

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1**  
**Faculté des Sciences de la nature et de la vie**  
**Département de Biologie et physiologie cellulaire**  
**Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et santé**

**THÈSE DE DOCTORAT 3<sup>ème</sup> cycle (LMD)**

En Biologie

Spécialité : Biologie et santé

**COMPARAISON DE LA TOXICITE D'UN PESTICIDE CHIMIQUE  
COMMERCIALISÉ ET D'UN BIOPESTICIDE FORMULÉ SUR DES  
POPULATIONS DES SOURIS EN CONDITIONS CONTROLÉES**

Par

**Cheïmâa BOUCHEKOUK**

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, USDB Blida 1	Présidente
K. HOUALI	Professeur, UMM Tizi Ouzou	Examineur
S. OUARAB	M.C.A., USDB Blida 1	Examinatrice
F.Z. KARA	Professeur, USDB Blida 1	Directrice de thèse
G. TAIL	Professeur, USDB Blida 1	Co- directrice de thèse

Blida, juin 2019

## RESUME

La toxicité par les pesticides chimiques est d'intensité variable. D'où l'intérêt de s'orienter vers de nouvelles alternatives tel que les biopesticides d'origine végétale qui sont efficaces, à large spectre d'action et à toxicité faible. Les plantes sont connues depuis fort longtemps pour leur utilisation dans la lutte biologique. L'Algérie de par sa position géographique possède une flore riche en plantes médicinales et aromatiques à l'état sauvage, à savoir les fougères. Dans ce cadre de recherche, le présent travail a pour but d'évaluer et de comparer la toxicité d'un pesticide chimique (acétamipride – néonicoténoïde) et d'un biopesticide formulé à base de l'huile essentielle du *Pteridium aquilinum* (*Dennstaedtiaceae*) sur des populations de souris en conditions contrôlées.

La composition chimique de l'huile essentielle des frondes du *P. aquilinum* a été analysée par GC/MS, où un total de 58 composés a été identifié, représentant 69,44 % de son contenu total avec la prédominance du linalool et du carvacrol. L'évaluation de ses activités biocides a révélé une efficacité antimicrobienne puissante contre *E. amylovora*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi* et *A. niger* ainsi qu'aphicide sur le puceron de la fève *A. fabae* avec des DL<sub>50</sub> respectivement de 27,79 µl/ml et 4,26 µl/ml après 24h et 48h de traitement. Après avoir déterminé les doses efficaces, un biopesticide liquide à 6% de matière active a été formulé. Son activité aphicide était comparable à celle de l'acétamipride après 24h du traitement.

L'étude de la toxicité aiguë de l'huile essentielle et du biopesticide chez les souris femelles a démontré que leur DL<sub>50</sub> est supérieur à 2000 mg/kg et pourraient être classé dans la catégorie 5. L'étude histo-pathologique des organes prélevés chez les souris traitées a révèle une architecture hépatique et rénale normale.

L'évaluation de la toxicité subaiguë du biopesticide (400, 200 et 100 mg/kg du poids corporel) chez les souris mâles et femelles n'a pas entraîné de mortalité. Nous avons enregistré une diminution significative du gain du poids relative des souris traitées par la forte dose. Les paramètres hématologiques et biochimiques analysés n'ont pas été altérés. L'étude histopathologique du foie et des reins n'a révélé aucune toxicité évidente chez les souris traitées par le biopesticide.

L'administration subaiguë de l'acétamipride (1/4, 1/8 et 1/16 de la DL<sub>50</sub>) a engendrés des effets toxiques dose dépendantes. Une réduction significative du gain du poids relatif chez les souris exposées aux trois doses d'acétamipride ainsi que celles du groupe satellite. Les souris traitées par 1/4 de la DL<sub>50</sub> ont montré une augmentation hautement significative du poids relatif du foie.

L'analyse des paramètres hématologiques et biochimiques a montré une modification significative du taux des globules blancs et rouges, du pourcentage de l'hématocrite de la concentration de l'hémoglobine, de l'urée, de la créatinine, des protéines totales, de l'aspartate aminotransférase, de l'alanine aminotransférase et de la phosphatase alcaline chez les animaux traités par la forte dose d'acétamipride. Par ailleurs, l'arrêt du traitement par ce pesticide chez les souris du groupe satellite, a induit une modification des paramètres hématologiques et biochimiques. Les examens histopathologiques du foie et des reins ont révélé que le traitement par l'acétamipride a entraîné des altérations dose dépendante.

**Mots clés** : Biopesticide, pesticide chimique, huile essentielle, *P. aquilinum*, acétamipride, antimicrobienne et aphicide, toxicité aiguë, toxicité subaiguë

## ABSTRACT

Toxicity of chemical pesticides is of varying intensity. It may induce searchers to look for new control alternatives such as botanical biopesticides due their wide and efficient spectrum and low toxicity. In fact, plants are known from a long time to be of use against pest. By its geographical location, Algeria has a great diversity of wild medicinal and aromatic plants, namely ferns. The aim of the present work, is to evaluate and to compare the efficiency and toxicity of a chemical pesticide (acetamiprid – neonicotenoid) with those of a biopesticide produced from the essential oil of *Pteridium aquilinum* (*Dennstaedtiaceae*) in mice population under monitored conditions.

chemical composition of *P. aquilinum* fronds essential oil has been analyzed by GC/MS. A total amount of 58 compounds have been identified. That represents 69,44% of the whole contents, with predominance of linalool and carvacrol. Evaluation of its anti-microbial activity has shown a high efficiency against *E. amylovora*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. savastanoi* pv. *savastanoi*, *A. niger* and also an aphicidal efficiency against bean aphis and *A. fabae* with LD<sub>50</sub> amounting 27,79% µl/ml to 4,26 µl/ml after 24h and 48h of treatment, respectively. After determination of efficient doses, a liquid biopesticide at a concentration of 6% has been prepared. Its aphicidal activity has been found to be equal to that of the acetamiprid after 24h of treatment.

Study of its acute toxicity toward female mice has shown that LD<sub>50</sub> of the essential oil and that of the biopesticide are both higher than 2000 mg/kg and may be classified in the category 5. Histopathological liver and kidneys study of treated mice has shown no modification of their architecture.

Evaluation of subacute toxicity of three doses of biopesticide (400, 200 and 100mg/kg body weight) in male and female mice has shown no mortality. However, we have recorded a decrease of relative weight gain for mice treated with high doses of biopesticides. Haematological and biochemical parameters were not affected.

The subacute administration of acetamiprid (1/4, 1/8, 1/16 of LD<sub>50</sub>) has produced high toxic effects dose dependent. A significant decrease in the relative weight gain at the three doses of acetamiprid and in the Satellite group was noticed. An increase in the relative liver weight was also observed at the highest dose 1/4 of LD<sub>50</sub>.



Analysis of haematological and biochemical parameters has shown a significant modification of red and white cells, hemoglobin, hematocrit, creatinine, total proteins, urea, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase for all mice treated with 1/4 LD<sub>50</sub> of acetamiprid. Besides, cessation of treatment for the mice in satellite group has shown a modification of haematological and biochemical parameters. Histopathological analysis of mice liver and kidneys exposed to acetamiprid caused doses dependent alterations.

**Keywords:** biopesticide, chemical pesticide, essential oil, *P. aquilinum*, acetamiprid, antimicrobial, aphicide, acute toxicity, subacute toxicity

## ملخص

تعتبر سمية المبيدات الحشرية ذات شدة متغيرة. هذا ما أدى الى التوجه نحو بدائل جديدة مثل المبيدات الحيوية ذات المنشأ النباتي لكونها فعالة، ذات سمية منخفضة وذات نشاط واسع النطاق. فلقد عرفت النباتات منذ فترة طويلة لاستخدامها في ميدان مكافحة البيولوجية. تحتوي الجزائر بموقعها الجغرافي على مجموعة غنية من النباتات الطبية والعطرية البرية، وبالتحديد السرخس. في إطار هذا البحث، يهدف العمل الحالي إلى تقييم ومقارنة سمية المبيد الكيميائي «الأسيتامبريد - نيونيكوتينويد» و مبيد بيولوجي مركب من الزيت العطري (*Pteridium aquilinum Dennstaedtiaceae*) على مجموعات من الفئران في ظروف مراقبة.

كشف التحليل الكروماتوغرافي المقترن بمطافية الكتلة للزيت الأساسي المستخرج من أوراق *P. aquilinum* على التعرف على 58 مركب مما يشكل 69,44% من اجمالي المكونات وعلى هيمنة اللينالول والكارفاكرول. وقد كشف تقييم أنشطتها في مجال الإبادة الحيوية فعالية عالية مضادة للميكروبات : *P. carotovorum subsp. carotovorum*, *E. amylovora*, *P. savastanoi pv. savastanoi* و *A. niger* وكذلك مضادة لحشرة المن في الفول *Fabae* مع الجرعة المميتة لـ 50% التي تقدر بـ 27.79 ميكرولترا / مل و 4.26 ميكرولترا / مل بعد 24 ساعة و 48 ساعة من العلاج على التوالي. بعد تحديد الجرعات الفعالة للزيت العطري، تمت صياغة مبيد بيولوجي سائل بنسبة 6% حيث كان نشاطه المبيد للمن مشابهاً لنشاط الأسيتامبريد بعد 24 ساعة من العلاج.

أظهرت دراسة السمية الحادة عند إناث فئران أن الجرعة المميتة لـ 50% من الزيوت الأساسية والمبيد البيولوجي أكبر من 2000 ملغ / كغ ويمكن تصنيفها في الفئة 5. كما كشفت الدراسة النسيجية للفئران المعالجة بنية طبيعية.

عند تقييم السمية شبه الحادة للمبيد البيولوجي (200, 400 و 100 ملغ/ كغ من وزن الجسم) , لم تسفر أي من هاته الجرعات عن وفيات عند ذكور وإناث الفئران. كما سجلنا انخفاضاً كبيراً في الزيادة النسبية لوزن الفئران المعالجة بالجرعة العالية ولم يطرأ أي تغيير في تحاليل العوامل الدموية والبيو كيميائية. لم تكشف الدراسة النسيجية للكبد والكليتين عن أي سمية واضحة عند الفئران المعالجة بهذا المبيد البيولوجي.

أدى تعرض الفئران للأسيتامبريد (4/1، 8/1 و 16/1 من الجرعة المميتة لـ 50%) إلى تأثيرات سامة متعلقة بالجرعة. سجلنا انخفاض كبير في زيادة وزن الجسم لدى الفئران المعرضة للجرعات الثلاث من المبيد بالإضافة إلى مجموعة الساتلايت. كما أظهرت الفئران المعالجة بـ 4/1 من الجرعة المميتة لـ 50% زيادة كبيرة في الوزن النسبي للكبد.

أظهر تحليل العوامل الدموية والبيو كيميائية للفئران المعالجة بـ 4/1 من الجرعة المميتة لـ 50% اضطراباً كبيراً في عدد كريات الدم الحمراء والبيضاء، مستويات الهيموجلوبين، الهيماتوكريت، اليوريا، الكرياتينين، البروتين الكلي، الأسبارتات أمينوترونسفراز، ألانين أمينوترونسفراز، والفوسفاتاز ألكالين. بالإضافة إلى ذلك، أدى وقف معالجة فئران

مجموعة الساتلايت بالمبيدات الكيماوية إلى حدوث تغير في العوامل الدموية والبيو كيميائية. كما كشفت الفحوص النسيجية للكبد والكليتين أن العلاج بالأسيتامبريد أدى إلى تغيرات متعلقة بالجرعة.

**الكلمات المفتاح:** مبيد بيولوجي, مبيد كيميائي, زيت عطري, *P. aquilinum*, أسيتامبريد, مضاد للميكروبات وللمن, السمية الحادة, السمية شبه الحادة.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude à **Madame le Professeur KARA**, de l'université de Blida, pour avoir assurée la direction de ce travail avec une rigueur scientifique, par sa disponibilité, sa patience, son suivi, et sa confiance tout au long de ces années, et ma co-directrice **Madame le Professeur TAIL**, pour son co-encadrement, sa confiance et de m'avoir accueillie en tant que membre de son équipe de recherche.

Je souhaite adresser ma profonde reconnaissance à **Madame le Professeur SAIDI**, de l'université de Blida, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, un grand merci lui est adressée pour son soutien et son aide durant ce parcours et de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire « Biotechnologies, Environnement et Santé » avec la plus grande bienveillance.

Ma gratitude et mes expressions de reconnaissance vont aussi aux honorables membres du jury, **Monsieur le Professeur HOUALI**, de l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, et **Madame le Docteur OUARAB** de l'université de Blida, qui ont bien voulu examiner ce manuscrit. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements et de mon profond respect.

Ma sincère gratitude est transmise à **Monsieur le Docteur LAZAR**, chef du département à l'institut national de protection des végétaux (INPV) pour son accueil, sa disponibilité, ses engagements et son intérêt vif porté au présent travail, sans cette aide, une grande partie de cette thèse n'aurait jamais pu être réalisée ; et aussi tout le personnel de cet établissement en particulier **Madame LETIFI, Ouissal, Billel et Leila** qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier tout le personnel du Centre de Recherche et de Développement (CRD) El-harrach, pour leur accueil bienveillant et en particulier **Madame AZINE**.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail en particulier à Monsieur le **Docteur BENABDELKADER**, de l'université de Boumerdes pour son aide dans la réalisation de l'analyse CPG/SM, **Monsieur MOUSSAOUI**, qui a assuré la formulation du biopesticide au sein du Laboratoire de phytopharmacie appliquée de l'université de Blida, **Monsieur le Docteur BESSAAD**, de l'université de Blida pour l'aide qu'il m'a apportée dans les prélèvements sanguins et **Madame le Docteur ABDELLAH** pour ses interprétations anatomo-pathologiques.

Je remercie particulièrement mon oncle **Monsieur le Docteur Mekarzia** pour son aide et ses conseils précieux tout au long de ces années.

Je souhaite adresser un remerciement chaleureux à mon amie et ma collègue **LOUKHAOUKHA Rahma**, ta présence, ta générosité inestimables, tes conseils, ton précieux soutien moral pendant les périodes difficiles et tes encouragements m'ont beaucoup aidé et poussé vers l'avant.

Je remercie très sincèrement mes collègues de Doctorat : **Rym, Selma et Imane** qui m'ont aidé à la réalisation d'une partie de ce travail, ainsi que les ingénieurs des différents laboratoires du département de Biologie et physiologie cellulaire.

A tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de ce document.

## DEDICACES

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce travail aux personnes les plus chères au monde*

*À mes très chers parents,*

*J'exprime mes plus grands remerciements et toute ma reconnaissance pour tous vos sacrifices et vos efforts, sans lesquels je n'aurai jamais pu achever ce travail. Je vous remercie du fond du cœur pour votre grande patience, votre soutien moral et votre présence affectueuse à mes côtés jusqu'à la dernière minute. Vous êtes le bonheur que Dieu m'a offert. Que vos sacrifices trouvent leur récompense dans l'aboutissement de ce modeste travail.*

*À mon cher frère Zinelâabidine et ma chère sœur Rayene, mes anges gardiens et mes fidèles accompagnants dans les moments les plus difficiles, votre soutien et vos précieux conseils m'ont aidé à réussir ce travail. J'ai toujours pu compter sur vous quel que soit le moment.*

*À toi Rahma et à ta famille, je ne saurais jamais vous exprimer mes profondes et mes sincères reconnaissances. Ta présence à mes côtés et ton aide ont fait preuve d'une amitié sincère.*

*À toute ma famille*

# TABLE DES MATIERES

RESUME	
ABSTRACT	
الملخص	
REMERCIEMENTS	
DEDICACES	
TABLE DES MATIERE	
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	18
1.1. Pesticides.....	18
1.1.1. Définition.....	18
1.1.2. Classification des pesticides.....	19
1.1.3. Insecticides.....	20
1.1.4. Acétamipride (insecticide néonicoténoïque).....	23
1.2. Biopesticides.....	24
1.2.1. Définition.....	24
1.2.2. Classification.....	24
1.2.3. Bio-pesticide à base des HE.....	25
1.2.4. Fougère aigle.....	27
1.2.5. Formulation des biopesticides.....	29
1.3. Toxicologie.....	31
1.3.1. Généralités.....	31
1.3.2. Niveaux de toxicité.....	32
1.3.3. Manifestations toxiques de certains organes cibles.....	33
1.3.4. Toxicologie des pesticides.....	36
1.3.5. Toxicologie des biopesticides à base des HE.....	38
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	40
2.1. Matériel.....	40
2.1.1. Matériel végétal.....	40
2.1.2. Souches microbiennes.....	41
2.1.3. Puceron noir de la fève.....	41
2.1.4. Matériel animal.....	41
2.1.5. Insecticide chimique.....	42
2.2. Méthodes.....	42
2.2.1. Détermination de la teneur en eau.....	42
2.2.2. Criblage phytochimique.....	43
2.2.3. Extraction et caractérisation de l'HE.....	44
2.2.4. Potentiel biopesticide de l'HE de <i>P. aquilinum</i> .....	46

2.2.5.	Formulation du biopesticide.....	52
2.2.6.	Étude toxicologique.....	53
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		63
3.1.	Détermination de la teneur en eau.....	63
3.2.	Criblage phytochimique.....	63
3.3.	Extraction et caractérisation de l'HE.....	65
3.3.1.	Rendement en HE.....	65
3.3.2.	Analyse de l'HE par CG/SM.....	66
3.4.	Potentiel biopesticide de l'HE de <i>P. aquilinum</i> .....	71
3.4.1.	Activité antibactérienne.....	71
3.4.2.	Activité antifongique.....	75
3.4.3.	Activité aphicide.....	79
3.4.4.	Formulation du biopesticide et son activité aphicide sur le puceron de la fève...	86
3.5.	Toxicité aiguë.....	90
3.5.1.	Comportement et symptômes cliniques.....	90
3.5.2.	Évolution pondérale.....	91
3.5.3.	Évaluation de la quantité de la nourriture et de l'eau consommées.....	93
3.5.4.	Poids absolu et relatif des organes.....	95
3.5.5.	Étude histo-pathologique.....	97
3.6.	Toxicité subaiguë.....	99
3.6.1.	Comportement des souris.....	99
3.6.2.	Évaluation de la quantité de la nourriture et de l'eau consommées.....	100
3.6.3.	Évolution pondérale.....	104
3.6.4.	Poids absolu et relatif des organes.....	109
3.6.5.	Analyse des paramètres hématologiques.....	114
3.6.6.	Analyse des paramètres biochimiques.....	118
3.6.7.	Examen histo-pathologique.....	127
CONCLUSION.....		136
APPENDICES		
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1	Représentation schématique d'une synapse cholinergique montrant les principales cibles de plusieurs classes d'insecticides	21
Figure 1.2	Anatomie fonctionnelle du foie « le lobule »	34
Figure 1.3	Unité fonctionnelle du rein « le néphron »	35
Figure 2.1	Frondes de <i>Pteridium aquilinum</i> de la station de Beni Ali-Blida	40
Figure 2.2	Schéma récapitulatif du mode opératoire de la toxicité aiguë de l'HE de <i>P. aquilinum</i> avec une dose initiale de 300 mg/kg du poids corporel	56
Figure 2.3	Schéma récapitulatif du mode opératoire de la toxicité aiguë du biopesticide avec une dose initiale de 2000 mg/kg du poids corporel	57
Figure 2.4	Schéma récapitulatif du mode opératoire suivi pour l'évaluation de la toxicité subaiguë du biopesticide et du pesticide chimique	62
Figure 3.1	Teneur en eau des frondes de <i>P. aquilinum</i>	63
Figure 3.2	Chromatogramme GC/MS de l'HE des frondes de <i>P. aquilinum</i>	69
Figure 3.3	Activité antibactérienne de l'HE de <i>P. aquilinum</i>	72
Figure 3.4	Effet de différentes concentrations de l'HE de <i>P. aquilinum</i> sur la croissance mycélienne d' <i>A. niger</i>	75
Figure 3.5	Variation du taux de mortalité corrigée des pucerons traités par différentes concentrations de l'HE de <i>P. aquilinum</i> et de l'ACMP en fonction de la durée d'exposition	80
Figure 3.6	Comparaison de l'efficacité aphicide du biopesticide et l'HE de <i>P. aquilinum</i> au fil du temps contre <i>A. fabae</i>	89
Figure 3.7	Variation du poids corporel des souris au cours de l'évaluation de la toxicité aiguë de l'HE de <i>P. aquilinum</i>	92
Figure 3.8	Variation du poids corporel des souris au cours de l'évaluation de la toxicité aiguë du biopesticide formulé	92
Figure 3.9	Évaluation de la quantité de nourriture consommée chez les souris traitées par l'HE de <i>P. aquilinum</i> et les témoins	93
Figure 3.10	Évaluation de la quantité de nourriture consommée chez les souris traitées par le biopesticide et les témoins	94
Figure 3.11	Évaluation du volume d'eau consommée chez les souris traitées par l'HE de <i>P. aquilinum</i> et les témoins	94
Figure 3.12	Évaluation du volume d'eau consommée chez les souris traitées par le biopesticide et les témoins	95



Figure 3.13	Variation du poids relatif des organes des souris traité par l'HE du <i>P. aquilinum</i> et les témoins	96
Figure 3.14	Variation du poids relatif des organes des souris traité par le biopesticide et les témoins	96
Figure 3.15	Étude histologique du foie (F) et des reins (R) des souris: a) témoin (Eau-Tween); b) HE 2 000 mg/kg; c) Témoin (Eau) et d) Biopesticide 2000 mg/kg (H.E, GrX40)	98
Figure 3.16	Effet du biopesticide et du pesticide chimique sur la consommation de la nourriture chez les souris traitées (a) : biopesticide (b) : pesticide chimique (c) : groupes satellites	101
Figure 3.17	Effet du biopesticide et du pesticide chimique sur la consommation de l'eau chez les souris traitées (a) : biopesticide (b) : pesticide chimique (c) : groupes satellites	103
Figure 3.18	Évolution du poids corporel des souris en fonction du sexe (mâles et femelles) et des doses des traitements a : biopesticide, b : pesticide chimique, c : groupes satellites	107
Figure 3.19	Évaluation du poids relatif des organes des souris en fonction du sexe (mâles et femelles) et des doses des traitements a : biopesticide, b : pesticide chimique, c : groupes satellites .	113
Figure 3.20	Paramètres hématologiques des souris témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction des doses et du sexe	115
Figure 3.21	Paramètres biochimiques des souris témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction des doses et du sexe	119
Figure 3.22	Paramètres hématologiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction du sexe	125
Figure 3.23	Paramètres biochimiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction du sexe	126
Figure 3.24	Étude histologique du foie des souris traitées par les trois doses du biopesticide et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë	128
Figure 3.25	Étude histologique du foie des souris traitées par PD1 et PD1S de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GR :X10, GR :X40)	130
Figure 3.26	Étude histologique du foie des souris traitées par PD2 et PD3 de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GR :X40)	131
Figure 3.27	Étude histologique des reins des souris témoins, traitées par les trois doses du biopesticide et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GR :X40)	133

Figure 3.28	Étude histologique des reins des souris traitées PD1 et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GrX40, GrX100)	134
Figure 3.29	Étude histologique des reins des souris traitées PD2 et PD3 de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GrX40, GrX100)	135
Tableau 1.1	Classification des pesticides par le degré de risque selon l'OMS	20
Tableau 1.2	Principales caractéristiques physicochimiques de l'ACMP	23
Tableau 1.3	Catégories d'exposition aux produits toxiques	31
Tableau 2.1	Réactions de caractérisation du criblage phytochimique	43
Tableau 2.2	Conditions opératoires de l'analyse GC/SM	45
Tableau 3.1	Criblage phytochimique des frondes de <i>P. aquilinum</i>	64
Tableau 3.2	Caractéristiques organoleptiques de l'HE de <i>P. aquilinum</i>	65
Tableau 3.3	Composition chimique de l'HE des frondes de <i>P. aquilinum</i>	66
Tableau 3.4	Criblage de l'activité antibactérienne de l'HE de <i>P. aquilinum</i>	71
Tableau 3.5	Pourcentage d'inhibition mycélienne de l'HE de <i>P. aquilinum</i> contre <i>A. niger</i>	76
Tableau 3.6	Activité aphicide des différentes concentrations de l'HE de <i>P. aquilinum</i> sur <i>A. fabae</i> en fonction du temps	82
Tableau 3.7	Paramètres toxicologiques de l'HE de <i>P. aquilinum</i> sur <i>A. fabae</i> en fonction du temps	83
Tableau 3.8	Activité aphicide des différentes concentrations du biopesticide sur <i>A. fabae</i> en fonction du temps	86
Tableau 3.9	Paramètres toxicologiques du biopesticide sur <i>A. fabae</i> au fil du temps	87
Tableau 3.10	Poids corporels des souris au cours d'une étude de toxicité aiguë après administration de l'HE et du biopesticide	91
Tableau 3.11	Poids corporels des souris témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique	104
Tableau 3.12	Poids corporels des souris des groupes satellites témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique	105
Tableau 3.13	Poids absolus et relatifs des organes des souris mâles traitées, témoins et satellites de l'étude de la toxicité subaiguë	110

Tableau 3.14	Poids absolus et relatifs des organes des souris femelles traitées, témoins et satellites de l'étude de la toxicité subaiguë	111
Tableau 3.15	Paramètres hématologiques des souris témoins et traitées par le biopesticide et l'ACMP	117
Tableau 3.16	Paramètres biochimiques des souris témoins et traitées par le biopesticide et l'ACMP	121
Tableau 3.17	Paramètres hématologiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP	123
Tableau 3.18	Paramètres biochimiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP	123

## INTRODUCTION

Les pesticides sont conçus pour lutter contre les ravageurs et améliorer la productivité des cultures. Ces produits chimiques étaient efficaces, faciles à utiliser, peu coûteux et donc extrêmement populaires. Cependant, sous une pression chimique constante, certains insectes sont devenus génétiquement résistants aux pesticides, les organismes non ciblés ont été touchés et les résidus de pesticides sont souvent apparus dans la nature [1].

Les pesticides peuvent affectés la santé publique par leurs différentes voies de pénétration dans le corps humain, à savoir ingestion, inhalation et contact [2]. Le cancer, les effets indésirables sur le système immunitaire, le dysfonctionnement du neuro-développement, les maladies métaboliques comme le diabète, la perturbation du système endocrinien et l'infertilité sont quelques-uns des risques pour la santé associée à une exposition continue aux pesticides synthétiques [3]. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime que 200 000 personnes meurent chaque année dans le monde, suite à l'empoisonnement par les pesticides [4].

Les néonicotinoïdes sont devenus la classe d'insecticide la plus vendue dans le monde, utilisée pour lutter contre les insectes suceurs, certains coléoptères et les lépidoptères [5]. Les niveaux actuels de pollution sur une large gamme d'invertébrés non ciblés par ces pesticides résultent des utilisations qui dépassent souvent les concentrations autorisées [6]. L'acétamipride, fait partie des insecticides néonicotinoïques [7]. De plus, il est fréquemment détecté dans les produits agricoles en raison de son utilisation généralisée et extensive [8] [9] [10].

Dans cette optique, un intérêt particulier est de s'orienter vers de nouvelles alternatives qui sont efficaces, à large spectre d'action et peu toxique tel que les biopesticides d'origine végétale. Les plantes sont connues depuis fort longtemps pour leur utilisation dans le domaine de lutte biologique et leur valorisation prend de plus en plus de l'ampleur. Plus de 2000 espèces de plantes sont dotées d'activité insecticide [11]. Les huiles essentielles et leurs dérivés sont bien connus pour leurs activités

biologiques : insecticides, fongicide, bactéricide etc. Une formulation de biopesticides à base de l'huile essentielle peut représenter un moyen alternatif pour lutter contre les organismes phytopathogènes ciblés. Leurs avantages comprennent la sécurité, l'efficacité et les effets limités sur les auxiliaires [12].

L'Algérie, par sa situation géographique au centre de la méditerranée, possède une végétation riche et diversifiée. Un grand nombre de plantes y poussent spontanément [13], dont les fougères qui sont très riches en métabolites secondaires. La fougère aigle *Pteridium aquilinum* L. Kuhn est une espèce omniprésente et cosmopolite [14]. Bien que plusieurs espèces de fougères possèdent une odeur assez typique [15], seuls quelques travaux concernant la caractérisation chimique de leurs constituants volatils ont été rapportés. La composition chimique de l'huile essentielle de *P. aquilinum* L. ainsi que ses activités biologiques sont très peu connues. Il sera intéressant de valoriser l'huile essentielle de la fougère aigle comme source de molécules actives dans le domaine de lutte biologique.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif principal est d'évaluer et de comparer la toxicité du biopesticide formulé à base de l'huile essentielle de *P. aquilinum* avec un pesticide chimique néonicoténoïque « acétamipride ». Pour cela nous avons établi le plan suivant, à savoir :

- l'analyse phytochimique des extraits de fronde de *P. aquilinum* ;
- l'extraction et la caractérisation de la composition chimique de l'huile essentielle de *P. aquilinum* par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse ;
- l'évaluation de son efficacité biocide à savoir: antibactérienne, antifongique et insecticide.
- La formulation du bio-pesticide à base de cette huile essentielle ainsi que l'évaluation de son efficacité insecticide en la comparant avec l'acétamipride;
- l'évaluation de la toxicité à court terme (toxicité aiguë) de l'huile essentielle de *P. aquilinum* et du biopesticide formulé ;
- l'évaluation de la toxicité subaiguë (administration répétée pendant 28 jours) du biopesticide et de l'acétamipride sur des souris mâles et femelles afin de mettre en évidence les altérations :

- des paramètres de la croissance pondérale
- des paramètres hématologiques et biochimiques
- anatomo-pathologiques du foie et des reins.

Notre travail présenté dans ce manuscrit est réparti en trois chapitres :

Le premier est scindé en trois parties bibliographiques: la première est réservée aux pesticides chimiques, leur classification et un exemple de néonicoténoïdes « acétamipride ». Dans la deuxième, nous avons aussi décrit les biopesticides comme alternatif de lutte et en particulier ceux à base de l'huile essentielle dont celle de la fougère aigle. La troisième partie est consacrée à la toxicologie des pesticide chimique (l'acétamipride), les huiles essentielles et leur biopesticide. Le deuxième chapitre s'intéresse aux méthodologies utilisées lors de la réalisation de cette thèse. Le dernier chapitre, relève les résultats, leur discussion, et s'articule selon cinq sections distinctes.

# 1 CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1.1. Pesticides

### 1.1.1. Définition

L'étymologie du mot pesticide provient de l'anglais « pest » qui signifie les ravageurs (animal, insecte ou plante nuisible) et du suffixe « -cide » du verbe latin « caedo, cadere » et qui signifie « tuer » [16]. L'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) définit un pesticide comme : toute substance ou mélange de substances destiné à :

- prévenir, détruire ou combattre tous les ravageurs (plantes ou animaux indésirables, vecteurs de maladies humaines ou animales),
- protéger la marchandise contre la détérioration pendant le stockage et le transport (appliquées sur les cultures avant ou après la récolte) [17].

Les produits phytosanitaires (pesticides à usage agricole) sont des formulations chimiques composées d'une ou de plusieurs matières actives minérales ou organiques et d'un ou plusieurs adjuvants :

- La matière active exerce une action générale ou spécifique sur les organismes nuisibles ou sur les végétaux. Elle confère au produit l'effet désiré.
- L'adjuvant quant à lui est une substance dépourvue d'activité, mais capable de modifier les propriétés physiques, chimiques ou biologiques des produits phytosanitaires. Il renforce l'efficacité, la sécurité du produit et facilite son utilisation [18].

### 1.1.2. Classification des pesticides

Il existe plus de 20.000 composés de pesticides caractérisés par une large gamme d'application et d'utilisation et une variété de structure chimique. D'une manière générale, les pesticides peuvent être classés selon leur : structure chimique, toxicité, et type d'activité / mode d'action [19]:

#### 1.1.2.1. Classification chimique

Selon leur structure chimique, les pesticides peuvent être classés en différentes familles, les deux principaux groupes sont : les pesticides organiques et les pesticides inorganiques.

##### 1.1.2.1.1. Pesticides inorganiques

Depuis de nombreuses années, les pesticides inorganiques ont été utilisés malgré leur neurotoxicité. Des exemples de ces types de composés sont l'arsenic, le cuivre, le plomb, le mercure ou les dérivés de l'étain, ou moins toxiques comme les borates, les silicates et les dérivés soufrés.

##### 1.1.2.1.2. Pesticides organiques

Compte tenu de leur diversité chimique, plusieurs groupes de pesticides organiques peuvent être distingués : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthriinoïdes, les néonicoténoïdes et d'autres classes chimiques.

#### 1.1.2.2. Classification toxicologique

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a proposé une classification de cinq catégories basées sur les paramètres de la toxicité orale et cutanée du pesticide sur les rats (Dose létale qui tue 50% de la population: DL<sub>50</sub>). Cet ordre de classement est variable allant d'extrêmement dangereux au sans risque (Tableau 1.1) [20].



Tableau 1.1 : Classification des pesticides par le degré de risque selon l'OMS [20]

Classes selon l'OMS		DL <sub>50</sub> du rat (mg/kg poids du corps)	
		Oral	Cutané
Ia	Extrêmement dangereux	< 5	< 50
Ib	Très dangereux	5-50	50-200
II	Modérément dangereux	50-2000	200-2000
III	Peu dangereux	> 2000	> 2000
U	Sans risque dans le cadre d'une utilisation normale	≥ 5000	

### 1.1.2.3. Classification selon l'activité/ mode d'action

Ce système repose sur le type du ravageur ciblé et le mode d'action : insecticides (insectes), fongicides (champignons), herbicides (mauvaises herbes), nématicide (nématodes) ainsi qu'attractif, répulsif et fumigant .

### 1.1.3. Insecticides

Les insectes constituent une menace majeure pour l'approvisionnement continu des aliments destinés à la consommation humaine ou en tant que vecteurs de maladies humaines [21]. De ce fait, les insecticides sont utilisés non seulement pour la protection des cultures et des denrées stockées mais aussi pour la protection directe des humains. En effet certains insectes sont vecteurs de maladies parfois mortelles, transmissibles à l'homme par simple piqûre [22].

Les cibles potentielles des insecticides sont nombreuses : système nerveux central, le métabolisme respiratoire ou la régulation hormonal [23] [24]. Du point de vue économique, il existe quatre classes chimiques d'insecticides d'importance majeure : organophosphorés, carbamates, pyréthroïdes et néonicotinoïdes. La cible principale de ces insecticides est le système nerveux central. Ils agissent sur trois sites différents (Figure 1.1) : inhibition de l'acétylcholinestérase, modulation des canaux sodiques voltage-dépendants ou des agonistes des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine [21].

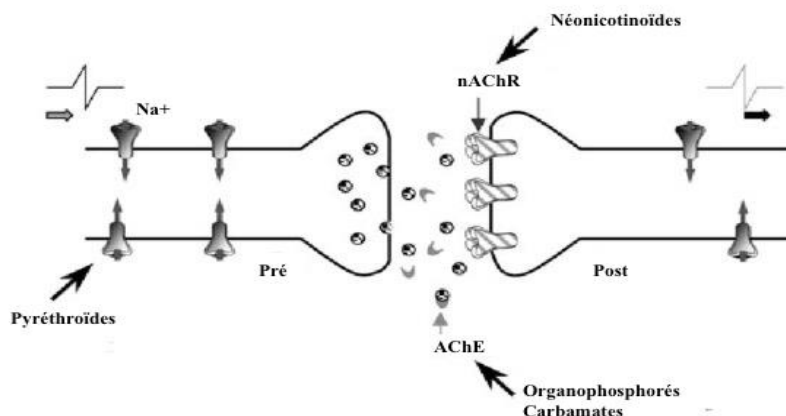


Figure 1.1: Représentation schématique d'une synapse cholinergique montrant les principales cibles de plusieurs classes d'insecticides (Modifié d'après [25]).

nAChR: récepteur nicotinique de l'acétylcholine; Pré : présynaptique ; Post : postsynaptique ;  
AChE : acétylcholinestérase ; Na<sup>+</sup> : canal sodique

#### 1.1.3.1. Insecticides néonicotinoïdes

Les néonicotinoïdes occupent aujourd'hui la classe chimique la plus importante des insecticides introduits sur le marché mondial. Ils sont homologués dans plus de 120 pays [24].

##### 1.1.3.1.1. Généralités

Les néonicotinoïdes sont des analogues synthétiques issues par diverses modifications chimiques de la nicotine. Le premier néonicotinoïde synthétisés était la nithiazine, un composant hautement toxique pour les insectes mais peu toxique pour les mammifères. Cependant, cette molécule n'a pas eu de succès commercial en raison de sa photo-instabilité [26].

Le développement des sept produits néonicotinoïques entre 1991 et 2002 reflète leur forte attractivité et les efforts intensifs de recherche et de développement de l'industrie de la protection des cultures. Selon le pharmacophore, les néonicotinoïdes sont classées en tant que [24]:

- . N-nitroguanidines : imidaclopride, thiaméthoxam, clothianidine et dinotéfurane,
- . Nitrométhylènes : nitenpyram,
- . N-cyano-amidines : acétamipride et thiaclopride.

#### 1.1.3.1.2. Mécanisme d'action

Les néonicotinoïdes exercent leur action insecticide neurotoxique en se liant aux récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChR) de la membrane post-synaptique des cellules nerveuses du système nerveux central (SNC) et agissant comme agonistes du nAChR (Figure 1.1). Ils imitent l'action de l'acétylcholine (ACh) en ouvrant les canaux ioniques qui permet l'entrée des cations, y compris le sodium et le calcium, provoquant ainsi une neurotransmission excitatrice dans le SNC [27] [28] [29] [30] [31], menant à la paralysie suivie par la mort [32].

Ces insecticides sont actifs contre un grand nombre d'insectes importants sur le plan économique, notamment les *Aphidae* (pucerons), les *Aleyrodidae* (aleurodes), les *Cicadellidae* (cicadelles), les *Chrysomelidae* (notamment la chrysomèle des racines du maïs), les *Elateridae* (taupins), les *Pseudococcidae* (cochenilles) et les acariens phytophages. Certains de ces groupes (pucerons) peuvent également transmettre des virus, de sorte que les néonicotinoïdes peuvent également contribuer au contrôle des insectes vecteurs de maladies virales des cultures [5] [24] [33].

Les néonicotinoïdes ont un effet systémique. Appliqués dans le sol ou à la graine, les produits sont absorbés par les racines, répartis dans la plante et assurent un contrôle constant et durable des insectes suceurs. Après l'application foliaire, les néonicotinoïdes pénètrent dans la feuille et contrôlent les parasites sur la face inférieure de la feuille en raison de leur bonne activité translaminaire. En outre, ils sont distribués par voie acropétale (mouvement du xylème) et peuvent protéger de nouvelles pousses en croissance [5]. Leur efficacité extraordinaire, ainsi que la pleine exploitation du nAChR, et les applications polyvalentes, ont contribué au succès unique de cette classe chimique. [5].

#### 1.1.4. Acétamipride (insecticide néonicoténoïque)

L'acétamipride (ACMP) est couramment utilisé pour contrôler les insectes suceurs hémiptères (pucerons, aleurodes), les thysanoptères et les lépidoptères sur un large éventail de cultures, en particulier les légumes et les fruits [34] [32].

##### 1.1.4.1. Caractéristiques et mode d'action

L'ACMP est un insecticide neurotoxique à effet choc (knockdown) provoquant un blocage irréversible du nAChR [34]. Les symptômes d'intoxication engendrés sont généralement l'excitation, la convulsion et la paralysie suivie par la mort [28]. Bien que l'ACMP soit très utilisé, il subsiste de nombreux doutes quant à sa toxicité et à ses risques pour la santé [35]. Ses principales caractéristiques physicochimiques sont résumées dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Principales caractéristiques physicochimiques de l'acétamipride [36]

Paramètres	Propriétés
Nom commun	Acétamipride
Nom IUPAC	(E)-N-[(6-Chloro-3-pyridinyl)méthyl]-N'-cyano-N-méthyléthanimid
Structure chimique	
Formule moléculaire	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>
Masse moléculaire	222,68 g/mol
Point d'ébullition	98.9 °C
Solubilité dans l'eau à 25°C, y compris l'effet du pH	dans l'eau distillée: 4,25 x 10 <sup>3</sup> mg/L pH 5: 3,48 x 10 <sup>3</sup> mg/L pH 7: 2,95 x 10 <sup>3</sup> mg/L pH 9: 3,96 x 10 <sup>3</sup> mg/L
Pression de vapeur	1 x 10 <sup>-8</sup> (mm Hg)
Coefficient de partition octanol-eau	log K <sub>ow</sub> = 0.80 à 25°C
Constante de dissociation	pK <sub>a</sub> : 0,7 à 25 °C

## 1.2. Biopesticides

### 1.2.1. Définition

Un biopesticide se définit comme tout pesticide d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants (plantes, animaux microscopiques tels que les nématodes et les microorganismes, y compris les bactéries, les virus et les champignons) ou substances d'origine naturelle synthétisées par ces derniers qui sont utilisés pour tuer les populations de ravageurs [37] [38].

### 1.2.2. Classification

Le terme biopesticides couvre un large éventail de produits potentiels qui peuvent être classés dans les catégories et sous-catégories suivantes [39] [37] [40] [41]:

#### 1.2.2.1. Pesticides microbiens et nématodes entomopathogènes

Ce sont des pesticides qui contiennent des micro-organismes, tels que les bactéries (*Bacillus thuringiensis*), les champignons (*Beauveria spp.*), les virus (*nucleopolyhedrosis viruses*) et les protozoaires (*Trichogramma*) ou les nématodes entomopathogènes comme ingrédients actifs qui attaquent des espèces nuisibles spécifiques.

#### 1.2.2.2. Protecteurs incorpores aux plantes (organismes génétiquement modifiés)

Ce sont des substances pesticides que les plantes produisent à partir du matériel génétique qui lui a été ajouté comme la protéine Bt : résistance aux insectes.

#### 1.2.2.3. Pesticides biochimiques

Ce sont des pesticides basés sur des substances naturelles qui contrôlent les ravageurs par des mécanismes non toxiques. Ils comprennent les substances qui

interfèrent avec la croissance ou l'accouplement, telles que les régulateurs de croissance, ou ceux qui repoussent ou attirent les insectes, tels que les phéromones.

#### 1.2.2.4. Pesticides d'origine végétale

Les produits végétaux à action phytosanitaire ont une longue histoire que la plupart des autres pesticides [38]. Ce sont des pesticides à base des extraits de plantes, des huiles végétales ou des huiles essentielles (HE) [42]. Ces métabolites secondaires constituent un réservoir extrêmement riche en biodiversité chimique. Plus de 200 000 structures chimiques diverses ont été identifiées [43]. Les HE constituent une catégorie majeure des biopesticides d'origine végétale qui a commencé à se développer avec la recherche dans les années 1980 [42]. Selon Isman, cette recherche a considérablement augmenté, notant qu'en 1980, moins de 2% de tous les articles scientifiques ont été consacrés aux bio-insecticides alors que cette proportion a dépassé les 21% en 2011 [44].

#### 1.2.3. Bio-pesticide à base des HE

Les HE (= essences ou huiles volatiles) sont des mélanges complexes de substances volatiles contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. Elles sont lipophiles, de faible poids moléculaire, généralement odorantes et liquides [45] [46], souvent agréable [46] et sécrétées en réaction à l'environnement comme moyen de protection contre les ravageurs ou pour aider la pollinisation en attirant certains insectes [47].

La composition chimique des HE est éminemment variable [38]. Leurs constituants appartiennent principalement à deux classes: les terpénoïdes (monoterpènes et sesquiterpènes) et les phénylpropanoïdes [42] [48]. Ces mélanges complexes de substances agissent par des mécanismes d'action différents. Ils présentent souvent des relations synergiques, pouvant être efficaces pour empêcher le développement des populations des agents pathogènes et des ravageurs résistants [49].

La littérature montre que de nombreuses études sont effectuées sur les performances remarquables des HE en tant qu'antimicrobiens (contre les bactéries, les levures et les champignons filamenteux). Les terpénoïdes sont des antimicrobiens liposolubles qui affectent les activités enzymatiques catalysées par la membrane des microorganismes [50]. De même, les monoterpènes et les sesquiterpènes ont une efficacité aussi remarquable sur les insectes et ils sont utilisés comme attractifs, défensifs, dissuasifs et toxiques [51].

Les biopesticides à base d'HE forment une classe de pesticides intéressante puisqu'en étant constituées de plusieurs composés à mécanismes d'action multiples, elles ont des modes d'application variés [52]. De même, comparés aux pesticides synthétiques, les biopesticides à base des HE sont des formulations préférables pour le contrôle des ravageurs à l'avenir; en raison de leur faible toxicité et leur biodégradabilité [53].

Le marché des biopesticide à base d'HE a connu la plus forte croissance de tous les marchés des pesticides d'origine végétale au cours des dernières années. L'utilisation des médicaments à base de plantes en Europe, au Japon et en Amérique du Nord a renforcé la confiance dans leur sécurité [42].

Seuls quelques travaux de recherches concernant la caractérisation chimique des constituants volatils des fougères ont été rapportés dans la littérature [54] [55] [56], dont deux sur la fougère aigle [57] [58]. Dans ce contexte, il sera intéressant d'approfondir les recherches sur la composition chimique de l'HE de cette fougère, ainsi que son utilisation dans le domaine de lutte biologique.

#### 1.2.4. Fougère aigle

La fougère aigle *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn est une espèce vasculaire largement et fréquemment distribuée [59]. Elle appartient au genre *Pteridium* Scopoli. Ce genre est monotypique, avec une seule espèce polymorphe [60].

##### 1.2.4.1. Noms vernaculaires

Le mot *Pteridium* dérive du nom grec « pteris : fougère » et « aquila » du latin qui signifie « aigle » [61]

Noms arabes : Fersik, Bû-hemmûs [62]

Noms français : fougère aigle, grande fougère, fougère commune, Ptéride aquiline [61]

Noms anglais : Bracken fern, Brake fern [61]

##### 1.2.4.2. Systematique

La classification botanique du *P. aquilinum* est la suivante [63] [64] :

Règne : Plantae

Embranchement : Tracheophyta

Classe : Polypodiopsida

Ordre : Polypodiales

Famille : *Dennstaedtiaceae*

Genre : *Pteridium*

Espèce : *P. aquilinum* (L.) Kuhn

##### 1.2.4.3. Description botanique

*P. aquilinum* est une plante herbacée vivace, d'environ 1 à 3 m de hauteur [65]. Les racines (adventives) modérément ramifiées, apparaissent à des intervalles irréguliers tout le long de la surface inférieure du rhizome [66]. Le rhizome est long, rampant, ramifié, noir, d'environ 12 mm d'épaisseur. Chaque branche produit généralement une seule feuille par an [60] [66].



Les frondes sont caduques, poussant à partir du rhizome, découpée en pennes qui se subdivisent en pinnules; pétiole dressé, ordinairement à peu près aussi long que le limbe, atteignant 1 cm d'épaisseur, jaunâtre et glabre au – dessus ; limbe vert clair, lancéolé, triangulaires bi-à tripennées ; les pennes peuvent atteindre 70 cm de longueur et 35 cm de largeur ; quant aux pinnules, elles peuvent atteindre 30 cm de longueur sur 2 à 6 cm de largeur, lancéolées à oblongues, entières ou pennatilobées [65] [60] [67] [68]. Sores sub-marginaux, couvrant parfois toute la face inférieure de la pinnule. Spores brunes, trilètes, tétraédriques - globuleuses, de 23-35  $\mu\text{m}$  de diamètre [69] [70].

Cette plante doit son nom de fougère aigle ( aigle bicéphale) à la figure que forment ses faisceaux vasculaires du pétiole en coupe transversale qui sont grossièrement disposés comme un fer à cheval [71] [66].

#### 1.2.4.4. Habitat et écologie

La fougère aigle pousse généralement dans les sols forestiers, les lisières des forêts, les montagnes jusqu'à 2000 m d'altitude, les pentes exposées et les zones ouvertes [72] [73]. C'est une espèce acidophile et commune dans les pinèdes [74] [73].

#### 1.2.4.5. Répartition géographique

*P. aquilinum* est une espèce omniprésente et cosmopolite [69] [14], à l'exception de la zone arctique et les régions désertiques chaudes [75] [66]. La fougère aigle présente une répartition africaine de la méditerranée jusqu'au CAP [70]. D'après l'Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord, il existe un nombre total de 114 taxons de fougères dont 58 en Algérie, 78 au Maroc et 37 en Tunisie [63].

En Algérie, cette espèce est répartie aux Sahels littoraux oranais, plaines littorales oranaises, l'Atlas tellien oranais, littoral algérois, l'Atlas tellien algérois, la Grande Kabylie, la Petite Kabylie, la Numidie et le Tell constantinois [76] [77].

#### 1.2.4.6. Utilisations et propriétés biologiques

*P. aquilinum* est largement utilisé comme légume cuit. Les jeunes crosses sont comestibles au Japon et au Gabon [70]. En Côte d'Ivoire, elle est utilisée comme plante médicinale sous diverses formes de préparations médicamenteuses (traitement du rhumatisme et des convulsions des nouveau-nés) [78]. En Algérie, les frondes sèches sont utilisées comme un antirhumatisme [79].

D'après la littérature, les extraits de la fougère aigle présentent une activité antibactérienne [80] [81], antifongique [82], insecticide [83], antioxydante [81] [84] et antipaludique [84].

#### 1.2.5. Formulation des biopesticides

L'utilisation des HE comme principe actif dans la formulation des biopesticides, est le meilleur choix pour une production agricole biologique [85]. Ces composés sont sensibles et peuvent facilement subir une dégradation sous l'action de l'oxygène, de la lumière et de la température. Par conséquent, une formulation adéquate de l'HE qui prend en compte ces aspects est requise pour les différentes applications. Les objectifs communs dans le développement d'une formulation à base de l'HE consistent à la protéger contre la dégradation ou les pertes par évaporation, à faciliter la manipulation et à augmenter son efficacité biologique. Les formulations possibles comprennent les formes liquides, semi-liquides et solides [86].

Les ingrédients d'une formulation du biopesticide doivent: (i) assurer la stabilité pendant la production, le traitement et le stockage du biopesticide, (ii) aider à l'application, (iii) protéger le biopesticide des conditions environnementales défavorables [87] [88] [89]. Une formulation d'un biopesticide consiste généralement en un ingrédient actif et en plusieurs substances inactives. L'objectif principal de ces additifs est d'augmenter l'efficacité de l'ingrédient actif et peuvent représenter 90 à 95% de la formulation [89] [90].

Les HE agissent très rapidement et leur efficacité est limitée par le fait qu'elles se volatilisent très rapidement. Des formulations alternatives, sont en cours de développement pour réduire les quantités appliquées, augmenter la durée de leur efficacité en réduisant leur évaporation, simplifier la manipulation et ralentir le taux de dégradation dans l'environnement [91]. Des expériences in vivo, réalisées sur des pommes inoculées par *Monilinia fructigena*, ont révélé que la formulation de l'huile de *Thymus vulgaris* a permis de réduire l'évaporation de l'huile de la zone traitée et qu'elle a fourni un taux significatif de suppression de la croissance mycélienne par rapport au témoin [92].

Les étapes suivantes peuvent être considérés comme des éléments essentiels pour une formulation appropriée d'un biopesticide à base de l'HE [85]:

- Extraction de l'HE
- Détermination du profil chimique de l'HE
- Évaluation de l'efficacité biocide de l'HE: antibactérienne, antifongique, insecticide.
- Détermination des doses et du degré d'efficacité.
- Calcul du pourcentage d'ingrédient actif pour la formulation et les adjuvants.
- Formulation du biopesticide pour le traitement proposé.

Les étapes et les additifs d'une formulation des biopesticides est rarement disponible dans la littérature, car une grande partie de l'information est détenue par les entreprises en tant que secrets commerciaux [41].

### 1.3. Toxicologie

#### 1.3.1. Généralités

Les interactions d'une substance toxique avec un organisme peuvent être divisées en trois phases : exposition, toxico-cinétique et toxico-dynamique [93].

##### 1.3.1.1. Phase d'exposition

L'organisme doit être exposé à un produit toxique pour qu'un effet nocif se manifeste. Ce produit peut agir au point de contact (effet local) ou pénétrer dans l'organisme (effet systémique) [94]. L'exposition aux produits toxiques est subdivisée en quatre catégories : aiguë, subaiguë, sub-chronique, et chronique (Tableau 1.3) [26].

Tableau 1.3 : Catégories d'exposition aux produits toxiques

	Catégories	Durée d'exposition
Administration unique	Aiguë	< 24 heures
Administration répétée	Subaiguë	≤ 1 mois
	Sub-chronique	1 à 3 mois
	Chronique	> 3 mois

##### 1.3.1.2. Toxico-cinétique (concentration des substances toxiques à la cible)

C'est l'étude de la façon dont les substances toxiques pénètrent, se déplacent et être éliminer du corps et si un toxique est rapidement excrété ou si des expositions répétées mèneront à l'accumulation dans le corps. Le parcours de ces substances dans l'organisme se schématise par quatre étapes : l'absorption, la distribution, la biotransformation et l'élimination [93].

### 1.3.1.3. Toxico-dynamique (interaction des substances toxiques avec la cible)

Elle fait référence à la description des effets d'un toxique sur un système biologique, à travers ses actions allant du niveau moléculaire aux cellules, aux tissus, aux systèmes d'organes [93] [95].

### 1.3.2. Niveaux de toxicité

#### 1.3.2.1. Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est définie comme le (s) changement (s) indésirable (s) survenant immédiatement ou peu du temps après une exposition unique ou de courte durée (24 heures) à une substance (s) [96]. En règle générale, c'est le premier test de toxicité effectué sur un nouveau produit chimique. Les objectifs de l'évaluation de la toxicité aiguë sont les suivants [26]:

- . Fournir une estimation de la toxicité intrinsèque de la substance, souvent exprimée en dose létale approximative ;
- . Fournir des informations sur les organes cibles et d'autres manifestations cliniques de toxicité ;
- . Fournir de l'information qui facilitera la conception et le choix de la dose pour les études à long terme (subchroniques, chroniques).

La dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) est définie comme la dose provoquant la mort chez 50% des animaux traités, pendant un temps donné, par administration unique. La DL<sub>50</sub> sert fréquemment à exprimer la toxicité aiguë ainsi que pour classer et comparer les produits toxiques [97] in [96].

#### 1.3.2.2. Toxicité subaiguë

La toxicité subaiguë est le plus souvent réalisée dans le cadre de la détermination des doses nécessaire pour choisir celles à étudier dans l'étude sub-chronique. Cette étude, incluant certains paramètres hématologiques et biochimiques semble extrêmement utile pour obtenir des données sur la toxicité de nombreux produits chimiques [98].

#### 1.3.2.3. Toxicité sub-chronique

L'évaluation de la toxicité sub-chronique soit souvent la source principale ou unique des données expérimentales pour déterminer les doses NOAEL (Dose sans effet nocif observé) et LOAEL (dose minimale avec effet nocif observé). On peut également mieux identifier et caractériser le ou les organes spécifiques affectés par le composé d'essai après une administration répétée [26].

#### 1.3.2.4. Toxicité chronique

Ce test est effectué pour obtenir des informations sur les effets d'une exposition prolongée ou répétée à une substance toxique. Ces effets n'apparaissent pas immédiatement après la première exposition, des années peuvent s'écouler avant que les signes et les symptômes ne se développent [26].

### 1.3.3. Manifestations toxiques de certains organes cibles

#### 1.3.3.1. Hépatotoxicité

Le foie est la plus volumineuse glande digestive de l'organisme. Il assure un large éventail de fonctions, y compris les activités métaboliques (glucidique, lipidique et protéique), le stockage des vitamines, la production de la bile et des facteurs de coagulation [99]. C'est le principal organe actif dans le métabolisme et la détoxification des xénobiotiques. Si l'accumulation de ces derniers est plus rapide que la capacité métabolique du foie, des dommages hépatiques peuvent survenir [100].

Le lobule est l'unité fonctionnelle de base du foie. Il est de forme hexagonale, construit autour d'une veine centrale, composé de nombreuses plaques cellulaires et irriguées par un réseau de sinusoides. Chaque plaque est constituée de cellules hépatiques spécialisées « les hépatocytes ». Ces dernières exécutent la même grande variété de fonctions métaboliques et de tâches sécrétoires. Le lobule est délimité par des triades formées de la veine porte, le canal biliaire et l'artère

hépatique et il contient d'autres cellules spécialisées, telles que les cellules de Kupffer (Figure 1.2) [99].

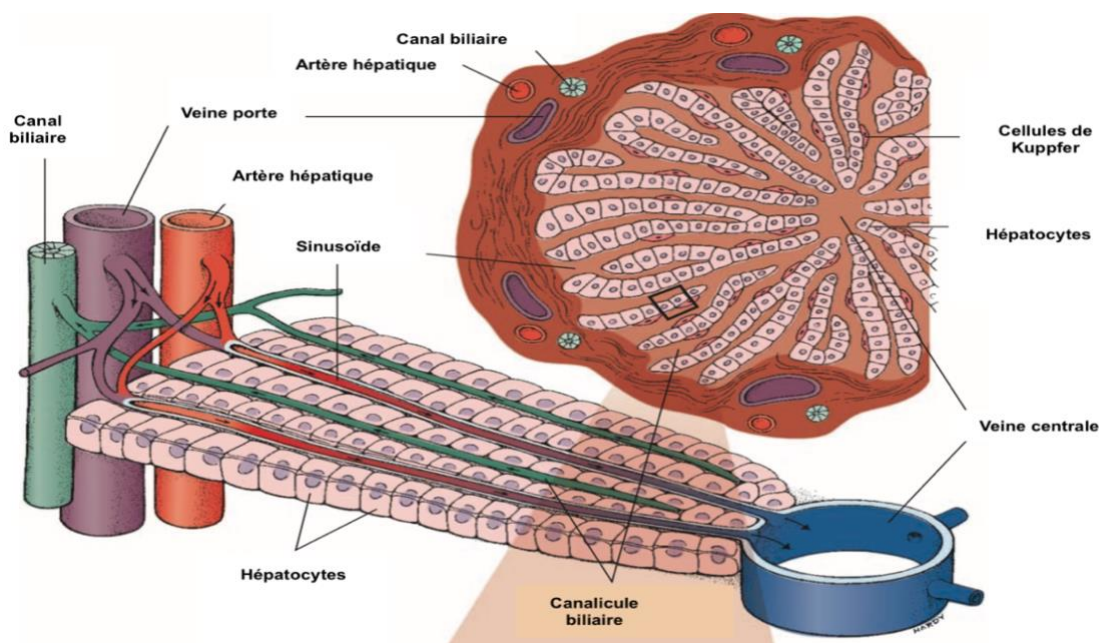


Figure 1.2 : Anatomie fonctionnelle du foie « le lobule » [99] (Rhoades, 2013).

L'hépatotoxicité fait référence à une atteinte hépatique associée à une altération de la fonction hépatique causée par une exposition à un xénobiotique [101]. Ces troubles entraînent divers changements pathologiques du foie tels que la nécrose, l'hépatite, la cholestase et la stéatose [102]. Le foie a été considéré comme l'organe le plus important ciblé par les effets toxiques des xénobiotiques tels que les pesticides [103].

#### 1.3.3.2. Néphrotoxicité

Le rein est un organe qui remplit une multitude de fonctions physiologiques. Son rôle vital est intimement lié à sa fonction dans l'homéostasie du milieu intérieur. Il effectue cette tâche en filtrant le sang et en formant de l'urine, tout en régulant simultanément la pression artérielle, les taux d'électrolytes et l'équilibre acido-basique [104] [105] [106].

Le néphron est l'unité structurale et fonctionnelle de base du rein. Pour assurer les fonctions rénales, les néphrons possèdent une organisation hautement segmentaire où chaque segment est spécialisé dans la sécrétion et la réabsorption de solutés particuliers [107]. Chaque rein est composé d'environ d'un million de néphrons, dont chacun est constitué d'un corpuscule rénal et d'un tubule rénal. Le corpuscule rénal consiste en une touffe de capillaires, le glomérule, entourée par la capsule de Bowman. Le tubule rénal est divisé en plusieurs segments : le tubule proximal, la boucle de Henle, le tubule distal et le tube collecteur (Figure 1.3) [108].

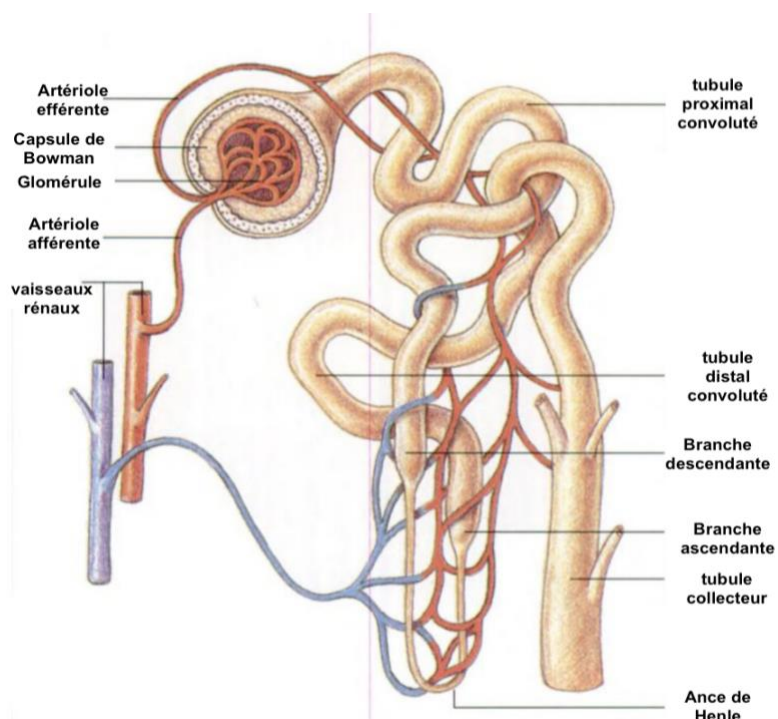


Figure 1.3 : Unité fonctionnelle du rein « le néphron » [109]

La néphrotoxicité est l'ensemble des altérations fonctionnelles ou structurelles rénales, induites directement ou indirectement par des agents chimiques et biologiques (ou leurs métabolites), qui sont absorbés dans l'organisme par inhalation, ingestion ou injection [110]. Les lésions rénales induites peuvent être réversibles ou définitives et intéressent le glomérule, le tubule et l'interstitium [111]. Ces parties du rein sont exposés à de grands volumes de substances toxiques véhiculées par le sang [112].



### 1.3.4. Toxicologie des pesticides

#### 1.3.4.1. Généralités

Les pesticides ne sont pas toujours sélectifs pour leurs espèces cibles, et peuvent provoquer des effets néfastes sur la santé des espèces non ciblées, y compris les humains [26].

Les intoxications par les pesticides peuvent résulter [113] :

- D'une ingestion d'aliments contaminés (surtout chez l'enfant) ou d'un contact avec la peau ou les muqueuses,
- D'une exposition professionnelle lors de la fabrication, de la formulation ou de l'application, par voie essentiellement respiratoire ou transcutanée,
- De leur présence dans l'environnement.

Les effets toxiques de l'exposition aux pesticides peuvent aller de symptômes bénins, comme une irritation cutanée mineure ou d'autres symptômes allergiques, à des symptômes plus graves, comme de forts maux de tête, des étourdissements ou des nausées. En règle générale, tout poison est plus toxique s'il est ingéré que s'il est inhalé et plus toxique s'il est inhalé que s'il est absorbé par la peau [114].

#### 1.3.4.2. Facteurs influant sur la toxicité des pesticides pour l'homme

L'OMS retient comme facteurs influant la gravité des effets nocifs résultants de l'exposition à un pesticide [115] :

- La dose,
- Les modalités de l'exposition,
- Le degré d'absorption,
- La nature des effets de la matière active et de ses métabolites,
- L'accumulation et la persistance du produit dans l'organisme.

#### 1.3.4.3. Classes de toxicité par les pesticides

En règle générale, les insecticides sont les plus toxiques, alors que les herbicides sont les plus dangereux en cas d'utilisation chronique [116]. En effet, parmi les 74 matières actives répertoriées en classe Ia (extrêmement dangereux) et en classe Ib (très dangereux), 48 (65%) sont des insecticides, en particulier les organophosphorés [26].

##### 1.3.4.3.1. Toxicité aiguë

Les intoxications aiguës par les pesticides sont principalement observées en milieu professionnel, en dehors des cas particuliers de suicides employant de telles substances [117]. Les effets de cette intoxication peuvent être locaux (dermiques et oculaires) et / ou systémiques. Cela inclut les réactions respiratoires, neurotoxiques, cardiovasculaires, endocriniennes, gastro-intestinales, néphrotoxiques et allergiques. Les symptômes les plus souvent rapportés lors d'une intoxication aiguë sont les suivants : irritation cutanée ou oculaire, maux de tête (céphalées), nausées, vomissements, étourdissements, fatigue et perte d'appétit [118].

##### 1.3.4.3.2. Toxicité subaiguë

Selon des études antérieures, la toxicité subaiguë de certains pesticides se manifeste par un stress oxydatif, une hépatotoxique et une néphrotoxicité chez les rongeurs [119] [120] [121].

#### 1.3.4.4. Toxicité par l'ACMP

La principale voie d'exposition est la voie orale. L'exposition professionnelle par l'ACMP peut se produire par contact cutané ou par inhalation. IL est rapidement et largement métabolisé. Ses métabolites dans l'urine représentent 79 à 86% de la dose administrée. Seulement 3 à 7% de l'ACMP sont collectés sous forme inchangée dans l'urine et les fèces [122].

Aux doses préconisées, l'ACMP est considéré comme sûr pour les humains et les animaux, des cas de maux de tête, d'étourdissements, de nausées, de vomissements et d'autres symptômes ont été signalés après l'inhalation de l'ACMP [123]. L'utilisation croissante de l'ACMP en agriculture par les traitements systémiques peut entraîner leur accumulation dans les fruits et les légumes [9] [10]. La consommation de ces derniers par les vertébrés pourrait entraîner une exposition chronique à faibles doses [124].

Malgré l'interaction entre les effets de l'exposition aux produits chimiques toxiques et la survie de l'être humain, les études toxicologiques sur l'ACMP sont limitées et les cas d'empoisonnement à ce pesticide sont encore rares. Peu de travaux ont montré ses effets toxiques subaigus et sub-chroniques [126] [35] [125] [103]. Chez les rats, IDL<sub>50</sub> de ce néonicoténoïde est estimée de 182 mg/kg du poids corporel avec une NOAEL de 7.1 mg/kg/j [127]. Selon Zhang et ses collaborateurs, l'ACMP peut induire un stress oxydatif au niveau testiculaire et rénal et endommager respectivement la fonction de reproduction masculine et rénale [126] [125].

#### 1.3.5. Toxicologie des biopesticides à base des HE

Étant donné que les biopesticides sont des produits naturels, ils sont souvent supposés être écologiques et inoffensifs. Cependant, le rôle des biopesticides est de tuer ou d'atténuer des organismes spécifiques grâce à un mécanisme de toxicité spécifique [41]. Les biopesticides à base des HE présentent une faible toxicité humaine. Il convient de noter que la plupart des HE ont DL<sub>50</sub> supérieure à 2 g / kg pour les applications par voie orale et par voie cutanée [49].

La toxicité de ces métabolites est notoirement difficile à prévoir car l'effet observé peut être augmenté ou diminué par les constituants de ce mélange (additivité, synergie et antagonisme) . Certaines HE contiennent de petites quantités de substances carcinogènes, la présence de grandes quantités de constituants antioxydants, antimutagènes et anticancéreux peut rendre cette huile non carcinogène [128].

La toxicité par les HE varie aussi en fonction de la voie d'administration (orale, cutanée ou inhalation), degré d'exposition (concentration en huile et temps d'exposition) et l'état de santé général de la personne exposée [129].

L'intoxication grave par les HE est généralement la conséquence de l'ingestion orale de l'huile pure et en quantités bien supérieures aux doses thérapeutiques. Le camphre et le salicylate de méthyle, ainsi que les huiles de girofle, de cannelle et d'eucalyptus, sont les plus signalés comme toxiques [128].

Des études antérieures illustrent le risque de l'utilisation accru des HE non diluées sur la peau qui peuvent provoquer des dermatites de contact. Les lactones sesquiterpéniques constituent un groupe important de substances notoires pour leur tendance à être des sensibilisants cutanés [130]. Les furanocoumarines sont généralement photo-toxiques, mais certaines ne le sont pas; certains aldéhydes sont des sensibilisants cutanés et certains éthers sont cancérigènes. Les phénols ont tendance à être des irritants et leur pouvoir est corrélé à la force de l'acide. Les hydrocarbures terpéniques et les alcools ont tendance à être relativement exempts de toxicité, tout comme les esters, à deux exceptions notables: le salicylate de méthyle et l'acétate de sabinyle [128].

## CHAPITRE 2

### MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Matériel

##### 2.1.1. Matériel végétal

##### 2.1.1.1. Zone de récolte

La Station de Beni-Ali est située dans le parc national de Chréa (wilaya de Blida). Elle se localise à 700 m d'altitude et à 13,4 Km du chef-lieu de la wilaya. Ses coordonnées géographiques sont 36°27'21" N, 2°51'22" E (latitude, longitude).

##### 2.1.1.2. Échantillonnage

Nous avons recueilli les frondes de *P. aquilinum* (Figure 2.1) de manière aléatoire la matinée, au mois de Juin (2015 et 2016). Les frondes récoltées sont mises dans des sacs en papier. L'authentification botanique de l'espèce est faite au niveau du département de botanique, École National Supérieur d'Agronomie (ENSA) EI- Harrach.



Figure 2.1 : Frondes de *Pteridium aquilinum* de la station de Beni Ali- Blida (originale, 2014)

Les frondes ont été lavées et séchées à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après séchage, le matériel végétal a été broyé pour l'extraction de l'HE.

#### 2.1.2. Souches microbiennes

Nous avons sélectionné quatre souches microbiennes phytopathogènes selon leur impact agro-économique. Ces souches sont isolées et identifiées par le laboratoire de Bactériologie et de Mycologie de l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV), EL-Harrach, Alger :

- Bactérie à Gram négatif : *Erwinia amylovora* , *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* et *Pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi*
- Champignon filamenteux : *Aspergillus niger*

#### 2.1.3. Puceron noir de la fève

Nous avons prélevé les pucerons aptères d'*Aphis fabae* des feuilles de la fève infestées, dans la région de Lakhdaria située au nord de la wilaya de Bouira. L'espèce est identifiée au niveau de de l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV), EL-Harrach, Alger.

#### 2.1.4. Matériel animal

L'animal utilisé est la souris NMRI (Naval Medical Research Institute) issue de l'institut Pasteur d'Alger. Nous avons utilisé des souris mâles et femelles pesant entre 20 et 30 g. Les animaux sont logés dans des cages en plastique transparent avec un accès libre à l'eau et à l'aliment standard fourni par l'Office National des Aliments du Bétail (ONAB). La litière utilisée est la sciure renouvelée chaque deux jours pour assurer le bon état hygiénique des animaux. La température expérimentale est maintenue à 22°C ( $\pm 3$  °C) avec une photopériode de 12/ 12 heures (lumière / obscurité). Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie pendant une semaine avant l'expérimentation.

### 2.1.5. Insecticide chimique

Notre choix s'est porté sur un insecticide chimique ACMP (Aceplan 20 SP à 20% de matière active), sous forme de poudre . C'est un produit couramment utilisé par les agriculteurs dans les traitements des pucerons. Il nous a été fournis aimablement par ACI (Agro Consulting International) Algérie.

## 2.2. Méthodes

Nos essais expérimentaux ont été réalisés au niveau des structure suivantes :

- Laboratoire de recherche de Biotechnologies, Environnement et Santé, Département de Biologie et physiologie cellulaire, Faculté SNV, Université SAAD Dahlab Blida 1 ;
- Institut National de Protection des Végétaux d'El-Harrach- Alger ;
- Laboratoire de Biotechnologies Végétale appliquée aux plantes aromatiques et médicinales (BVpam), Université de Lyon ;
- Laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD d'El-Harrach- Alger ;
- Laboratoire d'hygiène de Blida.

### 2.2.1. Détermination de la teneur en eau

Nous avons procédé la détermination de la teneur en eau par la dessiccation du matériel végétal à la température de  $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  dans une étuve ventilée jusqu'au poids constant. La teneur en eau est définie comme étant la perte du poids subit lors de la dessiccation. La détermination de la teneur en eau a été calculée selon la formule suivante [131] [132]:

$$\text{H}\% = \frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{PE}} \times 100$$

H% : Teneur en eau.

M1 : Poids de la capsule + l'échantillon avant dessiccation.

M2 : Poids de la capsule +l'échantillon après dessiccation.

PE : La prise d'essai.

Nous avons déterminé la moyenne des pourcentages de la teneur en eau de trois essais dans les mêmes conditions. La matière sèche (MS) est obtenue comme suit [132] :

$$MS \% = 100 - H\%$$

### 2.2.2. Criblage phytochimique

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au criblage phytochimique des extraits de frondes de *P. aquilinum* par des réactions de caractérisation en tubes afin d'avoir une idée générale sur la nature des composés présents. Ces analyses qualitatives sont basées sur des réactions de coloration et/ou de précipitation ainsi qu'à la fluorescence sous lumière ultraviolette (Tableau 2.1) [133] [134]. Les protocoles expérimentaux suivis pour la détermination des différentes classes chimiques sont mentionnés dans l'Appendice B.

Tableau 2.1 : Réactions de caractérisation du criblage phytochimique

Groupes chimiques	Réactif / Réaction	Observation (Présence / absence)
Alcaloïdes	- Mayer - Dragendorff	- précipité - précipité
Flavonoïdes	- <u>Anthocyanes</u> : acide sulfurique + NH <sub>4</sub> OH - <u>Flavonoïdes libres</u> : Réaction à la cyanidine	- coloration qui s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique - coloration orangée, rouge ou violette
Tanins	- <u>Total</u> : FeCl <sub>3</sub> à 1% - <u>Tanins catéchiques</u> : réaction de Stiasny - <u>Tanins galliques</u> : saturation avec l'acétate de sodium + 1 FeCl <sub>3</sub>	- coloration verdâtre - précipité - coloration bleu noire
Stéroïdes/ Terpènes	-Liebermann-Burchard	- anneau rouge brunâtre ou violet et couche surnageante verte ou violette
Coumarines	- Ammoniaque NH <sub>4</sub> OH	- Fluorescence sous lumière UV
Saponosides	- Indice de mousse (IM)	- IM > 100



### 2.2.3. Extraction et caractérisation de l'HE

#### 2.2.3.1. Hydrodistillation

L'extraction de l'HE de *P. aquilinum* est effectuée à l'aide d'un hydrodistillateur de type Clevenger sur les frondes séchées et broyées. Nous avons introduit 150 g de matière végétale dans un ballon de 2 litres, rempli aux 2/3 de son volume d'eau distillée. Ce mélange est porté à ébullition sur une plaque chauffante pour générer une vapeur d'eau saturée en composés volatils. Après 3 heures, ces vapeurs chargées de l'huile, en traversant un réfrigérant se condensent et se séparent en deux phases liquides ; une phase aqueuse (eau aromatique ou hydrolat) et une phase organique constituée par l'HE. Ces deux phases sont mises en mélange avec de l'éther diéthylique et séparées. La solution organique d'HE obtenue est séchée par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Ensuite, l'éther diéthylique a été évaporé et l'HE a été récupérée dans un tube en verre brun taré afin de calculer le rendement et conservée à 4°C jusqu'à son usage.

#### 2.2.3.2. Détermination du rendement

Le rendement en HE (%), a été défini comme étant le rapport entre le poids de l'HE obtenue et le poids de la matière végétale utilisée selon la formule suivante [135]:

$$R (\%) = \frac{P_h}{P_v} * 100$$

R : rendement de l'HE en % ;

P<sub>h</sub> : poids de l'HE en g ;

P<sub>v</sub> : poids de la matière végétale initial en g.

#### 2.2.3.3. Caractéristiques organoleptiques

Les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'HE ont été notées.

#### 2.2.3.4. Analyse par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC/SM)

Les spectres de masse des composés volatils ont été obtenus sur un spectromètre de masse à quadripôle et ionisation par bombardement électronique Agilent couplé à un chromatographe Agilent doté d'un injecteur automatique. Les informations concernant le type de colonne, le détecteur et les réglages du GC/SM sont résumées dans le (Tableau 2.2).

Tableau 2.2 : Conditions opératoires de l'analyse GC/SM

<b>Composant</b>	<b>Particularité</b>
<b>GC</b>	
Agilent HP	6850
Injecteur	250°C
Volume injecté	2 µl dans l'hexane
Mode	Splitless
Gaz vecteur	Hélium, 1,3 mL/min
Colonne	Capillaire, DB-5MS
Dimension de la colonne	30 m x 0,25 mm, 0,25 µm
Gradient	60 → 3 °C/min → 245 °C (4 min)
<b>MS</b>	
Agilent HP	5973
Ionisation	Impact électronique à 70 eV
Source d'ion	230° C
Balayage automatique	35-250 m / z

L'identification des composés volatils a été faite par GC/MS après une séparation de l'échantillon sur une colonne capillaire apolaire (DB-5MS). L'identification d'une molécule a été faite en comparant son spectre de masse (SM) obtenu aux bases de données électroniques WILEY 257 (Mass Spectral Library) et

NIST, ainsi qu'avec la bibliographie notamment Adams en utilisant des indices de rétention (IR) [136].

Ces IR ont été expérimentalement calculés en utilisant les temps de rétention (TR) d'une série de n-alcane (C8-C21), analysés dans les mêmes conditions chromatographiques selon l'équation suivante [137]:

$$IR = 100 \times Z + 100 \times n [(tR_s - tR_z) / (tR_{(Z+n)} - tR_z)]$$

Où :

tR<sub>s</sub>: temps de rétention absolu du soluté étudié ;

tR<sub>z</sub> : temps de rétention absolu de l'alcane à Z atomes de carbone qui précède le soluté ;

tR<sub>(Z+n)</sub> : temps de rétention absolu de l'alcane à (Z+n) atomes de carbone qui suit le soluté;

n : différence du nombre d'atome de carbone entre les deux alcanes (généralement n =1).

#### 2.2.4. Potentiel biopesticide de l'HE de *P. aquilinum*

L'un des éléments essentiels pour une formulation d'un biopesticide à base de l'HE est l'évaluation de ses activités biocides in vitro (antibactérien, antifongique, insecticide) et la détermination des doses et du degré d'efficacité.

##### 2.2.4.1. Évaluation de l'activité antibactérienne

Nous avons déterminé l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* par la méthode de diffusion sur gélose [138].

##### ➤ Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour étudier l'activité antibactérienne sont : le LPGA (Levure Peptone Glucose Agar) pour *Erwinia amylovora* et *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* et le King B pour *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

➤ Repiquage

Nous avons repiqué les souches bactériennes par la méthode des stries, puis incubées à 27 °C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de la suspension.

➤ Préparation de la suspension bactérienne

Nous avons prélevé des colonies fraîches et séparées de chaque souche bactérienne à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisé dans 5mL d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl), et standardisée à  $10^8$  UFC/mL.

➤ Technique

- Des boîtes de Pétri sont préalablement coulées avec 20 mL de milieu LPGA ou King B stérile en surfusion. Après solidification, une quantité de 100 µl de la suspension bactérienne estensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile.

- L'HE de *P. aquilinum* est stérilisée par des filtres Millipore de 0,45 µm. Dans des conditions aseptiques, des disques de papier Wathman n°1 de 6 mm de diamètre sont imprégnés avec 12,5 µl de l'HE et déposés à l'aide d'une pince stérile au centre des boîtes préalablement inoculés. Les essais ont été effectués en triple.

- Après un temps de diffusion de 15 à 30 min à température du laboratoire [139], les cultures bactériennes sont incubées à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 heures.

- La streptomycine (10 µg) est utilisée comme témoin positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique.

➤ Lecture et expression des résultats : après incubation, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à de la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré et exprimé en mm y compris le diamètre du disque de 6mm [140]. Selon la classification de Ponce et *al.*, la sensibilité des bactéries vis- à vis de l'HE est classée selon le diamètre des halos

d'inhibition: non sensible (diamètres < 8 mm) ; sensible (diamètres 9-14 mm); très sensible (diamètres 15-19 mm) et extrêmement sensible (diamètres >20 mm) [141].

#### 2.2.4.1.1. Effets bactéricides et bactériostatiques

Des disques de gélose prélevés de la zone inhibée autour des disques imbibés par l'HE sont placés dans un bouillon nutritif sans HE, et incubés à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 heures. Si aucune croissance bactérienne n'est observée dans le bouillon, l'effet a été considéré comme bactéricide. Si une croissance bactérienne a été observée dans le bouillon de culture, il a été considéré comme bactériostatique. Tous les essais ont été effectués en triple [138].

#### 2.2.4.1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

- L'efficacité antimicrobienne d'un composé est souvent décrite en termes de concentration minimale inhibitrice (CMI), la plus faible concentration du composé capable d'inhiber la croissance d'un microorganisme [142]. La CMI est déterminée par la méthode de diffusion rapportée par Kotan et ses collaborateurs [138].
- Nous avons préparé une série de dilution de l'HE de *P. aquilinum* dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) pour atteindre une plage de concentration décroissante (40 – 20 – 10 – 5 – 2,5 – 1,25 – 0,625 – 0,3125  $\mu\text{L} / \text{mL}$ ). Nous avons stérilisé les dilutions préparées par des filtres Millipore de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Une quantité de 100  $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/mL) estensemencée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture adéquat préalablement coulé et solidifié.
- Nous avons imprégné les disques de 6mm de diamètre avec de 12,5  $\mu\text{L}$  de la concentration à testée et déposé au centre de la boîte de Pétri inoculée. Après un temps de diffusion, les cultures bactériennes sont incubées à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 48 h.

- Lecture et expression des résultats : après incubation, la plus faible concentration de la série de dilution montrant un halo d'inhibition est prise comme valeur de la CMI.

#### 2.2.4.2. Évaluation de l'activité antifongique

Nous avons étudié l'efficacité antifongique de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. niger* par l'évaluation de la croissance mycélienne radiale sur milieu solide [143] [144].

##### ➤ Milieux de culture

Le milieu de culture PDA (Agar Dextrose de Pomme de terre) est utilisé pour préparer la pré-culture fongique et pour le test antifongique de l'HE .

#### 2.2.4.2.1. Criblage antifongique

- Nous avons préparé une série de dilution de l'HE de *P. aquilinum* dans le milieu PDA. Dans des tubes à essai stérile contenant 20 mL de PDA encore liquide, nous avons additionné 400 – 200 – 100 – 50 µl de l'HE afin d'obtenir les concentrations suivantes ( 2%, 1%, 0,5% et 0,25%). Le Tween-20 est incorporé dans le milieu pour améliorer la solubilité de l'HE. Après agitation des tubes, leur contenu est coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm.

- Après solidification du milieu, chaque boîte est inoculée aseptiquement au centre avec un disque mycélien (6 mm de diamètre) prélevé de la périphérie d'une pré-culture d'*A. niger* âgée de 48h. Trois répétitions sont effectuées pour chaque concentration.

- En parallèle, des boîtes témoins contenant seulement du PDA sont inoculés de la même manière. Les boîtes sont incubées à  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 7 jours en mesurant la croissance mycélienne chaque jour.

- Lecture et expression des résultats : après incubation, les diamètres mycéliens sont mesurés (en mm). En tenant compte de la croissance mycélienne du témoin, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition (PI) de la croissance mycélienne selon la formule décrite par [145] [144]:

$$PI = (d_c - d_t / d_c) \times 100$$

où :  $d_c$  = diamètre mycélium témoin - 6 mm

$d_t$  = diamètre mycélium traité - 6 mm

#### 2.2.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice de l'HE de *P. aquilinum* a été déterminée selon la méthode rapportée par deBillerbeck et *al.* [144]. Elle correspond à la plus faible concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée.

#### 2.2.4.2.3. Effet fongistatique ou fongicide

Les effets fongistatique ou fongicide de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. niger* sont déterminées suivant la technique décrite par Thomson [146]. Les disques mycéliens inhibés complètement par l'HE sont inoculés de nouveau dans le milieu PDA frais. Si aucune croissance mycélienne n'est observée l'effet est fongicide, si le champignon reprend sa croissance l'effet est donc fongistatique.

#### 2.2.4.3. Activité aphicide

Pour évaluer l'efficacité aphicide de l'HE de *P. aquilinum*, nous avons effectué des traitements par contact sur des populations de puceron de la fève *A. fabae* selon la technique de Harmouzi et ses collaborateurs [147].

##### ➤ Préparation des concentrations

Nous avons préparé cinq concentrations : 80, 40, 20, 10 et 5 µl/mL (équivalentes de 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%) en diluant l'HE de *P. aquilinum* dans de l'eau physiologique additionnée du Tween 80 comme émulsifiant à la concentration de 0,1% non toxique pour les insectes [148].

##### ➤ Technique

- Nous avons soigneusement nettoyé les feuilles saines collectées de la fève pour servir de support aux pucerons au cours du test.

Nous avons appliqué chaque concentration par contact sur les pucerons aptères. Ces derniers sont ensuite placés sur une feuille de la fève à l'intérieur d'une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Pour maintenir les feuilles turgescentes, leurs pédoncules sont enduits d'une mèche de coton imbibée de l'eau physiologique. Chaque concentration est appliquée sur 20 pucerons avec cinq répétitions. Les essais sont réalisés à  $23 \pm 1$  ° C et de 16 : 8 h de photopériode.

- En parallèle, nous avons utilisé l'insecticide chimique commercial Aceplan 20 (ACMP) comme témoin positif à une concentration de 1 mg/10mL. Selon l'index des produits phytosanitaires à usage agricole, la dose d'utilisation de ce pesticide contre les pucerons est de 10-12,5 g/hl [149].

- L'eau physiologique additionné de 0,1% de Tween 80 a servi de témoin négatif.

➤ Lecture et expression des résultats : Nous avons enregistré le nombre des pucerons morts après 12h, 24h, 36h, 48h du traitement. Le contrôle de la mortalité est vérifié à l'aide d'un pinceau à cheveux fines.



Nous avons calculé le pourcentage de mortalité corrigée (MC) par la formule de Schneider-Orelli pour connaître la toxicité réelle de l'HE de *P. aquilinum* [150] :

$$\% \text{ MC} = \frac{\% \text{ Mortalité traitement} - \% \text{ Mortalité contrôle}}{100 - \% \text{ Mortalité contrôle}} * 100$$

Afin de caractériser la puissance de l'HE utilisée, nous avons déterminé la DL<sub>50</sub> et la DL<sub>90</sub>.

#### 2.2.5. Formulation du biopesticide

A partir de l'HE de *P. aquilinum* obtenue ainsi que les doses efficaces contre les micro-organismes et le puceron testés, nous avons opté pour une formulation liquide à 6% de matière active additionné à des adjuvants [151]. Nous avons utilisé l'eau comme support pour l'application de la formulation préparée [90]. Cette dernière a été préparée au niveau du laboratoire de phytopharmacie appliquée de l'université de Blida.

**Principe actif (HE) + Adjuvants —————> Biopesticide formulé**

##### 2.2.5.1. Activité aphicide du biopesticide formulé

Afin de comparer l'activité aphicide du biopesticide formulé et de l'HE de *P. aquilinum*, nous avons suivi le même protocole décrit précédemment pour la détermination de l'efficacité de l'HE contre le puceron de la fève *A. fabae*. Nous avons préparé trois concentrations, à savoir 4%, 2% et 1% (40, 20 et 10 µl/mL) en diluant le biopesticide formulé à 6% dans de l'eau physiologique. Selon la solution à tester et à l'aide d'une micro-seringue, chaque concentration est appliquée sur le 20 pucerons aptères avec cinq répétitions. En parallèle, nous avons utilisé l'eau physiologique comme témoin négatif. Nous avons enregistré le nombre des pucerons morts après 12h, 24h, 36h, 48h du traitement. Le pourcentage de mortalité corrigée par la formule de Schneider-Orelli et les doses létales ont été calculées.

## 2.2.6. Étude toxicologique

Notre étude consiste à l'évaluation de la toxicité aiguë de l'HE de *P. aquilinum* et du biopesticide formulé, ainsi qu'à l'étude de la toxicité subaiguë (dose répétée - 28 jours) du biopesticide formulé et du pesticide chimique « ACMP » sur des souris.

### 2.2.6.1. Étude de la toxicité aiguë

Nous avons étudié la toxicité aiguë par voie orale de l'HE de *P. aquilinum* et du biopesticide formulé selon la ligne directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique 423 (OCDE). Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étape (trois), des informations sur la toxicité aiguë de la substance sont obtenues qui sont suffisantes pour les besoins de classification. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est à dire [152] :

- arrêt de l'essai,
- administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires.

Selon la bibliographie, la DL<sub>50</sub> de l'ACMP est respectivement de 198 mg / kg et 184 mg / kg chez les souris mâles et femelles [35].

#### ➤ Mode opératoire

Nous avons effectué notre expérimentation sur des souris NMRI femelles saines, non gravides avec un poids corporel entre 28 et 30 g. Les souris sont réparties au hasard en lots et acclimatés pendant 5 jours, chaque étape nécessite trois souris.

En raison d'absence d'information sur la toxicité par l'HE de *P. aquilinum*, la dose initiale recommandée est de 300 mg/kg pour des raisons liées au bien-être des animaux [152]. A partir des résultats obtenus, nous avons choisi une dose initiale de 2000 mg/kg pour le biopesticide.

Les souris mises à jeun 4 h avant l'essai, sont pesées et les doses d'essai sont préparées en fonction de leur poids corporel. Le biopesticide et l'HE de *P. aquilinum* sont dissouts respectivement dans l'eau physiologique et l'eau physiologique additionnée du tween 20. Les données sur la toxicité du Tween 20 chez la souris ont été examinées, dont la DL<sub>50</sub> était de 2,4 mL / kg. Il a également été recommandé de ne pas utiliser des doses supérieures au quart de la DL<sub>50</sub> pour les études pharmacologiques et toxicologiques, ce qui donne une limite supérieure de 0,6 mL / kg pour le Tween 20 [153] [154].

Les doses préparées sont administrées par voie orale en utilisant une sonde gastrique. Les schémas décrivant le mode opératoire suivi pour chacune des doses initiales sont représentés dans les Figures 2.2 et 2.3. En Parallèle, deux groupes témoins ont reçu respectivement de l'eau physiologique additionnée du Tween 20 et de l'eau physiologique.

➤ Comportement et symptômes cliniques

Les animaux sont observés individuellement, au moins une fois au cours des 30 premières minutes suivant l'administration du produit et régulièrement durant les premières 24 heures (avec une attention particulière pendant les 4 premières heures), puis quotidiennement par la suite, durant la période d'essai (14 jours). Ces observations incluent les changements de la peau, de la fourrure et du comportement qui était systématiquement enregistré et maintenu avec un enregistrement individuel. De même, les observations concernant les convulsions, les tremblements, la diarrhée, la salivation, la somnolence, le coma, et la mortalité ont été prises en compte.

➤ Mesure du poids des souris

Nous avons mesuré les poids corporels avant la première administration et une fois par semaine après l'administration (7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour), ainsi que le jour de l'autopsie (15<sup>ème</sup> jour pour le calcul du poids relatif des organes). Le pourcentage du gain du poids relatif (%GPR) des souris a été calculé selon la formule suivante [155]:

$$\text{GPR (\%)} = \frac{\text{Poids final (14<sup>ème</sup> jour) - Poids initial (0 jour)}}{\text{Poids initial (0 jour)}} \times 100$$

➤ Consommation d'eau et consommation alimentaire

La consommation hydrique et alimentaire sont également mesurées chaque jour. Les apports quotidiens moyen (g / souris / j) et (mL / souris / j) sont calculés [156].

➤ Sacrifice des animaux, observation macroscopique et mesure du poids relatif des organes

À la fin de l'essai (15<sup>ème</sup>), les animaux survivants sont pesés, anesthésiés par une inhalation légère d'une solution diluée du chloroforme, puis sacrifiés par dislocation cervicale. Chaque organe est soigneusement disséqué des animaux. Le cœur, les poumons, le foie, les reins et la rate sont débarrassés de l'excès de graisse, rincés avec de l'eau physiologique puis pesés. Le foie et les reins de chaque souris ont fait l'objet d'une étude histo-pathologiques. Le poids relatif des organes de chaque animal est ensuite calculé selon la formule suivante [157]:

$$\text{Poids relatif de l'organe(\%)} = \frac{\text{Poids absolu de l'organe (g)}}{\text{Poids corporel de la souris le jour du sacrifice (g)}} \times 100$$

➤ Réalisation des coupes histologiques

Pour réaliser l'étude histo-pathologique des reins et du foie, nous avons suivi les étapes décrites par Martoja et Martoja Pierson [158]. Les échantillons ont été déposés dans des cassettes d'inclusion et fixés immédiatement dans une solution du formol à 10% pendant 48 heures et lavés à l'eau courante. Les tissus fixés ont été déshydratés dans des bains d'éthanol à concentration croissante, éclairci dans un bain de xylène pendant 1 heure et incorporés dans la paraffine. Les sections micrométriques de 3 à 5 um ont été coupées par un microtome et colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Les lames ont été examinées au microscope optique pour une évaluation microscopique (détail en appendice B).

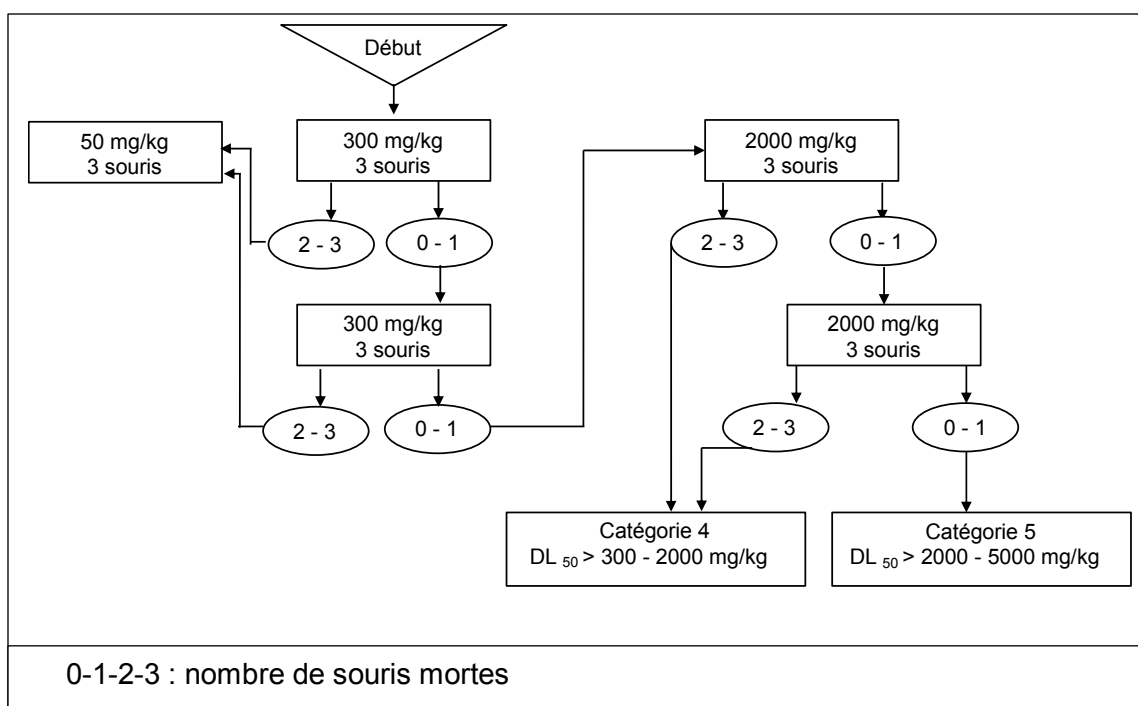


Figure 2.2 :Schéma récapitulatif du mode opératoire de la toxicité aiguë de l'HE de *P. aquilinum* avec une dose initiale de 300 mg/kg du poids corporel

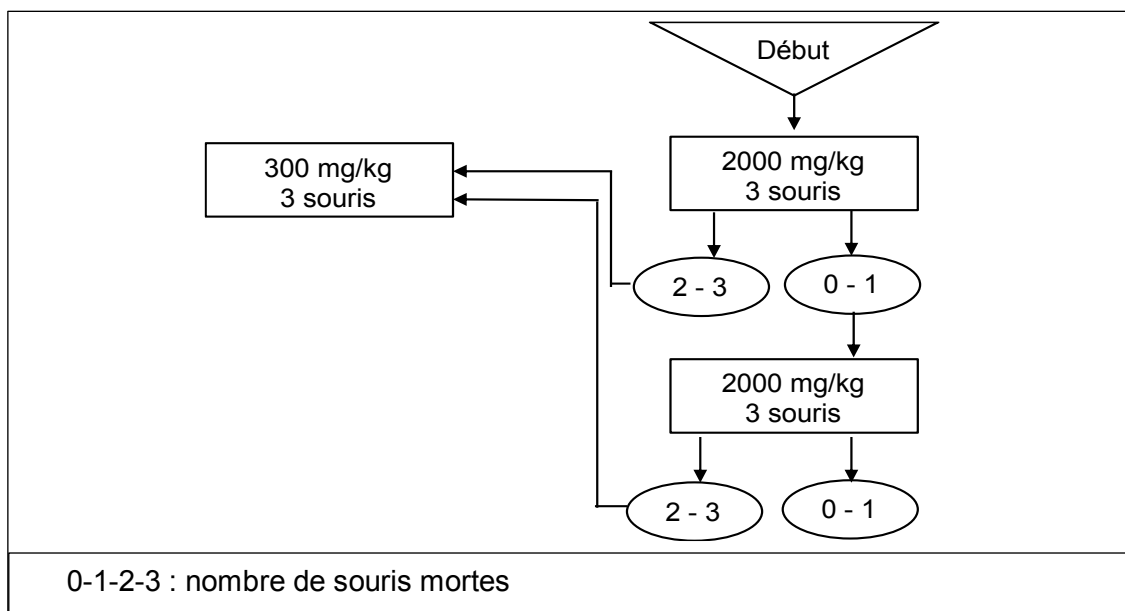


Figure 2.3 : Schéma récapitulatif du mode opératoire de la toxicité aiguë du biopesticide avec une dose initiale de 2000 mg/kg du poids corporel

#### 2.2.6.2. Étude de la toxicité subaiguë du biopesticide formulé et du pesticide chimique

Afin d'évaluer et de comparer la toxicité subaiguë du biopesticide et du pesticide chimique, nous avons suivi le protocole expérimental de la ligne directrice 407 de l'OCDE [159]. Une étude de 28 jours fournit des informations sur les effets toxiques d'une exposition répétée par voie orale au biopesticide et à l'ACMP.

##### ➤ Mode opératoire

- Nous avons calculé les doses à testées pour l'étude de toxicité subaiguë, en tenant compte de la  $DL_{50}$  et du calcul de la dose décrit dans la Ligne directrice 407 de l'OCDE. Sur la base des résultats obtenus de l'étude de toxicité aiguë, il a été montré que la  $DL_{50}$  de l'HE de *P. aquilinum* et biopesticide sont supérieur à 2000 mg/kg. Pour cela, nous avons choisi les doses, à savoir 400, 200 et 100 mg/kg de poids corporel (1/5, 1/10 et 1/20 de 2000 mg/kg).

Compte tenu de  $DL_{50}$  de l'ACMP chez les souris citée précédemment, nous avons choisi trois niveaux de doses, à savoir  $1/16 DL_{50}$  (12,37 mg/kg Mâle et 11,5 mg/kg Femelle),  $1/8 DL_{50}$  et (24,75 mg/kg Mâle et 23 mg/kg Femelle) et  $1/4 DL_{50}$  (49,5 mg/kg Mâle et 46 mg/kg Femelle).

- Nous avons inclus des groupe satellite supplémentaire afin d'observer la réversibilité, la persistance, ou l'apparition tardive des effets toxiques 14 jours après le traitement.

Nous avons établi dix groupes expérimentaux ( $n = 10$  animaux / groupe, 5 mâles et 5 femelles), comme suit:

- Groupe témoin : les souris ont reçu de l'eau physiologique pendant 28 jours ;
- Trois groupes traités par le biopesticide : les souris ont reçu les doses suivantes : 100, 200, 400 mg/kg du poids corporel pendant 28 jours;
- Trois groupes traités par le pesticide chimique: les souris ont reçu différentes doses, à savoir :  $1/16$ ,  $1/8$ ,  $1/4$  de la  $DL_{50}$  de l'ACMP pendant 28 jours;
- Groupe satellite témoin traité par voie orale pendant 28 jours avec de l'eau physiologique et gardé pendant 14 jours supplémentaires sans traitement ;
- Groupe satellite traité par le biopesticide avec la dose maximale de 400 mg/kg du poids corporel pendant 28 jours et gardé pendant 14 jours de plus sans traitement ;
- Groupe satellite traité par voie orale pendant 28 jours avec la dose maximale de  $1/4$  de la  $DL_{50}$  du pesticide chimique et gardé pendant 14 jours de plus sans traitement.

Les souris mises à jeun 4 h avant l'essai, sont pesées et les doses d'essai sont préparées en fonction de leur poids corporel. Le biopesticide et l'ACMP sont dissouts dans l'eau physiologique. Les différentes doses ainsi préparées, sont administrés quotidiennement par gavage aux souris avec un volume maximal de 1 mL/100 g du poids corporel, sept jours sur sept, sur une période de 28 jours. Au cours de cette période, les souris sont examinées soigneusement chaque jour afin de déceler tout signe de toxicité. Les animaux qui meurent et même les survivants sont autopsiés.

Un schéma décrivant le mode opératoire suivi pour l'évaluation de la toxicité subaiguë du biopesticide et du pesticide chimique est représenté dans la Figure 2.4.

- Comportement et évolution pondérale des souris

L'observation des signes généraux de toxicité chez les animaux ainsi que de la mortalité, ont été surveillées et enregistrées quotidiennement tout au long de l'étude. Le poids initial de tous les groupes a été enregistré avant l'administration des traitements testés et à la fin de chaque semaine, ainsi que le jour de l'autopsie (29<sup>ème</sup> jour et 43<sup>ème</sup> jour pour les groupes satellites). Le pourcentage du gain du poids relatif (%GPR) des souris a été calculé selon la formule suivante [155]:

$$\text{GPR (\%)} = \frac{\text{Poids final} - \text{Poids initial}}{\text{Poids initial}} \times 100$$

- Consommation hydrique et alimentaire

La quantité de la nourriture et de l'eau consommée sont enregistrées chaque jour pour chaque lot d'animaux et les apports quotidien moyen (g / souris / j) et (mL / souris / j) sont calculés.

- Prélèvement sanguin et sacrifice

A la fin de la période expérimentale (29<sup>ème</sup> jour et 43<sup>ème</sup> pour les lots satellites), les souris sont pesées et anesthésiées par inhalation légère d'une solution diluée du chloroforme. Nous avons effectué un prélèvement sanguin à l'aide des tubes capillaire d'hématocrites à travers le sinus rétro-orbital au niveau de la veine orbitale. Le sang est recueilli dans des tubes EDTA et héparine respectivement pour les analyses hématologiques et biochimiques. Les tubes héparinés sont maintenu pendant 20 min à la température du laboratoire. Ensuite, ils sont centrifugés à 2500 tours / min pendant 10 min. Le plasma obtenu en tant que surnageant est recueilli dans un tube Eppendorf étiqueté et conservé à -20 ° C jusqu'à utilisation [157].



Après la collecte du sang, nous avons sacrifié les souris par dislocation cervicale. Chaque organe est soigneusement disséqué des animaux. Le cœur, les poumons, le foie, les reins et la rate ont été observés macroscopiquement, débarrassés de l'excès de graisse, rincés avec de l'eau physiologique puis pesés. Le poids relatif des organes est ensuite calculé. Le foie et les reins de chaque souris sont conservés dans le fixateur formol à 10% pour une étude histo-pathologique selon la méthode de Martoja et Martoja-Pieson [158].

- Examens hématologiques

Les échantillons sanguins prélevés dans des tubes EDTA sont immédiatement utilisés pour déterminer les taux de globules blancs (GB), de globules rouges (GR), de plaquettes (PLT), le volume globulaire moyen (MCV), le pourcentage de l'Hématocrite (HCT), la concentration de l'Hémoglobine (HGB), la teneur corpusculaire en Hémoglobine (MCH), la concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine (MCHc) par un automate hématologique (Sysmex KX-21N).

- Examens biochimiques

Nous avons déterminé la concentration des différents paramètres biochimiques plasmatiques: glucose, urée, créatinine, aspartate aminotransférase (ASAT), alanine aminotransférase (ALAT), phosphatase alcaline (PAL), protéine totales et albumine par un automate biochimique (Roche Hitachi 902, Allemagne) avec le kit biochimique Spinreact (Espagne).

## Analyse statistique

Les résultats sont rapportés en moyenne  $\pm$  erreur type de la moyenne (SEM). Les différences entre les groupes du test antibactérien et antifongique et de l'étude de toxicité ont été déterminées par analyse de la variance (ANOVA à un facteur ou ANOVA à deux facteurs) suivie du test de Dunnett pour la comparaison des moyennes. Des valeurs de  $p < 0,05$  ont été définies comme significatives. Les analyses statistiques ont été effectuées par le logiciel GraphPad Prism version 7.00 pour Mac.

Le logiciel XLSTAT- Pro est utilisé pour analyser toutes les données de l'activité aphicide. Les pourcentages de la mortalité subissent une transformation angulaire d'après la table établie par Bliss [160]. Les données transformées font l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) suivie du test de Duncan et/ ou Tukey pour la comparaison des moyennes. Les taux de mortalité corrigés obtenus sont transformés en probit permettant d'établir une droite de régression basée sur les logarithmes décimaux des doses utilisées. Nous avons déterminé la  $DL_{50}$  et la  $DL_{90}$  de l'HE de *P. aquilinum* L. suivant le modèle Logarithme décimal de la dose – Probit de mortalité [161] [162].

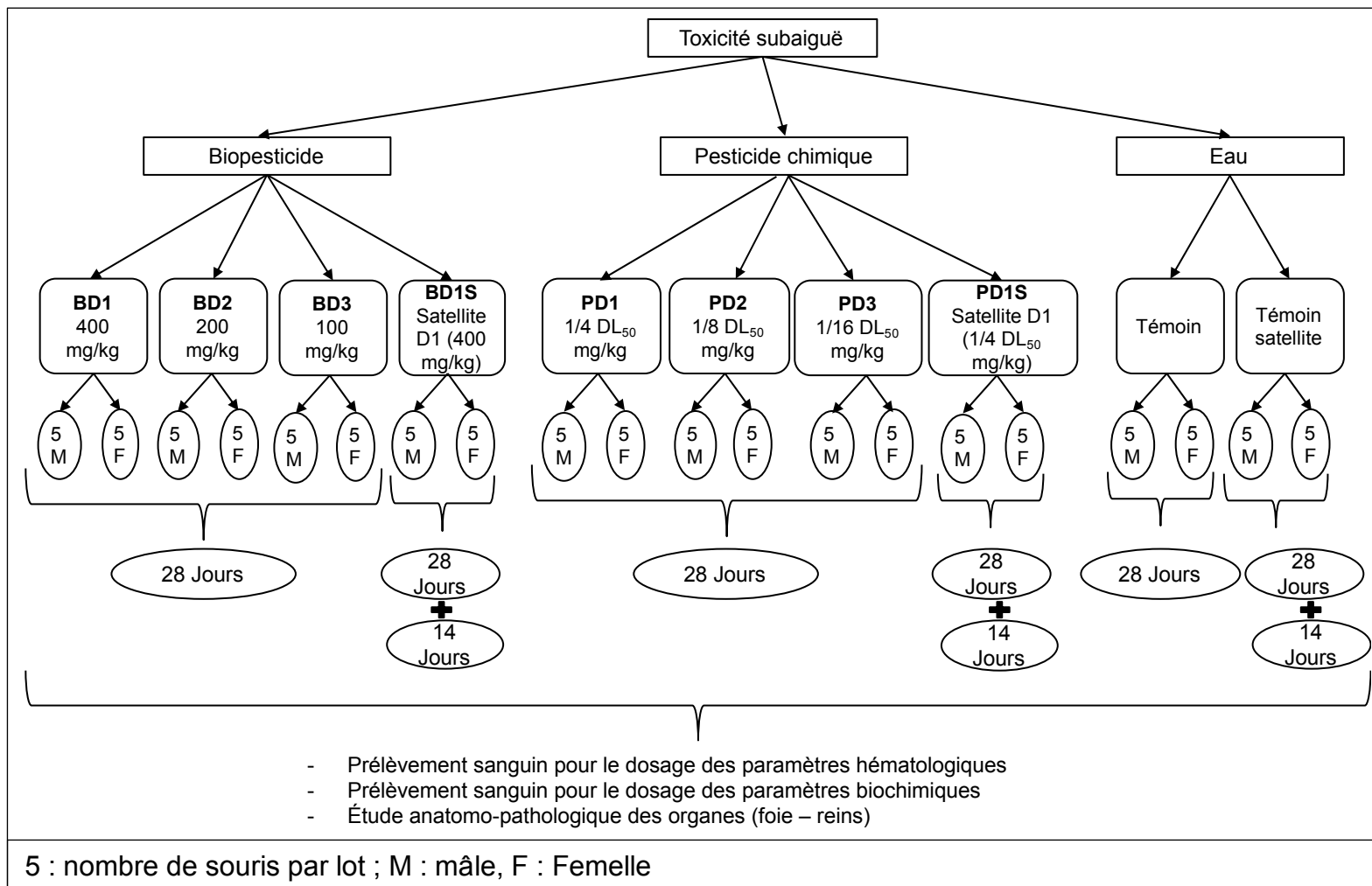


Figure 2.4 : Schéma récapitulatif du mode opératoire suivi pour l'évaluation de la toxicité subaiguë du biopesticide et du pesticide chimique

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### 3.1. Détermination de la teneur en eau

Les résultats de la teneur en eau (H%) et en matière sèche (MS%) des frondes de *P. aquilinum* sont illustrés dans le Figure 3.1 (détail en Appendice C).

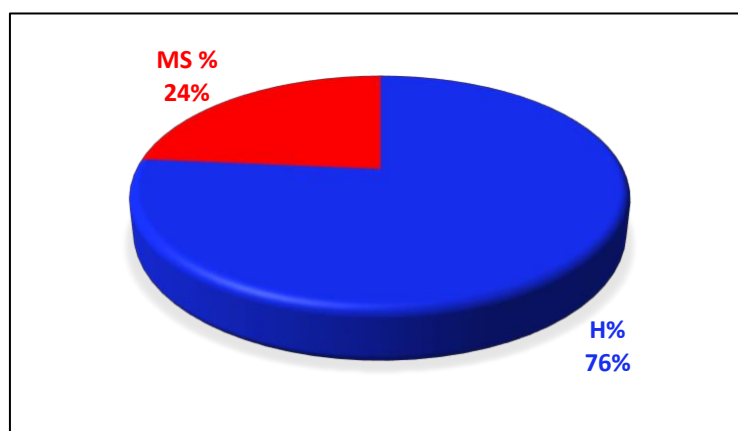


Figure 3.1 : Teneur en eau des frondes de *P. aquilinum*

Les résultats obtenus montrent que les frondes de *P. aquilinum* sont riches en eau avec un pourcentage de  $76,42 \pm 1,52$  et  $23,58 \pm 1,52$  de matière sèche.

#### 3.2. Criblage phytochimique

L'analyse phytochimique des extraits des frondes de *P. aquilinum* a révélé la présence de plusieurs métabolites secondaires qui sont résumés dans le Tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Criblage phytochimique des frondes de *P. aquilinum*

Métabolites secondaires		Résultats
Alcaloïde		-
Flavonoïde	Anthocyanes	-
	Flavonoïdes libres	+++ : Coloration rassemblée dont le surnageant d'alcool iso-amylique
Tannin	Total	+++ : Coloration verdâtre
	Catéchique	+++ : Précipité rouge
	Gallique	++ : Coloration noire
Stéroïde / Terpénoïde		+++ : Coloration violette du surnageant
Coumarines		+ : Présence d'une fluorescence
Saponines		+++ : Mousse persistante

Nous avons enregistré une richesse en composés polyphénoliques (flavonoïdes, tanins), en stérols / triterpènes et en saponines, au niveau des frondes de la fougère . Une absence d'alcaloïdes est notée. Ceci est en accord avec les travaux faits par Hassan et al. [80].

Kardong et ses collaborateurs ont rapporté la présence des flavonoïdes, tanins, terpènes, composés réducteurs, alcaloïdes et saponines, et l'absence des stérols dans les frondes de *P. aquilinum* [81]. Une étude faite par Awe et Amobi rapporte la présence des flavonoïdes, tanins, alcaloïdes et saponines, tandis que les terpènes sont absents [163].

### 3.3. Extraction et caractérisation de l'HE

#### 3.3.1. Rendement en HE

Les extractions par hydrodistillation ont fourni une HE de couleur jaune foncé avec une odeur puissante. Ses caractéristiques organoleptiques sont exposées au Tableau 3.2. Le rendement en HE est de l'ordre de  $0,025 \pm 0,005$  %. Cette valeur représente la moyenne des rendements de 3 extractions indépendantes. D'après ces résultats nous constatons que la fougère aigle est très faible en HE.

Tableau 3.2 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE de *P. aquilinum*

Aspect	Couleur	Odeur
Liquide à température ambiante	Jaune foncé	Très puissante

L'étude de Nwilo et ses collaborateurs, a montré un rendement de 0,9% des crosses de *P. aquilinum* poussé au Nigeria qui est largement supérieur à celui qu'on a obtenu [58].

Le rendement en HE peut être influencé par l'ontogénèse, les facteurs environnementaux, les périodes et sites de récolte, la situation géographique, la nature du sol, les conditions expérimentales d'extraction et les stades phénologiques [164] [165] [166] [167].

D'après des travaux antérieurs, les fougères présentent généralement un faible rendement en HE tel que les deux espèces appartenant à l'ordre des *Polypodiales* : *Asplenium adiantum-nigrum* (0,025%) et *Asplenium trichomanes* (0.030%) [56]. De même, deux espèces de la classe des Polypodiopsida, à savoir *Anemia radianna* et *Anemia hirsuta* avec un rendement respectif de 0.04 et 0.03% [55].

### 3.3.2. Analyse de l'HE par CG/SM

L'identification par CG/SM des constituants de l'HE de *P. aquilinum* a été réalisée par l'utilisation des indices de rétention (IR) sur colonne apolaire, l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs et la comparaison de ces données avec celles des bases de données électroniques, WILEY et NIST, de la base bibliographique Adams [136] et celles obtenues sur des composés standards purs. Les constituants identifiés sont listés dans le Tableau 3.3 selon leur ordre d'élution et représentés la Figure 3.2.

Tableau 3.3 : Composition chimique de l'HE des frondes de *P. aquilinum*

Composants <sup>a</sup>	IR <sub>E</sub>	IR <sub>L</sub>	%
2-Hexenal	834	846	0.12
Heptanal	899	901	0.11
Benzaldehyde	959	952	5.95
1-Octen-3-ol	975	974	0.26
2-Pentylfuran	985	984	0.14
3-Octanol	995	988	0.19
<i>n</i> -Octanal	1001	998	0.09
Limonene	1026	1024	0.07
$\beta$ -Ocimene	1041	1044	0.09
2-Octenal	1054	1049	0.16
<i>cis</i> -Linalool oxide (furanoid)	1066	1067	0.05
Terpinolene	1082	1086	0.12
Linalool	1098	1095	10.29
Nonanal	1102	1100	2.67
<i>neo</i> -3-Thujanol	1151	1149	0.14
Nonenal	1156	1157	0.33
4-Terpineol	1178	1174	0.11
Naphtalene	1182	1178	1.61
$\alpha$ -Terpineol	1194	1186	3.51
<i>n</i> -Decanal	1203	1201	0.18
Nerol	1222	1227	0.98
Pulegone	1234	1233	0.47
Cuminic aldehyde	1240	1238	4.57
Geraniol	1248	1249	3.30
Isopulegyl acetate	1272	1275	0.12
Vitispirane	1274	1272	0.22
<i>trans</i> -Anethole	1284	1282	1.37
2-Undecanone	1289	1293	5.32
Thymol	1296	1289	0.30

2-Undecanol	1301	1301	0.15
Carvacrol	1304	1298	8.15
Theaspirane B	1309	1299	1.52
<i>trans.trans</i> -2,4-Decadienal	1316	1315	0.58
<i>trans</i> -Piperitol acetate	1341	1343	0.18
<i>trans</i> - $\beta$ -Damascenone	1372	1383	0.58
$\beta$ -Caryophyllene	1412	1417	1.07
$\alpha$ -Ionone	1415	1428	0.17
Geranyl acetone	1442	1453	0.69
$\alpha$ -Humulene	1448	1452	0.28
$\beta$ -Ionone	1472	1487	3.20
Eremophilene	1492	1498	0.29
$\beta$ -Bisabolene	1501	1505	0.27
Tridecanal	1507	1509	1.50
Calamenene	1515	1528	0.70
$\alpha$ -Calacorene	1534	1544	0.20
Spathulenol	1571	1577	0.35
Caryophyllene oxide	1573	1582	0.88
Veridiflorol	1587	1592	0.11
Longiborneol	1601	1599	0.14
Dill apiol	1612	1620	0.25
$\beta$ -Tumerone	1658	1668	0.40
2-Pentadecanone	1693	1697	0.19
<i>epi</i> -Cyclocolorone	1774	1774	2.07
Farnesyl acetone	1901	1913	0.54
Isophytol	1939	1946	0.32
Phytol	2101	2105	0.21
Monoterpènes hydrocarbonés			0.28
Monoterpènes oxygénés			32.86
Sesquiterpènes hydrocarbonés			4.42
Sesquiterpènes oxygénés			4.49
Autres			27.39
Total identifié			69.44
<p><sup>a</sup> Constituants listés par ordre d'élution sur la colonne capillaire DB-5; RI<sub>E</sub>: Indices de rétention expérimentaux déterminé par la colonne mentionnée par co-injection d'une série de n-alcanes (C<sub>8</sub>-C<sub>21</sub>); RI<sub>L</sub>: Indices de rétention tirés de la bibliographie [136] [168] [169] [170] [171] [172]</p>			



L'analyse CG-SM de l'HE de *P. aquilinum* nous a permis d'identifier cinquante-huit composants, représentant 69,44 % de la composition totale. Les composés oxygénés sont plus présents que de composés hydrocarbonés. Ces composés oxygénés sont majoritairement monoterpéniques (32.86 %). Ces analyses ont mis en évidence la prédominance du Linalool (10.29 %) et du Carvacrol (8.15 %). Nous notons aussi la présence, à un degré moindre, de Benzaldéhyde (5.95 %), de 2-Undecanone (5.32%), de Cuminic aldéhyde (4.57 %), d' $\alpha$ -Terpineol (3.51 %), de Géraniol (3.30 %) et de  $\beta$ -Ionone (3.20 %).

Ces principaux composants (Tableau 3.3) représentent 44.29% de l'HE, tandis que les autres composés sont présents en petites quantités ou en traces. Il existe des indications selon lesquelles des composés à l'état de trace sont critiques pour l'activité de l'HE et peuvent avoir un effet synergique avec d'autres ingrédients de l'huile [173].

La composition chimique de l'HE de *P. aquilinum* est très peu étudié dans le monde entier : Pologne [57] et Nigeria [58]. Ces travaux antérieurs à la présente étude, ont montré une variation qualitative et quantitative du profile chromatographique de l'HE de *P. aquilinum* .

Dans l'étude menée par Halarewicz et Szumny, sur l'HE des frondes de la fougère aigle Polonaise récoltés au mois du juin et août et dans deux zones différentes, a montré que la composition qualitative a été indépendante du site ou de la saison de récolte avec la prédominance du benzaldéhyde (44-50%) et une fraction terpénique représentée par le limonène, le linalool, le terpinéol,  $\beta$ -Ionone et le citral en faibles quantités [57].

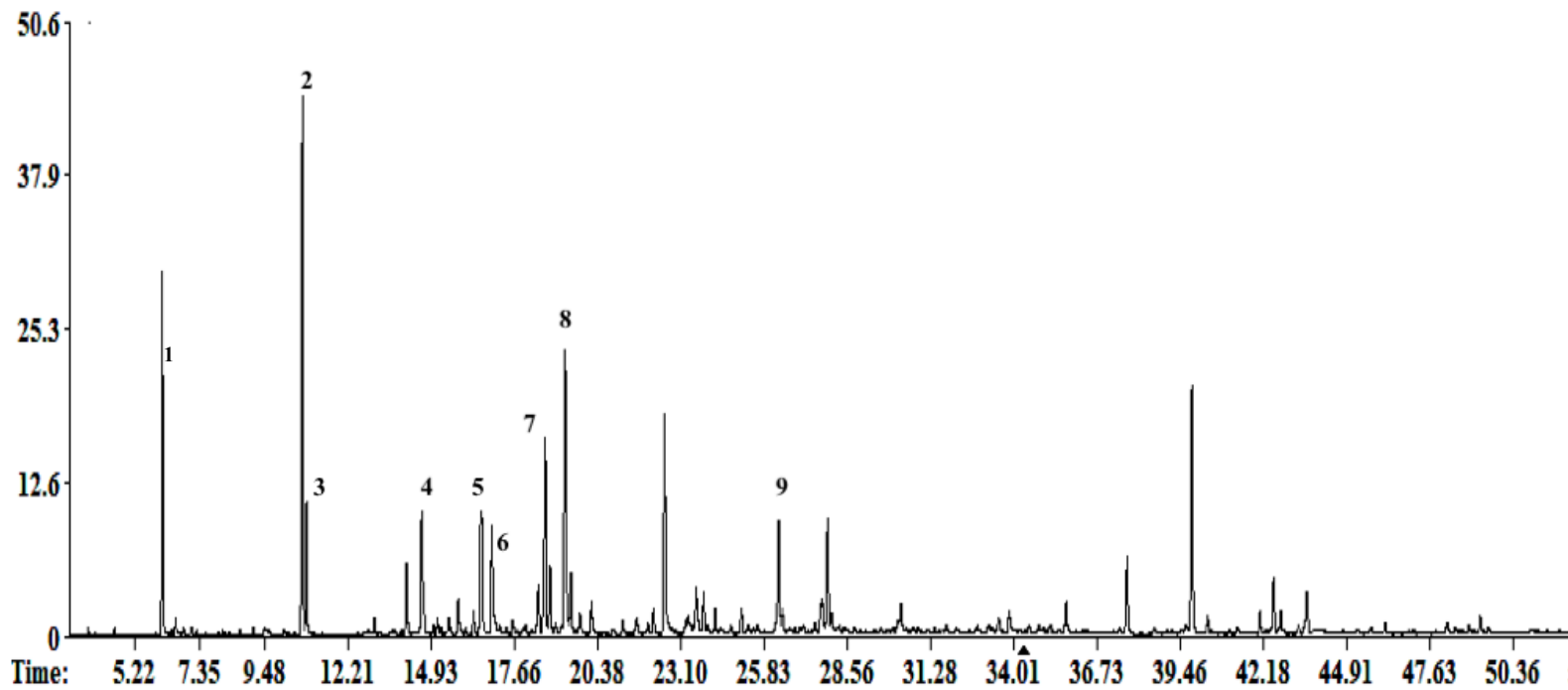


Figure 3.2 : Chromatogramme GC/MS de l'HE des frondes de *P. aquilinum* (1): benzaldehyde, (2): linalool, (3): nonanal, (4):  $\alpha$ -terpineol, (5): cuminaldehyde, (6): geraniol, (7): 2-undecanone, (8): carvacrol, (9):  $\beta$ -ionone

Nwiloh et ses collaborateurs, ont montré que l'HE des crosses de *P. aquilinum* Nigérienne est prédominée par les alcanes (86.60%) dont le composant majoritaire est le tetratriacontane (12.37 %), avec la présence des monoterpènes et des sesquiterpènes (  $\gamma$ -terpinene,  $\alpha$ - pinene,  $\beta$ -pinene, 1,8-cineole, ocimene, linalool,  $\gamma$ -epicene, geranial, neral, myrcene, nerolidol et fenchone) [58].

La différence de la composition constatée entre l'HE de *P. aquilinum* étudiée et les autres populations est vraisemblablement liée à plusieurs facteurs. La composition chimique des HE est déterminée par des facteurs génétiques, mais d'autres facteurs peuvent entraîner des modifications significatives de la production des métabolites secondaires. En fait, ces métabolites représentent une interface chimique entre les plantes et l'environnement. Les stimuli de l'environnement dans lesquels se trouve la plante peuvent rediriger la voie métabolique, entraînant la biosynthèse de différents composés. Parmi ces facteurs : les interactions plantes / microorganismes, plantes / insectes et plantes / plantes; l'âge et le stade de développement, les facteurs abiotiques tels que la luminosité, la température, les précipitations, la nutrition, le moment et l'heure de la collecte, ainsi que les techniques de récolte et de post-récolte. Il convient de souligner que ces facteurs peuvent présenter des corrélations les uns avec les autres, ne pas agir seuls, et exercer une influence conjointe sur le métabolisme secondaire [46] [174].

### 3.4. Potentiel biopesticide de l'HE de *P. aquilinum*

#### 3.4.1. Activité antibactérienne

Nous avons évalué l'activité antibactérienne *in vitro* de l'HE de *P. aquilinum* sur trois bactéries phytopathogène à Gram négatives. Les tests ont été réalisés par la méthode de diffusion sur gélose et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats de ce criblage sont résumés dans le Tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Criblage de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum*

Souches	HE		Streptomycine	DMSO
	DI(mm) ± ET <sup>a</sup>	CMI <sup>b</sup>	DI(mm) ± ET <sup>c</sup>	DI(mm) ± ET <sup>d</sup>
<i>E. amylovora</i>	32,0* ± 0,58	0,625	15,0 ± 0,58	6,0 ± 0,00
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	33,7* ± 0,88	2,50	21,3 ± 0,33	6,0 ± 0,00
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	33,0* ± 0,58	5,00	15,7 ± 0,33	6,0 ± 0,00

- <sup>a</sup> DI, diamètre d'inhibition (mm) de l'HE (12,5 µl /disque) y compris le diamètre du disque (6 mm), moyenne ± SEM (n=3)

- <sup>b</sup> CMI, concentration minimale inhibitrice (µl /mL)

- <sup>c</sup> DI, diamètre d'inhibition (mm) de la streptomycine (10 µg /disque) y compris le diamètre du disque (6mm), moyenne ± SEM (n=3)

- <sup>d</sup> DI, diamètre d'inhibition (mm) du DMSO y compris le diamètre du disque (6mm), moyenne ± SEM (n=3)

\* Effet bactéricide est observé

Selon les résultats représentés dans le Tableau 3.4, l'HE à 12.5 µl/ disque révèle un effet antibactérien et bactéricide puissant sur les trois souches testées : *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (33,7mm), *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (33 mm) et *E. amylovora* (32 mm) [141]. Comme contrôle négatif, le DMSO n'a pas affecté la croissance des souches bactériennes (Tableau 3.4).

La streptomycine a montré une activité antibactérienne puissante contre *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (21,3 mm) et modéré contre *E. amylovora* (15,0 mm) et *P. savastanoi* pv. *savastanoi* (15,7 mm).

L'activité antibactérienne de l'HE est hautement significative avec une zone d'inhibition forte par rapport à celle de la streptomycine ( $p < 0.05$ ) (Figure 3.3). L'HE de *P. aquilinum* présente une activité bactéricide contre les trois souches testées et aucune différence n'est enregistré par rapport à son effet entre ces dernières ( $p > 0.05$ ) (détail en Appendice D)

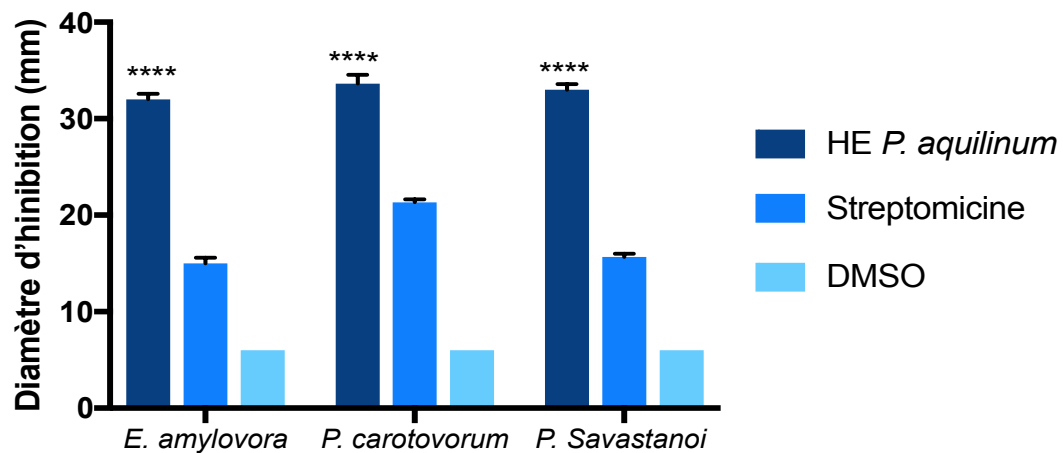


Figure 3.3 : Activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* (moyenne  $\pm$  SEM (n=3))  
(\*\*\*\* $p < 0,0001$ )

Les valeurs des CMI représentées dans le Tableau 3.4 montrent que l'HE de *P. aquilinum* présente une très forte activité contre *E. amylovora* avec une valeur de 0,625  $\mu\text{l}$  /mL suivi par *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 2,50  $\mu\text{l}$  /mL et enfin *P. savastanoi* pv. *savastanoi* 5,00  $\mu\text{l}$ /mL.

En se référant à la littérature, l'activité antibactérienne des HE devrait être liée à leur composition chimique, à la configuration structurale de leurs composants constitutifs et à leurs groupes fonctionnels et aux interactions synergiques possibles entre les composants [176].

Le potentiel antibactérien élevé de l'HE de *P. aquilinum* pourrait être expliqué par la présence de certains composants majeurs et / ou mineurs. L'HE de *P. aquilinum* est composée de 32.86 % de monoterpènes oxygénés qui sont connus par leur activité antimicrobienne la plus puissante surtout les terpènes oxygénés alcools et phénols [177] [178]. Leur activité pourrait résider sur la perturbation de la fraction lipidique de la membrane plasmique du microorganisme [179].

Compte tenu du grand nombre de composés chimiques présents dans les HE, il est fort probable que leur activité antibactérienne ne soit pas imputable à un mécanisme spécifique, mais qu'il existe plusieurs cibles dans la cellule [180] [173]. La structure chimique des différents composants de l'HE affecte leur mode d'action précis et leur activité antibactérienne [176].

Il est important de noter que le pourcentage du linalool et du carvacrol est respectivement de 10.29 % et 8.15 %. Le linalool possède un large spectre antibactérien, en inhibant 17 souches bactériennes [181], 42 bactéries phytopathogènes, alimentaires et cliniques [177], 4 souches cliniques [182], 22 bactéries phytopathogènes [183]. Plusieurs études ont démontré que le carvacrol est un composant puissant contre toutes les souches phytopathogènes testées [138] [184] [183] [185].

Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité antibactérienne de l'HE sur trois bactéries d'impact agro-économique. Le Feu bactérien est une maladie induite par la bactérie *Erwinia amylovora* (*Enterobacteriaceae*), destructrice et économiquement importante [186] [187] [185] [188]. *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovorum* est une entérobactérie responsable à pourritures des tiges (jambes noires) et de tubercules (pourritures molles) de la pomme de terre [189] [190] [191]. Ce phytopathogène a la capacité de causer de dommages importants sur le champ et des tubercules, entraînant de lourdes pertes économiques [192] [193]. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (*Pseudomonadaceae*) provoque la maladie des nœuds de l'olivier (*Olea europaea*). Elle est considérée comme l'une des maladies les plus grave

affectant les oliviers et peut entraîner des pertes importantes en termes de production [194] [195].

Plusieurs travaux ont démontré l'effet antibactérien des HE ainsi que le linalool et le carvacrol contre *E. amylovora* et *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* [138] [196] [197]. Bouaichi et ses collaborateurs ont révélé l'activité antibactérienne de quatre HE contre *P. savastanoi* pv. *savastanoi*. Un effet puissant a été remarqué pour les HE riches en carvacrol [198].

Le linalool et aussi  $\alpha$ -terpinéol provoquent une altération de la perméabilité de la membrane externe, une altération de la fonction de la membrane cellulaire et la fuite des matériaux intracellulaires [178]. Le carvacrol est un composant capable de désintégrer la membrane externe des bactéries à Gram négatif en libérant les lipopolysaccharides (LPS). Il augmente la perméabilité de la membrane cytoplasmique à l'ATP (une augmentation de l'ATP extracellulaire associé d'une diminution de l'ATP intracellulaire) [199]. D'autres travaux ont rapporté que ce monoterpène est capable de modifier la composition en acides gras de la membrane cytoplasmique des bactéries testés [200].

L'activité trouvée dans l'huile peut être due aussi à la présence du benzaldéhyde (5.95 %). C'est une molécule antibactérienne qui interagit avec la surface de la cellule et conduit à la mort cellulaire par la désintégration de la membrane cellulaire et la libération des composants intracellulaires [201]. Cette activité observée dans l'HE peut être liée à la présence d'autres molécules qui ont été déjà décrites dans les littératures pour leur pouvoir antibactérien : 2-Undécanone [202], Cumine [203] et  $\alpha$ -Terpinéol [178].

Selon la littérature, les composants mineurs des HE jouent un rôle essentiel dans l'activité antibactérienne, produisant des interactions synergiques et / ou antagonistes avec d'autres composants [204] [138]. D'après l'analyse chimique, un composant mineur « thymol » qui est présent dans l'HE de la fougère aigle, possède une activité antibactérienne puissante [138]. Des travaux récents ont démontré que l'activité antibactérienne d'une HE entière est meilleure que celle de ses composants

majoritaires dont le  $\beta$ -pinene (6.71%) est plus puissant que le 1,8-cineole (27.23%) [205].

### 3.4.2. Activité antifongique

La méthode de la croissance mycélienne radiale sur milieu solide nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'HE de *P. aquilinum* vis-à-vis de la souche fongique testée. L'activité antifongique des différentes concentrations (2, 1, 0,5 et 0,25 %) est révélée par la mesure de la croissance mycélienne d'*A. niger* quotidiennement pendant 7 jours. Les résultats obtenus sont illustrés dans la Figure 3.4.

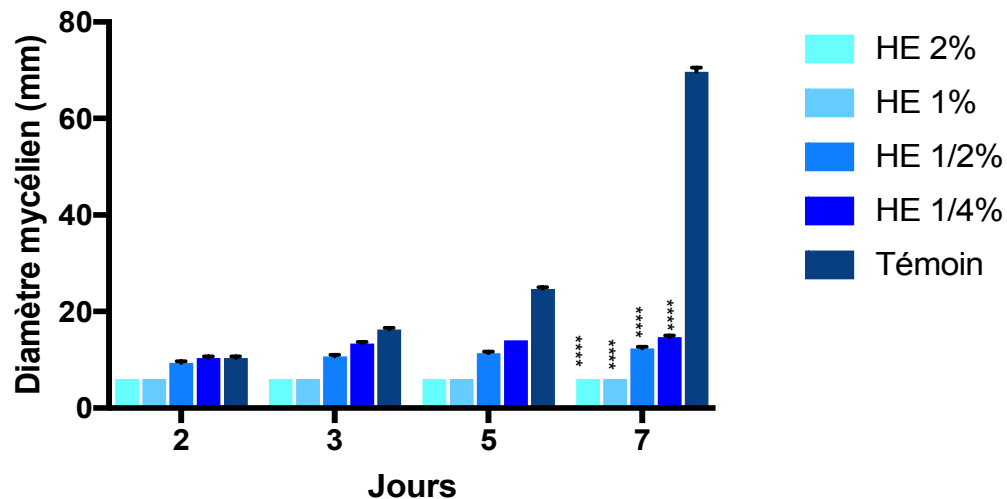


Figure 3.4 : Effet de différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* sur la croissance mycélienne d'*A. niger* (moyenne  $\pm$  SEM (n=3)) (\*\*\*\*p<0,0001)

L'étude statistique a montré une différence hautement significative ( $p < 0,0001$ ) entre les quatre concentrations testées comparativement au témoin (Figure 3.4). Les résultats du diamètre mycélien obtenus après 7 jours d'incubation, révèlent que l'HE de *P. aquilinum* présente une activité antifongique contre *A. niger* (détail en Appendice D).

Des pourcentages d'inhibition mycélien de 100%, 100%, 90,03% et 86,40% sont respectivement observés à des concentrations de 20, 10, 5, 2,5  $\mu\text{L/mL}$  de l'HE. Le



pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne augmente avec l'augmentation de la concentration de l'HE de *P. aquilinum* donc, son effet inhibiteur augmente proportionnellement à sa concentration jusqu'à une inhibition totale enregistré à des concentrations de 2 et 1%. La CMI de l'HE de *P. aquilinum* obtenue contre *A. niger* au 7<sup>ème</sup> jour est de 10 µl/mL. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 3.5. L'HE de *P. aquilinum* a montré un effet fongistatique sur le champignon testé.

Tableau 3.5 : Pourcentage d'inhibition mycélienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. niger*

	Concentration	Pourcentage d'inhibition mycélienne
HE de <i>P. aquilinum</i>	20 µl /mL	100 ± 0.00 <sup>b</sup>
	10 µl /mL <sup>a</sup>	100 ± 0.00 <sup>b</sup>
	0,5 µl /mL	90,03 ± 1,15
	0,25 µl /mL	86,40 ± 0,62

PI : calculé des diamètre mycélium - 6 mm

<sup>a</sup>Valeur de la CMI

<sup>b</sup> Effet fongistatique

L'activité antifongique des HE et de leurs composants, ainsi que leur capacité à bloquer la production de toxines, peuvent présenter différents niveaux de puissance, en fonction de leur structure. La structure et la fonction de la membrane plasmique des cellules fongiques est une clé essentielle pour la survie de ces microorganismes. Toute altération ou modification importante impliquant la synthèse ou le maintien de la membrane cellulaire peut entraîner des dommages et, par conséquent, entraîner la mort du champignon [174].

Ces dernières années, le développement d'agents antifongiques plus sûrs, tels que les HE pour lutter contre les champignons phytopathogènes, a suscité un intérêt. De nombreuses études ont signalé que les HE de différentes espèces agissent comme des inhibiteurs puissants de la croissance mycélienne des souches phytopathogènes [206] [207] [208] [209] [210].

*A. niger* est un champignon filamenteux, peut contaminer les produits agricoles à différents stades. Les changements dus à la détérioration par cette espèce peuvent être de nature sensorielle, nutritionnelle et qualitative, tels que: pigmentation, décoloration, pourriture, développement d'odeurs et de saveurs désagréables. Cependant, la conséquence la plus notable de sa présence est la contamination des produits par ses mycotoxines qui présentent des effets délétères sur les vertébrés [211] [212] [213].

Des travaux de recherche antérieurs sur l'analyse et les propriétés antifongiques des HE de diverses espèces ont montré qu'elles avaient divers degrés d'inhibition de la croissance contre *A. niger* en raison de leurs compositions chimiques différentes [206] [144] [214] [215] [216] [209].

En général, les composés antimicrobiens actifs des HE sont des terpènes de nature phénolique. Ces derniers attaquent la paroi et la membrane cellulaire, en affectant sa perméabilité ce qui engendre un dégagement des constituants intracellulaires. Ils peuvent également interférer avec les constituants de la membrane et perturber sa fonction [208] [217] [174].

Les agents antifongiques peuvent aussi désactiver le champignon en perturbant la structure et la fonction des organites de cellules fongiques et / ou en inhibant la synthèse des matières nucléaires ou des protéines [218].

L'huile de *P. aquilinum* obtenue par hydrodistillation des frondes contient des mono- et sesquiterpènes hydrocarbonés et des mono- et sesquiterpènes oxygénés. Ces dernières années, plusieurs chercheurs ont rapporté que les mono- et sesquiterpènes étaient les principaux composants de diverses HE, qui ont un potentiel énorme pour inhiber fortement la croissance d'agents pathogènes microbiens [219] [215] [208]. En particulier, les phénols et les alcools qui ont un potentiel effet antifongique suivis par les aldéhydes et les cétones [220].

L'HE de *P. aquilinum* a montré un effet antifongique contre *A. niger*. Cette activité pourrait être attribuée à la présence du Linalool (10.29 %), du carvacrol (8.15 %), Benzaldéhyde (5.95 %), 2-Undecanone (5.32%) et d'  $\alpha$ -Terpinéol (3.51 %), ce qui a significativement inhibé la croissance mycélienne (100%). Il est également possible que les composants mineurs, soient impliqués dans certains types de synergie antifongique avec d'autres composants actifs de l'HE [208].

Des études menées par DeBillerbeck et *al.*, sur l'effet inhibiteur de l'HE de *Cymbopogon nardus* sur la croissance mycélienne d'*A. niger*, en observant microscopiquement les modifications ultra-structurales des hyphes d'*A. niger*. Les résultats obtenus ont révélé un changement au diamètre des hyphes et à leurs parois qui paraissaient nettement plus minces. Ces modifications pourraient être causées par l'interférence de l'HE avec les enzymes responsables de la synthèse de la paroi ce qui perturbe la croissance normale. De plus l'HE a entraîné la désintégration de la membrane cytoplasmique et la désorganisation de la structure mitochondriale [144].

Pitarokili et ses collaborateurs ont évalué l'activité antifongique de l'HE de *Salvia sclarea* (Lamiaceae ) et le linalool sur la croissance radiale de trois champignons phytopathogènes : *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* et *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi*. Ce monoterpène possède divers degrés d'inhibition selon le champignon testé. Le linalool, qui représentait 18,46% de l'huile totale, a présenté un effet comparable à celui de l'huile totale sur *S. cepivorum* et *F. oxysporum f. sp. dianthi*, tandis que sur *S. sclerotiorum* le linalool était plus efficace [221]. Des travaux récents ont rapporté que le linalool affecte la morphologie du mycélium, avec des changements dans la localisation de la chitine dans les hyphes [174].

Le carvacrol fait partie des composés phénoliques qui ont montré une forte activité antifongique. Il a été suggéré qu'il interagit avec la membrane mycélienne provoquant sa rupture [222]. De nombreux travaux ont rapporté que l'effet antifongique de l'HE de plusieurs espèces était principalement lié à la présence du carvacrol [222] [223] [224].

Des travaux de recherche récents, ont été établis sur l'activité antifongique in vitro de l'HE de *Armeniaca sibirica* (*Rosaceae*) et de son composé majoritaire le benzaldéhyde (62.52%) contre 19 champignons phytopathogènes. Les résultats obtenus montrent que l'HE présente une activité antifongique à large spectre avec des taux d'inhibition de variant de 44,8% à 100%, tandis que ceux du benzaldéhyde sont de 28,6% à 100% [210]. L' $\alpha$ -terpinéol a été évalué pour son activité antifongique in vitro contre dix champignons phytopathogènes. Ce composé a inhibé la croissance mycélienne des champignons avec des pourcentages différents [219].

L'activité antifongique de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. niger* peut être liée aussi à la présence d'autres molécules qui ont été déjà décrites dans les littératures pour leur pouvoir antifongique à savoir le 2-Undecanone [202] [225], le Cuminic aldéhyde [226] [214] et le géraniol [227] [228].

### 3.4.3. Activité aphicide

#### 3.4.3.1. Étude de la mortalité des pucerons aptères d'*A. fabae* exposé à l'HE de *P. aquilinum*

L'efficacité de l'HE de *P. aquilinum* vis-à-vis des aptères de *A. fabae* a été menée au laboratoire. Les différentes concentrations testées (80, 40, 20, 10 et 5  $\mu$ l/mL) ont montré des propriétés insecticides après 48 h d'exposition. La Figure 3.5 montre les variations du taux de mortalité corrigée des pucerons traités par les différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* ainsi que par l'insecticide (ACMP) en fonction de la durée d'exposition.

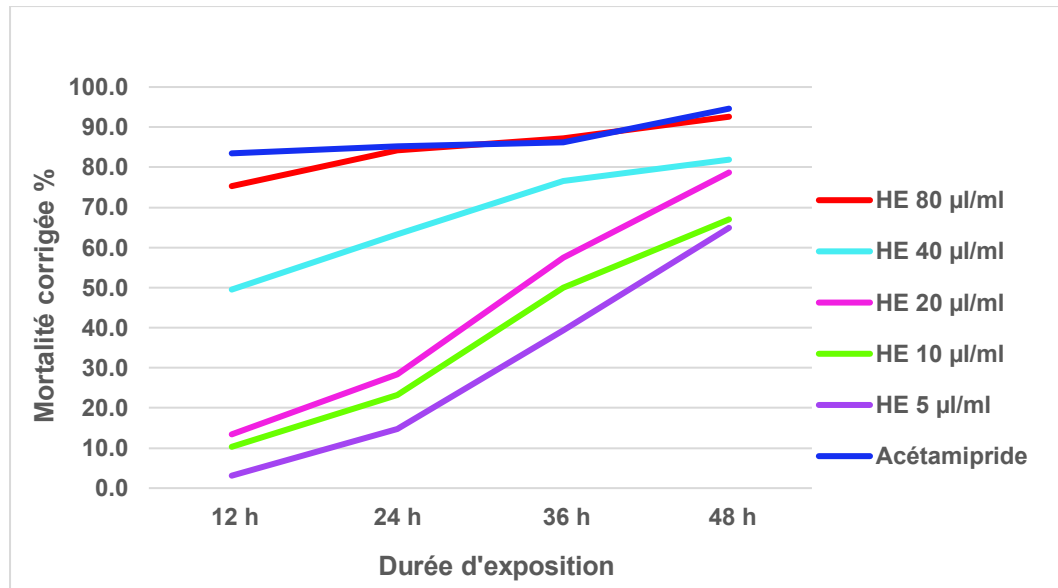


Figure 3.5 : Variation du taux de mortalité corrigée des pucerons traités par différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* et de l'ACMP en fonction de la durée d'exposition

Nous remarquons qu'il existe une relation entre la mortalité corrigée des pucerons et l'augmentation des concentrations de l'HE de *P. aquilinum*, ainsi qu'avec la durée d'exposition au traitement.

Les valeurs du pourcentage de la mortalité corrigée d'*A. fabae* traités par différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* ainsi que par l'insecticide chimique l'ACMP sont résumés dans le Tableau 3.6.

L'analyse de variance de la mortalité corrigée des pucerons après 12h, 24h, 36h et 48h d'exposition à différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* a révélé une différence hautement significative ( $p < 0.0001$ ) pour les quatre temps testés (Tableau 3.6). Cette analyse a révélé que les deux facteurs (concentration et durée d'exposition) agissent significativement sur la mortalité des pucerons (détail en Appendice D).

D'après ces résultats, il existe donc une relation entre la concentration de l'HE, la durée d'exposition et la mortalité des pucerons. L'HE de *P. aquilinum* exerce donc un effet concentration-mortalité, avec une augmentation significative de la mortalité des pucerons, lorsque la concentration croît [229].

Nous avons enregistré une mortalité variante entre  $3,05 \pm 1,25$  à  $92,63 \pm 3,16$ , après le traitement des pucerons par les différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum*. La concentration de  $5 \mu\text{l/mL}$  était la moins toxique avec un pourcentage de mortalité de  $14,81 \pm 3,19$  après 24 et  $64,91 \pm 3,88$  après 48h. Tandis que la mortalité la plus forte était de  $84,42 \pm 3,50$  après 24h et  $92,63 \pm 3,16$  après 48h, pour une concentration de  $80\mu\text{l/mL}$ .

La comparaison des moyennes par le test de Duncan a démontré que l'HE à 8% est très efficace et présente une activité insecticide similaire avec celle de l'ACMP au fil du temps ( $p > 0,05$ ). Tandis qu'une différence significative ( $p < 0,05$ ) est enregistrée pour les autres concentrations par rapport à l'ACMP, aux différents temps d'exposition à l'exception de la concentration  $40\mu\text{l/mL}$  après 36h du traitement ( $p = 0,066$ ).

#### 3.4.3.2. Étude toxicologique

Le Tableau 3.7 représente les valeurs de la  $DL_{50}$ , leurs intervalles de confiance, le slope ainsi que la  $DL_{90}$  de l'HE. de *P. aquilinum* estimées à 12h, 24h, 36h et 48h. La  $DL_{50}$  la plus faible était de  $4,259 \mu\text{l/mL}$ , enregistrée après 48h du traitement ( $ER = Y = 0,867x + 4,669$ ,  $R^2 = 0,920$ ,  $P = 0,0097$ ), alors que  $39,296 \mu\text{l/mL}$  était la  $DL_{50}$  la plus élevée, enregistrée après 12h du traitement ( $ER = Y = 2,118x + 1,534$ ,  $R^2 = 0,954$ ,  $P = 0,0043$ ).

Tableau 3.6 : Activité aphicide des différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae* en fonction du temps

Temps	5 µl/mL	10 µl/mL	20 µl/mL	40 µl/mL	80 µl/mL	DDL	f	P	ACMP
12 h	3,05 ±	10,32 ±	13,32 ±	49,58 ±	75,26 ±	4	77,742	<0.0001	83,47 ± 1,95
	1,25 <b>d</b>	1,67 <b>c</b>	2,51 <b>c</b>	4,78 <b>b</b>	3,00 <b>a</b>				
24 h	14,81 ±	23,07 ±	28,17 ±	63,06 ±	84,42 ±	4	47,459	<0.0001	85,25 ± 1,09
	3,19 <b>d</b>	4,16 <b>cd</b>	4,63 <b>c</b>	2,59 <b>b</b>	3,50 <b>a</b>				
36 h	39,47 ±	49,94 ±	57,37 ±	76,61 ±	87,37 ±	4	22,277	<0.0001	86,14 ± 2,16
	3,53 <b>d</b>	4,42 <b>cd</b>	4,59 <b>c</b>	1,21 <b>b</b>	4,28 <b>a</b>				
48 h	64,91 ±	67,02 ±	78,65 ±	81,93 ±	92,63 ±	4	10,993	<0.0001	94,62 ± 2,42
	3,88 <b>d</b>	4,52 <b>cd</b>	2,53 <b>bc</b>	2,07 <b>b</b>	3,16 <b>a</b>				

- Les valeurs de la mortalité corrigée sont exprimées en moyenne ± SEM.

- p : ANOVA à un facteur entre les cinq concentrations de l'HE

- Les moyennes d'une même ligne suivie de lettres alphabétiques identiques ne diffèrent pas statistiquement (Test de Duncan entre les différentes concentrations de l'HE et l'ACMP (p<0.05)).

Nos résultats obtenus montrent une diminution des DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> de l'HE de *P. aquilinum* peu à peu avec le temps. Cela indique que l'effet aphicide de l'HE augmente avec la durée d'exposition. La DL<sub>50</sub> de l'HE de *P. aquilinum* après 48 h est environ 9 fois plus faible que celle enregistré pour un temps d'exposition de 12 h. L'huile testée a entraîné une mortalité dépendante de la concentration et du temps, car la valeur de la DL<sub>50</sub> a diminué en fonction du temps.

Les résultats obtenus de l'activité aphicide de l'HE de *P. aquilinum* sont en accord avec l'activité aphicide des HE de quatre plantes médicinales à savoir, *Moringa oleifera*, *Eruca sativa*, *Raphanus sativus* et *Allium sativum* contre le puceron noir de la fève à des concentrations de 1, 2 et 4% après 48h du traitement. Les HE ont été très efficaces et les pourcentages de mortalité ont augmenté avec l'augmentation de leurs

concentrations à différentes durées d'exposition [230]. Habou et ses collaborateurs, ont montré aussi l'efficacité de l'HE de *Jatropha curcas* sur *A. fabae* à des concentrations allant de 0.5 à 15 % pendant 120 h [231].

Tableau 3.7 : Paramètres toxicologiques de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae* en fonction du temps

Temps	ER	R <sup>2</sup>	DL <sub>50</sub>	IC DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	S	P
Après 12 h	Y = 2,118x + 1,534	0,954	39,296	36,61- 42,15	174,40	2,95	0,0043
Après 24 h	Y = 1,725x + 2,556	0,930	27,794	25,40 - 30,09	144,47	3,77	0,0079
Après 36 h	Y = 1,178x + 3,824	0,968	13,559	10,06 - 16,57	121,97	6,99	0,0024
Après 48 h	Y = 0,867x + 4,669	0,920	4,259	1,20 - 7,69	72,44	14,03	0,0097

ER : équation de régression ; DL : dose létale entraînant une mortalité de 50 et 90% ; IC : intervalle de confiance 95% ; S : slope ; P : différence significative (P <0,05)

Les insecticides d'origine végétal ont longtemps été présentés comme des alternatives attrayantes aux insecticides chimiques de synthèse pour le contrôle des insectes ravageurs [232]. Des études récentes ont montré que l'application des HE a plusieurs avantages par rapport aux autres stratégies de contrôle. Leurs applications affectent les pucerons en peu de temps en les détruisant plus rapidement et en réduisant leur potentiel de reproduction [233].

Les HE de nombreuses plantes contiennent un certain nombre de composés bioactifs qui peuvent exercer une influence régulatrice ou inhibitrice sur les processus biologiques des insectes [234]. Une composition complexe d'HE est plus efficace qu'un seul composé pur en raison de la présence de plusieurs principes actifs, qui peuvent opérer par différents modes d'action [235]. Les insectes développent une résistance



plus lente à un insecticide composé d'un mélange de différentes substances actives plutôt qu'à un seul composé [232]. Il semble effectivement que l'activité insecticide par les HE dépend de leur composition chimique et les concentrations testées [236].

En Afrique du Nord, *Aphis fabae* Scopli, (1763) est l'un des principaux ravageurs de la fève et une contrainte majeure pour production féverole (*Vicia faba* L.) En plus des dommages directs aux plantes, l'infestation par les pucerons nuit largement à la féverole par l'excrétion de miellat, qui stimule la croissance de la moisissure sur les feuilles, provoquant des interférences avec certains processus physiologiques de la plante hôte [237]. En outre, ce puceron est le vecteur de nombreux virus tels que le virus de la jaunisse réticulée de la betterave (BYNV : Beet yellow net virus) et le virus de l'enroulement de la pomme de terre (PLRV : Potato leaf roll virus) [238].

Les propriétés toxiques des HE contre les organismes nuisibles tels que *A. fabae* ont été étudiées par plusieurs auteurs [239] [240] [231] [241] [230]. Nos résultats obtenus sur l'activité insecticide de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae* appuient sur l'effet toxique des HE contre ce ravageur.

Des travaux similaires sur l'efficacité des HE de cumin (*Cuminum cyminum* L.), d'anis (*Pimpinella anisum* L.), d'origan (*Origanum syriacum* var. *Bevanii* L.) et d'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn.) qui ont été testés comme fumigants contre le puceron du coton (*Aphis gossypii* Glover) [242].

D'autres travaux sont menés sur l'activité insecticide des HE du *Thymus vulgaris*, *Veronica officinalis* et *Agrimonia eupatoria* contre le puceron du chou (*Brevicoryne brassicae*), qui ont rapporté un effet toxique élevés des huiles testées [243].

L'activité insecticide de l'HE de *P. aquilinum* est peut-être dû à sa richesse en monoterpènes oxygénés (32.86 %). En accord avec nos résultats, les HE les plus efficaces sont celles qui contiennent majoritairement des composés monoterpéniques oxygénés [244] [245] [240].

Des travaux antérieurs ont démontré que les fractions contenant principalement des sesquiterpènes et des monoterpénoïdes oxygénés de l'HE de *Tagetes minuta* L. sont plus efficaces pour limiter la croissance de la population de pucerons [246].

Selon Grodnitzky et Coats, les propriétés insecticides de certains monoterpénoïdes leur font d'excellents composés pour le développement d'insecticides sûrs, efficaces et entièrement biodégradables [247]. Görür et al, ont constaté que l'effet insecticide puissant contre le puceron du chou après un traitement par l'HE de *T. vulgaris* est dû au pourcentage élevé en phénols monoterpéniques (thymol, carvacrol) [243].

L'apparition rapide de la toxicité des HE ou de leurs composants chez les insectes indique un mode d'action neurotoxique [248]. Les monoterpènes agissent sur différentes cibles en fonction de leur nature chimique [38]. Des travaux récents ont montré que les monoterpènes inhibent l'AchE enzyme responsable de l'hydrolyse de l'Ach [249] [250], qui est un neurotransmetteur excitateur. La non hydrolyse de cette dernière entraîne l'augmentation de sa concentration qui induit une hyperactivité aboutissant à la mort de l'insecte [148].

Plusieurs monoterpénoïdes qui représentent les molécules majoritaires de l'HE de *P. aquilinum* sont évalués pour leur activité inhibitrice de d'ACHé à savoir le linalool et le géraniol [250] [148] [251].

D'autres études ont porté sur la possibilité que le monoterpénoïde phénolique « carvacrol » exerce son effet insecticide en se liant au nAChR dans le système nerveux central de *Musca domestica* [252]. Les monoterpénoïdes peut interférer aussi au niveau du neurotransmetteur « Octopamine » qui est spécifique aux arthropodes [253] [254] [38].

Comme nous avons discuté dans cette partie, l'examen des études antérieures a révélé que les HE obtenues à partir de nombreuses plantes ont beaucoup gagné de popularité auprès des chercheurs en raison de leurs multiples activités biologiques. Bien qu'un grand nombre d'espèces végétales ont été étudiées pour leur potentiel en

HE et leurs activités antibactérienne, antifongique et insecticide. Cependant, à notre connaissance, aucun rapport n'a encore été publié concernant l'évaluation des activités biologiques de l'HE de *P. aquilinum*.

#### 3.4.4. Formulation du biopesticide et son activité aphicide sur le puceron de la fève

D'après les résultats obtenus de l'activité biocide de l'HE de *P. aquilinum*, un biopesticide à 6% de l'HE testée a été formulé. Pour cela, nous avons évalué l'activité aphicide de ce bioproduit à différentes concentrations 4%, 2% et 1% de la matière active.

D'après les résultats représentés dans le Tableau 3.8, nous remarquons qu'il existe une relation entre la mortalité corrigée d'*A. fabae* et l'augmentation des concentrations de biopesticide, ainsi qu'avec la durée d'exposition au traitement.

Tableau 3.8 : Activité aphicide des différentes concentrations du biopesticide contre *A. fabae* en fonction du temps

Temps	1%	2%	4%	DDL	f	P	ACMP
12 h	36,7 ± 3,13 d	66,3 ± 2,55 c	74,5 ± 1,55 b	2	57,320	<0.0001	83,47 ± 1,95 a
24 h	47,9 ± 1,85 c	73,4 ± 2,85 b	83,0 ± 1,90 a	2	46,983	<0.0001	85,25 ± 1,09 a
36 h	58,9 ± 1,84 c	77,9 ± 1,86 b	88,4 ± 1,91 a	2	47,374	<0.0001	86,14 ± 2,16 a
48 h	68,8 ± 1,96 c	83,9 ± 1,60 b	93,5 ± 1,89 a	2	31,103	<0.0001	94,62 ± 2,42 a

- Les valeurs de la mortalité corrigée sont exprimées en moyenne ± SEM.
- p : ANOVA à un facteur des trois concentrations du biopesticide.
- Les moyennes d'une même ligne suivies de lettres alphabétiques identiques ne diffèrent pas statistiquement (Test de Duncan entre les différentes concentrations du biopesticide et l'ACMP (p<0.05)).

Nous avons enregistré une mortalité variante entre  $36,7 \pm 3,13$  et  $93,5 \pm 1,89$  après le traitement des pucerons par les différentes concentrations du biopesticide. La comparaison de moyenne par le test de Duncun a démontré que la concentration 4% du biopesticide formulé est très efficace et présente une activité insecticide similaire avec celle de l'ACMP à partir de 24h ( $p < 0,05$ ) (détail en Appendice D).

Le Tableau 3.9 représente les valeurs de la  $DL_{50}$ , leurs intervalles de confiance, le slope ainsi que la  $DL_{90}$  du biopesticide estimées à 12h, 24h, 36h et 48h. La  $DL_{50}$  la plus faible était de 5,18  $\mu\text{L/mL}$ , enregistrée après 48h du traitement, alors que 14,19 $\mu\text{L/mL}$  était la  $DL_{50}$  la plus élevée, enregistrée après 12h du traitement.

Tableau 3.9 : Paramètres toxicologiques du biopesticide contre *A. fabae* au fil du temps

Temps	ER	R <sup>2</sup>	DL <sub>50</sub>	IC DL <sub>50</sub>	DL <sub>90</sub>	S
Après 12 h	$Y = 1,664x + 3,083$	0,916	14,19	11,39 – 17,69	83,61	3,96
Après 24 h	$Y = 1,678x + 3,327$	0,962	9,93	7,98 – 12,35	57,65	3,91
Après 36 h	$Y = 1,617x + 3,627$	0,995	7,06	5,63 – 8,86	43,82	4,12
Après 48 h	$Y = 1,707x + 3,780$	1,000	5,18	4,18 – 6,43	29,21	3,82

ER : équation de régression ; DL : dose létale entraînant une mortalité de 50 et 90% ;  
IC : intervalle de confiance 95% ; S : slope

Les résultats obtenus montrent une diminution des  $DL_{50}$  et  $DL_{90}$  du biopesticide au fil du temps. Cela indique que l'efficacité du biopesticide contre *A. fabae* augmente avec la durée d'exposition.

D'après ces résultats obtenus et ceux de l'activité aphicide de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae* (Tableau 3.7), nous remarquons que la formulation du biopesticide à base de l'HE de *P. aquilinum* à différentes concentrations est plus efficace que la dilution de l'HE dans l'eau physiologique additionnée du Tween 80.

La figure 3.6 illustre la comparaison de l'efficacité des traitements, à savoir le biopesticide et l'HE de *P. aquilinum* à différentes concentrations en fonction du temps d'exposition. La comparaison de moyenne par le test de Duncan indique que la concentration 4% du biopesticide est la plus efficace au fil du temps et que l'HE à 4% présente une activité comparable avec celle du biopesticide à 2% à partir de 36h (Appendice D).

Selon Carlisle et Rathburn, une formulation peut améliorer l'efficacité insecticide du bioproduit [255]. Les adjuvants ajoutés à la formulation préparé ont augmenté l'efficacité de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae* [89] [90].

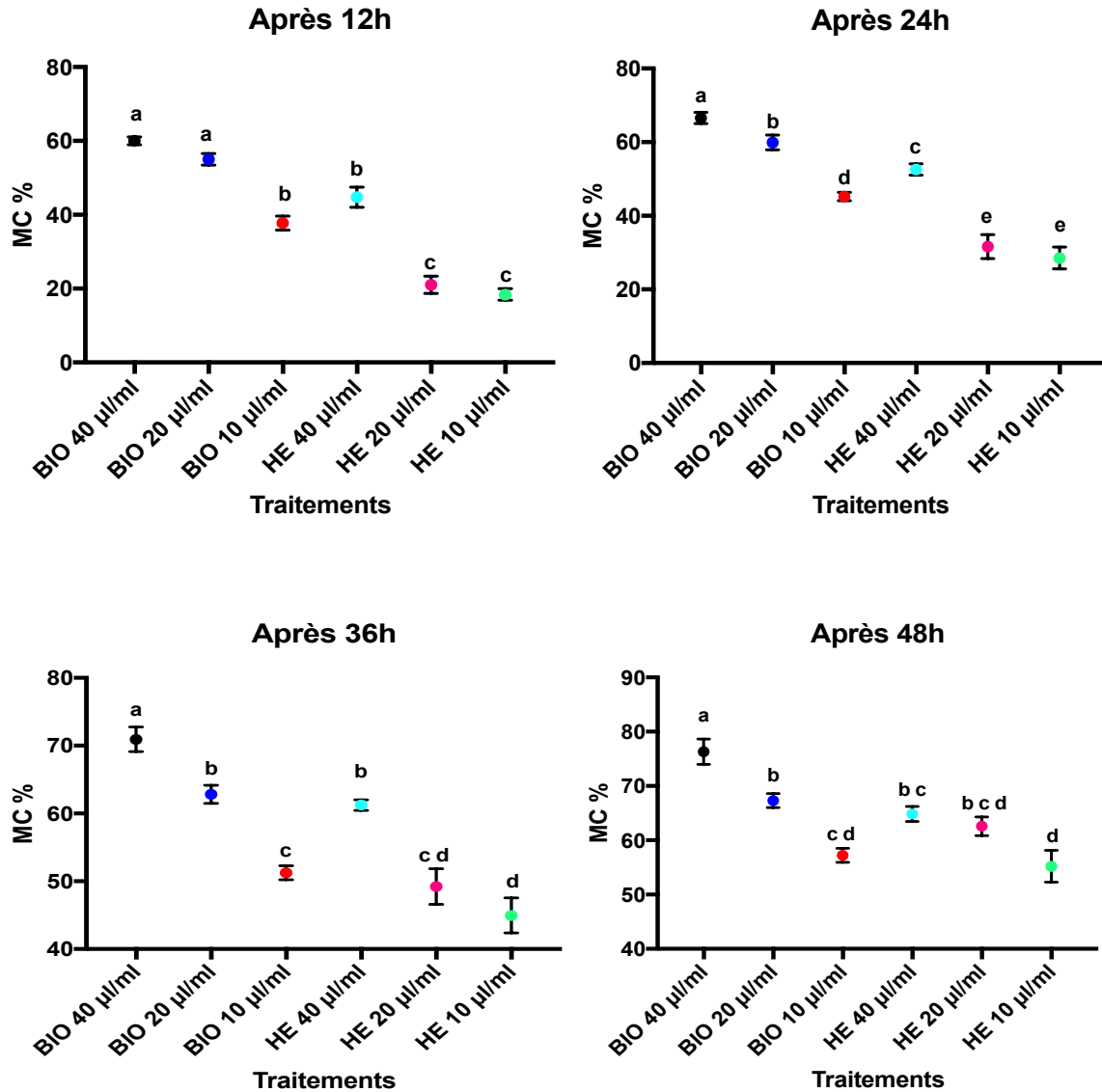


Figure 3.6 : Comparaison de l'efficacité aphicide du biopesticide et l'HE de *P. aquilinum* au fil du temps contre *A. fabae*

Les valeurs de la mortalité corrigée sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM. Les lettres alphabétiques identiques ne diffèrent pas statistiquement (Test de Duncan entre les différentes concentrations du biopesticide et l'ACMP ( $p < 0.05$ )).

### 3.5. Toxicité aiguë

Le comportement et les symptômes, la variation du poids corporel et du poids relatif des organes ainsi que les résultats de l'étude histo-pathologique ont permis de mettre en évidence les conséquences des traitements par voie orale de l'HE de *P. aquilinum* à (300 et 2000 mg/kg) et du biopesticide formulé à 2000 mg/kg sur des souris NMRI femelles.

#### 3.5.1. Comportement et symptômes cliniques

L'essai de toxicité aiguë a permis d'estimer la DL<sub>50</sub> et également de fournir des informations utiles concernant les effets de l'exposition aiguë des animaux à de fortes doses de produits à testés.

La méthode d'essai avec une dose initiale de 300 mg/kg du poids corporel est principalement utilisée dans les cas où aucune information sur les effets toxiques d'un traitement n'est disponible [152]. D'après l'expérimentation réalisée, la dose initiale de 300 mg/kg du poids corporel n'a révélé aucune mortalité chez les animaux et aucun changement n'a été constaté pour le comportement des animaux tels que l'hyperactivité, les étourdissements, les vomissements, la diarrhée, la salivation excessive, la perte de fourrure, l'anxiété, les convulsions et la morbidité. Leur comportement ressemble à celui des animaux témoins.

La dose supérieure suivante de 2000 mg/kg du poids corporel a été choisie. Les souris sont suivies quotidiennement jusqu'au dernier jour de l'expérimentation (14<sup>ème</sup> jour) pour détecter les signes de toxicité ainsi que de la mortalité. Aucun changement du comportement n'est observé et aucune mortalité n'a été enregistrée jusqu'à 14<sup>ème</sup> jour. Nous pouvons conclure que l'HE de *P. aquilinum* est toléré jusqu'à 2000 mg/kg du poids corporel lorsqu'elle est administrée en une seule dose et que la DL<sub>50</sub> par voie orale est estimée donc supérieure à 2000 mg/kg du poids corporel.

À la lumière des résultats obtenus, nous avons testé la toxicité aiguë par voie orale du biopesticide formulé à un niveau de 2000 mg/kg. Cette administration unique n'a pas provoqué de signes de toxicité chez les souris et aucune mortalité n'a été enregistrée chez le groupe témoin (eau physiologique) et le groupe traité. Cela suggère que la DL<sub>50</sub> du biopesticide est supérieure à 2000 mg/kg.

Il en résulte que le biopesticide formulé à 6% ainsi que l'HE de *P. aquilinum* appartiennent à la classe 5 dans le système mondial de classification des substances chimique et considérés comme peu toxiques selon le Guide l'OCDE 423 [152].

### 3.5.2. Évolution pondérale

Nous avons évalué le poids corporel des souris des cinq lots tout au long de la période d'expérimentation, avant l'administration orale et le 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour après l'administration, les données obtenues sont rapportées dans le Tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Poids corporels des souris au cours d'une étude de toxicité aiguë de l'HE et du biopesticide

	Poids corporel (g)			GPR (%)
	0	7 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> jour	
Témoin (eau-tween 20)	29,17 ± 0,21	30,83 ± 0,22	32,17 ± 0,22	10,34 ± 0,99
HE (300mg/kg)	28,67 ± 0,21 ns	30,17 ± 0,31	31,67 ± 0,21 ns	10,47 ± 0,08 ns
HE (2000mg/kg)	28,83 ± 0,40 ns	30,50 ± 0,22	31,83 ± 0,31 ns	10,45 ± 0,99 ns
Témoin (eau)	29,33 ± 0,40	31,50 ± 0,48	32,50 ± 0,31	10,80 ± 0,60
Biopesticide (2000mg/kg)	28,83 ± 0,17 ns	30,33 ± 0,21	32,00 ± 0,36 ns	10,98 ± 1,05 ns

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=6), ns : non significatif (p>0,05)

Nous avons enregistré une augmentation comparable du poids corporel des animaux témoins et traités par l'HE de *P. aquilinum* à 300 et 2000 mg/kg et le biopesticide à 2000 mg/kg (Figures 3.7 et 3.8). Le gain du poids relatif est similaire dans les groupes traités et leurs témoins respectifs (Tableau 3.10) (détail en Appendice



E). L'administration orale de l'HE de *P. aquilinum* et du biopesticide à différentes concentrations n'a eu aucun effet sur la croissance et le développement des souris. Cela indique qu'il n'y a pas eu de perturbation du métabolisme glucidique, protéique ou lipidique [26] [157]. Selon Vaghasiya et ses collaborateurs, le poids pondéral et le poids relatif des organes internes est un indice sensible de la toxicité après une exposition à des substances toxiques [256].

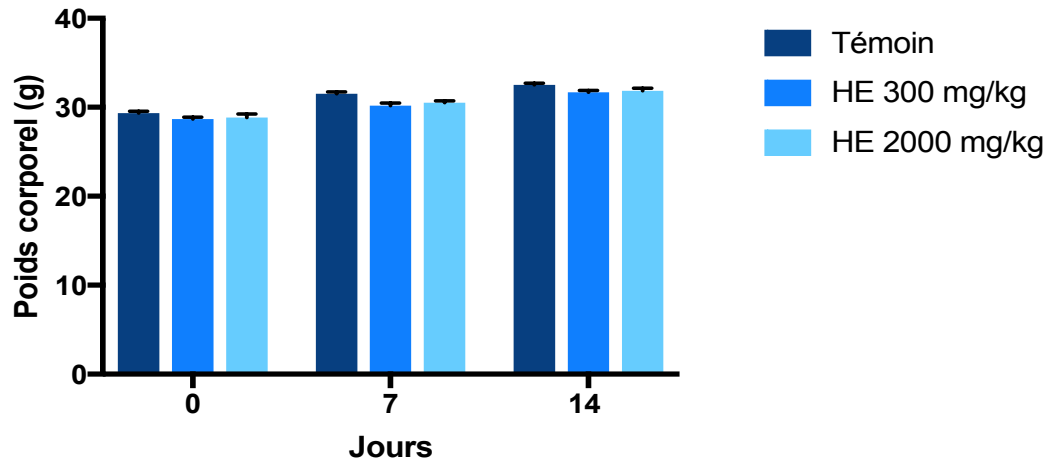


Figure 3.7 : Variation du poids corporel des souris au cours de l'évaluation de la toxicité aiguë de l'HE de *P. aquilinum* (moyenne  $\pm$  SEM)

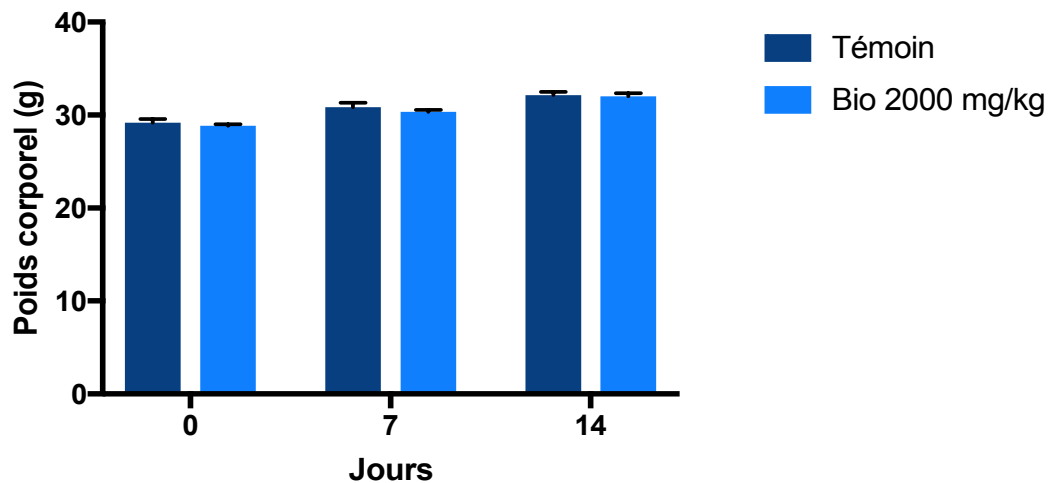


Figure 3.8 : Variation du poids corporel des souris au cours de l'évaluation de la toxicité aiguë du biopesticide formulé (moyenne  $\pm$  SEM)

### 3.5.3. Évaluation de la quantité de la nourriture et de l'eau consommées

#### 3.5.3.1. Consommation de la nourriture

La détermination de la consommation de la nourriture est importante dans l'étude de la sécurité d'un produit, car un apport adéquat en nutriments est essentiel à l'état physiologique des animaux et à la réponse appropriée au produit testé au lieu d'une fausse réponse due aux conditions nutritionnelles inappropriées [257].

La quantité de la nourriture consommée par les souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* à 300 et 2000 mg/kg et le biopesticide formulé à 2000 mg/kg, est respectivement représentée dans les Figures 3.9 et 3.10.

La consommation de nourriture journalière par les souris dans les groupes traités par l'HE de *P. aquilinum* et le biopesticide et leurs témoins respectifs était presque identique et aucun changement significatif, n'est enregistré ( $p > 0,05$ ) (détail en Appendice E). Ceci révèle que ces traitements n'ont pas affecté les processus métaboliques de base des animaux [258].

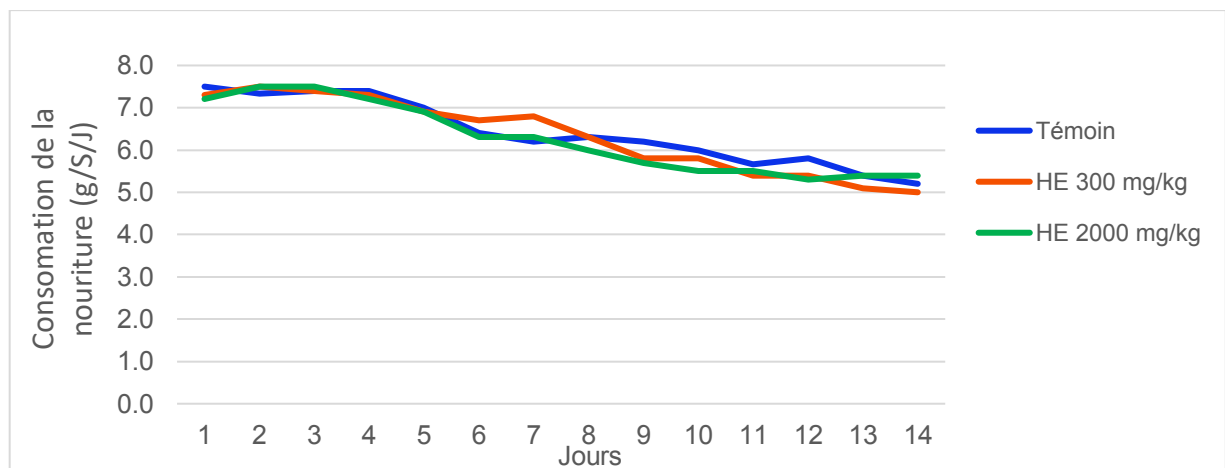


Figure 3.9 : Évaluation de la quantité de la nourriture consommée chez les souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* et les témoins

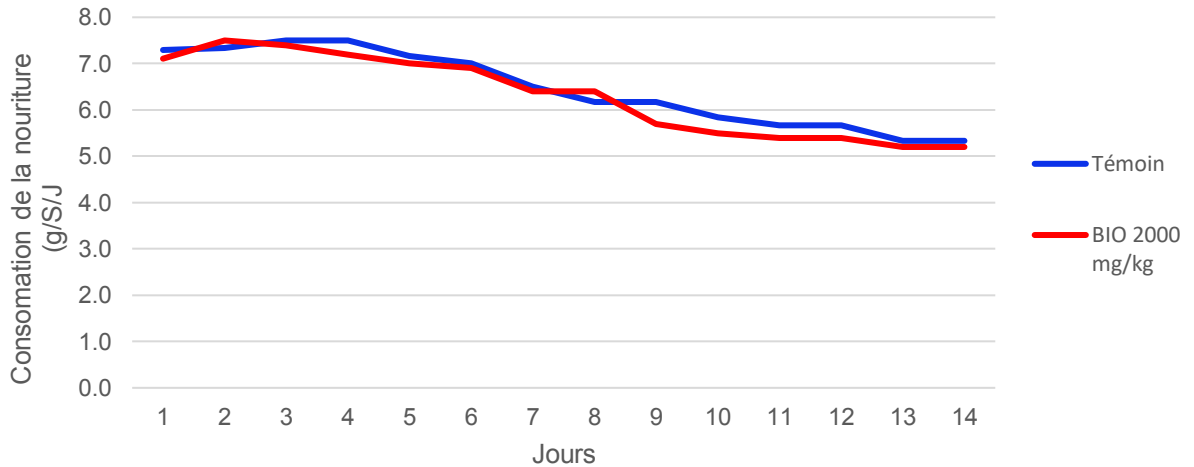


Figure 3.10 : Évaluation de la quantité de la nourriture consommée chez les souris traitées par le biopesticide et les témoins

### 3.5.3.2. Consommation de l'eau

Le volume d'eau consommé par les souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* à 300 et 2000 mg/kg et le biopesticide formulé à 2000 mg/kg est représenté dans les Figures 3.11 et 3.112

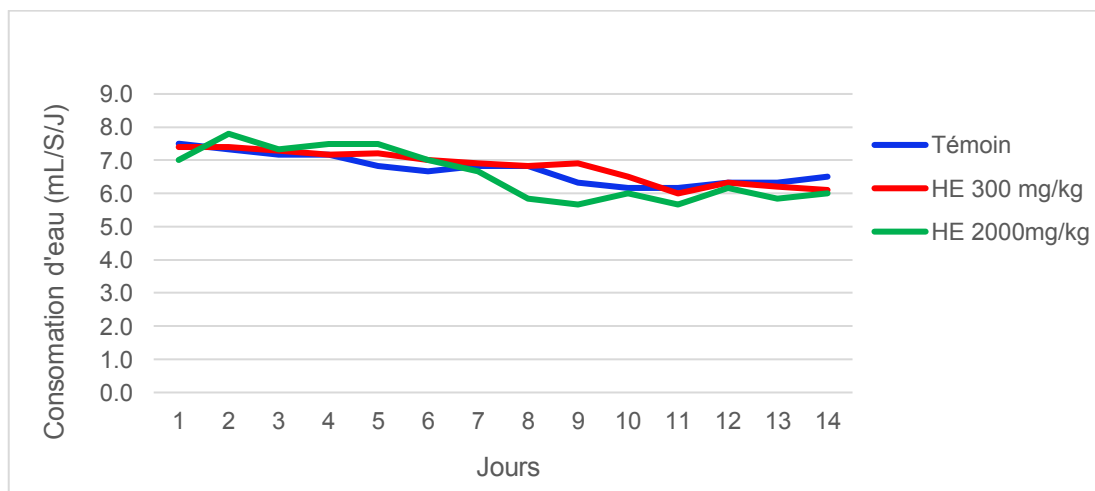


Figure 3.11 : Évaluation du volume d'eau consommée chez les souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* et les témoins

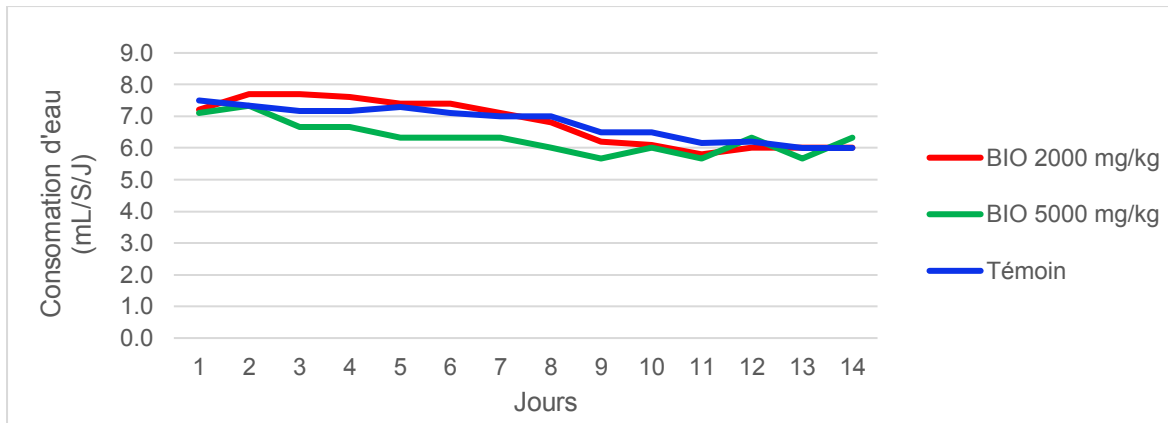


Figure 3.12 : Évaluation du volume d'eau consommée chez les souris traitées par le biopesticide et les témoins

La consommation de l'eau chez les souris femelles témoins et traités par le biopesticide à 2000 mg/kg était presque identique (Figure 3.12). Tandis que chez les souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* à 300 et 2000 mg/kg, cette consommation variait légèrement avec celle des témoins (Figure 3.11). Cependant, ces différences n'étaient pas significatives ( $p > 0,05$ ) (détail en Appendice E).

#### 3.5.4. Poids absolu et relatif des organes

Après le sacrifice des souris et la pesé des organes (foie, reins, poumons, cœur et rate), nous avons calculé le poids relatif de chaque organe (%). Les résultats obtenus sont illustrés dans les Figures 3.13 et 3.14. Le tableau de la variation des poids absolus et relatifs des organes des souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* et le biopesticide et les témoins relatifs est représenté dans l'Appendice E.

Le poids absolu et relatif des organes, à savoir le foie, les reins, les poumons, la rate et le cœur des souris femelles traitées par l'HE de *P. aquilinum* et le biopesticide ont montré une tendance similaire à ceux de leurs témoins respectifs et aucune différence significatives n'est enregistrée ( $p > 0,05$ ) (Figures 3.13 et 3.14).

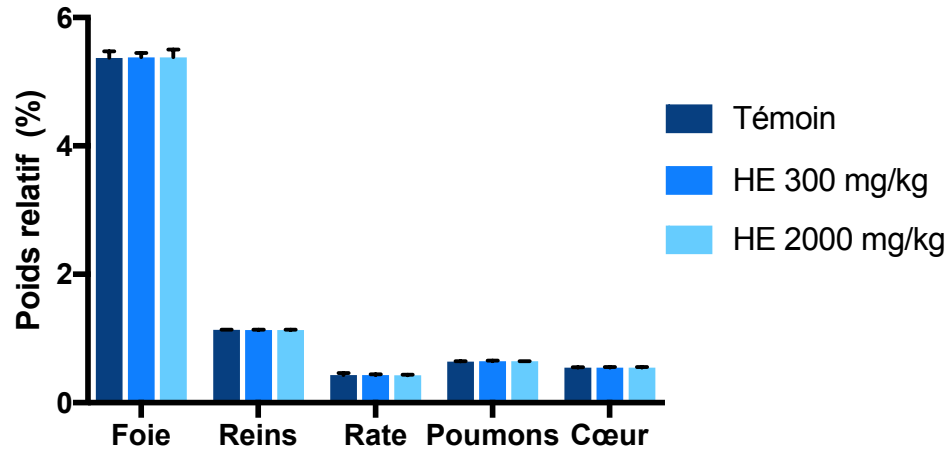


Figure 3.13 : Variation du poids relatif des organes des souris traité par l'HE du *P. aquilinum* et les témoins (moyenne  $\pm$  SEM)

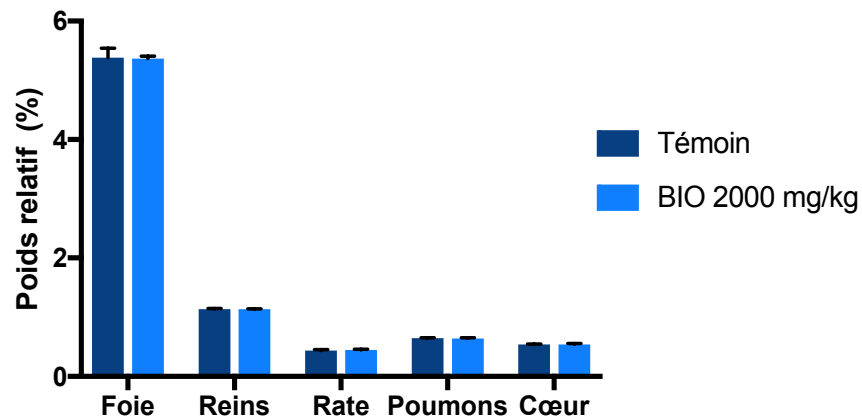


Figure 3.14 : Variation du poids relatif des organes des souris traité par le biopesticide et les témoins (moyenne  $\pm$  SEM)

L'administration de l'HE de *P. aquilinum* à 300 et à 2000 mg/kg ainsi que le biopesticide à 2000 mg/kg n'a pas affecté le poids relatif des organes des souris. Ce poids est un indice important de l'état physiologique et pathologique chez l'animal. Il est fondamental pour déterminer si l'organe a été exposé à une blessure ou non. Le cœur, le foie, les reins, la rate et les poumons sont les principaux organes affectés par les réactions métaboliques provoquées par les substances toxiques [259] [256].

### 3.5.5. Étude histo-pathologique

Les coupes histologiques du foie et des reins des souris traitées par l'HE de *P. aquilinum* à 300 et 2000 mg/kg et le biopesticide à 2000 mg/kg ainsi que les groupes témoins respectifs ont été observées dans le but de mettre en évidence les altérations tissulaires provoquées par ces traitements. L'examen macroscopique n'a révélé aucune anomalie. L'observation microscopique du foie et des reins de l'ensemble des souris a montré une architecture normale du tissu hépatique, ainsi qu'un aspect normal des glomérules et des tubules des reins (Figure 3.15).

L'évaluation histopathologique a indiqué que l'HE de *P. aquilinum* et le biopesticide formulé n'ont aucun effet néfaste sur la morphologie des tissus. Par conséquent, nous pouvons conclure que les doses testées de l'HE et du biopesticide n'ont provoqué aucun effet toxique chez les souris NMRI femelles.

Ces examens ont confirmé que les traitements testés ne causaient aucun dommage tissulaire. Les organes internes n'ont révélé aucune anomalie pathologique par rapport au contrôle. Par conséquent, les résultats suggèrent que l'HE de *P. aquilinum* et le biopesticide formulé ne sont pas toxiques après une exposition aiguë.

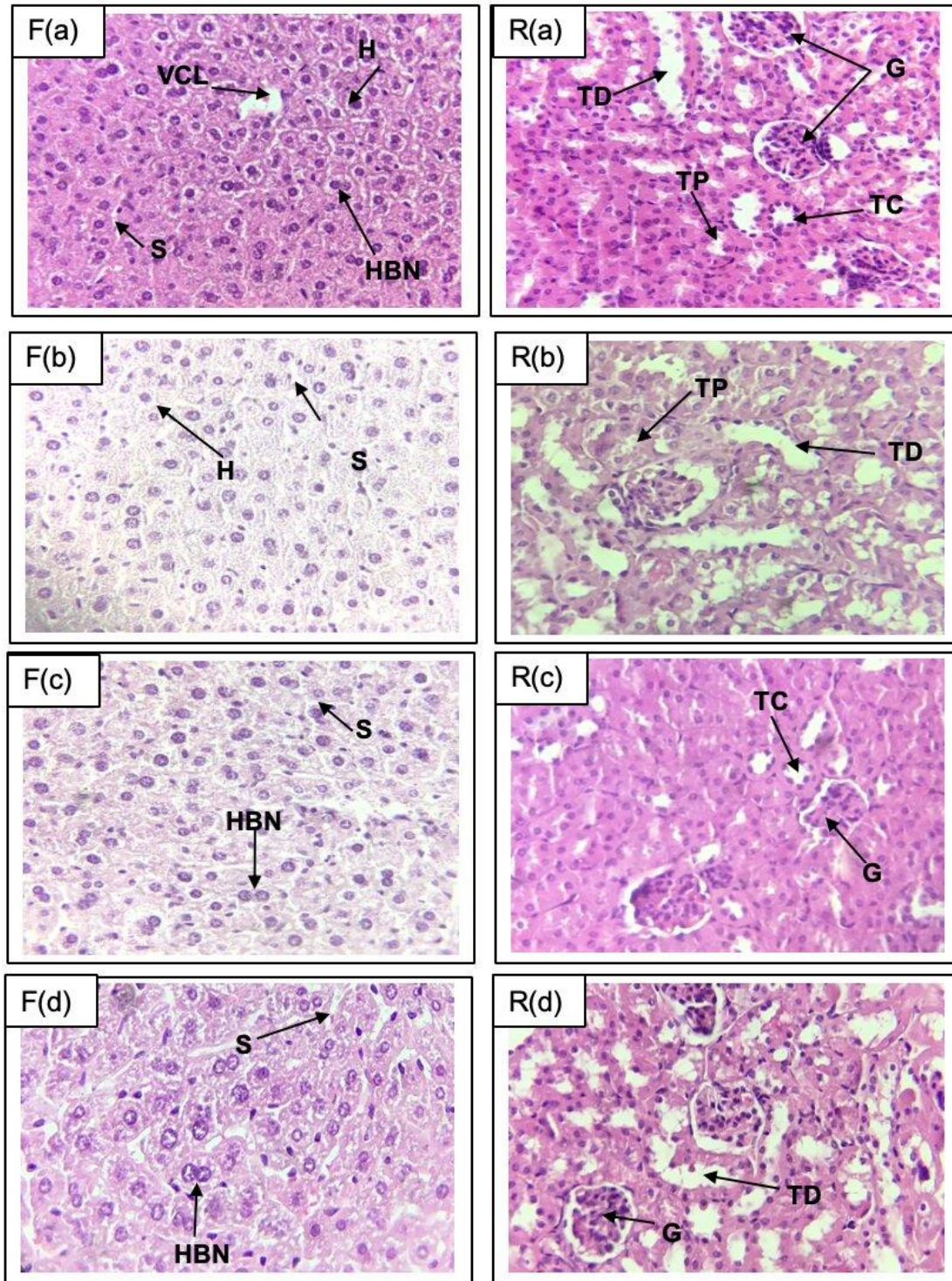


Figure 3.15 : Étude histologique du foie (F) et des reins (R) des souris: a) témoin (Eau-Tween); b) HE 2 000 mg/kg; c) Témoin (Eau) et d) Biopesticide 2000 mg/kg (H.E, GrX40)

VCL : veine centrolobulaire, HBN : hépatocyte binucléé, H : hépatocyte, S : sinusoïde, G : glomérule, TD : tubule distal, TP : tubule proximal, TC : tube collecteur



### 3.6. Toxicité subaiguë

Les données cliniques de la toxicité aiguë sont limitées, car des effets toxiques cumulatifs peuvent se produire à de très faibles doses. Par conséquent, l'administration répétée d'un produit est généralement utile pour évaluer sa toxicité [260].

Le biopesticide formulé à 6% et l'HE de *P. aquilinum* présentent une  $DL_{50} > 2000$  mg/kg du poids corporel. Pour cela, nous avons évalué la toxicité subaiguë de cette préparation à trois doses décroissantes à savoir, 400, 200 et 100 mg/kg du poids corporel après administration répétée pendant 28 jours.

En parallèle, nous avons évalué la toxicité subaiguë de l'ACMP à trois doses, à savoir 1/4, 1/8 et 1/16 de la  $DL_{50}$ . La  $DL_{50}$  de ce pesticide est de 198 mg/kg et 184 mg/kg respectivement chez les souris mâles et femelles.

Les résultats de l'étude de la toxicité subaiguë touchent:

- Le comportement des souris ;
- L'évaluation de la quantité de la nourriture et le volume d'eau consommées ;
- L'évolution du poids corporel des animaux ;
- L'évolution du poids relatif des organes ;
- L'analyse des paramètres hématologiques ;
- L'analyse des paramètres biochimiques ;
- L'examen histo-pathologique du foie et des reins des souris sacrifiées.

#### 3.6.1. Comportement des souris

Durant toute la période expérimentale, l'administration de différentes doses du biopesticide (400, 200 et 100 mg/kg) et de l'ACMP (1/4, 1/8 et 1/16 de la  $DL_{50}$ ), n'a montré aucun signe de toxicité sur le comportement général des souris mâles et femelles ou de mortalité pendant les 28 et les 42 jours consécutifs des traitements.



### 3.6.2. Évaluation de la quantité de la nourriture et du volume d'eau consommées

Les Figures 3.16 et 3.17 résument les effets des traitements subaigus du biopesticide et de l'ACMP sur les apports alimentaires et hydriques. L'analyse de la variance a mis en évidence des modifications significative ( $p < 0,05$ ) dose-dépendante de la consommation de la nourriture et de l'eau chez les souris traitées par le biopesticide par rapport aux témoins (détail en Appendice E).

En effet, nous avons enregistré une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la quantité de la nourriture consommée par les souris mâles et femelles traitées par la forte et la moyenne dose du biopesticide ainsi que le groupe satellite respectivement à partir de la deuxième et la troisième semaine (Figure 3.16 a). Tandis que le traitement subaigu par la faible dose (BD3), n'a pas entraîné de modifications significatives ( $p > 0,05$ ) de la consommation de la nourriture par rapport à celle des témoins au court de 28 jours.

Le traitement des souris mâles par le biopesticide aux doses BD1M et BD2M a diminué significativement ( $p < 0,05$ ) la consommation hydrique à partir de la première semaine jusqu'au dernier jour des traitements. Tandis que les mâles traités par BD3M, présentent une consommation hydrique comparable à celle des témoins au court de 28 jours (Figure 3.17 a). Nous avons enregistré une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de la consommation hydrique chez les souris femelles traitées par les différentes doses du biopesticide (BD1F, BD2F et BD3F) au cours des deux premières semaines (Figure 3.17 a).

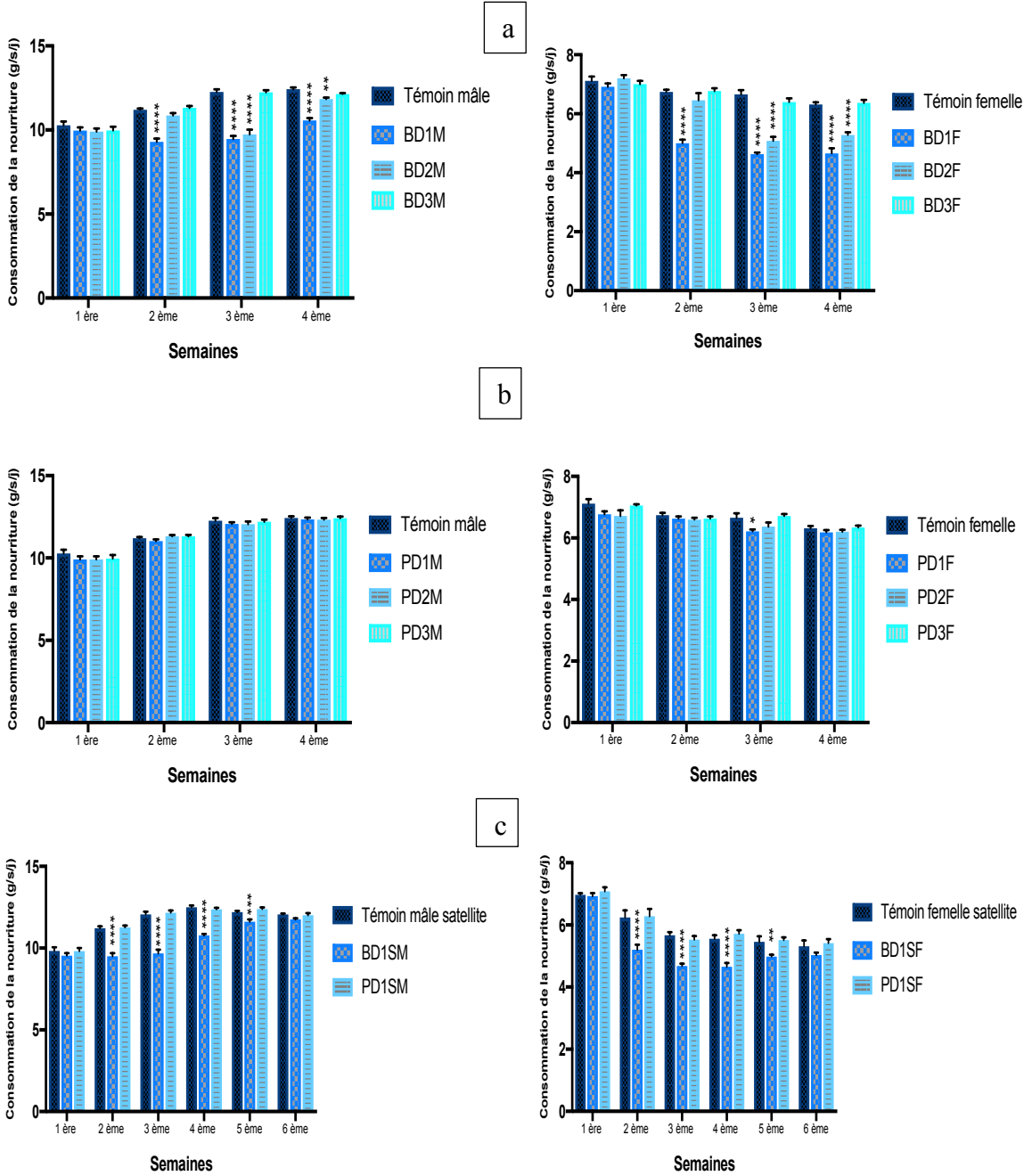


Figure 3.16 : Effet du biopesticide et du pesticide chimique sur la consommation de la nourriture chez les souris traitées (a) : biopesticide (b) : pesticide chimique (c) : groupes satellites .

Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM (n=7 jours). Pour une semaine donnée, la comparaison des moyennes par le test de Dunnett est établie: \*(p< 0,05), \*\*\*(p<0,01), (p<0,001), \*\*\*\*(p<0,0001)

Après 14 jours d'interruption du traitement par le biopesticide, la consommation de la nourriture et de l'eau chez souris du groupe satellite a augmenté. À la 6<sup>ème</sup> semaine, l'analyse statistique a révélé qu'aucune différence significative n'est enregistré pour les consommations hydrique et alimentaire chez les deux sexes par rapport au témoin ( $p > 0,05$ ) (Figures 3.16 c et 3.17 c).

Une étude antérieure a démontré que certains extraits de plantes ont la capacité de réduire la consommation de la nourriture et de l'eau chez les souris [261]. Selon les travaux réalisés par Raza et ses collaborateurs, toute diminution de ces paramètres peut indiquer les effets toxiques de la plante [262].

Parallèlement, nous avons noté que l'administration quotidienne de PD1 et PD2 de l'ACMP pendant 28 jours a modifié la consommation alimentaire chez souris mâles et femelles. Du point de vue statistique, ces traitements n'avaient entraîné aucune différence significative des apports en nourriture à l'exception d'une diminution significative ( $p < 0,05$ ) enregistrée à la 3<sup>ème</sup> semaine chez les souris femelles traitées par PD1F (Figure 3.16 b).

La consommation hydrique chez les souris mâles traitées par les différentes doses a diminué au cours du traitement subaigu par l'ACMP. L'analyse de variance a révélé que ces diminutions sont non significatives, à l'exception de celles enregistrées chez les animaux traités par les doses PD1M et PD3M ( $p < 0,05$ ) (Figure 3.17 b).

Les animaux maintenus en observation 14 jours plus tard sans traitement par l'ACMP, ne présentaient aucune différence significative de la consommation alimentaire et hydrique ( $p > 0,05$ ) par rapport au témoin (Figures 3.16 c et 3.17 c).

Les résultats obtenus sont comparables à ceux trouver par Devan Shakthi et ses collaborateurs, sur la consommation de la nourriture chez les rats traités par l'ACMP à différentes doses [32].

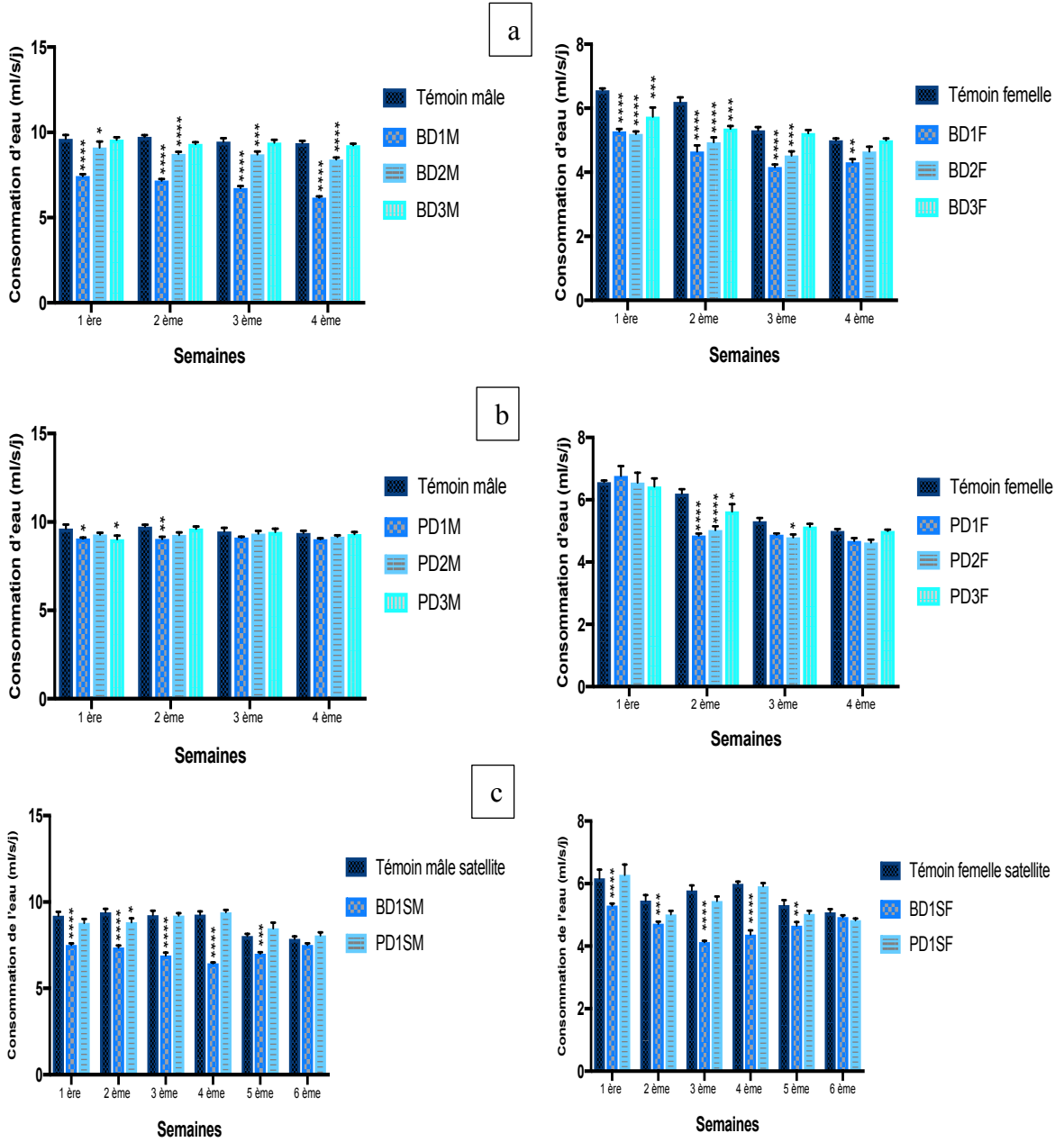


Figure 3.17 : Effet du biopesticide et du pesticide chimique sur la consommation de l'eau chez les souris traitées (a) : biopesticide (b) : pesticide chimique (c) : groupes satellites .

Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM (n=7 jours). Pour une semaine donnée, la comparaison des moyennes par le test de Dunnett est établie: \*(p< 0,05), \*\* (p<0,01), (p<0,001), \*\*\*\*(p<0,0001)

### 3.6.3. Évolution pondérale

Les pesées hebdomadaires, le gain du poids absolu et le gain du poids relatif des souris témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique ainsi que les groupes satellites des deux sexes sont représentés dans les Tableaux 3.11 et 3.12.

Tableau 3 .11 : Poids corporels des souris témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

		Poids corporel (g)					Gain du poids (g)	GPR(%)
		0	7 <sup>ème</sup> jour	14 <sup>ème</sup> jour	21 <sup>ème</sup> jour	28 <sup>ème</sup> jour		
Mâle	Témoin	19,0 ± 0,31	26,8 ± 0,49	31,4 ± 0,51	35,6 ± 0,51	36 ± 0,71	17,0 ± 0,45	89,46 ± 1,67
	BD1 M 400 mg/kg	18,4 ± 0,24 <sup>ns</sup>	25,2 ± 0,20 <sup>ns</sup>	29,4 ± 0,87*	32 ± 0,55****	33,6 ± 0,40**	15,2 ± 0,20	82,63 ± 0,94 *
	BD2 M 200 mg/kg	18,6 ± 0,24 <sup>ns</sup>	26,2 ± 0,37 <sup>ns</sup>	29,8 ± 0,73 <sup>ns</sup>	32,2 ± 0,66****	34 ± 0,32*	15,4 ± 0,24	82,86 ± 1,86 <sup>ns</sup>
	BD3 M 100 mg/kg	19,0 ± 0,32 <sup>ns</sup>	25,8 ± 0,37 <sup>ns</sup>	31 ± 0,45 <sup>ns</sup>	34,6 ± 0,68 <sup>ns</sup>	35 ± 0,55 <sup>ns</sup>	16,0 ± 0,32	84,25 ± 1,58 <sup>ns</sup>
	PD1 M 49,5 mg/kg	19 ± 0,00 <sup>ns</sup>	24,6 ± 0,51**	28 ± 0,48****	30,4 ± 0,6****	29,8 ± 0,37****	9,8 ± 0,20	51,58 ± 1,05****
	PD2 M 24,75 mg/kg	19,4 ± 0,25 <sup>ns</sup>	25,2 ± 0,86 <sup>ns</sup>	29,2 ± 0,58**	31 ± 0,32****	30 ± 0,32****	10,2 ± 0,37	52,58 ± 1,84****
	PD3 M 12,37 mg/kg	19,6 ± 0,25 <sup>ns</sup>	26 ± 0,63 <sup>ns</sup>	31,2 ± 1,11 <sup>ns</sup>	34,4 ± 0,75 <sup>ns</sup>	34,4 ± 0,87 <sup>ns</sup>	14,8 ± 0,66	75,42 ± 2,68****
Femelle	Témoin	24,8 ± 0,20	27,4 ± 0,24	31,2 ± 0,37	32,4 ± 0,6	33,4 ± 0,4	8,6 ± 0,24	34,67 ± 0,84
	BD1 F 400 mg/kg	24,2 ± 0,2 <sup>ns</sup>	27,2 ± 0,37 <sup>ns</sup>	29,4 ± 0,24**	30,4 ± 0,24***	31,2 ± 0,37****	5,8 ± 0,20	28,93 ± 1,34*
	BD2 F 200 mg/kg	24,4 ± 0,24 <sup>ns</sup>	27,4 ± 0,24 <sup>ns</sup>	30 ± 0,32 <sup>ns</sup>	31 ± 0,32*	32 ± 0,32*	7,6 ± 0,24	31,17 ± 1,10 <sup>ns</sup>
	BD3 F 100 mg/kg	24,8 ± 0,2 <sup>ns</sup>	27,4 ± 0,24 <sup>ns</sup>	31 ± 0,45 <sup>ns</sup>	31,8 ± 0,2 <sup>ns</sup>	33 ± 0,32 <sup>ns</sup>	8,2 ± 0,20	33,07 ± 0,78 <sup>ns</sup>
	PD1 F 46 mg/kg	24,8 ± 0,37 <sup>ns</sup>	25,8 ± 0,2**	27,8 ± 0,37****	28,8 ± 0,37****	30 ± 0,32****	2,4 ± 0,24	9,74 ± 1,13****
	PD2 F 23 mg/kg	24,2 ± 0,2 <sup>ns</sup>	26,8 ± 0,37 <sup>ns</sup>	28 ± 0,00****	29,2 ± 0,2****	30,4 ± 0,24****	3,4 ± 0,24	14,07 ± 1,06****
	PD3 F 11,5 mg/kg	25 ± 0,00 <sup>ns</sup>	27,6 ± 0,4 <sup>ns</sup>	30 ± 0,70 <sup>ns</sup>	30,6 ± 0,4**	32,4 ± 0,51 <sup>ns</sup>	7,4 ± 0,51	29,60 ± 2,03*

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5) ; ns : non significatif ANOVA/ test de Dunnett : (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\*\*(p<0,01), \*\*\*\*(p<0,001), \*\*\*\*\*(p<0,0001)

Tableau 3.12 : Poids corporels des souris des groupes satellites témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

	Poids corporel (g)					
	Mâle			Femelle		
	Témoin S	BD1SM	PD1SM	Témoin S	BD1SF	PD1SF
0	24,0 ± 0,32	23,6 ± 0,24 <sup>ns</sup>	24,0 ± 0,32 <sup>ns</sup>	25,4 ± 0,24	25,0 ± 0,32 <sup>ns</sup>	24,6 ± 0,24 <sup>ns</sup>
7 <sup>ème</sup> jour	29,2 ± 0,37	28,8 ± 0,20 <sup>ns</sup>	27,4 ± 0,24 <sup>*</sup>	29,2 ± 0,37	28,0 ± 0,32 <sup>ns</sup>	26,6 ± 0,40 <sup>**</sup>
14 <sup>ème</sup> jour	32,2 ± 0,66	30,4 ± 0,24 <sup>*</sup>	28,2 ± 0,37 <sup>****</sup>	31,4 ± 0,51	28,8 ± 0,37 <sup>**</sup>	27,8 ± 0,37 <sup>****</sup>
21 <sup>ème</sup> jour	33,4 ± 0,68	31,0 ± 0,32 <sup>**</sup>	29,4 ± 0,55 <sup>****</sup>	32,8 ± 0,97	30,4 ± 0,24 <sup>**</sup>	29,0 ± 0,32 <sup>****</sup>
28 <sup>ème</sup> jour	35,2 ± 0,37	33,0 ± 0,71 <sup>**</sup>	28,6 ± 0,55 <sup>****</sup>	34,2 ± 0,73	31,0 ± 0,32 <sup>***</sup>	29,8 ± 0,37 <sup>****</sup>
35 <sup>ème</sup> jour	36,2 ± 0,37	34,0 ± 0,45 <sup>**</sup>	31,0 ± 0,55 <sup>****</sup>	34,6 ± 0,87	32,0 ± 0,31 <sup>**</sup>	30,6 ± 0,40 <sup>****</sup>
42 <sup>ème</sup> jour	37,2 ± 0,37	35,6 ± 0,51 <sup>*</sup>	33,4 ± 0,51 <sup>****</sup>	35,4 ± 0,87	33,2 ± 0,37 <sup>**</sup>	32,0 ± 0,31 <sup>****</sup>
Gain du poids (g)	13,2 ± 0,20	12,0 ± 0,32	9,4 ± 0,24	10,0 ± 0,70	8,2 ± 0,20	7,4 ± 0,24
GPR (%)	55,03 ± 1,09	50,83 ± 1,08 <sup>*</sup>	39,16 ± 0,79 <sup>****</sup>	39,32 ± 2,59	32,82 ± 0,89 <sup>*</sup>	30,10 ± 1,01 <sup>**</sup>

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5) ; ns : non significatif ANOVA/ test de Dunnett : (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\*(p<0,01), (p<0,001), \*\*\*\*(p<0,0001)

Le poids corporel des animaux traités par le biopesticide a augmenté de manière dose dépendante par rapport au poids initial (Figure 3.18). Le poids corporel des souris témoins mâles et femelles est passé respectivement de 19,0 ± 0,31 à 36 ± 0,71g et de 24,8 ± 0,20 à 33,4 ± 0,4 g. Toutefois, une augmentation moins importante du poids corporel a été observée chez les groupes traités par BD1 et BD2 chez les deux sexes. Par comparaison statistique avec le groupe témoin, le poids moyen obtenu après 28 jours chez les souris mâles et femelles traitées par ces doses est significativement plus faible (p <0,05).

En outre, les souris traitées par les différentes doses du biopesticide, à savoir BD1, BD2 et BD3, présentent un gain du poids relatif respectivement de 82,63, 82,86 et 84,25 % chez les mâles et 28,93, 31,17 et 33,07 % chez les femelles. Ces valeurs sont inférieures à ceux des lots mâle et femelle du groupe témoin respectivement de 89,46 et 34,67 %. En revanche, le gain du poids relatif n'a pas été affecté statistiquement que par BD1(400 mg/kg) par rapport au groupe témoin (Tableau 3.11). Tandis que le gain du poids relatif des souris qui ont reçu les doses moyenne et faible (200 et 100 mg/kg), n'était pas significativement différent de celui des souris témoins ( $p > 0,05$ ) (détail en Appendice E).

En parallèle, les pesés hebdomadaires des souris mâles et femelles du groupe satellite traité par la forte dose du biopesticide (BD1S), ont montrées une évolution pondérale comparable à celle des témoins jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour. La comparaison des moyennes par le test de Dunnett a révélé, qu'à partir de la deuxième semaine, jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour, une différence significative ( $p < 0,05$ ) du poids corporel et du gain de poids relatif chez les souris mâle et femelle traitées.

À partir de ces résultats et de ceux de l'évaluation de la consommation alimentaire, nous remarquons que les souris traitées par BD1 consomment moins de nourriture que les témoins et présentent une diminution de leurs poids corporels. Tandis que les groupes traités par la moyenne et la faible dose ont gagné un poids similaire à celui des témoins (Tableau 3.11). Il existe donc une corrélation entre la dose du biopesticide administrée et la consommation de nourriture ainsi que le gain du poids corporel. Ces résultats suggèrent que la forte dose du biopesticide formulé à 6% de l'HE de *P. aquilinum*, exerce un faible effet anorexique.

Des travaux antérieurs ont montré que les rats nourris par des préparation à base de l'HE du *Nigella sativa* (4% et 0,3%) pendant 8 semaines, consomment moins de nourriture et ils ont pris moins du poids que le groupe témoin ce qui a montré un faible effet anorexique du traitement [263].

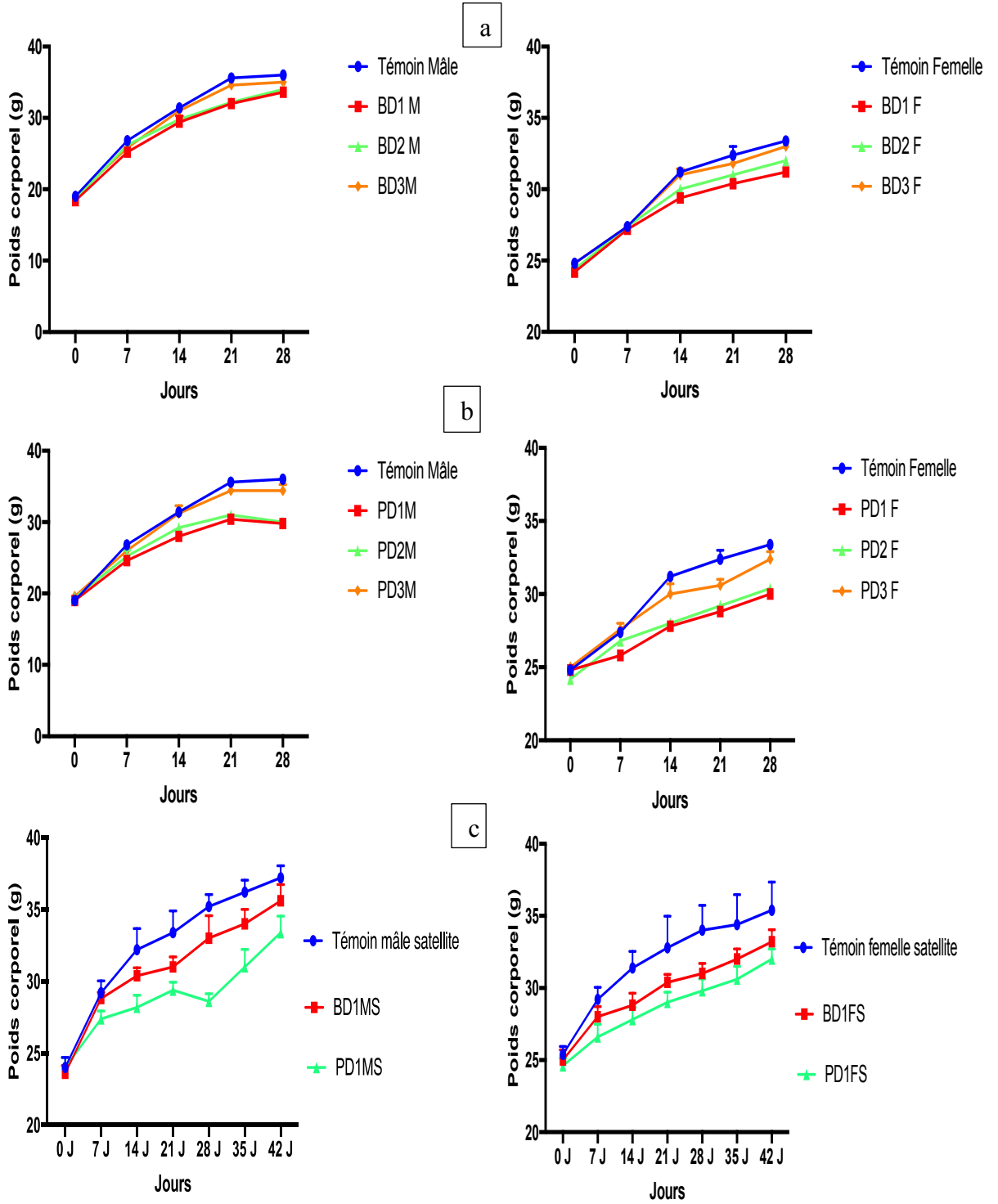


Figure 3.18 : Évolution du poids corporel des souris en fonction du sexe (mâles et femelles) et des doses des traitements a : biopesticide, b : pesticide chimique, c : groupes satellites .

Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM (n=5)



La variation du poids moyen des souris mâles et femelles au cours des quatre semaines du traitement par la plus forte dose d'ACMP (PD1) était significativement plus faible que celui des souris témoins ( $p < 0,05$ ) à partir du 7<sup>ème</sup> jour (Tableau 3.11). En parallèle, nous avons noté une différence significative ( $p < 0,05$ ) du poids corporel des souris mâles et femelles du groupe satellite par rapport au groupe témoin à partir du 7<sup>ème</sup> jour jusqu'au 42<sup>ème</sup> jour (Tableau 3.12) (Figure 3.18).

Les souris mâles et femelles traitées par PD2 présentent un poids corporel moyen similaire à celui des témoins jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour. À partir de la deuxième semaine, ces animaux ont montré une croissance pondérale significativement plus faible que celle du témoin ( $p < 0,05$ ). Tandis qu'aucune différence significative de la croissance pondérale des souris traités par PD3 n'est enregistrée au cours des 28 jours d'expérimentation. En revanche, l'analyse de variance et le test de comparaison des moyennes ont révélé une différence significative du gain du poids relatif chez les animaux des trois groupes traités par les différentes doses, à savoir PD1, PD2 et PD3 ( $p < 0,05$ ) (Tableau 3.11).

Le poids corporel moyen des souris mâles traitées par les doses PD1 et PD2 ainsi que celui du lot satellite augmente progressivement jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour (PD1M :  $30,4 \pm 0,6$  , PD2M :  $31 \pm 0,32$ , PD1SM :  $29,4 \pm 0,55$  ) puis diminue jusqu'au 28<sup>ème</sup> jour (PD1M :  $29,8 \pm 0,37$ , PD2M :  $30 \pm 0,32$ , PD1SM :  $28,6 \pm 0,55$ ). En revanche, l'arrêt du traitement par l'ACMP pendant deux semaines a montré une augmentation du poids corporel des souris mais la différence reste significative ( $p < 0,05$ ).

Les résultats obtenus de la réduction du poids corporel chez les souris mâles traitées par l'ACMP en fonction de la dose, sont en corrélation avec les travaux réalisés chez des souris traitées par l'ACMP respectivement pendant 28 et 35 jours [35] [126]. Une autre étude effectuée sur des rats mâles a montré une diminution significative du gain du poids corporel à une dose de 1/5 de la  $DL_{50}$  de l'ACMP [103]. Cette diminution peut être traduite par la perturbation du métabolisme glucidique, protéique ou lipidique [26] [157]. En règle générale, les modifications et la réduction du gain pondéral sont un indice simple et sensible de la toxicité après une exposition à des substances toxiques [262] [256]

#### 3.6.4. Poids absolu et relatif des organes

Après l'examen macroscopique des différents organes prélevés des souris témoins et traitées par les différentes doses du biopesticide et de l'ACMP, nous avons observé un aspect-couleur normale des organes. Les valeurs du poids absolu et relatif du foie, des reins, des poumons, de la rate et du cœur des souris mâles et femelles sont représentées respectivement dans les Tableaux 3.13 et 3.14.

Le traitement des souris par le biopesticide a entraîné une diminution et une augmentation dose-dépendante respectivement du poids relatif des reins et de la rate (Figure 3.19, Tableaux 3.13 et 3.14). Du point de vue statistique, l'administration orale du biopesticide formulé pendant 28 jours à différentes doses, à savoir BD1, BD2 et BD3 ainsi que chez le groupe satellite n'a entraîné aucun changement significatif ( $p > 0,05$ ) du poids relatif des organes (foie, reins, cœur, poumon et rate) (détail en Appendice E).

Bien que le poids corporel a progressivement augmenté chez les groupes traités par le biopesticide, il n'y a pas eu de changements significatifs du poids relatif des organes par rapport au témoin ce qui indique que le biopesticide présente des niveaux de toxicité négligeables sur la croissance des animaux.

L'analyse du poids des organes dans les études toxicologiques est un critère d'évaluation important pour l'identification des effets potentiellement nocifs des produits chimiques [264] [265]. Le poids des organes peut être l'indicateur le plus sensible d'un effet exercé par une substance testée sur un cobaye aux laboratoires. Des différences significatives de poids entre les animaux traités et témoins peuvent être observé en absence de tout changement morphologique [264].

Tableau 3.13 : Poids absolus et relatifs des organes des souris mâles traitées, témoins et satellites de l'étude de la toxicité subaiguë

	Reins		Foie		Rate		Poumons		Cœur	
	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO
Témoïn	0,461 ± 0,011	1,417 ± 0,015	1,485 ± 0,025	4,564 ± 0,073	0,124 ± 0,008	0,381 ± 0,015	0,203 ± 0,010	0,623 ± 0,021	0,153 ± 0,010	0,469 ± 0,014
BD1 M	0,369 ± 0,017	1,285 ± 0,056	1,329 ± 0,080	4,618 ± 0,251	0,136 ± 0,026	0,473 ± 0,094	0,184 ± 0,011	0,641 ± 0,037	0,133 ± 0,004	0,460 ± 0,005
BD2 M	0,390 ± 0,037	1,288 ± 0,085	1,343 ± 0,07	4,467 ± 0,112	0,125 ± 0,006	0,417 ± 0,011	0,187 ± 0,016	0,619 ± 0,040	0,139 ± 0,005	0,464 ± 0,023
BD3 M	0,440 ± 0,028	1,366 ± 0,057	1,431 ± 0,10	4,427 ± 0,148	0,131 ± 0,014	0,404 ± 0,026	0,212 ± 0,01	0,663 ± 0,036	0,149 ± 0,012	0,460 ± 0,011
PD1 M	0,434 ± 0,009	1,392 ± 0,012	1,428 ± 0,038	5,176 ± 0,131 ****	0,155 ± 0,011	0,499 ± 0,023	0,199 ± 0,006	0,646 ± 0,015	0,145 ± 0,010	0,471 ± 0,027
PD2 M	0,374 ± 0,009	1,381 ± 0,044	1,419 ± 0,056	5,285 ± 0,126 ****	0,102 ± 0,006	0,372 ± 0,010	0,174 ± 0,005	0,639 ± 0,007	0,126 ± 0,006	0,461 ± 0,009
PD3 M	0,463 ± 0,012	1,412 ± 0,007	1,491 ± 0,062	4,572 ± 0,141	0,119 ± 0,008	0,367 ± 0,028	0,206 ± 0,005	0,632 ± 0,006	0,154 ± 0,008	0,474 ± 0,031
Témoïn Satellite	0,451 ± 0,012	1,429 ± 0,009	1,507 ± 0,034	4,776 ± 0,103	0,114 ± 0,004	0,360 ± 0,012	0,206 ± 0,006	0,653 ± 0,027	0,146 ± 0,007	0,462 ± 0,012
BD1SM	0,445 ± 0,012	1,400 ± 0,012	1,491 ± 0,030	4,694 ± 0,100	0,127 ± 0,009	0,400 ± 0,020	0,214 ± 0,009	0,675 ± 0,028	0,149 ± 0,006	0,486 ± 0,009
PD1SM	0,439 ± 0,022	1,435 ± 0,060	1,474 ± 0,071	4,808 ± 0,134	0,136 ± 0,012	0,444 ± 0,036	0,224 ± 0,005	0,734 ± 0,016	0,143 ± 0,007	0,465 ± 0,015

PAO (g) : poids absolu de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)  
 PRO (%) : poids relatif de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)  
 ANOVA/ test de Dunnett : (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\*(p<0,01), (p<0,001), \*\*\*\*(p<0,0001)

Tableau 3.14 : Poids absolus et relatifs des organes des souris femelles traitées, témoins et satellites de l'étude de la toxicité subaiguë

	Reins		Foie		Rate		Poumons		Cœur	
	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO
Témoin	0,334 ± 0,011	1,050 ± 0,017	1,446 ± 0,052	4,557 ± 0,185	0,135 ± 0,011	0,423 ± 0,025	0,209 ± 0,005	0,658 ± 0,009	0,166 ± 0,007	0,522 ± 0,013
BD1 F	0,254 ± 0,015	1,015 ± 0,045	1,123 ± 0,050	4,489 ± 0,062	0,120 ± 0,005	0,481 ± 0,007	0,186 ± 0,007	0,745 ± 0,023	0,127 ± 0,009	0,505 ± 0,018
BD2 F	0,276 ± 0,016	1,037 ± 0,049	1,205 ± 0,035	4,529 ± 0,072	0,120 ± 0,012	0,432 ± 0,041	0,187 ± 0,010	0,705 ± 0,037	0,135 ± 0,005	0,509 ± 0,012
BD3 F	0,299 ± 0,026	1,035 ± 0,070	1,322 ± 0,063	4,585 ± 0,015	0,130 ± 0,007	0,453 ± 0,015	0,175 ± 0,127	0,612 ± 0,051	0,145 ± 0,004	0,506 ± 0,018
PD1 F	0,360 ± 0,016	1,199 ± 0,040	1,471 ± 0,111	4,880 ± 0,258 **	0,155 ± 0,011	0,514 ± 0,029	0,204 ± 0,007	0,678 ± 0,018	0,166 ± 0,005	0,553 ± 0,010
PD2 F	0,301 ± 0,010	1,071 ± 0,041	1,226 ± 0,031	4,520 ± 0,080	0,104 ± 0,002	0,372 ± 0,010	0,183 ± 0,007	0,654 ± 0,019	0,149 ± 0,006	0,532 ± 0,022
PD3 F	0,311 ± 0,018	1,031 ± 0,079	1,389 ± 0,019	4,584 ± 0,148	0,119 ± 0,008	0,395 ± 0,034	0,214 ± 0,010	0,705 ± 0,034	0,154 ± 0,008	0,508 ± 0,033
Témoin Satellite	0,340 ± 0,013	1,028 ± 0,019	1,501 ± 0,089	4,537 ± 0,183	0,144 ± 0,015	0,436 ± 0,040	0,200 ± 0,010	0,606 ± 0,032	0,158 ± 0,011	0,476 ± 0,022
BD1SF	0,317 ± 0,010	1,015 ± 0,036	1,411 ± 0,036	4,519 ± 0,071	0,142 ± 0,008	0,454 ± 0,023	0,203 ± 0,011	0,651 ± 0,036	0,147 ± 0,003	0,473 ± 0,012
PD1SF	0,321 ± 0,009	1,044 ± 0,024	1,400 ± 0,029	4,543 ± 0,057	0,133 ± 0,006	0,433 ± 0,018	0,220 ± 0,005	0,713 ± 0,009	0,145 ± 0,002	0,471 ± 0,009

PAO (g) : poids absolu de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

PRO (%) : poids relatif de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

ANOVA/ test de Dunnett : (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001), \*\*\*\* (p<0,0001)

Les souris mâles et femelles traitées par PD1 ainsi que les mâles traités par PD2 ont montré une augmentation significative du poids relatif du foie par rapport à ceux des témoins (Figure 3.19 b). Nos résultats corroborent les travaux de Chakroun et ses collaborateurs, qui ont rapporté un changement significatif du poids relatif du foie des rats mâles ayant reçu 1/5 de la  $DL_{50}$  de l'ACMP [103]. De même, une augmentation significative du poids relatif du foie des rats mâles et femelles traitées par l'ACMP à 110 mg/kg du poids corporel pendant 90 jours [32]. Une étude antérieure a démontré des résultats similaires après l'administration de 20 mg / kg / jour d'imidaclopride (un néonicotinoïde) chez les rats [266]. Les modifications du poids relatif des organes refléteraient la toxicité de la substance [267].

D'après les résultats mentionnés dans les Tableaux 3.13 et 3.14, nous remarquons que le poids relatif de la rate chez les souris traitées par PD1 a augmenté par rapport à celui du témoin chez les souris mâles et femelle respectivement de ( $0,499 \pm 0,023 - 0,381 \pm 0,015$  %) et de ( $0,514 \pm 0,029 - 0,423 \pm 0,025$  %). Statistiquement cette modification du poids relatif est non significative ( $p > 0,05$ ). L'administration quotidienne de l'ACMP pendant 28 jours n'a entraîné aucune modification significative du poids relatif des autres organes, à savoir les reins, les poumons et le cœur ( $p > 0,05$ ) par rapport à ceux des témoins (Figure 3.19). Une étude antérieure sur la toxicité sub-chronique chez les rats traités par l'ACMP, a montré aussi que ce pesticide chimique n'affecte pas le poids relatif de ces organes vitaux [32].

L'arrêt du traitement de 14 jours par l'ACMP du groupe satellite, a induit une diminution du poids relatif du foie. L'analyse de la variance a révélé une différence non significative ( $P > 0,05$ ) du poids relatif du foie chez les mâles et les femelles respectivement de l'ordre de  $4,808 \pm 0,134\%$  et  $4,543 \pm 0,057$  % par rapport à ceux des témoins de  $4,776 \pm 0,103$  % et  $4,537 \pm 0,183$  (Tableau 3.13 et 3.14).

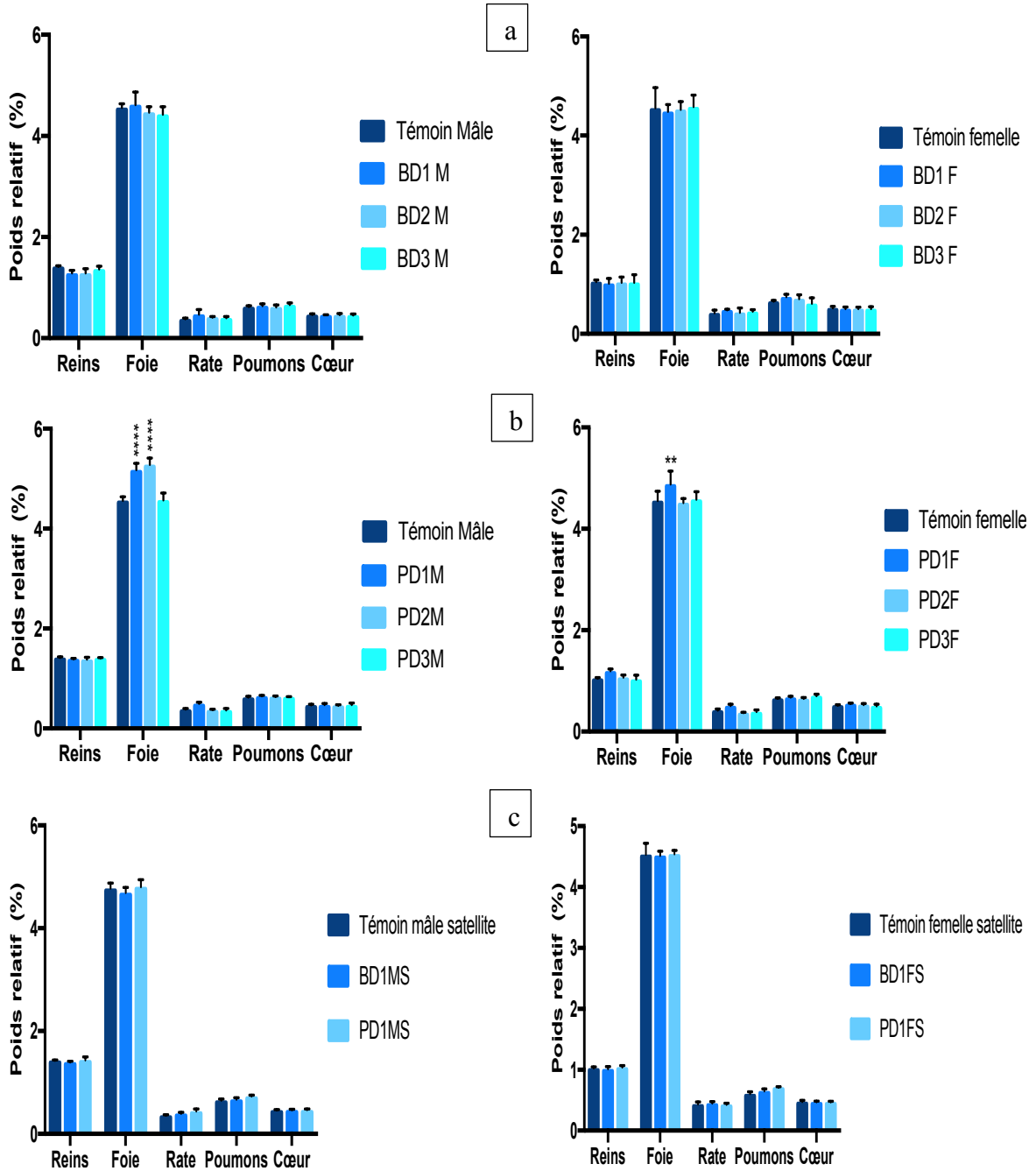


Figure3.19 : Évaluation du poids relatif des organes des souris en fonction du sexe (mâles et femelles) et des doses des traitements a : biopesticide, b : pesticide chimique, c : groupes satellites .

Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM (n=5) (\*\* p<0,01,\*\*\*\*p<0,0001)

### 3.6.5. Analyse des paramètres hématologiques

Les paramètres sanguins sont des indices importants de l'état physiologique et pathologique chez l'homme et l'animal [268]. L'intervalle normal de ces paramètres peut être modifié par l'ingestion de certaines plantes toxiques [269] [270]. Afin d'évaluer l'état physiologique et pathologique des souris en raison de l'administration orale du biopesticide et de l'ACMP pendant 28 jours, les paramètres hématologiques ont été mesurés. Les profils hématologiques du groupe témoin et des groupes traités par le biopesticide et l'ACMP sont présentés dans le Tableau 3.15 et la Figure 3.20.

Les taux des paramètres hématologiques analysés (GR, HGB, HTC, MCV, MCH, MCHc et PLT) chez souris mâles et femelles traitées par les différentes doses du biopesticide à savoir, BD1, BD2 et BD3 ont montré des variations non significatives par rapport à celles des témoins ( $p > 0,05$ ). Les résultats obtenus indiquent que le biopesticide formulé à base de l'HE de *P. aquilinum* administré à différentes doses n'a pas d'effet ni sur les cellules sanguines circulantes ni sur leur production [271].

D'après les résultats illustrés dans la Figure 3.20, nous constatons que le traitement par les différentes doses du biopesticide a provoqué une augmentation non significative ( $p > 0,05$ ) du taux des GB chez les souris de deux sexes. Selon Atsamoa et ses collaborateurs, cette augmentation suggère que certains principes actifs biologiques sont capables de stimuler le système immunitaire en augmentant le taux de globules blancs défensifs [272].

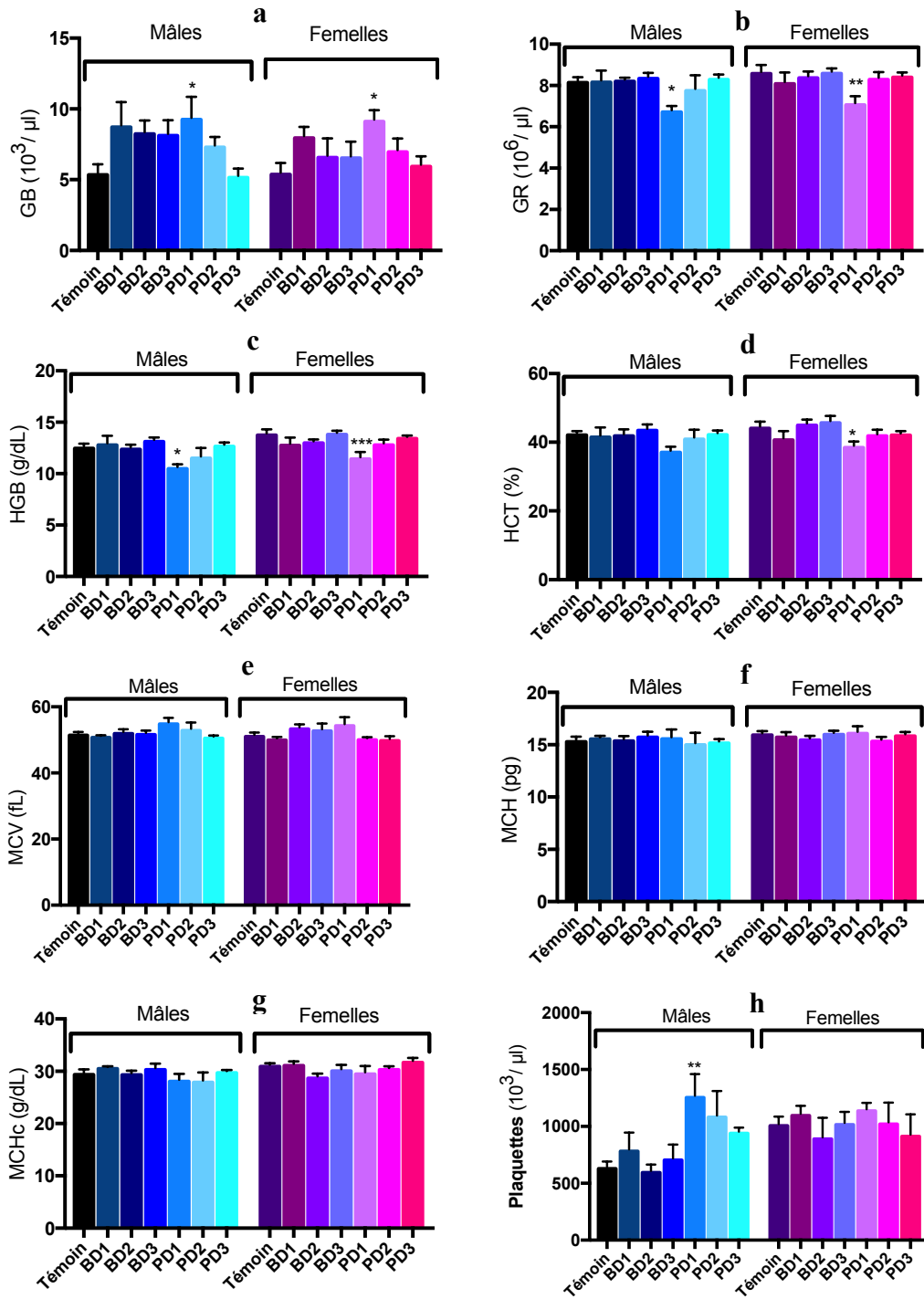


Figure 3.20 : Paramètres hématologiques des souris témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction des doses et du sexe: a : GB, b : GR, c : HGB, d : HCT, e : MCV, f : MCH, g : MCHc et h : PLT  
 Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM



Parallèlement, les résultats de l'étude hématologique (Tableau 3.15, Figure 3.20) montrent une diminution du taux de GR, de la concentration de l'HGB et du % HCT chez les souris mâles et femelles traitées par la forte dose (PD1) par rapport au groupe témoin. Statistiquement, ces différences sont significatives à l'exception du pourcentage d'HCT chez les mâles ( $p= 0,08$ ). Ces résultats sont en accord avec des travaux réalisés sur la toxicité de l'ACMP respectivement chez les souris et les rats [35] [103]. Selon une étude antérieure, la réduction des taux de GR, de l'HGB et de l'HTC pourrait être due à l'inhibition de l'érythropoïèse ou à une augmentation du taux de destruction des érythrocytes dans la rate [273].

Les souris traitées par la forte dose d'ACMP ont montré une augmentation non significative du MCV chez les souris mâles et femelles ( $p> 0,05$ ), ainsi que des changements non significatifs de la MCH et la MCHc.

L'analyse hématologique des souris traitées par la forte dose d'ACMP indiquent une augmentation significative des GB ( $p< 0,05$ ) ainsi que des PLT chez les mâles ( $p< 0,01$ ). Des résultats similaires ont été également observés par Chakroun et ses collaborateurs [103]. L'augmentation du taux des GB peut indiquer une activation du mécanisme de défense du système immunitaire de l'animal [274]. Le taux de globules blancs est directement proportionnel à la gravité du stress, et peut être attribuée à une augmentation de la mobilisation des leucocytes [275] [276]. Ces résultats sont en accord avec la conclusion de Youcef et ses collaborateurs, qui ont trouvé que certains pesticides augmentent le taux des globules blancs [274]. L'augmentation du nombre de PLT pourrait indiquer un effet possible de l'ACMP sur les systèmes de coagulation sanguine [103].

Tableau 3.15 : Paramètres hématologique des souris témoins et traitées par le biopesticide et l'ACMP

	Mâle							Femelle						
	Témoin	BD1	BD2	BD3	PD1	PD2	PD3	Témoin	BD1	BD2	BD3	PD1	PD2	PD3
GB (10 <sup>3</sup> /µl)	5,5 ± 0,61	8,8 ± 1,63 <sup>ns</sup>	8,4 ± 0,82 <sup>ns</sup>	8,2 ± 0,95 <sup>ns</sup>	9,4 ± 1,47 <sup>*</sup>	7,4 ± 0,60 <sup>ns</sup>	5,3 ± 0,51 <sup>ns</sup>	5,5 ± 0,68	8,1 ± 0,65 <sup>ns</sup>	6,7 ± 1,22 <sup>ns</sup>	6,7 ± 1,02 <sup>ns</sup>	9,25 ± 0,66 <sup>*</sup>	7,1 ± 0,80 <sup>ns</sup>	6,1 ± 0,60 <sup>ns</sup>
GR (10 <sup>6</sup> / µl)	8,22 ± 0,18	8,25 ± 0,47 <sup>ns</sup>	8,28 ± 0,09 <sup>ns</sup>	8,43 ± 0,18 <sup>ns</sup>	6,80 ± 0,21 <sup>*</sup>	7,84 ± 0,65 <sup>ns</sup>	8,38 ± 0,16 <sup>ns</sup>	8,66 ± 0,34	8,17 ± 0,46 <sup>ns</sup>	8,45 ± 0,22 <sup>ns</sup>	8,67 ± 0,16 <sup>ns</sup>	7,15 ± 0,33 <sup>**</sup>	8,37 ± 0,28 <sup>ns</sup>	8,48 ± 0,15 <sup>ns</sup>
HB (g/dL)	12,6 ± 0,28	13,0 ± 0,73 <sup>ns</sup>	12,5 ± 0,28 <sup>ns</sup>	13,3 ± 0,22 <sup>ns</sup>	10,7 ± 0,27 <sup>*</sup>	11,7 ± 0,83 <sup>ns</sup>	12,8 ± 0,21 <sup>ns</sup>	13,9 ± 0,38	12,9 ± 0,58 <sup>ns</sup>	13,2 ± 0,17 <sup>ns</sup>	14,0 ± 0,20 <sup>ns</sup>	11,6 ± 0,50 <sup>***</sup>	13,0 ± 0,35 <sup>ns</sup>	13,6 ± 0,12 <sup>ns</sup>
HCT (%)	42,6 ± 0,57	42,0 ± 2,29 <sup>ns</sup>	42,3 ± 0,64 <sup>ns</sup>	43,9 ± 1,22 <sup>ns</sup>	37,6 ± 1,12 <sup>ns</sup>	41,4 ± 2,24 <sup>ns</sup>	42,7 ± 0,70 <sup>ns</sup>	44,6 ± 1,41	41,2 ± 2,06 <sup>ns</sup>	45,5 ± 1,15 <sup>ns</sup>	46,2 ± 1,49 <sup>ns</sup>	39,0 ± 1,21 <sup>*</sup>	42,3 ± 1,30 <sup>ns</sup>	42,6 ± 0,65 <sup>ns</sup>
MCV (fL)	52,0 ± 0,46	51,3 ± 0,17 <sup>ns</sup>	52,4 ± 0,83 <sup>ns</sup>	52,1 ± 0,69 <sup>ns</sup>	55,4 ± 1,31 <sup>ns</sup>	53,4 ± 1,90 <sup>ns</sup>	51,0 ± 0,35 <sup>ns</sup>	51,6 ± 0,70	50,5 ± 0,43 <sup>ns</sup>	53,9 ± 0,86 <sup>ns</sup>	53,3 ± 1,69 <sup>ns</sup>	54,8 ± 2,14 <sup>ns</sup>	50,6 ± 0,29 <sup>ns</sup>	50,3 ± 0,85 <sup>ns</sup>
MCH (pg)	15,5 ± 0,32	15,7 ± 0,15 <sup>ns</sup>	15,5 ± 0,28 <sup>ns</sup>	15,9 ± 0,36 <sup>ns</sup>	15,7 ± 0,72 <sup>ns</sup>	15,2 ± 0,98 <sup>ns</sup>	15,3 ± 0,21 <sup>ns</sup>	16,1 ± 0,19	15,9 ± 0,33 <sup>ns</sup>	15,6 ± 0,25 <sup>ns</sup>	16,1 ± 0,20 <sup>ns</sup>	16,2 ± 0,52 <sup>ns</sup>	15,5 ± 0,24 <sup>ns</sup>	16,0 ± 0,21 <sup>ns</sup>
MCHc (g/dL)	29,7 ± 0,64	30,8 ± 0,13 <sup>ns</sup>	29,7 ± 0,45 <sup>ns</sup>	30,6 ± 0,80 <sup>ns</sup>	28,4 ± 1,12 <sup>ns</sup>	28,2 ± 1,53 <sup>ns</sup>	30,0 ± 0,22 <sup>ns</sup>	31,3 ± 0,27	31,4 ± 0,45 <sup>ns</sup>	29,0 ± 0,53 <sup>ns</sup>	30,4 ± 0,81 <sup>ns</sup>	29,8 ± 1,18 <sup>ns</sup>	30,6 ± 0,32 <sup>ns</sup>	32,0 ± 0,57 <sup>ns</sup>
PLT (10 <sup>3</sup> / µl)	645 ± 45,3	798 ± 147,0 <sup>ns</sup>	610 ± 55,1 <sup>ns</sup>	719 ± 122,4 <sup>ns</sup>	1269 ± 192,8 <sup>**</sup>	1095 ± 216,0 <sup>ns</sup>	954 ± 34,8 <sup>ns</sup>	1020 ± 65,16	1111 ± 70,9 <sup>ns</sup>	904 ± 171,5 <sup>ns</sup>	1031 ± 95,8 <sup>ns</sup>	1150 ± 58,3 <sup>ns</sup>	1036 ± 172,7 <sup>ns</sup>	927 ± 178,6 <sup>ns</sup>

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

ANOVA/ test de Dunnett : ns : non significatif (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\*(p<0,01), \*\*\* (p<0,001), \*\*\*\*(p<0,0001)

### 3.6.6. Analyse des paramètres biochimiques

Les effets de l'administration orale subaiguë du biopesticide et de l'ACMP sur les paramètres biochimiques plasmatique sont représentés dans le Tableau 3.16 et la Figure 3.21.

Les concentrations de la glycémie, de l'urée, de la créatinine, de la phosphatase alcaline (ALP), des protéines totales et de l'albumine chez les souris mâles et femelles traitées par les différentes doses de biopesticide, à savoir BD1, BD2 et BD3 ne présentaient pas de différence significative ( $p > 0,05$ ) par rapport à ceux des témoins (détail en Appendice E).

De nombreux composés de plantes s'accumulent dans le foie où ils sont détoxifiés [277]. Une évaluation du taux des transaminases pourrait s'avérer utile pour déterminer les effets toxiques des plantes médicinales sur le foie [278]. Cependant, nous avons observé une légère variation non significative de la concentration des ASAT chez les deux sexes traités par la dose moyenne (BD2) et des ALAT chez les femelles traitées par les différentes doses du biopesticide par rapport au témoin. Les analyses obtenues montrent qu'aucune modification significative des concentrations de ces enzymes, de l'urée et de la créatinine n'est pas enregistré. Ces paramètres sont respectivement de bons indicateurs de la fonction hépatique et rénale. Selon Hilaly et ses collaborateurs, il est raisonnable de déduire que le biopesticide formulé à 6% n'a pas endommagé le foie et les reins [279].

La présente étude révèle des variations non significatives ( $p > 0,05$ ) de la concentration du glucose plasmatiques chez les souris mâles et femelles traitées par les différentes doses du pesticide chimique, à savoir 1/4, 1/8 et 1/16 de la  $DL_{50}$ . Toutefois nous avons noté des changements significatifs de certains paramètres biochimiques chez les souris traitées par PD1 par rapport au groupe témoin. L'augmentation significative des concentrations sanguines de l'urée et de la créatinine chez les souris traitées par PD1 est en accord avec les résultats obtenus par Zhang et *al.* [125]. L'urée et la créatinine sont considérée comme des marqueurs significatifs de la fonction rénale [280].

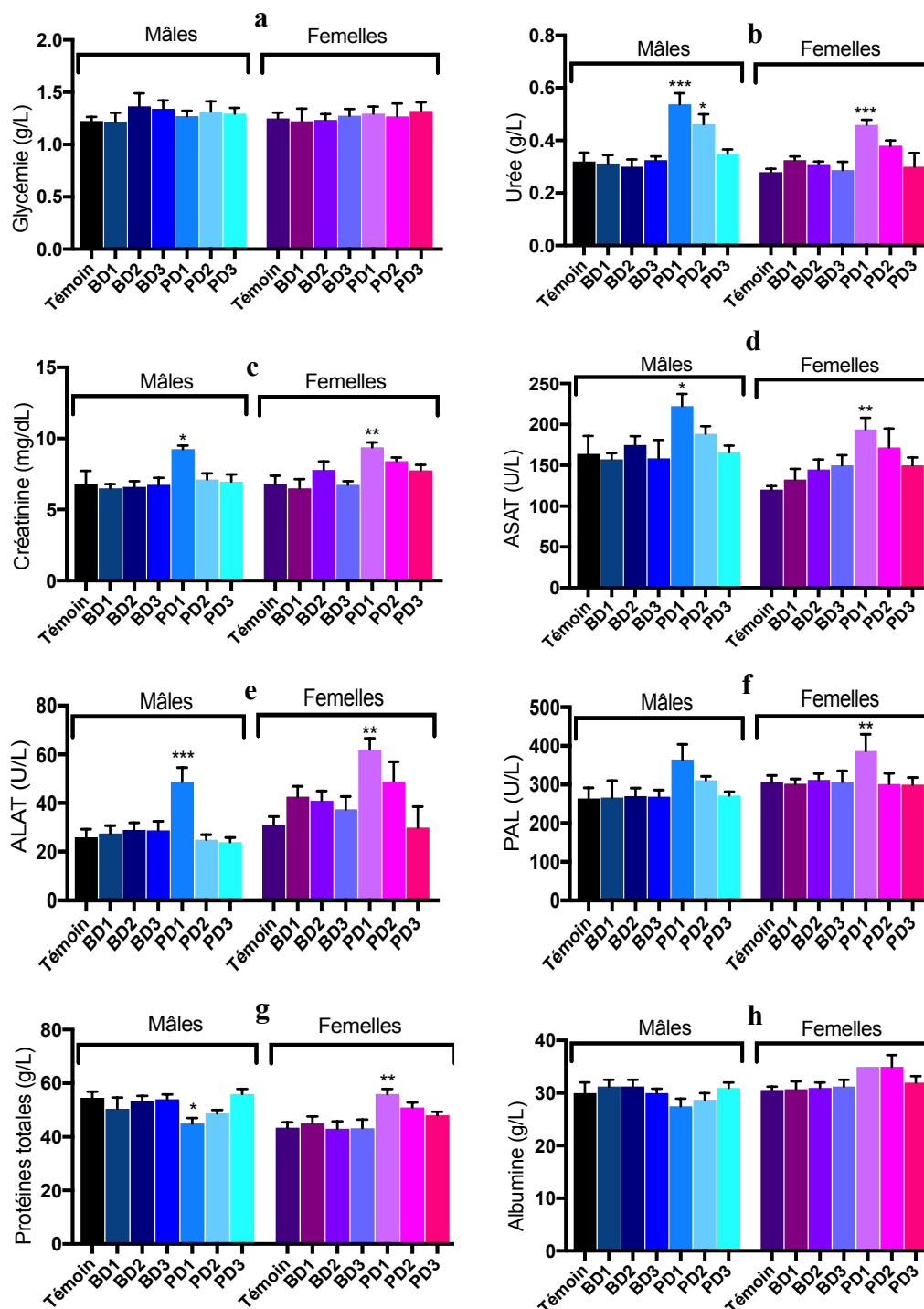


Figure 3.21 : Paramètres biochimiques des souris témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction des doses et du sexe : a : Glycémie, b : Urée, c : Créatinine, d: ASAT, e : ALAT, f : PAL , g : Protéines totales et h : Albumine

Les valeurs sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM

Il ressort clairement de notre observation que, lors du traitement des souris par l'ACMP à la plus forte dose, les concentrations des ASAT, ALAT et PAL ont augmenté significativement de ceux des témoins à l'exception du PAL des mâle ( $p=0,053$ ) (Figure 3.21). Ces résultats sont en accord avec des études antérieures sur la toxicité par l'ACMP chez les souris et les rats [126] [35] [103]. Des résultats similaires ont été rapporté après l'administration orale pendant 4 semaines d'imidaclopride chez les rats [281] [282].

Le foie est le premier organe à faire face à toute molécule étrangère transporté et qui subit plus de dommages. Lorsque la membrane plasmique des hépatocytes est endommagée, une variété d'enzymes sont libérées dans le flux sanguin [283]. Ces lésions sont caractérisées par une fuite du contenu cytoplasmique provoquant une augmentation relativement plus importante des ALAT que des ASAT. Toutefois, une augmentation proportionnellement plus importante des ASAT indique que les membranes mitochondriales et cytoplasmiques sont endommagées [284].

L'augmentation significative de ces enzymes montre que l'administration orale quotidienne d'ACMP a affecté le foie [285] [286]. Selon Chakroun et *al.*, l'élévation de l'activité des enzymes sanguines de la présente étude peut être causée par la perte de l'architecture de la membrane des hépatocytes et par les dommages hépatocellulaires observés chez les animaux traités par la plus forte dose, ce qui a contribué à la fuite des enzymes intracellulaires dans le sang [103]. En outre, Rahman et ses collaborateurs suggèrent que l'augmentation de l'activité de la PAL dans le plasma pourrait être due à l'augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique ce qui montre l'état de stress des animaux traités par l'ACMP [287].

Tableau 3.16 : Paramètres biochimiques des souris témoins et traitées par le biopesticide et l'ACMP

	Mâle							Femelle						
	Témoin	BD1	BD2	BD3	PD1	PD2	PD3	Témoin	BD1	BD2	BD3	PD1	PD2	PD3
Glycémie	1,22 ± 0,04	1,22 ± 0,09 ns	1,37 ± 0,12 ns	1,34 ± 0,08 ns	1,27 ± 0,05 ns	1,32 ± 0,10 ns	1,30 ± 0,05 ns	1,25 ± 0,05	1,22 ± 0,12 ns	1,24 ± 0,06 ns	1,28 ± 0,06 ns	1,30 ± 0,07 ns	1,27 ± 0,12 ns	1,32 ± 0,08 ns
Urée	0,32 ± 0,03	0,31 ± 0,03 ns	0,30 ± 0,03 ns	0,33 ± 0,01 ns	0,54 ± 0,04 ***	0,46 ± 0,04 *	0,35 ± 0,02 ns	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,01 ns	0,31 ± 0,01 ns	0,29 ± 0,03 ns	0,46 ± 0,02 ***	0,38 ± 0,02 ns	0,30 ± 0,05 ns
Créatinine	6,8 ± 0,92	6,5 ± 0,29 ns	6,6 ± 0,40 ns	6,8 ± 0,48 ns	9,3 ± 0,25 *	7,1 ± 0,43 ns	7,0 ± 0,49 ns	6,8 ± 0,58	6,5 ± 0,65 ns	7,8 ± 0,58 ns	6,8 ± 0,25 ns	9,4 ± 0,34 **	8,4 ± 0,26 ns	7,8 ± 0,39 ns
ASAT	163 ± 14,1	158 ± 7,2 ns	175 ± 10,8 ns	159 ± 22,2 ns	223 ± 14,9 *	189 ± 9,0 ns	166 ± 8,3 ns	120 ± 4,2	133 ± 13,2 ns	145 ± 12,0 ns	150 ± 12,5 ns	194 ± 14,1 **	172 ± 23,1 ns	150 ± 9,8 ns
ALAT	26 ± 3,3	28 ± 3,2 ns	29 ± 2,9 ns	29 ± 3,8 ns	49 ± 5,9 ***	25 ± 2,0 ns	24 ± 1,9 ns	31 ± 3,3	43 ± 4,3 ns	41 ± 4,0 ns	38 ± 5,2 ns	62 ± 4,6 **	49 ± 8,0 ns	30 ± 8,5 ns
PAL	264 ± 27,5	266 ± 44,2 ns	270 ± 21 ns	269 ± 17,4 ns	364 ± 38,6 ns	311 ± 10,1 ns	272 ± 9,3 ns	306 ± 17,5	303 ± 12,0 ns	312 ± 16,6 ns	308 ± 27,8 ns	387 ± 43,5 **	302 ± 27,1 ns	300 ± 18,4 ns
PT	55 ± 2,3	51 ± 4,1 ns	53 ± 1,9 ns	54 ± 1,9 ns	45 ± 2,0 *	49 ± 1,3 ns	56 ± 1,9 ns	43 ± 2,1	45 ± 2,6 ns	43 ± 2,8 ns	43,3 ± 3,1 ns	56 ± 1,9 ns	51 ± 1,9 ns	48 ± 1,2 ns
Albumine	30 ± 1,6	31 ± 1,3 ns	31 ± 1,0 ns	30 ± 0,8 ns	28 ± 1,4 ns	29 ± 1,3 ns	31 ± 1,0 ns	31 ± 0,6	31 ± 1,5 ns	31 ± 1,0 ns	31 ± 1,3 ns	35 ± 0,0 ns	35 ± 2,2 ns	32 ± 1,2 ns

Les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

ANOVA/ test de Dunnett : ns : non significatif (p>0,05), \*(p< 0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001), \*\*\*\* (p<0,0001)

Dans la présente étude, nous remarquons d'une part que l'administration orale de la dose élevée d'ACMP chez les souris mâles a réduit les taux de protéines totales et de l'albumine (Figure 3.21). Cette diminution significative est en accord avec les résultats obtenus par Chakroun et *al.* sur des rats mâles exposés à l'ACMP [103]. Ce pesticide néonicotinoïde est connu pour produire un stress oxydatif en inhibant les enzymes antioxydante et en induisant la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) [126] [125] [103]. La raison de la diminution des protéines totales pourrait être due aux effets néfastes des DRO, généré par l'exposition à l'ACMP sur les protéines par oxydation dans le foie [103].

D'autre part, d'après les résultats précédemment obtenus sur la diminution de la consommation hydrique (Figure 3.17) chez les souris femelles traitées par PD1 et PD2, nous remarquons que ces animaux présentent des taux élevés en protéines totales et albumine plasmatique (Figure 3.21). Des résultats similaires ont été également observés chez des rats femelles traités par l'ACMP en suspension dans une solution saline normale pendant 28 jours. Ces auteurs ont montré que cette augmentation est peut-être due à la déshydratation consécutive et du refus des animaux de boire de l'eau suite à l'administration d'ACMP [10] .

Les valeurs moyennes des paramètres hématologiques et biochimique des souris des groupes satellites témoin et traités par le biopesticide et l'ACMP sont respectivement rapportées dans les Tableaux 3.17 et 3.18.

Après 14 jours d'interruption du traitement, aucune modification significative des paramètres hématologique et biochimique dans le groupe satellite traité par la forte dose du biopesticide n'est enregistrée (Figures 3.22 et 3.23). Ces résultats indiquent que cette formulation à base d'HE de *P. aquilinum* n'a montré aucun effet toxique tardif chez les animaux d'essai.

Tableau 3.17 : Paramètres hématologiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP

	Mâle			Femelle		
	Témoin S	BD1 S	PD1 S	Témoin S	BD1 S	PD1 S
GB (10 <sup>3</sup> /µl)	5,4 ± 0,55	6,8 ± 0,48 <sup>ns</sup>	8,9 ± 1,76 <sup>ns</sup>	5,6 ± 0,47	6,5 ± 0,58 <sup>ns</sup>	7,4 ± 1,76 <sup>ns</sup>
GR (10 <sup>6</sup> / µl)	8,15 ± 0,26	8,26 ± 0,24 <sup>ns</sup>	7,77 ± 0,31 <sup>ns</sup>	8,36 ± 0,23	8,32 ± 0,25 <sup>ns</sup>	7,75 ± 0,21 <sup>ns</sup>
HB (g/dL)	12,9 ± 0,43	12,6 ± 0,57 <sup>ns</sup>	11,7 ± 0,51 <sup>ns</sup>	13,2 ± 0,30	13,3 ± 0,30 <sup>ns</sup>	12,6 ± 0,22 <sup>ns</sup>
HCT (%)	42,0 ± 1,38	41,7 ± 1,52 <sup>ns</sup>	40,8 ± 1,53 <sup>ns</sup>	43,3 ± 0,76	43,0 ± 0,82 <sup>ns</sup>	40,0 ± 0,87 *
MCV (fL)	52,3 ± 0,40	52,1 ± 0,56 <sup>ns</sup>	52,5 ± 0,79 <sup>ns</sup>	51,8 ± 0,71	51,7 ± 0,83 <sup>ns</sup>	51,6 ± 0,65 <sup>ns</sup>
MCH (pg)	16,2 ± 0,27	15,8 ± 0,35 <sup>ns</sup>	15,1 ± 0,92 <sup>ns</sup>	15,8 ± 0,30	16,0 ± 0,27 <sup>ns</sup>	16,2 ± 0,23 <sup>ns</sup>
MCHc (g/dL)	30,7 ± 0,37	30,3 ± 0,60 <sup>ns</sup>	28,8 ± 1,79 <sup>ns</sup>	30,4 ± 0,34	30,9 ± 0,35 <sup>ns</sup>	31,4 ± 0,33 <sup>ns</sup>
PLT (10 <sup>3</sup> /µl)	662 ± 40,6	681 ± 51,9 <sup>ns</sup>	1237 ± 142,6 **	1003 ± 61,5	1045 ± 50,8 <sup>ns</sup>	1055 ± 135 <sup>ns</sup>

Les données sont exprimées en moyenne±SEM (n=5), ns(p>0,05), \*(p< 0,05),\*\*(p<0,01)

Tableau 3.18 : Paramètres biochimiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP

	Mâle			Femelle		
	Témoin S	BD1 S	PD1 S	Témoin S	BD1 S	PD1 S
Glycémie	1,23 ± 0,03	1,29 ± 0,04 <sup>ns</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>ns</sup>	1,29 ± 0,07	1,31 ± 0,05 <sup>ns</sup>	1,24 ± 0,09 <sup>ns</sup>
Urée	0,38 ± 0,01	0,36 ± 0,02 <sup>ns</sup>	0,38 ± 0,05 <sup>ns</sup>	0,31 ± 0,03	0,3 ± 0,02 <sup>ns</sup>	0,35 ± 0,03 <sup>ns</sup>
Créatinine	6,8 ± 0,73	6,4 ± 0,51 <sup>ns</sup>	8,73 ± 0,37 <sup>ns</sup>	7,8 ± 0,42	7,86 ± 0,34 <sup>ns</sup>	7,4 ± 0,55 <sup>ns</sup>
ASAT	167 ± 13,00	169 ± 20,09 <sup>ns</sup>	189 ± 11,11 <sup>ns</sup>	149 ± 16,23	142 ± 13,68 <sup>ns</sup>	196 ± 10,65 <sup>ns</sup>
ALAT	24 ± 3,32	22 ± 4,36 <sup>ns</sup>	25 ± 2,24 <sup>ns</sup>	37 ± 4,64	32 ± 4,06 <sup>ns</sup>	41 ± 6,78 <sup>ns</sup>
PAL	277 ± 30,93	257 ± 25,22 <sup>ns</sup>	272 ± 14,71 <sup>ns</sup>	329 ± 28,0	302 ± 18,03 <sup>ns</sup>	272 ± 8,7 <sup>ns</sup>
PT	55 ± 2,24	52 ± 1,23 <sup>ns</sup>	47 ± 1,23**	52 ± 2,00	50 ± 1,58 <sup>ns</sup>	58 ± 1,23*
Albumine	30 ± 2,74	31 ± 1,87 <sup>ns</sup>	32 ± 1,23 <sup>ns</sup>	32 ± 1,23	31 ± 1,00 <sup>ns</sup>	32 ± 1,23 <sup>ns</sup>

Les données sont exprimées en moyenne±SEM (n=5), ns(p>0,05), \*(p< 0,05),\*\*(p<0,01)



Les paramètres hématologiques du groupe satellite traité par la forte dose d'ACMP sont comparables à ceux du groupe satellite témoin ( $p > 0,05$ ) à l'exception du taux des plaquettes chez les souris mâles ( $p < 0,01$ ). Le taux de GR ainsi que le pourcentage d'HCT a augmenté par rapport au PD1 mais avec des valeurs inférieures à celles du témoin. L'analyse de variance révèle qu'aucune différence significative n'est enregistrée ( $p > 0,05$ ) (détail en Appendice E).

L'arrêt du traitement par le pesticide chimique chez les souris du groupe satellite, a induit une diminution de la concentration de l'urée, de la créatinine, des transaminases ainsi que du PAL. Aucune différence significative entre ces paramètres avec ceux du lot satellite témoin n'est enregistré par l'analyse de variance.

Toutefois, le taux des protéines totales est statistiquement différent avec une diminution chez les mâles et une augmentation chez les femelles traitées par PD1 (Tableau 3.18).

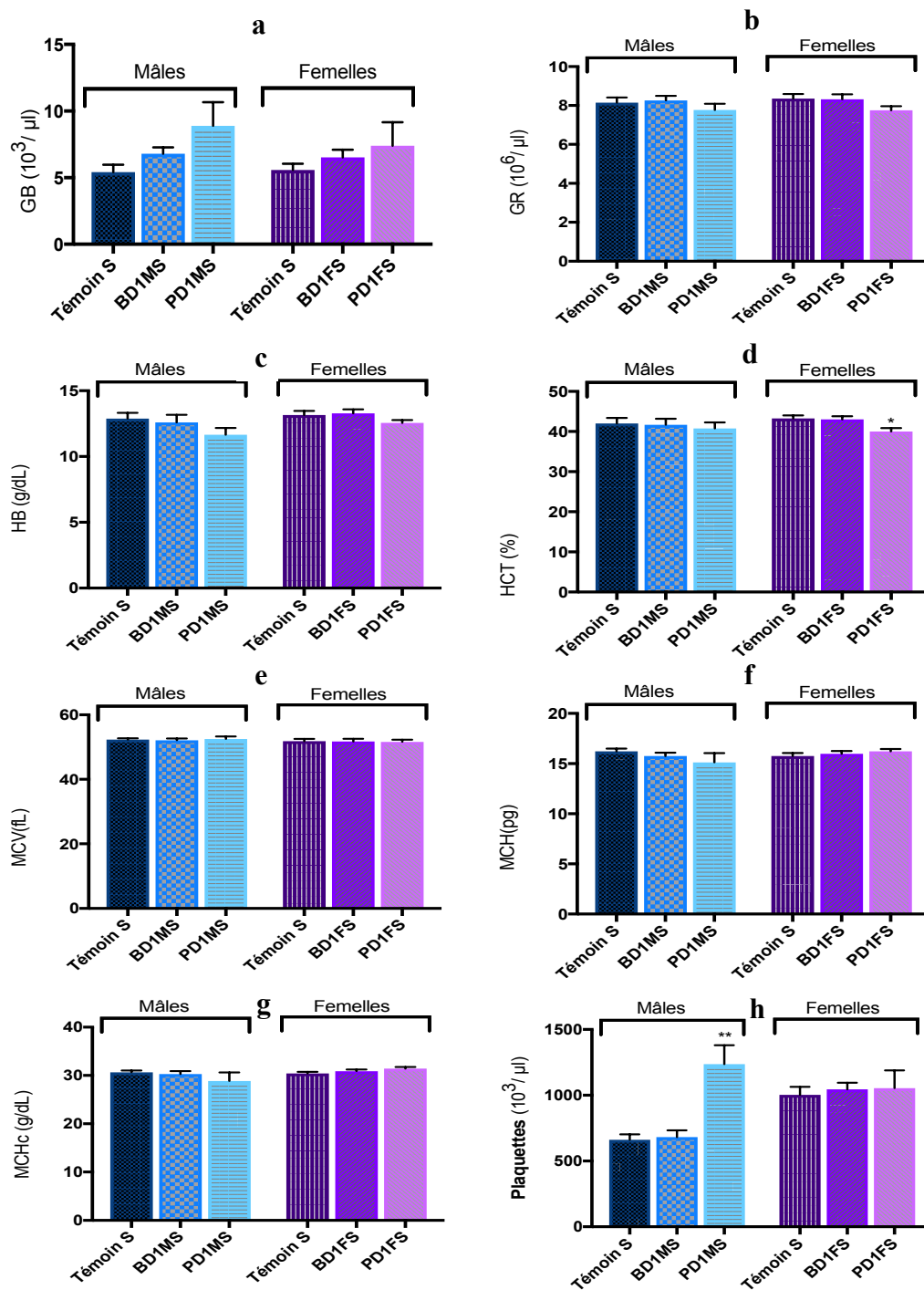


Figure 3.22 : Paramètres hématologiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction du sexe : a : GB, b : GR, c : HB, d : HTC, e : MCV, f : MCH, g : MCHc et h : PLT

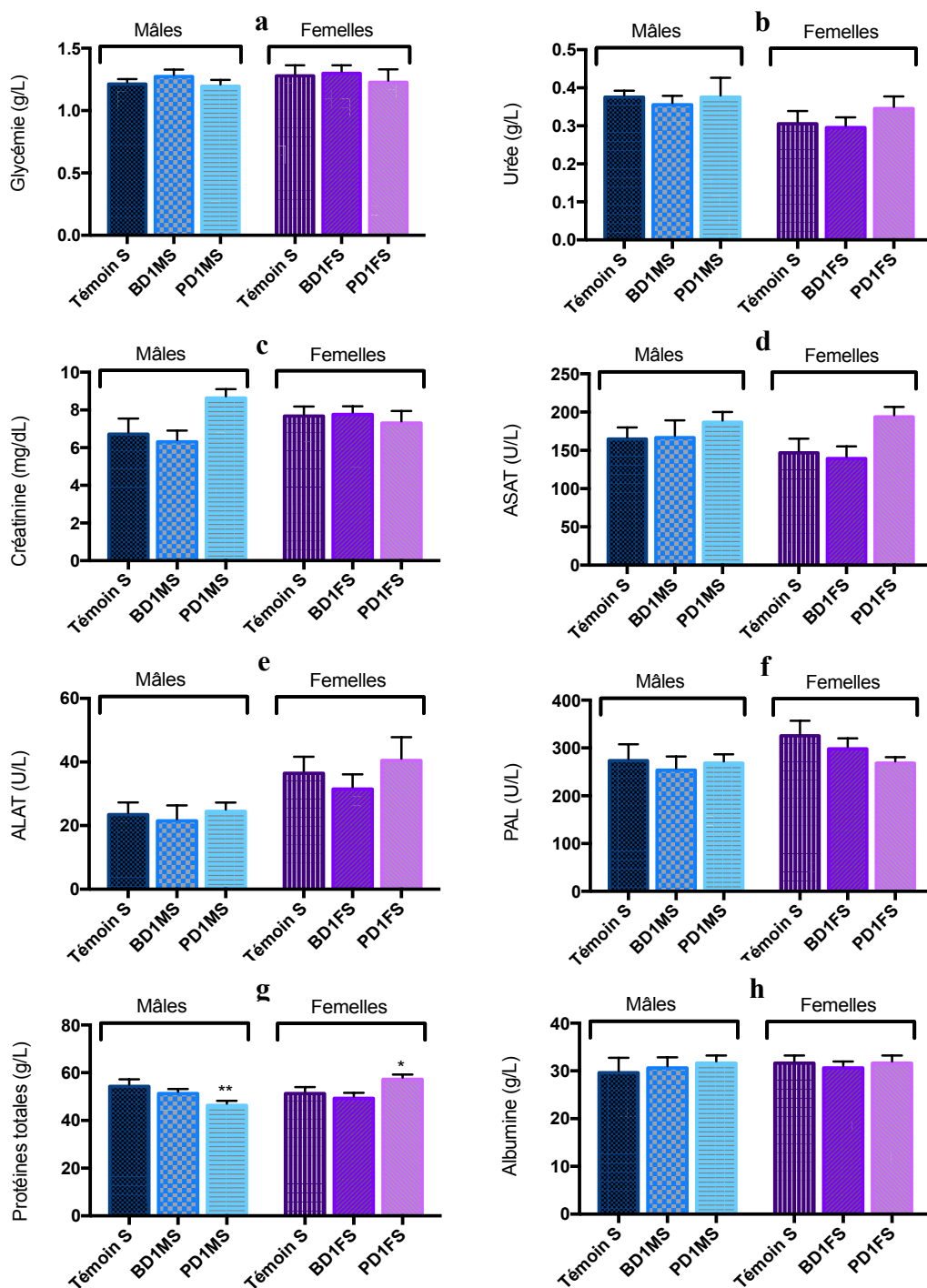


Figure 3.23 : Paramètres biochimiques des souris des groupes satellites témoins et traités par le biopesticide et l'ACMP en fonction du sexe : a : Glycémie, b : Urée, c : Créatinine, d : ASAT, e : ALAT, f : PAL , g : Protéines totales et h : Albumine

### 3.6.7. Examen histo-pathologique

L'évaluation des altérations pathologiques induites chez les animaux du laboratoire par les xénobiotiques représente la pierre angulaire de l'évaluation de leur sécurité. Cette évaluation préliminaire, qui repose largement sur des techniques histo-pathologiques conventionnelles, représente une contribution majeure au développement des produits [288].

#### 3.6.7.1. Examen histo-pathologique du foie

Nous avons examiné sous microscope optique les sections colorées (hématoxyline – éosine) des tissus hépatiques obtenues à partir des souris mâles et femelles traités avec différentes doses du biopesticide formulé (400, 200 et 100 mg/kg du poids corporel) et d'ACMP (1/4, 1/8 et 1/16 de la DL<sub>50</sub>). Pour cela, nous avons comparé ces lames avec celles des animaux du groupe témoin.

Les sections colorées du foie des animaux des groupes témoin et satellite témoin ont montré des lobules normaux avec la veine centrolobulaire au milieu. Aux coins, nous avons observé des triades portales, constituées de l'artère hépatique, de la veine porte et du canal biliaire. Des hépatocytes, avec des noyaux centraux et séparés par des sinusoides étroites. Cependant, nous notons l'absence de nécrose et de conditions dégénératives des hépatocytes (Figure 3.24).

Chez les animaux traités avec les trois doses du biopesticide ainsi que ceux de son groupe satellite, une architecture normale des veines centrales, des triades portales et des hépatocytes ont été observée lors de l'examen histo-pathologique du foie. Aucun signe de nécrose et de conditions dégénératives dans les hépatocytes (Figure 3.24).



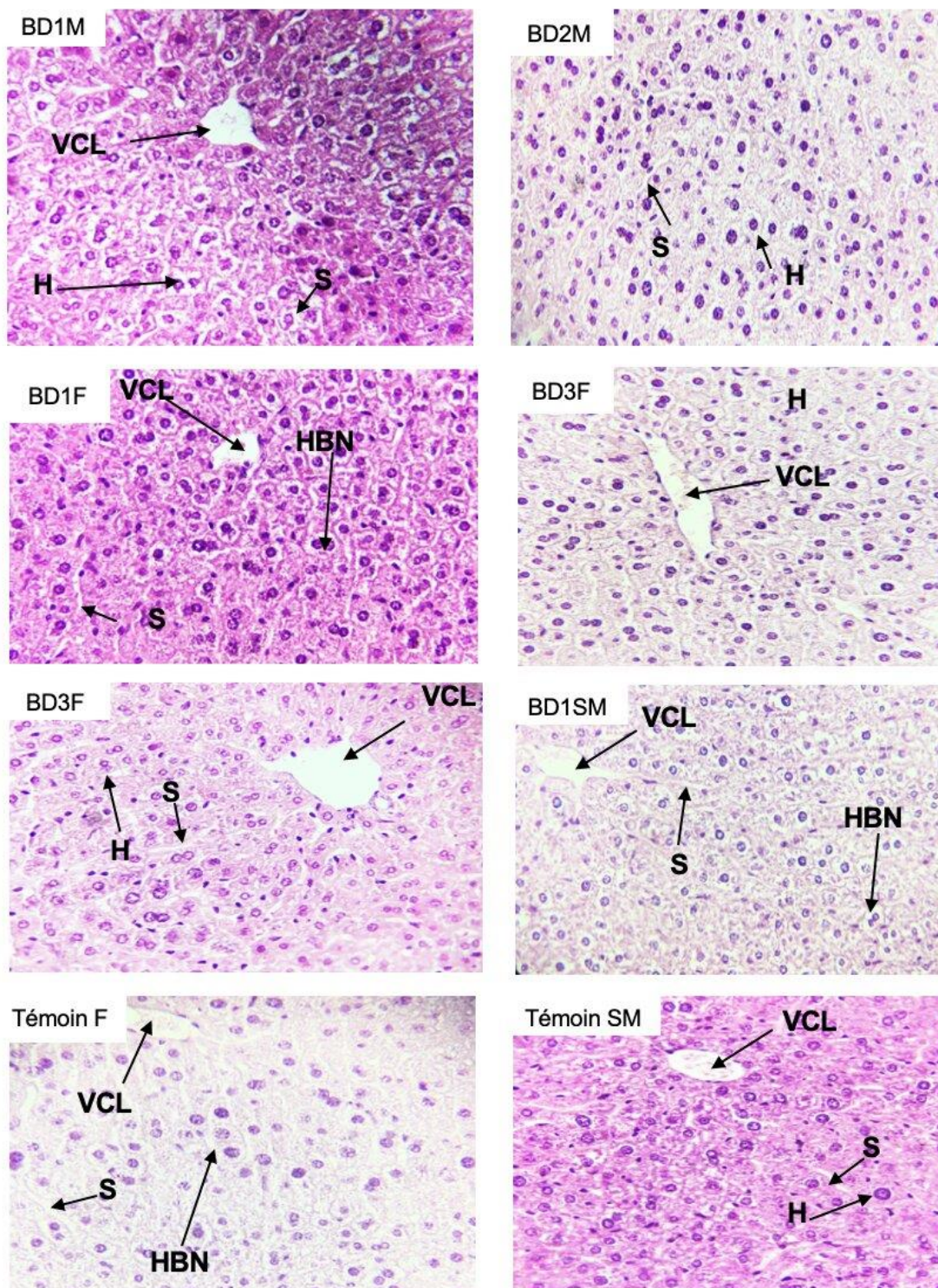


Figure 3.24 : Étude histologique du foie des souris témoins, traitées par les trois doses du biopesticide et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GrX40), D1=400mg/kg, D2=200mg/kg, D3=100mg/kg, S :satellite, M :mâle, F : femelle, H :hépatocyte, VCL :veine centrolobulaire, HBN :hépatocyte binucléé, S :sinusoïde

L'analyse histologique du foie de souris, des deux sexes, traitées par les trois doses de l'ACMP (1/4, 1/8 et 1/16 de la DL<sub>50</sub>) a révélé des altérations doses-dépendantes.

L'histopathologie hépatique des souris mâles et femelles traitées par la forte dose a indiqué des altérations marquées par une dilatation sévère de la veine centrolobulaire (Figure 3.25 a,b), ainsi que la triade portale (Figure 3.25 c,d) et augmentation de l'infiltration inflammatoire péri-vasculaire (Figure 3.25 e.g) et intra-parenchymateuse (Figure 3.25 f.h). Une dilatation des capillaires sinusoides a été aussi observé (Figure 3.25 c,f,h). Ces mêmes observations histo-pathologiques hépatiques ont été marquées pour le groupe satellite traité par la forte dose d'ACMP chez les deux sexes. Ces observations sont conformes avec celles obtenues avec d'autres résultats précédemment publiés [103]. De plus, une dilatation de la veine centrale et des capillaires sinusoides et une infiltration leucocytaire ont été observées dans le tissu hépatique des rats exposés à l'imidaclopride à raison de 45 mg / kg pendant 4 semaines [282]. Les infiltrations lymphocytaires observés sont un indicateur de l'irritabilité et de l'inflammation des cellules [103]. Par conséquent, la raison de l'augmentation des GB chez les souris de ces lots pourrait être expliquée par l'activation du système immunitaire et la présence de l'inflammation dans les tissus hépatiques [274].

Des altérations histo-pathologiques modérées incluant une inflammation péri-vasculaire et intra-parenchymateuse modéré, une dilatation modérée de la veine centrolobulaire ainsi qu'une dilatation des sinusoides sont enregistrées après l'administration de la moyenne et la faible dose d'ACMP chez les souris mâles et femelles (Figure 3.26 ).



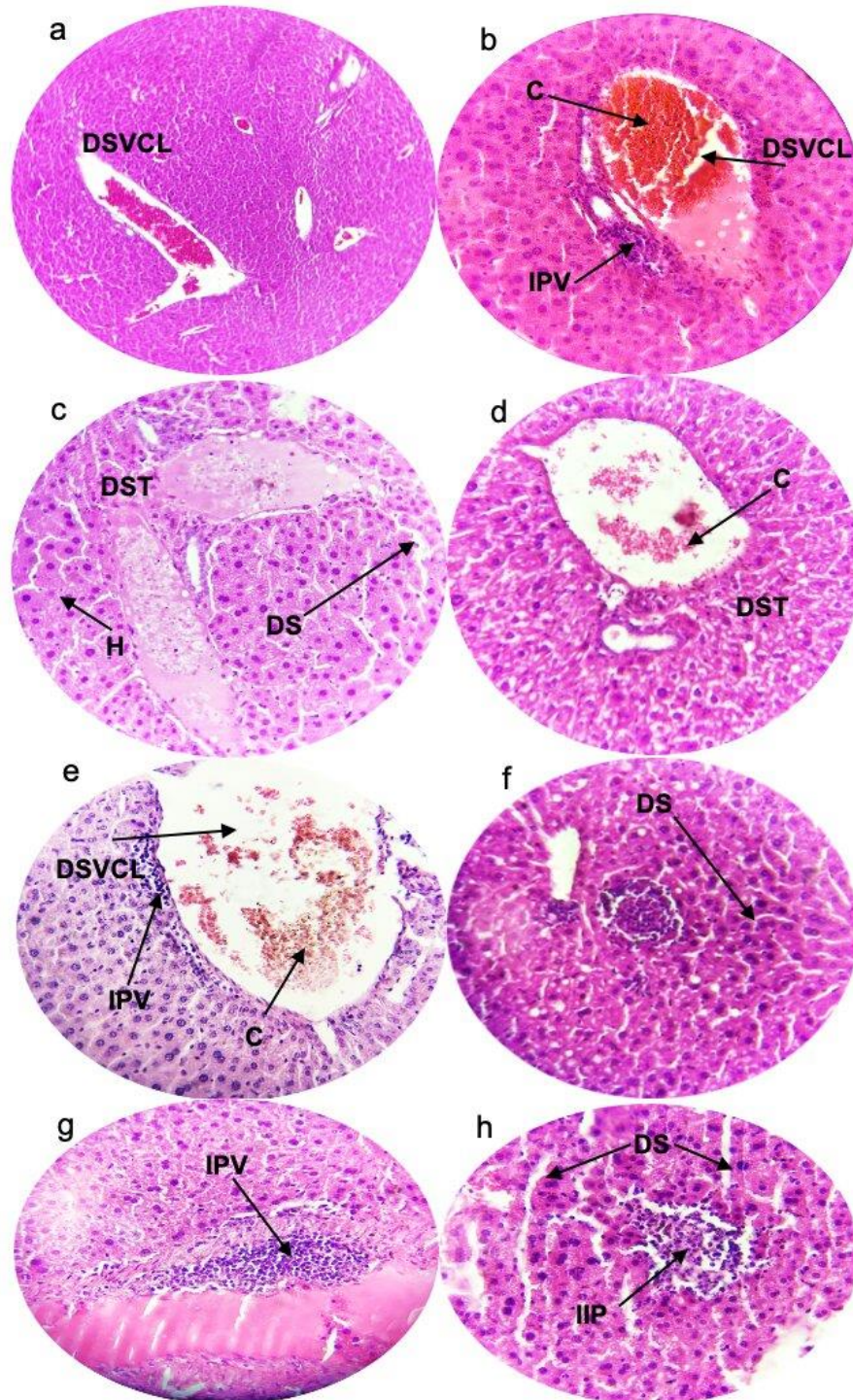


Figure 3.25 : Étude histologique du foie des souris traitées par PD1 et PD1S de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GR :X10 (a) GR :X40 (b,c,d,e,f,g,h))  
 Inflammation intra-parenchymateuse (I.I.P.), dilatation des capillaires sinusoides (D.S.), inflammation péri-vasculaire (IPV) dilatation sévère de la triade portale (DT), dilatation sévère de la veine centrolobulaire (DSVCL), congestion (c), hépatocyte (H), veine centrolobulaire (VCL)

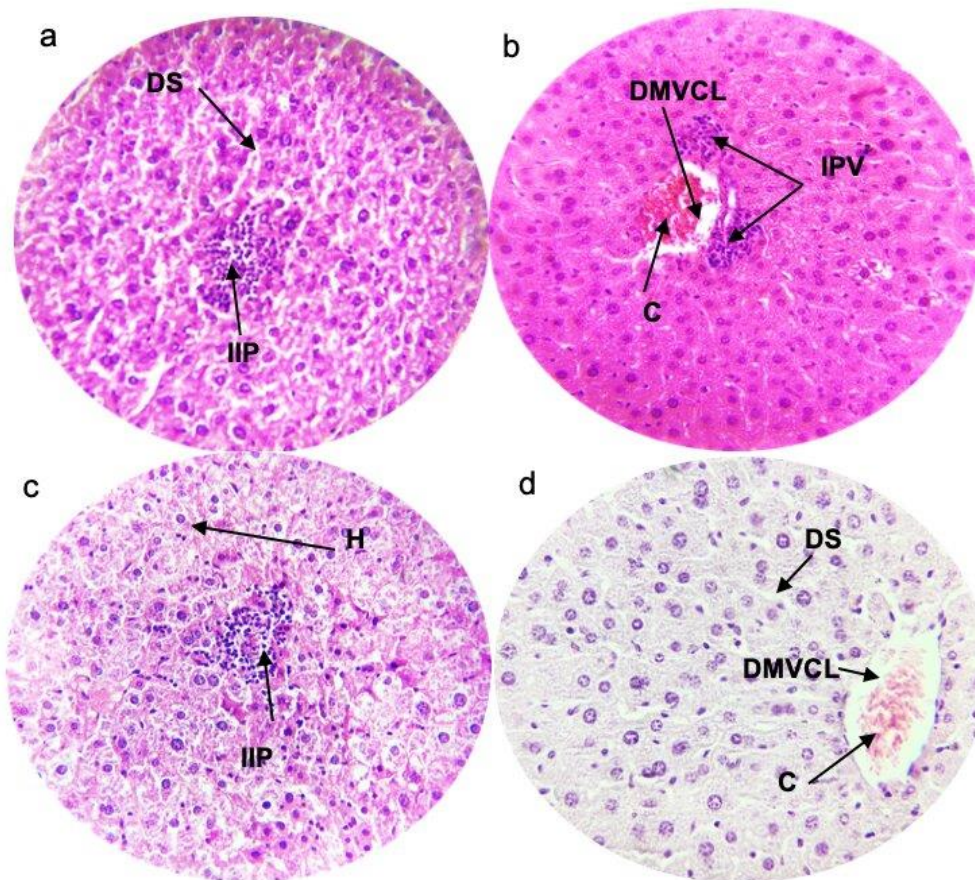


Figure 3.26 : Étude histologique du foie des souris traitées par PD2 et PD3 de l'étude de la toxicité subaiguë : inflammation intra-parenchymateuse (IIP), dilatation des capillaires sinusoides (D.S.), inflammation péri-vasculaire (IPV), dilatation modérée de la veine centrolobulaire (DMVCL), congestion (C), hépatocyte (H) (H.E, GR :X40)



### 3.6.7.2. Examen histo-pathologique des reins

Les sections colorées des tissus rénaux obtenus à partir des souris mâles et femelles traitées avec le biopesticide et l'ACMP ont été examinées au microscope optique ainsi que les groupes témoins et satellites.

En conséquence, l'histo-pathologie rénale des animaux des groupes témoin et satellite traités avec de l'eau physiologique présentent des corpuscules rénaux ayant un espace urinaire de taille normale, un glomérule normal et des structures tubulaires (Figure 3.27).

Des corpuscules rénaux normaux présentant un glomérule normal, un espace urinaire et des systèmes tubulaires ont été observés lors de l'examen histo-pathologique du tissu rénal chez les souris traitées avec les trois doses du biopesticide formulé ainsi que celles du groupe satellite. Aucun signe de nécrose n'est observé (Figure 3.27).

En comparaison avec ceux des témoins, la structure des reins chez les souris traitées par la forte dose d'ACMP et les satellites, présente des altérations au niveau du parenchyme rénal : les glomérules sont atrophiés et désintégrés, l'espace capsulaire s'est élargi de manière évidente, une congestion, une hémorragie interstitielle, une perte de l'architecture de certains tubules avec un aplatissement des cellules épithéliales des tubules distaux et une restriction des lumières des tubules proximaux, une infiltration inflammatoire péri-vasculaire et intra-parenchymateuse (Figure 3.28). La créatinine sérique détermine le taux de filtration glomérulaire. Selon Tiez, les taux de créatinine augmentent dans le sérum lorsque le cortex et / ou les glomérules sont endommagés [289]. De graves lésions rénales entraîneront une augmentation des taux de la créatinine [121]. L'augmentation dose-dépendante du taux de créatinine dans la présente étude révèle une atteinte éventuelle des reins suite à l'administration de l'ACMP [289].

L'administration de PD2 et PD3 a induit une infiltration inflammatoire intra-parenchymateuse et péri-vasculaire, une congestion et une restriction des lumières des tubules proximaux chez les souris mâles et femelles traitées pendant 28 jours (Figure 3.29)

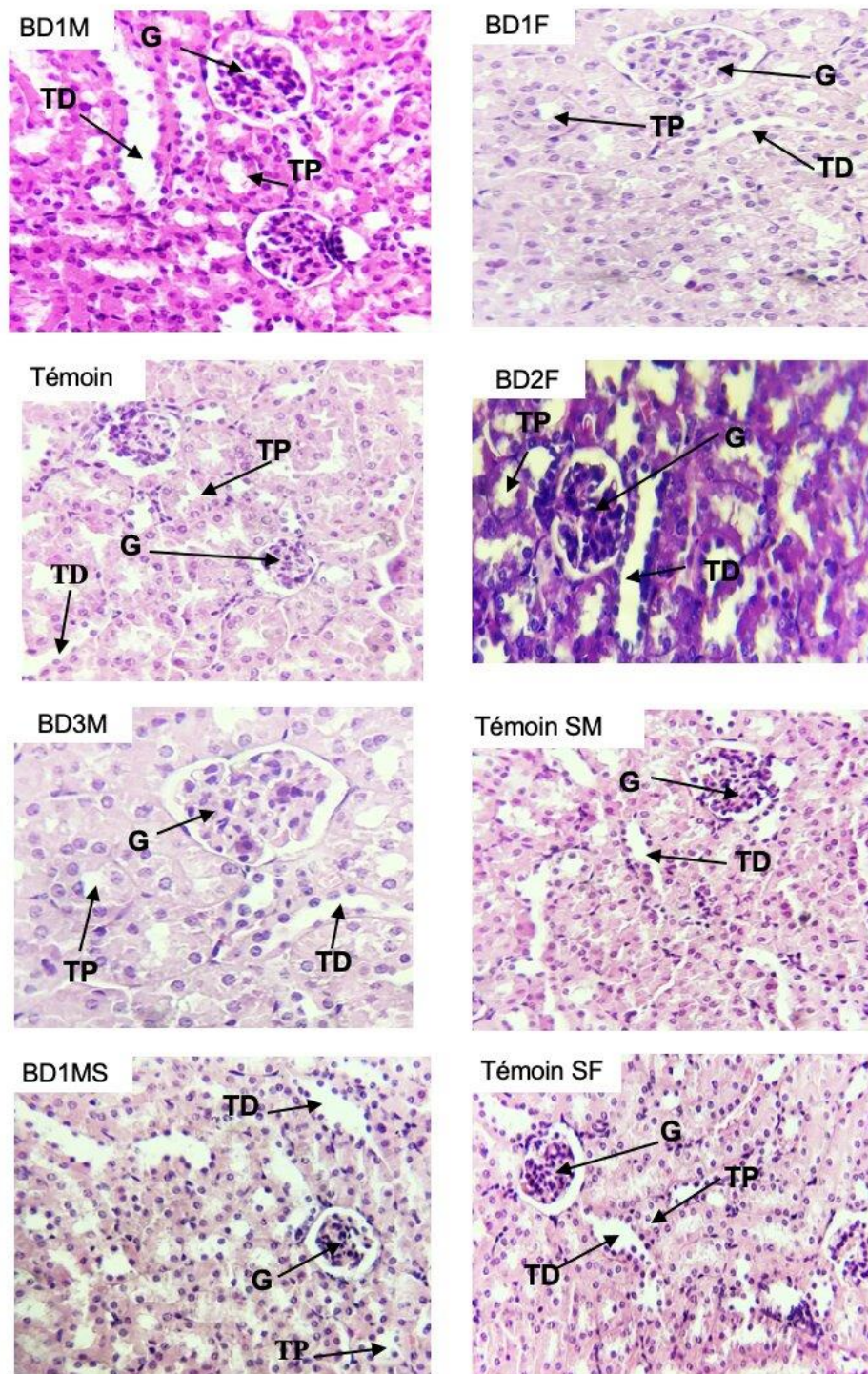


Figure 3.27 : Étude histologique des reins des souris témoins, traitées par les trois doses du biopesticide et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë : D1=400 mg/kg, D2=200 mg/kg, D3=100mg/kg (H.E, GrX40)  
 S :satellite, M :mâle, F :femelle, G : glomérule, TD :tubule distale et TP : tubule proximal



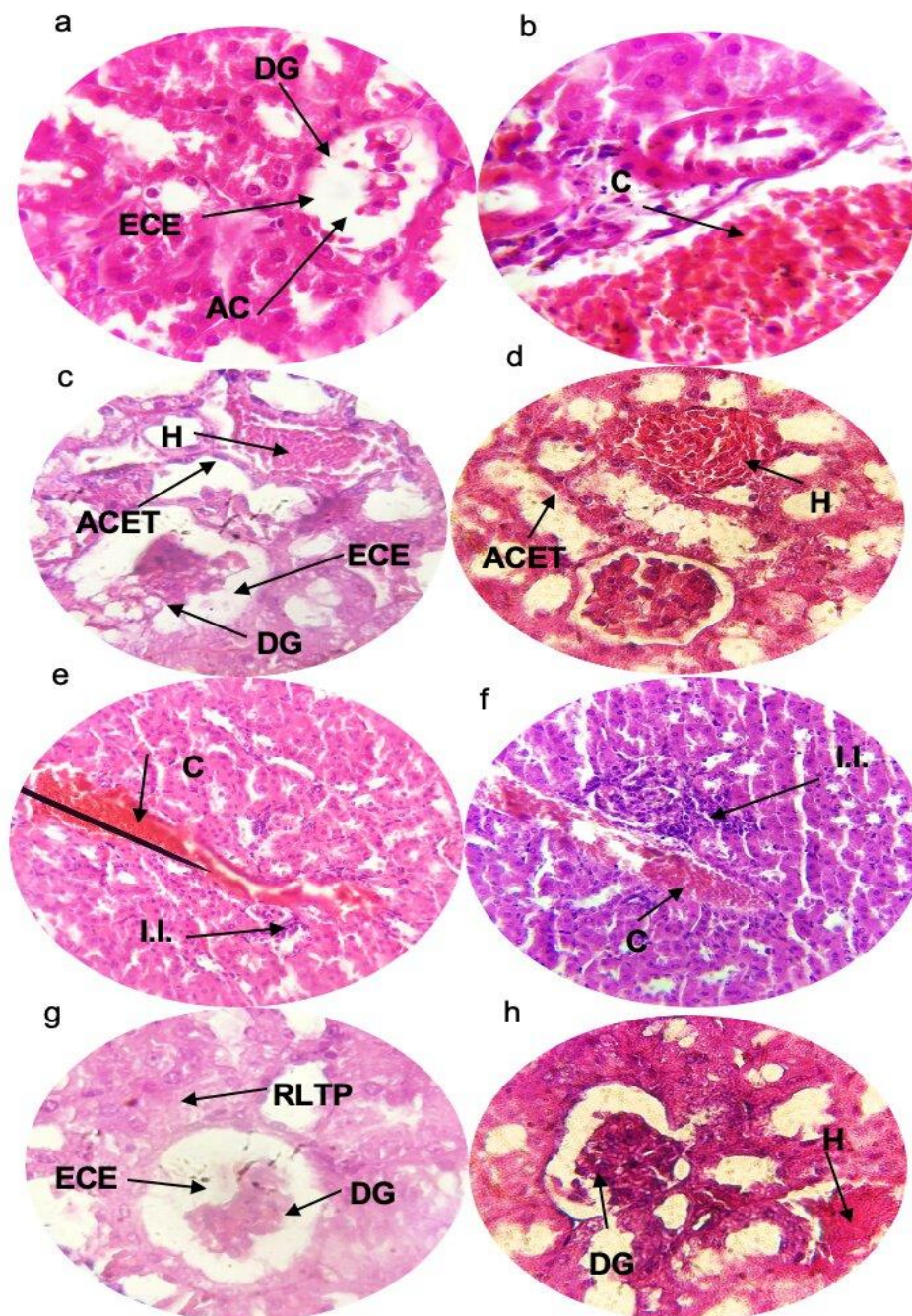


Figure 3.28 : Étude histologique des reins des souris traitées par la forte dose d'ACMP et les satellites de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GrX40 e,f et GrX100 a,b,c,d,g,h)

AC : atrophie des capillaires glomérulaires, C : congestion, DG : Désintégration glomérulaire, ECE : espace sous capsulaire élargi, I.I. : infiltration inflammatoire, ACET : aplatissement des cellules épithéliales tubulaires distales, RLTP : restriction des lumières des tubules proximaux, H : hémorragie

Les reins sont fréquemment sensibles aux effets néphrotoxiques de nombreux xénobiotiques [119]. Actuellement, il existe peu de documentation sur les effets néphrotoxiques des pesticides. Le peu de travaux provient d'études sur des animaux et de rapports de cas d'individus empoisonnés par des pesticides [290].

Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec ceux trouvés par des études antérieures [10] [125] [121]. D'autres travaux ont aussi rapporté la néphrotoxicité par les pesticides chez les souris [119] et chez les rats [291].

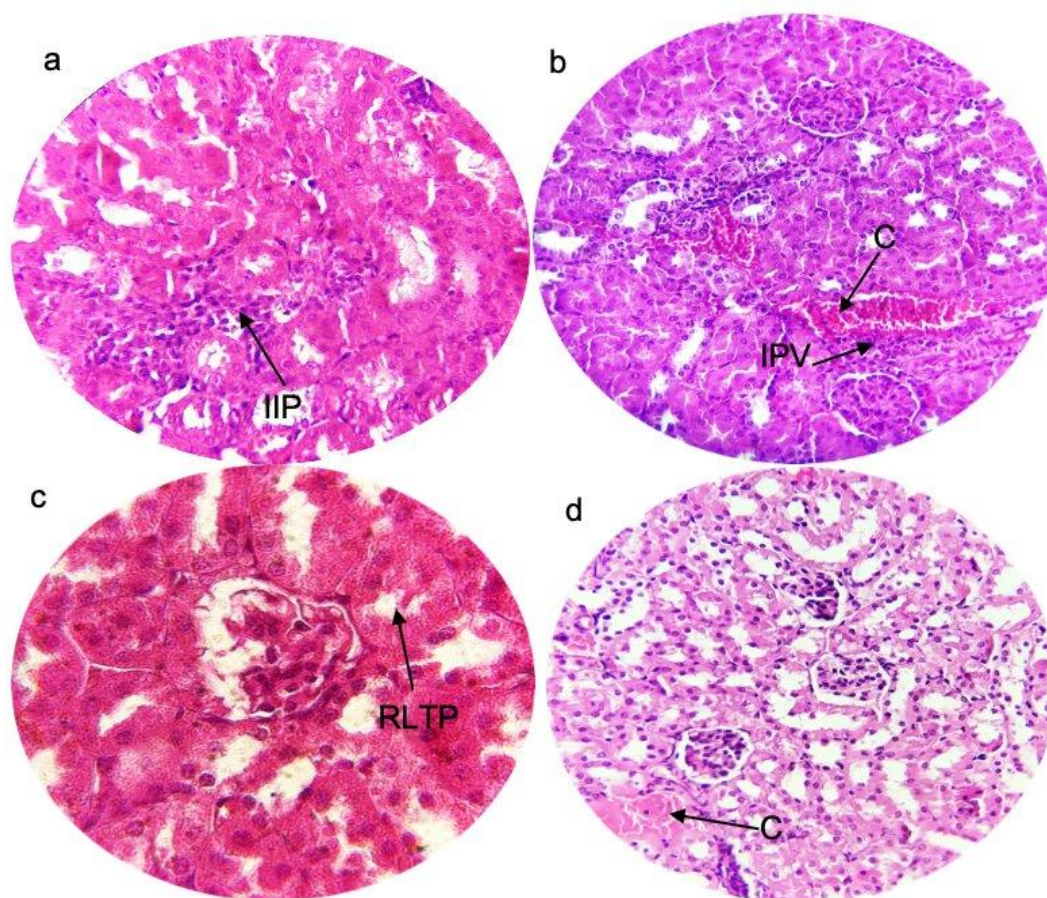


Figure 3.29 : Étude histologique des reins des souris traitées par PD2 et PD3 de l'étude de la toxicité subaiguë (H.E, GrX40 a,b,d et GrX100 c)

IIP : inflammation intra-parenchymateuse et IPV :péri-vasculaire, C : congestion, RLTP :restriction des lumières des tubules proximaux

## CONCLUSION

Les travaux de recherches entrepris au cours de cette étude nous ont permis d'évaluer et de comparer la toxicité d'un biopesticide formulé à base de l'HE de *P. aquilinum* et d'un pesticide néonicoténoïque à savoir, l'ACMP sur des souris, ainsi que l'extraction et la caractérisation de cette HE et l'évaluation de ses activités dans la lutte biologique.

Le criblage phytochimique des frondes de la fougère aigle a montré une composition riche et variée en métabolites secondaires représentés essentiellement par les tanins, les flavonoïdes, les stérols / terpénoïdes et les saponines.

L'analyse chimique des composés volatils des frondes de *P. aquilinum* par GC/SM a permis d'identifier 58 composants, représentant 69,44 % de la composition totale, dont les monoterpènes oxygénés à 32.86 %. Ces analyses ont permis de mettre en évidence la prédominance du linalool et du carvacrol. Nous avons noté une variabilité chimique importante des constituants de l'HE analysé par rapport à celles du Nigeria et de la Pologne.

Sur la base de l'analyse chromatographique de l'huile volatile de la fougère aigle, des tests antimicrobiens et insecticides ont été effectués respectivement sur des souches phytopathogènes à savoir, *Erwinia amylovora*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* et *Aspergillus niger*, ainsi que sur le puceron de la fève *Aphis fabae*. Les résultats obtenus ont dévoilés une activité biocide remarquable et puissante de l'HE de la plante testée contre les différents ravageurs ciblés.

De même le biopesticide formulé , à base de l'HE de *P. aquilinum* , a présenté une efficacité importante sur les populations du puceron de la fève *A. fabae*. Son effet insecticide était comparable à celui du pesticide chimique « ACMP » à une concentration de 4% à partir de 24h.



Sur le plan toxicologique, la  $DL_{50}$  de l'HE et du biopesticide chez les souris femelles a été supérieure à 2000 mg/kg et aucune altération histologique hépatique et rénale n'est constatée.

À la lumière des résultats obtenus sur la comparaison de l'effet toxique subaigu des trois doses testées du biopesticide (400, 200 et 100 mg/kg) et de l'ACMP (1/4, 1/8, et 1/16 de la  $DL_{50}$ ) durant 28 jours, on peut conclure que :

- Le gavage des souris mâles et femelles par l'ACMP et le biopesticide n'a pas induits des perturbations dans leur comportement ;
- Une diminution significative du pourcentage du gain du poids relatif des souris traitées par la forte dose du biopesticide et les trois doses d'ACMP ;
- Une augmentation du poids relatif du foie a été observée chez les souris mâles et femelles traitées par la forte dose d'ACMP ;
- L'évaluation des paramètres hématologiques et biochimiques montre également une perturbation après l'administration subaiguë de l'ACMP. Toutefois, le traitement par le biopesticide n'a pas affecté significativement ces paramètres ;
- Une diminution des niveaux des GR, de HGB et de HCT et une augmentation du MCV et GB chez les souris mâles femelles traitées par PD1, ainsi qu'une augmentation des PLT chez les mâles ;
- Une augmentation des taux de l'urée, créatinine, ASAT, ALAT et PAL chez les souris traitées par PD1 ;
- Une diminution des protéines totales chez les souris mâles et une augmentation chez les femelles traitées par PD1 ainsi que le groupe satellite PD1S ;
- L'étude anatomo-pathologique du foie et des reins a révélé que le biopesticide n'a causé aucune altération tissulaire. Tandis qu'une exposition à l'ACM a entraîné une hépatotoxicité et une néphrotoxicité dose - dépendante.
- L'histopathologie hépatiques des souris traitées par la forte dose d'ACPM et celles du groupe satellite a montré des altérations marquées par une dilatation sévère de la veine centrolobulaire et de la triade portale, une

infiltration inflammatoire péri-vasculaire et intra-parenchymateuse ainsi qu'une dilatation des capillaires sinusoides ;

- Une infiltration inflammatoire péri-vasculaire et intra-parenchymateuse, une perte de l'architecture de certains tubules avec un aplatissement des cellules épithéliales des tubules distaux et une restriction des lumières des tubules proximaux, une congestion, une hémorragie interstitielle, un élargissement de l'espace capsulaire ainsi que l'atrophie des glomérules, sont révélés dans l'étude histo-pathologique du parenchyme rénal.

Les résultats ci-dessus suggèrent que le foie et le rein sont affectés par l'administration subaiguë de l'ACMP. D'autres études toxicologiques pourront être envisagées. Il serait intéressant d'évaluer la toxicité subchronique de ce pesticide chez les rats ainsi que ses effets sur le système nerveux.

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'HE de *P. aquilinum* comme biopesticide. Sur la base des résultats obtenus, les doses testées chez les souris n'ont montré aucun signe de toxicité biochimique, hématologique et histologique. Nos résultats obtenus sont des travaux préliminaires et initiatifs en Algérie sur cette espèce ; il serait souhaitable de poursuivre ces travaux en évaluant :

- les autres activités biocides du biopesticide afin de déterminer son spectre d'action;
  - son efficacité sur le terrain qui viserait à préciser sa stabilité ;
  - sa toxicité subchronique de 90 jours chez les rats,
  - ses effets secondaires sur la faune auxiliaire,
- ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

## APPENDICE A

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

<b>ACh</b>	: Acétylcholine
<b>AChE</b>	: Acétylcholinestérase
<b>ACI</b>	: Agro Consulting International
<b>ACMP</b>	: Acétamipride
<b>BD1</b>	: Forte dose du biopesticide (400 mg/kg du poids corporel)
<b>BD2</b>	: Moyenne dose du biopesticide (200 mg/kg du poids corporel)
<b>BD3</b>	: Faible dose du biopesticide (100 mg/kg du poids corporel)
<b>BD1S</b>	: Forte dose du biopesticide du groupe satellite
<b>CG/SM</b>	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>CMI</b>	: Concentration minimale inhibitrice
<b>DL<sub>50</sub></b>	: Dose létale qui tue 50% de la population
<b>DL<sub>90</sub></b>	: Dose létale qui tue 90% de la population
<b>DMSO</b>	: Diméthylsulfoxyde
<b>DRO</b>	: Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>ENSA</b>	: École National Supérieur d'Agronomie
<b>FAO</b>	: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
<b>GB</b>	: Globules blancs
<b>GPR</b>	: Gain du poids relatif
<b>GR</b>	: Globules rouges
<b>HCT</b>	: Hématocrite
<b>HGB</b>	: Hémoglobine
<b>INPV</b>	: Institut National de Protection des Végétaux
<b>IR</b>	: Indice de rétention
<b>LOAEL</b>	: dose minimale avec effet nocif observé
<b>LPGA</b>	: Levure Peptone Glucose Agar
<b>MC</b>	: Mortalité corrigée
<b>MCH</b>	: teneur corpusculaire en Hémoglobine
<b>MCHc</b>	: Concentration corpusculaire moyenne en Hémoglobine
<b>MCV</b>	: Volume globulaire moyen
<b>nAChR</b>	: récepteurs nicotiques de l'acétylcholine
<b>NMRI</b>	: Naval Medical Research
<b>NOAEL</b>	: Dose sans effet nocif observé
<b>OCDE</b>	: Organisation de Coopération et de Développement Économique



**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**ONAB** : Office National des Aliments du Bétail  
**PD1** : Forte dose du pesticide (1/4 de DL<sub>50</sub>)  
**PD2** : Moyenne dose du pesticide (1/8 de DL<sub>50</sub>)  
**PD3** : Faible dose du pesticide (1/16 de DL<sub>50</sub>)  
**PD1S** : Forte dose du pesticide groupe satellite  
**PDA** : Agar Dextrose de Pomme de terre  
**PI** : Pourcentage d'inhibition  
**PLT** : Plaquettes  
**R** : Rendement de l'HE  
**SEM** : Erreur standard de la moyenne  
**SM** : Spectre de masse  
**SNC** : Système nerveux central  
**TR** : Temps de rétention

## APPENDICE B

### SCREENING PHYTOCHIMIQUE

#### Test des alcaloïdes

➤ Solution à analyser

10 g de la poudre végétale a été mélangé à 50 ml de l'acide sulfurique  $H_2SO_4$  dilué au 1/10. Cette préparation a été agité et laissé macérer pendant 24 heures à température ambiante du laboratoire. Nous l'avons filtré sur papier et lavé à l'eau distillée de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat.

➤ Caractérisation

1 ml du filtrat est introduit dans deux tubes à essai auxquels nous ajoutons :  
Tube n°1 : 5 gouttes de réactif de Mayer (solution aqueuse de mercuri-iodure de potassium).

Tube n°2 : 5 gouttes de réactif de Dragendorff (solution aqueuse d'iodobismuthite de potassium).

La présence d'alcaloïdes a été caractérisée par les précipités dans les tubes à essai. Les résultats ont été classés comme suit : test positif : + test négatif : 0

#### Les substances polyphénoliques

➤ Solution à analyser

Un infusé à 5% a été préparé par l'ajout de 5 g de la poudre végétale à 100 ml de l'eau distillée bouillante. Nous l'avons filtré sur papier et rincé avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir 100 ml de filtrat.

➤ Caractérisation

#### Tanins

Une quantité de 1 ml d'une solution aqueuse diluée de  $FeCl_3$  à 1% a été à 5 ml d'infusé à 5% dans un tube à essai. En présence de tanins il se développe une coloration verdâtre ou bleu noirâtre.

### Tanins catéchiques (réaction de Stiasny)

A 30 ml d'infusé à 5%, nous avons ajouté 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40% et 5 ml HCl concentré) et chauffé au bain-marie à 90°C pendant 15 mn. L'obtention d'un précipité montre la présence de tanins catéchiques.

### Tanins galliques

Filtrer et saturer le filtrat d'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1 ml d'une solution de FeCl<sub>3</sub> à 1%. Le développement d'une teinte bleu noire indique la présence de tanins non précipités par le réactif de Stiasny : ce sont les tanins galliques.

### Flavonoïdes

#### Anthocyanes

A 5 ml d'infusé, ajouter 5 ml d'acide sulfurique puis 5 ml de NH<sub>4</sub>OH. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé en milieu basique, on peut conclure la présence d'anthocyane.

#### Flavonoïdes libres ou génines (à la réaction à la cyanidine)

Introduire dans un tube à essai 5 ml d'infusé, ajouter 5 ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCl concentré à parties égales en volume), 1 ml d'alcool isoamylique puis quelques copeaux de magnésium. Sur la couche surnageante d'alcool isoamylique, l'apparition d'une coloration : rose orangée (flavones), rose-violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. Cette réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les aurones, les catéchines et les isoflavones.

### Tests des stérols – triterpènes- coumarines

#### ➤ Solution à analyser

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 g de poudre et 20 ml d'éther. Boucher, agiter et laisser au réfrigérateur pendant 24 heures ; puis filtrer sur papier filtre, ensuite compléter à 20 ml avec de l'éther

➤ Caractérisation

Stérols- Triterpènes (Réaction de Lieberman-Burchard)

Dans une capsule, évaporer à sec 10 ml de l'extrait. Dissoudre le résidu dans 1 ml d'anhydride acétique et 1 ml de chloroforme (CHCl<sub>3</sub>). Répartir le mélange dans deux tubes à essai dont l'un servira de référence. A l'aide d'une pipette, déposer 1 à 2 ml de l'acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) au fond du tube à essai sans agitation. A la zone de contact des deux liquides il y a formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, la couche surnageante devenant verte ou violette révèle la présence de stérols et de triterpènes.

Coumarines

Ajouter à 5 ml d'extrait étheré évaporé à sec ,2 ml d'eau chaude. Partager la solution entre deux tubes à essai. Ajouter au contenu de l'un 0,5 ml de l'ammoniaque diluée à 25 %. Observer la fluorescence sous UV 366 nm. La présence de fluorescence dans le tube où il a été ajouté de l'ammoniaque indique la présence des coumarines.

Test des saponosides

➤ Solution à analyser

Mélanger 1 g de poudre avec 100 ml d'eau distillée. Maintenir à ébullition pendant 15 mn. Filtrer et après refroidissement ajuster à 100 ml.

➤ Caractérisation

Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, introduire successivement 1,2, 3, ...,10 ml de décocté. Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée. Agiter chaque tube dans le sens de la longueur du tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. Laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse. Si celle-ci est inférieure à 1 cm dans tous les tubes l'indice est moins de 100. La dilution dans le tube où la hauteur de la mousse est égale à 1 cm représente l'indice recherché. Si la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm dans les tubes, dans ce cas il est nécessaire de préparer une nouvelle série de dilution de la décoction et recommencer le processus de détermination.

**Indice de mousse = 100 / n° du tube où la hauteur de mousse est de 1cm**

## REALISATION DES COUPES HISTOLOGIQUES

- Fixation et rinçage : Le foie et les reins déposés dans des cassettes d'inclusion, ont été lavés plusieurs fois avec de l'eau du robinet pour éliminer l'excès de fixateur après 48h de fixation dans une solution du formol à 10 %. Le but de cette étape est de figer le tissu dans l'état le plus proche de son état initial et de garder sa structure morphologique et son intégrité chimique.

- Déshydratation et éclaircissement : ils permettent d'éliminer l'eau à partir des tissus pour les imprégner à la paraffine. La déshydratation est réalisée dans trois bains d'éthanol à concentration croissante 70, 95 et 100%, respectivement pendant une heure chacun. L'éclaircissement est ensuite effectué dans un bain de xylène pendant 1 heure. Cette étape permet d'éliminer l'alcool à partir des tissus.

- Imprégnation : les tissus sont ensuite imprégnés dans deux bains successifs dont le premier contient 50 % de xylène et 50 % de paraffine et le second contient la paraffine pure durant une heure chacun dans une étuve réglée à 58 °C.

- Inclusion et mise en bloc : elle est réalisée dans des cassettes en plastique selon les étapes suivantes : écoulement de la paraffine dans des moules métalliques, inclusion et orientation des pièces dans la paraffine et refroidissement des blocs sur une plaque métallique réfrigérée environ 10 minutes.

- Confection des coupes : Les blocs de tissu ont été sectionnés à une épaisseur de 3 à 5 µm. les rubans sont étalés dans un bain marie (37 °C) puis récupérés et collés sur des lames propres. Ces dernières sont séchées dans une étuve réglée à 25 °C pendant 24 heures.

- Déparaffinage et réhydratation : cette étape sert à retirer la paraffine du tissu et la remplacer par l'eau pour permettre la pénétration des colorants. Les coupes sont passées dans un bain de xylène pendant 30 minutes. Cependant, la réhydratation a pour but de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau. Les organes sont imprégnés dans un bain d'alcool 100 ° pendant 10 minutes.

- Coloration : elle permet de visualiser les différents composants tissulaires et cellulaires. Dans notre étude, nous avons appliqué la technique de coloration d'hématoxyline-éosine : C'est une coloration topographique qui permet de visualiser la morphologie des cellules (noyau bleu et cytoplasme rose violacé) afin de déterminer leur répartition, architecture et structure.

- Montage et observation: les lames sont prolongées dans un bain de xylène pour l'éclaircissement. Une lamelle est fixée sur chaque lame par l'Eukitt. A la fin, les lames sont nettoyées au xylène puis séchées et observées au microscope optique Leica (DM1000, Allemagne) aux différents grossissements (G x10, G x40 et G x100).

## APPENDICE C

Tableau C1 : Teneur en eau des frondes de *P. aquilinum*

	M1	M2	PE	H%	MS %
1 <sup>er</sup> essai	1,5139	0,6474	1,1252	77	23
2 <sup>ème</sup> essai	1,9842	0,6801	1,6811	77,57	22,43
3 <sup>ème</sup> essai	0,9675	0,4580	0,6821	74,7	25,3
Moyenne	/	/	/	76,42	23,58
Écart-type	/	/	/	1,52	1,52

Tableau C2: Teneur en huile essentielle des frondes de *P. aquilinum*

	Poids des frondes secs (g)	Poids de l'huile essentielle (g)	Rendement %
1 <sup>er</sup> essai	150g	0,030	0,02
2 <sup>ème</sup> essai	150g	0,045	0,03
3 <sup>ème</sup> essai	150g	0,036	0,024
Moyenne	/	/	0,025
Écart-type	/	/	0,005

## APPENDICE D

### 1. Étude statistique de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre les bactéries phytopathogènes

Tableau D1: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Erwinia amylovora*

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : HEF, B: B : STREPTOMICINE, C : DMSO
F	784,5
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Oui
R Carré	0,9962

Tableau D2 : Comparaison des moyennes (test de Tukey ) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Erwinia amylovora*

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 3					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Tukey	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
HEF vs. STREPTOMICINE	17	14,95 to 19,05	Oui	****	<0,0001
HEF vs. DMSO	26	23,95 to 28,05	Oui	****	<0,0001
STREPTOMICINE vs. DMSO	9	6,954 to 11,05	Oui	****	<0,0001

Tableau D3 : Tableau : Analyse de variance (ANOVA à un facteur) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : HEF, B: B : STREPTOMICINE, C : DMSO
F	648,4
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Oui
R Carré	0,9954

Tableau D4: Comparaison des moyennes (test de Tukey ) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 3					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Tukey	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
HEF vs. STREPTOMICINE	12,33	9,971 to 14,7	Oui	****	<0,0001
HEF vs. DMSO	27,67	25,3 to 30,03	Oui	****	<0,0001
STREPTOMICINE vs. DMSO	15,33	12,97 to 17,7	Oui	****	<0,0001

Tableau D5: Tableau : Analyse de variance (ANOVA à un facteur) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi*.

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : HEF, B : B : STREPTOMICINE, C : DMSO
F	1263
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Oui
R Carré	0,9976

Tableau D6 : Comparaison des moyennes (test de Tukey ) de l'activité antibactérienne de l'HE de *P. aquilinum* contre *Pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi*.

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 3					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Tukey	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
HEF vs. STREPTOMICINE	17,33	15,66 to 19	Oui	****	<0,0001
HEF vs. DMSO	27	25,33 to 28,67	Oui	****	<0,0001
STREPTOMICINE vs. DMSO	9,667	7,997 to 11,34	Oui	****	<0,0001



2. Étude statistique de l'activité antifongique de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. niger*.

Tableau D7: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) de l'effet des différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* sur la croissance mycélienne d'*A. niger*.

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin, B : HE 2% , C : HE 1%, D: HE 1/2%, E: HE 1/4%
F	3664
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Oui
R Carré	0,9993

Tableau D8: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de l'effet des différentes concentrations de l'HE de *P. aquilinum* sur la croissance mycélienne d'*A. niger*.

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 4					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. HE 2%	63,67	61,84 to 65,49	Oui	****	<0,0001
Témoin vs. HE 1%	63,67	61,84 to 65,49	Oui	****	<0,0001
Témoin vs. HE 1/2%	57,33	55,51 to 59,16	Oui	****	<0,0001
Témoin vs. HE 1/4%	55	53,17 to 56,83	Oui	****	<0,0001

3. Étude statistique de l'activité aphicide de l'HE de *P. aquilinum* contre *A. fabae*.

Tableau D9: Analyse de la variance (Après 12h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	9228,133	2307,033	77,742	< 0,0001
Erreur	20	593,507	29,675		
Total corrigé	24	9821,640			

Tableau D10: Analyse de la variance (Après 24h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	7081,059	1770,265	47,459	<b>&lt; 0,0001</b>
Erreur	20	746,016	37,301		
Total corrigé	24	7827,076			

Tableau D11: Analyse de la variance (Après 36h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	3278,776	819,694	22,277	<b>&lt; 0,0001</b>
Erreur	20	735,927	36,796		
Total corrigé	24	4014,703			

Tableau D12: Analyse de la variance (Après 48h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	1475,879	368,970	10,993	<b>&lt; 0,0001</b>
Erreur	20	671,289	33,564		
Total corrigé	24	2147,168			

Tableau D13: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 12h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 5 µl/ml	58,366	17,838	2,317	<b>&lt; 0,0001</b>	0,226	Oui
ACMP vs 10 µl/ml	47,730	14,588	2,281	<b>&lt; 0,0001</b>	0,185	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	45,072	13,775	2,234	<b>&lt; 0,0001</b>	0,143	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	21,346	6,524	2,168	<b>&lt; 0,0001</b>	0,098	Oui
ACMP vs 80 µl/ml	5,812	1,776	2,064	0,088	0,050	Non
80 µl/ml vs 5 µl/ml	52,554	16,062	2,281	<b>&lt; 0,0001</b>	0,185	Oui
80 µl/ml vs 10 µl/ml	41,918	12,811	2,234	<b>&lt; 0,0001</b>	0,143	Oui
80 µl/ml vs 20 µl/ml	39,260	11,999	2,168	<b>&lt; 0,0001</b>	0,098	Oui
80 µl/ml vs 40 µl/ml	15,534	4,748	2,064	<b>&lt; 0,0001</b>	0,050	Oui
40 µl/ml vs 5 µl/ml	37,020	11,314	2,234	<b>&lt; 0,0001</b>	0,143	Oui
40 µl/ml vs 10 µl/ml	26,384	8,064	2,168	<b>&lt; 0,0001</b>	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	23,726	7,251	2,064	<b>&lt; 0,0001</b>	0,050	Oui
20 µl/ml vs 5 µl/ml	13,294	4,063	2,168	<b>0,001</b>	0,098	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	2,658	0,812	2,064	0,425	0,050	Non
10 µl/ml vs 5 µl/ml	10,636	3,251	2,064	<b>0,003</b>	0,050	Oui

Tableau D14: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 24h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 5 µl/ml	45,202	12,689	2,317	< <b>0,0001</b>	0,226	Oui
ACMP vs 10 µl/ml	38,742	10,876	2,281	< <b>0,0001</b>	0,185	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	35,624	10,000	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	14,688	4,123	2,168	<b>0,001</b>	0,098	Oui
ACMP vs 80 µl/ml	0,146	0,041	2,064	0,968	0,050	Non
80 µl/ml vs 5 µl/ml	45,056	12,648	2,281	< <b>0,0001</b>	0,185	Oui
80 µl/ml vs 10 µl/ml	38,596	10,835	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
80 µl/ml vs 20 µl/ml	35,478	9,959	2,168	< <b>0,0001</b>	0,098	Oui
80 µl/ml vs 40 µl/ml	14,542	4,082	2,064	<b>0,000</b>	0,050	Oui
40 µl/ml vs 5 µl/ml	30,514	8,566	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
40 µl/ml vs 10 µl/ml	24,054	6,752	2,168	< <b>0,0001</b>	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	20,936	5,877	2,064	< <b>0,0001</b>	0,050	Oui
20 µl/ml vs 5 µl/ml	9,578	2,689	2,168	<b>0,033</b>	0,098	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	3,118	0,875	2,064	0,390	0,050	Non
10 µl/ml vs 5 µl/ml	6,460	1,813	2,064	0,082	0,050	Non

Tableau D15: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 36h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
80 µl/ml vs 5 µl/ml	31,704	8,521	2,317	< <b>0,0001</b>	0,226	Oui
80 µl/ml vs 10 µl/ml	25,686	6,904	2,281	< <b>0,0001</b>	0,185	Oui
80 µl/ml vs 20 µl/ml	21,424	5,758	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
80 µl/ml vs 40 µl/ml	9,410	2,529	2,168	<b>0,047</b>	0,098	Oui
80 µl/ml vs ACMP	2,246	0,604	2,064	0,552	0,050	Non
ACMP vs 5 µl/ml	29,458	7,917	2,281	< <b>0,0001</b>	0,185	Oui
ACMP vs 10 µl/ml	23,440	6,300	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	19,178	5,154	2,168	< <b>0,0001</b>	0,098	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	7,164	1,925	2,064	0,066	0,050	Non
40 µl/ml vs 5 µl/ml	22,294	5,992	2,234	< <b>0,0001</b>	0,143	Oui
40 µl/ml vs 10 µl/ml	16,276	4,375	2,168	<b>0,001</b>	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	12,014	3,229	2,064	<b>0,004</b>	0,050	Oui
20 µl/ml vs 5 µl/ml	10,280	2,763	2,168	<b>0,028</b>	0,098	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	4,262	1,145	2,064	0,263	0,050	Non
10 µl/ml vs 5 µl/ml	6,018	1,617	2,064	0,119	0,050	Non

Tableau D16: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 48h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 5 µl/ml	23,490	6,215	2,317	<b>&lt; 0,0001</b>	0,226	Oui
ACMP vs 10 µl/ml	22,164	5,864	2,281	<b>&lt; 0,0001</b>	0,185	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	14,780	3,910	2,234	<b>0,003</b>	0,143	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	12,522	3,313	2,168	<b>0,008</b>	0,098	Oui
ACMP vs 80 µl/ml	2,132	0,564	2,064	0,578	0,050	Non
80 µl/ml vs 5 µl/ml	21,358	5,651	2,281	<b>&lt; 0,0001</b>	0,185	Oui
80 µl/ml vs 10 µl/ml	20,032	5,300	2,234	<b>0,000</b>	0,143	Oui
80 µl/ml vs 20 µl/ml	12,648	3,346	2,168	<b>0,007</b>	0,098	Oui
80 µl/ml vs 40 µl/ml	10,390	2,749	2,064	<b>0,011</b>	0,050	Oui
40 µl/ml vs 5 µl/ml	10,968	2,902	2,234	<b>0,037</b>	0,143	Oui
40 µl/ml vs 10 µl/ml	9,642	2,551	2,168	<b>0,045</b>	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	2,258	0,597	2,064	0,556	0,050	Non
20 µl/ml vs 5 µl/ml	8,710	2,304	2,168	0,074	0,098	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	7,384	1,954	2,064	0,063	0,050	Non
10 µl/ml vs 5 µl/ml	1,326	0,351	2,064	0,729	0,050	Non

#### 4. Étude statistique de l'activité aphicide du biopesticide contre *A. fabae*.

Tableau D17: Analyse de la variance (Après 12h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	1366,083	683,042	57,320	<b>&lt; 0,0001</b>
Erreur	12	142,996	11,916		
Total corrigé	14	1509,080			

Tableau D18: Analyse de la variance (Après 24h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	1192,329	596,165	46,983	<b>&lt; 0,0001</b>
Erreur	12	152,268	12,689		
Total corrigé	14	1344,598			

Tableau D19: Analyse de la variance (Après 36h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	977,561	488,781	47,374	< <b>0,0001</b>
Erreur	12	123,809	10,317		
Total corrigé	14	1101,371			

Tableau D20: Analyse de la variance (Après 48h)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	912,501	456,251	31,103	< <b>0,0001</b>
Erreur	12	176,026	14,669		
Total corrigé	14	1088,528			

Tableau D21: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 12h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 10 µl/ml	28,362	12,951	2,287	< 0,0001	0,143	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	11,114	5,075	2,223	0,000	0,098	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	6,074	2,774	2,120	0,014	0,050	Oui
40 µl/ml vs 10 µl/ml	22,288	10,178	2,223	< 0,0001	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	5,040	2,301	2,120	0,035	0,050	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	17,248	7,876	2,120	< 0,0001	0,050	Oui

Tableau D22: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 24h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 10 µl/ml	22,038	10,765	2,287	< 0,0001	0,143	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	7,356	3,593	2,223	0,006	0,098	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	0,696	0,340	2,120	0,738	0,050	Non
40 µl/ml vs 10 µl/ml	21,342	10,425	2,223	< 0,0001	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	6,660	3,253	2,120	0,005	0,050	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	14,682	7,172	2,120	< 0,0001	0,050	Oui

Tableau D23: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 36h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
40 µl/ml vs 10 µl/ml	19,674	8,418	2,287	< 0,0001	0,143	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	8,114	3,472	2,223	0,008	0,098	Oui
40 µl/ml vs ACMP	2,530	1,083	2,120	0,295	0,050	Non
ACMP vs 10 µl/ml	17,144	7,336	2,223	< 0,0001	0,098	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	5,584	2,389	2,120	0,030	0,050	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	11,560	4,946	2,120	0,000	0,050	Oui

Tableau D24: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 48h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
ACMP vs 10 µl/ml	20,154	6,700	2,287	< 0,0001	0,143	Oui
ACMP vs 20 µl/ml	10,046	3,340	2,223	0,011	0,098	Oui
ACMP vs 40 µl/ml	1,060	0,352	2,120	0,729	0,050	Non
40 µl/ml vs 10 µl/ml	19,094	6,348	2,223	< 0,0001	0,098	Oui
40 µl/ml vs 20 µl/ml	8,986	2,987	2,120	0,009	0,050	Oui
20 µl/ml vs 10 µl/ml	10,108	3,360	2,120	0,004	0,050	Oui

Tableau D25: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 12h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
BIO 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	41,656	15,158	2,317	< 0,0001	0,226	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	38,998	14,191	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	22,288	8,110	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 40 µl/ml	15,272	5,557	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 20 µl/ml	5,040	1,834	2,064	0,079	0,050	Non
BIO 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	36,616	13,324	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 20 µl/ml	33,958	12,357	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
BIO 20 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	17,248	6,276	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 40 µl/ml	10,232	3,723	2,064	0,001	0,050	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	26,384	9,601	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	23,726	8,633	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
HE 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	7,016	2,553	2,064	0,017	0,050	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 10 µl/ml	19,368	7,048	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 20 µl/ml	16,710	6,080	2,064	< 0,0001	0,050	Oui
HE 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	2,658	0,967	2,064	0,343	0,050	Non

Tableau D26: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 24h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
BIO 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	38,046	12,17	2,317	< 0,0001	0,226	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	34,928	11,172	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	21,342	6,827	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 40 µl/ml	13,992	4,476	2,168	0,000	0,098	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 20 µl/ml	6,66	2,13	2,064	0,044	0,05	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	31,386	10,039	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 20 µl/ml	28,268	9,042	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
BIO 20 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	14,682	4,696	2,168	0,000	0,098	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 40 µl/ml	7,332	2,345	2,064	0,028	0,05	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	24,054	7,694	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	20,936	6,697	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
HE 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	7,35	2,351	2,064	0,027	0,05	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 10 µl/ml	16,704	5,343	2,168	< 0,0001	0,098	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 20 µl/ml	13,586	4,346	2,064	0,000	0,05	Oui
HE 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	3,118	0,997	2,064	0,329	0,05	Non

Tableau D27: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 36h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
BIO 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	25,97	9,953	2,317	< 0,0001	0,226	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	21,708	8,319	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	19,674	7,54	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 40 µl/ml	9,694	3,715	2,168	0,003	0,098	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 20 µl/ml	8,114	3,11	2,064	0,005	0,05	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	17,856	6,843	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 20 µl/ml	13,594	5,21	2,234	0,000	0,143	Oui
BIO 20 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	11,56	4,43	2,168	0,001	0,098	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 40 µl/ml	1,58	0,606	2,064	0,551	0,05	Non
HE 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	16,276	6,238	2,234	< 0,0001	0,143	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	12,014	4,604	2,168	0,000	0,098	Oui
HE 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	9,98	3,825	2,064	0,001	0,05	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 10 µl/ml	6,296	2,413	2,168	0,06	0,098	Oui
BIO 10 µl/ml vs HE 20 µl/ml	2,034	0,78	2,064	0,443	0,05	Non
HE 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	4,262	1,633	2,064	0,115	0,05	Non

Tableau D28: Doses / Duncan / Analyse des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95% (Après 48h) :

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	alpha (Modifié)	Significatif
BIO 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	21,104	7,737	2,317	< 0,0001	0,226	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	19,094	7	2,281	< 0,0001	0,185	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	13,72	5,03	2,234	0,000	0,143	Oui
BIO 40 µl/ml vs HE 40 µl/ml	11,462	4,202	2,168	0,001	0,098	Oui
BIO 40 µl/ml vs BIO 20 µl/ml	8,986	3,294	2,064	0,003	0,05	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	12,118	4,443	2,281	0,001	0,185	Oui
BIO 20 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	10,108	3,706	2,234	0,006	0,143	Oui
BIO 20 µl/ml vs HE 20 µl/ml	4,734	1,736	2,168	0,213	0,098	Non
BIO 20 µl/ml vs HE 40 µl/ml	2,476	0,908	2,064	0,373	0,05	Non
HE 40 µl/ml vs HE 10 µl/ml	9,642	3,535	2,234	0,009	0,143	Oui
HE 40 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	7,632	2,798	2,168	0,026	0,098	Oui
HE 40 µl/ml vs HE 20 µl/ml	2,258	0,828	2,064	0,416	0,05	Non
HE 20 µl/ml vs HE 10 µl/ml	7,384	2,707	2,168	0,032	0,098	Oui
HE 20 µl/ml vs BIO 10 µl/ml	5,374	1,97	2,064	0,06	0,05	Non
BIO 10 µl/ml vs HE 10 µl/ml	2,01	0,737	2,064	0,468	0,05	Non



## APPENDICE E

### 1. Évaluation de la toxicité aiguë de l'HE de *P. aquilinum* et du biopesticide

Tableau E1 : Poids absolus et relatifs des organes des souris traitées et témoins de l'étude de la toxicité aiguë

	Foie		Reins		Rate		Poumons		Cœur	
	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO	PAO	PRO
Témoin	1,685 ± 0,047	5,373 ± 0,101	0,356 ± 0,004	1,136 ± 0,003	0,136 ± 0,010	0,433 ± 0,027	0,202 ± 0,003	0,645 ± 0,004	0,172 ± 0,002	0,548 ± 0,004
HE 300 mg/kg	1,651 ± 0,028	5,382 ± 0,065	0,348 ± 0,004	1,135 ± 0,003	0,132 ± 0,002	0,431 ± 0,011	0,199 ± 0,001	0,649 ± 0,009	0,168 ± 0,004	0,546 ± 0,011
HE 2000 mg/kg	1,688 ± 0,054	5,383 ± 0,121	0,355 ± 0,003	1,134 ± 0,004	0,134 ± 0,003	0,427 ± 0,010	0,203 ± 0,002	0,646 ± 0,003	0,172 ± 0,002	0,548 ± 0,008
Témoin	1,774 ± 0,047	5,380 ± 0,164	0,375 ± 0,005	1,136 ± 0,010	0,145 ± 0,005	0,439 ± 0,014	0,213 ± 0,002	0,645 ± 0,009	0,180 ± 0,002	0,544 ± 0,005
BIO 2000 mg/kg	1,717 ± 0,015	5,368 ± 0,041	0,364 ± 0,005	1,137 ± 0,005	0,142 ± 0,004	0,445 ± 0,011	0,206 ± 0,003	0,644 ± 0,008	0,174 ± 0,002	0,545 ± 0,013

PAO (g) : poids absolu de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM(n=6)  
 PRO (%) : poids relatif de l'organe. Les données sont exprimées en moyenne ± SEM(n=6)

Tableau E2: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du poids corporel du jour 0 des souris de l'étude de la toxicité aiguë

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin, B : 300 mg/kg, C : 2000 mg/kg
F	0,5303
Valeur du p	0,5991
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,06604

Tableau E3: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du poids corporel du 14<sup>ème</sup> jour des souris de l'étude de la toxicité aiguë

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin, B : 300 mg/kg, C : 2000 mg/kg
F	0,8333
Valeur du p	0,4538
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1

Tableau E4: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du gain du poids relatif (GPR) des souris de l'étude de la toxicité aiguë

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin, B : 300 mg/kg, C : 2000 mg/kg
F	0,008131
Valeur du p	0,9919
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,001083

## 2. Évaluation de la toxicité subaiguë du biopesticide et de l'ACMP

Tableau E5: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids corporel des souris mâles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 5					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Jour 0					
Témoin Mâle vs. BD1M	0,6	-1,184 to 2,384	Non	ns	0,8898
Témoin Mâle vs. BD2M	0	-1,784 to 1,784	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. BD3M	0	-1,784 to 1,784	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. PD1M	0	-1,784 to 1,784	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. PD2M	-0,4	-2,184 to 1,384	Non	ns	0,9817
Témoin Mâle vs. PD3M	-0,6	-2,384 to 1,184	Non	ns	0,8898
7 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Mâle vs. BD1M	1,6	-0,1836 to 3,384	Non	ns	0,096
Témoin Mâle vs. BD2M	0,6	-1,184 to 2,384	Non	ns	0,8898
Témoin Mâle vs. BD3M	1	-0,7836 to 2,784	Non	ns	0,4968
Témoin Mâle vs. PD1M	2,2	0,4164 to 3,984	Oui	**	0,009
Témoin Mâle vs. PD2M	1,6	-0,1836 to 3,384	Non	ns	0,096
Témoin Mâle vs. PD3M	0,8	-0,9836 to 2,584	Non	ns	0,7082
14 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Mâle vs. BD1M	2	0,2164 to 3,784	Oui	*	0,0213
Témoin Mâle vs. BD2M	1,6	-0,1836 to 3,384	Non	ns	0,096
Témoin Mâle vs. BD3M	0,4	-1,384 to 2,184	Non	ns	0,9817
Témoin Mâle vs. PD1M	3,4	1,616 to 5,184	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD2M	2,2	0,4164 to 3,984	Oui	**	0,009
Témoin Mâle vs. PD3M	0,2	-1,584 to 1,984	Non	ns	0,9996
21 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Mâle vs. BD1M	3,6	1,816 to 5,384	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. BD2M	3,4	1,616 to 5,184	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. BD3M	1	-0,7836 to 2,784	Non	ns	0,4968
Témoin Mâle vs. PD1M	5,2	3,416 to 6,984	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD2M	4,6	2,816 to 6,384	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD3M	1,2	-0,5836 to 2,984	Non	ns	0,3138
28 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Mâle vs. BD1M	2,4	0,6164 to 4,184	Oui	**	0,0035
Témoin Mâle vs. BD2M	2	0,2164 to 3,784	Oui	*	0,0213
Témoin Mâle vs. BD3M	1	-0,7836 to 2,784	Non	ns	0,4968
Témoin Mâle vs. PD1M	7,2	5,416 to 8,984	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD2M	6,4	4,616 to 8,184	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD3M	1,6	-0,1836 to 3,384	Non	ns	0,096

Tableau E6: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids corporel des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes		5			
Nombre de comparaison entre groupe		6			
Alpha		0,05			
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Jour 0					
Témoin Femelle vs. BD1 F	0,6	-0,6287 to 1,829	Non	ns	0,633
Témoin Femelle vs. BD2 F	0,4	-0,8287 to 1,629	Non	ns	0,9031
Témoin Femelle vs. BD3 F	0	-1,229 to 1,229	Non	ns	>0,9999
Témoin Femelle vs. PD1 F	0	-1,229 to 1,229	Non	ns	>0,9999
Témoin Femelle vs. PD2 F	0,6	-0,6287 to 1,829	Non	ns	0,633
Témoin Femelle vs. PD3 F	-0,2	-1,429 to 1,029	Non	ns	0,9958
7 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Femelle vs. BD1 F	0,2	-1,029 to 1,429	Non	ns	0,9958
Témoin Femelle vs. BD2 F	0	-1,229 to 1,229	Non	ns	>0,9999
Témoin Femelle vs. BD3 F	0	-1,229 to 1,229	Non	ns	>0,9999
Témoin Femelle vs. PD1 F	1,6	0,3713 to 2,829	Oui	**	0,0051
Témoin Femelle vs. PD2 F	0,6	-0,6287 to 1,829	Non	ns	0,633
Témoin Femelle vs. PD3 F	-0,2	-1,429 to 1,029	Non	ns	0,9958
14 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Femelle vs. BD1 F	1,8	0,5713 to 3,029	Oui	**	0,0012
Témoin Femelle vs. BD2 F	1,2	-0,02875 to 2,429	Non	ns	0,0583
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,2	-1,029 to 1,429	Non	ns	0,9958
Témoin Femelle vs. PD1 F	3,4	2,171 to 4,629	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD2 F	3,2	1,971 to 4,429	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD3 F	1,2	-0,02875 to 2,429	Non	ns	0,0583
21 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Femelle vs. BD1 F	2	0,7713 to 3,229	Oui	***	0,0003
Témoin Femelle vs. BD2 F	1,4	0,1713 to 2,629	Oui	*	0,0187
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,6	-0,6287 to 1,829	Non	ns	0,633
Témoin Femelle vs. PD1 F	4,2	2,971 to 5,429	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD2 F	3,8	2,571 to 5,029	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD3 F	1,8	0,5713 to 3,029	Oui	**	0,0012
28 <sup>ème</sup> jour					
Témoin Femelle vs. BD1 F	2,2	0,9713 to 3,429	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. BD2 F	1,4	0,1713 to 2,629	Oui	*	0,0187
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,4	-0,8287 to 1,629	Non	ns	0,9031
Témoin Femelle vs. PD1 F	6,2	4,971 to 7,429	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD2 F	3	1,724 to 4,276	Oui	****	<0,0001
Témoin Femelle vs. PD3 F	1	-0,2287 to 2,229	Non	ns	0,1549

Tableau E 7: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids corporel des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 7					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Jour 0					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	0,4	-1,032 to 1,832	Non	ns	0,7517
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	0	-1,432 to 1,432	Non	ns	>0,9999
7 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	0,4	-1,084 to 1,884	Non	ns	0,7517
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	1,8	0,3161 to 3,284	Oui	*	0,0151
14 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	1,8	0,3632 to 3,232	Oui	*	0,0115
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	4	2,568 to 5,432	Oui	****	<0,0001
21 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	2,4	0,9682 to 3,832	Oui	**	0,0007
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	4	2,568 to 5,432	Oui	****	<0,0001
28 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	2,2	0,7682 to 3,632	Oui	**	0,0019
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	6,6	5,168 to 8,032	Oui	****	<0,0001
35 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	2,2	0,7682 to 3,632	Oui	**	0,0019
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	5,2	3,768 to 6,632	Oui	****	<0,0001
42 <sup>ème</sup> jour					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	1,6	0,1682 to 3,032	Oui	*	0,0263
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	3,8	2,368 to 5,232	Oui	****	<0,0001

Tableau E 8: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids corporel des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 7					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Jour 0					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	0,4	-1,211 to 2,011	Non	ns	0,7969
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	0,6	-1,011 to 2,211	Non	ns	0,6091
7 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	1,2	-0,4409 to 2,841	Non	ns	0,179
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	2,6	0,9591 to 4,241	Oui	**	0,0014
14 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	2,6	0,9591 to 4,241	Oui	**	0,0014
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	3,6	1,959 to 5,241	Oui	****	<0,0001
21 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	2,4	0,7591 to 4,041	Oui	**	0,0031
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	3,8	2,159 to 5,441	Oui	****	<0,0001
28 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	3	1,359 to 4,641	Oui	***	0,0002
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	4,2	2,559 to 5,841	Oui	****	<0,0001
35 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	2,4	0,7591 to 4,041	Oui	**	0,0031
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	3,8	2,159 to 5,441	Oui	****	<0,0001
42 <sup>ème</sup> jour					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	2,2	0,5591 to 3,841	Oui	**	0,0069
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	3,4	1,759 to 5,041	Oui	****	<0,0001

Tableau E 9: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du gain du poids relatif (GPR) des souris mâles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B : BD1M, C : BD2M, D : BD3M, E : PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	79,85
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Oui
R Carré	0,9448

Tableau E 10: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du gain du poids relatif (GPR) des souris mâles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin Mâle vs. BD1M	6,832	0,08704 to 13,58	Oui	*	0,0462
Témoin Mâle vs. BD2M	6,596	-0,149 to 13,34	Non	ns	0,0571
Témoin Mâle vs. BD3M	5,21	-1,535 to 11,95	Non	ns	0,1789
Témoin Mâle vs. PD1M	37,88	31,14 to 44,63	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD2M	36,88	30,14 to 43,63	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD3M	14,04	7,297 to 20,79	Oui	****	<0,0001

Tableau E 11: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du gain du poids relatif (GPR) des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin femelle, B : BD1F, C : BD2F, D : BD3F, E : PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	62,2
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Oui
R Carré	0,9302

Tableau E 12: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du gain du poids relatif (GPR) des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenn e	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité é	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	5,732	0,9163 to 10,55	Oui	*	0,0149
Témoin femelle vs. BD2F	3,5	-1,316 to 8,316	Non	ns	0,2244
Témoin femelle vs. BD3F	1,6	-3,216 to 6,416	Non	ns	0,8713
Témoin femelle vs. PD1F	24,93	20,11 to 29,74	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. PD2F	20,6	15,78 to 25,41	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. PD3F	5,066	0,2503 to 9,882	Oui	*	0,0363

Tableau E 13: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du gain du poids relatif (GPR) des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin mâle S, B: BD1MS, C: PD1MS
F	68,11
Valeur du p	<0,0001
Degré de significativité du p	****
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Oui
R Carré	0,919



Tableau E 14: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du gain du poids relatif (GPR) des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin mâle S vs. BD1MS	4,204	0,6762 to 7,732	Oui	*	0,021
Témoin mâle S vs. PD1MS	15,88	12,35 to 19,41	Oui	****	<0,0001

Tableau E 15: Analyse de variance (ANOVA à un facteur) du gain du poids relatif (GPR) des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin femelle S, B: BD1FS, C: PD1FS
F	7,763
Valeur du p	0,0069
Degré de significativité du p	**
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Oui
R Carré	0,564

Tableau E 16: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du gain du poids relatif (GPR) des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle S vs. BD1FS	6,502	0,4831 to 12,52	Oui	*	0,0348
Témoin femelle S vs. PD1FS	9,222	3,203 to 15,24	Oui	**	0,0045

Tableau E 17: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids relatif des organes des souris mâles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 5					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>Reins</b>					
Témoin Mâle vs. BD1 M	0,1321	-0,1496 to 0,4138	Non	ns	0,6699
Témoin Mâle vs. BD2 M	0,1297	-0,1521 to 0,4114	Non	ns	0,6864
Témoin Mâle vs. BD3 M	0,0518	-0,2299 to 0,3335	Non	ns	0,9934
Témoin Mâle vs. PD1M	0,02542	-0,2563 to 0,3071	Non	ns	0,9997
Témoin Mâle vs. PD2M	0,03668	-0,245 to 0,3184	Non	ns	0,9982
Témoin Mâle vs. PD3M	0,00484	-0,2769 to 0,2866	Non	ns	>0,9999
<b>Foie</b>					
Témoin Mâle vs. BD1 M	-0,05398	-0,3357 to 0,2277	Non	ns	0,9921
Témoin Mâle vs. BD2 M	0,0971	-0,1846 to 0,3788	Non	ns	0,8791
Témoin Mâle vs. BD3 M	0,1362	-0,1455 to 0,418	Non	ns	0,6419
Témoin Mâle vs. PD1M	-0,6122	-0,8939 to -0,3305	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD2M	-0,7208	-1,003 to -0,4391	Oui	****	<0,0001
Témoin Mâle vs. PD3M	-0,00854	-0,2903 to 0,2732	Non	ns	0,9999
<b>Rate</b>					
Témoin Mâle vs. BD1 M	-0,09226	-0,374 to 0,1895	Non	ns	0,9008
Témoin Mâle vs. BD2 M	-0,03544	-0,3172 to 0,2463	Non	ns	0,9995
Témoin Mâle vs. BD3 M	-0,02292	-0,3046 to 0,2588	Non	ns	0,9997
Témoin Mâle vs. PD1M	-0,1177	-0,3989 to 0,1636	Non	ns	0,7633
Témoin Mâle vs. PD2M	0,00882	-0,2729 to 0,2905	Non	ns	0,9999
Témoin Mâle vs. PD3M	0,0145	-0,2672 to 0,2962	Non	ns	0,9998
<b>Poumons</b>					
Témoin Mâle vs. BD1 M	-0,01766	-0,2994 to 0,2641	Non	ns	0,9997
Témoin Mâle vs. BD2 M	0,0046	-0,2771 to 0,2863	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. BD3 M	-0,0399	-0,3216 to 0,2418	Non	ns	0,9979
Témoin Mâle vs. PD1M	-0,02276	-0,3045 to 0,259	Non	ns	0,9997
Témoin Mâle vs. PD2M	-0,01568	-0,2974 to 0,266	Non	ns	0,9998
Témoin Mâle vs. PD3M	-0,00856	-0,2903 to 0,2732	Non	ns	0,9999
<b>Cœur</b>					
Témoin Mâle vs. BD1 M	0,00882	-0,2729 to 0,2905	Non	ns	0,9999
Témoin Mâle vs. BD2 M	0,00536	-0,2764 to 0,2871	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. BD3 M	0,00952	-0,2722 to 0,2912	Non	ns	0,9999
Témoin Mâle vs. PD1M	-0,002	-0,2837 to 0,2797	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. PD2M	0,00744	-0,2743 to 0,2892	Non	ns	>0,9999
Témoin Mâle vs. PD3M	-0,0051	-0,2868 to 0,2766	Non	ns	>0,9999

Tableau E 18: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids relatif des organes des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes		5			
Nombre de comparaison entre groupe		6			
Alpha		0,05			
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>Reins</b>					
Témoin Femelle vs. PD1 F	-0,1484	-0,3947 to 0,0977	Non	ns	0,4226
Témoin Femelle vs. PD2 F	-0,0243	-0,2705 to 0,2219	Non	ns	0,9996
Témoin Femelle vs. PD3 F	0,01898	-0,2272 to 0,2652	Non	ns	0,9997
Témoin Femelle vs. BD1 F	0,03496	-0,2113 to 0,2812	Non	ns	0,9979
Témoin Femelle vs. BD2 F	0,01354	-0,2327 to 0,2598	Non	ns	0,9998
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,01508	-0,2311 to 0,2613	Non	ns	0,9998
<b>Foie</b>					
Témoin Femelle vs. PD1 F	-0,3209	-0,5729 to -0,0688	Oui	**	0,0065
Témoin Femelle vs. PD2 F	0,0395	-0,2125 to 0,2915	Non	ns	0,9968
Témoin Femelle vs. PD3 F	-0,02508	-0,2771 to 0,2269	Non	ns	0,9996
Témoin Femelle vs. BD1 F	0,07052	-0,1815 to 0,3225	Non	ns	0,9487
Témoin Femelle vs. BD2 F	0,03038	-0,2216 to 0,2824	Non	ns	0,9995
Témoin Femelle vs. BD3 F	-0,02558	-0,2776 to 0,2264	Non	ns	0,9996
<b>Rate</b>					
Témoin Femelle vs. PD1 F	-0,09096	-0,3379 to 0,1559	Non	ns	0,8455
Témoin Femelle vs. PD2 F	0,051	-0,1952 to 0,2972	Non	ns	0,988
Témoin Femelle vs. PD3 F	0,0285	-0,2177 to 0,2747	Non	ns	0,9996
Témoin Femelle vs. BD1 F	-0,05804	-0,3043 to 0,1882	Non	ns	0,9767
Témoin Femelle vs. BD2 F	-0,00902	-0,2552 to 0,2372	Non	ns	0,9999
Témoin Femelle vs. BD3 F	-0,02958	-0,2758 to 0,2166	Non	ns	0,9995
<b>Poumons</b>					
Témoin Femelle vs. PD1 F	-0,01962	-0,2658 to 0,2266	Non	ns	0,9997
Témoin Femelle vs. PD2 F	0,00426	-0,242 to 0,2505	Non	ns	>0,9999
Témoin Femelle vs. PD3 F	-0,04678	-0,293 to 0,1994	Non	ns	0,9924
Témoin Femelle vs. BD1 F	-0,08692	-0,3331 to 0,1593	Non	ns	0,8677
Témoin Femelle vs. BD2 F	-0,04684	-0,2931 to 0,1994	Non	ns	0,9923
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,0463	-0,1999 to 0,2925	Non	ns	0,9927
<b>Cœur</b>					
Témoin Femelle vs. PD1 F	-0,03146	-0,2777 to 0,2148	Non	ns	0,9995
Témoin Femelle vs. PD2 F	-0,01038	-0,2566 to 0,2358	Non	ns	0,9999
Témoin Femelle vs. PD3 F	0,01312	-0,2331 to 0,2593	Non	ns	0,9998
Témoin Femelle vs. BD1 F	0,01658	-0,2296 to 0,2628	Non	ns	0,9997
Témoin Femelle vs. BD2 F	0,01256	-0,2337 to 0,2588	Non	ns	0,9998
Témoin Femelle vs. BD3 F	0,0158	-0,2304 to 0,262	Non	ns	0,9997

Tableau E 19: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids relatif des organes des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 5					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Reins					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	0,02976	-0,1444 to 0,2039	Non	ns	0,8948
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	-0,0060	-0,1802 to 0,1682	Non	ns	0,9954
Foie					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	0,0817	-0,09247 to 0,2559	Non	ns	0,4606
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	-0,0318	-0,206 to 0,1423	Non	ns	0,8806
Rate					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	-0,0391	-0,2133 to 0,135	Non	ns	0,8265
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	-0,0840	-0,2582 to 0,09011	Non	ns	0,4417
Poumons					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	-0,0218	-0,1961 to 0,1523	Non	ns	0,9413
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	-0,0812	-0,2554 to 0,09293	Non	ns	0,4642
Cœur					
Témoin mâle satellite vs. BD1MS	-0,0065	-0,1807 to 0,1677	Non	ns	0,9946
Témoin mâle satellite vs. PD1MS	-0,0037	-0,1779 to 0,1704	Non	ns	0,9982

Tableau E 20: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) du poids relatif des organes des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 5					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenn e	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Reins					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	0,01324	-0,1417 to 0,1681	Non	ns	0,9723
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	-0,0152	-0,1702 to 0,1396	Non	ns	0,9633
Foie					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	0,01778	-0,1371 to 0,1727	Non	ns	0,9507
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	-0,0063	-0,1612 to 0,1486	Non	ns	0,9936
Rate					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	-0,0179	-0,1728 to 0,137	Non	ns	0,9498
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	0,00262	-0,1523 to 0,1575	Non	ns	0,9989
Poumons					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	-0,0448	-0,1997 to 0,1101	Non	ns	0,7331
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	-0,1065	-0,2614 to 0,0483	Non	ns	0,2114
Cœur					
Témoin femelle satellite vs. BD1FS	0,00318	-0,1517 to 0,1581	Non	ns	0,9983
Témoin femelle satellite vs. PD1FS	0,0053	-0,1496 to 0,1602	Non	ns	0,9955

Tableau E 21: Évaluation de la quantité de la nourriture et de l'eau consommée par les souris témoins et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique de l'étude de la toxicité subaiguë

		Mâle							Femelle						
		Témoin	BD1 M	BD2 M	BD3 M	PD1 M	PD2 M	PD3 M	Témoin	BD1 F	BD2 F	BD3 F	PD1 F	PD2 F	PD3 F
1 <sup>ère</sup> semaine	Eau	9,6 ± 0,23	7,4 ± 0,11 ****	9,1 ± 0,35 *	9,6 ± 0,13	9,1 ± 0,05 *	9,3 ± 0,09	9,0 ± 0,21 *	6,6 ± 0,05	5,3 ± 0,07 ****	5,2 ± 0,08 ****	5,7 ± 0,28 ***	6,8 ± 0,31	6,6 ± 0,31	6,4 ± 0,26
	Nourriture	10,3 ± 0,22	10,0 ±0,18	9,9 ± 0,19	10,0 ± 0,21	9,9 ± 0,20	9,9 ± 0,15	10,0 ± 0,11	7,1 ± 0,15	6,9 ± 0,11	7,2 ± 0,11	7,0 ± 0,11	6,8 ± 0,09	6,7 ± 0,18	7,1 ± 0,04
2 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,7 ± 0,10	7,2 ± 0,08 ****	8,7 ± 0,12 ****	9,3 ± 0,10	9,0 ± 0,11 **	9,3 ± 0,13	9,6 ± 0,12	6,2 ± 0,14	4,7 ± 0,18 ****	4,9 ± 0,16 ****	5,4 ± 0,08 ***	4,9 ± 0,06 ****	5,0 ± 0,12 ****	5,6 ± 0,24 *
	Nourriture	11,2 ± 0,09	9,3 ± 0,20 ****	10,9 ± 0,14	11,3 ± 0,12	11,0 ± 0,10	11,3 ± 0,07	11,3 ± 0,09	6,7 ± 0,07	5,0 ± 0,12 ****	6,5 ± 0,24	6,8 ± 0,09	6,6 ± 0,07	6,6 ± 0,06	6,6 ± 0,07
3 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,5 ± 0,19	6,7 ± 0,12 ****	8,7 ± 0,17 ***	9,4 ± 0,16	9,1 ± 0,06	9,3 ± 0,15	9,4 ± 0,18	5,3 ± 0,11	4,2 ± 0,08 ****	4,5 ± 0,12 ***	5,2 ± 0,09	4,9 ± 0,04	4,8 ± 0,09 *	5,1 ± 0,08
	Nourriture	12,3 ± 0,15	9,5 ± 0,17 ****	9,7 ± 0,28 ****	12,2 ± 0,13	12,1 ± 0,11	12,1 ± 0,17	12,2 ± 0,13	6,7 ± 0,14	4,6 ± 0,05 ****	5,1 ± 0,13 ****	6,4 ± 0,12	6,2 ± 0,06 *	6,4 ± 0,13	6,7 ± 0,06
4 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,4 ± 0,12	6,2 ± 0,07 ****	8,4 ± 0,12 ****	9,3 ± 0,09	9,0 ± 0,05	9,2 ± 0,07	9,3 ± 0,11	5,0 ± 0,06	4,3 ± 0,11 **	4,7 ± 0,15	5,0 ± 0,06	4,7 ± 0,09	4,6 ± 0,09	5,0 ± 0,04
	Nourriture	12,4 ± 0,10	10,6 ± 0,14 ****	11,8 ± 0,08 **	12,1 ± 0,05	12,3 ± 0,11	12,3 ± 0,10	12,4 ± 0,10	6,3 ± 0,07	4,7 ± 0,17 ****	5,3 ± 0,09 ****	6,4 ± 0,10	6,2 ± 0,07	6,2 ± 0,06	6,3 ± 0,06

Consommation d'eau (ml/souris/j) : les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

Consommation de la nourriture (g/souris/j) : les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)

\* (p< 0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001), \*\*\*\* (p<0,0001)

Tableau E 22: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation d'eau des souris mâle témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 4					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	2,186	1,691 to 2,681	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	0,5143	0,0192 to 1,009	Oui	*	0,0384
Témoin mâle vs. BD3M	0,04286	-0,4522 to 0,5379	Non	ns	0,9997
Témoin mâle vs. PD1M	0,5571	0,06205 to 1,052	Oui	*	0,0206
Témoin mâle vs. PD2M	0,3286	-0,1665 to 0,8237	Non	ns	0,3282
Témoin mâle vs. PD3M	0,6	0,1049 to 1,095	Oui	*	0,0106
<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	2,557	2,062 to 3,052	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	1	0,5049 to 1,495	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD3M	0,4143	-0,0808 to 0,9094	Non	ns	0,1368
Témoin mâle vs. PD1M	0,7	0,2049 to 1,195	Oui	**	0,0019
Témoin mâle vs. PD2M	0,4714	-0,02366 to 0,9665	Non	ns	0,0683
Témoin mâle vs. PD3M	0,1143	-0,3808 to 0,6094	Non	ns	0,9793
<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	2,729	2,233 to 3,224	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	0,7571	0,2621 to 1,252	Oui	***	0,0007
Témoin mâle vs. BD3M	0,07143	-0,4237 to 0,5665	Non	ns	0,9979
Témoin mâle vs. PD1M	0,3571	-0,1379 to 0,8522	Non	ns	0,2509
Témoin mâle vs. PD2M	0,1286	-0,3665 to 0,6237	Non	ns	0,964
Témoin mâle vs. PD3M	0,02857	-0,4665 to 0,5237	Non	ns	0,9998
<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	3,207	2,712 to 3,702	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	0,9714	0,4763 to 1,467	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD3M	0,1286	-0,3665 to 0,6237	Non	ns	0,964
Témoin mâle vs. PD1M	0,3571	-0,1379 to 0,8522	Non	ns	0,2509
Témoin mâle vs. PD2M	0,2143	-0,2808 to 0,7094	Non	ns	0,7391
Témoin mâle vs. PD3M	0,07143	-0,4237 to 0,5665	Non	ns	0,9979

Tableau E 23: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation d'eau des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 4					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	1,286	0,7871 to 1,784	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	1,371	0,8728 to 1,87	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD3F	0,8286	0,33 to 1,327	Oui	***	0,0002
Témoin femelle vs. PD1F	-0,2	-0,6986 to 0,2986	Non	ns	0,7946
Témoin femelle vs. PD2F	0,01429	-0,4843 to 0,5129	Non	ns	>0,9999
Témoin femelle vs. PD3F	0,1429	-0,3557 to 0,6415	Non	ns	0,9439
<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	1,543	1,044 to 2,041	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	1,257	0,7585 to 1,756	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD3F	0,8286	0,33 to 1,327	Oui	***	0,0002
Témoin femelle vs. PD1F	1,343	0,8443 to 1,841	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. PD2F	1,171	0,6728 to 1,67	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. PD3F	0,5714	0,07282 to 1,07	Oui	*	0,0176
<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	1,143	0,6443 to 1,641	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	0,7857	0,2871 to 1,284	Oui	***	0,0004
Témoin femelle vs. BD3F	0,08571	-0,4129 to 0,5843	Non	ns	0,995
Témoin femelle vs. PD1F	0,4286	-0,07003 to 0,9272	Non	ns	0,1202
Témoin femelle vs. PD2F	0,5143	0,01568 to 1,013	Oui	*	0,0404
Témoin femelle vs. PD3F	0,1714	-0,3272 to 0,67	Non	ns	0,8815
<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	0,6857	0,1871 to 1,184	Oui	**	0,0027
Témoin femelle vs. BD2F	0,3429	-0,1557 to 0,8415	Non	ns	0,2945
Témoin femelle vs. BD3F	0	-0,4986 to 0,4986	Non	ns	>0,9999
Témoin femelle vs. PD1F	0,3143	-0,1843 to 0,8129	Non	ns	0,3792
Témoin femelle vs. PD2F	0,3714	-0,1272 to 0,87	Non	ns	0,2233
Témoin femelle vs. PD3F	0	-0,4986 to 0,4986	Non	ns	>0,9999



Tableau E 24: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation de la nourriture des souris mâles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 4					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	0,3143	-0,1022 to 0,7308	Non	ns	0,2127
Témoin mâle vs. BD2M	0,3857	-0,0308 to 0,8022	Non	ns	0,0807
Témoin mâle vs. BD3M	0,3	-0,1165 to 0,7165	Non	ns	0,2522
Témoin mâle vs. PD1M	0,3714	-0,04509 to 0,7879	Non	ns	0,0994
Témoin mâle vs. PD2M	0,3714	-0,05029 to 0,7931	Non	ns	0,1062
Témoin mâle vs. PD3M	0,3143	-0,1074 to 0,736	Non	ns	0,223
<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	1,9	1,491 to 2,309	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	0,3286	-0,08015 to 0,7373	Non	ns	0,1641
Témoin mâle vs. BD3M	-0,1143	-0,523 to 0,2944	Non	ns	0,9496
Témoin mâle vs. PD1M	0,1714	-0,2373 to 0,5801	Non	ns	0,763
Témoin mâle vs. PD2M	-0,1143	-0,523 to 0,2944	Non	ns	0,9496
Témoin mâle vs. PD3M	-0,1143	-0,523 to 0,2944	Non	ns	0,9496
<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	2,8	2,391 to 3,209	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	2,529	2,12 to 2,937	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD3M	0,02857	-0,3801 to 0,4373	Non	ns	0,9997
Témoin mâle vs. PD1M	0,2071	-0,2016 to 0,6159	Non	ns	0,5996
Témoin mâle vs. PD2M	0,2143	-0,1944 to 0,623	Non	ns	0,5664
Témoin mâle vs. PD3M	0,07143	-0,3373 to 0,4801	Non	ns	0,9947
<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin mâle vs. BD1M	1,864	1,456 to 2,273	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle vs. BD2M	0,5786	0,1699 to 0,9873	Oui	**	0,0019
Témoin mâle vs. BD3M	0,2857	-0,123 to 0,6944	Non	ns	0,2791
Témoin mâle vs. PD1M	0,07857	-0,3301 to 0,4873	Non	ns	0,9921
Témoin mâle vs. PD2M	0,09286	-0,3159 to 0,5016	Non	ns	0,9809
Témoin mâle vs. PD3M	0,01429	-0,3944 to 0,423	Non	ns	0,9999

Tableau E 25: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation de la nourriture des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 4					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	0,2	-0,2112 to 0,6112	Non	ns	0,6386
Témoin femelle vs. BD2F	-0,08571	-0,4969 to 0,3255	Non	ns	0,9878
Témoin femelle vs. BD3F	0,1143	-0,2969 to 0,5255	Non	ns	0,9509
Témoin femelle vs. PD1F	0,3429	-0,06835 to 0,7541	Non	ns	0,1392
Témoin femelle vs. PD2F	0,4	-0,01121 to 0,8112	Non	ns	0,0598
Témoin femelle vs. PD3F	0,05714	-0,3541 to 0,4683	Non	ns	0,998
<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	1,743	1,332 to 2,154	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	0,2857	-0,1255 to 0,6969	Non	ns	0,2847
Témoin femelle vs. BD3F	-0,02857	-0,4398 to 0,3826	Non	ns	0,9997
Témoin femelle vs. PD1F	0,1143	-0,2969 to 0,5255	Non	ns	0,9509
Témoin femelle vs. PD2F	0,1429	-0,2683 to 0,5541	Non	ns	0,8768
Témoin femelle vs. PD3F	0,1143	-0,2969 to 0,5255	Non	ns	0,9509
<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	2,029	1,617 to 2,44	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	1,571	1,16 to 1,983	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD3F	0,2571	-0,1541 to 0,6683	Non	ns	0,3871
Témoin femelle vs. PD1F	0,4429	0,03165 to 0,8541	Oui	*	0,0293
Témoin femelle vs. PD2F	0,2857	-0,1255 to 0,6969	Non	ns	0,2847
Témoin femelle vs. PD3F	-0,05714	-0,4683 to 0,3541	Non	ns	0,998
<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle vs. BD1F	1,657	1,246 to 2,068	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD2F	1,029	0,6174 to 1,44	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle vs. BD3F	-0,05714	-0,4683 to 0,3541	Non	ns	0,998
Témoin femelle vs. PD1F	0,1286	-0,2826 to 0,5398	Non	ns	0,9189
Témoin femelle vs. PD2F	0,1143	-0,2969 to 0,5255	Non	ns	0,9509
Témoin femelle vs. PD3F	-0,02857	-0,4398 to 0,3826	Non	ns	0,9997

Tableau E 26: Évaluation de la quantité de la nourriture et de l'eau consommée par les souris satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique de l'étude de la toxicité subaiguë

		Mâle			Femelle		
		Témoin S	BD1SM	PD1SM	Témoin S	BD1SF	PD1SF
1 <sup>ère</sup> semaine	Eau	9,2 ± 0,23	7,5 ± 0,09 ****	8,8 ± 0,22	6,2 ± 0,28	5,3 ± 0,06 ****	6,3 ± 0,32
	Nourriture	9,8 ± 0,22	9,5 ± 0,16	9,8 ± 0,19	7,0 ± 0,05	6,9 ± 0,09	7,1 ± 0,12
2 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,4 ± 0,21	7,4 ± 0,11 ****	8,8 ± 0,23 *	5,5 ± 0,18	4,7 ± 0,07 ***	5,0 ± 0,12
	Nourriture	11,2 ± 0,12	9,5 ± 0,20 ****	11,3 ± 0,11	6,2 ± 0,23	5,2 ± 0,16 ****	6,3 ± 0,23
3 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,2 ± 0,25	6,9 ± 0,16 ****	9,2 ± 0,14	5,8 ± 0,15	4,1 ± 0,04 ****	5,4 ± 0,15
	Nourriture	12,1 ± 0,15	9,7 ± 0,23 ****	12,2 ± 0,14	5,7 ± 0,10	4,7 ± 0,07 ****	5,5 ± 0,11
4 <sup>ème</sup> semaine	Eau	9,3 ± 0,18	6,4 ± 0,06 ****	9,4 ± 0,14	6,0 ± 0,06	4,4 ± 0,13 ****	5,9 ± 0,11
	Nourriture	12,5 ± 0,10	10,8 ± 0,08 ****	12,4 ± 0,09	5,6 ± 0,11	4,7 ± 0,12 ****	5,7 ± 0,11
5 <sup>ème</sup> semaine	Eau	8,0 ± 0,13	7,0 ± 0,08 ***	8,5 ± 0,34	5,3 ± 0,16	4,7 ± 0,11 **	5,0 ± 0,10
	Nourriture	12,2 ± 0,08	11,6 ± 0,14 ***	12,4 ± 0,10	5,5 ± 0,18	5,0 ± 0,05 **	5,5 ± 0,09
6 <sup>ème</sup> semaine	Eau	7,9 ± 0,13	7,5 ± 0,09	8,1 ± 0,17	5,1 ± 0,10	4,9 ± 0,06	4,8 ± 0,05
	Nourriture	12,1 ± 0,06	11,8 ± 0,07	12,0 ± 0,12	5,3 ± 0,19	5,0 ± 0,08	5,4 ± 0,13

Consommation d'eau (ml/souris/j) : les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5)  
 Consommation de la nourriture (g/souris/j) : les données sont exprimées en moyenne ± SEM (n=5). \* (p< 0,05), \*\* (p<0,01), \*\*\* (p<0,001), \*\*\*\* (p<0,0001)

Tableau E 27: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation d'eau des souris mâle satellite témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 6					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
1 <sup>ère</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	1,686	1,125 to 2,246	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,1571	-0,4035 to 0,7178	Non	ns	0,7525
2 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	2,029	1,468 to 2,589	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,5714	0,01076 to 1,132	Oui	*	0,0451
3 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	2,336	1,775 to 2,896	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,0238	-0,5369 to 0,5845	Non	ns	0,9933
4 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	2,821	2,261 to 3,382	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,133	-0,694 to 0,4273	Non	ns	0,8134
5 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	1,019	0,4579 to 1,579	Oui	***	0,0002
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,448	-1,008 to 0,1131	Non	ns	0,1346
6 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	0,3571	-0,2035 to 0,9178	Non	ns	0,2634
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,2	-0,7607 to 0,3607	Non	ns	0,6361

Tableau E 28: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation d'eau des souris femelles satellite témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 6					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
<b>1<sup>ère</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,8714	0,4242 to 1,319	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,1143	-0,5615 to 0,333	Non	ns	0,7885
<b>2<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,7429	0,2956 to 1,19	Oui	***	0,0007
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,4429	-0,00438 to 0,890	Non	ns	0,0526
<b>3<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	1,657	1,21 to 2,104	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,3429	-0,1044 to 0,7901	Non	ns	0,155
<b>4<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	1,629	1,181 to 2,076	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,08571	-0,3615 to 0,533	Non	ns	0,8735
<b>5<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,6571	0,2099 to 1,104	Oui	**	0,0028
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,2857	-0,1615 to 0,733	Non	ns	0,2615
<b>6<sup>ème</sup> semaine</b>					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,1571	-0,2901 to 0,6044	Non	ns	0,6444
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,2571	-0,1901 to 0,7044	Non	ns	0,3307

Tableau E 29: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation de la nourriture des souris mâles satellite témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 6					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
1 <sup>ère</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	0,2857	-0,07084 to 0,6423	Non	ns	0,1328
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,0143	-0,3423 to 0,3708	Non	ns	0,994
2 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	1,714	1,358 to 2,071	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,057	-0,4137 to 0,2994	Non	ns	0,9093
3 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	2,393	2,036 to 2,749	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,093	-0,4494 to 0,2637	Non	ns	0,7814
4 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	1,721	1,365 to 2,078	Oui	****	<0,0001
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,1286	-0,228 to 0,4851	Non	ns	0,6301
5 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	0,5857	0,2292 to 0,9423	Oui	***	0,0008
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	-0,193	-0,5494 to 0,1637	Non	ns	0,3721
6 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin mâle stellite vs. BD1MS	0,2357	-0,1208 to 0,5923	Non	ns	0,2399
Témoin mâle stellite vs. PD1MS	0,0429	-0,3137 to 0,3994	Non	ns	0,9477

Tableau E 30: Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) de la consommation de la nourriture des souris femelles satellite témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

Nombre des groupes 6					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
1 <sup>ère</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,04286	-0,2733 to 0,359	Non	ns	0,9341
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,1143	-0,4305 to 0,2019	Non	ns	0,6288
2 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	1,043	0,7267 to 1,359	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,0428	-0,359 to 0,2733	Non	ns	0,9341
3 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,9857	0,6695 to 1,302	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	0,1429	-0,1733 to 0,459	Non	ns	0,4929
4 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,9	0,5838 to 1,216	Oui	****	<0,0001
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,1571	-0,4733 to 0,159	Non	ns	0,4295
5 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,4714	0,1552 to 0,7876	Oui	**	0,0024
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,0571	-0,3733 to 0,259	Non	ns	0,8865
6 <sup>ème</sup> semaine					
Témoin femelle stellite vs. BD1FS	0,2857	-0,03047 to 0,601	Non	ns	0,0819
Témoin femelle stellite vs. PD1FS	-0,1	-0,4162 to 0,2162	Non	ns	0,6983

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres hématologiques des souris mâle témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

GB

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-3,37	-7,198 to 0,4581	Non	ns	0,1003
Témoin vs. BD2M	-2,88	-6,489 to 0,7292	Non	ns	0,1566
Témoin vs. BD3M	-2,76	-6,369 to 0,8492	Non	ns	0,1857
Témoin vs. PD1M	-3,895	-7,723 to -0,06688	Oui	*	0,045
Témoin vs. PD2M	-1,945	-5,773 to 1,883	Non	ns	0,5588
Témoin vs. PD3M	0,2	-3,409 to 3,809	Non	ns	0,9998

GR

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-0,0235	-1,211 to 1,164	Non	ns	>0,9999
Témoin vs. BD2M	-0,058	-1,178 to 1,062	Non	ns	0,9998
Témoin vs. BD3M	-0,204	-1,324 to 0,9155	Non	ns	0,9916
Témoin vs. PD1M	1,422	0,2341 to 2,609	Oui	*	0,0144
Témoin vs. PD2M	0,3865	-0,8009 to 1,574	Non	ns	0,882
Témoin vs. PD3M	-0,152	-1,272 to 0,9675	Non	ns	0,9979



## HGB

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-0,31	-1,991 to 1,371	Non	ns	0,9911
Témoin vs. BD2M	0,1	-1,485 to 1,685	Non	ns	0,9997
Témoin vs. BD3M	-0,66	-2,245 to 0,9252	Non	ns	0,7334
Témoin vs. PD1M	1,99	0,3087 to 3,671	Oui	*	0,0158
Témoin vs. PD2M	0,965	-0,7163 to 2,646	Non	ns	0,4395
Témoin vs. PD3M	-0,18	-1,765 to 1,405	Non	ns	0,9995

## HTC

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	0,64	-4,926 to 6,206	Non	ns	0,9995
Témoin vs. BD2M	0,32	-4,927 to 5,567	Non	ns	0,9997
Témoin vs. BD3M	-1,3	-6,547 to 3,947	Non	ns	0,9616
Témoin vs. PD1M	5,065	-0,5008 to 10,63	Non	ns	0,0848
Témoin vs. PD2M	1,24	-4,326 to 6,806	Non	ns	0,9764
Témoin vs. PD3M	-0,06	-5,307 to 5,187	Non	ns	>0,9999

## MCV

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B: BD1M, C: BD2M, D: BD3M, E: PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	2,413
Valeur du p	0,0561
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,3667

### MCH

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B: BD1M, C: BD2M, D: BD3M, E: PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	0,2806
Valeur du p	0,9407
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non

### MCHc

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B: BD1M, C: BD2M, D: BD3M, E: PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	1,546
Valeur du p	0,2044
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,2707

### PLT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-153,5	-606 to 299,1	Non	ns	0,8636
Témoin vs. BD2M	35	-391,7 to 461,7	Non	ns	0,9997
Témoin vs. BD3M	-73,95	-526,5 to 378,6	Non	ns	0,9949
Témoin vs. PD1M	-623,9	-1117 to -131,2	Oui	**	0,0093
Témoin vs. PD2M	-450,2	-902,8 to 2,384	Non	ns	0,0516
Témoin vs. PD3M	-309	-735,7 to 117,7	Non	ns	0,2265

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres hématologiques des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

GB

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	-2,58	-5,975 to 0,8151	Non	ns	0,1857
Témoin femelle vs. BD2F	-1,2	-4,595 to 2,195	Non	ns	0,8253
Témoin femelle vs. BD3F	-1,16	-4,555 to 2,235	Non	ns	0,8439
Témoin femelle vs. PD1F	-3,75	-7,329 to -0,1712	Oui	*	0,0375
Témoin femelle vs. PD2F	-1,6	-4,995 to 1,795	Non	ns	0,6097
Témoin femelle vs. PD3F	-0,56	-3,955 to 2,835	Non	ns	0,9937

GR

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	0,49	-0,6769 to 1,657	Non	ns	0,7074
Témoin femelle vs. BD2F	0,209	-0,898 to 1,316	Non	ns	0,9876
Témoin femelle vs. BD3F	-0,015	-1,122 to 1,092	Non	ns	>0,9999
Témoin femelle vs. PD1F	1,507	0,4 to 2,614	Oui	**	0,005
Témoin femelle vs. PD2F	0,283	-0,824 to 1,39	Non	ns	0,9488
Témoin femelle vs. PD3F	0,171	-0,936 to 1,278	Non	ns	0,9951

### HGB

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	1	-0,4647 to 2,465	Non	ns	0,2681
Témoin femelle vs. BD2F	0,765	-0,6245 to 2,155	Non	ns	0,4644
Témoin femelle vs. BD3F	-0,055	-1,445 to 1,335	Non	ns	0,9999
Témoin femelle vs. PD1F	2,325	0,9355 to 3,715	Oui	***	0,0006
Témoin femelle vs. PD2F	0,965	-0,4245 to 2,355	Non	ns	0,254
Témoin femelle vs. PD3F	0,345	-1,045 to 1,735	Non	ns	0,9549

### HCT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	3,4	-2,17 to 8,97	Non	ns	0,367
Témoin femelle vs. BD2F	-0,885	-6,169 to 4,399	Non	ns	0,9933
Témoin femelle vs. BD3F	-1,585	-6,869 to 3,699	Non	ns	0,9023
Témoin femelle vs. PD1F	5,575	0,2912 to 10,86	Oui	*	0,0359
Témoin femelle vs. PD2F	2,255	-3,029 to 7,539	Non	ns	0,6944
Témoin femelle vs. PD3F	1,995	-3,289 to 7,279	Non	ns	0,7844

### MCV

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
Résumé d'ANOVA	
F	2,268
Valeur du p	0,0681
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,3436

### MCH

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	0,8832
Valeur du p	0,5211
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1693

### MCHc

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	2,265
Valeur du p	0,0684
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,3433

### PLT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	0,4545
Valeur du p	0,8351
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,09493

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres hématologiques des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

GB

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	2,929
Valeur du p	0,0997
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,3694

GR

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,8422
Valeur du p	0,4567
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1328

HGB

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	1,722
Valeur du p	0,2236
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,2384

HCT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,2056
Valeur du p	0,8173
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,03603

### MCV

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,08326
Valeur du p	0,9207
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,01491

### MCH

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,8383
Valeur du p	0,4583
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1323

### MCHc

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,7012
Valeur du p	0,5169
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1131

### PLT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin S vs. BD1MS	-19,25	-371,8 to 333,3	Non	ns	0,9863
Témoin S vs. PD1MS	-575,4	-907,8 to -243	Oui	**	0,002

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres hématologiques des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

**GB**

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,846
Valeur du p	0,4553
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,1333

**GR**

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	1,927
Valeur du p	0,1917
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,2594

**HGB**

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	1,731
Valeur du p	0,2221
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,2394

**HCT**

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin S vs. BD1FS	0,28	-2,541 to 3,101	Non	ns	0,9557
Témoin S vs. PD1FS	3,28	0,2877 to 6,272	Oui	*	0,0327



### MCV

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,01954
Valeur du p	0,9807
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,00354

### MCH

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,6703
Valeur du p	0,5313
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,1086

### MCHc

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	2,025
Valeur du p	0,1784
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,2691

### PLT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,1125
Valeur du p	0,8947
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)?	Non
R Carré	0,02004

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres biochimiques des souris mâle témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique  
Glycémie

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B: BD1M, C: BD2M, D: BD3M, E: PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	0,4926
Valeur du p	0,8077
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1057

Urée

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	0,0075	-0,1103 to 0,1253	Non	ns	0,9997
Témoin vs. BD2M	0,02	-0,09103 to 0,131	Non	ns	0,9921
Témoin vs. BD3M	-0,005	-0,1228 to 0,1128	Non	ns	0,9999
Témoin vs. PD1M	-0,2175	-0,3353 to -0,09973	Oui	***	0,0002
Témoin vs. PD2M	-0,1425	-0,2603 to -0,02473	Oui	*	0,0133
Témoin vs. PD3M	-0,03	-0,141 to 0,08103	Non	ns	0,944

Créatinine

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	0,3	-1,833 to 2,433	Non	ns	0,9977
Témoin vs. BD2M	0,2	-1,811 to 2,211	Non	ns	0,9996
Témoin vs. BD3M	0,05	-2,083 to 2,183	Non	ns	>0,9999
Témoin vs. PD1M	-2,45	-4,583 to -0,3169	Oui	*	0,0198
Témoin vs. PD2M	-0,3125	-2,446 to 1,821	Non	ns	0,9968
Témoin vs. PD3M	-0,16	-2,171 to 1,851	Non	ns	0,9997

### ASAT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	5,5	-45,3 to 56,3	Non	ns	0,9996
Témoin vs. BD2M	-12	-59,9 to 35,9	Non	ns	0,9597
Témoin vs. BD3M	4,25	-46,55 to 55,05	Non	ns	0,9997
Témoin vs. PD1M	-59,5	-110,3 to -8,697	Oui	*	0,0172
Témoin vs. PD2M	-25,75	-76,55 to 25,05	Non	ns	0,5613
Témoin vs. PD3M	-3	-50,9 to 44,9	Non	ns	0,9997

### ALAT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-1,5	-14,78 to 11,78	Non	ns	0,9995
Témoin vs. BD2M	-3	-15,52 to 9,522	Non	ns	0,967
Témoin vs. BD3M	-2,75	-16,03 to 10,53	Non	ns	0,9835
Témoin vs. PD1M	-22,75	-36,03 to -9,469	Oui	***	0,0004
Témoin vs. PD2M	1	-12,28 to 14,28	Non	ns	0,9997
Témoin vs. PD3M	2	-10,52 to 14,52	Non	ns	0,9952

### PAL

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	-2,25	-104,2 to 99,75	Non	ns	>0,9999
Témoin vs. BD2M	-6	-102,2 to 90,17	Non	ns	0,9997
Témoin vs. BD3M	-4,75	-106,7 to 97,25	Non	ns	0,9998
Témoin vs. PD1M	-101	-203 to 0,9997	Non	ns	0,053
Témoin vs. PD2M	-47,25	-149,2 to 54,75	Non	ns	0,6447
Témoin vs. PD3M	-8	-104,2 to 88,17	Non	ns	0,9997

### Protéines totales

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin vs. BD1M	4,1	-4,888 to 13,09	Non	ns	0,6582
Témoin vs. BD2M	1,2	-7,274 to 9,674	Non	ns	0,9976
Témoin vs. BD3M	0,6	-7,874 to 9,074	Non	ns	0,9997
Témoin vs. PD1M	9,6	0,6117 to 18,59	Oui	*	0,0329
Témoin vs. PD2M	5,85	-3,138 to 14,84	Non	ns	0,319
Témoin vs. PD3M	-1,4	-9,874 to 7,074	Non	ns	0,9946

### Albumine

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin Mâle, B: BD1M, C: BD2M, D: BD3M, E: PD1M, F: PD2M, G: PD3M
F	1,184
Valeur du p	0,3479
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,2284

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres biochimiques des souris femelles témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

### Glycémie

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	0,1838
Valeur du p	0,9787
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,04224

## Urée

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	-0,045	-0,1532 to 0,06322	Non	ns	0,734
Témoin femelle vs. BD2F	-0,03	-0,132 to 0,07203	Non	ns	0,9202
Témoin femelle vs. BD3F	-0,0075	-0,1157 to 0,1007	Non	ns	0,9997
Témoin femelle vs. PD1F	-0,18	-0,282 to -0,07797	Oui	***	0,0003
Témoin femelle vs. PD2F	-0,1	-0,202 to 0,00203	Non	ns	0,0564
Témoin femelle vs. PD3F	-0,02	-0,122 to 0,08203	Non	ns	0,9874

## Créatinine

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	0,3	-1,548 to 2,148	Non	ns	0,9949
Témoin femelle vs. BD2F	-1	-2,742 to 0,7423	Non	ns	0,4395
Témoin femelle vs. BD3F	0,05	-1,798 to 1,898	Non	ns	>0,9999
Témoin femelle vs. PD1F	-2,59	0,8477	Oui	**	0,002
Témoin femelle vs. PD2F	-1,61	-3,352 to 0,1323	Non	ns	0,0783
Témoin femelle vs. PD3F	-0,96	-2,702 to 0,7823	Non	ns	0,4795

## ASAT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	-12,5	-68,26 to 43,26	Non	ns	0,9756
Témoin femelle vs. BD2F	-25	-77,57 to 27,57	Non	ns	0,6206
Témoin femelle vs. BD3F	-30	-85,76 to 25,76	Non	ns	0,5029
Témoin femelle vs. PD1F	-74	-126,6 to -21,43	Oui	**	0,0034
Témoin femelle vs. PD2F	-52	-104,6 to 0,5684	Non	ns	0,0534
Témoin femelle vs. PD3F	-30	-82,57 to 22,57	Non	ns	0,4451

### ALAT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	-11,5	-35,07 to 12,07	Non	ns	0,597
Témoin femelle vs. BD2F	-10	-32,22 to 12,22	Non	ns	0,6696
Témoin femelle vs. BD3F	-6,5	-30,07 to 17,07	Non	ns	0,9386
Témoin femelle vs. PD1F	-31	-53,22 to -8,777	Oui	**	0,0038
Témoin femelle vs. PD2F	-18	-40,22 to 4,223	Non	ns	0,1472
Témoin femelle vs. PD3F	1	-21,22 to 23,22	Non	ns	0,9998

### PAL

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	1,533
Valeur du p	0,2069
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,2613

### Protéines totales

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 6					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin femelle vs. BD1F	-1,6	-10,53 to 7,325	Non	ns	0,9922
Témoin femelle vs. BD2F	0,4	-8,015 to 8,815	Non	ns	0,9998
Témoin femelle vs. BD3F	0,15	-8,775 to 9,075	Non	ns	>0,9999
Témoin femelle vs. PD1F	-12,6	-21,02 to -4,185	Oui	**	0,0018
Témoin femelle vs. PD2F	-7,6	-16,02 to 0,815	Non	ns	0,0883
Témoin femelle vs. PD3F	-4,6	-13,02 to 3,815	Non	ns	0,4873

### Albumine

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin femelle, B: BD1F, C: BD2F, D: BD3F, E: PD1F, F: PD2F, G: PD3F
F	2,357
Valeur du p	0,0595
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,3523

ANOVA/ Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres biochimiques des souris mâles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

### Glycémie

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	1,308
Valeur du p	0,3063
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,179

### Urée

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,1509
Valeur du p	0,8615
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,02454

### Créatinine

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin S vs. BD1MS	0,4	-1,579 to 2,379	Non	ns	0,8341
Témoin S vs. PD1MS	-1,93	-3,909 to 0,04884	Non	ns	0,0558

### ASAT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,6379
Valeur du p	0,5454
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,0961

### ALAT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,2
Valeur du p	0,8214
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,03226

### PAL

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,1764
Valeur du p	0,8404
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,02855



### Protéines totales

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin S vs. BD1MS	3	-2,779 to 8,779	Non	ns	0,3551
Témoin S vs. PD1MS	8	2,221 to 13,78	Oui	**	0,0087

### Albumine

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1MS, C:PD1MS
F	0,24
Valeur du p	0,7903
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,03846

ANOVA / Comparaison des moyennes (test Dunnett's ) des paramètres biochimiques des souris femelles satellites témoin et traitées par le biopesticide et le pesticide chimique

### Glycémie

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,2635
Valeur du p	0,7731
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,04571

### Urée

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	1
Valeur du p	0,3966
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,1429

### Créatinine

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,3031
Valeur du p	0,744
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,04809

### ASAT

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenn e	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativit é	P ajustée
Témoin S vs. BD1FS	7,4	-41,13 to 55,93	Non	ns	0,9005
Témoin S vs. PD1FS	-47	-95,53 to 1,528	Non	ns	0,0575

### ALAT

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,7262
Valeur du p	0,5038
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,108

## PAL

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	2,038
Valeur du p	0,1729
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,2536

## Protéines totales

Nombre des groupes 1					
Nombre de comparaison entre groupe 2					
Alpha 0,05					
Test de comparaison multiple Dunnett	Diff moyenne	IC de la diff 95,00%	Significatif	Degré de significativité	P ajustée
Témoin S vs. BD1FS	2	-3,779 to 7,779	Non	ns	0,6057
Témoin S vs. PD1FS	-6	-11,78 to -0,2207	Oui	*	0,0421

## Albumine

Tableau analysé	ANOVA à un facteur
Données analysés	A : Témoin S, B: BD1FS, C:PD1FS
F	0,25
Valeur du p	0,7828
Degré de significativité du p	ns
Diff significative entre les moyennes (P <0,05)	Non
R Carré	0,04

## REFERENCES

1. Damalas, C., «Understanding benefits and risks of pesticide use», Scientific Research and Essay, V.4, n°10, (2009), 945-949.
2. Nesheim, O.N., Fishel, F.M. et Mossler, M., «Toxicity of Pesticides PI-13», University of Florida (UF), Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS), USA, (2014)
3. Anjarwalla, P., Belmain, S., Sola, P., Jamnadass, R. et Stevenson, P.C., «Handbook on Pesticidal Plants», World Agroforestry Centre, Nairobi, (2016).
4. WHO in collaboration with the United Nations Environment Programme, «Public health impact of pesticides used in agriculture», World Health Organization Geneva, (1990).
5. Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W. et Nauen, R., «Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection», Pest. Manag. Sci., V.64, (2008), 1099-1105.
6. Pisa, L.W., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M, Downs, C.A., Goulson, D., Kreutzweiser, D.P., Krupke, C., Liess, M.; McField, M., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J.D., Sluijs, J.P.V., Dyck, V. et Wiemers, M., «Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates», Environ. Sci. Pollut. Res., V.22, (2015), 68-102.
7. Sanyal, D., Chakma, D. et Alam, S., «Persistence of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid on chili (*Capsicum annum* L.)», Bull. Environ. Contam. Toxicol., V.81, (2008), 365-368.
8. Akiyama, Y., Yoshioka, N. et Tsuji, M., « Pesticide residues in agricultural products monitored in Hyogo prefecture, Japan, FYs 1995-1999», J. AOAC Int., V.85, (2002), 692-703.
9. Zywitz, D., Anastassiades, M. et Scherbaum, E., «Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in fruits and vegetables by LC-MS and LC-MS-MS – Methodology and residue data», Deutsche Lebensmittel-Rundschau, V.99, (2003), 188-196.
10. Mondal, S., Ghosh, R.C., Mate, M.S. et Karmakar, D.B., «Effects of acetamiprid on immune System in female rats», Proc Zool Soc, V.62, (2009), 109-107.

11. Grainge, M. et Ahmed, S., «Handbook of plants with pest-control properties», Wiley Inter science, New York, (1988).
12. Sarwar, M. et Salman, M., «Toxicity of Oils Formulation as a New Useful Tool in Crop Protection for Insect Pests Control», International Journal of Chemical and Biomolecular Science, V.1, n°4, (2015), 297-302.
13. Bendif, H., «Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques in vitro des extraits actifs de quelques *Lamiaceae*: *Ajuga iva* (L.) Schreb., *Teucrium polium* L., *Thymus munbyanus* subsp. *coloratus* (Boiss. & Reut.) Greuter & Burdet et *Rosmarinus eriocalyx* Jord & Fourr», Thèse. ENS, Algerie, (2017).
14. USDA., «National Genetic Resources program», Germplasm Resources information Network (GRIN), 31, (2006), 2948.
15. Page, C., «Ecological strategies in fern evolution: a neopteridological overview», Rev. Palaeobot. Palynol., V.119, (2002), 1-33.
16. Gautier, H., «Etude des effets d'un composé soufré libéré par les Allium, le disulfure de diméthyle, sur les neurones d'insecte et sur l'activité électroencéphalographique de souris», Thèse. Ecole doctorale d'angers, (2007).
17. FAO, «International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides», FAO, Rome, (2005).
18. ACTA, « Index phytosanitaire», Paris, ACTA, (2006).
19. Calvo-Flores, F.G., Isac-Garcia, J. et Dobado, J.A., «Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties», John Wiley VCH, Weinheim, (2018).
20. OMS, «The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification», Germany, (2009).
21. Nauen, R., «Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor», Pest management science, V.62, n°8, (2006), 690-692.
22. Eyraud, V., «Étude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue», Thèse, institut national des sciences appliquées, Lyon, (2014).
23. Sparks, T. et Nauen, R., «IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management», Pesticide Biochemistry and Physiology, V.121, (2015), 122–128.

24. Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. et Elbert, A., «Overview of the status and global strategy for neonicotinoids», *J Agric Food Chem*, V.59, (2011), 2897–2908.
25. Raymond-Delpech, V., Matsuda, K., Sattelle, B.M., Rauh, J.J. et Sattelle, D.B., «Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides», *Invertebrate Neuroscience*, V.5, n°3-4, (2005), 119–133.
26. Klaassen, C., «Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7th ed.», McGraw-Hill, USA, (2008).
27. Tomizawa, M. et Casida, J.E., «Molecular recognition of neonicotinoid insecticides: the determinants of life or death» *Acc. Chem. Res.*, V.42, (2009), 260 - 269.
28. Yamamoto, I. et Casida, J., «Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor», Springer Science & Business Media, Tokyo, (1999).
29. Jeschke, P. et Nauen, R., «Nicotinic acetylcholine receptor agonists, target and selectivity aspects, in Modern Crop Protection Chemicals», Wiley-VCH Verlag, Weinheim, (2007).
30. Benowitz, N., «Pharmacology of nicotine: addiction, smoking-induced disease, and therapeutics», *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, V.49, (2009), 57 - 71.
31. Timothy, C., «Mammalian Toxicology of Insecticides», Royal Society of Chemistry, Cambridge, (2012).
32. Devana Shakthi, R.K., Mishrab, A., Prabua, P.C., Mandalb, T.K. et Panchapakesan, S., «Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats», *Toxicological & Environmental Chemistry*, V.97, n°9, (2015), 1236-1252.
33. Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L.P., Bonmatin, J.M., Chagnon, M., Downs, C. et Furlan, L., «Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites», *Environmental Science and Pollution Research*, V.22, (2014), 1-30 .
34. Roberts, T. et Hutson, D., «Metabolic Pathways of Agrochemicals: Insecticides and fungicides», Royal Society of Chemistry, Cambridge, (1998).
35. Singh, T.B., Mukhopadhyay, S.K., Sar, T.K. et Ganguly, S., «Acetamiprid Induces Toxicity in Mice under Experimental Conditions with Prominent Effect on the Hematobiochemical Parameters», *Drug Metab. Toxicol.*, V.3, n°6, (2012), 1000134.

36. FAO/WHO, «Pesticide residues in food 2017», food and agriculture organisation of the united nations, world health organisation. Rome, (2017).
37. Thakore, Y., «The biopesticide market for global agricultural use», *Ind. Biotechnol.*, V.2, (2006), 194 - 208.
38. Regnault-Roger, C., Philogène, B.J.R. et Vincent, C. «Biopesticides d'origine végétale 2ème éd», TEC and DOC Lavoisier, Paris, (2008).
39. Copping, L. et Menn, J., «Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy», *Pest Manag. Sci.*, V.56, n°8, (2000), 651- 676.
40. Gupta, S. et Dikshit, A., «Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control» *J. Biopesticides* , V.3, (2010), 186 - 188.
41. Nollet, L. et Rathore, H., «BIOPESTICIDES HANDBOOK», CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, (2015).
42. Regnault-Roger, C. P., «Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world», *Annu. Rev. Entomol.*, V.57, (2012), 405–424.
43. Buchanan, B.B., Griseb, W., Jones, R.L., «Biochemistry and Molecular Biology of Plants», Wiley BlackWell, (2015), 1133.
44. Gross, A. D., Coats, J. R., Seiber, J. N. et Duke, S. O., «Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities», American Chemical Society. Washington, (2014), 21-30.
45. Bruneton, J., «Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales 3ème Ed», Lavoisier, Paris, (1999).
46. Morais, L., «Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais», *Horticult. Bras.*, V.27, (2009), 4050-4063.
47. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. et Idaomar, M., «Biological effects of essential oils – A review», *Food Chem. Toxicol.*, V.46, (2008), 446–475.
48. Zuzarte, M. et Salgueiro, L., «Essential Oils Chemistry», in De Sousa, D.P., «Bioactive Essential Oils and Cancer», Springer International Publishing, Switzerland, (2015), 19-61.
49. Pavela, R. et Benelli, G., «Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints», *Trends in Plant Science*, (2016), 1-8.
50. Kalemba, D. et Kunicka, A., «Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils», *Current Medicinal Chemistry*, V.10, (2003), 813-829.
51. Parmar, B. et Walia, S., «Prospects and problems of phytochemical biopesticides», Overseas Publishers Association New Delhi, (2001).

52. Chiasson, H. et Beloin, N., «Les huiles essentielles, des biopesticides, Nouveau genre », *Antennae Bulletin de la Société d'entomologie du Québec*, V.14, n°1, (2007), 3-6.
53. Walia, S., Saha, S., Tripathi, V. et Sharma, K.K., «Phytochemical biopesticides: some recent developments», *Phytochem Rev*, V.16, (2017), 989–1007.
54. Miyazawa, M., Horiuchi, E. et Kawata, J., «Components of the Essential Oil from *Matteuccia struthiopteris*», *J. Oleo Sci.*, V.56, (2007), 457–461.
55. Santos, M.G., Fernandes, C.P., Tietbohl, L.A.C., Garrett; R., Lobo, Revoredo, J.F., Kelecom, A. et Rocha, L., «Chemical Composition of Essential Oils from Two Fern Species of Anemia», *American Fern Journal*, V.103, n°4, (2014), 215–224.
56. Hammami, S., Snène, A., R., E. M., Faidi, K., Falconieri, D., Dhaouadi, H., Piras, A., Mighri, Z. et Porcedda, S., «Essential Oil Constituents and Antioxidant Activity of Asplenium Ferns», *Journal of Chromatographic Science*, (2016), 1-5.
57. Halarewicz, A. et Szumny, A., «Analysis of essential oils in leaf extracts from bracken fern, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn. sub. *aquilinum*», *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, V.13, n°4, (2010), 20.
58. Nwiloh, B., Monago, C., Monago, C. et Uwakwe, A., «Chemical composition of essential oil from the fiddleheads of *Pteridium aquilinum* L. Kuhn found in Ogoni», *Journal of Medicinal Plants Research*, V.8, (2014), 77-80.
59. Vetter, J., «Working with Ferns: Issues and Applications», LCC: Springer Science+Business Media, New York, (2011).
60. Bajaj, Y., «Biotechnology in Agriculture and Forestry 26. Medicinal and Aromatic Plants VI», Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, New York, (1994).
61. Rameau, J.C., Mansion, D. et Dumé, G., «Flore forestière française: guide écologique illustré. Montagnes Volume 2», Forêt privée française, (1989).
62. Bachiri, L., Daoudi, A., Labazi, N., Ibjibijen, J. et Nassiri, L., «Étude floristique du val d'Ifrane Bassin versant du Oued Tizguit », *Journal of Animal and Plant Sciences*, V.26, n°1, (2015), 3977 - 4006 .
63. Dobignard, A. et Chatelain, C., «index synonymique de la flore d'afrigue du nord. Volume 1: Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledoneae », C.E.BOTANIKUES, Genève. (2010).



64. Schuettpelz, E., Schneider, H., Smith, A.R., Hovenkamp, P., Prado, J., Rouhan, G. et al., «A community-derived classification for extant lycophytes and ferns», *Journal of Systematics and Evolution*, V.54, n°6, (2016), 563 - 603.
65. Akobundu, I. et Agyakwa, C. W., «Guide des adventices d'Afrique de l'ouest», Institut National d'agriculture tropicale (IITA), Nigeria, (1989).
66. Vashishta, P.C., Sinha, A.K. et Kumar, A., «Botany for Degree students Pteridophyta», S. Chand Publishing, New Delhi, (2006).
67. Louhi Haou, S., «Écologie des ptéridophytes en Numidie (nord-est de l'Algérie)», thèse, université Badji Mokhtar, Annaba, (2014).
68. Adou, D. et Ipou Ipou, J., «*Pteridium aquilinum*, une ptéridophyte envahissante des cultures pérennes du sud de la Côte d'Ivoire: quelques notes ethnobotaniques», *tropicultura*, V.25, n°4, (2007), 232-234.
69. Cody, W. J. et Crompton, C. W., «The biology of canadian weeds. *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn», *Canadian Journal of Plant Science*, V.55, (1975), 1059-1072.
70. Grubben, G., «Ressources végétales de l'Afrique tropicale Volume 2 Légumes», PROTA, Wageningen, (2004).
71. Mandret, G. et Merlin, P., «La fougère aigle, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn au nord-ouest Cameroun», *Études et synthèses de l'I.E.M.V.T. Séminaire Régional sur les Fourrages et l'Alimentation des Ruminants*, (1987), 190-204.
72. Haou, S., de Bélair, G. et Viane, R.L.L., «Inventory of the ferns (filicopsida) of Numidia's (NorthEastern Algeria)», *International Journal of Biodiversity and Conservation*, V.3, n°6, (2011), 206-223.
73. Heim, E., «Flora and Vegetation of Bali Indonesia: An Illustrated Field Guide» Books on Demand, Norderstedt, (2015)
74. Kolbek, J., Srutek, M. et Box, E.E.O., «Forest Vegetation of Northeast Asia», Kluwer Academic Publishers, Netherland, (2003).
75. Page, C., «The taxonomy and phytogeography of bracken- a review», *Botanical Journal of the Linnean Society*, V.73, (1976), 1 - 34.
76. Medjahdi, B., Letreuch-Belarouci, A. et Prelli, R., «Actualisation du catalogue des ptéridophytes du nord-ouest Algérien (région de Tlemcen)», *Acta Botanica Malacitana*, V.38, (2013), 33 -39.

77. Hamel, T., Slimani, A., Madoui, B.E.M. et Boulemtafes, A., «Pteridophytes of Edough peninsula (north-east Algerian)», International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy, V.8, n°1, (2017), 92 - 96.
78. Adou, L.M.D., Kone, M.W., Ipou Ipou, J. et N'GUESSAN, E.K., «Ethnobotanique et analyse phytochimique qualitative de *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (*Dennstaedtiaceae*), une Ptéridophyte utilisée comme plante médicinale en Côte d'Ivoire», Int. J. Biol. Chem. Sci., V.10, n°4, (2016), 1783-1792.
79. Hamel, T., Sadou, S., Seridi, R., Boukhdar, S. et Boulemtafes, A., «Pratique traditionnelle d'utilisation des plantes médicinales dans la population de la péninsule de l'Edough (nord-est Algérien)», Ethnopharmacologia, (2018), 65-71.
80. Hassan, S.W., Umar, R.A., Dabai, Y.U., Ebbo, A.A. et Faruk, U.Z., «Antibacterial, Phytochemical and Toxicity Studies of *Pteridium aquilinum* L. (*Dennstaedtiaceae*) in Rabbits», Journal of Pharmacology and Toxicology, V.2, (2007), 168-175.
81. Kardong, D., Upadhyaya, S. et Saikia, L.R., «Screening of phytochemicals, antioxidant and antibacterial activity of crude extract of *Pteridium aquilinum* Kuhn», journal of pharmacy research, V.6, (2013), 179 - 182.
82. Sahayaraj, K., Borgio, J.S.F. et Raju, G., «Antifungal activity of three fern extracts on causative agents of groundnut early leaf spot and rust diseases», Journal of Plant Protection Research, V.49, n°1, (2009), 53-56.
83. Selvaraj, P., Britto, J. D., A. et Sahayaraj, K., «Phytoecdysone of *Pteridium aquilinum* (L) Kuhn (*Dennstaedtiaceae*) and its pesticidal property on two major pests», Phytopathology and Plant Protection, V.38, n°2, (2005), 99-105.
84. Panneerselvam, C., Murugan, K., Roni, M., Azizv T., Suresh, U., Rajaganesh, R., Madhiyazhagan, P., Subramaniam, J., Dinesh, D., Nicoletti, M., Higuchi, A., Alarfaj, A.A., Munusamy, M.A. Kumar, S., Desneux, N. et Benelli, G., «Fern-synthesized nanoparticles in the fight against malaria: LC/MS analysis of *Pteridium aquilinum* leaf extract and biosynthesis of silver nanoparticles with high mosquitocidal and antiplasmodial activity», Parasitol Res., V.115, n°3, (2015), 997-1013.
85. EL Rasheed, S. et EL Rasheed, A., «Formulation of Essential Oil Pesticides Technology and their Application», Agricultural Research and Technology, V.9, n°2, (2017), 1-19.

86. Martin, A., Varona, S., Navarrete, A., Cocero, M.J., «Encapsulation and Co-Precipitation Processes with Supercritical Fluids: Applications with Essential Oils», *The Open Chemical Engineering Journal*, V.4, (2010), 31-41.
87. Burges, H., «Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial Microorganisms, Nematodes and Seed Treatments», Kluwer Academic, Dordrecht, (1998).
88. Khachatourians, G. et Arora, D., «Applied Mycology and Biotechnology Agriculture and Food Production, vol. 2», Elsevier Sciences, Amsterdam, (2002), 239–274.
89. Hynes, R. et Boyetchko, S., «Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations», *Soil Biology and Biochemistry*, V.38, n°4, (2006), 845–849.
90. Sarwar, M., «Commonly Available Commercial Insecticide Formulations and Their Applications in the Field», *International Journal of Materials Chemistry and Physics*, V.1, n°2, (2015), 116-123.
91. Scarfato, P., Avallone, E., Iannelli, P., Feo De, V. et Acierno, D., «Synthesis and characterization of polyurea microcapsules containing essential oils with antigerminative activity», *J. Appl. Polym. Sci.*, V.105, (2007), 3568–3577.
92. Tanović, B., Gašić, S., Hrustić, J., Mihajlović, M., Grahovac, M., Delibašić, G. et Stevanović, M., «Development of a *Thyme* Essential Oil Formulation and Its Effect on *Monilinia fructigena*» *Pestic. Phytomed. (Belgrade)*, V.28, n°4, (2013), 273–280.
93. Brown, K. et Stine, T., «Principles of Toxicology Second Edition», CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, (2006).
94. Gilles, G., «Notions de Toxicologie. Québec», Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, (2004).
95. Gupta, R., «Biomarkers in toxicology», Academic Press Elsevier, USA, (2014).
96. Walum, E., «Acute Oral Toxicity», *Environmental Health Perspectives*, V.106, n°2, (1998), 497-503.
97. Oliver, J., «Chemicals Testing and Animal Welfare», The National Chemicals Inspectorate, Sweden, (1986), 19-142.
98. Woutersen, R.A., Til, H.P. et Feron, V.J., «Sub-acute Versus Sub-chronic Oral Toxicity Study in Rats: Comparative Study of 82 Compounds», *Journal of Applied Toxicology*, V.4, n°5, (1984), 277-280.

99. Rhoades, R.A. et Bell, D.R., «Medical Physiology Principles for Clinical Medicine 4th Edit», Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, (2013), 536-549.
100. Bigoniya, P., Singh, C.S. et Shukla, A., «A comprehensive review of different liver toxicants used in experimental pharmacology», *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.*, V1, (2009), 124–135.
101. Navarro, V. et Senior, J., «Drug-related hepatotoxicity», *N. Engl. J. Med.*, V.354, (2006), 731-739.
102. Singh, A., Bhat, T.K. et Sharma, O.P., «Clinical biochemistry of hepatotoxicity», *J. Clin. Toxicol.*, S4:001, (2011).
103. Chakroun, S., Ezzi, L., Grissa, I., Kerkeni; E., Neffati, F., Bhourri, R.; Sallem, A., Najjar, M.F., Hassine, M., Mehdi, M., Haoua, Z. et Cheikh Ben, H., «Hematological, biochemical, and toxicopathic effects of subchronic acetamiprid toxicity in Wistar rats», *Environ Sci Pollut Res*, (2016), 25191-25199.
104. Blanchard, A., Rosa, P. et Pascal, H., «Exploration des fonctions tubulaires rénales», *Néphrol. Thérapeut.*, V.5, (2008), 68-83.
105. Greenberg, A., «Primer on Kidney Diseases 5ème Edit», Elsevier Health Sciences, Philadelphie, (2009).
106. McCampbell, K.K., Springer, K.N. et Wingert, R.A., «Analysis of Nephron Composition and Function in the Adult Zebrafish Kidney», *Journal of Visualized Experiments*, (2014), 1-17.
107. Desgrange, A. et Cereghini, S., «Nephron Patterning: Lessons from Xenopus, Zebrafish, and Mouse Studies», *Cells*, V.4, (2015), 483-499.
108. Rhoades, R. B. et Bell, D.R., «Medical physiology : principles for clinical medicine», Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009, 391-418
109. Moreau, D., Robenson, J.M., Putterman, A., Stochalger, J.L. , Cheli, R., Haworth K., Abatan, M. et Arowolo, R., «Anatomy and Physiology 2nd Edit», Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, (2002).
110. Anonyme, «Consensus statement on the health significance of nephrotoxicity (Editorial)», *Toxicol Lett*, V.46, (1989),TXL 02115 .
111. Aparicio, M., Alhenc-Gelas, F., Druke, T.B., Friedlander, G., GAUDRIC, A., GUBLER, M.C., LAVILLE, M., LÉVY, M.; MARRE, M., RIBSTEIN, M., RONCO, P., SIMON, P. et STENGEL, B., «Insuffisance rénale chronique - Etiologies, moyens de diagnostic précoce, prévention », INSERM, Paris, (1998), 141 – 176.

112. Ferguson, A., M., Vaidya, S., V. et Bonventre, V., J., «Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury», *Toxicology*, V.245, (2008), 182-193.
113. Viala, A. et Botta, A. «Chapitre 71. Les pesticides» in «Toxicologie 2ème édition», Lavoisier Tec & Doc. EMI, ( 2005).
114. Damalas, C. et Koutroubas, S., «Farmers' Exposure to Pesticides: Toxicity Types and Ways of Prevention», *Toxics*, V.4, n°1, (2016), 1-10.
115. OMS, «L'utilisation des pesticides en agriculture et ses conséquences pour la santé publique», Organisation mondiale de la santé, (1991), 145.
116. Ojo, J., «Pesticides use and health in Nigeria», *Ife Journal of Science*, V.18, n°4, (2016), 981-991.
117. Cherin, P., Voronska, E., Fraoucen, N. et Jaeger De, C., «Toxicité aigüe des pesticides chez l'homme», *Médecine et Longévité*, V.4, n°2, (2012), 68-74.
118. Thundiyil, J.G., Stober, J., Besbelli, N. et Pronczuk, J., «Acute pesticide poisoning: a proposed classification tool» *Bull World Health Organ*, V.86, n°3, (2008), 205- 209.
119. Arfata, Y., Mahmoodb, N., Tahirc, M., Rashidd, M., Anjume, S., Zhaoa, F., Lia, D.J., Suna, Y.L., Hua, L., Zhihaoa, C., Yina, C., Shanga, P. et Qian, A., «Effect of imidacloprid on hepatotoxicity and nephrotoxicity in male albino mice», *Toxicology Reports*, V.1, (2014), 554–561.
120. Olayinka, E. et Ore, A., «Hepatotoxicity, Nephrotoxicity and Oxidative Stress in Rat Testis Following Exposure to Haloxyfop-p-methyl Ester, an Aryloxyphenoxypropionate Herbicide», *Toxics*, V.3, (2015), 373-389.
121. Noaishi, M. et Abd alhafez, H., «Hepatotoxicity and Nephrotoxicity Evaluation after Repeated Dose of Acetamiprid in Albino Rats», *Egypt. J. Chem. Environ. Health*, V.2, n°2, (2016), 439 -452.
122. Wexler, P., Anderson, B., de Peyster, A., Gad, S., Hakkinen, P.G., Kamrin, M., Locey, B., Mehendale, H., Pope C. et Shugart, L., «Encyclopedia of toxicology 2nd Edit», Elsevier, (2005), 23-24.
123. Chen, L.M., Liu, H.S., Chen, N. et Du, S.M., «The determination of acetamiprid residues om serum by gas chromatography», *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, (2007), 191-192.
124. Brunet, J.-L., Maresca, M., Fantini, J. et Belzunces, L.P., «Intestinal absorption of the acetamiprid neonicotinoid by Caco-2 cells: Transepithelial transport,

- cellular uptake and efflux», *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, V.43, n°3, (2008), 261–270.
125. Zhang, J.J., Wang, Y., Xiang, H.Y., Jia, H.Z. et Wang, X.Z., «Nephrotoxicity of acetamiprid on male mice and the rescue role of vitamin E», *J Anim Vet Adv*, V.11, (2012), 2721–2726.
  126. Zhang, J.J., Wang, Y., Xiang, H.Y., Li, M.X., Li, W.H., Ma, K.G., Wang, X.Z. et Zhang, G.H., «Oxidative stress: Role in acetamiprid induced impairment of the male mice reproductive system», *Agricultural Sciences in China*, V.10, (2011), 786-796.
  127. Tomizawa, M. et Casida, J. E., «Neonicotinoid insecticide toxicology: Mechanisms of Selective Action», *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, V.45, n°1, (2005), 247–268.
  128. Tisserand, R. et Young, R., «Essential Oil Safety. A Guide for Health Care Professionals 2nd Edit», Churchill Livingstone Elsevier, United Kingdom, (2014).
  129. Vigan, M., «Essential oils: renewal of interest and toxicity», *Eur. J. Dermatol.*, V.20, n°6, (2010), 685-692.
  130. Warshaw, E. et Zug, K., «Sesquiterpene lactone allergy», *American Journal of Contact Dermatitis*, V.7, n°1, (1996), 1-23.
  131. Audigié, C., Figarella, J. et Zonszain, F., «Manipulation d'analyse biochimique», Doin Edition, Paris, (1978).
  132. Halmi, S., «Étude botanique et phytochimique: Approche biologique et pharmacologique d'*Opuntia ficus indica*», Thèse, université des frères Mentouri, Constantine.
  133. Diallo, A., «Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* Willd. (*Myrtaceae*)», Thèse, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Bamako, (2005).
  134. Niare, A., «Étude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium guineense* Willd. (*MYRTACEAE*). Thèse, Faculté de Médecine, de Pharmacie, Bamako, (2006).
  135. da Costa, O.B., Menezzi, D., C.H.S., Benedito, C.L.E., Resck, I.S., Vieira, R.F. et Bizzo, H.R., «Essential Oil Constituents and Yields from Leaves of *Blepharocalyx salicifolius* (Kunt) O. Berg and *Myracrodruon urundeuva* (Allemão) Collected during Daytime», *International Journal of Forestry Research*, (2014), 1-6.

136. Adams, R., «Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry 4th ed», Allured Pub Corp, USA, (2007).
137. van den Dool, H. et Kratz, P.D., «A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography», *J. Chromatogr. A*, V.11, (1963), 463-471
138. Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., ydin, T., Cakmakci, R., Ozer, H., Kordali, S., Mete, E. et Dikbas, N., «Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria», *J. Sci. Food Agric.*, V.90, (2010), 145–160.
139. Rožman, T. et Jeršek, B., «Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*», *Acta agriculturae Slovenica*, V.93, (2009), 51-58.
140. Amara, N. et Melouk, F., «Activité Antimicrobienne des Extraits des Feuilles de la Vigne Sauvage (*Vitis vinifera sylvestris*)», *Algerian Journal of Natural Products*, (2016), 358 - 366.
141. Ponce, A.G., Fritz, R., Valle del, C. et Roura, S.I., «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard», *Lebensm.-Wissu.-Technol.*, V.36, (2003), 679-684.
142. Mann, C. et Markham, J., «A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils», *Journal of Applied Microbiology*, V.84, (1998), 538–544.
143. Grover, R. et Moore, J., «Toxicometric studies of fungicides against brown rot organisms *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa*», *Phytopathology*, V.52, (1962), 876–880.
144. de Billerbeck, G., V., Roques, G., C., Bessière, M., Fonvieille, L.J. et Dargent, R.R., «Effect of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* », *Canadian Journal of Microbiology*, V.47, (2001), 9–17.
145. Pandey, D.K., Tripathi, N.N., Tripathi, R.D. et Dixit, S.N., «Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H.suaveolens*», *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, V.89, (1982), 344–349.
146. Thomson, D.P., «Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi», *Mycologia*, V.81, n°1, (1989), 151–153.

147. Harmouzi, A., Boughdad, A., El Ammari, Y. et Chaouch, A., «Chemical composition and toxicity of Moroccan *Tetraclinis articulata* and *Juniperus phoenicea* essential oils against *Aphis citricola* Goot, 1912 (Homoptera, *Aphididae*). Res Chem Intermed, V.5, (2016), 1-13.
148. Bokobana, E.M., Koba, K., Poutouli, W.P., Akantetou, P.K., Nadio, N.A., Laba, B., Tozoou, P., Raynaud, C. et Sanda, K., «Évaluation du potentiel insecticide et répulsif de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. sur *Aphis gossypii glover* (Homoptera: *Aphididae*), ravageur du cotonnier au Togo», Rrv. Cames , (2014), 48-55.
149. «L'index des produits phytosanitaires à usage agricole», Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques, Alger, (2011).
150. Püntener, W. «Manual for field trials. In Plant Protection 2ème edition », Ciba-Geigy Basle, Suisse, (1981).
151. Moussaoui, K., Hedjala, A.O., Zitouni, G. et Djazouli, Z., «Estimation de la toxicité des d'huiles essentielles formulées de thym et d'eucalyptus et d'un produit de synthèse sur le parasite de l'abeille tellienne *Varroa destructor* (Arachnida, Varroidae)», Agrobiologia, V.4, (2014), 17–26.
152. OCDE 423, «Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë», Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques, (2001), 1-14.
153. Bartsch, W., Sponer, G., Dietmann, K. et Fuchs, G., «Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol I 400, 1,2- propanediol and Tween 20», *Arzneimittelforschung*, V.26, n°8, (1976) 1581– 1583.
154. Kelava, T., Cavar, I. et Culo, F., «Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury», *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, V.88, (2010), 1-8.
155. Paiz, R.C., Juárez-Flores, B.I., Aguirre, R.J.R., Cárdenas, O.C., Reyes, A.J.A., García, C.E. et Álvarez, F.G., «Glucose-lowering effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* A. Web., Cactaceae) in diabetic rats», *J. Med. Plants Res.* , V.4, (2010), 2326–2333.
156. Ha, A.W., Kang, H.K., Kim, S.L., Kim, M.H. et Kim, W.K., «Acute and Subacute Toxicity Evaluation of Corn Silk Extract», *Prev. Nutr. Food Sci.*, V.23, n°1, (2018), 70-76.



157. Roy, S., Ukil, B. et Lyndem, L.M., «Acute and sub-acute toxicity studies on the effect of *Senna alata* in Swiss Albino mice», *Cogent Biology*, V.2, (2016), 1272166.
158. Martoja, R. et Martoja-Pierson, M., «Initiation aux techniques de l'histologie animale», Masson, Paris, (1967).
159. OCDE 407, «Étude de toxicité orale à dose répétée pendant 28 jours sur les rongeurs», Ligne Directrice De L'OCDE Pour Les Essais De Produits Chimiques, (2008).
160. Fischer, R. et Yates, F., «Statistical Tables for Biological, Medical and Agricultural Research» Edition Longman, London, (1975).
161. Swaroop, S., «Statistical Methods in Malaria Eradication», Monograph Series World Health Organization, Genève, (1966).
162. Mehaoua, M.S., Hadjeb, A., Lagha, M., Bensalah, M.K. et Ouakid, M.L., «Study of the Toxicity of *Azadirachtin* on Larval Mortality and Fertility of Carob Moth's Female *Ectomyeloisceratoniae* (Lepidoptera, Pyralidae) Under Controlled Conditions», *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, V.7, n°1, (2013), 1-9.
163. Awe, S. et Amobi, O., «Antibacterial, Phytochemical and Proximate Analysis of *Pteridium aquilinum*», *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, V.2, n°9, (2015), 1-7.
164. Sangwan, N.S., Farooqi, A., Shabih, F. et Sangwan, R.S., «Regulation of essential oil production in plants», *Plant Growth Regulation*, V.34, (2001), 3–21.
165. Merghache, S., Hamza, M. et Tabti, B., «Etude physicochimique de l'huile essentielle de *Ruta chalepensis* L. De Tlemcen, Algérie», *Afrique Science : Revue Internationale des Sciences et Technologie*, V.5, n°1, (2009), 67-81.
166. Chauhan, N.K., Singh, S., Haider, S.Z. et Lohani, H., «Influence of Phenological Stages on Yield and Quality of Oregano (*Origanum vulgare* L.) Under the Agroclimatic Condition of Doon Valley (Uttarakhand), *Indian J Pharm Sci.*, V.75, n°4, (2013), 489 - 493.
167. Fadil, M., Farah, A., Ihssane, B., Haloui, T. et Rachiq, S., «Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse», *J. Mater. Environ. Sci.*, V.6, n°8, (2015), 2346 – 2357.

168. Pino, J.A., Marbot, R. et Vazquez, C., «Volatile components of tamarind (*Tamarindus indica* L.) grown in Cuba», J. Essent. Oil Res., V.16, n°4, (2004), 318-320.
169. Pino, J.A., Mesa, J., Muñoz, Y., Martí, M.P. et Marbot, R., «Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars», J. Agric. Food Chem., V.53, n°6, (2005), 2213-2223.
170. Boulanger, R. et Crouzet, J., «Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.): free and bound flavor compounds», Food Chem., V.74, n°2, (2001), 209-216.
171. Jantan, I., Ling, Y.E., Romli, S., Ayop, N. et Ahmad, A.S., «A comparative study of the constituents of the essential oils of three Cinnamomum species from Malaysia», J. Essent. Oil Res., V.15, n°6, (2003), 387-391.
172. Tzakou, O., Vagias, C., Gani, A. et Yannitsaros, A., «Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three Conyza species growing in Greece», Flavour Fragr. J., V.19, (2004), 425-428.
173. Burt, S., «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review», International Journal of Food Microbiology, V.94, n°3, (2004), 223-253.
174. Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R. et Feo De, V., «Essential Oils and Antifungal Activity», pharmaceuticals, V.10, n° 86, (2017), 1-20.
175. Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. et Rasooli, I.I., «Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils», Food Chem., V.102, (2007), 898-904.
176. Dorman, H. J. et Deans, S. G., «Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils», J. Appl. Microbiol., V.88, n°2, (2000), 308–316.
177. Kotan, R., Kordali, S. et Cakir, A., «Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes», Z. Naturforsch., V.62c, (2007), 507-513.
178. Zengin, H. et Baysal, A., «Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy», Molecules, V.19, (2014), 17773-17798.
179. Cristani, M., d'Arrigo, M., Mandalari, G., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Micieli, D., Venuti, V. et Bisignano, G., «Interaction of four monoterpenes contained in

- essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activities», *J. Agric. Food Chem.*, V.55, (2007), 6300–6308.
180. Skandamis, P. et Nychas, G.J., «Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres», *Journal of Applied Microbiology*, V.91, (2001), 1011 – 1022.
181. Pattnaik, S., Subramanyam, V.R., Bapaji, M., Kole, C.R., «Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils», *Microbios* , V.89, (1997), 39–46.
182. Bassolé, I.H.N., Lamien-Meda, A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., Nebie, R.C. et Dicko, M.H., «Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination», *Molecules* , V.15, (2010), 7825–7839.
183. Dadasoglu, F., Aydin, T., Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dikbas, N. et Mete, E., «Antibacterial activities of extracts and essential oils of three *Origanum* species against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants», *J. Plant Pathol.*, V.93, (2011), 271–282.
184. Kotan R., Cakir A., Ozerc H., Kordalia S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Dikbase N., Aydin T. et Kazaz C., «Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria», *Scientia Horticulturae*, V.172, (2014), 210–220.
185. Karami-Osboo, R., Khodaverdi, M. et Ali-Akbari, F., «Antibacterial Effect of Effective Compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora*» *J. Agr. Sci. Tech.* , V.12, (2010), 35-45.
186. Delaunay-Cesbron, S., «Interaction entre des mutants hrp d'*Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, le parent pathogène et la plante hôte : recherche de mécanismes modulant la compatibilité», Thèse, Université d'Angers, France, (2009).
187. Vanneste, J., «Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*», CABI Publishing, UK, (2000).
188. Wilson, M., Epton, H.A.S. et Sigee, D.C., «*Erwinia amylovora* Infection of Hawthorn Blossom II: The Stigma» *J. Phytopathol.*, V.127, (1989), 15–28.

189. Lim, J.A., Jee, S., Lee, D.H., Roh, E., Jung, K., Oh, C. et Heu, S., «Biocontrol of *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Carotovorum* Con Bacteriofagos», J. Microbiol. Biotechnol., V.23, n°8, (2013), 1147 - 1153.
190. Gerardin, D., R., J., Kellenberger, I., Schaerer, S. et Dupuis, B., «Sensibilité de la pomme de terre à la pourriture molle provoquée par *Dickeya* spp.», Recherche Agronomique Suisse, V.6, n°4, (2013), 288–295.
191. Naas, H., Sebahia, M., Orfei, B., Rezzonico, F., Buonauro, R. et Moretti, C., «*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as causal agents of potato soft rot in Algeria», Eur. J. Plant Pathol., v.151, n°4, (2018), 1027–1034.
192. Bhat, K.A., Masood, S.D., Bhat, N.A, Bhat, M.A, Razvi, S.M., Mir, M.R., Sabina, A., Wani, N. et Habib, M., «Current status of post-harvest soft rot in vegetables: a review», Asian J. Pl. Sci. , V.9, (2010), 200-208.
193. Hélia, V., «*Pectobacterium* spp. et *Dickeya* spp. de la pomme de terre : nouvelle nomenclature pour *Erwinia* spp., symptomatologie, épidémiologie et prophylaxie», C. Agricultures, V.4, (2008), 349-354.
194. Ramos, C., Matas, I.M., bardaji, L., Aragón, I.M. et Murillo, J., «*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*: some like it knot», Molecular Plant Pathology, V.13, n°9, (2012), 1-12.
195. Quesada, J., M., Penyalver, R. et López, M.M., «Epidemiology and Control of Plant Diseases Caused by Phytopathogenic Bacteria: The Case of Olive Knot Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*», Plant Pathology, (2012), 299–326.
196. Horváth, G.Y., Botz, L., Kocsis, B., Lemberkovics, É. et Szabó, L.G.Y., «Antimicrobial natural products and antibiotics detected by direct bioautography using plant pathogenic bacteria», Acta Botanica Hungarica , V.46, n°1–2, (2004), 153–165.
197. Božik, M., Nový, P. et Klouček, P., »Susceptibility of Postharvest Pathogens to Essential Oils», Scientia agriculturae bohemica, V.48, n°3, (2017), 103–111.
198. Bouaichi, A., Benkirane, R., Habbadi, K., Benbouazza, A. et Achbani; E.H., «Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* causal agent of olive knot», Journal of Agriculture and Veterinary Science, V.8, (2015), 41-45.

199. Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. et Wright, A.V., «Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria», *J. Agr. Food Chem.*, V.46, (1998), 3590–3595.
200. Di-Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G. et Mauriello, G. «Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media», *J. Agric. Food Chem.*, V.54, (2006), 2745–2749.
201. Alamri, A., El-Newehy, M.H. et Al-Deyab, S.S., «Biocidal polymers: synthesis and antimicrobial properties of benzaldehyde derivatives immobilized onto amine-terminated Polyacrylonitrile», *Chem. Cent. J.*, V.6, (2012), 1-13.
202. Reddy, D., N. et Al-Rajab, A.J., «Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils», *Cogent Chemistry*, V.2, (2016), 1220055.
203. Iacobellis, N.S., Cantore, P.L., Capasso, F. et Senatore, F., «Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils», *J. Agric. Food Chem.*, V.53, (2005), 57–61.
204. Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Faleiro, L., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G. et Pedro, L.G., «Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff Et Link», *Food Chem.*, V.105, (2007), 146–155.
205. Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y. et Efferth, T., «Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components», *Molecules*, V.12, (2012), 2704-2713.
206. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A. et Ihlal, M., «Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the antifungal activity of six Moroccan essences», *Journal of Food Protection*, (1984), 748-752.
207. Bajpai, V.K., Rahman, A. et Kang, S.C., «Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu.», *Ind Crop Prod*, V.26, (2007), 28– 35.
208. Bajpai, V. et Kang, S., «Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu.», *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, V.87, (2010), 327-336.

209. Hussain, F., Abid, M., Shaukat, S.S. et Farzana Akbar, M.M., «Anti-fungal activity of some medicinal plants on different pathogenic fungi», Pak. J. Bot., V.47, n°5, (2015), 2009-2013.
210. Geng, H., Yu, X., Lu, A., Cao, H., Zhou, B., Zhou, L. et Zhao, Z.Z., «Extraction, Chemical Composition, and Antifungal Activity of Essential Oil of Bitter Almon», Int. J. Mol. Sci., V.17, (2016), 1421
211. Perrone, G., Susca, A., Cozzi, G., Ehrlich, K., Varga, J., Frisvad, J.C., Meijer, M., Noonim, P., Mahakarnchanakul, W. et Samson, .R.A., «Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural productsL, Stud. Mycol., V.59, (2007), 53–66.
212. Magan, N. et Olsen., M., «Mycotoxines in food: Detection and control, Woodhead», Publishing in Food Science and Technology, England, (2004).
213. Kokkonen, M., Jesto, M., Rizzo, A. et Rizzo, A., «The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains», Int. J. Food Microbiol., V.99, (2005), 207–214.
214. Rahman, A.U., Choudhary, M.I., Farooq, A., Ahmed, A., Iqbal, M.Z., Demirci, B., Demirci, F. et Baser, K.H.C., «Antifungal Activities and Essential Oil Constituents of Some Spices from Pakistan», Journal- Chemical Society of Pakistan, (2000), 60-65.
215. Gudzic, B., Djokovic, D., Vajs, V., Palic, R. et Stojanovic, G., «Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz.», Flavour Frag. J., V.17, n°5, (2002), 392–394.
216. Mahilrajan, S., Nandakumar, J., Kailayalingam, R., Manoharan, N.A. et SriVijeindran, S., «Screening the antifungal activity of essential oils against decay fungi from palmyrah leaf handicrafts», Biological Research , V.47, n°35, (2014), 1-5.
217. Hammami, I., Smaoui, S., Hsouna, Ben A., Hamdi, N. et Triki, M.A., «*Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease», EXCLI J., (2015), 83–94.
218. Freisesleben, S. et Jager, A., «Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism—a review», Med. Arom. Plants, V.3, (2014), 1–6.

219. Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. et Hirata, T., «Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*», *Flavour Frag J*, V.19, n°1, (2004), 62–68.
220. Sokovic, M. et Van Griensven, L., «Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*», *European Journal Plant Pathology*., V.116, (2006), 211-224.
221. Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos Panayotarou, N. et Tzakou, O., «Composition and Antifungal Activity on Soil-Borne Pathogens of the Essential Oil of *Salvia sclarea* from Greece», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V.50, n°23, (2002), 6688–6691.
222. Thompson, D. P., «Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol», *J. Food Prot.*, V.59, (1996), 412–415.
223. Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L.M.I. et Hmamouchi, M., «Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers.», *J. Ethnopharmacol.* , V.89, (2003), 165–169.
224. Arras, G. et Usai, M., «Fungitoxic activity of twelve essential oils against four postharvest Citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* (L.) Hofmngg oil and its effect in subatmospheric pressure conditions», *Journal of Food Protection*, V.64, (2001), 1025–1029.
225. Haddouchi, F., Chaouche, T.M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A. et Benmansour, A.A., «Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria», *Food Chemistry*, V.141, (2013), 253–258.
226. Al-Snafi, A., «The pharmacological activities of *Cuminum cyminum* - A review» *Journal of Pharmacy*, (2016), 46-65.
227. Viollon, C. et Chaumont, J., «Antifungal proprieties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*», *Mycopathologia*, V.128, (1994), 151-153.
228. Mahmoud, A., «Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents», *Lett. Appl. Microbiol.*, V.19, (1994), 110-113.
229. Chougourou, C.D., Dellouh, P.L., Agbaka, A., N'guessan, K.R. et Gbenou, J.D. «Toxicité et effets répulsifs de certaines huiles extraites des plantes locales

- Béninoises sur la mouche domestique *Musca domestica* L. (DipteraMuscidae)», *Journal of Applied Biosciences*, V.55, (2012), 3953– 3961.
230. Alghamdi, A., «Insecticidal effect of four plant essential oils against two aphid species under laboratory conditions», *Journal of Applied Biology and Biotechnology* , V.6, n°2, (2018), 27-30 .
231. Habou, A., Z., Haougui, A., Mergeai, G., Haubruge, E., Toudou, A. et Verheggen, F.J., «Insecticidal effect of *Jatropha curcas* oil on the aphid *Aphis fabae* (Hemiptera: *Aphididae*) and on the main insect pests associated with cowpeas (*Vigna unguiculata*) in Niger», *Tropicultura*, V.29, n°4, (2011), 225-229.
232. Isman, M., «Plant essential oils for pest and disease management», *Crop Prot.* , V.19, (2000), 603 - 608.
233. Işık, M. et Görür, G., «Aphidicidal activity of seven essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Hemiptera: *Aphididae*)», *Munis Ent. Zool.*, V.4, (2009), 424-431.
234. Digilio, M.M., «Insecticide activity of Mediterranean essential oils», *Journal of Plant Interactions*, V.3, n°1, (2008), 17-23.
235. Czerniewicz, P., Chrzanowski, G., Sprawka, I. et Sytykiewicz, H., «Aphicidal activity of selected *Asteraceae* essential oils and their effect on enzyme activities of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzer)», *Pesticide Biochemistry and Physiology*, V.145, (2018), 84-92.
236. Pellecuer J.A.J., «Sur l'activité de l'huile essentielle de *Hyptis pectinata*», *Révue de l'Institut pasteur de Lyon*, V.9, (1976), 135-159.
237. Hure, J. et Van Der Werf, W., «The influence of black bean aphid, *Aphis fabae* Scop. and its honeydew on the photosynthesis of sugar beet», *Annals of Applied Biology*, V.122, (1993), 189–200.
238. Blackman, R.L. et Eastop, V.F., «Taxonomic Issues», in Van Emden, H. et Harrington, R., «*Aphids as Crop Pests Second Edition*», CABI publishing, London, (2017),1-27
239. Abbassy, M.A., Abdelgaleil, S.A.M. et Rabie, R.Y.A., «Insecticidal and synergistic effects of *Majorana hortensis* essential oil and some of its major constituents», *Entomologia Experimentalis et Applicata*, V.131, n°3, (2009), 225–232.
240. Kimbaris, A.C., Papachristos, D.P., Michaelakis, A., Martinou, A.F. et Polissiou, M.G., «Toxicity of plant essential oil vapours to aphid pests and their coccinellid predators», *Biocontrol Science and Technology*, V.20, n°4, (2010), 411–422.



241. Hasanshahi, G., Abbasipour, H., Jahan, F., Askarianzadeh, A., Karimi, J. et Rastegar, F., «Fumigant Toxicity and Nymph Production Deterrence Effect of Three Essential Oils Against Two Aphid Species in the Laboratory Condition», *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, V.19, n°3, (2016), 706-711.
242. Tunı, I. et Sahinkaya, S., «Sensitivity of two greenhouse pest to vapours of essential oils», *Entomol. Exp. Appl.*, V.86, (1998), 183-187.
243. Görür, G., Abdullah, M.I. et Işık., M., «Insecticidal activity of the *Thymus*, *Veronica* and *Agrimonia*'s essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*», *Acta Phytopathol Entomol Hung*, V.43, (2008), 203-210.
244. Devonshire, A. F., «The evolution of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*», *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B*, V. 353, (1998), 1677–1684.
245. Ayvaz, A. S., «Insecticidal activity of the essential oils from different plants against three stored-product insects», *Journal of Insect Science*, V.10, (2010), 21.
246. Tomova, B.S., Waterhouse, J.S. et Doberski, J., «The Effect of Fractionated Tagetes Oil Volatiles on Aphid Reproduction», *Entomologia Experimentalis et Applicata*, (2005), 115.
247. Grodnitzky, J. et Coats, J., «QSAR evaluation of monoterpenoids' insecticidal activity», *J Agric Food Chem.*, V.50, (2002), 4576–4580.
248. Rai, M. et Carpinella, M., «Naturally Occuring Bioactive Compounds», Elsevier, UK, (2006), 29-44.
249. López, M. et Pascual-Villalobos, M., «Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control», *Industrial Crops and Products*, V.31, (2010), 284–288.
250. Praveena, A.A., «Inhibition of acetylcholinesterase in three insects of economic importance by linalool, a monoterpene phytochemical», *Insect Pest Management*, (2011), 340-345.
251. Gallardo, A., Picollo, M.I., González-Audino, P. et Mougabure-Cueto, G., «Insecticidal Activity of Individual and Mixed Monoterpenoids of Geranium Essential Oil Against *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae)» *Journal of Medical Entomology*, V.49, n°2, (2012), 332–335.
252. Tong, F., Gross, A.D., Dolan, M.C. et Coats, J.R., «The phenolic monoterpene carvacrol inhibits the binding of nicotine to the house fly nicotinic acetylcholine receptor», *Pest Management Science*, V.69, n°7, (2012), 775-780.

253. Enan, E., «Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action», *Comparative Biochemistry and Physiology*, V. C 130, (2001), 325 - 337.
254. Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C, Demchenko, N. et Shaaya, E., «Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests», *Pest Management Science*, V.58, (2002), 1101–1106.
255. Carlisle, B. et Rathburn, J., «Insecticide formulations-types and uses: a review», *J. Au. Mosq. CoNrrrol Assoc.*, (1985), 80-84.
256. Vaghasiya, Y.K., Shukla, V.J. et Chanda, S.V., «Acute Oral Toxicity Study of *Pluchea arguta* Boiss Extract in Mice», *Journal of Pharmacology and Toxicology*, V.6, n°2, (2011), 113-123.
257. Sathish, R., Anbu, J., Murgesan, M., Anjana, A. et Kumar, A., «Toxicity study on siddha formulation mega *Sanjeevi Mathirai* in albino rats», *International Journal of Pharma and Bio Sciences* , V.3, n°3, (2012), 121–130.
258. Chitra, B., Ramaswamy, R.S. et Suba, V., «Toxicity Evaluation of Pūrṇa Cantiroṭaya Centūram, a Siddha Medicine in Wistar Rats», *International Scholarly Research Notices*, (2015), 473296.
259. Dybing, E., Doe, J., Groten, J., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A.G., Schlatter, J., Steinberg, P., Tritscher, A., Walker, R. et Younes, M., «Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues», *Food Chem. Toxicol.*, V.42, (2002), 237-282.
260. Al-Afifi, N.A., Alabsi, A.M., Bakri, M.M. et Ramanathan, A. «Acute and sub-acute oral toxicity of *Dracaena cinnabari* resin methanol extract in rats», *BMC Complementary and Alternative Medicine*, V.18, n° 50, (2018).
261. Magnifouet, N.H., Ngonu, R.A., Kuate, J.R., Koanga, L.M., Tamokou, J.D., Ndifor, F., Mouokeu, R.S., Ebelle, R.M., Biyiti, L. et Amvam, P.H., «Acute and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hyloidendron* stem bark.», *J. Ethnopharmacol.*, V.133, (2011), 70-76.
262. Raza, M., Al-Shabanah, O.A., El-Hadiyah, O.A. et Al-Majed, A.A., «Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice», *Sci. Pharmaceut.*, V.70, (2002), 135-145.

263. Sultan, M.T., Butt, M.S. et Anjum, F.M, «Safety assessment of black cumin fixed and essential oil in normal Sprague dawley rats: Serological and hematological indices», *Food and Chemical Toxicology*, V.47, (2009), 2768–2775.
264. Bailey, S., Zidell, R. et Perry, R., «Relationships Between Organ Weight and Body/Brain Weight in the Rat: What is the best analytical endpoint?», *Toxicologic Pathology*, V.32, (2004), 448-466.
265. Sellers, R., Morton, D., Michael, B., Roome, N., Johnson, J., Yano, B.L., Perry, R. et Schafer, K., «Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicologic Studies», *Toxicologic Pathology*, V.35, (2007), 751-755.
266. Bhardwaj, S., Srivastava, M.K., Kapoor, U. et Srivastava, L.P., «A 90 days oral toxicity of imidacloprid in female rats: morphological, biochemical and histopathological evaluations», *Food Chem Toxicol*, V.48, (2010), 1185–1190.
267. Derelanko, M. et Hollinger, M., «CRC Handbook of Toxicology», CRC Press, USA, (1995), 51-104.
268. Schlam, O.W., Jain, N.C. et Carroll, E.J., «Veterinary Haematology, 3rd ed.», Lea and Tebiger Publishers, Philadelphia, (1975).
269. Abatan, M. et Arowolo, R., «Toxicity of *Eugenia uniflora* to rats», *Nigerian Journal of Animal Production*, V.16, (1989), 16–19.
270. Ajagbonna, O.P., Onifade, K.I. et Suleiman, U., «Hematological and Biochemical changes in rats given extract of *Calotropis procera*. Sokoto », *Journal of Veterinary Sciences*, V.1, (1999), 36–42.
271. Mukinda, J. et Eagles, P., «Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats», *Journal of Ethnopharmacology*, V.128, (2010), 236–240.
272. Atsamoa, A.D., Nguielefacka, T.B., Datté, J.Y. et Kamanyi, A. «Acute and subchronic oral toxicity assessment of the aqueous extract from the stem bark of *Erythrina senegalensis* DC (*Fabaceae*) in rodents», *Journal of Ethnopharmacology*, V.134, (2011), 697–702.
273. Grissa, I., Elghoul, J., Ezzi, L., Chakroun, S., Kerkeni, E., Hassine, M., El Mir, L., Mehdi, M., Cheikh Ben, H. et Haouas, Z., «Anemia and genotoxicity induced by sub-chronic intragastric treatment of rats with titanium dioxide nanoparticles», *Mutat Res Genet Toxicol Envi Mutagen* , V.794, (2015), 25–31.

274. Yousef, M.I, El-Demerdash, F.M., Kamel, K.I. et Al-Salhen, K.S., «Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by isoflavones and cypermethrin», *Toxicology* , V.189, (2003), 223–234.
275. Srivastava, P. et Narain, A., «Catfish blood chemistry under environmental stress», *Experimentia*, (1985), 855–857.
276. Celik, I., Yilmaz, Z. et Turkoglu, V., «Hematotoxic and hepatotoxic effects of dichlorvos at sublethal dosages in rats», *Environ Toxicol*, V.24, (2009), 128–132.
277. Clarke, E. et Clarke, M., «Veterinary Toxicology», Cassel and Collier Macmillan Publishers, London, (1977).
278. Adeneye, A.A., Ajagbonna, O.P., Adeleke, T.I. et Bello, S.O., «Preliminary toxicity and phytochemical studies of the stem bark aqueous extract of *Musanga cecropioides* in rats», *Journal of Ethnopharmacology*, V.105, (2006), 374–379.
279. Hilaly, J.E., Israili, Z.H. et Lyouss, B., «Acute and chronic toxicological studies of *Ajuva Iva* in experimental animals», *Journal of Ethnopharmacology*, V.91, (2004), 43–50.
280. Almdal, T. et Vilstrup, H., «Strict insulin treatment normalizes the organic nitrogen contents and the capacity of urea-N synthesis in experimental diabetes in rats», *Diabetologica*, V.31, (1988), 114-118.
281. Mohany, M., Badr, G., Refaat, I. et El-Feki, M., «Immunological and histological effects of exposure to imidacloprid insecticide in male albino rats» *African. J Pharm Pharmacol*, V.5, (2011), 2106–2114.
282. Toor, H.K., Sangha, G.K. et Khera, K.S., «Imidacloprid induced histological and biochemical alterations in liver of female albino rats», *Pestic Biochem Physiol*, V.105, (2013), 1–4.
283. Hashish, E. et Elgaml, S., «Role of Nicotinic Acid in Mitigating Methomyl Induced Acute Toxicity in Albino Rats», *J Clin Exp Pathol* , V.6, n°2, (2016), 1000268.
284. Crook, M., «Clinical chemistry and metabolic medicine 8th ed.», Hodder Arnold. London, (2012), 416.
285. Thomson, A. et Shaffer, E., «Principes fondamentaux de gastro-entérologie Étatspathologiques et démarches thérapeutiques, 5e éd.». Association canadienne de gastroentérologie, (2005).
286. Nana, H.M., Ngane, R.A.N., Kuate, J.R., Mogtomo, L.M.K., Tamokou, J.D., Ndifor, F., Mouokeu, R.S., Etame Ebelle, R.M., Biyiti, L. et Zollo, P.H.A., «Acute

- and sub-acute toxicity of the methanolic extract of *Pteleopsis hylodendron* stem bark», *Journal of Ethnopharmacology*, V.137, (2011), 70–76.
287. Rahman, M.F., Siddiqui, M.K. et Jamil, K., «Acid and alkaline phosphatase activities in a novel phosphorothionate (RPR-11) treated male and female rats. Evidence of dose and timedependent response», *Drug Chem Toxicol*, V.23, (2000), 497–509.
288. Greaves, P., «Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. Interpretation and Relevance in Drug Safety Studies 4th Edit.» Academic Press, (2012), 892.
289. Tiez, N., «Fundamentals of Clinical Chemistry, 2nd ed.», Martila, Philippines, (1982), 976.
290. Calvert, G., «Agricultural pesticide exposure and chronic kidney disease: new findings and more questions», *Occup Environ Med.*, V.73, n°1, (2016), 1–2.
291. Nwankwo, O.V., Uraku, J.A., Famurewa, C.A. et Uraku, O.H., «Assessment of Nephrotoxicity and Histopathological Lesions of Albino Rats Exposure to DD-Force and Baygon Insecticides», *Int. J. Med. Surg. Sci.*, V.4, n°4, (2017).