

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Biotechnologies



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master Académique en
Sciences de la Nature et de la Vie
Spécialité : Phytopharmacie Appliquée

Contribution à l'optimisation de formulation d'un produit à base d'huile essentielle de thym. Estimation de l'effet biocide sur les culex

Présenté par : **Melle ADLI Fatma**

Devant les membres de jury composé de :

Mr. AROUN M. E. F.	M.C.B.	U.S.D.B	Président
Mme. BABA AISSA K.	M.A.A.	U.S.D.B	Promotrice
Mr. DJAZOULI Z. E.	PR	U.S.D.B	Co-promoteur
Mme. ALLAL L.	PR	U.S.D.B	Examinatrice

Année universitaire 2015/2016

Remerciements

On dit souvent que le trajet est aussi important que la destination. Toutes ses années d'étude m'ont permis de bien comprendre la signification de cette phrase toute simple. Ce parcours, en effet, ne s'est pas réalisé sans défis et sans soulever de nombreuses questions pour lesquelles les réponses nécessitent de longues heures de travail.

Un grand merci à Dieu pour m'avoir donné l'opportunité de mener à terme ce travail.

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que ce mémoire est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ce travail m'ont permis de progresser dans cette phase délicate.

Je tiens à remercier Mr. **AROUN M.E.F** pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury

Je remercie sincèrement ma promotrice Mme **BABA AISSA Karima** pour son aide, sa disponibilité et ses bons conseils.

J'ai beaucoup de reconnaissance à témoigner à mon co-promoteur, le Professeur **DJAZOULI Zahr El-Din**, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire (Laboratoire de Phytopharmacie Appliquée (PPA) de l'Université Saad Dahleb Blida, pour sa disponibilité et pour ses multiples conseils.

Je tiens à remercier Mme **Allel L** pour avoir accepté de faire partie de ce jury

Je souhaite remercier tout particulièrement ma sœur Mme **ADLI Feriel** pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail en acceptant d'être mon guide et pour avoir partagé ses connaissances de la phase expérimentale à la phase rédactionnelle. Elle a toujours été à l'écoute de mes nombreuses interrogations et je la remercie vraiment pour tout ! Merci pour ton aide et pour les bons moments passés ensemble. Je t'adresse mes plus sincères encouragements et te souhaite beaucoup de réussite.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme **Hammadi D** et surtout Melle **Zakour Nora**, pour m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoire Paludisme et des Maladies Parasitaires de l'INSP au titre d'un stage de courte durée.

Un grand merci à ...

A toute ma famille, au clan ADLI pour avoir partagé tous ces bons moments ensemble et à la joie d'être si proches.

A mes parents, pour avoir toujours cru en moi et pour ce que vous faites au quotidien pour moi. Merci de dépasser vos limites pour moi. Merci pour votre confiance, vos sacrifices, vos attentions bienveillantes et vos encouragements.

A mes frère et soeurs :

A Morad, pour être un grand frère pour moi et surtout pour ses encouragements.

A Hania, pour être toujours là pour me faire avancer.

A Mezoura, et à son mari **Abd El-Nacer** qui m'ont beaucoup aidé et supporté

A Kamel, pour ses soutiens à n'importe quel moment et quoi que je fasse.

A Idia, pour ton soutien et tes conseils malgré la distance.

A mon fiancé, pour ta présence, ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien et tes encouragements.

A toute la **famille Djenadi**, pour votre présence depuis toutes ces années, pour m'avoir accueillie entre vous, pour les bons moments qu'on a passé ensembles et pour vos encouragements et votre bonne humeur.

A Sid ahmed pour ta patience, ta sagesse, pour être toujours là quand j'ai besoin de toi et surtout pour m'avoir supportée.

A toute la **famille Adjtoutah**, pour votre soutien, vos encouragements et surtout vos prières pour moi.

A ma nièce Hafsa pour ta spontanéité, ton honnêteté et ta bonne humeur, pour toutes ces années passés ensemble et nos grands moments de délire.

A mon neveu Abd Essalam pour être mon petit frère chéri qui sait m'écouter et qui ne me refuse jamais une demande.

A tous mes nièces et neveux Hanae, Belkis, Abd Essamed, Malak, Abd Elhadi, Asmae, Aroua, Ibrahim, Oumaila, Mouhamed, Imad, Mouadh, Takoua, Anes, le petit dragon Abd Elaziz et la toute petite princesse Tasnim.

A ma cousine Zola, pour être toujours là pour me comprendre, et à toutes nos longues discussions constructives.

A tous mes amis

A Fayçal, pour ta patience et ta sagesse, et pour être toujours présent.

A Imene, pour tous les moments passés ensemble à la fac en tant que binôme et ailleurs et pour les longues heures passées sur skype à rigoler et à travailler.

A Hamza, pour ton aide et ta gentillesse.

A Oussama, pour ton aide et ton humour grandiose

A Yasmine, pour tes heures d'écoute à toute épreuve, pour être présente pour moi quoique je fasse, pour toujours motivée pour sortir.

A Imene pour son bakisme et sa gentillesse BAKA (oui même dans mes remerciements, je le place).

A Ryma, pour savoir m'écouter, pour être ma « meilleure amie » surtout lors de nos grandes discussions qui me manquent.

A Iatimed, pour tous nos moments fantastiques et parfois improbables passés et futurs.

Aux autres, qui n'étaient jamais loin de moi pendant toutes ces années, pour nos grands délires, et pour être des gens à part.

A toute la TEAM, pour m'avoir acceptée comme je suis et pour être toujours là pour moi, pour être des amis géniaux :

A Wail, pour l'aide que tu m'as apportée et ton honnêteté.

A toute la bande de L'OLIVIER **Amel, Amira et Wafa**,... pour nos grandes sorties et pique-nique à la fac et ailleurs.

A toute ma promotion : Nesrine, Asma, Lina, Sarah, Soumia, Hafida, Kheira, Mellissa, Karima, Fatima, Chahra, Islem, Hamid... qui ont fait que toutes ces années d'étude sont passées si vite et si intensément.

A tous les autres biologistes sympas que j'ai rencontrés pendant mes études : Nacer, Soumia, Lamine, ...et à tous les supers souvenirs que l'on a ensemble et à tous les événements futurs.

A tous pour m'avoir apporté chacun à votre manière quelque chose dans ma vie.

A tous ceux que j'ai oubliés, je m'en excuse et je vous remercie aussi.

Merci.

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout

Ils représentent la lumière de notre existence
L'étoile brillante de notre réjouissance

Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal
Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal

Espérant des lendemains épiques
Un avenir glorieux et magique

Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis
Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré

MC

Je dédie cette thèse à ...

A mon très cher oncle Mouhamed Djenadi

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Vous avez toujours été présents pour les bons conseils.

Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au long de ma vie professionnelle et personnelle.

Veillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A ma très chère mère lalla

Azziza

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Contribution à l'optimisation de formulation d'un produit à base d'huile essentielle de thym. Estimation de l'effet biocide sur les *Culex*

Résumé

L'effet dévastateur causé par les Culicidae tant à l'homme qu'aux animaux, par leur rôle de vecteurs potentiels de maladies infectieuses, rend impératif la mise en œuvre d'un ensemble de procédés de lutte visant à réduire sa propagation (Rioux, 1958).

Dans ce travail, il a été question d'optimiser une formulation d'un bioproduit à base d'huile essentielle de thym *Thymus vulgaris* avec un modèle mathématique appliqué sur les moustiques *Culex pipiens*.

L'étude a été menée dans différentes stations : le Parc National de Chréa, le marais côtier de Réghaïa, le laboratoire de phytopharmacie appliquée de l'Université de Saad Dahleb Blida1 et le laboratoire du Paludisme et des Maladies Parasitaires de l'INSP.

Les applications réalisées ont enregistré un effet sur les larves traitées du *Culex pipiens* avec une gradation de toxicité, selon les doses formulées à partir du plan d'expériences choisi.

Les résultats montrent que les différents types d'application d'huile essentielle formulée de *Thymus vulgaris* agissent sur le taux de mortalité des larves du *Culex*.

Mots clés : planification expérimentale, optimisation par plans d'expériences, *Culex pipiens*, *Thymus vulgaris*, Bioproduit.

A contribution to the optimisation of formulation of a product based on Thyme essential oil. Estimated biocidal effect on *Culex*.

Abstract

The devastating effect caused by Culicidae both man and animals, in their role as potential vectors of infectious diseases, makes imperative the implementation of a set of control processes to reduce its spread (Rioux 1958).

The aim of this dissertation is to optimize the formulation of thyme *Thymus vulgaris* essential oil based bioproduct with a mathematical model applied on *Culex pipiens* mosquitoes.

The experiment was conducted at the experimental station of the Faculty of Natural and Life Science. The study was carried out in different stations: the Chréa National Park, coastal marshes Réghaïa, laboratory of applied phytopharmacy and at University Saad Dahleb Blida and the Laboratory of Malaria and Parasitic Diseases of the INSP.

The applications built have recorded an effect on some population parameters of the treated insect, *Culex pipiens*. This effect shows toxicity gradation, according to the doses raised from the used software.

The results show that different types for applying *Thymus vulgaris* essential oils act on reducing the residual populations of larvae of *Culex pipiens*.

Keywords: experimental design, optimization design of experiments, *Culex pipiens*, *Thymus vulgaris*, Bioproduct.

الإسهام في إيجاد الصيغة المثلى للمنتج الحيوي المستخلص من الزيت الأساسي للزعتر. تقدير لتأثير المبيد البيولوجي على البعوض.

ملخص

الآثار المدمرة الناجمة عن البعوضيات تأثر على كل من الإنسان والحيوان، في دورها كناقلات محتملة للأمراض المعدية، ويجعل من الضروري تنفيذ مجموعة من عمليات الرقابة لمنع انتشارها (Rioux 1958).

قمنا في هذه الدراسة ، بالنقاش الأمثل لتحسين صيغة منتج حيوي بقاعدة زيت أساسي للزعتر *Thymus vulgaris* بنموذج رياضي تمّ تطبيقه على البعوض *Culex pipiens*. وقد أجريت الدراسة في محطات مختلفة: الحديقة الوطنية للشريعة والمستنقع الساحلي لرعاية، مختبر الصيدلة النباتية التطبيقية لجامعة سعد دحلب البليدة ومختبر الملاريا و الأمراض الطفيلية INSP.

التطبيقات المنجزة سجلت تأثيرا على بعض العوامل السكانية لليرقات المعالجة للبعوض *Culex pipiens*. هذا التأثير يمثل بتدرج في النسب، حسب الدفعات المصاغة ابتداء من خطة التجارب المختارة.

النتائج تظهر أنّ الأنواع المختلفة لتطبيق الزيوت الأساسية للزعتر تعمل على تخفيض التجمّعات المتبقية ليرقات بعوض *Culex pipiens*.

□□□□□□ □□□□□□

التخطيط التجريبي ، التحسين عن طريق التصميم التجريبي، *Thymus vulgaris* ، *Culex pipiens* المنتج الحيوي

Liste des figures

- Figure 01** : Photo d'une femelle de *Culex pipiens* lors d'un repas de sang (In Balenghien, 2006)6
- Figure 02** : Morphologie générale d'un *Culex* adulte (Mariana Ruiz Villarreal, 2010)..7
- Figure 03** : Morphologie schématique de la tête de Culicinae (Wood et al., 1979)8
- Figure 04** : Morphologie schématique du thorax chez les Culicidae (Becker et al., 2003)10
- Figure 05** : Aspect général du génitalia mâle d'un Culicidae (*Culex pipiens* L) (Knight et Laffoon, 1971)11
- Figure 06** : OEufs en Nacelle de *Culex pipiens* (Cliché Amara Korba, 2010)12
- Figure 07** : Larve de *Culex. Pipiens* (In Brunhes et al., 1999)13
- Figure 08** : Morphologie externe de la tête de la larve des Culicidae (in Boukraa S., 2010) a : Vue dorsale chez les Anophilinae (à gauche) et les Culicinae (à droite) (Becker et al., 2003, avec légende complétée). b : Mentum d'une larve de 4ème stade de *Culex theileri* (Boukraa S., 2010) c : Antenne et soies antennaires de Culicinae (Schaffner et al., 2001).14
- Figure 09** : Chetotaxie de la face dorsale du thorax et de l'abdomen des larves (Becker et al., 2003)15
- Figure 10** : Soies du siphon et des segments VIII et X d'une larve de Culicinae (Becker et al., 2003)17
- Figure 11** : Aspect général d'une nymphe de *Culex pipiens* (Berchi, 2000)18
- Figure 12** : Cycle de développement de moustique *Culex pipiens* (Klowden, 1990).19
- Figure 13** : Distribution de *Culex pipiens* dans le monde (Senevet et al., 1999)22
- Figure 14** : Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles (Tayoub, 2006)29
- Figure 15** : (A): Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles, poil sécréteur (Khenaka, 2011). (B): illustration schématique du développement de la glande productrice d'huile essentielle (Gaspar, 2004)29
- Figure 16** : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L.(Iserin, 2001)36
- Figure 17** : Les plans d'expériences optimisent les trois parties encadrées du processus d'acquisition des connaissances (Goupy J. 1999)42

Figure 18 : Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental (Goupy J. 1999)	43
Figure 19 : Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux (Goupy J. 1999)	43
Figure 20 : Définition de domaine d'étude (Goupy J. 1999)	44
Figure 21 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy J. 1999)	44
Figure 22 : a. Localisation du parc national de Chréa (Anonyme, 2015) b. Site de récolte mois d'Avril (Originale, 2016)	49
Figure 23 : a. Carte de la réserve naturelle du lac de Réghaïa (Source : Direction générale des forêts, 2014) b. Centre cynégétique de Réghaïa (Originale, 2016)	50
Figure 24 : Protocole de collecte des larves de culex (Originales, 2016)	51
Figure 25 : <i>Thymus vulgaris</i> (Originale, 2016)	53
Figure 26 : Montage appareil hydro-distillateur clevenger (Originale, 2016)	54
Figure 27 : Huile essentielle de Thym (Originale, 2016)	54
Figure 28 : Les étapes d'isolement des larves de culex (Originales, 2016)	56
Figure 29 : Les étapes d'éclaircissement des larves des culex (Originales, 2016) a. Rinçage dans de l'eau distillée (10min), b. Eclaircissement dans du KOH a 10% (10min), c. Rinçage dans de l'eau distillée (5min), d.e.f. déshydratation dans de l'alcool a différentes concentrations (70°, 90° et 100°)	56
Figure 30 : a. Montage des larves des culex et b. Observation des larves des culex (Originales, 2016)	57
Figure 31 : Critères d'identification de <i>Culex pipiens</i> (Originales, 2016)	57
Figure 32 : Les étapes du déroulement des tests (Original, 2016) a. Dépôts des larves, b. Prélèvement du produit pour le dosage et c. Injection du produit dans les gobelets	58
Figure 33 : Matrice des essais de plan d'expériences	61

Figure 34 : Tableau récapitulatif de la matrice d'expériences	62
Figure 35 : Graphe illustrant le taux de mortalité en fonction de la concentration de l'HE formulée à base de thym	62
Figure 36 : Graphe des valeurs de probabilité normale	66
Figure 37 : Graphe des effets moyens des facteurs	67
Figure 38 : Graphe des écarts	67
Figure 39 : Graphe des effets moyens	68
Figure 40 : Graphe qui démontre la solution du point optimale	69

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i> (Morales, 2002)	36
Tableau 02 : Teneur en polyphénols dans l'infusion aqueuse du <i>Thymus vulgaris</i> (Kulišić et al., 2006)	38
Tableau 03 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de <i>Thymus vulgaris</i> L	39
Tableau 04 : Equipements et produits utilisés au laboratoire	55
Tableau 05 : Effet de la concentration de l'HE	63
Tableau 06 : Des statistiques du modèle	64
Tableau 07 : Tableau représentatif de l'analyse de la variance avec test d'écart à la linéarité	64
Tableau 08 : Analyse post-ANOVA avec intervalle de confiance	65
Tableau 09 : Tableau des prévisions	69

Liste des abréviations

- (ANOVA)** Analyses de la variance
- (°C)** Degré Celsius
- (Cm)** Centimètre(s)
- (DDT)** Dichloro-diphényl-trichloroéthane
- (F-valeur)** valeur de test de Fisher
- (G)** Gramme(s)
- (Gx)** Grossissement
- (H)** Heure(s)
- (Ha)** hectare(s)
- (HE)** Huile Essentielle(s)
- (HPLC)** La chromatographie en phase liquide à haute performance
- (INSP)** Institut National de la Santé Publique
- (KOH)** Hydroxyde de potassium
- (M)** Mètre(s)
- (MI)** Millilitre(s)
- (Mm)** Millimètre(s)
- (N°)** Numéro
- (Prob)** Probabilité
- (R²)** Le coefficient de corrélation

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste de figures

Liste de tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique4

I. Présentation de *Culex pipiens*.....4

1. Généralités4

2. Présentation de *Culex pipiens*4

2.1. Définition.....4

2.2. Caractéristiques de *Culex pipiens*5

2.3. Position systématique5

2.4. Cycle de développement du moustique6

2.4.1. L'adulte (Imago)7

2.4.1.1 Tête.....7

2.4.1.2 Thorax.....9

2.4.1.3 Abdomen.....10

2.4.2. Les œufs.....11

2.4.3. La larve.....12

2.4.3.1. Tête.....13

2.4.3.2 Thorax.....15

2.4.3.3 Abdomen.....15

2.4.4. La nymphe.....17

3. Périodes d'activité.....19

4. Facteurs de développement.....20

5. Reproduction.....20

6. Ponte21

7. Répartitions géographiques.....21

7.1 En Algérie	22
8. Intérêts de la lutte contre <i>Culex pipiens</i>	22
8.1. Espèces cibles.....	22
8.2. Les principales nuisances causées par <i>Culex pipiens</i>	23
9. Les différents moyens de lutte contre les moustiques	25
a- Lutte physique	25
b- Lutte génétique	25
c- Lutte chimique	26
d- Lutte biologique	26
e- Lutte intégrée	27
II. Les huiles essentielles	27
1. Définition des huiles essentielles.....	27
2. Localisation.....	28
3. Composition chimique.....	29
4. Rôle physiologique.....	30
5. Propriétés et caractéristiques	30
6. Procédés d'extraction.....	31
6.1. Hydro-distillation	31
6.2. Entraînement à la vapeur d'eau	32
6.3. L'hydro-diffusion	32
6.4. Extraction assistée par micro-ondes.....	32
7. Toxicité des huiles essentielles.....	32
8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles	33
9. Conservation des huiles essentielles	34
III. Présentation du <i>Thymus vulgaris</i>	34
1. Généralités.....	34
2. Présentation de la plante	35
2.1. Origine	35
2.2. Position systématique	35
2.3. Description botanique.....	36
2.4. Composition chimique.....	37
2.5. Utilisation des feuilles.....	39
3. Intérêt de la formulation d'un bioproduit	40
IV. Les plans d'expériences	41

1. Construction d'un plan d'expérience	45
2. Les différents types de plans d'expériences	45
▪ Plans de criblage	45
▪ Plans de modélisation	45
▪ Plans de mélanges	46
Chapitre II : Matériel et méthodes	47
1. Partie terrain	47
1.1. Sites de récolte des matériels biologiques	47
1.1.1. Parc National de Chréa	47
a- Les températures.....	47
b- Les précipitations	48
c- La neige	48
d- Le brouillard	48
c- Le vent (sirocco).....	48
1.1.1.1. Méthode d'échantillonnage	49
1.1.2. Le marais côtier de Réghaïa.....	49
1.1.2.1. Matériels utilisés	50
1.1.2.2. Méthode d'échantillonnage.....	51
2. Partie laboratoire	52
2.1. Extraction de l'huile essentielle.....	52
2.1.1. Matériels utilisés	52
2.1.2. Matériel végétal	52
2.1.3. Méthode d'extraction.....	53
2.2. L'identification des larves	55
2.2.1. Matériels utilisés.....	55
2.2.2. Matériel entomologique	55
2.2.3. Méthode d'identification des larves	55
2.3. Etude de l'activité larvicide	57
2.3.1. Formulation du bioproduit	57
2.3.2. Test de toxicité.....	58
3. Méthode d'analyse des données	59

3.1. Le calcul du pourcentage de mortalité observée.....	59
4. Analyse statistique des résultats.....	59
a- Analyses de variance (Design Expert DX7)	59
Chapitre III : Résultats et interprétations	60
1. Préparation des essais (expériences)	60
1.1. Choix de la réponse	60
1.2. Choix des facteurs	60
1.3. Choix du domaine	60
1.4. Choix du plan d'expérience.....	60
1.5. Choix de l'expérimentation	61
2. Utilisation du modèle et optimisation.....	68
Chapitre IV : Discussion générale.....	70
Conclusion générale	72
Références bibliographique	
Annexes	

Certains groupes de Diptères sont responsables des plus grandes endémies, c'est le cas des Culicidae. Ces insectes qui forment des groupes très homogènes, occupent une place importante dans la faune terrestre comme dans la faune aquatique d'une part et dans la transmission de maladies dues à leurs piqûres d'autre part. Ces insectes font alors l'objet d'un matériel d'étude très important pour les entomologistes. Les Culicidae causent de graves préjudices tant à l'homme qu'aux animaux par leur rôle de vecteurs potentiels de maladies infectieuses, tels que le paludisme, la fièvre jaune, la dengue, la filariose et la peste équine (Rioux, 1958).

En Algérie, *Culex pipiens L.* est l'espèce de moustique qui présente le plus d'intérêt pour son étude en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines (Bendali & al., 2001). Les moustiques sont généralement contrôlés par des insecticides conventionnels (organochlorés, organophosphorés et pyréthrinoïdes) qui ont donné de bons résultats mais, malheureusement, ont aussi largement contribué à perturber l'environnement par des effets toxiques indésirables sur l'homme et sur les espèces non visées (Ishaaya & Horowitz, 1998). En conséquence, une lutte intégrée et raisonnée s'est développée ces dernières années avec l'apparition de nouvelles molécules biologiques ayant une action spécifique sur le processus du développement des insectes nuisibles.

La réflexion actuelle sur les méthodes de lutte non chimiques s'adressant particulièrement aux formes larvaires (Chapman, 1981 ; Coz et Mouchet, 1981) tient d'une part aux limitations des produits chimiques synthétiques en santé publique (Moreau et Stiles, 1978), aux défauts des méthodes classiques, et d'autre part, au grand avantage de la lutte biologique qui n'est dangereuse ni pour l'homme, ni pour l'environnement, et on peut espérer qu'elle sera efficace à long terme.

Pour assurer une meilleure intervention, tout en préservant au maximum le milieu naturel, de nouvelles méthodes préventives ainsi que de nouveaux produits sont constamment recherchés. Ainsi, pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de contrôle des

moustiques est davantage encouragée. Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement. L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (Crosby *et al.*, 1966).

Dans certaines régions d'Afrique noire, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, comme en Algérie, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales. En effet, les odeurs du basilic *Ocimum basilicum*, Basil (Labiée) et de Sarghina, *Corrigiola telephiifolia* (Caryophyllacée) sont des répulsifs très efficaces. D'après Jacobson (1989), plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées.

Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les larves d'insectes. L'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de Jang *et al.* (2002) sur *A. aegypti* et *Culex pipiens* en testant l'activité larvicide de certaines légumineuses et les travaux d'Alaoui Slimani (2002) dans lesquels la toxicité de *Mentha pulegium* (Labiée) a été confirmée sur des larves de culicidés.

L'originalité de ce travail réside dans l'optimisation de la formulation d'un bioproduit à base d'huile essentielle de thym *Thymus vulgaris* appliqué contre les larves de *Culex pipiens*. Cette optimisation étant réalisée par la méthode statistique des plans

Notre travail s'articule autour de quatre chapitres : le premier chapitre présente une revue bibliographique divisée en quatre parties. La première partie de ce chapitre concerne les Culicidae, la seconde est consacrée aux Huiles Essentielles, pour la troisième le thym. Et pour le dernier, goupy.

Le second chapitre matériel et méthodes, présente le choix des stations d'étude, la description des biotopes ainsi que les méthodes utilisées pour l'échantillonnage et l'extraction de l'huile essentielle du thym ainsi que la collecte et l'identification du *Culex pipiens*.

Le troisième chapitre rassemble les résultats obtenus au cours de notre étude lesquels concernent l'effet biocide du bioproduit formulé à base de thym contre les larves du *Culex*

pipiens. Les résultats sont analysés par des méthodes de planification expérimentale moyennant le logiciel Design Expert version DX7.

Le quatrième chapitre est consacré à la discussion générale.

Enfin, nous terminons ce travail par une conclusion générale en mettant l'accent sur les perspectives et les travaux qui restent à mener en se référant à de nouvelles voies d'approche qui pourraient peut-être élucider certains problèmes causés par ces diptères.

I. Présentation de *Culex pipiens*

1. Généralités

Les moustiques, d'abord recensés sous le terme *Culex* ont été identifiés en 1759. Pour autant on a la certitude qu'ils sont apparus à l'ère jurassique, il y a plus de 170 millions d'années. Le fossile le plus ancien retrouvé date du crétacé (environ 145 millions d'années). A cette époque, ils étaient trois fois plus gros que les moustiques actuels (Anonyme 2015).

Ce n'est qu'au XVIIIème siècle que les entomologistes définissent une meilleure classification et que la famille soit dénommée Culicidae.

A ce jour, 3523 espèces de moustiques sont répertoriées sur la surface du globe. Parmi celles-ci, 10 sont assez agressives envers l'humain. Il s'agit essentiellement des : *Aedes Caspius*, *Aedes Detritus* et *Culex Pipiens*.

La famille *Culex* compte près de 800 espèces, dont les plus connues sont *Culex Pipiens* et *Culex Quinquefasciatus*.

Les *Culex* sont présents sur l'ensemble des zones terrestres (sauf l'Antarctique où il fait véritablement trop froid pour leur survie) dans tous les milieux naturels, et urbains (Bussieras et Chermette, 1991). Ils sont présents là où il y a de l'eau.

2. Présentation de *Culex pipiens*

2.1. Définition

Culex pipiens est un moustique qui appartient à la variété dite commune de moustiques (*Culex*). Il est également nommé maringouin, cousin ou moustique domestique. Il existe des sous-espèces de *Culex pipiens*. Tout comme chez les autres espèces de moustiques, c'est la femelle qui pique pour produire ses œufs. Le sang consommé est donc indispensable à la reproduction de cette espèce. Pour

lutter contre ce moustique on utilise des insecticides ou la réintroduction de prédateurs naturels (Pierrick, 2014).

2.2. Caractéristiques de *Culex pipiens*

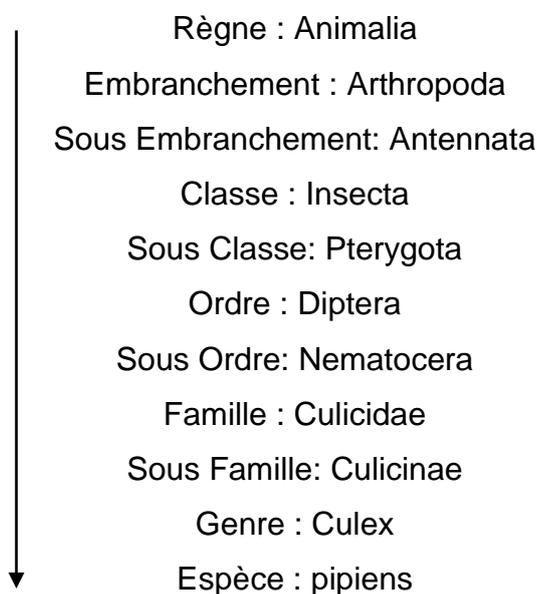
Culex pipiens possède les principales caractéristiques suivantes:

- palpes allongés chez le male (plus longs que la trompe) et légèrement recourbés vers le haut,
- palpes plus courts que la trompe chez la femelle (environ un quart de sa taille),
- au repos, l'abdomen des adultes est quasiment parallèle au support,
- larves avec antennes allongées,
- siphon respiratoire des larves long.

Culex pipiens est une espèce relativement commune en région méditerranéenne. On la retrouve également dans toutes les régions tempérées de l'hémisphère nord (Wall et Shearer, 1992).

2.3. Position systématique

La position systématique du moustique *Culex pipiens* a été proposée par Linné (1758), comme suit:



2.4. Cycle de développement du moustique

Morphologiquement, les Culicidae sont caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles (6 à 40 articles), des ailes pourvues d'écailles, les femelles possèdent de longues pièces buccales en forme de trompe rigide vulnérantes de type piqueur-suceur.

Les Culicidae, auxquels appartient le complexe *Culex pipiens*, sont des insectes à métamorphose complète (Holométaboles), passant par trois stades de développement. De sorte que ces derniers (larve, nymphe et adulte) ont des morphologies différentes, adaptées à leurs modes de vie : aquatique pour les stades pré-imaginaux, et aérien pour le stade imaginal (Carnevale et Robert, 2009) (figure 12). Dans les conditions optimales, le cycle dure de 10 à 14 jours. La femelle adulte est hématophage, après son émergence d'une durée estimée à 24-72h, elle pique les vertébrés pour sucer leur sang contenant des protéines nécessaires à la maturation des œufs (Klowden, 1990) (figure 01). Pendant la piqûre, la femelle injecte de la salive anticoagulante qui provoque, chez l'homme, une réaction inflammatoire plus ou moins importante selon les individus (Reinert, 2000).



Figure 01 : Photo d'une femelle de *Culex pipiens* lors d'un repas de sang (In Balenghien, 2006)

Dans ce qui suit, il est important de décrire les différents caractères morphologiques de l'adulte, et des stades pré-imaginaux dont la connaissance est indispensable en systématique.

2.4.1. L'adulte (Imago)

L'adulte atteint environ 9 mm en taille moyenne, globalement brun clair, avec des bandes antérieures claires sur les tergites abdominaux. Il se distingue facilement des autres familles de Nématocères, notamment par les écailles dont leur corps est recouvert et par la trompe (ou proboscis) très allongé. Trois parties bien distinctes compose l'adulte : la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 02).

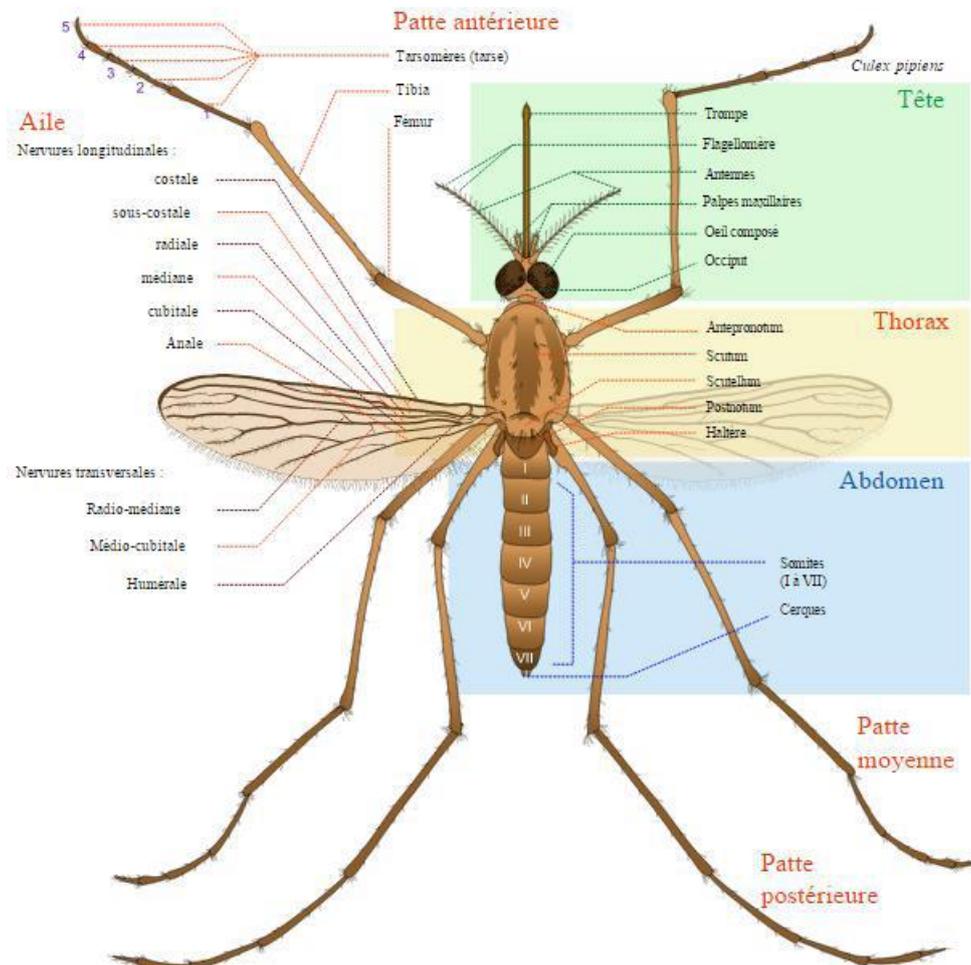


Figure 02 : Morphologie générale d'un *Culex adulte* (Mariana Ruiz Villarreal, 2010)

2.4.1.1 Tête

Deux yeux composés de nombreuses ommatidies s'étendant sur les faces dors-latérales mais aussi sur une petite partie de la face ventrale. Ocelles absents. Les parties antérieure et supérieure de la tête comprenant, de bas en haut et d'avant en arrière, le clypeus (au-dessus de l'insertion de la trompe), le front (qui porte les

antennes), le vertex (région juxta-oculaire) et l'occiput (partie postérieure). Dans les échancrures du champ oculaire, s'insèrent les antennes. Celles-ci sont formées de 15 articles chez les mâles et 16 articles chez les femelles. Les deux premiers articles appelés respectivement scape et pédicelle et les articles suivants forment le flagellum, portant à leur base des verticilles de soies, dont la longueur et le nombre varient suivant le sexe. L'appareil buccal de type piqueur-suceur est constitué par une trompe allongée, très développée, toujours dirigée en avant, droite ou courbée (Rodhain et Perez, 1985) (Figure 03). Cette dernière est constituée chez la femelle, la seule qui est hématophage, par une gaine en gouttière (lèvre inférieure ou labium) à concavité tournée vers le haut et terminée par deux lobes sensoriels appelés labelle. Le labium renferme 6 stylets dont l'ensemble forme l'appareil vulnérant. Ces stylets comprennent deux mandibules, deux maxilles, l'hypo-pharynx contenant un canal de petit diamètre (canal salivaire) et le labre (épi-pharynx). En se réunissant les deux derniers, forment l'appareil suceur. De tous les stylets terminés en pointe, seuls les maxilles sont dentées en scie à la partie apicale. Lors de la piqûre, le labium ne pénètre pas dans les téguments mais se replie à leur surface. De part et d'autre de la trompe, sont insérés les palpes maxillaires, qui se composent de 5 articles chez tous les mâles ainsi que les femelles des Anophielinae et de 3 articles chez les femelles des Culicinae. Chez les mâles, les deux paires de stylets mandibulaires et maxillaires sont réduits ou manquants, ce qui les rend incapables de piquer (Séguy, 1923, 1955 ; Callot et Helluy, 1958 ; Becker et *al.*, 2003).

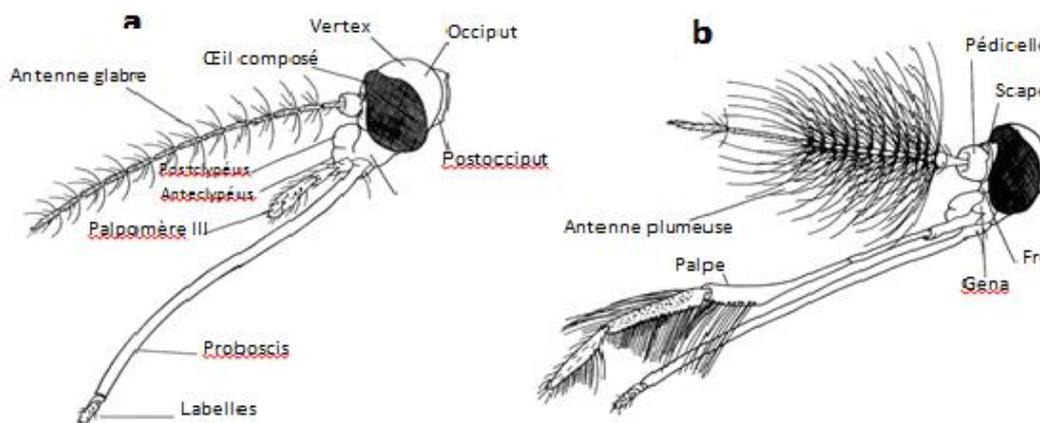


Figure 03 : Morphologie schématique de la tête de Culicinae (vue de profil)

a) Femelle, b) Mâle (Wood et al., 1979)

2.4.1.2 Thorax

Assez globuleux et renflé à sa partie dorsale, le thorax comporte trois segments soudés, le pro, le méso et le métathorax, dont chacun présente une partie dorsale (tergum) et une partie ventrale (sternum). Les pièces latérales étant les pleures. Sur chacun de ces segments, s'insère une paire de pattes. En outre, le mésothorax, très développé, porte une paire de stigmates ou spiracles, une paire d'ailes et un prolongement postérieur et dorsal qui est le scutellum. La présence ou l'absence de soies post et pré-spiraculaires au niveau du mésothorax constitue l'un des principaux caractères pour distinguer les genres des Culicinae.

Le métathorax porte quant à lui une paire de stigmates et une paire de balanciers ou haltères (Rodhain et Perez, 1985) (Figure 04). La membrane alaire, transparente, est soutenue par des nervures longitudinales et transversales délimitant entre elles les cellules dont les plus importantes au niveau systématique sont celles qui sont comprises entre les deux fourchettes radiales R2+3 et R4+5. En outre, ces nervures portent des écailles et le bord postérieur de l'aile est orné d'une frange d'écailles. Des écailles de formes, de couleurs et de dispositions variées, couvrent également les segments thoraciques et les pattes (Hegh, 1921 ; Becker et *al.*, 2003). D'après Séguy (1923), les pattes sont très fragiles, longues et grêles. Leur longueur augmente de la première à la troisième paire. Chaque patte comprend, de sa base à l'extrémité distale, la hanche ou coxa, le trochanter indistinct, le fémur, le tibia et un tarse de cinq articles, dont le dernier porte deux griffes et parfois un empodium et deux pulvilli. Elles peuvent porter des soies, des poils et présenter des anneaux, formés par des écailles, diversement colorés. L'absence ou la présence de griffes denticulées ou de pulvilli sur les derniers tarsi permet de distinguer les genres constituant la famille des Culicidae.

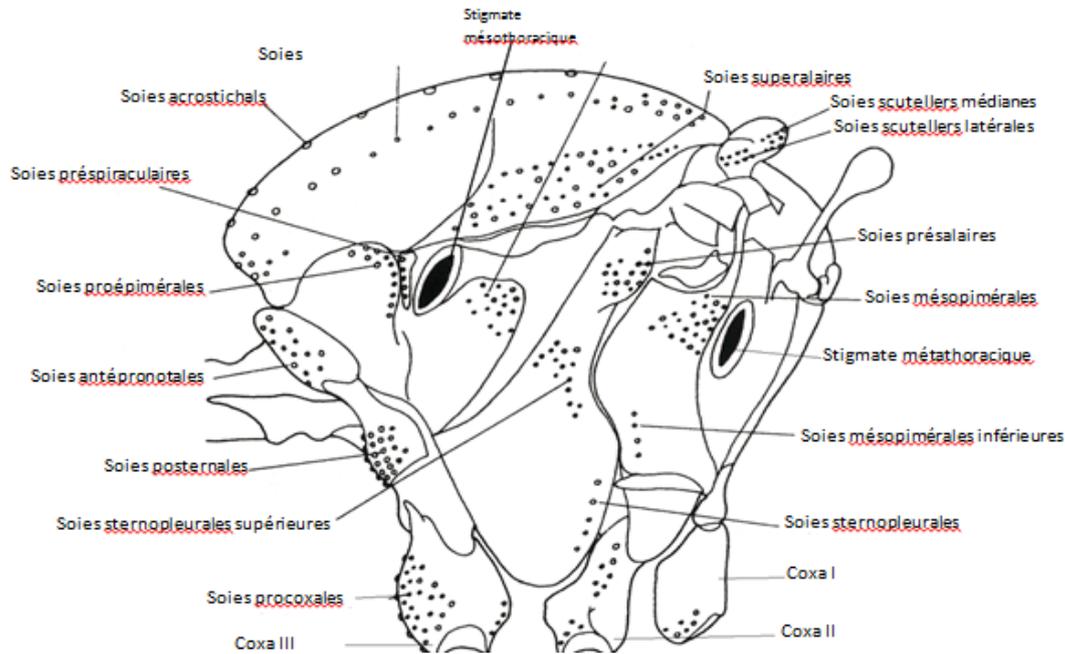


Figure 04 : Morphologie schématique du thorax chez les Culicidae, indiquant l'emplacement de principaux groupes de soies utilisés en taxonomie (Becker et al., 2003, dont la légende a été complétée)

2.4.1.3 Abdomen

Il est formé de dix segments, mais seuls les huit premiers sont différenciés et visibles extérieurement. Ils sont composés chacun d'une plaque chitineuse dorsale, le tergite et d'une plaque ventrale ou sternite reliées par une membrane souple latérale. La localisation des écailles et des soies, leur couleur et leur disposition sur les tergites abdominaux sont très variés (écailles absentes chez les Anophelinae). Les deux derniers segments abdominaux, sont modifiés pour les fonctions reproductrices. Les appendices génitaux ou genitalia du mâle (hypopigium) sont pourvus de diverticules anatomiques complexes et fournissent les meilleurs caractères de systématique. Le IXe segment comporte trois articles dont le gonocoxite de forme ovoïde, le gonostyle mince et allongé et un 3ème article généralement réduit à une petite dent ou épine (Figure 05). Cependant le Xe segment ou segment anal, représente la partie centrale au niveau duquel se remarquent le pénis ou phallosome qui est un organe impair médian, entouré de deux paramères et souvent des protubérances d'aspect très variés (en oursin chez les *Culex* par exemple), ainsi que deux bras latérobasaux, plus ou moins

développés, insérés à sa base (Knight et Laffoon, 1971 ; Rodhain et Perez, 1985). Chez la femelle, les segments génitaux de formation très simple, n'ont guère de valeur taxonomique. Le Xe segment porte deux prolongements, les cerques, principalement visibles pour les genres *Aedes* et *Ochlerotatus*.

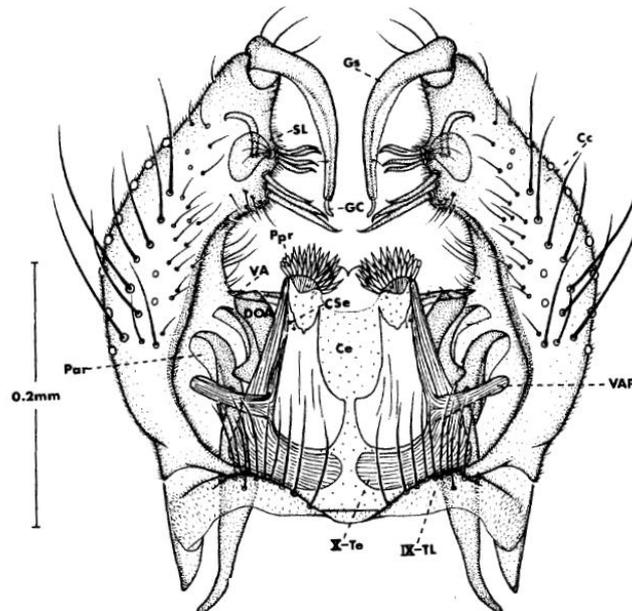


Figure 05 : Aspect général du génitalia mâle d'un Culicidae (*Culex pipiens L.*) (Cc : gonocoxite ; Ce : cerque ; GC : griffe du gonostyle ; Gs : gonostyle ; Par : paramère ; Ppr : paraprocte ; SL : lobe subapical ; VA : bras ventral ; VAP : bras basal ; X-Te : tergite X ; IX-TL : lobe du tergite IX) (Knight et Laffoon, 1971)

2.4.2. Les œufs

Fusifformes, ils mesurent environ 1mm de long. Pondus en « radeaux » directement sur la surface de l'eau. De couleur blanchâtre au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent (Fig.6). Ils sont détruits très rapidement en cas d'assèchement. Ils sont réunis par 200 à 400 en nacelle leur permettant d'être insubmersibles (Anonyme).

L'œuf comprend de l'intérieur vers l'extérieur l'embryon, la membrane vitelline pellucide, l'endo-chorion et l'exo-chorion plus ou moins pigmenté et ornementé. Les *Culex*, forment des nacelles plus ou moins régulières où chaque œuf (Figure 06), qui est muni d'un flotteur micropylaire en socle, se tient verticalement (Séguy, 1955).

C'est avec les pattes postérieures croisées que la femelle du moustique guide ses œufs pour obtenir cette formation (Callot et Helluy, 1958).

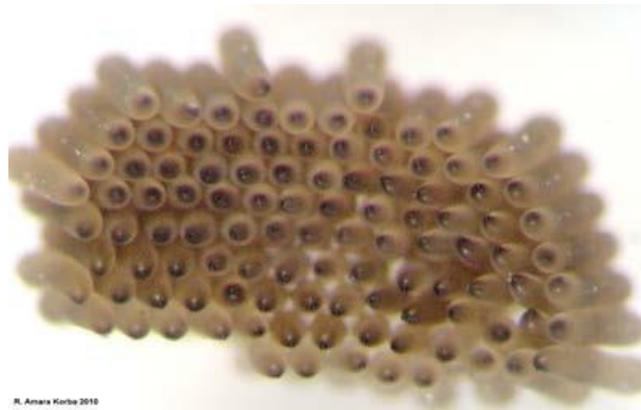


Figure 06 : Œufs en Nacelle de *Culex pipiens*
(Cliché Amara Korba, 2010)

2.4.3. La larve

Celle de *Culex pipiens* se développe indifféremment dans les eaux claires ou polluées. D'aspect vermiforme, son corps se divise en trois segments : la capsule céphalique complètement sclérifiée, le thorax aplati composé de trois segments fusionnés (bien plus large que les deux autres parties) et l'abdomen souple qui se compose de dix segments. Sa taille varie de 2mm à 12mm en moyenne en fonction des stades (Figure 07). Elle est dépourvue d'appareil locomoteur, ce qui ne signifie pas qu'elle soit immobile. D'après Forattini (1996) (in Becker et *al.*, 2003), 222 paires de soies sont insérées tout au long du corps de la larve, leur arrangement est appelé la Chetotaxie ce qui présente le principal critère en taxonomie morphologique des larves. Son extrémité caudale est munie d'un siphon, ou tube respiratoire (dans le prolongement de l'abdomen), long et étroit affleurant à la surface de l'eau; ce tube est muni de 5 clapets qui s'ouvrent sur deux orifices par où l'air pénètre à l'intérieur quand la larve monte à la surface de l'eau, et se rabattent quand elle gagne les profondeurs. Ses pièces buccales sont de types broyeurs, adaptées à un régime saprophyte (alimentation de type particulaire) (Kettle, 1995 et Andreo, 2003).

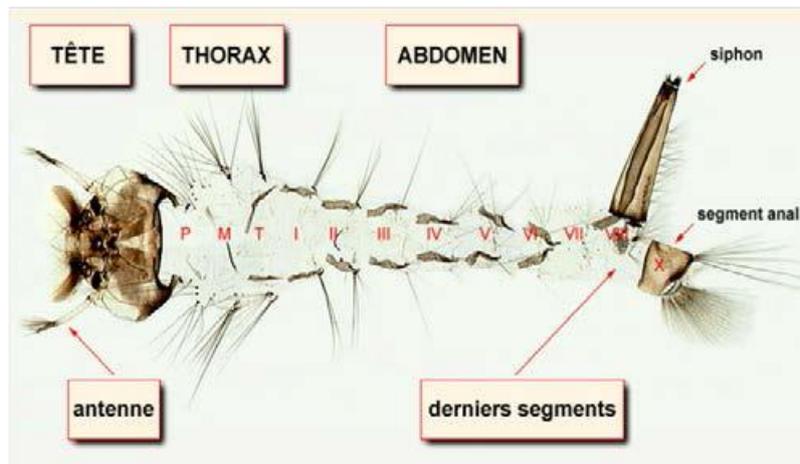


Figure 07 : Larve de *Culex pipiens*
(In Brunhes et al., 1999)

2.4.3.1. Tête

La capsule céphalique est formée d'une plaque chitineuse médiane, le frontoclypéus et de deux plaques latérales épicroâniennes. Au frontoclypéus est rattachée une plaque antérieure étroite (préclypéus) portant les brosses buccales. Les pièces buccales sont broyeuses, et principalement composées par des mandibules épaisses à pointes aiguës, et d'une plaque mentonnière triangulaire et dentelée appelée mentum (Séguy, 1955 ; Rodhain et Perez, 1985).

Préclypéus et frontoclypéus portent 18 paires des soies symétriques codées de 0-C à 17-C (la lettre C désigne les soies qui se trouvent sur les plaques de la tête). La forme et le nombre des branches de ces soies présentent un grand intérêt taxonomique notamment les soies préclypéales, clypéales, frontales et occipitales. Deux paires d'yeux sont situées sur la partie médio-latérale des plaques épicroâniennes. Les deux yeux antérieurs en forme de taches noirâtres, constituent les yeux composés primordiales du futur adulte. Derrière ceux-ci, se trouvent les deux petits yeux des larves ou stemmata. Les antennes qui se posent dans les angles antérolatéraux de la tête, sont plus ou moins minces et légèrement effilées. Elles peuvent être plus courtes que la tête et droites ou légèrement incurvées ou aussi longues voire plus longues que la tête et prendre la forme d'une courbe régulière. Le tégument des antennes est souvent couvert des poils et des spicules. Les soies

antennaires, nommées de 1-A à 6-A, sont très utiles pour la reconnaissance des genres et certaines espèces appartenant au genre *Culex* (Becker et al., 2003) (Figure 08).

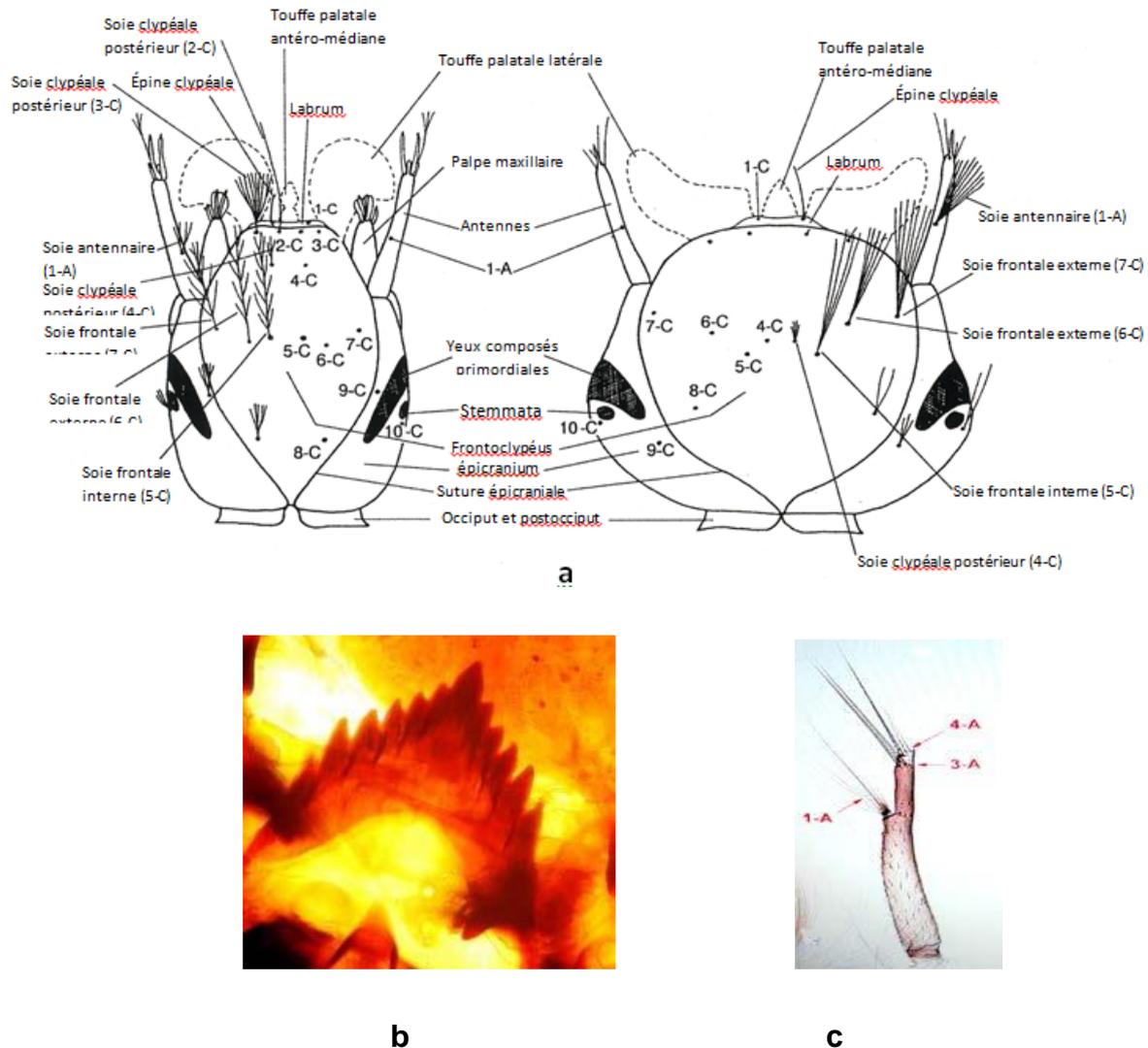


Figure 08 : Morphologie externe de la tête de la larve des Culicidae (in Boukraa S., 2010) a : Vue dorsale chez les Anophilinae (à gauche) et les Culicinae (à droite) (Becker et al., 2003, avec légende complétée). b : Mentum d'une larve de 4ème stade de *Culex theileri* (Boukraa S., 2010) c : Antenne et soies antennaires de Culicinae (Schaffner et al., 2001).

2.4.3.2 Thorax

Le thorax est large et trois séries successives de soies plus ou moins ramifiées en marquent les trois régions autrement indistinctes. Les paires de soies symétriques sont numérotées 0-P à 14-P sur le prothorax, 1-M à 14-M sur le mésothorax et 1-T à 13-T sur le métathorax. Becker et *al.*, (2003) signalent que seules les soies prothoraciques présentent un intérêt taxonomique (Figure 09). Chez les *Uranotaenia*, quelques soies méso-thoraciques et méta-thoraciques peuvent aussi être modifiées et participer à la distinction des espèces (Ramos et Brunhes, 2004).

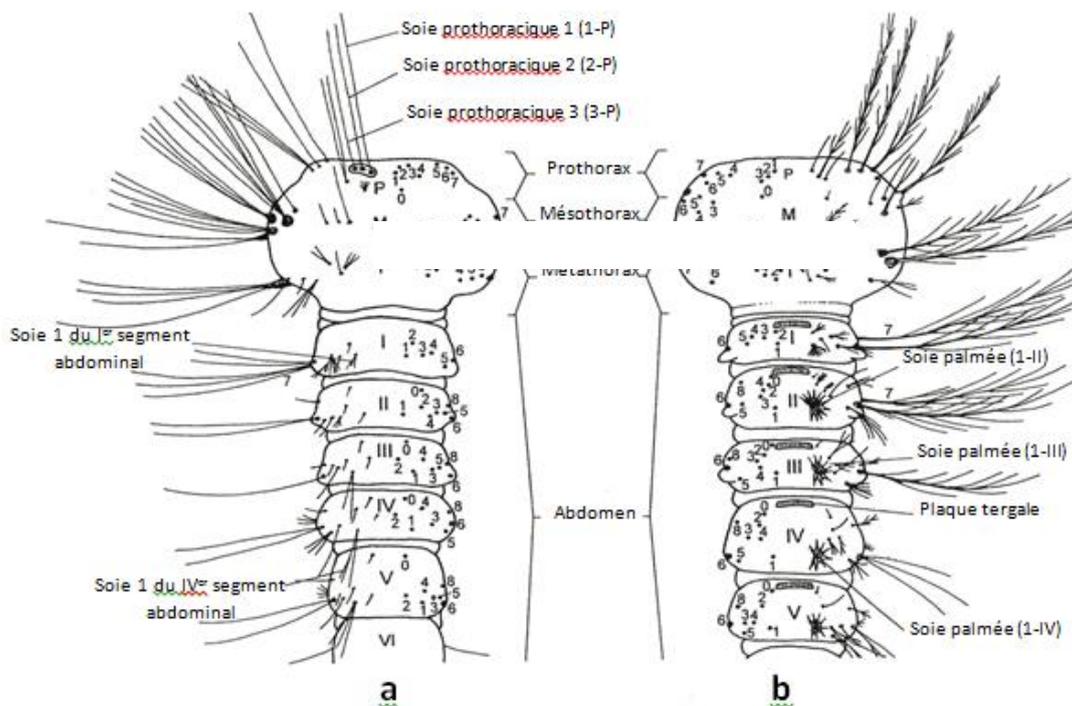


Figure 09 : Chetotaxie de la face dorsale du thorax et de l'abdomen des larves.
a : Culicinae ; b : Anophelinae (Becker et al., 2003).

2.4.3.3 Abdomen

Caractérisé par une forme allongée et sub-cylindrique, l'abdomen des larves de Culicidae est composé de dix segments individualisés. Les sept premiers se ressemblent entre eux, où chaque segment est orné de 15 paires de soies (excepté le segment I où se trouvent seulement 13 paires de soies). La majorité de ces soies

sont très peu utilisées en taxinomie, hormis chez les *Anopheles* où l'abdomen est recouvert par certains caractères spécifiques, notamment, les soies palmées et les plaques tergales. Sur le huitième segment abdominal qui possède un intérêt majeur en taxonomie, deux structures très importantes sont annexées. La première, c'est le peigne qui est constitué par un ensemble s'épines ou d'écailles, variables dans leur forme, leur nombre et leur disposition. Le nombre d'écailles varie de 5 à plus de 100 et peuvent être arrangées en une seule ligne, en double lignes, en forme irrégulière ou encore en forme triangulaire. Celles-ci, s'insèrent sur le bord postérieur d'une plaque chitineuse chez les *Uranotaenia* et les *Anophèles*. La deuxième structure correspond aux deux ouvertures spiraculaires qui s'ouvrent soit directement au niveau du tégument (comme c'est le cas chez les Anophelinae) soit à l'extrémité apicale d'un organe chitinisé de forme troconique, appelé le siphon respiratoire, principal caractère des Culicinae (Figure 10). Il s'agit d'un des caractères les plus utilisés pour l'identification des espèces constituant les Culicinae. Plus ou moins long, ce siphon porte de part et d'autre une rangée d'épines (peigne de siphon) et selon les genres et les espèces, une ou plusieurs touffes de soies.

Le dernier segment ou segment anal projeté ventralement, ne se trouve pas dans le prolongement du corps, mais forme avec celui-ci un angle de 130°. Il est entouré sur la partie dorso-latérale, d'un renforcement chitineux qui constitue la selle. Cette dernière est ornée d'épines et d'une paire de soies (1-X), de paires de longues soies disposées en une brosse dorsale, d'une ligne de soie et d'une brosse disposée ventralement. Au niveau du bord postérieur de la selle, quatre papilles anales saillantes entourent l'anus, qui est terminal (Callot et Helluy, 1958 ; Rodhain et Perez, 1985 ; Becker et *al.*, 2003 ; Ramos et Brunhes, 2004).

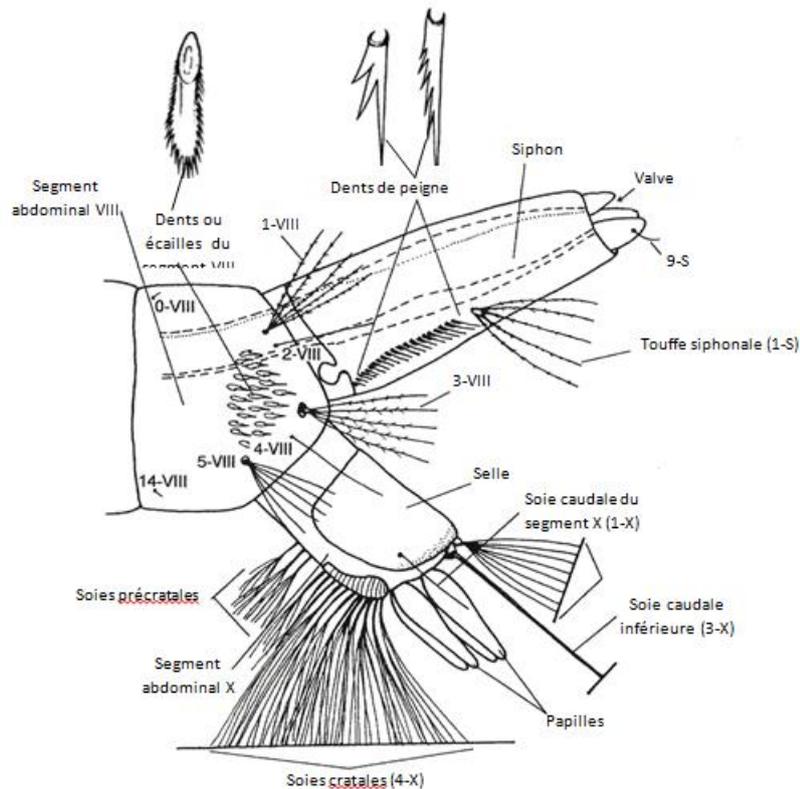


Figure 10 : Soies du siphon et des segments VIII et X d'une larve de Culicinae (Becker et al., 2003, avec légende complétée)

2.4.4. La nymphe

La nymphe des Culicidae ou pupae en anglais, se caractérise par une tête et un thorax réunis en une seule masse globuleuse, le céphalothorax, et une partie postérieure effilée et recourbée constituant l'abdomen ; ce dernier donne à la forme générale de la nymphe un aspect d'une virgule (Figure 11). Sur le sommet de la portion céphalothoracique se projettent deux trompettes respiratoires de formes très variables -souvent longues et cylindriques-équivalents physiologiques du siphon respiratoire de la larve. L'abdomen de la nymphe de Culicidae est composé de huit segments (visibles) où chacun d'eux porte des soies caractéristiques. Une soie palmé se trouve généralement au niveau de premier segment, cependant, le dernier segment est muni de deux palettes natatoires transparentes souvent ornées de denticules et de soies (Hegh, 1921 ; Rodhain et Perez, 1985).

La cuticule du céphalothorax est transparente où les ébauches des appendices locomoteurs, des antennes, de l'appareil buccal et des yeux composés des futurs adultes sont nettement visibles (Becker, 2003). La forme et l'ornementation de ces trompettes peut fournir, avec les palettes natatoires, certains caractères spécifiques aux genres et aux espèces. La disposition des rares soies que la nymphe porte sur le corps peut aussi être utilisée, surtout, lorsque l'identification des larves et des adultes sont difficiles (Séguy, 1923).

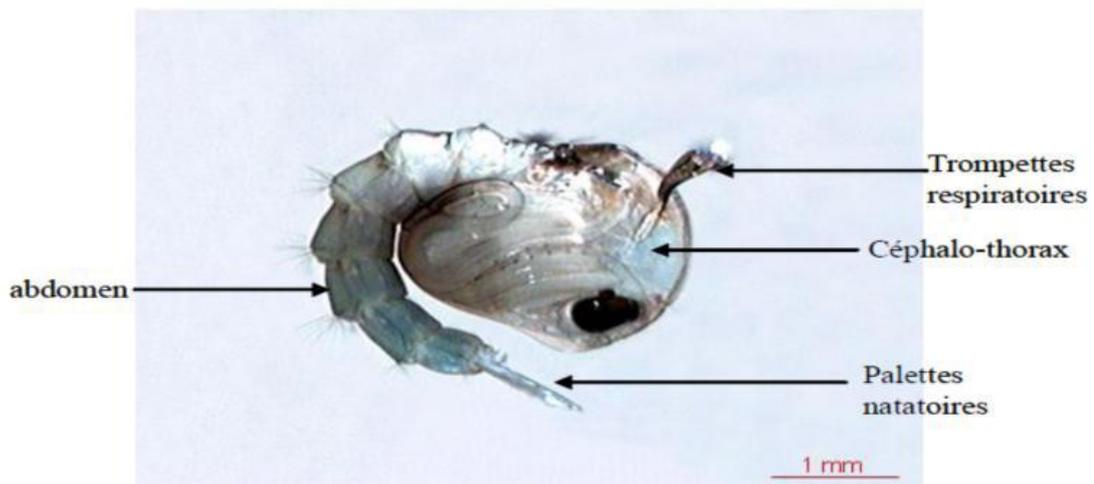


Figure 11 : Aspect général d'une nymphe de *Culex pipiens* (Berchi, 2000).

Le schéma ci-dessous résume le cycle du *Culex* :

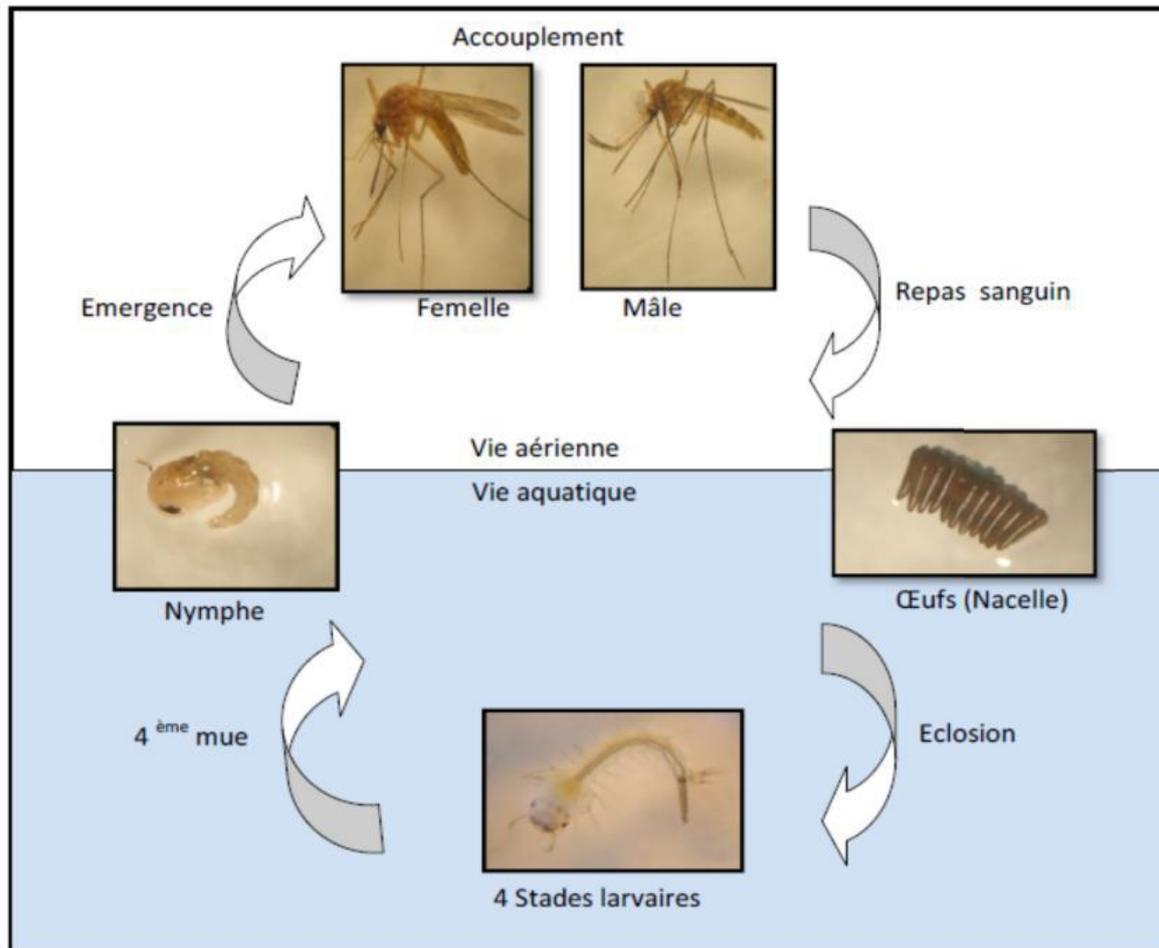


Figure 12 : Cycle de développement de moustique *Culex pipiens* (Klowden, 1990).

3. Périodes d'activité

Le développement des *Culex* dépend essentiellement de la température et de la pluviométrie. Ils vont donc préférentiellement se développer dans les pays chauds où ils pourront être présents quel que soit le moment de l'année. Leur développement sera favorisé lors de fortes températures associées à des taux d'humidité élevés. Sous nos climats, la période de l'année correspondante est l'été, mais aussi l'automne dans une plus faible mesure (Toral Y Caro M.2005).

Notre climat tempéré est beaucoup moins stable que les climats équatoriaux et tropicaux, où les saisons sèches suivent les saisons humides. Le nombre de *Culex* n'est donc pas constant d'une année sur l'autre, ainsi qu'au cours d'une même saison. On distingue de plus au sein du climat tempéré des différences de

température et de pluviométrie entre les climats océaniques, méditerranéens et continentaux (Ripert C.2007).

En Algérie, on trouvera préférentiellement des *Culex* dans les régions méditerranéennes (Toral Y Caro M.2005), lors de fortes températures associées à un degré d'humidité élevé.

La période d'activité des *Culex*, comme tous les moustiques, démarre au crépuscule et dure jusqu'à la fin de la nuit (Urquhart et al.1996), (Wall et Shearer, 1997)

4. Facteurs de développement

Différents facteurs vont influencer sur le degré d'humidité, et ainsi jouer un rôle dans le développement des *Culex*. On trouve :

- **Les facteurs naturels** : la fréquence des précipitations ainsi que leur quantité (Paz S., Albersheim I.2008), les orages dont les dégâts peuvent causer des crues, la résurgence des nappes phréatiques (Ripert C.2007). Ce type de facteurs dépend essentiellement de la région et il est difficile pour l'homme de les contrôler.
- **Les facteurs artificiels** : les systèmes d'irrigation par gravité tels que les rizières, les zones d'élevage piscicoles et d'aquaculture, les stations d'épuration, les barrages, les lacs artificiels (Ripert C.2007). Ces facteurs sont plus facilement contrôlables car créés par l'homme.

Pour ce qui est du rôle de la température, de fortes chaleurs, notamment en début d'été, favoriseront le développement de *Culex pipiens* (Paz et Albersheim 2008).

5. Reproduction

Deux à quatre jours après leur sortie de l'eau, les moustiques partent en quête d'un partenaire sexuel. Le moustique mâle est attiré par les vibrations des ailes de la femelle en vol (200 à 400 battements par seconde), ainsi que par des phéromones

sexuelles. La perception des phéromones par le mâle est rendue possible par des soies sensibles situées sur les antennes. Les battements d'ailes, quant à eux, sont perçus grâce à l'organe de Johnston, lui aussi formé de soies spéciales et situé sur les antennes (Toral, 2005).

Culex pipiens est hétérodynome, c'est-à-dire que la reproduction est saisonnière. Après l'accouplement, les mâles ne tardent pas à mourir. Il n'y a généralement qu'un seul accouplement au début de la vie de l'adulte. La fécondation des œufs a lieu au fur et à mesure de la ponte (Andreo, 2003 ; Bussieras et Chermette 1991 ; Cachereul, 1997).

Les femelles nées à l'automne ne se reproduisent pas ; elles se nourrissent de substances sucrées ce qui leur permet ensuite de survivre tout l'hiver sans s'alimenter (Andreo, 2003 ; Kettle, 1995).

6. Ponte

Selon les mêmes auteurs, cités précédemment une fois gorgée de sang, la femelle se réfugie dans un abri jusqu'au développement complet des œufs, puis elle cherche un endroit pour pondre. Le nombre d'œufs varie en fonction de la quantité de sang absorbé, les pontes autogènes étant toujours composées d'un nombre relativement réduit d'œufs. Les œufs sont déposés en nacelle à la surface de l'eau, perpendiculairement à celle-ci, et arrangés de façon à ce que la larve ait la tête en bas et émerge par le dessous de l'œuf. Une femelle peut pondre 800 à 2500 œufs répartis en pontes de 100 à 400. Les pontes ont généralement lieu au crépuscule.

7. Répartitions géographiques

Senevet *et al.* (1999) estiment que *Culex pipiens* est le moustique le plus fréquent dans le monde (Figure 13) et extrêmement commun dans l'ensemble des zones tempérées.

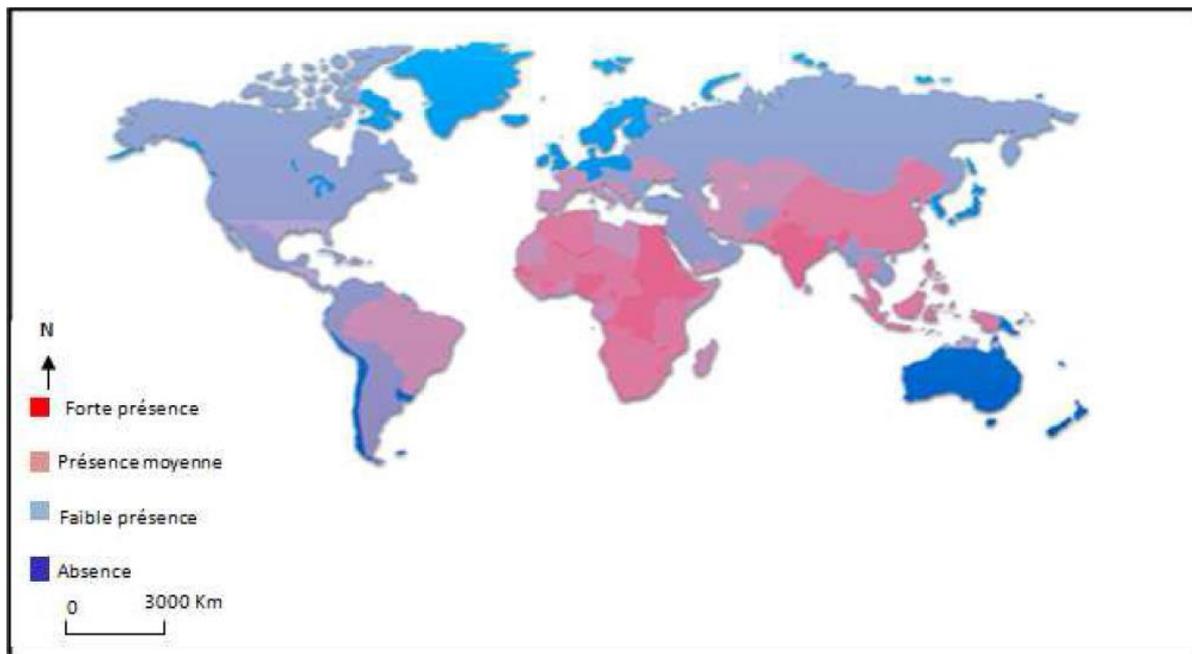


Figure 13 : distribution de *Culex pipiens* dans le monde (Senevet et al., 1999)

7.1 En Algérie

On recense environ 50 espèces de moustiques appartenant principalement aux genres *Aedes*, *Anopheles*, *Culex*, *Coquillettidia* et *Culiseta* (Senevet et al., 1999).

Culex pipiens est l'espèce de moustique qui présente le plus d'intérêt en raison de sa large répartition géographique de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines (Bendalif et al., 2001).

8. Intérêts de la lutte contre *Culex pipiens*

8.1. Espèces cibles

On distingue deux types d'espèces cibles : les hommes et les animaux.

Les espèces essentiellement zoophiles comme *Culex pipiens* vont s'attaquer en priorité à des animaux, en l'occurrence des oiseaux car ce moustique est ornithophile.

Cependant, s'il se retrouve dans une zone habitée par des hommes ou bien des mammifères, ce *Culex* est capable de prendre son repas sanguin sur ces nouveaux hôtes. Il est donc accessoirement anthropophile (Faraj *et al.*, 2006 ; Ripert C.2007 ; Euzeby, Hamer *et al.*, 2008).

8.2. Les principales nuisances causées par *Culex pipiens*

On distingue deux types de nuisances causées par *Culex pipiens* :

- La première est causée par la pique de la femelle (Urquhart *et al.* 1996) qui va entraîner, chez l'homme comme chez l'animal, une lésion ronde érythémateuse de quelques mm à 2 cm de diamètre. Il est à noter que la pique ne provoque aucune douleur immédiate grâce à un anesthésique local contenu dans la salive (Andreo, 2003). Les lésions sont très souvent suivies d'une réaction allergique due aux allergènes présents dans la salive de *Culex pipiens* injectée durant le repas sanguin. Cela entraîne généralement un fort prurit (Toral *et Caro*, 2005)
- La deuxième nuisance est liée à la transmission de maladies. Le moustique se contamine au cours du repas sanguin sur un hôte infecté. L'agent pathogène va alors subir un cycle de maturation et sera transmis au cours du repas suivant sanguin (Cchst, 2015).

On distingue 2 types d'agents pathogènes transmis par les *Culex* :

- **Des virus**
 - De la famille des *Bunyaviridae* genre *Phlebovirus*, comme le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift, zoonose dont l'espèce cible principale est le bétail (Petit *et al.*, 2009)
 - De la famille des *Flaviviridae* genre *Flavivirus* :
 - ❖ Le West Nile atteint les oiseaux mais peut aussi toucher l'homme (Faraj *et al.*, 2006 ; Hamer *et al.*, 2008).
 - ❖ L'encéphalite de Saint Louis atteint également l'oiseau et l'homme.
 - ❖ L'encéphalite japonaise humaine a pour réservoirs le porc et les oiseaux sauvages.

- ❖ Le virus de la dengue atteint exclusivement l'homme.
- ❖ La fièvre jaune peut se transmettre aux singes et à l'homme (Andreo, 2003).

- **Des parasites**

- *Dirofilaria immitis*, responsable de la dirofilariose cardio-pulmonaire du chien.

Ce parasite vit essentiellement dans le cœur droit et l'artère pulmonaire. Il entraîne des troubles cardiaques décomposés en 2 phases. Lors de la première, dite phase de compensation, le chien souffre de toux chronique, de dyspnée, de tachycardie, d'anémie et éventuellement d'hémoptysie. Un souffle cardiaque est audible. La fonction cardiocirculatoire se dégrade petit à petit, et le chien entre alors dans la deuxième phase, celle de décompensation : il souffre d'insuffisance cardiaque droite avec hépatomégalie, ascite, œdèmes sous-cutanés et insuffisance rénale. Le pronostic varie selon l'avancée des signes cliniques et la précocité du traitement.

Plus rarement, l'animal peut développer un syndrome veine cave, caractérisé par un choc cardio-génique avec tachycardie, arythmie, tachypnée, dyspnée. La survie n'est que de quelques heures (Fremont F, 1996 ; Castric C, 2002 ; Euzeby J.2008).

D'autres espèces peuvent néanmoins être atteintes : le chat, les canidés sauvages et même l'homme (Toral Y Caro M.2005).

- *Dirofilaria repens*, agent de la filariose sous-cutanée chez le chien, mais aussi chez le chat et l'homme.

L'adulte se développe dans le tissu conjonctif sous-cutané. Cliniquement, des nodules de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre apparaissent. Ils sont indolores, prurigineux et localisés préférentiellement en région postérieure du corps (Euzeby J.2008 ; Toral Y Caro M.2005).

- *Wuchereria bancrofti*, responsable de la filariose lymphatique de l'homme (Andreo, 2003) (Toral Y Caro M.2005).

Le nombre d'agents transmis, le nombre d'espèces atteintes dont l'Homme justifient les campagnes de lutte contre les moustiques.

9. Les différents moyens de lutte contre les moustiques

Depuis l'antiquité, l'homme a toujours cherché à se protéger contre les arthropodes nuisant et vecteurs. Dans différentes régions tropicales, certaines pratiques traditionnelles permettent la réduction des piqûres de moustiques dans les habitations. Les moyens mis alors en œuvre étaient essentiellement des mesures d'aménagement de l'environnement (Mouchet et Carnevale, 1991).

a- Lutte physique

Elle consiste à modifier le biotope de l'insecte en supprimant tous les facteurs favorables à son développement, cette technique est la plus anciennement connue contre *Culex*, elle est basée sur les mesures d'assainissement et d'aménagement du milieu urbain qui consiste à éliminer les collections d'eaux usées stagnantes ou tout au moins à les rendre inaccessibles aux adultes, et concurremment à prévenir l'apparition et la multiplication des gîtes. Malheureusement, de tels travaux d'assainissement restent le plus souvent à l'état de projet et les rares mesures prises sont généralement insuffisantes (coût budgétaire très élevé) (Curtis, 1994 ; Chavasse *et al.*, 1995).

Il y a aussi l'utilisation des moustiquaires de portes et de fenêtre des maisons et des immeubles, qui gardent les moustiques à l'extérieur. Les filets tendus dans les tentes ou suspendus au-dessus des lits sont des barrières efficaces contre les insectes piqueurs ou suceurs tels que les moustiques (Mathis *et la.*, 1970).

b- Lutte génétique

Elle consiste à provoquer l'extinction d'une population naturelle d'insectes en y introduisant des individus de la même espèce préalablement rendus stériles par les rayons X ou par chimio-stérilisation. Cette technique a donné de bons résultats sur les insectes à faible densité de population et en milieu isolé (glossine, lucilie bouchère).

Sur les moustiques, ces techniques séduisantes au laboratoire n'ont donné jusqu'à présent que peu de résultats sur le terrain (Crampton *et al.*, 1990 ; Collins *et al.*, 2000).

c- Lutte chimique

Elle est basée sur l'utilisation d'insecticides chimiques. Les insecticides les plus couramment utilisés à ce jour en santé publique, sont des insecticides de synthèse. Ils sont répartis en six grandes familles, organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes, phényl pyrazoles, régulateurs de croissance.

Au lendemain de la seconde guerre mondiale, le développement de la chimie a permis l'acquisition d'insecticides, comme le dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT) dont les propriétés ont été mises en évidence par le chimiste suisse P. Müller en 1939 et commercialisé en 1943 (Dajoz, 1969).

La découverte de ce dernier a été une véritable révolution dans la lutte contre les insectes. Il fut largement utilisé en agriculture et en santé publique, où il contribua à sauver de nombreuses vies humaines (Mouchet, 1994). Il agit sur le système nerveux périphérique et central des insectes. En Afrique de l'Ouest, la notification des premiers cas de la résistance au DDT et à la Dieldrine du *Culex*, remonte à 1958 (Hassal, 1990).

d- Lutte biologique

Sous ce vocable, on retrouve notamment l'emploi de prédateurs naturels des moustiques pour lutter contre ces derniers, comme les oiseaux, les chauves-souris, les poissons et certains insectes. À ce propos, Kumar et Hwang (2006) ont élaboré une revue de littérature des moyens de lutte biologique ayant recours à des amphibiens, des poissons, des petits crustacés aquatiques (comme les copépodes) ainsi que des insectes.

Chatterjee *et al.* (2007) mentionnent que la libellule *Brachytron pratense* peut dévorer une grande quantité de larves de moustiques.

Parmi l'arsenal d'agents potentiels de lutte (bactéries, champignons, protozoaires, virus) identifiés au cours des 30 dernières années, les plus efficaces et les plus prometteurs se sont révélés être deux bactéries sporulant et appartenant au genre *Bacillus* (Who, 1984) : *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bt-H14) et *Bacillus Sphaericus*. Le spectre d'activité de ces deux bactéries est assez étroit et constitue l'un des atouts majeurs de ces agents de lutte.

e- Lutte intégrée

On la définit comme étant « l'emploi rationnel de toutes les méthodes de lutte appropriées tant sur le plan technique (compatibilité, innocuité), que sur le plan de la gestion (rentabilité), afin d'obtenir une réduction efficace des populations de vecteurs et d'enrayer la transmission de la maladie ». Les moyens mis en œuvre peuvent être de nature chimique ou autre (aménagement de l'environnement, protection individuelle et lutte biologique). En outre, si l'on veut pouvoir mener durablement la lutte anti vectorielle intégrée, il est essentiel de s'appuyer sur l'éducation pour la santé et la participation communautaire (Who, 1992).

II. Les huiles essentielles

1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE), appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal (Padrini et Lucheroni, 1996). Pour la 8^{ème} édition de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles sont : «des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation» (Bruneton, 1993). Elles sont odorantes et très volatiles, c'est-à-dire qu'elles s'évaporent rapidement dans l'air (Padrini et Lucheroni, 1996). Généralement se sont des antiseptiques antibactériens vermifuges ou stomachiques. On dénombre environ 600 essences utilisées de nos

jours en aromathérapie dont l'essor s'étend dans le domaine médical et touristique (Delille, 2010).

L'usage des HE en tant que répulsifs cutanés pour la protection personnelle contre les insectes est donc fortement déconseillé (SMV et SFP, 2010). Il est important de faire une différence entre les HE et les huiles végétales. Les HE sont obtenues par expression (réservée aux agrumes) ou par distillation à la vapeur d'eau, Une huile végétale est obtenue par pression, et est constituée majoritairement de corps gras (Binet et Brunel, 2000; Chaker, 2010).

2. Localisation

Les HE peuvent être stockées dans tous les organes de la plante, par exemples: dans les sommités fleuries (menthe, lavande) les feuilles (eucalyptus, laurier) les rhizomes (gingembre) les fruits (agrumes, badiane, anis), les racines (vétiver), les graines (muscades), bien que cela soit moins habituel dans des écorces (cannelier) (Yahyaoui, 2005).

Elles sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante. Elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules ou se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles (Bouamer et *al.*, 2004).

La synthèse et l'accumulation des HE sont généralement associées à la présence des structures histologiques spécialisés, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante qui sont : cellules à HE de Lauraceae, les poils sécréteurs des Laminaceae, poches sécrétrices des Myrtaceae, des Rutaceae, et les Laminaceae, et les canaux sécréteurs qui existent dans de nombreuses familles. Il est intéressant de remarquer que les organes d'une même espèce peuvent renfermer des huiles essentielles de composition différente selon la localisation dans la plante (Belkou et *al.*, 2005).

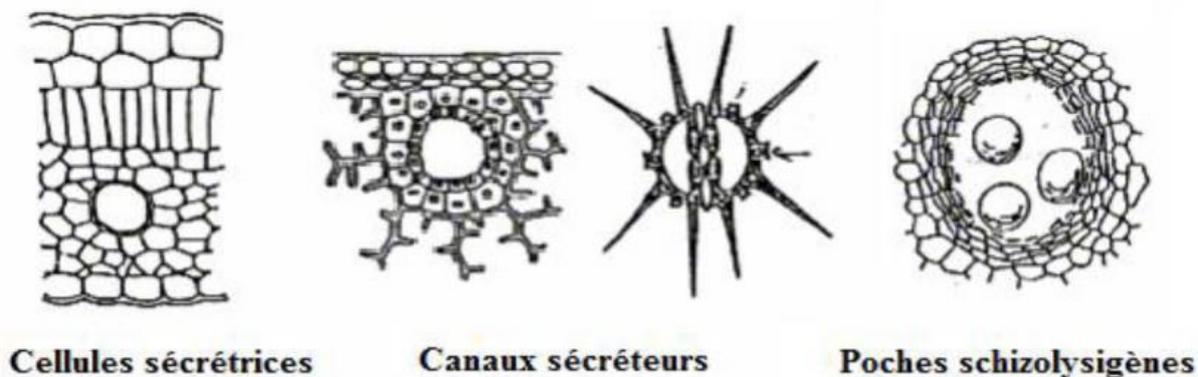


Figure 14 : Quelques organes sécréteurs d'huiles essentielles (Tayoub, 2006).

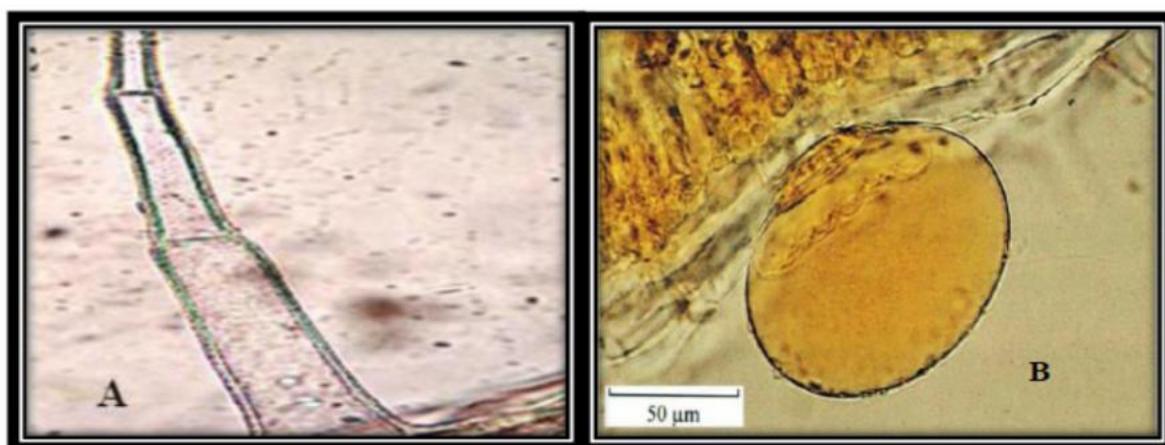


Figure 15 : (A): Diversité des structures de sécrétion des huiles essentielles, poil sécréteur) (Khenaka, 2011). (B): illustration schématique du développement de la glande productrice d'huile essentielle (Gaspar, 2004).

3. Composition chimique

Dans les plantes, les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule. Elles peuvent être stockées dans divers organes: fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graines (Brunetton, 1987).

Les HE sont constitués principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit des terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Kurkin, 2003).

4. Rôle physiologique

Les plantes aromatiques produisent des HE en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu (Rai et *al.*, 2003). Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservant l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaiche, 1979). Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes (Capo et *al.*, 1990).

5. Propriétés et caractéristiques

Selon (Bardeau, 1976; Lagrand, 1978; Lemberg, 1982; Bruneton, 1999), les HE possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques:

- Elles sont solubles dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, les huiles fixes, les émulsifiants et dans la plupart des solvants organiques, et peu solubles dans l'eau à laquelle, toutefois, elles communiquent leur odeur.
- Leur point d'ébullition varie de 160°C à 240°C.
- Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau, elle varie de 0,75 à 0,99 (les HE sassafras, de girofle ou cannelle constituent des exceptions).
- Elles ont un indice de réfraction élevé.
- Elles sont dextrogyres ou lévogyres, rarement inactives sur la lumière polarisée.
- Elles dissolvent les graisses, l'iode, le soufre, le phosphore et elles réduisent certains sels
- Ce sont des parfums, et ont une conservation limitée.

- Sont très altérables et sensibles à l'oxydation (mais ne rancissent pas).
- Ce sont des substances de consistance huileuse, plus ou moins fluides, très odorantes et volatiles.
- A température ambiante, elles sont généralement lipides, à coloration bleue.
- Ce sont des produits stimulants, employés à l'intérieur, comme à l'extérieur du corps, quelquefois purs, généralement en dissolution dans l'alcool ou un solvant adapté (Abdelouahid et Bekhechi, 2010).

6. Procédés d'extraction

La majorité des HE sont obtenues par distillation par entraînement à la vapeur d'eau sous basse pression. Le procédé consiste à faire traverser par de la vapeur d'eau une cuve remplie de plantes aromatiques. A la sortie de la cuve de distillation et sous pression contrôlée, la vapeur d'eau enrichie l'HE traverse un serpentin où elle se condense. A la sortie, un essencier (appelé autrefois vase florentin) recueille l'eau et l'huile essentielle. La différence de densité entre les deux liquides permet une séparation aisée de l'HE recueillie par débordement. Les autres procédés d'extraction (par enfleurage, par solvant) ne seront pas détaillés ici car ils ne peuvent être utilisés pour une médication par les HE digne de ce nom (Zhiri et Baudoux, 2005).

6.1. Hydro-distillation

Il s'agit de la méthode la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée. Le matériel végétal est immergé directement dans un alambic rempli d'eau placé sur une source de chaleur. Le tout est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'huile essentielle se sépare de l'hydrolat par simple différence de densité. L'HE étant plus légère que l'eau, elle surnage au-dessus de l'hydrolat (Franchomme *et al.*, 1990).

6.2. Entraînement à la vapeur d'eau

La masse végétale repose sur une grille vers laquelle la vapeur sèche est pulsée. La vapeur d'eau endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. Cette méthode apporte l'amélioration de la qualité de l'HE en minimisant les altérations hydrolytiques. (Bruneton, 1993).

6.3. L'hydro-diffusion

Cette technique relativement récente est particulière. Elle consiste à faire passer, du haut vers le bas et à pression réduite, la vapeur d'eau au travers de la matrice végétale. L'avantage de cette méthode est d'être plus rapide donc moins dommageable pour les composés volatils (Franchomme *et al.*, 1990 ; Richard, 1992).

6.4. Extraction assistée par micro-ondes

L'extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique qui combine l'utilisation des micro-ondes et d'autres méthodes traditionnelles. Dans ces procédés, la matière végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques : condensation, refroidissement et décantation (Hemwimon *et al.*, 2007).

7. Toxicité des huiles essentielles

Les HE ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque, comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Cet aspect des HE est d'autant plus important que leur utilisation, de plus en plus populaire, tend à se généraliser avec l'émergence de nouvelles pratiques thérapeutiques telle que l'aromathérapie (Smith *et al.*, 2000).

Certaines HE sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène

(huiles riches en cinnamaldéhyde (Smith et *al.*, 2000). Ou photo-toxique (huiles de citrus contenant des furocoumarines (Naganuma et *al.*, 1985).

Les HE contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses. Ce sont: Cannelle de Ceylan, Basilic exotique, Menthe, Clou de girofle, Niaouli, Thym à thymol, Marjolaine, Sarriette, Lemon-grass. Les inflammations cutanées siègent de manière privilégiée sur les paupières, les aisselles et le périnée. De plus, certaines HE peuvent provoquer des réactions cutanées allergiques. Les réactions de la maladie sont variées et peuvent apparaître jusqu'à 3 jours après le contact du produit avec la peau. Ils vont du simple prurit (démangeaison) à l'eczéma allergique en passant par des plaques, un aspect psoriasique, voire des pigmentations ou dépigmentations locales (Meynadier et Raoson Peyron, 1997).

Les cétones comme l'athujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Franchomme et *al.*, 1990). Il existe aussi quelques HE dont certains composés sont capables d'induire la formation de cancers (Homburger et *al.*, 1968).

Ainsi, l'administration de 2 gr de menthol (extrait HE Menthe) est mortel et 10 gr d'eucalyptol peut également entraîner la mort. Il est donc indispensable que les huiles essentielles soient particulièrement diluées pour éviter tout accident, et en tout cas, on ne devrait plus en délivrer en vente libre (Vassart, 2009).

8. Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Différents secteurs utilisent les HE, à l'état naturel ou sous forme d'isolats (substances pures isolées d'HE) tels que le pinène, la scarole, le linalol, le citral, le safrol, comme matière première pour la synthèse des principes actifs médicamenteux, des vitamines, des substances odorantes, des parfums et des produits de cosmétologies. Ils sont donc utilisés dans plusieurs domaines : en thérapeutique, en parfumerie ou cosmétologie, en agro-alimentaire et même en entretien dans la vie quotidienne (Brunton, 1993 ; Huard. 1999 ; Gaucher ; Lusson. 2001 ; Muller. 2003)

9. Conservation des huiles essentielles

Les HE sont des substances très délicates et s'altèrent facilement, ce qui rend leur conservation difficile. Les risques de dégradation sont multiples: photoisomérisation, photocyclisation, coupure oxydative de propénylphénols, peroxydation des carbures et décomposition en cétones et alcools (limonène) (Bruneton, 1999). Ces dégradations peuvent modifier leurs propriétés si elles ne sont pas enfermées dans des flacons propres et secs en aluminium, en acier inoxydable ou en verre teinté, à l'abri de la lumière et de la chaleur (Bruneton, 1999; Valnet, 1984).

III. Présentation du *Thymus vulgaris*

1. Généralités

L'utilisation du thym dans la vie humaine date depuis très longtemps, il était dédié à Vénus parce qu'il apportait de l'énergie vitale pour le corps.

Le genre *Thymus* est un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002). Comme beaucoup de labiées elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste *Thymus vulgaris* L. localement connu « zaatar ». En français et anglais par exemple, on emploie fréquemment le nom du genre (« thym » et « thyme » respectivement) pour désigner l'espèce *Thymus vulgaris* (Amiot, 2005).

Le nom « Thymus » dérive du mot grec « thymos » qui signifie « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001). L'espèce *Thymus vulgaris* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, connu surtout pour ses qualités aromatiques, elle a aussi de très nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001).

Il existe une variation de la production des composés secondaires chez certaines espèces végétales que l'on appelle polymorphisme chimique. Le *Thymus vulgaris* exprime six formes de chémotypes différents, chaque chémotype est nommé

suivant le composant principal de son huile essentielle (exemples : thymol (T), carvacrol (C),...). (Amiot, 2005).

2. Présentation de la plante

2.1. Origine

Thymus vulgaris L. est indigène de l'Europe du sud, on le rencontre depuis la moitié orientale de la péninsule ibérique jusqu'au sud-est de l'Italie, en passant par la façade méditerranéenne française (Özcan et Chalchat, 2004 ; Amiot, 2005). Il est maintenant cultivé partout dans le monde comme thé, épice et plante médicinale (Kitajima et al., 2004).

En Algérie, il est représenté par de nombreuses espèces qui ne se prêtent pas aisément à la détermination. Citant ainsi quelques espèces connues en Algérie : *T.vulgaris*, *T.serpyllum*, *T.algériensis*, *T.hirtus*, *T.fontanésii*. (Quezel ; Santa 1962)

Le *Thymus vulgaris* se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian et al., 2003).

Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (Poletti, 1988).

2.2. Position systématique

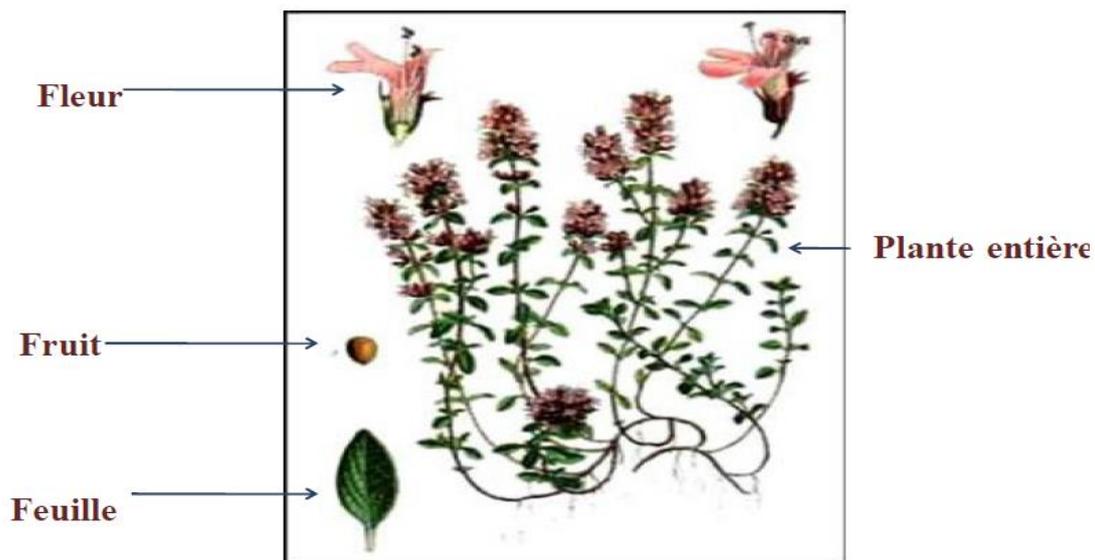
Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Morales, 2002) synthétisée dans le tableau 1.

Tableau 01 : Classification botanique de *Thymus vulgaris* (Morales, 2002)

Règne	Plantes
Sous règne	Plantes vasculaires
embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> L.

2.3. Description botanique

Thymus vulgaris L. est un arbuste aromatique à tiges ramifiées, pouvant atteindre 40 cm de hauteur.

Figure 16 : Aspects morphologiques de *Thymus vulgaris* L. (Iserin, 2001)

Il possède de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert foncés, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de monoterpènes. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose. *Thymus vulgaris* est d'ailleurs caractérisé par un polymorphisme floral qui a été au moins aussi étudié que son polymorphisme chimique (Bruneton, 1999 ; Morales, 2002) (figure 16).

2.4. Composition chimique

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riches en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des conditions géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études (extraction et détection). L'hybridation facile de l'espèce mène à une grande variabilité intra-spécifique, qui affecte l'homogénéité du rendement d'extrait et sa composition en produits chimique (Balladin et Headley, 1999 ; Amiot, 2005).

La teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré (Bruneton, 1999) ; l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été analysée en utilisant la chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une spectrométrie de masse (SM), 30 composés ont été identifiés et caractérisés, les plus abondants sont respectivement : thymol (44,4 - 58,1 %), *p*-cymène (9,1 - 18,5 %), γ -terpinène (6,9 - 18,0%), carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 - 6,2 %). La caractéristique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* était sa teneur élevée du thymol (Guillén et Manzanos, 1998 ; Balladin et Headley, 1999 ; Hudaib et al., 2002 ; Bouhdid et al., 2006).

Le contenu phénolique total, flavonoïdes, catéchine, et anthocyanine dans l'infusion aqueuse préparée du *thymus vulgaris* a été déterminé par des méthodes spectrophotométriques (Kulišić et al., 2006). Le tableau 2, ci-dessous résume les résultats.

Tableau 02 : Teneur en polyphénols (en μg EAG/mg d'extrait) dans l'infusion aqueuse du *Thymus vulgaris* (Kulišić et al., 2006)

Plante	Phénols totaux	Flavonoïdes	Non- flavonoïdes	Catéchines	Anthocyanines
<i>Thymus vulgaris</i>	33.3	25.0	8.3	1.2	6.7

La méthodologie habituelle pour étudier les dérivés flavonoidiques dans les plantes implique les extractions successives employant plus d'un solvant, plusieurs étapes de fractionnement et différentes techniques de chromatographie pour extraire, séparer, isoler, épurer et identifier les composés d'intérêt. Le tableau 3 énumère les flavonoides trouvées dans les feuilles *Thymus vulgaris* L., par plusieurs auteurs, en utilisant la méthodologie ci-dessus mentionnée.

De nombreuses études ont confirmé que les espèces qui appartiennent à la famille des Lamiaceae sont une bonne source d'acide rosmarinique, l'identification des composés polyphénoliques dans l'infusion aqueuse de *Thymus vulgaris* par analyse HPLC a montré une présence dominante d'acide rosmarinique ($17,45 \text{ mg/g}$ = 1,7 % de la masse sèche de *Thymus vulgaris*) et un autre composé significatif est l'eriocitrin ($1,96 \text{ mg/g}$) (Kulišić et al., 2006).

D'autres composants ont été détectés seulement en traces, l'acide caféique ($0,02 \text{ mg/g}$) et l'acide *p*-hydroxybenzoïque. La composition en vitamines a été déterminée et révèle la présence de la vitamine E (α -tocophérol) ($4,4 \text{ mg/Kg}$) (Guillén et Manzanos, 1998 ; Kulišić et al., 2006).

Tableau 03 : Les flavonoïdes trouvés par plusieurs auteurs dans les feuilles de *Thymus vulgaris* L.

Flavonoïdes	Références
- Cirsilineol (5,4'-dihydroxy-6,7,3'-triméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Thymonine (5,6,4' - trihydroxy-7,8,3'-triméthoxyflavone)	Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Eriodictyol (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Morimitsu <i>et al.</i> , 1995
- Sideritoflavone (5,3',4'-trihydroxy- 6,7,8- triméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Guillén et Manzano, 1998
- 5-Desmethylnobiletine (5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Guillén et Manzano, 1998
- Apigénine (5,7,4'-trihydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Kulišić <i>et al.</i> , 2006
- Lutéoline (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavone)	Adzet <i>et al.</i> , 1988 Kulišić <i>et al.</i> , 2006
- Xanthomicrol (5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone)	Guillén et Manzano, 1998
- 5-Desmethylsinensetine (5-hydroxy-6,7,3',4'-tetraméthoxyflavone)	Guillén et Manzano, 1998
- Quercétine (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone)	Morimitsu <i>et al.</i> , 1995 Kulišić <i>et al.</i> , 2006

2.5. Utilisation des feuilles

Thymus vulgaris est une des plus populaires plantes aromatiques utilisées dans le monde entier, ces applications sont très vastes et touchent le domaine alimentaire et celui de la médecine traditionnelle (Adwan *et al.*, 2006). De plus son huile essentielle est utilisée dans les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Jordán *et al.*, 2006).

L'épice *Thymus vulgaris* est intensivement cultivé en Europe et aux Etats-Unis pour l'usage culinaire dans l'assaisonnement des poissons, volailles, des potages et des légumes (Özcan et Chalchat, 2004).

La feuille et la sommité fleurie de *Thymus vulgaris* sont traditionnellement utilisées par voie orale dans le traitement symptomatique de troubles digestifs tels

que : ballonnement épigastrique, lenteur à la digestion, éructation, flatulence ainsi que dans le traitement symptomatique de la toux et de la bronchite (Bruneton, 1999). Sa feuille est énumérée dans la pharmacopée de fines herbes allemande et britannique a été employée en tant que bronchospasmodique, expectorant et antibactérien. On dit que la tisane de la feuille du *Thymus vulgaris* favorise le repos et le sommeil (Kitajima *et al.*, 2004).

En usage local, elles sont traditionnellement utilisées en cas de nez bouché, de rhume, pour le traitement des petites plaies après lavage abondant, pour soulager les piqûres d'insectes et les douleurs rhumatismales, en bain de bouche pour l'hygiène buccale (Poletti, 1988 ; Brunton, 1999) ainsi comme additif de bain préparé par décoction qui stimule l'écoulement de sang vers la surface du corps humain, soulageant de ce fait la dépression nerveuse (Özcan et Chalchat, 2004).

L'huile essentielle de cette plante entre dans les formulations de diverses spécialités : pommades antiseptiques et cicatrisantes, sirops pour traitement des affections des voies respiratoires, préparation pour inhalation (Bruneton, 1999).

3. Intérêt de la formulation d'un bioproduit :

L'intérêt porté aux matières actives des produits phytosanitaires fait parfois oublier qu'elles ne sont que rarement administrées seules. Il est nécessaire de les associer à des composés, appelés formulant ou adjuvants, sans activité biologique propre, mais sans lesquels nombre d'entre elles n'auraient qu'une efficacité nulle ou insuffisante. Lorsque l'adjonction se fait lors de la préparation industrielle, on parle de formulant ; lorsqu'elle se fait lors de l'application du produit, on parle d'adjuvant.

Les buts poursuivis sont principalement d'assurer :

- Les stabilités chimique et physique du produit.
- Son efficacité biologique et son innocuité à l'égard des cultures.
- Les sécurités de l'utilisateur et de l'environnement.

Actuellement, l'utilisation en formulation phytosanitaire de produits végétaux ou de dérivés simples est sortie des études de laboratoire et l'on commence à les trouver comme constituants de préparations commerciales. Toutefois, il n'existe pas encore de formulation « toute végétale » ; cependant des brevets ont été déposés, qui affichent cette prétention. Le succès qui se dessine tient à plusieurs raisons :

- Des études approfondies de mise au point ont abouti à donner aux dérivés de produits végétaux des fonctionnalités similaires à celles des produits d'origine chimique, et ce pour un prix qui s'en rapproche.
- Ils permettent des réductions importantes des doses de pesticides appliquées avec un bénéfice économique pour l'utilisateur ainsi qu'un bénéfice environnemental.
- Les produits dérivés du végétal sont dans leur majorité facilement biodégradés, qualité que n'ont pas beaucoup de produits d'origine chimique.
- Leur impact sur l'environnement est faible et souvent indétectable (Gauvrit et Cabanne, 1993).

IV. Le plan d'expériences

Les plans d'expérience servent à optimiser l'organisation des essais (expériences). Cette organisation permet d'obtenir le maximum de renseignement avec le minimum d'expériences. Elle permet également d'obtenir la meilleure précision possible sur la modélisation des résultats. La méthode des plans d'expériences est basée sur des règles mathématiques strictes et elle exige une démarche rigoureuse de la part de l'expérimentateur. (Goupy J.1999)

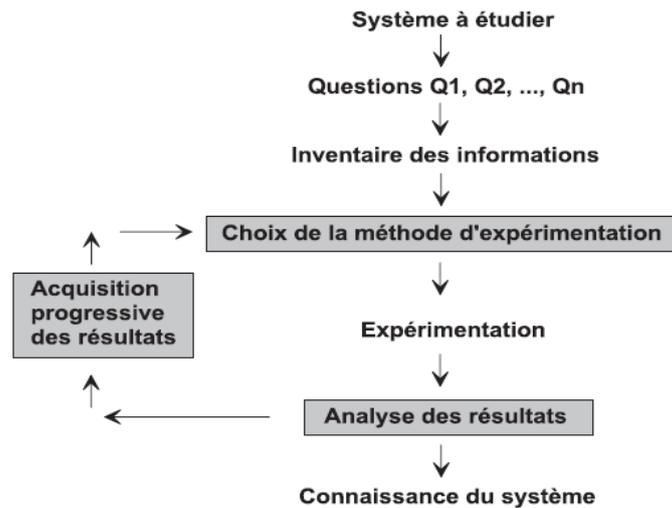


Figure 17 : Les plans d'expériences optimisent les trois parties encadrées du processus d'acquisition des connaissances (Goupy J. 1999)

La compréhension de la méthode des plans d'expériences s'appuie sur deux notions essentielles, celle de **d'espace expérimental** et celle de **modélisation mathématique** des grandeurs étudiées (Goupy J.1999).

La grandeur d'intérêt, qui est généralement notée y , porte le nom de **réponse**. Les variables qui peuvent modifier la réponse sont appelées **facteurs**. On parle donc des facteurs qui influent sur une réponse. Les termes facteur et réponse sont universellement employés dans le domaine des plans d'expériences (Triboulet P, 2008).

En l'absence de toute information qui lie la réponse aux facteurs, on se donne, a priori, une loi d'évolution. C'est le **modèle mathématique apriori** ou le **modèle postulé**. La forme la plus générale de ce modèle est :

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k)$$

où y est la réponse ou la grandeur d'intérêt.

Les x_i représentent les niveaux des différents facteurs

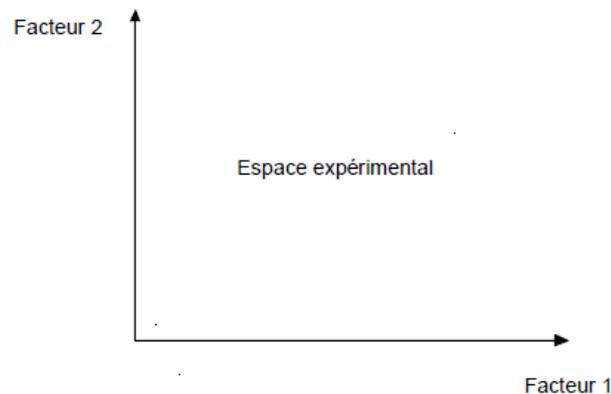


Figure 18 : Chaque facteur est représenté par un axe gradué et orienté. Les axes des facteurs sont orthogonaux entre eux. L'espace ainsi défini est l'espace expérimental (Goupy J. 1999)

Le niveau x_1 du facteur 1 et le niveau x_2 du facteur 2 peuvent être considérés comme les coordonnées d'un point de l'espace expérimental (Figure 19). Une expérience donnée est alors représentée par un point dans ce système d'axes. Un plan d'expériences est représenté par un ensemble de **points expérimentaux** (Goupy J. 1999).

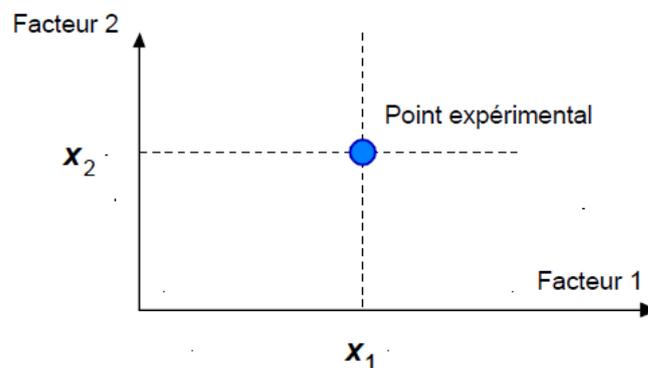


Figure 19 : Dans l'espace expérimental, les niveaux des facteurs définissent des points expérimentaux (Goupy J. 1999)

Le regroupement des domaines des facteurs définit le **domaine d'étude** (Goupy J. 1999)

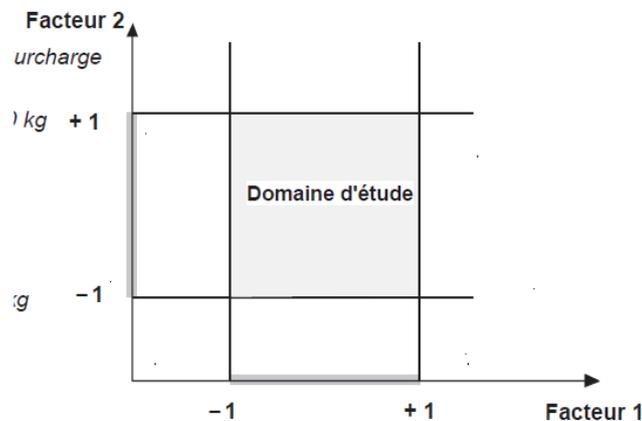


Figure 20 : Définition de domaine d'étude (Goupy J. 1999)

A chaque point du domaine d'étude correspond une réponse. A l'ensemble de tous les points du domaine d'étude correspond un ensemble de réponses qui se localisent sur une surface appelée la **surface de réponse** (Figure 21). Les quelques réponses mesurées aux points du plan d'expériences permettent de calculer l'équation de la surface de réponses.

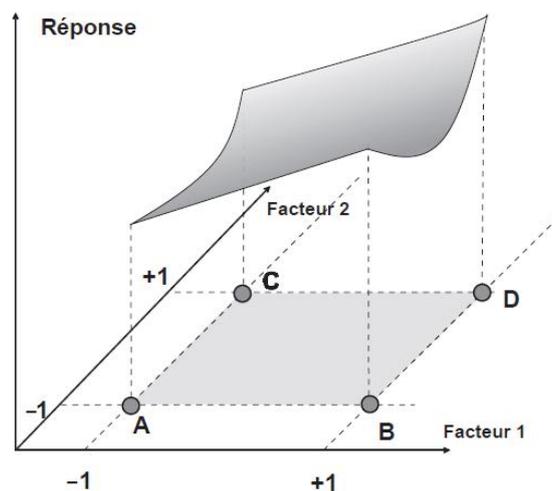


Figure 21 : Les réponses associées aux points du domaine d'étude forment la surface de réponse (Goupy J. 1999)

1. Construction d'un plan d'expérience

La conduite d'une expérimentation obéit à une démarche précise. Cette démarche est facilitée par l'application de la méthode des plans d'expériences. En effet, la construction et le choix d'une matrice d'expériences bien adaptée à l'étude nécessite une réflexion approfondie qui balise la préparation de l'expérimentation et qui prépare l'interprétation des résultats. Les principales étapes de la méthode sont les suivantes (selon les études et le type de recherche, on pourra ajouter ou supprimer des étapes) :

- Définition de l'objectif de l'étude,
- Description détaillée des éléments sur lesquels va porter l'expérimentation,
- Choix de la réponse permettant d'atteindre l'objectif,
- Recherche des facteurs qui pourraient être influents sur la réponse,
- Existence ou non d'interactions entre les facteurs,
- Examen des plans d'expériences,
- Expérimentation,
- Interprétation des résultats,
- Arrêt ou poursuite de l'étude.

2. Les différents types de plans d'expériences

- **Plans de criblage :**

Ces plans permettent de décrire les facteurs les plus influents sur une réponse donnée.

- **Plans de modélisation :**

Ces plans donnent accès à des modèles mathématiques du second degré. On les regroupe sous la nomination de plans pour surfaces de réponse.

Ils possèdent des avantages et des inconvénients qu'il faut connaître pour choisir la stratégie qui s'adapte le mieux au problème posé.

- **Plans de mélanges :**

Ce sont des plans particuliers adaptés aux facteurs dépendants. Ils sont surtout utilisés pour étudier l'influence des proportions des constituants d'un produit sur une réponse donnée.

Notre travail consiste à optimiser la formulation d'un bioproduit à base d'une huile essentielle formulée extraite de la plante *Thymus Vulgaris* de la région de Chréa sur les larves de moustiques *Culex pipiens L* et tester la toxicité du produit.

1. Partie terrain

1.1. Sites de récolte des matériels biologiques

1.1.1. Parc National de Chréa

Créé le 23 juillet 1983 Le parc de Chréa fait partie des dix parcs nationaux du pays. Omniprésente, la nature accueille à bras ouverts les randonneurs. On découvre à travers ce documentaire la beauté des sommets, le ruisseau des singes, le col des fougères et les magnifiques cédraies millénaires. La visite de l'écomusée nous renseigne sur la richesse et la biodiversité de cette région. Les amateurs de ski y trouvent aussi leur compte, quand les neiges enrobent les montagnes d'un manteau blanc (Anonyme 1986).

Situé en plein cœur du massif blidéen à 50 km au sud-ouest d'Alger. Il s'étend en echarpe sur 26 587 ha Le long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas Tellien, comprises entre les latitudes Nord 36°19' / 36°30', et les longitudes Est 2°38' / 3°02' (Anonyme 2015).

En 2002 l'UNESCO a reconnu le parc comme réserve mondiale de la biosphère (Anonyme 2014).

a- Les températures

Le Parc National de Chréa est compris entre les isothermes 8 et 11°C de températures moyennes annuelles, les sommets étant plus froids et les piémonts plus chauds. Pour ce qui est des températures moyennes mensuelles, leur minimum se situe généralement en janvier pour toutes les stations. Les températures les plus basses sont enregistrées à Chréa avec 3°C (Anonyme, 2015).

b- Les précipitations

Le Parc National de Chréa est compris entre les isohyètes 760 et 1400 mm/an de précipitations moyennes annuelles. Dans l'ensemble, les moyennes mensuelles des précipitations annuelles sont plus importantes dans les stations situées sur le versant Nord-Ouest que dans les stations situées sur le versant Sud Est. Les stations les plus arrosées font face aux vents humides venant du Nord-Ouest (Anonyme, 2015).

c- La neige

La couche de neige qui en moyenne est de 15 à 20 cm, atteint parfois 50 cm. Les moyennes annuelles des jours d'enneigement dans le Parc national de Chréa, atteignent la fréquence moyenne de 26 jours pour Chréa, et de 20,2 jours pour le lac de Mouzaia (Anonyme, 2015).

d- Le brouillard

Le brouillard est relativement fréquent dans les parties hautes du Parc national qui sont souvent plongées dans les nuages. Pour le col de Chréa, les observations faites sur une dizaine d'années seulement ont donné 104 jours/an de brouillard (Anonyme, 2015).

e- Le vent (sirocco)

Dans le Parc National de Chréa, ce sont les vents du Nord-Ouest qui prédominent. En ce qui concerne le sirocco, il se manifeste un à trois jours/an (Anonyme, 2015).



Figure 22 : a. Localisation du parc national de Chréa (Anonyme, 2015)
b. Site de récolte mois d'Avril (Originale, 2016)

1.1.1.1. Méthode d'échantillonnage

La plante du thym a été récoltée manuellement au niveau du parc national de Chréa plus précisément dans le secteur de Chréa à une altitude de 1400 m dans le mois d'Avril 2016

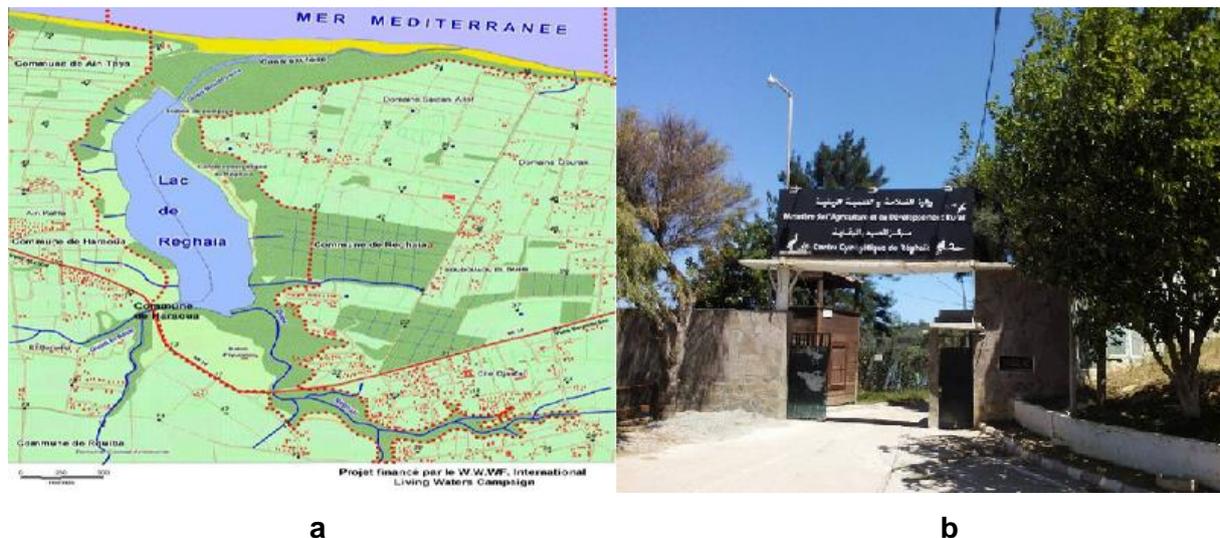
1.1.2. Le marais côtier de Réghaïa

Jacob *et al.* (1979), estime que le marais côtier de Réghaïa correspond à l'estuaire de l'oued Réghaïa qui constitue l'unique vestige de l'ancienne Mitidja marécageuse.

Cette réserve naturelle est une zone humide d'une superficie de plus de 1500 ha, située à 30 km à l'Est d'Alger. Ses coordonnées sont 3°10' de longitude Est et 36°25 de Latitude Nord. Elle est bordée au Nord par la mer Méditerranée au Sud par la route nationale n°5 reliant Alger à Constantine, à l'Est par la ville de Boudouaou et à l'Ouest par la ville d'Ain-Taya.

Selon le même auteur, la région d'étude appartient à l'étage bioclimatique sub-humide, la période humide englobe les trois saisons (automne, hiver, et printemps) et la période sèche correspond à l'été.

Le marais de Réghaïa reçoit les eaux de l'oued Réghaïa, celui-ci collecte les eaux usées qui sont brunâtres, nauséabondes et riches en matières organiques .Il y pousse une abondante végétation essentiellement. Cependant, il semble être un milieu approprié pour notre étude car il est considéré comme un site protégé et d'importance internationale (Site Ramsar pour les zones humides), il est de ce fait non traité. Il réunit, alors, les conditions favorables pour le développement et la multiplication des insectes.



a **b**
Figure 23 : a. Carte de la réserve naturelle du lac de Réghaïa
(Source : Direction générale des forêts, 2014)
b. Centre cynégétique de Réghaïa (Originale, 2016)

1.1.2.1. Matériel utilisé

L'équipement nécessaire pour la collecte d'échantillons larvaires est fonction de la méthode utilisée. Le matériel le plus souvent employé est le suivant :

- Des récipients fermés (pour y mettre les échantillons) dans notre cas bouteille en plastique,
- Une louche,
- Un entonnoir,
- Un carnet d'annotation,
- Un appareil photo numérique,
- La personne chargées de la collecte doivent porter des bottes une blouse et des gants de protection.

1.1.2.2. Méthode d'échantillonnage

Durant le mois de mai 2016, la récolte des larves de moustiques a été conduite dans la région de Réghaïa en utilisant la méthode de coup de louche « Dipping » (Rioux *et al.*, 1965). Cette méthode, simple a priori, consiste à plonger, en plusieurs endroits du gîte larvaire, un récipient de capacité connue qui est dans notre cas d'un litre, prolongée par un manche assez long pour pouvoir atteindre les endroits difficiles d'accès.

Par ailleurs, la collecte des larves a été réalisée en s'approchant lentement du gîte car toute perturbation est susceptible de faire plonger les larves et les nymphes au fond du gîte et de les rendre inaccessibles.

Cette collecte consiste à se positionner face au soleil de sorte que l'ombre ne balaie pas la surface du gîte, en restant immobile, pendant quelques secondes, pour permettre aux larves de reprendre leur activité normale et de plonger la louche doucement dans l'eau suivant un angle de 45°C et la retirer d'un mouvement uniforme en évitant les remous puis verser le contenu de la louche dans un contenant (bouteille en plastique) en prenant soin de bien l'étiqueter. et de ne pas fermer les bouteilles hermétiquement pour permettre aux larves de respirer et enfin reporter sur le carnet d'annotation toutes les informations concernant le gîte avant de les rapporter au laboratoire.



Rassemblement de larves de culex observé sur le site de collecte



Capture des larves sur le site par la méthode du coup de louche dipping



Transfert des larves récoltées au laboratoire

Figure 24 : Protocole de collecte des larves de culex (Originales, 2016)

2. Partie laboratoire

2.1. Extraction de l'huile essentielle

Cette partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de phytopharmacie appliquée du département des biotechnologies. Elle a été consacrée à l'étude de l'huile essentielle extraite à partir de la plante de thym (*Thymus vulgaris*) provenant de la région du parc de Chréa (situé au sud-ouest d'Algérie), par la méthode d'hydro-distillation.

2.1.1. Matériel utilisé

- Un appareil de type cleverger comprend (un ballon bicol de 500 ml, extracteur et réfrigérant),
- Potence, noix et pinces,
- Plaque chauffante (chauffe ballon),
- Balance analytique,
- Bain marie.

2.1.2. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué des parties aériennes de *Thymus vulgaris*. Les feuilles du thym ont été cueillies en avril 2016 de la région du parc Chréa. Après séchage à une température ambiante et à l'abri de la lumière solaire, afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules, les feuilles ont été récupérées et mises dans des sacs en papier et stockées jusqu'à leur utilisation.



Figure 25 : *Thymus vulgaris* (Originale, 2016)

2.1.3. Méthode d'extraction

Une biomasse de 200g de feuilles de plante a été soumise à une hydro distillation pendant 2h, à l'aide d'un appareillage de type Clevenger modifié.

Cette méthode consiste à faire bouillir un mélange d'eau et de substance naturelle contenant le composé à extraire (huile essentielle). La vapeur entraîne les huiles essentielles contenues dans le produit brut en condensant ces vapeurs à l'aide d'un réfrigérant.

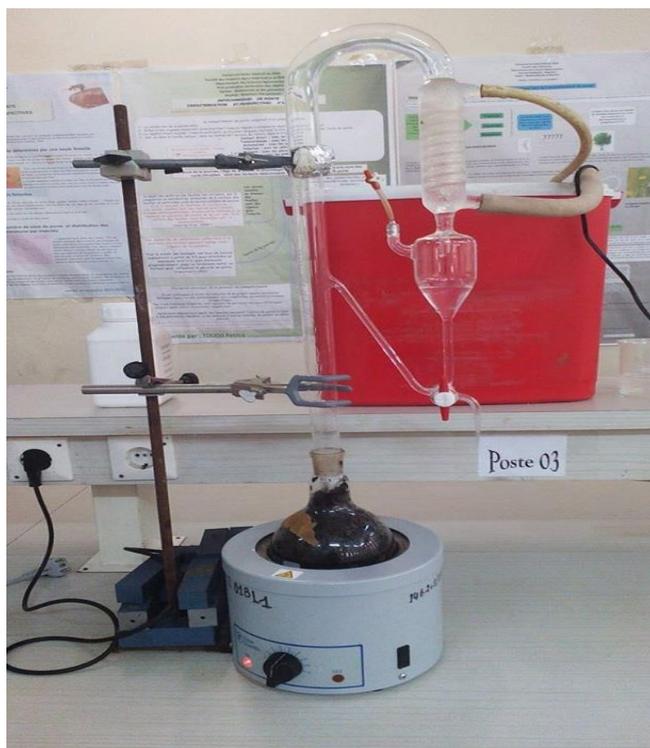


Figure 26 : Montage d'appareil hydro-distillateur clewenger (Originale, 2016)

L'huile essentielle recueillie par décantation à la fin de la distillation a été filtrée sur colonne de sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau résiduelles. L'essence ainsi obtenue a été mise dans de petits flacons opaques et stockée à 4 °C avant son utilisation.



Figure 27 : Huile essentielle de Thym (Originale, 2016)

2.2. L'identification des larves

Cette partie expérimentale a été réalisée au laboratoire du Paludisme et des Maladies Parasitaires de l'INSP. Elle consiste à identifier morphologiquement les larves de culex à partir de l'échantillon collecté du site de Réghaïa, par la méthode isolement-éclaircissement-montage.

2.2.1. Matériel utilisé

Tableau 04 : Equipements et produits utilisés au laboratoire (originale, 2016)

Equipements	Produits	Appareillages
<ul style="list-style-type: none"> - Verrerie - Pipettes en plastique - Bacs blancs - Minuterie - Lames et lamelle - Tubes de 10ml - Gobelets en plastique - Une lance 	<ul style="list-style-type: none"> - Eau distillée - Alcools (70°, 90° et 100%) - KOH à 10% - Baume du Canada 	<ul style="list-style-type: none"> - Microscope photonique - Microordinateur muni du Logiciel d'identification des moustiques

2.2.2. Matériel entomologique

Le modèle biologique utilisé dans notre expérimentation est l'espèce *Culex pipiens* collecté sur quatre gîtes larvaires différents dans le lac de Réghaïa en mois de mai 2016.

2.2.3. Méthode d'identification des larves

Seules les larves du 4ème stade ont été utilisées pour l'identification vue leur facilité de manipulation et leur chétotaxie (Bouadiba *et al.*, 2012).

D'après Messai *et al.* (2012), le montage des larves se fait, en premier lieu, par la réhydratation des larves conservées dans de l'alcool dans un bain d'eau distillée pendant quelques minutes. Puis, leur éclaircissement dans une solution de potasse (KOH) à 10% pendant environ 10 minutes, leur rinçage à l'eau distillée (3 bains de 2

à 5 minutes), leur déshydratation par passage dans de l'alcool à concentration croissante (70°, 90° et 100°) pendant 15 minutes pour éliminer l'eau contenue dans l'échantillon. Et enfin, leur montage entre lame et lamelle dans une goutte de baume du Canada, en sectionnant à l'aide d'une fine aiguille la larve au niveau du 7ème segment abdominal en deux parties.

La partie antérieure est montée face dorsale et la partie postérieure est montée latéralement (Boulkenafet, 2006). Les larves préparées vont ainsi être examinées sous un microscope photonique aux grossissements 10x10 et 10 x40.

L'identification a été faite grâce au programme logiciel « Les Moustiques de l'Afrique méditerranéenne », réalisé par l'IRD de Montpellier en collaboration avec l'institut Pasteur de Tunis (Brunhes *et al.*, 1999).



Figure 28 : Les étapes d'isolement des larves de culex (Originales, 2016)



Figure 29 : Les étapes d'éclaircissement des larves des culex (Originales, 2016)

a. Rinçage dans de l'eau distillée (10min), b. Eclaircissement dans du KOH à 10% (10min), c. Rinçage dans de l'eau distillée (5min), d.e.f. déshydratation dans de l'alcool à différentes concertations (70°, 90° et 100°)

**a****b**

**Figure 30 : a. Montage des larves des culex et
b. Observation des larves des culex (Originales, 2016)**

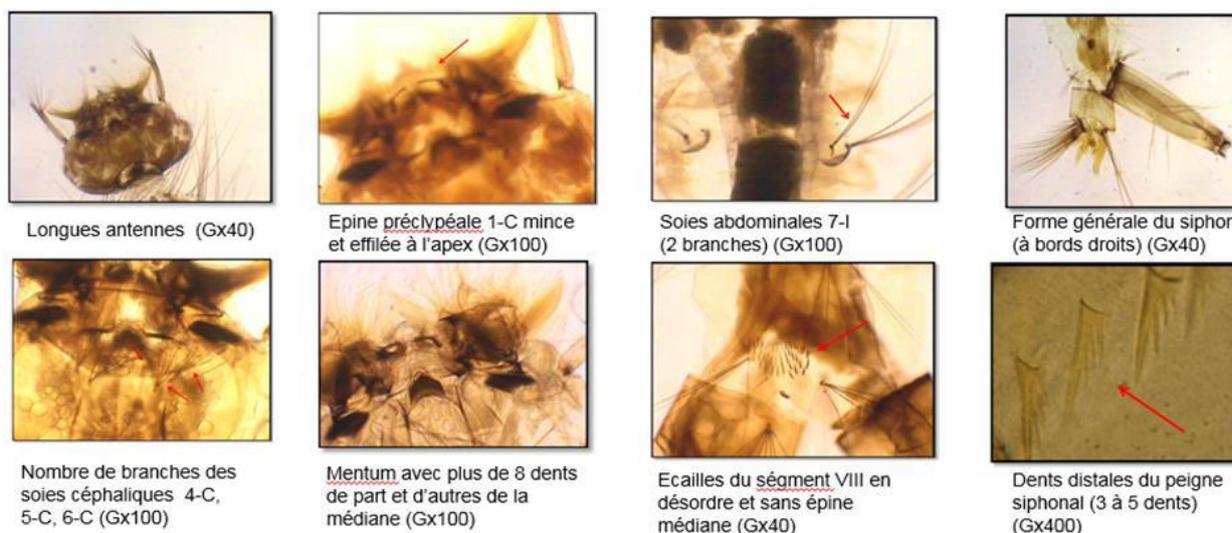


Figure 31 : Critères d'identification de *Culex pipiens* (Originales, 2016)

2.3. Etude de l'activité larvicide

2.3.1. Formulation du bioproduit

Le bioproduit utilisé présente une activité larvicide, dont la matière active (huile essentielle), est issue de la plante *Thymus vulgaris*. A l'aide d'une balance de précision, nous avons commencé par peser la quantité de l'huile essentielle destinée à la formulation qui a été limitée selon le rendement de la plante puis mélangée avec différents composés appropriés à la formulation selon le protocole établi par

Moussaoui et al, (2014). Le produit final est considéré comme une solution mère à 10% de principe actif (HE *Thymus vulgaris*).

2.3.2. Test de toxicité

Les tests ont consisté à évaluer la mortalité des larves de moustique de l'espèce *Culex pipiens* en présence des solutions diluées de larvicides suivant une méthodologie inspirée du protocole de l'Organisation mondiale de la santé (OMS,2005).

Les expérimentations ont été réalisées dans des gobelets de 5cm de diamètre, avec des lots de 20 larves de moustiques. Dans chaque gobelet, a été versé un mélange constitué de 99ml d'eau distillée et de 1ml de solution diluée de larvicide totalisant un volume de 100ml, exception faite pour le gobelet témoin qui ne contenait que de l'eau distillée.

Les gobelets ont été placés dans une salle de laboratoire dans des conditions standards (Température à 27 °C – Humidité à 80%).

La période de suivi a été de 72h avec une lecture du test à des intervalles de temps fixes à savoir 24, 48 et 72 heures.

L'efficacité de chaque dose a été estimée par le biais du taux de mortalité en relevant dans chaque gobelet le nombre de larves mortes après l'application des différents traitements.

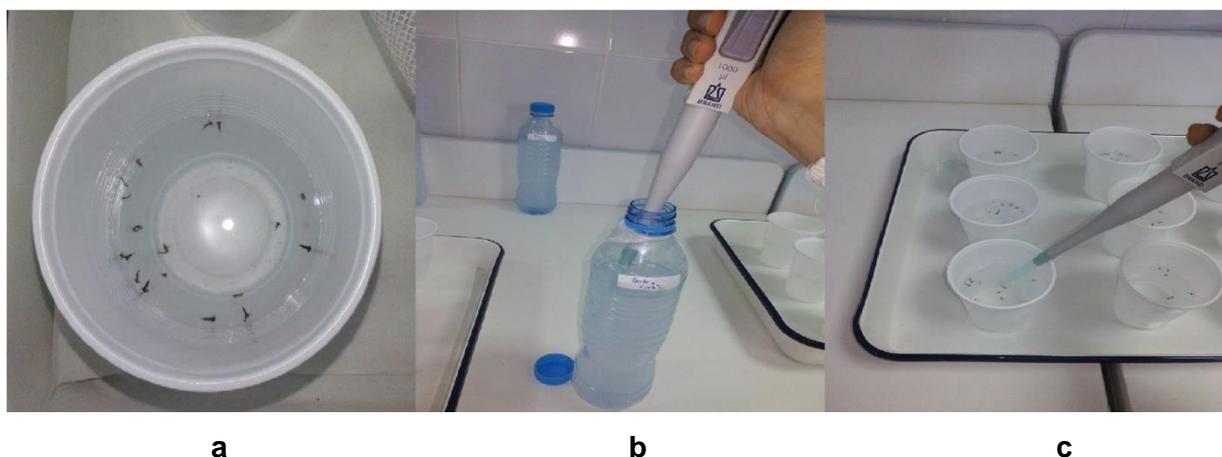


Figure 32 : Les étapes du déroulement des tests (Original, 2016)

a. Dépôts des larves, b. Prélèvement du produit pour le dosage et c. Injection du produit dans les gobelets

3. Méthode d'analyse des données

3.1. Le calcul du pourcentage de mortalité observée

Le pourcentage de mortalité observée chez les individus témoins et testé est estimé par la formule suivante :

$$\text{Mortalité observée} = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$

4. Analyse statistique des résultats

a- Analyses de variance (Design Expert DX7) :

Lorsque le problème consiste à savoir si la moyenne d'une variable quantitative varie significativement selon les conditions (période, matière active, dose), nous avons eu recours à une analyse de variance (ANOVA pour *Analysis Of Variance*) qui permet de vérifier la signification de la variable d'intérêt entre toutes les combinaisons des modalités, dans les conditions paramétriques si la distribution de la variable quantitative est normale.

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité P erreur 5%.

P > 0,05 : Différence non significative. P < 0,05 : Différence significative.

1. Préparation des essais (expériences)

Afin réaliser une étude dont l'objectif est de connaître l'effet larvicide de l'huile essentielle formulée du thym sur les larves de *Culex pipiens*, nous allons mettre en œuvre une méthode permettant d'optimiser l'organisation des expériences en déterminant les facteurs influents à partir d'un modèle mathématique.

1.1. Choix de la réponse

La réponse est le taux de mortalité des larves de culex par rapport aux traitements effectués, la figure suivante illustre la saisie de la donnée réponse dans le logiciel.

1.2. Choix des facteurs

Un seul facteur est pris en compte dans notre étude ; la concentration de l'huile essentielle formulée à base de thym.

1.3. Choix du domaine

Les concentrations (doses) proposées varient entre 0 et 0.05 ml/l comme illustré sur l'annexe II.

1.4. Choix du plan d'expérience

Nous avons opté pour les plans pour surface de réponse de type D-optimaux (annexe I et II) car ils permettent le criblage des facteurs et conduisent à des modélisations simples mais suffisantes lorsqu'il faut passer à des modèles mathématiques du second degré d'autant que plus notre étude ne compte qu'un seul facteur influent.

1.5. Choix de l'expérimentation

Pour étudier le facteur concentration, il faut réaliser 13 essais (proposés par le logiciel). Les conditions opératoires (concentration en l'huile essentielle) de chaque essai sont décrites dans le tableau (figure 33), appelé matrice des essais ou matrice d'expérimentation.

Std	Run	Block	Factor 1 A:CONCENTRATION HE m/l	Response 1 TAUX DE MORTALITE %
4	1	Block 1	0.04	
2	2	Block 1	0.05	
7	3	Block 1	0.01	
6	4	Block 1	0.03	
5	5	Block 1	0.01	
1	6	Block 1	0.00	
13	7	Block 1	0.02	
10	8	Block 1	0.00	
11	9	Block 1	0.05	
9	10	Block 1	0.05	
12	11	Block 1	0.00	
3	12	Block 1	0.02	
8	13	Block 1	0.04	

Figure 33 : Matrice des essais de plan d'expériences

Après avoir effectué les 13 essais avec les concentrations indiquées :

- Essai n°1 : concentration HE = 0 ml/l,
- Essai n°2 : concentration HE = 0 ml/l,
- ...,
- Essai n°13 : concentration HE = 0.05ml/l.

Nous reportons les résultats obtenus dans le tableau (figure 34)

Std	Run	Block	Factor 1 A:CONCENTRATION HE m/l	Response 1 TAUX DE MORTALITE %
1	6	Block 1	0.00	0
10	8	Block 1	0.00	0
12	11	Block 1	0.00	0
7	3	Block 1	0.01	0
5	5	Block 1	0.01	5
13	7	Block 1	0.02	50
3	12	Block 1	0.02	40
6	4	Block 1	0.03	85
4	1	Block 1	0.04	60
8	13	Block 1	0.04	50
2	2	Block 1	0.05	65
11	9	Block 1	0.05	85
9	10	Block 1	0.05	85

Figure 34 : Tableau représentatif de la matrice d'expériences

Une fois le plan d'expérience construit c'est-à-dire que les données nécessaires sont saisies, le logiciel propose un récapitulatif de ces données (annexe III).

Représentant graphiquement les variations du taux de mortalité en fonction de la concentration de l'HE (figure 35).

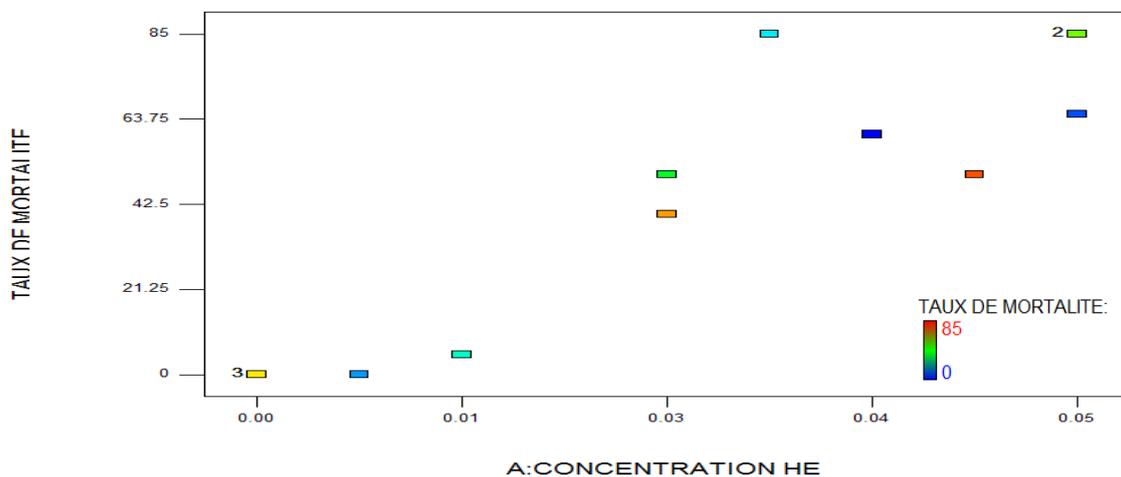


Figure 35 : Graphe illustrant le taux de mortalité en fonction de la concentration de l'HE formulée à base de thym

Le programme calcule les effets de tous les termes du modèle. Il produit des statistiques telles que F-valeurs (le manque d'ajustement), et les valeurs de R² (coefficient de corrélation) pour comparer les modèles (linéaire, quadratique, etc....).

Lorsqu'un modèle statistiquement significatif est détecté, le programme le souligne et le note " suggéré ". Comme c'est le cas ici pour le modèle linéaire (Tableau 05).

Tableau 05 : Effet de la concentration de l'HE

Lack of Fit Tests						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
<u>Linear</u>	<u>2004.49</u>	<u>6</u>	<u>334.08</u>	<u>5.27</u>	<u>0.0441</u>	<u>Suggested</u>
Quadratic	1816.20	5	363.24	5.74	0.0390	
Cubic	1620.97	4	405.24	6.40	0.0334	
Pure Error	316.67	5	63.33			

Le modèle summary statistics montre l'écart-type, le R², le R²-ajusté, le R²-prédit ainsi que la statistique PRESS pour chaque modèle. Un faible écart type, un R² près de 1 et un relativement faible PRESS sont les meilleures.

Le coefficient de corrélation linéaire de deux caractères X et Y est égal à la covariance de X et Y divisée par le produit des écarts-types de X et Y

$$r(X,Y) = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

Encore une fois le modèle linéaire est suggéré dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Les statistiques du modèle

Model Summary Statistics

Source	Std. Dev.	R-Squared	Adjusted R-Squared	Predicted R-Squared	PRESS	
<u>Linear</u>	<u>14.53</u>	<u>0.8445</u>	<u>0.8303</u>	<u>0.8006</u>	<u>2975.00</u>	<u>Suggested</u>
Quadratic	14.60	0.8571	0.8285	0.7741	3371.72	
Cubic	14.67	0.8702	0.8269	0.7408	3868.52	

Continuons en appuyant sur le bouton  en choisissant le modèle " suggéré " par les statistiques précédentes (annexe IV).

Nous procédons, par la suite, à une analyse de la variance (ANOVA) de notre modèle. A noter que ceci n'est possible que si les facteurs sont fixes et non aléatoires.

Tableau 07 : Tableau représentatif de l'analyse de la variance avec test d'écart à la linéarité

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value	
Model	12601.92	1	12601.92	59.72	< 0.0001	significant
<i>A-CONCENTRATION HE</i>	12601.92	1	12601.92	59.72	< 0.0001	
Residual	2321.16	11	211.01			
<i>Lack of Fit</i>	2004.49	6	334.08	5.27	0.0441	significant
<i>Pure Error</i>	316.67	5	63.33			
Cor Total	14923.08	12				

Par model, on entend les conditions d'estimation des effets des facteurs.

La F-valeur, désignant le test pour comparer le modèle avec la variance résiduelle, de 59,72 implique que le modèle est significatif.

Les valeurs de " Prob > F " (Probabilité de voir la valeur observée F (Fisher) avec l'hypothèse qu'il n'y a pas d'effet de facteur) moins de 0,0500 indiquent que les termes du modèle sont significatifs.

Ensuite, nous avons une collection de statistiques sommaires pour le modèle (annexe V)

Le R² prédit de 0,8006 est en accord raisonnable avec le R² ajusté (mesure de la quantité de variation autour de la moyenne expliquée par le modèle) de 0,8303.

La précision adéquate mesure le rapport du signal sur le bruit ; Un rapport supérieur à 4 est souhaitable. Notre rapport de 14.216 indique un signal adéquat.

Comme conclusion à ces résultats, nous pouvons dire que notre modèle peut être utilisé pour naviguer dans l'espace de conception.

- Analyse Post ANOVA et équations de prédiction

Cette section permet de fournir des définitions des informations post- ANOVA pour les termes individuels.

Tableau 08 : Analyse post-ANOVA avec intervalle de confiance

Factor	Coefficient		Standard		95% CI		VIF
	Estimate	df	Error	Low	High		
Intercept	39.61	1	4.03	30.74	48.48		
A-CONCENTRATION HE	40.50	1	5.24	28.97	52.04	1.00	

Le logiciel nous indique de passer aux diagnostics graphiques (l'icône suivante dans la progression) :

1. tracé de la probabilité normale des résidus de Student pour vérifier la normalité des résidus.
2. les résidus de Student en fonction des valeurs prévues pour vérifier l'erreur constante.
3. les résidus de Student pour chercher les valeurs aberrantes, à savoir, les valeurs influentes.

Le graphe de probabilité normale (Figure 36) indique que si les résidus suivent une distribution normale et dans notre cas, nous voyons que les points suivent bien une ligne droite, alors ceci nous amène à dire que ce graphe teste l'hypothèse d'une variance constante.

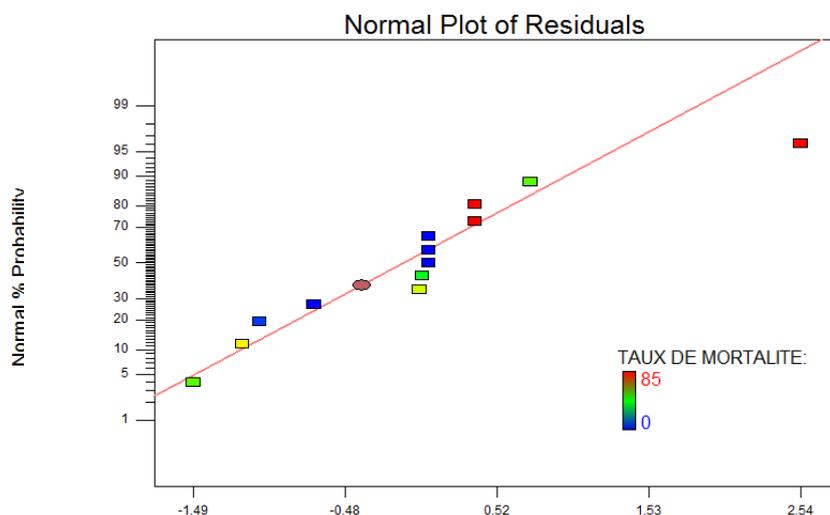


Figure 36 : Graphe des valeurs de probabilité normale

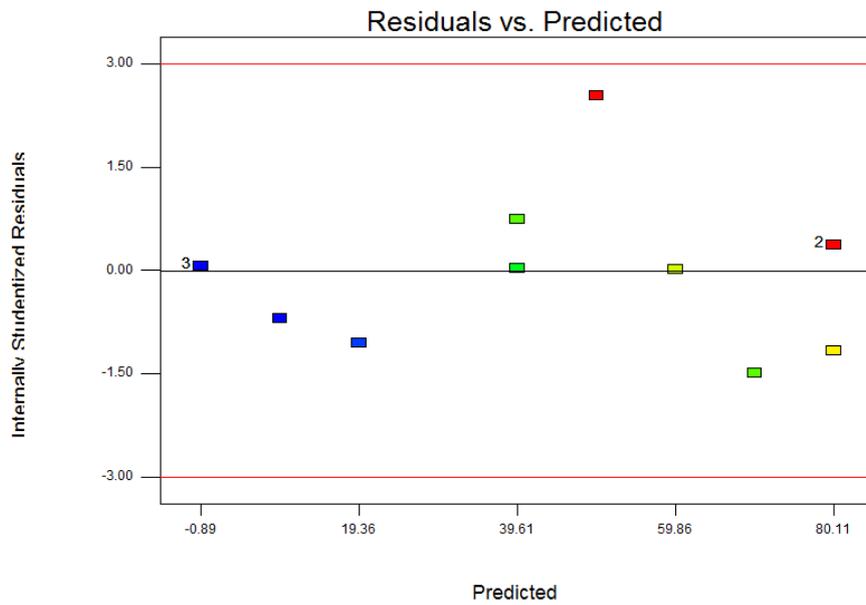


Figure 37 : Graphe des effets moyens des facteurs

Le graphe suivant est un graphe des résidus par rapport à l'ordre d'exécution expérimentale. Il montre les variables qui ont pu influencer la réponse au cours de l'expérience.

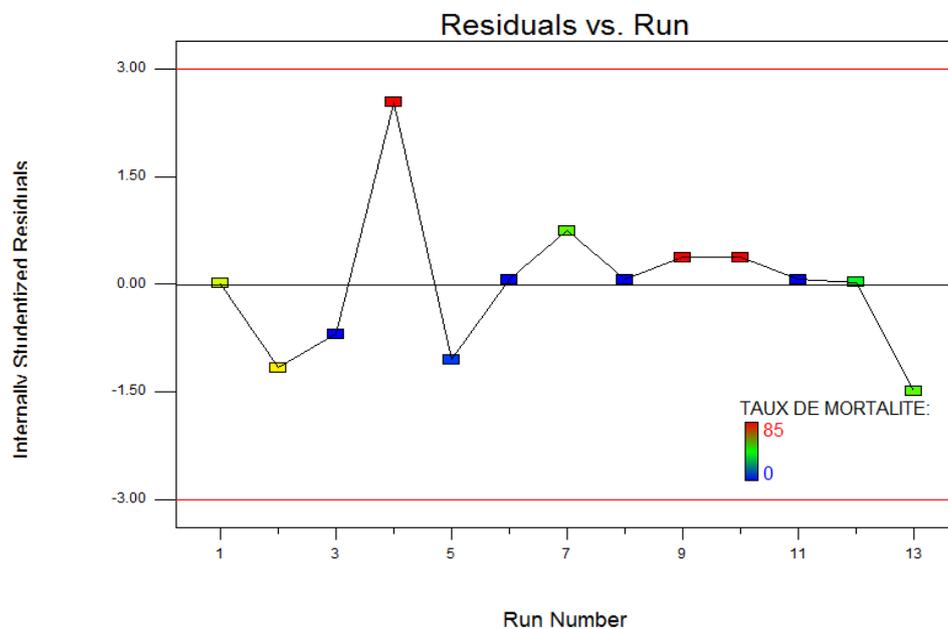


Figure 38 : Graphe des écarts

Selon (Goupy , 1999), un effet moyen positif pour un facteur s'interprète qualitativement. Ainsi, une augmentation de la valeur du facteur entraîne une augmentation de la réponse. Dans notre cas une augmentation de la concentration de l'HE formulée à base de thym entraîne une augmentation du taux de mortalité des larves de *Culex pibiens*. Le graphique suivant illustre ces effets en montrant l'effet linéaire du facteur HE étudié sur la réponse des larves traitées.

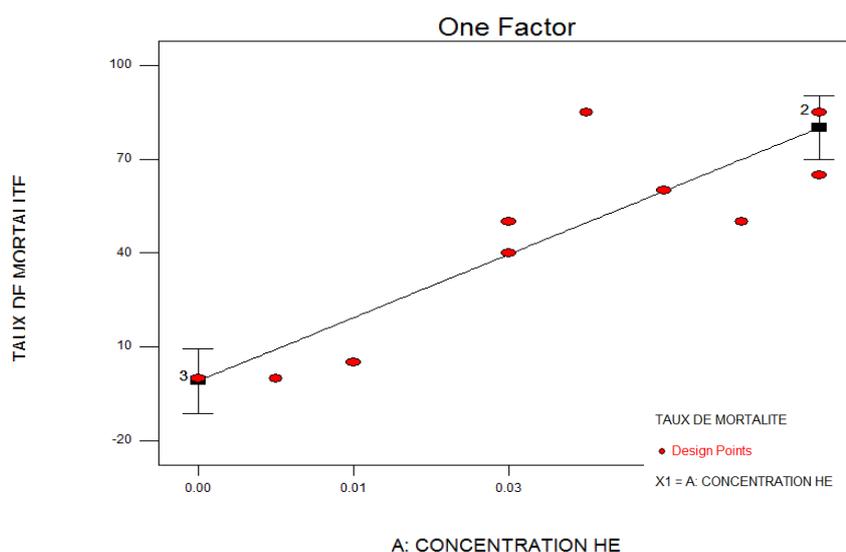


Figure 39 : Graphe des effets moyens

2. Utilisation du modèle et optimisation

Le modèle étant validé, le logiciel facilite son utilisation en exprimant la réponse (taux de mortalité des larves) en fonction des valeurs réelles des facteurs (concentration de l'HE) et en effectuant les prévisions en tout point du domaine. Ces prévisions sont accompagnées de leurs intervalles de confiance (Tableau 09).

Il est bon de signaler que le modèle obtenu ne peut être utilisé qu'à l'intérieur du domaine d'étude d'où l'utilité d'une étude préalable correcte.

Tableau 09 : Tableau des prévisions

Factor	Name	Level	Low Level	High Level	Std. Dev.	Coding
A	CONCENTRATIO	0.050	0.000	0.050	0.000	Actual

Response	Prediction	SE Mean	95% CI low	95% CI high	SE Pred	95% PI low	95% PI high
TAUX DE MORTALITE	80.1064	6.53	65.73	94.48	15.93	45.05	115.16

Le taux optimal de mortalité des larves traitées est de 80.1064 % avec un intervalle de confiance entre 65.73 et 94.48 % et un intervalle de prévision entre 45.05 et 115.16 %.

Ce qui correspond à la valeur 0.05 de la concentration HE comme le montre la figure suivante :

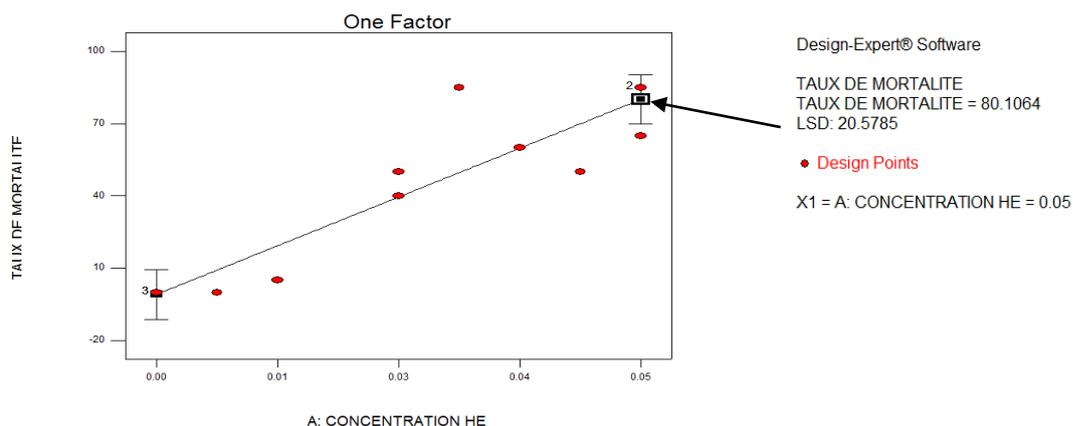


Figure 40 : Graphe démontrant la solution du point optimal

L'effet dévastateur causé par les Culicidae tant à l'homme qu'aux animaux, par leur rôle de vecteurs potentiels de maladies infectieuses, rend impératif la mise en œuvre d'un ensemble de procédés de lutte visant à réduire sa propagation (Rioux, 1958).

Cette étude s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une huile essentielle issue d'une plante aromatique afin de mettre au point des méthodes de lutte intégrée, peu onéreuse, efficace et aisément utilisable.

Dans le présent chapitre nous exposons les hypothèses relatives aux effets larvicides des différentes doses d'un bioproduit formulé à base d'huile essentielle de thym. Les réponses du taux de mortalité des larves du *Culex pipiens* dégageraient la manière de planifier les expériences afin d'optimiser la formulation du bioproduit à base d'huile essentielle de thym en question.

La lecture individualisée de la fluctuation des densités des larves du *Culex pipiens* fait ressortir le facteur dose comme élément de restriction des vivants de *Culex pipiens* (*exposés aux différentes doses du bioproduit formulé*).

Les mêmes résultats font ressortir que l'effet biocide de la formulation est tributaire de la dose du principe actif (Huile essentielle du Thym) cela signifie que plus la dose augmente plus la formulation extériorise son effet biocide sur les larves du *Culex pipiens*.

Des études récentes ont montré que les produits naturels issus des plantes et les métabolites secondaires représentent une importante source de molécules pouvant être exploitées dans différents domaines.

Aubertot et *al.* (2005), estiment que les huiles essentielles les plus étudiées dans la littérature pour leurs propriétés biocides appartiennent à la famille des *Labiatae* : thym, origan, lavande, menthe, romarin, sauge, etc... étant donnée la grande complexité de la composition chémotypique des huiles essentielles.

Selon Bendaho (2007) la composition chimique de l'huile essentielle varie d'une plante à une autre.

Dorman et *al.* (2000), estime que le principal facteur modifiant l'activité insecticide des huiles essentielles est le type et la structure moléculaire des

composants actifs présents. Cependant, ce constat ne doit pas amener à penser que la toxicité d'une plante est obligatoirement liée à la nature du composé dominant.

Regnault-Roger (2005), affirme que les huiles essentielles de thym (*Thymus vulgaris*), de l'origan (*Origanum vulgare*), du romarin (*Rosmarinus officinalis*), du basilic (*Ocimum basilicum*), de la sauge (*Salvia officinalis*) et de la coriandre (*Coriandrum sativum*) sont très toxiques.

L'objectif de notre expérimentation étant de réaliser une approche d'optimisation de la formulation du bioproduit formulé à base d'huile essentielle de thym par le biais d'une modélisation mathématique, on a fait appel à une méthode de recherche expérimentale planifiée appelée « plans d'expériences ». Cette démarche expérimentale nous a aidés à structurer notre recherche de manière différente et à mieux comprendre le phénomène étudié. Elle nous a surtout permis une diminution considérable du nombre d'expériences, une interprétation rapide et l'optimisation de la formule à utiliser.

Ces dernières décennies, la protection de l'environnement s'impose de plus en plus comme une préoccupation mondiale majeure. La méthode classique de lutte chimique contre les insectes jadis considérée comme panacée, fait de plus en plus place à la lutte intégrée et la lutte biologique par l'utilisation de micro-organismes, de prédateurs, de parasitoïdes et de méthodes dites physiques. Le recours aux plantes aromatiques, et particulièrement aux huiles essentielles extraites de ces plantes, est devenu une alternative courante dans cette lutte.

Par le présent travail, nous avons étudié en premier lieu l'effet biocide d'un bioproduit formulé à base d'huile essentielle de thym *Thymus vulgaris* sur les larves du *Culex pipiens* à travers l'application de la méthode des plans d'expériences.

Notre démarche consistait en l'utilisation des plans dits pour surfaces de réponses afin de viser l'optimalité de notre modèle en ayant recours aux plans D-optimaux du second degré.

Après identification de la réponse des larves de *Culex pipiens* vis-à-vis des facteurs influents sur leur mortalité, les résultats obtenus stipulent que l'effet toxique de la formulation d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est dépendant de la dose, montrant que plus la concentration augmente plus la formulation présente un effet biocide plus important sur les larves du *Culex pipiens*

Dans la continuité de l'utilisation des plans d'expériences et comme perspectives à notre travail, il serait d'un grand intérêt de réaliser des études faisant intervenir plusieurs paramètres d'entrée (facteurs influents) pour notamment établir des plans de criblages ou encore des plans de mélanges (plans très utilisés dans le domaine de procédés chimiques).

Abdelouahid D., Bekhechi C., 2010. Les huiles essentielles. Ed. Off. Pub. Univ. Paris, pp 3-14 et 83-98.

Adwan G., Abu-Shanab B., Adwan K., Abu-Shanab F., 2009. Antibacterial effects of Nutraceutical Plants Growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa* Turk. *J. Biol.* 30 : pp 239-242.

Amara K. R., 2010. Bio-écologie du complexe *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) responsable de la transmission du virus West Nile et du virus de la Fièvre de la vallée du rift en Algérie. Mémoire de Master II, Université Badji Mokhtar Annaba Algérie, pp 57.

Amiot J., 2005. *Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaires. *Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier*.

Anderson S. L., Richards S. L., Smartt C. T. (Page consultée le 04/16). EDIS, University of Florida IFAS extension, [en ligne]. Adresse URL : <http://edis.ifas.ufl.edu/in811>

Anonyme., 1983. Informal consultation on insect growth regulators. WHO/VBC/83.

Anonyme., 1986. Paysages et Environnement. Consulté le 05/2016. Via le site internet: <http://www.MEDITERRANEAN-MEMORY.fr/>

Anonyme., 2014. Parc national Chréa. Consulté le 05/2016. Via le site internet: <http://www.algerie-monde.com/>

Anonyme., 2015. INSECTES. Consulté le 04/2016. Via le site internet: <http://aramel.free.fr/15-3.shtml>.

Anonyme., 2015. Page [en ligne] consultée le 05/2016. Via le site internet: <http://www.parcnationalchrea.dz/>.

Andreo V., 2003. L'effet anti-gorgement sur un chien d'un shampoing à 0,07% de Deltaméthrine sur un moustique du Complexe *Culex pipiens* ; Thèse de Médecine Vétérinaire, Toulouse. pp 70.

Balenghien T., 2006. De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France. Thèse de Doctorat, Grenoble, Université J. Fourier : pp 235, <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00129514/fr/>.

Balladin D.A; Headley, O., 1999. Evaluation of solar dried thyme (*Thymus vulgaris* Linné) herbes. *Renewable Energy*. 17, pp 523-531.

Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Lane J. and Kaiser A., 2003. Mosquitoes and their control. Ed. Kluwer Academic, New York, pp 498.

Beer A.M., Lukanov J., Sagroche V., 2007. Effect of Thymol on the spontaneous contractile activity of the smooth muscles. *Phytomedicine* 14: pp 65-69

Belaiche P., 1979. Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. Ed. Maloine S.A.Paris.

Belkou H., Beyoud F., Taleb Bahmed Z., 2005. Approche de la composition biochimique de la menthe verte (*mentha spicata* L) dans la région de Ouargla, Mémoire DES, univ Ouargla pp 2,61.

Bendali F, Djebbar F. & Soltani N., 2001. Efficacité comparée de quelques espèces de poisons à l'égard de divers stades de *Culex pipiens* L. dans des conditions de laboratoire. *Parasitica*, 57(4) : pp 255-265.

Berchi S., 2000. Bioécologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttés. Thèse doc. Es – science, Université de Constantine, Algérie, pp133.

Binet P., Brunel J. P., 2000. Physiologie Végétale. Tome II. Edit., Doin. pp 54.

Bouabida H., Djebbar M. et Soltani, N., 2012. Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Tébessa (Algérie). *Faunistic Entomology*, Tébessa, 65, pp 99-103.

Bouamer A .Bellaghit M. et Mollay A., 2004. Etude comparative entre l'huile essentielle de la menthe verte et la menthe poivrée de la région de Ouargla ; Mémoire DES Unive. Ouargla, pp 2-5 ; 10 ; 19 ; 21-22.

Bouhdid S., Idaomar M., Zhiri A., Bouhdid D., Skali N. S., Abrini J., 2006. Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrès International de biochimies, Agadir*. pp 324-327.

Boukraa S., 2010. Bio-systématique des moustiques (Diptera : Culicidae) dans et aux alentours des fermes d'élevage en Belgique. Mémoire Ingénieur, Gembloux Agro Bio-Tech, Université de LIEGE, Belgique. pp109.

Boulkenafet F., 2006. Contribution à l'étude des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Mémoire de Magister, Université de Constantine, pp 190.

Bruneton J., 1993. «Pharmacognosie et phytochimie plantes médicinales ».Ed .Tec et Doc, Lavoisier, paris, pp 915.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. *3ème Ed Tec&Doc. Paris.*

Bruneton J., 1987. Elément de phytochimie et pharmacognosie, Paris : Lavoisier - Tech. & doc, pp 584.

Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy B., Angel G. et Hervy J.P., 1999. Les Culicidae d'Afrique méditerranéenne. Logiciel de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.), Montpellier, ISBN 2,7099, pp 1446-8.

Brunhes J., Rhaim A., Geoffroy A., Angel G. et Hervy J.P., 1999. Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne : Programme d'identification et d'enseignement. Ed.IRD, Montpellier.

Bussieras J., Chermette R., 1991. Parasitologie Veterinaire, Entomologie, Service de Parasitologie, ENVA. pp 58-61.

Cachereul A., 1997. Les moustiques : cycle de developpement, aspects anatomophysiologiques et regulation du cycle ovarien, These de Medecine Veterinaire, Nantes. pp117.

Callot J. et Helluy J., 1958. Parasitologie médicale. Ed. Médicales Flammarion, Paris, pp 645.

Carnevale P., Robert V., 2009. Les anophèles. Biologie, transmission du Plasmodium et lutte anti-vectorielle. Ed. I. R. D., Marseille, pp 389.

Capo M., Courilleau V., Valette C., 1990. Chimie des couleurs et des odeurs. Culture et techniques, pp 204.

Castric C., 2002. Mise au point sur le diagnostic et le traitement de la dirofilariose cardiopulmonaire et de l'angiostrongylose canines. Th. : Med.Vet. : Alfort, 084, pp 81.

Centre canadien d'hygiène et de sécurité du travail. (Page consultée le 04/2016). CCHST, [en ligne]. Adresse URL <http://www.cchst.ca/oshanswers/diseases/westnile.html>.

Chaker ., Kalamoinni., 2010. Thèse sur: Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées, l'Institut National.

Chapman, H.C., 1981. Potential for use of biological agents in the integrated control of vectors. TDR/BCV/SWG. 81/WP. pp10.

Chatterjee S.N., Ghosh A. et Chandra G., 2007. Eco-friendly control of mosquito larvae by *Brachytron pratense* nymph. *Journal of Environmental Health*, 69 (8), pp 44-48.

Chavasse D.C., Lines J.D., Ichimori K., Majala A.R., Minjas J.N. et Marijani J., 1995. Mosquito control in Dar es Salaam II Impact of expanded polystyrene beads and pyriproxyfen treatment of breeding sites on *Culex quinquefasciatus* densities *Med. Vet. Entomol*, 9 (2), pp 141-146.

Collins F.H., Kamau L., Ranson H.A., Vulule J.M., 2000. Molecular entomology and prospects for malaria control. *Bull. WHO*, 2000 (78) pp1412-1423.

Coz, J. et Mouchet, J., 1981. Conception actuelle de lutte contre les anophèles. *Méd.Malad.Infect.*, n 0 6 bis, pp 404 – 407.

Crampton J., Morris A., Lycett A. et Eggleston P., 1990. Transgenic mosquitoes : a future vector control strategy ? *Parasitology Today*, 6 (2), pp 31-36.

Crosby DG., 1966. Natural pest control Agents. *Adv. Chem. Ser.* 53, pp 1-16.

Curtis C.F., 1994. Approaches to vector control : new and trusted. 4. Appropriate technology for vector control: impregnated bed nets, polystyrene beads and fly traps. *Royal Society of Tropical Medicine and hygiene* (1994) 88, pp 144-146.

Dajoz R., 1969. Les insecticides. ed. Presses Universitaires de France, pp 128.

Delille A.L., 2010. les plantes medicinales d'Algerie. 2eme edition .Berti edition.p239 Doc., Paris, pp 488- 538.

Dohm D. J., O'Guinn M. L., 2002. Turell M. J. Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) to transmit West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, 39, pp 221-225.

Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*. 183, pp 191-195.

Euzeby J., 2008. Grand dictionnaire illustre de parasitologie medicale et veterinaire. Paris : Editions Tec&Doc, pp 818.

Faraj C., Elkholi M., Lyagoubi M., 2006. Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 99, pp 119-121.

- Forattlni P., Sillum M. A. M. 1996. Two species of Science Section of Cutf\ (Mclanocviwm) (Diptera: Culicidae). Mosq. Svsi. pp 142.
- Franchomme P. et Péroël D., 1990. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges, pp 445.
- Fremont F., 1996. Les vecteurs de la dirofilariose canine dans le Var, etude bibliographique. Th. : Med.Vet. : Toulouse, 003. pp 63.
- Gaspar F., Jeeke G., 2004. Essential oil from *Origanum vulgare* L. ssp. *Virens* (HOFFM. and LINK) IETSWAART : Content, Composition and Distribution Within the Bracts., *J. Essent. Oil Res.*, 16, pp. 82-84.
- Gaucher I., Lusson J., 2001. << projet génie agro-alimentaire, industries alimentaires et biologiques >>, [http : // www.Perso. Wanadoo. Fr / JI / GIA / index.Html](http://www.Perso.Wanadoo.Fr/JI/GIA/index.Html).
- Gauvrit C. et Cabanne F., 1993. Oils for weed control : uses and mode of action, *Pestic. Sci.*, 37, pp 147-153.
- Giordani R., Hadeif Y., Kaloustian J., 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79, pp 199-203.
- Goupy,J., 1999. Plans d'expériences pour surface de réponse, DUNOD.
- Triboulet P., 2008. Notions de bases sur les plans d'expériences.
- Guillén M. D., Manzanos M. J., 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. *plqnt. Food chemistry*. 63 (3) , pp 373-383.
- Hamer G. L., Kitron U. D., Brawn J. D., Loss S. R., Ruiz M. O., Goldberg T. L., Walker E. D., 2008. *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) : a bridge vector of West Nile virus to humans. *Journal of Medical Entomology*, janvier, 45, pp 125-128.
- Hassal K.A., 1990. The biochemistry and uses of pesticides : structure, metabolism, mode of action and uses in crop protection. VCH publ. Inc., New York, USA, pp 536.
- Hegh E., 1921. Les moustiques, moeurs et moyens de destruction. Ed. Imprim. Indust. & Financ., Bruxelles, pp 239.
- Hemwimon S., Pavasant P. et Shotiprux A., 2007. « Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Marinda Citrifolia* Separation and purification Technology». pp 44-50.
- Homburger F., Boger E., 1968. The carcinogenicity of essential oils, flavors and spices: A review. *Cancer Res.* 28, pp 2372-2374.

- Huard I., Huard D., 1999. << Les huiles essentielles et l'aromathérapies >>, éd. Québecot.
- Hudaib M., Speroni E., Pietra A. M. D., Carvin V., 2002. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. J. *Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis* 29, pp 691-700.
- Iserin P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Larousse. Londres pp 143 et 225-226.
- Ishaay I. & Horowitz A.R., 1998. Insecticides with novel mode of action : overview. In: Ishaaya I & Degheel D. (eds). Insecticides with novel mode of action-mechanism and application, Berlin: Springer.pp:1-24.
- Jacobson, 1989. The Free Social Science Summary. Strategic politicians and the dynamics of House elections, pp 1946-1986.
- Jang Y. S. Kim M. K., Ahn Y. J., Lee H. S., 2002. Larvicidal activity of Brazilian plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Agri. Chem. Biotechnology*. 45 (3), pp131-134.
- Jassim S.A., Naji M.A., 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Appl. Microbiol.* 95 (3), pp 412-27.
- Jordán M.J. , Martínez R.M. , K.L. Goodner , Baldwin E.A. , Stomayor J.A., 2006. Seasonal Variation of *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and products* 24, pp 253-263.
- Kaloustian J., El-Moselhy T. F., Portugal H., 2003. Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* 401, pp 7786.
- Kettle D.S., 1995. Medical and Veterinary Entomology, 2^o edition, Wallingford: CAB international, pp 725.
- Khenaka K., 2011. Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine. Thèse Magister: Biotechnologies Microbiennes. Constantine: Université Mentouri, pp 81.
- Kitajima J., Ishikawa T., Urabe A., Satoh M., 2004. Monoterpenoids and their glycosides from the leaf of thyme. *Phytochemistry*. 65, pp 3279-3287.
- Klowden M.J., 1990. The endogenous regulation of mosquito reproductive behavior.
- Knight, K.L. et Laffoon J.L., 1971. A mosquito taxonomic glossary. V. Abdomen (except female genitalia). *Mosq. Syst. Newslett.* 3 (1), pp 8-24.

Kulšić T., Dragović-Uzelac V., Miloš M., 2006. Antioxidant Activity of Aqueous Tea Infusions Prepared from Oregano, Thyme and Wild Thyme. *Food Technol. Biotechnol.* 44 (4), pp 485-492.

Kumar R. et Hwang J.S., 2006. Larvical efficiency of aquatic predators : a perspective for mosquito biocontrol. *Zoological Studies.* 45 (4), pp 447-466.

Kurkin V. A., 2003. *Chem. Nat. Compd.*, 39, pp 123.

Linné C., 1758. *Systema naturae per regna frivata naturae.* Edition 10. Holmia, 1: pp 82.

Mariana R. V. 2010. Diagramme montrant l'anatomie d'un moustique *Culex pipiens*

Marm Kilpatrick A., Meola M. A., Moudy R. M., Kramer L. D., 2008. Temperature, viral genetics and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathogens* [en ligne]. [cite le 04/16]. Adresse URL : <http://www.plospathogens.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000092>

Mathis W., Smith E. A., School H. F., 1970. Use of air barriers to prevent entrance of house flies, *J. Fifth Edition.* McGraw-Hill Inc, New York, pp 1094.

Messai N., Berchi S., Boulkenafed F. et Louadi K., 2012. Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera : Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Faunistic Entomology*, 63(3), pp 203-206.

Morales, R., 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the genus Thymus.* Ed. *Taylor & Francis, London.* pp 1-43.

Moreau, C.M. and Stiles, A.R., 1978. Insect chemosterilants. *WHO/vBC/78*, pp 695.

Mouchet J. et Carnevale P., 1991. Les vecteurs et la transmission : épidémiologie. Le paludisme *Ellipses U.R.E.F.*, pp 34-59.

Mouchet J., 1994. Le DDT en santé publique. *Cahier santé*, 4, pp 257-262.

Moulinier C., 2003. Parasitologie et mycologie médicales, éléments de morphologie et de biologie. Cachan : EM inter, pp 796.

Moussaoui K., Ahmed Hedjala O., Zitouni G. et Djazouli Z. (2014) Estimation de la toxicité des huiles essentielles formulés de thym et d'eucalyptus et d'un produit de synthèse sur le parasite de l'abeille tellienne *Varroa destructor*. Université de blida 1, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département de Biotechnologie/(2) Institut Technique des élevages, Route de Chebli Baba Ali

Muller M. F., 2003. << Aromathérapie >>, éd. Anne la fay, Fabienne vaslet, Hachette livre.

Naganuma M., Hirose S., Nakayama Y., Nakajima K., Someya T., 1985.
A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.* 278, pp 31-36.

OMS., 2005. Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, (Page consultée le 02/06/2015). [en ligne]. Adresse URL : www.who/cds/whopes/gcdpp/2005.13.

Özcan M., J.-C. Chalchat ., 2004. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. Growing Wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (4), pp 68-73.

Padrini F., Lucheroni M.T., 1996. le grande livre des huiles essentielles .Ed de Vecchi. pp 115.

Pariante L., 2001. Dictionnaire des sciences pharmaceutique et biologique. 2ème Ed. *Académie nationale de pharmacie. Paris*, pp 1643.

Paz S., Albersheim I., 2008. Influence of warming tendency on *Culex pipiens* population abundance and on the probability of West Nile fever outbreaks. *EcoHealth*, 5, pp 40-48.

Petit S., Gogny M., Martel J.L., Pellerin J.L., Pinault L., Pouliquen H., Puyt J.D., Vandaele E., 2009. Dictionnaire des Médicaments Vétérinaires 2009. 15ème édition. Rueil-Malmaison : Editions du Point Vétérinaire, pp 1808.

Pierrick H., 2014. *Culex pipiens* - Définition. Réalisé en collaboration avec des Polytechnique de Toulouse, pp 22-38.

Poletti A., 1988. Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. *Delachaux & Nistlé S. A. Suisse*. pp 103 et 131.

Quezel P. et Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales *Ed C.N.R.S. Tome I*. pp 565.

Rai M. K., Acharya D., Wadegaonkar P., 2003. Plant derived antimycotics: Potential of Asteraceous plants, in: *Plant-derived antimycotics: Current Trends and Future prospects*. Haworth press, N-York, Londin, Oxford, pp 165-185.

Ramos H.C., Brunhes J., 2004. Insecta, Diptera, Culicidae, Uranotaenia. Faune de Madagascar 91. Ed. IRD Édition, CIRAD, MNHN-Paris, Montpellier, pp 463.

Reddy M.V. B., Angers P., Gosselin A., Arul J., 1998. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* essential oil. *Phytochemistry*. 47 (8), pp 1515-1520.

Reinert J.F., 2000. New classification for the composite genus *Aedes* (Diptera: Culicidae: Aedini), elevation of subgenus *Ochlerotatus* to generic rank, reclassification of the other subgenera, and notes on certain subgenera and species. *J. Am. Mosquito Control Assoc* ,16, pp 175-188.

Richard H., 1992. *Épices et Aromates. Technologie et Documentation Lavoisier*. Paris, pp 339.

Rioux J-A., 1958. *Les Culicidae du "Midi" méditerranéen. Etude systématique et écologique*, Ed. Paul lechevalier, Paris: pp 301.

Rioux J.A., Golvan Y.J., Croset H., Tour S., Houin R., Abonnec E., Petitdidier.M., Volhardt Y., Dedet J.P., Albert J.L., Lanotte G., Quilici M., 1965. *Epidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France*. Paris : Ed INSERM ; Montpellier INSERM ; (37), pp 223.

Ripert C., 2007. *Epidémiologie des maladies parasitaires, tome 4, affections provoquées ou transmises par les arthropodes*. Cachan : EM inter, pp 581.

Robich R. M., Denlinger D. L., 2005. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, pp 15912-15917.

Rodhain F. et Perez C., 1985. *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Ed. Maloine S. A., Paris, pp 458.

Santa S., 1962. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales Ed C.N.R.S. Tome I*, pp 565.

Schaffner E., Angel G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaiem A. et Brunhes J., 2001. *Les moustiques d'Europe. Logiciel d'identification et d'enseignement de I. R. D.*, Montpellier, ISBN 2-7099 - 1485-9.

Seguy E., 1923. *les moustiques de France*. Ed. Paul Lechevalier, Paris, pp 225.

Seguy E., 1955. *Introduction à l'étude Biologique et Morphologique des insectes Diptères*. Ed. Muséum Nationale, Rio-de-Janeiro, pp 260.

Senevet G., Andarelli L., 1999. *Les moustiques de l'Afrique du Nord et du Bassin Méditerranéen, les genres Culex*. *Encyclopédie entomologique*, ed. Lechevalier P, Paris, pp 383.

SLIMANI S. 2002. *Contribution à l'étude de l'effet d'un fongicide « propinèbe » sur l'activité sexuelle chez les pigeons mâles (Columba livia domestica) : Etude biologique, biochimique, hormonale et histologique*. Mémoire de Magister en

Physiologie animale appliquée, option Ecotoxicologie. Département de Biologie, Université de Annaba (Directeur de recherche BOULAKOUD M.S.).

SMV et SFP., 2010. Société de médecine des voyages et Société française de parasitologie. Recommandations de bonne pratique – Texte court : « protection personnelle anti-vectorielle ou protection contre les insectes piqueurs et les tiques ».

Tayoub G., Schowb I., Masotti V., Rabier J., Ruzzier M., Viano J., 2006. Contribution de la microscopie électronique à balayage et photonique à la connaissance de l'anatomie et de la morphologie de *Styrax officinalis* L. C. R. Biologies, 329, pp 712-718.

Technology, and Applications. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of Tunisia, pp 23-181.

Thuille N., Fille M., Nagl M., 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 206, pp 217-221.

Toral Y., Caro M., 2005. Evaluation in vitro de l'efficacité du fipronil sur *Culex pipiens pipiens*. Th. : Med.Vet. : Toulouse, 099, pp 53.

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L., Dunn A.M., Jennings F.W., 1996. Veterinary parasitology. 2nd edition. Oxford: Blackwell science. pp 307.

Valnet J., 1984. Aromathérapie – Traitement des maladies par les essences de plantes. Ed. Maloine S. A . n° 10.

Vassart S., 2009. Les huiles Essentielles .Ed. I.P.I, Besancon. pp 92.

Wall R., Shearer D., 1992. Veterinary Entomology, Chapman & Hall. pp 88-191.

Wall R., Shearer D., 1997. Veterinary entomology. London : Chapman & Hall, pp 439.

W.H.O., 1984. Report of the seventh meeting of the scientific working group on biological control of vectors. Mimeogr. doc. TDR/BCV/SWG/84.3, pp 33.

W.H.O., 1992. Résistance des vecteurs aux pesticides. Quinzième rapport du Comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. Genève, (Organisation Mondiale de la Santé, Série de rapport technique ; 818).

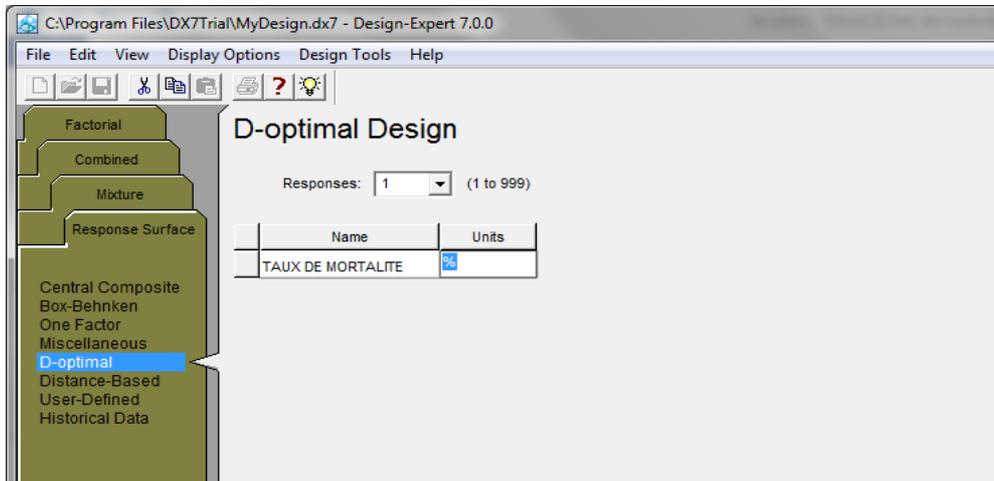
Wood, D.M., P.T. Dang and R.A. Ellis, 1979. The Mosquitoes of Canada (Diptera: Culicidae). Canadian Department of Agriculture Publication, Ottawa, Canada, pp 390.

Yahyaoui N., 2005. Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Mentha Spicata* L sur *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera,

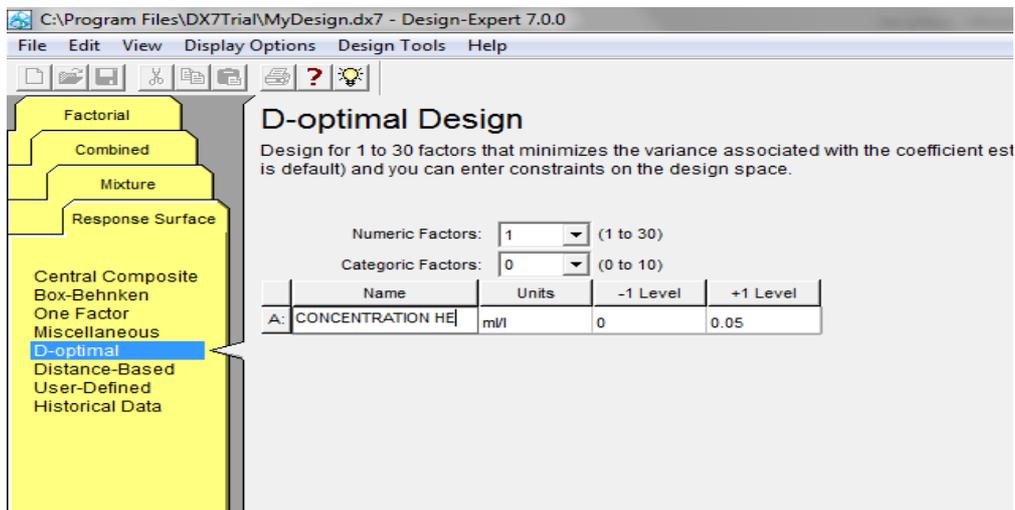
Bostrychidae) et *Tribolium confusum* (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae). Thèse de Magister en sciences agronomiques, option Ecologie, INA, El-Harrach.

Zhiri A., Baudoux D., 2005. Essentielles chémotypées et leurs synergies: a r o m a t h é r a p i e s c i e n t i f i q u e Edition Inspir Development - rue Goethe, 1 - L-1637 Luxembourg; ISBN : 2-919905-27-9.

Annexe I : Saisie de la donnée réponse dans le logiciel



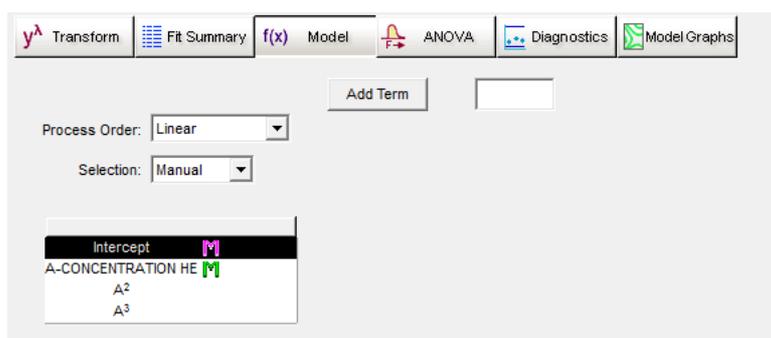
Annexe II : Saisie de la donnée facteur dans le logiciel



Annexe III : Tableau récapitulatif du plan étudié

Design Summary											
Study Type	Response Surface		Runs	13							
Initial Design	D-optimal		Coordinate Exchange	Blocks	No Blocks						
Design Model Quadratic											
Factor	Name	Units	Type	Low Actual	High Actual	Low Coded	High Coded	Mean	Std. Dev.		
A	CONCENTRATION HE	mM	Numeric	0.000	0.050	-1.000	1.000	0.025	0.019		
Response	Name	Units	Obs	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Y1	TAUX DE MORTALITE	%	13	Polynomial	0.000	85.000	40.385	33.881	N/A	None	Linear

Annexe IV : Illustration du Choix du modèle sur le logiciel



Annexe V : Des différentes statistiques pour le modèle

Std. Dev.	14.53	R-Squared	0.8445
Mean	40.38	Adj R-Squared	0.8303
C.V. %	35.97	Pred R-Squared	0.8006
PRESS	2975.00	Adeq Precision	14.216