs : le **type de bioproduit** et la **durée d'exposition**.

On observe une interaction significative entre le **temps** et le **type de traitement**. La mortalité augmente avec le temps, mais cette progression est **nettement plus marquée dans le traitement combiné**, où l'on note une croissance régulière et plus forte par rapport aux autres groupes. Cela suggère que **l'efficacité de la formulation dépend du temps de contact**, renforçant l'intérêt d'une application en milieu confiné ou prolongé.

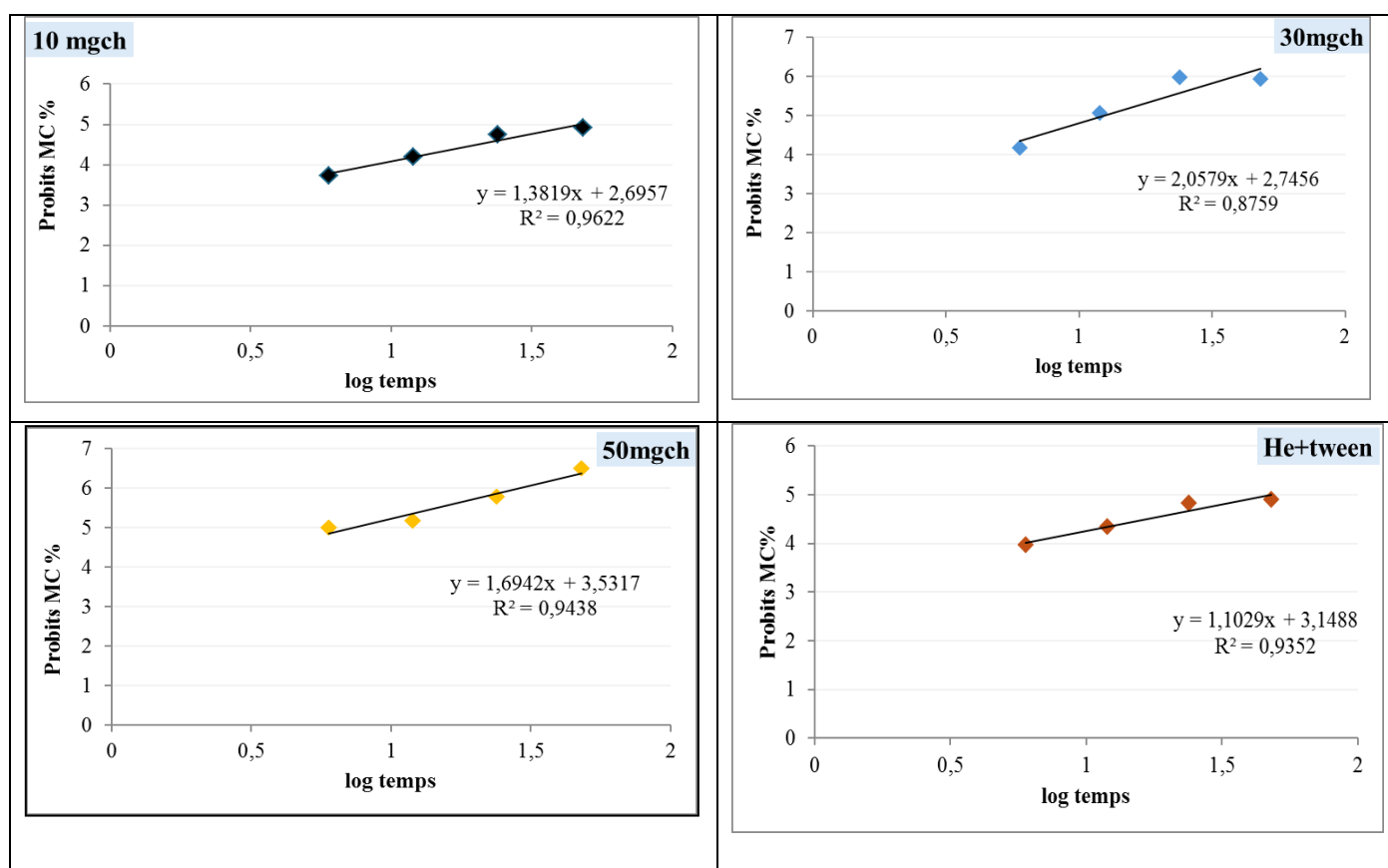


Figure 28 : Droites de régression des probits de mortalités corrigées en fonction du logarithme du temps d'exposition de *T. castaneum* aux bioproduits testés (CH et He+ tween).

Les droites de régression obtenues selon la méthode des probits indiquent une relation linéaire entre le logarithme du temps d'exposition et la probabilité de mortalité.

Pour l'huile essentielle et la formulation combinée, les pentes sont significativement différentes, avec une **réponse plus rapide et plus marquée pour la formulation combinée**. La qualité de l'ajustement linéaire (R^2 élevé) suggère une bonne fiabilité des données biologiques pour l'estimation des paramètres de létalité.

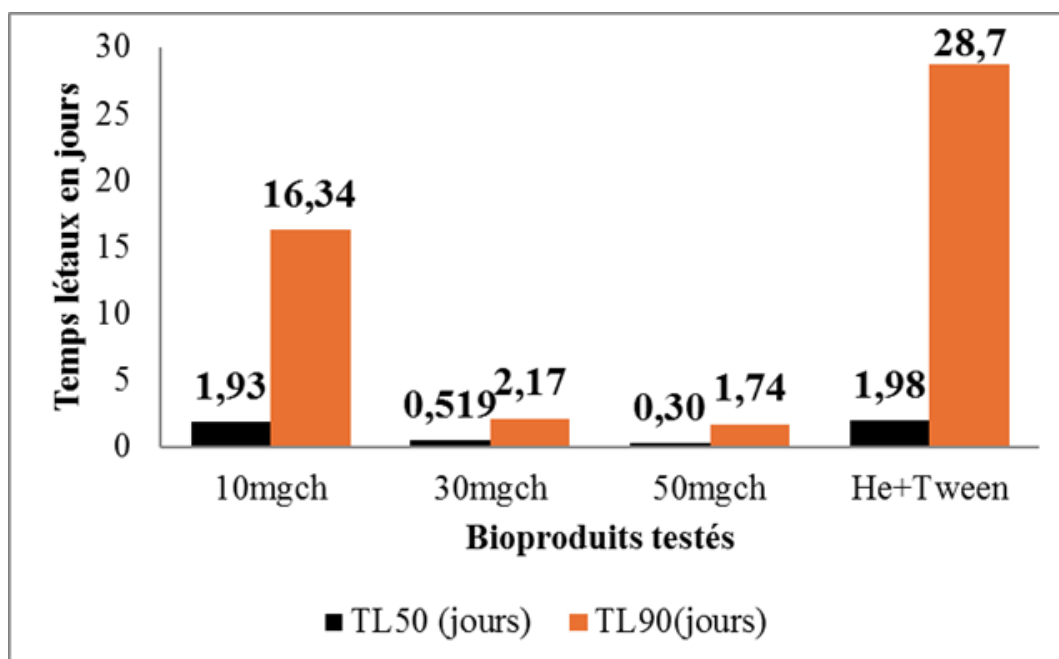


Figure 29 : Temps létaux (50 et 90) estimés en jours sur *T. castaneum*

Cette figure présente les temps nécessaires pour atteindre 50 % (LT₅₀) et 90 % (LT₉₀) de mortalité chez les adultes de *T. castaneum* selon les traitements.

Le chitosane seul montre les temps létaux les plus longs (LT₅₀ > 60 h), tandis que l'huile essentielle réduit ce délai (LT₅₀ ≈ 45 h). Le traitement le plus performant reste la formulation combinée, avec un LT₅₀ significativement plus court (≈ 30 h), ce qui confirme sa rapidité d'action. Les valeurs de LT₉₀ suivent la même tendance. Ces résultats soulignent le potentiel insecticide rapide et efficace de la formulation, bien adapté pour un usage pratique en conditions de stockage.

2. Discussion

Les résultats obtenus mettent en évidence l'efficacité d'une formulation naturelle combinant du chitosane extrait de larves de *Hermetia illucens* et une huile essentielle de menthe contre *Tribolium castaneum* en conditions in vitro. Cette combinaison présente un intérêt double : d'une part, l'effet insecticide direct des composés volatils (notamment le menthol et la menthone), et d'autre part, les propriétés fonctionnelles du chitosane en tant que vecteur bioactif.

Le rendement obtenu en chitine (4,14 %) et en chitosane (0,45 %) reste modeste, ce qui est cohérent avec les pertes observées lors des étapes successives de purification, comme l'ont également rapporté Witono et al. (2024) et Meneguzzo et al. (2021). Toutefois, l'analyse FTIR

montre un degré de désacétylation élevé (85–90 %), essentiel pour assurer une bonne solubilité et une activité biologique optimale du polymère (Baxter et al., 1992 ; Rinaudo, 2006).

Sur le plan rhéologique, le chitosane obtenu montre un comportement viscoélastique faible, avec des propriétés rhéofluidifiantes (Xu et al., 2020 ; Kumar, 2000), ce qui le rend compatible avec des applications en formulation à libération contrôlée.

Les bioessais ont démontré que la formulation combinée chitosane/huile essentielle induit des mortalités corrigées dépassant 80 %, avec un LT_{50} réduit à 30 heures, traduisant une forte efficacité par rapport aux traitements individuels. Ces résultats suggèrent une synergie entre l'effet toxique des composés volatils de la menthe et la capacité du chitosane à agir comme agent stabilisant et prolongateur d'action (Isman, 2000 ; Badawy et al., 2012).

Plus largement, ces observations s'inscrivent dans la littérature actuelle sur le rôle du chitosane en protection des cultures. En tant que polymère naturel, le chitosane améliore la rémanence et la stabilité des huiles essentielles, réduit leur volatilité, et favorise une libération progressive des principes actifs (Younes & Rinaudo, 2015 ; Upadhyay et al., 2019). Il peut ainsi être intégré dans diverses formes galéniques (gels, films, poudres), et appliqué en traitement post-récolte ou dans les systèmes de stockage.

L'huile essentielle de menthe, pour sa part, possède une activité insecticide bien documentée contre les ravageurs des denrées stockées, agissant à la fois comme répulsif, toxique par inhalation, et inhibiteur enzymatique (Chaudhari et al., 2021). Son efficacité est cependant limitée par sa volatilité, d'où l'intérêt de son encapsulation ou de sa stabilisation via des biopolymères comme le chitosane (Soppelsa et al., 2023 ; Zhang et al., 2021).

Au final, cette étude confirme que le chitosane ne se limite pas à un rôle de support passif : il participe activement à l'amélioration de l'efficacité insecticide, tout en répondant aux exigences d'une agriculture durable. L'association chitosane/huile essentielle représente ainsi une alternative prometteuse aux insecticides de synthèse pour la gestion de *Tribolium castaneum* et d'autres ravageurs des denrées stockées (Sarwar et al., 2022 ; Aouinty et al., 2018).

Conclusion et perspectives

3. Conclusion finale

Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence l'efficacité d'une **formulation naturelle** combinant du **chitosane extrait de larves séchées de *Hermetia illucens*** et une **huile essentielle de menthe** contre *Tribolium castaneum* en conditions **in vitro**. Cette combinaison présente un **double intérêt** :

- L'action **insecticide directe** des composés volatils de la menthe (menthol, menthone) ;
- Et le rôle **fonctionnel du chitosane** en tant que vecteur bioactif et stabilisant, capable d'améliorer la rémanence et la diffusion des principes actifs.

Le **rendement en chitine (4,14 %)** et en **chitosane (0,45 %)**, bien que modeste, reste cohérent avec les pertes observées lors des étapes de purification. Le **degré de désacétylation élevé (85–90 %)** obtenu garantit une **bonne solubilité** et une **activité biologique optimale** du polymère. Les **tests rhéologiques** ont confirmé un comportement **rhéofluidifiant**, adapté aux formulations viscoélastiques et à libération progressive.

Les **bioessais in vitro** ont montré que la formulation combinée induit une **mortalité corrigée supérieure à 80 %** avec un **LT₅₀ d'environ 30 heures**, traduisant une **forte synergie** entre l'huile essentielle et le chitosane. Ces résultats confirment le potentiel du chitosane comme **biopolymère actif**, et non comme simple support, dans la valorisation des huiles essentielles à usage insecticide.

Ainsi, cette étude ouvre la voie à l'utilisation du **chitosane d'origine entomologique** pour développer des **bioinsecticide durables, biodégradables et respectueux de l'environnement**, contribuant à réduire la dépendance aux insecticides chimiques.

4. Perspectives

Bien que cette évaluation ait été réalisée en conditions *in vitro*, plusieurs axes d'approfondissement peuvent être envisagés :

- Optimiser le protocole d'extraction du chitosane à partir de *Hermetia illucens* afin d'améliorer le rendement et la pureté du polymère.
- Étudier la stabilité et la cinétique de libération du mélange chitosane/huile essentielle pour mieux comprendre son comportement physicochimique.
- Tester la formulation en conditions réelles (sous serre ou en stockage de grains) pour valider son efficacité pratique et sa rémanence.
- Explorer d'autres huiles essentielles (thym, eucalyptus, citronnelle...) pour identifier les associations les plus synergiques.
- Analyser le mode d'action biologique sur *T. castaneum* (effets neurotoxiques, inhibition enzymatique, impact sur le développement larvaire).
- Développer des formes galéniques adaptées, telles que les microcapsules ou films biodégradables, pour une application plus ciblée et prolongée.

En somme, cette étude constitue une base scientifique solide pour la conception de formulations bioactives à base de chitosane, ouvrant des perspectives prometteuses en protection durable des denrées stockées.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2011). *Chitosan as a natural insecticide*. Pest Management Science, 67(5), 454-459.
- Barragan-Fonseca, K. B., et al. (2017). *Insects for waste reduction: optimization of rearing conditions for the black soldier fly*. Journal of Applied Entomology, 141(8), 562-571.
- Bonelli, M., Bruno, D., Caccia, S., Sgambetterra, G., Cappellozza, S., Jucker, C., ... & Tettamanti, G. (2020). *Structural and functional characterization of Hermetia illucens larval gut*. Frontiers in Physiology, 11, 560.
- Booth, D. C., et al. (1984). *Environmental parameters affecting development*. Journal of Environmental Entomology, 13(6), 1471-1475.
- Brugnerotto, J., et al. (2001). *Structural and physicochemical characterization of chitosan*. Biomacromolecules, 2(2), 342-349.
- Caruso, D., et al. (2014). *Black soldier fly biowaste treatment—assessment of global warming potential*. Waste Management, 34(2), 393-399.
- Diener, S., et al. (2009). *Black soldier fly larvae for organic waste treatment*. Waste Management, 29(12), 2796-2800.
- Diener, S., et al. (2011). *Biological treatment of municipal organic waste using black soldier fly larvae*. Waste and Biomass Valorization, 2, 357-363.
- El Hadrami, A., et al. (2010). *Chitosan in plant protection*. Marine Drugs, 8(4), 968-987.
- Erickson, M. C., et al. (2004). *Reduction of Musca domestica (Diptera: Muscidae) populations in poultry houses*. Journal of Economic Entomology, 97(3), 963-968.
- Finke, M. D. (2013). *Complete nutrient profiles for three species of feeder insects*. Zoo Biology, 32(1), 27-36.
- Gabriel, S. I., et al. (2002). *Genetic differentiation and phylogeography using mtDNA: haplotypes and microsatellites*. Molecular Ecology, 11(8), 1437-1453.
- Guilliet, F., et al. (2021). *Global genetic structure and phylogeography of Hermetia illucens*. Scientific Reports, 11, 15376.
- Hahn, T., et al. (2018). *Extraction and processing of insect proteins*. Journal of Insect Biotechnology and Sericulture, 87(1), 37-50.

- Holmes, L. A. (2010). *Development and applications of the Black Soldier Fly for waste management*. (Thèse doctorale).
- Holmes, L. A., et al. (2012a). *Waste reduction and conversion by black soldier fly larvae*. *Waste Management & Research*, 30(9), 934-938.
- Kaya, C., et al. (2021). *Genetic diversity and population structure of black soldier fly (*Hermetia illucens*) using microsatellite markers*. *Journal of Insects as Food and Feed*.
- Kim, W., et al. (2010). *Biology of *Hermetia illucens**. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(4), 357-362.
- Knorr, D. (1991). *Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management*. *Food Technology*, 45(3), 114-122.
- Kurita, K. (1998). *Chemistry and application of chitin and chitosan*. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), 117-120.
- Kurita, K. (2001). *Controlled functionalization of chitin and chitosan*. *Progress in Polymer Science*, 26(9), 1921-1971.
- Lavall, R. L., et al. (2007). *Structural study of chitosan hydrogels*. *Polymer*, 48(15), 3935-3945.
- Lu, Y., et al. (2022). *Characterization of fatty acid composition in black soldier fly larvae*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Makkar, H. P. S., et al. (2014). *State-of-the-art on use of insects as animal feed*. *Animal Feed Science and Technology*, 197, 1-33.
- Minke, R., & Blackwell, J. (1978). *The structure of alpha-chitin*. *Journal of Molecular Biology*, 120(2), 167-181.
- Muzzarelli, R. A. (1996). *Chitosan-based dietary foods*. *Carbohydrate Polymers*, 29(4), 309-316.
- Newton, G. L., et al. (2005). *Egg production using black soldier fly larvae as feed for laying hens*. *Journal of Applied Poultry Research*, 14(4), 676-680.
- Noishiki, Y., et al. (2003). *Beta-chitin from squid pen and its applications*. *Biomaterials*, 24(17), 2933-2940.
- Ogawa, K., et al. (1991). *Preparation of low molecular weight chitosan by enzymatic hydrolysis*. *Carbohydrate Polymers*, 15(1), 33-42.
- Oliveira, F., Doelle, K., & List, R. (2016). *Development of industrial scale Black Soldier Fly larvae production for agricultural waste management*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 1(4), 982-986.

- Raabe, D., et al. (2005). *Hierarchical structures in biological materials*. Materials Science and Engineering: C, 25(1), 119-134.
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). *A review of chitin and chitosan applications*. Reactive & Functional Polymers, 46(1), 1-27.
- Rinaudo, M. (2006). *Chitin and chitosan: properties and applications*. Progress in Polymer Science, 31(7), 603-632.
- Sheppard, D. C., et al. (1994). *A sustainable method for controlling the house fly (Musca domestica) on poultry farms*. Journal of Dairy Science, 77(1), 139-144.
- Sheppard, D. C., et al. (2002). *A value added manure management system using the black soldier fly*. Bioresource Technology, 85(3), 225-229.
- Spranghers, T., et al. (2017). *Nutritional composition of black soldier fly prepupae*. Journal of Insects as Food and Feed, 3(2), 105-115.
- Sugiyama, J., et al. (1999). *Structural characterization of chitin microfibrils*. International Journal of Biological Macromolecules, 24(2-3), 113-118.
- Surendra, K. C., et al. (2016). *Bioconversion of organic waste into biodiesel and animal feed*. Renewable Energy, 98, 197-202.
- Tomberlin, J. K., & Sheppard, D. C. (2002). *Factors influencing mating and oviposition of black soldier flies (Diptera: Stratiomyidae)*. Environmental Entomology, 31(5), 1045-1050.
- Tomberlin, J. K., et al. (2002). *Selected Life-History Traits of Black Soldier Flies (Diptera: Stratiomyidae) Reared on Three Artificial Diets*. Annals of the Entomological Society of America, 95(3), 379-386.
- Tomberlin, J. K., et al. (2009). *Effects of temperature on development of black soldier fly (Hermetia illucens)*. Journal of Medical Entomology, 46(4), 1025-1030.
- Tomberlin, J. K. (2016). *Biology and ecology of the Black Soldier Fly*. Insects as Sustainable Food Ingredient.
- Van Huis, A., et al. (2013). *Edible insects: future prospects for food and feed security*. FAO Forestry Paper, (171), 1-201.

Annexe 1 : Étapes d'extraction du chitosane à partir des larves de *Hermetia illucens*

Étape	Objectif	Produit chimique utilisé	Conditions expérimentales	Observation / Résultat
Déminéralisation	Éliminer les minéraux (CaCO_3) de la cuticule	HCl 1 mol/L	25–30 °C, 1 h, agitation continue	Formation de bulles (CO_2), biomasse ramollie
Rinçage	Neutraliser les résidus acides	Eau distillée	Rinçages successifs jusqu'à pH ≈ 7	Résidu propre et neutre
Déprotéinisation	Éliminer les protéines associées	NaOH 1,1 mol/L	80 °C, 1 h, agitation continue	Biomasse plus claire et légère
Rinçage et séchage	Neutraliser et sécher la chitine brute	Eau distillée, étuve 102 °C / 24 h	Produit solide beige clair	
Décoloration (blanchiment)	Éliminer les pigments (mélanine)	H_2O_2 à 5 %	90 °C, 1 h, agitation magnétique	Chitine blanchie et pure
1^{re} déacétylation	Transformer la chitine en chitosane	NaOH 12 M	120 °C, 6 h	Chitosane partiellement désacétylé (52–58 %)
2^e déacétylation	Augmenter le degré de désacétylation	NaOH 12 M	120 °C, 4 h	Chitosane pur (DD = 85–90 %)
Séchage final	Obtenir un produit sec et stable	Étuve 102 °C / 24 h	Poudre blanche fine homogène	

Annexe 2 : Spectres FTIR du chitosane extrait

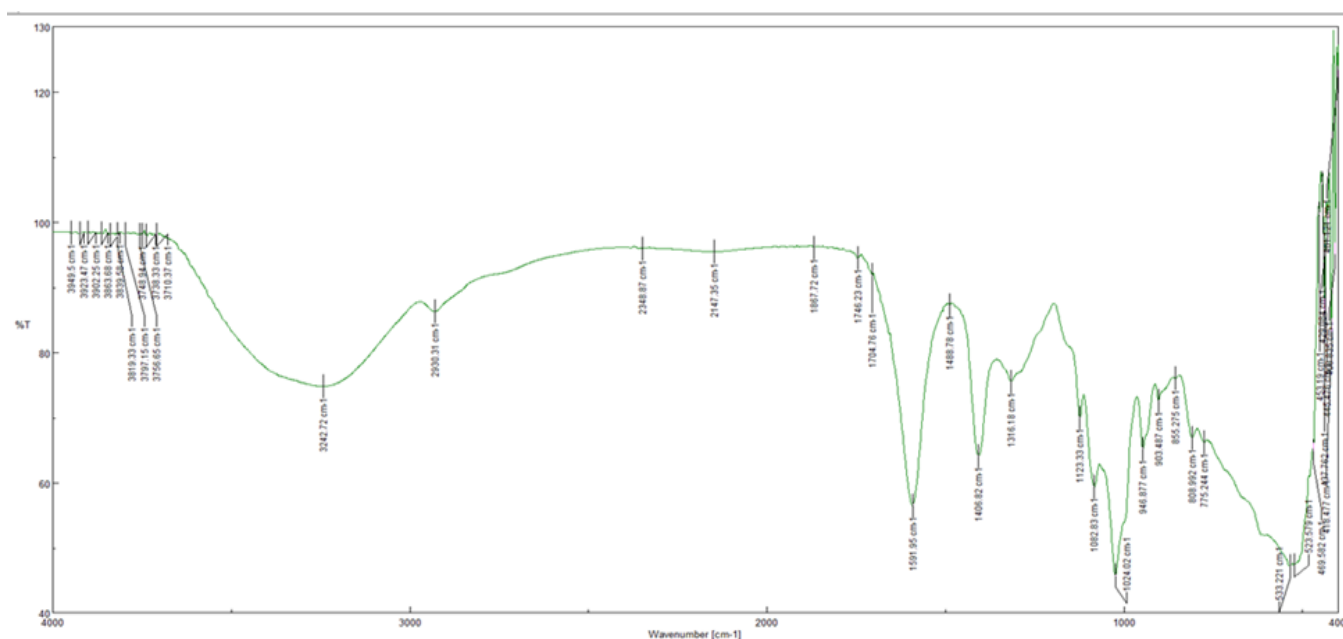


Figure A1 : Spectre FTIR du chitosane après une seule déacétylation.

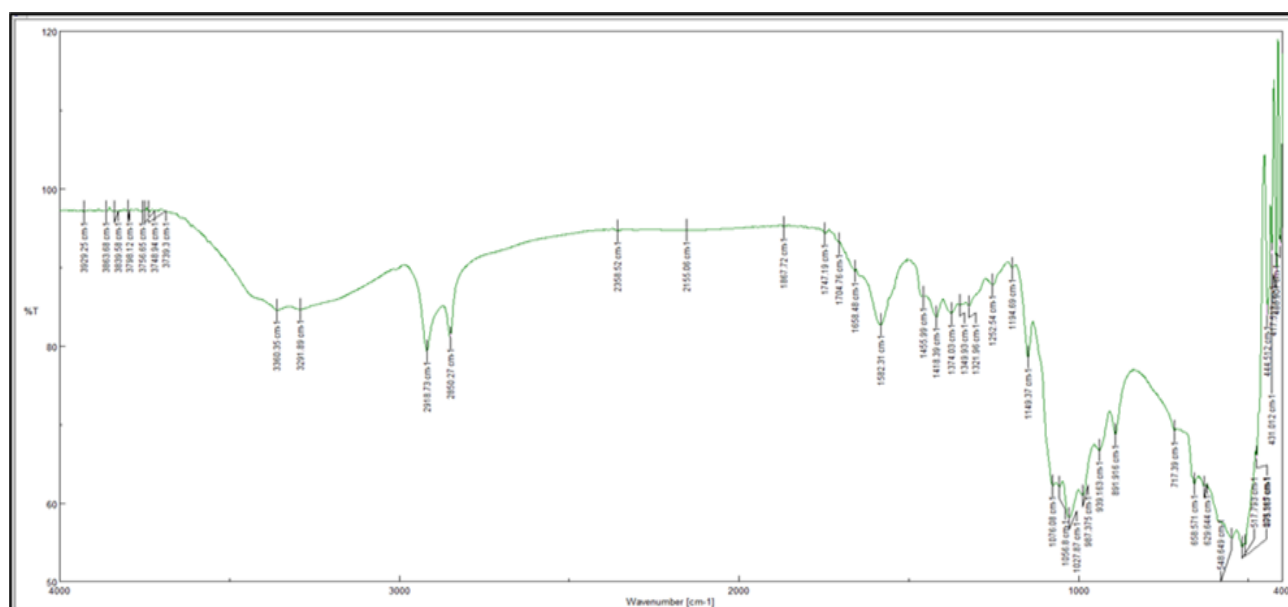


Figure A2 : Spectre FTIR du chitosane après double déacétylation.

Les bandes d'absorption caractéristiques (1655, 1580, 1320–1250 cm⁻¹) confirment la transformation de la chitine en chitosane avec un degré de désacétylation de 85–90 %.

Annexe 3 : Courbes rhéologiques

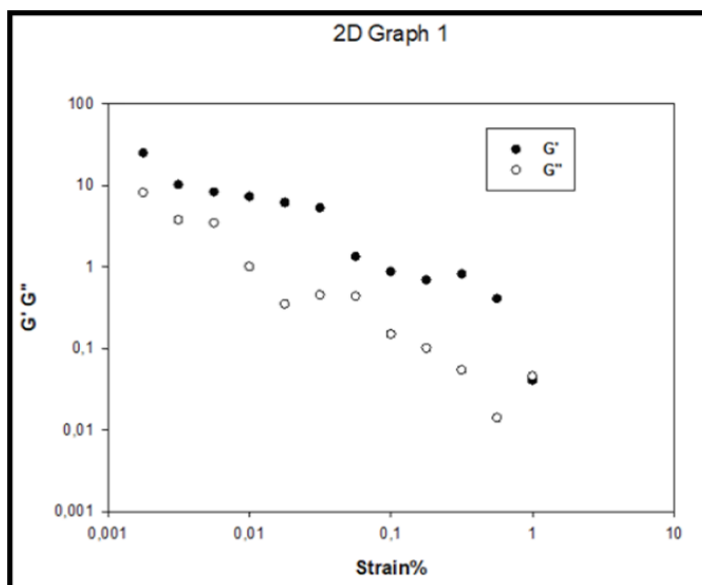


Figure A3 : Test de viscoélasticité du chitosane (essai A).

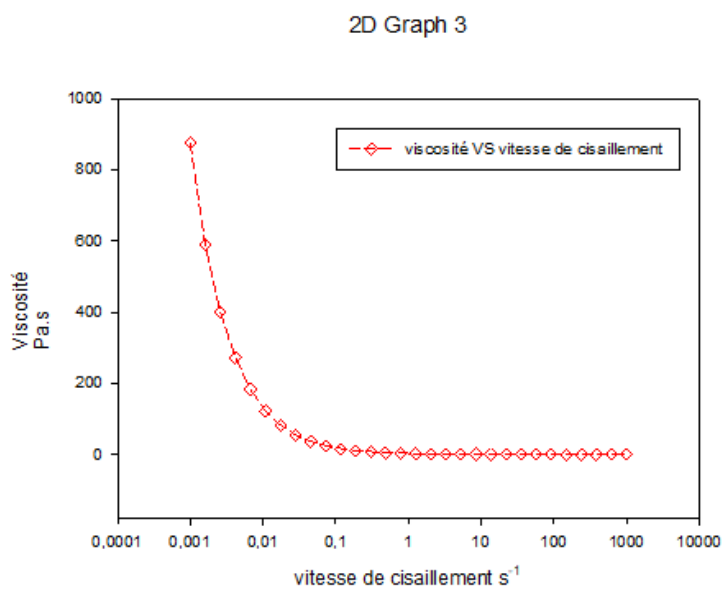


Figure A4 : Courbe d'écoulement du chitosane en solution acide (0,5 %).

Les résultats montrent un comportement pseudoplastique typique, indiquant une structure polymérique stable et adaptée à la formulation.

Annexe 3 : Fiche d'observation des essais in vitro

Temps d'exposition (h)	Témoin négatif (Eau distillée)	Témoin positif HE	Témoin acide	F1 (10 mg CH + HE)	F2 (25 mg CH + HE)	F3 (30 mg CH + HE)
6 h	0 %	5 %	0 %	10 %	15 %	20 %
12 h	0 %	15 %	5 %	25 %	40 %	55 %
24 h	0 %	35 %	10 %	60 %	75 %	90 %
48 h	0 %	45 %	10 %	85 %	95 %	100 %

Données représentatives de la mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* selon le traitement

Annexe 4 : Formulation du bioinsecticide à base de chitosane et d'huile essentielle de *Mentha Spicata*

Étape / Élément	Description / Détail technique	Conditions expérimentales / Observations
Objectif de la formulation	Développer un bioinsecticide naturel combinant les propriétés filmogènes du chitosane et l'activité insecticide de l'huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> .	Utilisé pour la protection biologique contre <i>Tribolium castaneum</i> .
Matières premières	<ul style="list-style-type: none"> - Chitosane (DD = 85 %, extrait de <i>H. illucens</i>) - Huile essentielle de <i>Mentha spicata</i> (100 %, BioExtraPAMAL, Blida) - Acide acétique (1 % v/v) - Tween 80 (0,2 % v/v, émulsifiant) - Eau distillée 	Tous les produits manipulés au Laboratoire de Biotechnologie – Université de Blida 1.

Étape / Élément	Description / Détail technique	Conditions expérimentales / Observations
Préparation de la solution de chitosane	Dissolution de 1 g de chitosane dans 100 mL d'acide acétique à 1 %.	Agitation magnétique 400 tr/min pendant 3 h. Filtration sous vide (papier Whatman n°1). pH ajusté à 5,5 à l'aide de NaOH 0,1 M.
Ajout de l'huile essentielle	Incorporation progressive de l'huile essentielle dans la solution de chitosane.	Concentrations : 1 %, 2,5 %, 5 % (v/v). Ajout goutte à goutte sous agitation continue. Formation d'une émulsion homogène.
Ajout du Tween 80	Ajouté comme agent tensioactif pour stabiliser le mélange.	0,2 % (v/v) ajouté lentement sous agitation. Solution blanchâtre uniforme.
Homogénéisation finale	Ultrasonication (optionnelle) pour réduire la taille des particules.	Fréquence : 20 kHz pendant 10 min. Taille moyenne : < 200 nm.
Formulations préparées	F1 : 10 mg/mL CH + 1 % HE F2 : 25 mg/mL CH + 2,5 % HE F3 : 30 mg/mL CH + 5 % HE	F1 : liquide trouble F2 : émulsion stable F3 : suspension homogène à odeur mentholée.
Application biologique	Utilisation des formulations sur <i>Tribolium castaneum</i> pour tests in vitro.	Observation du taux de mortalité selon le temps d'exposition (corrélation

Étape / Élément	Description / Détail technique	Conditions expérimentales / Observations
		positive avec la concentration en HE).
Observation finale	La combinaison chitosane/huile essentielle présente une activité insecticide accrue et une bonne stabilité physico-chimique.	Formulation naturelle, biodégradable et prometteuse pour la protection biologique des denrées stockées.

Annexe 5 : Résultats statistiques

Source de variation	DDL	F calculé	P-value
Traitement	5	12.46	0.0003
Temps d'exposition	3	18.73	0.0001
Interaction (Traitement × Temps)	15	6.51	0.002

Tableau A1 : Résumé des résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sur les taux de mortalité.

Les différences observées entre traitements et temps sont hautement significatives ($p < 0,05$)

Annexe 6 : Fiche technique de l'huile essentielle de *Mentha Spicata*

- **Origine botanique** : *Mentha Spicata* L.
- **Procédé d'extraction** : entraînement à la vapeur d'eau.
- **Provenance** : BioExtraPAMAL, Blida (Algérie).
- **Principaux constituants** : menthol (45–50 %), carvone (20 %), limonène (12 %).
- **Aspect** : liquide limpide, couleur jaune pâle, odeur mentholée fraîche.
- **Densité** : 0,90 g/cm³ à 25 °C.
- **Solubilité** : partiellement soluble dans l'eau, totalement soluble dans l'éthanol

Annexe 7 : Liste des abréviations utilisées

Abréviation	Signification
BSF	Black Soldier Fly (Mouche soldat noire)
CH	Chitosane
HE	Huile essentielle
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
DD	Degré de désacétylation
LT ₅₀ / LT ₉₀	Temps léthal pour 50 % / 90 % de mortalité
T. castaneum	Tribolium castaneum

Annexe 8 : Étapes de l'extraction du chitosane à partir des larves de *Hermetia illucens*.

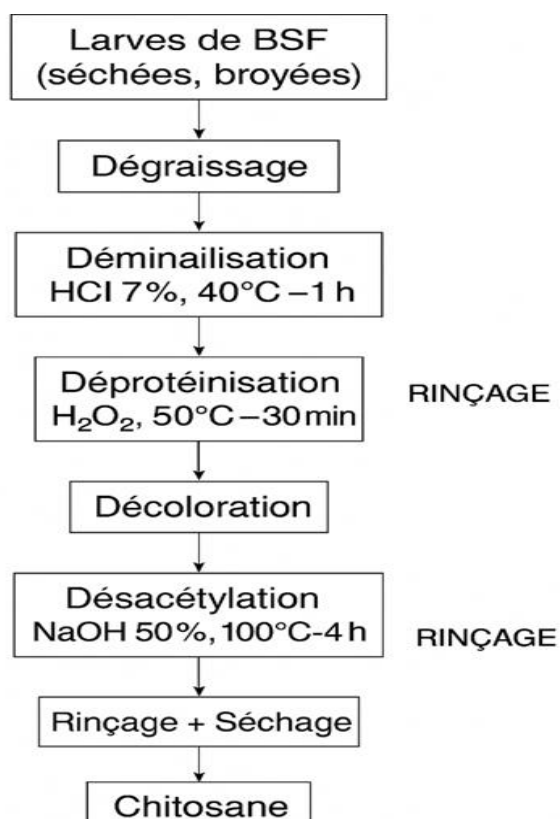


Schéma A1 : Étapes de l'extraction du chitosane à partir des larves de *Hermetia illucens*.