

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Tébessa



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie
Département des êtres vivants

MEMOIRE

Présente en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

En : Sciences Biologiques

Spécialité : Santé et Environnement

**Etude préliminaire de l'effet larvicide d'une plante
du genre *Rosmarinus* à l'égard de *Culex pipiens***

Par

BERRAH Fatima

AHCENE Hadjer

Devant le jury :

Dr. BOUABIDA Hayette	MCB	Université de Tébessa	Présidente
Dr. ZEGHIB Assia	MCB	Université de Tébessa	Rapporteuse
Mlle. BELLAL Warda	MAA	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 30/05/2016

تهدف هذه الدراسة الى تجريب مفعول الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات اكليل الجبل

واسع الانتشار في ولاية تبسة *Culex pipiens* وقد تم تقييم عدة مظاهر:

المردود من الزيت : حيث تم استخلاصه بالتبخير و حساب مردوده المقدر بنسبة (1,24).

المظهر السمي : باستخراج التراكيز المميّنة للزيت المستخلص من اكليل الجبل بمساعدة برنامج

.Graph Pad Prism

المظهر قياسي: الكثير من الجوانب القياسية أخذت بعين الاعتبار:

البرقي الرابع 72 ,48 ,24

أظهرت تحاليل البيانات أن الزيت لإكليل يسبب انخفاضا في هذه المعايير مقارنة مع الشواهد

المظهر البيوكيميائي: نتائج التحاليل أظهرت في مستوى البروتيند و الغلوسيد و انخفاض في الليبد

مقارنة بالشواهد 72 ,48 ,24

المؤشرات الحيوية: عليها تبين تغييرات الإنزيمي 48 ,24 ,

72 التالية:

- زيادة النشاط الإنزيمي AChE

- الإنزيمي GST

- كمية GSH

الكلمات المفتاحية : *Rosmarinus officinalis Culex pipiens* القياس، المكونات البيوكيميائية، الزيت الاساسي، الإنزيمي.

Abstract

This study is designed to test the effect of essential oil extracted from *Rosmarinus officinalis* on *Culex pipiens*, the most abundant species of mosquito in the area of Tebessa, several aspects were determined.

Essential oil yield : For this we have done in the laboratory extraction of essential oil by steam distillation , after extraction , we calculated the performance that defined as the ratio between the mass of HE obtained and the mass of plant material processed percentage $R = (1.24 \%)$.

Toxicological aspects: Hoes established through a Graph Pad Prism 04 analysis, the lethal concentrations CL25 (60.12ppm) and CL50 (97.72ppm). The *Rosmarinus officinalis* essential oil exhibit toxicity instar fourth larvae of *Culex pipiens* with a concentration–response relationship.

Biochemical aspects: The experimentation is designed to determine the effect of *Rosmarinus officinalis* essential oils on biochemical compositions after treatment at different times (24, 48 and 72 h). The results show an increase in proteins and sugars and decrease in lipids, in treated series compared to controls.

Biomarkers: Results show a variation of enzymes at various times after treatment (24, 48 and 72 h). The *Rosmarinus officinalis* essential oil causes, on one hand, induction of GST activity and, on other hand, a significant decrease and increase in GSH and AChE rates, respectively.

Key words: *Culex Pipiens*, *Rosmarinus officinalis* essential oil, toxicity, biochemical compositions, biomarkers.

RESUME

Cette étude a été réalisée dans le but de développer une nouvelle stratégie de lutte contre les larves de *Culex pipiens*, vecteurs de maladies parasitaires, en apportant un intérêt majeur à l'utilisation des huiles essentielles de plantes comme bio-insecticide. La méthode du travail que nous avons adoptée, vise l'évaluation de l'activité larvicide de la matière végétale de *Rosmarinus officinalis* chez cette espèce de moustique de la région de Tébessa, plusieurs aspects ont été déterminés.

Rendement en huile essentielle: Pour cela nous avons effectué au laboratoire l'extraction de l'huile essentielle par l'entraînement à la vapeur, après l'extraction, nous avons calculé le rendement qui a défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité exprimé en pourcentage $R = (1.24 \%)$.

Aspect toxicologique : a permis d'établir, grâce à une analyse de logiciel Graph Pad Prism 04, les concentrations létales CL₂₅ (60,12ppm) et CL₅₀ (97,72ppm). L'huile essentielle extraite de *Rosmarinus officinalis* manifeste une toxicité à l'égard des larves de quatrième stade chez *Culex pipiens*, avec une relation concentration-réponse.

Aspect morphométrique : plusieurs paramètres morphométriques ont été considérés ; la largeur du thorax, le poids et le volume corporel des individus du stade larvaire 4 de *Culex pipiens*. L'analyse des données montre que le *R. officinalis* provoque une réduction de ces paramètres par rapport aux témoins.

Aspect biochimique : les résultats obtenus révèlent une variation des compositions biochimiques après traitement à différentes périodes (24, 48, 72 heures). Elles montrent une augmentation des protéines et glucides et une diminution des lipides chez les séries traitées par rapport aux témoins.

Biomarqueurs : les résultats obtenus révèlent une variation des biomarqueurs après traitement à différentes périodes (24, 48, 72 heures). L'huile essentielle provoque une induction de l'activité de la GST, une diminution significative du taux de la GSH et une augmentation du taux de l'AChE.

Mots clés : *Culex pipiens*, *Rosmarinus officinalis*, huile essentielle, toxicité, compositions biochimiques, biomarqueurs.



Dédicace

A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

*A ma mère, ma plus grande supportrice pour son amour, son réconfort
et ses prières.*

A mon amie et mon binôme Hadjer.

A mes sœurs : Abla et sa marie, Mounia, et Aouatef

A mon frère Yacine qui représente pour moi le pilier de tous mes efforts

Et a sa femme Amina

A mes amies intimes Ahlem, Chichou

A tous mes amis et collègues

A tout le groupe de ma promotion

A toute la promotion de master II spécialement promotion de biochimie

*La réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible, sans
la contribution de toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont
supporté, encouragé et aidé d'une manière ou d'une autre. Merci à
toutes et à tous.*

Fatima

Remerciements

Un grand merci à Dieu pour nous avoir donné tant de patience pour pouvoir continuer malgré les obstacles et les embûches.

*Ce travail a été effectué au laboratoire de molécules bioactives et applications de l'université de Tebessa, nous remercions vivement **M^{me} BOUABIDA Hayette** pour d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous tenons tout particulièrement à exprimer nos plus vifs remerciements et notre profonde gratitude à **M^{me} ZEGHIB Assia**, docteur à l'université de Tebessa, qui nous a fait l'honneur d'assurer notre encadrement et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de ce travail.*

*Nous remercions notre Co-promotrice **M^{me} TINE- DJEBBAR Fouzia** de son aide durant la réalisation de notre travail, pour leur accueil, leur sympathie ainsi que leurs idées constructives*

*Notre plus profonde gratitude au **M^{elle} BELLAL Warda** pour l'immense privilège qu'elle nous a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

Un grand merci pour tous ceux qui ont participé de près ou de loin de la réalisation de ce mémoire, qu'ils trouvent ici l'expression de toute notre gratitude.

N°	Titre	Pages
01	La position systématique de <i>Culex pipiens</i> Linné (1857)	05
02	Position systématique de <i>Rosmarinus officinalis</i>	10
03	Dosage des protéines totales chez les larves de quatrième stade de <i>Culex pipiens</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage	15
04	Dosage des lipides totaux chez les larves de quatrième stade de <i>Culex pipiens</i> :réalisation de la gamme d'étalonnage	16
05	Dosage des glucides totaux chez les larves de quatrième stade de <i>Culex pipiens</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage	17
06	Effet des huiles essentielles extraites de (ppm) appliquées sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures ($m \pm \text{sem}$, $n=10$ répétitions comportant chacune 20 individus).	26
07	Efficacité de l'huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , à 24h analyse des probits.	26
08	Effet de l'huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 48 heures ($m \pm \text{sem}$, $n=10$ répétitions comportant chacune 20 individus).	27
09	Efficacité de l'huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 48h, analyse des probits	27
10	Effet de l'huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 72 heures ($m \pm \text{sem}$, $n=10$ répétitions comportant chacune 20 individus).	28

11	Efficacité de l'huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 72h, analyse des probits.	28
12	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg) des larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$; $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres	29
13	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> , à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	31
14	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50) sur le volume corporel (mm^3) des larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres	32
15	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur le contenu en protéines ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx. pipiens</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	34
16	Effet de l'huile essentielle de <i>R.officinalis</i> (CL50 et CL25), sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de <i>Culex pipiens</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	36

17	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> , sur le contenu en glucides ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de <i>Culex pipiens</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	39
18	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50), sur le taux de la GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de <i>Culex pipiens</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	41
19	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de <i>Culex pipiens</i> ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries	42
20	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$; $n= 3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	44

N°	Titre	pages
01	Œufs de <i>Culex pipiens</i>	06
02	Stade larvaire du <i>Culex pipiens</i>	07
03	Nymphe de <i>Culex pipiens</i>	08
04	Stade adulte de <i>Culex pipiens</i>	08
05	Les sites d'élevage des moustiques	09
06	Localisation géographique de la zone d'étude (Djebel Belkif .wilaya de Tèbessa)	11
07	Montage de l'hydrodistillateur de type CLEVANGER	13
08	Les étapes d'extraction d'huile essentielle	13
09	Teste de sensibilité réalisé sur les larves de moustiques L4	14
10	Extraction des métabolites	18
11	Dosage des biomarqueurs	23
12	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50), sur le poids (mg/ individu) chez les larves du quatrième stade (L4) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative entre les séries témoins et traitées.*Différence significative ($p<0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées.	30
13	Effet d'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50), sur la largeur de thorax (mg/ individu) chez les larves du quatrième stade (L4) à différentes périodes (24,48 et 72 h) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$).Comparaison des moyennes**Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, *** Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées	31
14	Effet d'huile essentielle de <i>R.officinalis</i> (CL25 et CL50), sur le volume corporelle (mm^3 / individu) chez les larves du quatrième stade (L4) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$).Comparaison des moyennes : **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, ***Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées	33

15	Dosage des protéines totales chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg) (R^2 : coefficient de détermination).	34
16	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> , à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0,05$), **Différence hautement significative ($p<0,01$).	35
17	Dosage des lipides totaux chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (μg) (R^2 : coefficient de détermination).	36
18	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL50 et CL25), sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) de <i>Culex pipiens</i> à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : *Différence significative ($p<0,05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées.	37
19	Dosage des glucides totaux chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (μg) (R^2 : coefficient de détermination).	38
20	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> (CL50 et CL25) sur le contenu en glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) de <i>Culex pipiens</i> à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0,05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, *** Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.	39

21	Effets de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> , sur le taux du GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées.	41
22	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> , sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.	43
23	Effet de l'huile essentielle de <i>R. officinalis</i> , sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$; $n= 3$). Comparaison des moyennes ** Différence significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, *** Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.	45

Abréviations

(°C)	Degré Celsius
(%)	Pourcentage
(<)	Inférieur
(>)	Supérieur
(sem)	Ecart moyen
microlitre	Microgramme
μM	Micromolaire
μM /min/mg	Micromoles par minutes et par milligramme
l	litre
L4	Larve de stade 4
M	Molaire
mg	Milligramme
ml	Millilitr
min	Minute
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
p	Coefficient de signification
ppm	Partie par million
pH	Potentiel hydrogène
R²	Coefficient de détermination
l	Litre
mM	Millimolaire
R	Rendement
m	Moyenne
n	Nombre de répétitions
trs	Tours
Vh	Volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation
Vs	Volume de surnageant dans la cuve
Vd	Volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation

Vh	Volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation
I C	Intervalle de confiance
HE	Huile Essentielle
h	Heure
g	Gramme
Gr	Grossissement
DTNB	5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
EDTA	Acide d'éthylènediaminetétraacétique
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
CL25	Concentration létale de 25% de la population
CL50	Concentration Létale de 50% de la population
CL90	Concentration Létale de 90% de la population
<i>R. officinalis</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
<i>Cx. pipiens</i>	<i>Culex pipiens</i>
(nmol/L)	Nano Mol Par Litre
(ng/ml)	Nano Gramme Par Millilitre
(CYP P450)	Cytochromes P450
(GSH)	Le glutathion réduit
(-SH)	sulfhydryle
(TCA)	Acide Trichloracétique
(SSA)	Sulfosalicylique
(DO)	Densité Optique
(TP)	Tampon Phosphate
(DO)	Variation De La Densité Optique Par Minutes En Fonction Du Temps
p	signification
	Seuil de signification
	Longueur d'onde
μmol	Micro-mol
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
BBC	Bleu brillant de comassie
GST	glutathion S-transférase

Abstract	
Résumé	
Dédicace	
Remerciement	
Liste des tableaux	
List des figures	
Liste des abréviations	
Tables des matières	
I. Introduction.....	01
II. Matériel et Méthodes.....	05
II.1. Présentation de l’insecte	05
II.2. Présentation de l’insecte	09
II.3. Présentation de la plante.....	10
II.4. Extraction de l’huile essentielle et traitement.....	11
II.5. Test de toxicité	14
II.6. Etude morphométrie.....	14
II.7. Extraction et dosage des principaux constituants biochimiques.....	15
II.7.1. Dosage des protéines totales.....	15
II.7.2. Dosage des lipides totaux.....	16
II.7.3. Dosage des glucides totaux.....	16
II.8. Dosage des biomarqueurs.....	19
II.8.1. Dosage du glutathion(GSH).....	19
II.8.2. Dosage des glutathion S-transférases.....	20
II.8.3. Dosage de l’activité de l’acétylcholinestérase.....	21
II.9. Analyse statistique.....	22

III. Résultats.....	25
III.1. Rendement en huile essentielle.....	25
III.2. Essais toxicologiques.....	25
III.2.1. Toxicologie de l’huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> à l’égard de <i>Culex pipiens</i> à 24 heures.....	25
III.2.2. Toxicologie de l’huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> à l’égard de <i>Culex pipiens</i> à 48 heures.....	27
III.2.3. Toxicologie de l’huile essentielle extraite de <i>R. officinalis</i> à l’égard de <i>Culex pipiens</i> à 72heures.....	28
III.3. Effet sur la croissance pondérale.....	29
III.4. Effet sur la croissance linéaire.....	30
III.4.1. Largeur de thorax	30
III.4.2. Effet sur le volume corporel.....	32
III.5. Effet sur la composition biochimique.....	32
III.5.1. Contenu en protéines totales.....	33
III.5.2. Contenu en lipides totaux.....	35
III.5.3. Contenu en glucides totaux.....	37
III.6. Effet sur les biomarqueurs	40
III.6.1. Effet sur le taux de la GSH.....	40
III.6.2. Effet sur l’activité spécifique de la GST	42
III.6.3. Effet sur l’activité spécifique de l’acétylcholinestérase.....	43
IV. Discussion.....	47
IV.1. Rendement en huile essentielle.....	47
IV.2. Toxicologie de l’huile essentielle de <i>R. officinalis</i>	47
IV.3. Effet de l’huile essentielle sur la croissance	48

IV.4. Effet de l’huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur les compositions	51
biochimiques.....	51
IV.4.1. Effet de l’huile essentielle sur le contenu en protéines totales.....	51
IV.4.2. Effet de l’huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur les lipides totaux.....	53
IV.4.3. Effet de l’huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur les glucides totaux.....	54
IV.5. Effet de l’huile essentielle de <i>R. officinalis</i> sur les biomarqueurs.....	55
IV.5.1. Effet sur l’activité spécifique de GSH.....	55
IV.5.2. Effet sur l’activité spécifique de la GST.....	56
IV.5.3. Effet sur le taux de la l’AChE	57
Conclusion et perspective.....	60
Références bibliographiques.....	62

I. INTRODUCTION

Les invertébrés, représentent plus de 95% des espèces du règne animal (**Wilson et al, 1999**), sont présents presque dans tous les types d'écosystèmes et constituent une part très importante de la biodiversité des milieux terrestres et aquatiques. Les Arthropodes sont l'un d'embranchements des invertébrés les plus importants, avec plus d'un million d'espèces connues, dont les trois quarts de ces espèces appartenant à la classe des insectes (**Gourmelon & Ahtiainen, 2007**).

A ce jour, 3530 espèces de moustiques sont décrites au niveau mondial (**Becker et al, 2003**). Les moustiques ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'Homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies. Les femelles en période de reproduction ont besoin de sang pour le développement des œufs et certaines espèces ont une préférence marquée pour le sang humain. Parmi les espèces connues dans la transmission des maladies à l'Homme, nous citons celles appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Les espèces du genre *Culex* transmettent des maladies parasitaires telles la filariose et la fièvre jaune (**Alaoui Slimani et al, 1999**).

En Algérie, *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata* sont considérés parmi les espèces les plus abondantes et sont d'une grande importance médicale et vétérinaire (**Gomes et al, 2009**). Pour lutter activement contre les Culicidaees, plusieurs méthodes ont été entreprises dans le monde, comprenant la lutte chimique et la lutte biologique (**Berliner, 1915**).

Les moustiques sont généralement contrôlés par des insecticides conventionnels (les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoides de synthèse), qui ont eu à long terme des effets secondaires (accumulation de résidus dans la chaîne alimentaire, effets sur les organismes non visés...). La lutte chimique continue à être le moyen majeur de contrôle de ces vecteurs (**Casida & Quistad, 1998**). Cependant, en dehors de leur neurotoxicité, les produits chimiques utilisés sont devenus moins efficaces du fait de la résistance développée par certaines espèces de moustiques et insectes en général (**Rodriguez et al, 2002; Konan et al. 2003; Díaz et al, 2007; Asidi et al, 2012**).

Toutes ces raisons ont poussées les chercheurs de proposer d'autres alternatives plus sélectifs qui ne présentent aucun effet toxique pour les organismes non visés. L'apparition de la méthode biologique, celle-ci a fait l'objet d'une nouvelle lutte, plus sûre, plus sélective et biodégradable et induit des effets toxiques contre différentes espèces de Diptères. Elle est présentée par

l'utilisation des poissons larvivores (**Bendali et al, 2001**), des biopesticides botaniques tels que le spinosad, Azadirachtin, les huiles essentielles et des extraits végétaux (**Pavela, 2009; Rehim et al., 2011; Arya et al., 2011; Zoubiri & Baaliouamer, 2011; Maiza et al., 2013**).

Ainsi plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées. Les espèces de la famille de *Meliaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae* et *Canellaceae* sont les principales familles les plus prometteuses comme source de bioinsecticides (**Benayad, 2008**). Parmi plusieurs huiles essentielles, celles de la famille des *Lamiaceae* ont reçu une attention considérable dans la recherche des produits naturels pour lutter contre les insectes (**Benayad, 2008**).

Le romarin (*Rosmarinus Officinalis*) fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Labiées*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**Atik bekkara et al, 2007**). Les extraits des huiles essentielles de cette plante sont largement utilisés. (**Hostettmann ,1997**).

Depuis 2006, de nombreuses études ont été réalisées sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide. La plupart de ces études ont mis en évidence un effet larvicide et/ou répulsif sur les moustiques, et notamment les *Culicidés* (**Bastien, 2008**).

Dans cette perspective, les recherches envisagées visent à évaluer les réponses des populations d'une espèce de moustique, *Culex pipiens*, la plus répandue dans la région de Tébessa (**Tine-Djebbar, 2009**) à l'impact d'un nouvel insecticide à base d'huile essentielle d'une espèce de romarin, *Rosmarinus officinalis* sur :

1. L'aspect toxicologique pour déterminer les concentrations létales CL25 (concentrations létales de 25% de la population) et CL50 (concentrations létales de 50% de la population) de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinallis* à l'égard des larves du quatrième stade nouvellement exuvies de *Culex pipiens*.
2. L'aspect morphométrique des individus du stade larvaire 4 témoins et traités à la CL25 et la CL50, tel que le poids, la largeur du thorax et le volume corporel.
3. La composition biochimique des individus du stade larvaire 4 par la détermination du contenu en protéines, lipides et glucides à différentes périodes (24, 48 et 72h) après traitement.

4. Les biomarqueurs de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE) et de détoxification, la glutathion-S-transférase (GST) et son cofacteur, le glutathion réduit (GSH).

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Présentation de l'insecte *Culex pipiens*

Le matériel biologique est représenté par l'espèce de moustique la plus abondante dans les zones urbaines, *Culex pipiens*, c'est un moustique capable de coloniser différents biotopes, (Savage & Miller, 1995). *Culex pipiens* capable de se développer dans toutes les régions du globe, excepte celles où il règne de trop froid (Resseguier, 2011). Il est actif pendant toute l'année et atteint son maximum de développement pendant les saisons chaudes. Il se développe aussi bien dans les milieux dulçaquicoles, naturels (fosses, mares, flaques d'eau) ou artificiels (bassins, réservoirs, récipients, vieux pneus remplis d'eau de pluie, situés en général à proximité des habitations) (Moulinier, 2003 ; Faraj *et al.*, 2006).

Les moustiques appartiennent à la classe des insectes, à l'ordre des diptères et à la famille des Culicidés. Les moustiques sont cosmopolites et sont groupés en deux sous-familles, *Culicinae* et *Anophelinae* (Trari *et al.*, 2002).

Les diptères du genre *Culex* sont des agents nuisants et des vecteurs compétents pour plusieurs agents pathogènes affectant l'Homme et les animaux, tel est le cas du virus du Nil occidental et de la fièvre de la Vallée du Rift (Moutailler *et al.*, 2008; Kridaet *et al.*, 2011; Reusken *et al.*, 2011).

Position systématique

Tab. 01 : La position systématique de *Culex pipiens* Linné (1857)

<i>Règne</i>	<i>Animalia</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Arthropoda</i>
<i>Classe</i>	<i>Insecta</i>
<i>Ordre</i>	<i>Diptera</i>
<i>Famille</i>	<i>Culicidae</i>
<i>Genre</i>	<i>Culex</i>
<i>Espèce</i>	<i>Culex pipiens</i>

Morphologie

Les Culicidaes, auxquels appartient le complexe *Culex pipiens*, sont des insectes à métamorphose complète (Holométaboles) de sorte que les trois stades de développement (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**).

Cycle biologique

La vie du moustique passe par plusieurs stades : oeufs, larves et nymphes qui sont aquatique et l'adulte qui a une vie aérienne (**Jolivet, 1980**).

La ponte des œufs

Les oeufs sont pondus en « radeaux » de couleur noire facilement visibles à l'oeil nu, directement sur la surface de l'eau, ils sont détruits très rapidement en cas d'assèchement. Les *Culex*, forment des nacelles plus ou moins régulières où chaque œuf, 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 oeufs pour obtenir cette formation (**Callot et Helluy, 1958**).

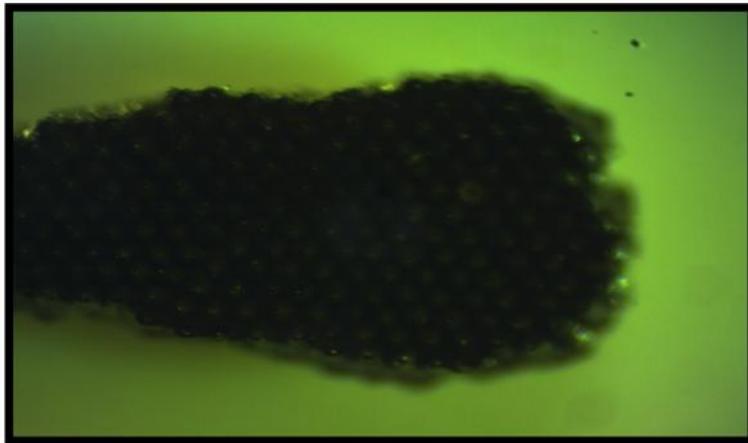


Figure 01 : Œufs de *Culex pipiens*.

Stade larvaire

La vie du moustique au stade larvaire est inférieure à 10 jours : l'évolution de la larve s'accomplit en 4 stades de développement L1, L2, L3 et L4, séparés par une mue lui permet de passer d'environ 2 à 12 mm. Les larves sont mobiles et respirent à la surface de l'eau, par l'intermédiaire d'un siphon respiratoire situé à l'extrémité de l'abdomen. Elles se déplacent par saccades et se nourrissent de divers micro-organismes (particules végétales, bactérie et levures) (Urquhart *et al*, 1996 ; Andreo, 2003).

Le corps de la larve des Culicidae est divisé en trois parties principales : la capsule céphalique complètement sclérifiée, le thorax aplati composé de trois segments fusionnés (bien plus large que les deux autres parties) et l'abdomen qui se compose de dix segments (D'après Forattini (1996) in Becker *et al*, 2003).



Figure 02 : stade larvaire de *Culex pipiens*.

Stade nymphal

Le stade nymphal est un stade de transition au métabolisme extrêmement actif, au cours duquel l'insecte subit de très profondes transformations morphologiques et physiologiques (Alayat, 2012). Mobile mais ne s'alimente pas durant toute la durée de ce stade, qui varie entre 2 à 5 jours. Elle prélève l'air atmosphérique grâce à deux trompettes respiratoires situées sur le céphalothorax (Urquhart *et al*, 1996 ; Cachareul, 1997 ; Wall & Shearer, 1997). Son corps est constitué de 2 parties : un large céphalothorax (antennes, trompe, pattes et ailes) et l'abdomen est sous forme d'une queue permettant de distinguer les sexes. Chez les femelles la queue est plus courte (Guitsevitch *et al*, 1974 ; Rhodain & Perz, 1985).



Figure 03: Nympe de *Culex pipiens* (Moulinier, 2003)

Stade adulte

L'adulte, une fois métamorphosé, provoque une cassure au niveau de la tête nymphale et émerge à la surface de l'eau (Clements, 1999). Possèdent une seule paire d'ailes membraneuses longues et étroites, pourvues d'écailles le long de ses nervures, repliées horizontalement au repos. La deuxième paire est réduite à une paire de balanciers (Harbach, 2007). Ils possèdent un corps mince qui se divise en trois parties : la tête, le thorax, l'abdomen, de taille moyenne environ 9 mm, globalement brun clair, et des pattes longues et fines (Wolfgang & Werner, 1988 ; Balenghien, 2007). Avec des bandes antérieures claires sur les tergites abdominaux (Balenghien, 2007).



Figure 04 : Stade adulte de *Culex pipiens*.

II.2. Technique d'élevage a l'état larvaire

Les œufs et les larves de moustiques sont récoltés à partir de deux sites d'échantillonnages : la résidence 1000(2) de la région de l'université Larbi Tèbessi (ville de Tébessa) et le village de Boulehaf eddire. Les larves sont élevées au laboratoire dans des récipients en plastique contenant 150 ml d'eau déchlorurée à une température ambiante et nourries avec 0,04 g du mélange biscuit 75% - levure 25% (Soltani&Rehimi, 1999). L'eau est renouvelée chaque jour (Wigglesworth, 1972). Lorsque les larves atteignent le stade nymphal, elles sont placées dans des récipients et déposées dans des cages où elles se transformeront en adulte qui se nourrit de raisin sec et de datte.



Figure 05 : Les sites d'élevage des moustiques.

II.3. Présentation de la plante

Description botanique

Rosmarinus officinalis appartient à la famille botanique des *Lamiacées* au sein du genre *Rosmarinus*. C'est un arbrisseau toujours vert de 0,5 à 2 m. La tige ligneuse est couverte d'une écorce grisâtre et se divise en de nombreux rameaux opposés (Chafai Elalaoui Ali *et al*, 2014). Les feuilles sont étroitement lancéolées linéaires, faibles et coriaces, les fleurs d'une bleue pale, maculées intérieurement de violet, sont disposées en courtes grappes denses, s'épanouissent presque tout au long de l'année (Atik bekkara *et al*, 2007 et Gonzalez-trujano *et al*, 2007). Le fruit a une forme ovoïde, entouré par un calice brun et persistant. L'inflorescence et le calice ont une pilosité très courte ; l'inflorescence est en épis très courts et les bractées mesurent 1 à 2mm (Chafai Elalaoui Ali *et al*, 2014).

Originaire des régions méditerranéennes, le romarin pousse spontanément dans le sud de l'Europe. On le cultive dans le monde entier à partir de semi ou de boutures au printemps (Iserin *et al*, 2007). Il apprécie les climats chauds ou modérément secs (Paul, 1996). Son écorce s'écaille sur les branches les plus âgées et son odeur est extrêmement odorante et tenace (Delille, 2007).

Origine du nom : le mot romarin (*Rosmarinus*) dérive du latin

«Ros» : rosée

«Marinus» : marin ou de marin

Position systématique

Tab.02 : position systématique de *Rosmarinus officinalis* (Quezel et santa, 1963).

<i>Règne</i>	<i>Plantes</i>
<i>Embranchement</i>	<i>Spermaphytes</i>
<i>Classe</i>	<i>Dicotylédones</i>
<i>Ordre</i>	<i>Lamiales</i>
<i>Famille</i>	<i>Lamiaceae</i>
<i>Genre</i>	<i>Rosmarinus</i>
<i>Espèce</i> :	<i>Rosmarinus officinalis</i> L

II.4. Extraction de l'huile essentielle et traitement

Matière végétale :

Elle est constituée de la plante *Rosmarinus officinalis*, collectée au niveau de la région de Djebel Belkif wilaya de Tébessa.

Détermination de l'origine géographique

Les échantillons de la plante ont été prélevés à partir d'un site de Djebel Belkif à 35°33'28" Nord et 7° 59'2" Est. Le site fait partie de la wilaya de Tébessa qui appartient à un milieu tempéré.



Figure 06 : Localisation géographique de la zone d'étude (Djebel Belkif, wilaya de Tébessa)

Protocole d'extraction

Notre étude porte sur la partie aérienne de *Rosmarinus officinalis* (Tiges et feuilles). L'extraction de l'huile essentielle de cette plante a été effectuée par hydrodistillation, dans un appareil de type Clevenger, au sein du laboratoire des Molecules Bioactives et Applications Université de Larbi Tèbessi TEBESSA. A chaque fois, nous prenons la plante sèche de *Romarin* avec l'eau distillée (100g de matériel végétal / 1500 ml d'eau distillée) introduits dans un ballon de deux litres, l'ensemble est porté à ébullition pendant 3 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversant un réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Ensuite, l'huile est récupérée dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement (Mawussi, 2008 ; Tchoumboungang et al, 2009 ; Bouguerra, 2012).

Rendement

Le rendement de l'HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'HE obtenue et la masse du matériel végétal traité (AFNOR, 1986). Le rendement est exprimé en pourcentage :

$$R = P_B / P_A \times 100$$

Ou

$$R = [P_B / P_A] \times 100$$

R : Rendement en huile en %

P_A : Poids de la matière sèche de la plante en g.

P_B : Poids de l'huile en g.



Figure 07 : Montage de l'hydrodistillateur de type CLEVINGER.

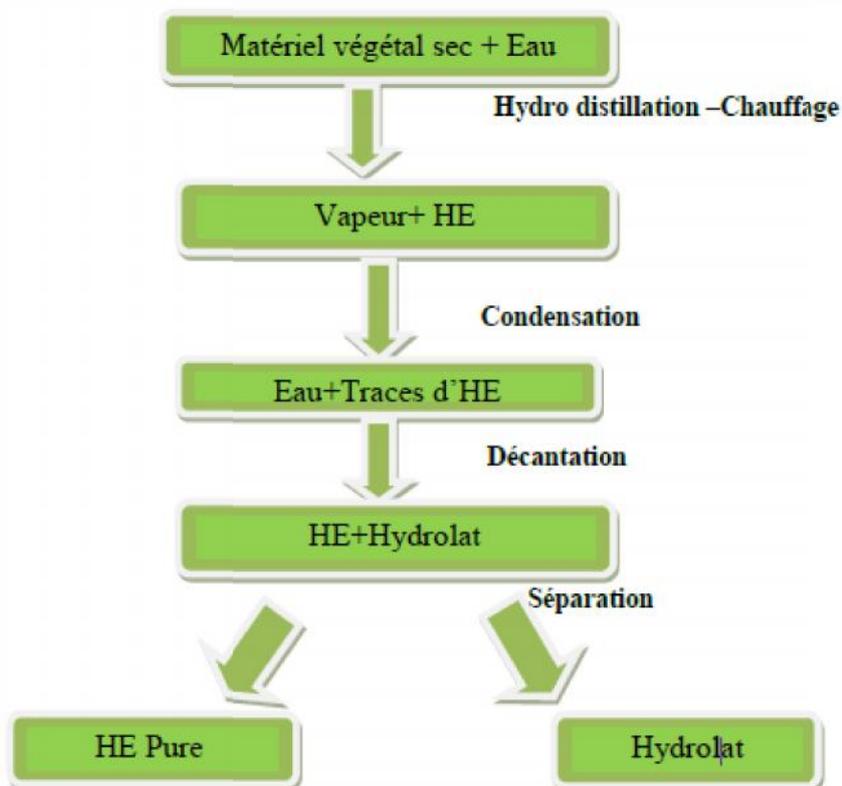


Figure 08 : Les étapes d'extraction de l'huile essentielle.

II.5. Test de toxicité

Nous avons préparé une solution stock à 52500ppm d'huile essentielle dans l'éthanol et par une série de dilutions, nous avons obtenu la gamme des solutions suivantes : 25, 50, 100, 150, 200, 300 et 350 ppm. 1mL de chaque solution préparée est mis dans des récipients contenant 150 mL d'eau déchlorurée en contact avec 20 larves du stade 4 de *Culex pipiens*. Le même nombre de larves a été placé dans des récipients témoin contenant 150 mL d'eau déchlorurée. Dix répétitions ont été réalisées pour chaque dilution ainsi que pour le témoin. Nous avons dénombré les larves mortes et vivantes après 24, 48,72 h de contact avec l'HE de *R.officinalis*.



Figure 09 : Teste de sensibilité réalisé sur les larves de moustiques L4

II.6. Etude morphométrique

Le volume corporel des larves des séries témoins et traitées, a été déterminé à partir de la valeur cubique de la largeur du thorax et celui des adultes mâles et femelles calculé à partir de la valeur cubique de la longueur des ailes (Timmermann, 1998). Le volume corporel a une influence sur le volume du repas sanguin et le nombre d'œufs matures produits (Van Den Heuvel, 1963).

II.7. Extraction et dosage des principaux constituants biochimiques

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon **Shibko *et al*, (1966)**. Les échantillons sont placés dans des tubes eppendorf contenant 1 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons. Après une première centrifugation (5000 trs / min à 4°C, 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de **Duchateau & Florkin (1959)**. Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (**Goldworthy *et al*, 1972**) et le culot II, dissout dans la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon **Bradford (1976)**.

II.7.1 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de **Bradford (1976)** dans une fraction aliquote de 100 mL à laquelle on ajoute 4 mL de réactif du bleu brillant de commassie (BBC) G 250 (Merck). La solution de BBC, se prépare comme suit : On homogénéise 100 mg de BBC, dans 50 mL d'éthanol 95°, on y ajoute ensuite 100 mL d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 1000 mL avec l'eau distillée. La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à 4 °C. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf (Sigma) titrant 1 mg/mL (**Tableau 03**).

Tab.03 : Dosage des protéines totales chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens*: réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100

II.7.2. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de **Goldsworthy et al, (1972)** utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 mL des extraits lipidiques ou de gamme étalon aux quelles on évapore totalement le solvant, puis on ajoute 1mL d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, on prend 200 mL de ce mélange au quel on ajoute 2,5 mL de réactif sulfophosphovanillinique. Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. Le réactif est préparé comme suit : Dissoudre 0,38 g de vanilline dans 55 mL d'eau distillée et ajouter 195 mL d'acide orthophosphorique à 85%. Ce réactif se conserve pendant 3 semaines à 4 °C et à l'obscurité. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf on ajoute 1 mL d'éther chloroforme (1V/1V).

Tab. 04 : Dosage des lipides totaux chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens*: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther /chloroforme) (1V/1V)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (µg)	0	50	100	150	200	250

II.7.3. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon **Duchateau & Florkin (1959)**. Elle consiste à additionner 100 mL du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 mL du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon. La lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La préparation du réactif d'anthrone se fait comme suit : peser 150 mg d'anthrone, ajouter 75 mL d'acide sulfurique concentré et 25 mL d'eau distillée. On obtient une solution limpide de couleur verte qui est stockée à l'obscurité.

La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/mL).

Tab. 05: Dosage des glucides totaux chez les larves de quatrièm stade de *Culex pipiens*: réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (μl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (μl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantite de glucose (μg)	0	20	40	60	80	100

II.8. Dosage des biomarqueurs

Les larves du quatrième stade des séries témoins et traitées ont été utilisés pour le dosage de l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE), des glutathion S-transférases (GST) et du taux du glutathion (GSH).

Tous les dosages ont été menés sur des échantillons biologiques prélevés à 24, 48 et 72 heures après traitement avec l'huile essentielle de *R.officinalis* à deux concentrations 60.12ppm et 97.72ppm correspondant à la CL25 et la CL50. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée suivant la méthode de **Bradford**, afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques et le taux du glutathion. Des séries témoins sont réalisées parallèlement.

II.8.1 Dosage du glutathion (GSH)

- **Principe**

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de **Weckbecker et Cory (1988)**. Le principe de ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance optique de l'acide 2-nitro-5-mercaturique. Ce dernier résulte de la réduction de l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman, DTNB) par les groupements (-SH) du glutathion.

Pour cela une déprotéinisation de l'homogénat est indispensable afin de garder uniquement les groupements thiol spécifiques du glutathion.

Mode opératoire

Les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'huile essentielle de *R. officinalis* à une concentration de 60.12ppm et 97.72ppm correspondant à la CL25 et CL50, sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures), puis pesées. Elles sont, ensuite, homogénéisées dans une solution d'EDTA (0,02 M) [7.448 g EDTA, 1000 mL eau distillée] à raison de 0,8 mL par 200 mg de poids. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus, avec une série témoin. Le surnageant est récupéré et utilisé comme source d'enzyme. L'homogénat, ainsi, obtenu est centrifugé (13000 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité de GSH.

- Prélever 0,8 mL de l'homogénat.
- Déprotéiniser en ajoutant 0,2 mL d'une solution d'acide sulfosalicylique (SSA) 0,25%.
- Agiter le mélange et laisser pendant 15 min dans un bain de glace.
- Centrifuger à 1000 tours/min pendant 5 min.
- Prélever 0,5 mL du surnageant.

- Ajouter 1mL du tampon Tris + EDTA (0,02 M d'EDTA), pH 9,6.
- Mélanger et ajouter 0,025 mL de DTNB à 0,01 M (dissous dans le méthanol absolu).
- Laisser pendant 5 min à température ambiante pour la stabilisation de la couleur qui se développe instantanément.
- Lire les densités optiques à 412 nm contre le blanc.

Calcul de la concentration : la concentration du glutathion est obtenue par la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_0}{13,1} * \frac{Vd}{Vh} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (μM / mg de protéines).

Do : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH) ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 mL [0,2 mL ASS + 0,8 mL homogénat].

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 mL.

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 mL [0,5 mL surnageant + 1 mL tris / EDTA + 0,025 mL DTNB].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 mL.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

II.8.2. Dosage des glutathion S-transférases

Principe

La mesure de l'activité des GST a été réalisée par la méthode de **Habig *et al*, (1974)**. Celle-ci consiste à fournir à l'enzyme un substrat, en général, du 1-chloro, 2,4-dinitrobenzène (CDNB), qui se conjugue facilement avec le glutathion sous l'action de nombreuses formes de GST. La réaction de conjugaison de ces deux produits, entraîne la formation d'une molécule nouvelle qui absorbe la lumière à 340 nm de longueur d'onde.

Mode opératoire

Les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'huile essentielle de *R.officinalis* à une concentration de 60.12ppm et 97.72ppm correspondant à la CL25 et CL50, sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures), pesées puis broyées dans 1 mL de tampon phosphate de sodium (0,1 M, pH 6). L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec une série témoin.

L'homogénat, ainsi obtenu, est centrifugé (13000 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité des GSTs.

La méthode utilisée dans cette étude consiste à faire agir les GSTs contenues dans la culture sur un mélange (GSH+CDNB) à une température de 37°C et à un pH de 6. La variation de la densité optique, due à l'apparition du complexe GSH-CDNB, est mesurée pendant 15 secondes durant 1 minute à une longueur d'onde de 340 nm, selon les étapes suivantes:

- Les échantillons sont homogénéisés dans 1mL de TP (0,1M, pH=6) :
- Centrifugation à 14000 tours/min pendant 30min.
- Récupération de surnageant comme source d'enzyme.
- On prélève 200µL de surnageant et on ajoute 1,2 mL du mélange CDNB (1mM), GSH (5mM).
- Le blanc contenant 200µL d'eau distillé remplaçant la quantité de surnageant.
-

Calcul de l'activité enzymatique de la GST : l'activité enzymatique de la GST est obtenue par la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta D_{0/m}}{9.6} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : millimoles de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (mM/min/mg de protéines).

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

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM⁻¹ cm⁻¹).

Vt : volume total dans la cuve : 1,4 mL [0,2 mL surnageant + 1,2 mL du mélange CDNB/GSH].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 mL.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

II.8.3. Dosage de l'activité Activité de l'acétylcholinestérase

Principe

Le dosage de l'activité AChE est réalisé selon la méthode d'**Ellman *et al*, (1961)**. L'acétylcholinestérase est une enzyme très courante chez les animaux, elle catalyse la réaction d'hydrolyse de l'acétylcholine en choline et acide éthanoïque (acétique).

Mode opératoire

Les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'huile essentielle de *R. officinalis* à une concentration de 6012ppm et 97.72ppm correspondant à la CL25 et CL50, sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures), puis pesées. Elles sont, ensuite, homogénéisées dans 1mL de la solution détergente D [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, -aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1mL Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 mL tampon tris (10 mM, pH 7)] qui solubilise les membranes. Après centrifugation (5000 trs/ min pendant 5 min), le surnageant est récupéré et servira comme source d'enzyme. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant 20 individus chacune, avec une série témoin.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé selon la méthode d'**Ellman *et al*, (1961)** sur une fraction aliquote de 100 µL à laquelle on ajoute 100 µL de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO₃HNa (bicarbonate de sodium), 1 mL tampon tris (0,1 M, pH 7)] et 1 mL de tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 µL de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 mL eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 min pendant 20 minutes à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 µL de solution détergente remplace les 100 µL de surnageant.

$$X = \frac{\Delta D_{0/mn}}{1.36 \cdot 10^4} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/min/mg de protéines).

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

1,36 x 10⁴ : coefficient d'extinction molaire du DTNB (M-1 cm-1).

Vt : volume total dans la cuve : 1,3 mL [0,1 mL surnageant + 0,1 mL DTNB + 1 mL tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 mL acétylthiocholine].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 mL.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

II.9. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart-moyen (m±sem). Différents tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel de Graph Pad Prism 04 pour la réalisation des doses létales aussi le Minitab, tels que le test "t" de Student et l'analyse de la variance à un critère de classification.

III. RESULTATS

III.1 Rendement en huile essentielle de *R. officinalis*

L'huile essentielle de *R. officinalis* est extraite par la technique d'hydrodistillation. Elle présente un rendement de 1.24 % de la matière sèche de la partie aérienne de la plante. Elle est liquide, mobile, d'une coloration jaune claire et à odeur camphrée,

L'huile essentielle de *R. officinalis*, a été appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de *Cx. pipiens*. L'effet de cette huile a été évalué sur certains paramètres morphométriques (le poids, la largeur du thorax des larves 4 et le volume corporel (V)) ainsi que sur la composition biochimique (contenu en protéines, lipide, et glucides) et sur les biomarqueurs (GSH, GST et AChE) des individus témoins et traités à différentes périodes : 24, 48 et 72 heures.

III.2. Essais toxicologiques

Les études toxicologiques ont permis de déterminer l'efficacité de l'huile essentielle de *R. officinalis* évaluée à partir de la mortalité enregistrée chez les individus cibles à différentes périodes 24, 48 et 72 heures après traitement.

III.2.1. Toxicologie de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* à l'égard de *Culex pipiens* à 24 heures

Les tests de toxicité sont appliqués sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens* avec des différentes concentrations : 25, 50,100, 150, 200, 300, 350 ppm pendant 24h. Les mortalités corrigées sont mentionnées dans **le tableau 06**, avec des taux variant de 18% (25ppm) à 100 % (350ppm) avec une relation dose-réponse.

Tab.06 : Effet de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures ($m \pm \text{sem}$, $n=10$ répétitions comportant chacune 20 individus).

doses	25	50	100	150	200	300	350
1	20.0	25.0	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
2	30.0	30.0	45.0	70.0	100.0	100.0	100.0
3	10.0	15.0	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
4	15.0	30.0	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
5	15.0	20.0	45.0	60.0	95.0	100.0	100.0
6	20.0	25.0	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
7	30.0	30.0	45.0	70.0	100.0	100.0	100.0
8	10.0	15.0	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
9	15.0	30.0	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
10	15.0	20.0	45.0	60.0	95.0	100.0	100.0
$m \pm \text{se}$	18 ± 5.6	24 ± 5.2	41 ± 3.2	65 ± 4	99 ± 1.6	100 ± 0	100 ± 0

Les concentrations létales, la CL50 (ou l'insecticide induit la mortalité de 50 % de la population ciblée), et le CL90 (qui provoque la mortalité de 90% de la population) sont déterminées grâce a logiciel Graph Pad Prism 04. Elles sont respectivement de 97,72 ppm (intervalle de confiance : 63,61-150,81) et 258,82ppm (intervalle de confiance : 110,92-603,95).

Tab.07 : Efficacité de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, à 24h analyse des probits.

Plante	Coefficient	Slope	CL50 (μg) IC (95%)	CL90 (μg) IC (95%)
<i>R.officinalis</i>	$R^2= 0.8955$	2.26	97,72 ppm (63,61-150,81)	258,82ppm (110,92-603,95)

III.2.2. Toxicologie de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* à l'égard de *Culex pipiens* à 48 heures

Les tests de toxicité sont appliqués sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens* avec des différentes concentrations : 25, 50,100, 150, 200, 300, 350 ppm pendant 24h. Les mortalités corrigées sont mentionnées dans le **tableau 08**, avec des taux variant de 18% (25ppm) à 100 % (350ppm) avec une relation dose-réponse.

Tab.08 : Effet de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 48 heures (m± sem, n=10 répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses	25	50	100	150	200	300	350
1	20.0	25.0	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
2	30.0	30.4	45.0	70.0	100.0	100.0	100.0
3	10.0	15.0	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
4	15.0	30.0	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
5	15.0	20.0	45.0	65.0	95.0	100.0	100.0
6	20.0	25.0	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
7	30.0	30.0	45.0	70.0	100.0	100.0	100.0
8	10.0	15.0	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
9	15.0	30.0	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
10	15.0	20.0	45.0	60.0	95.0	100.0	100.0
m± sem	18 ± 5.6	24.4± 5.2	41± 3.2	65.05 ± 4	99 ± 1.6	100 ± 0	100 ± 0

Les concentrations létales, la CL50 et la CL90 sont déterminées grâce a logiciel Graph Pad Prism (04) Elles sont respectivement de 97,72 ppm (intervalle de confiance 61.65 -149.81) et 257,62ppm (intervalle de confiance : 109,94-601,85).

Tab.09 : Efficacité de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 48h, analyse des probits.

Plante	Coefficient	slope	CL50 (µg) IC (95%)	CL90 (µg) IC (95%)
<i>R.officinalis</i>	R ² = 0.8955	2.26	97,72 ppm (61,65-149,81)	257,85ppm (109,94-601,85)

III.2.3. Toxicologie de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* à l'égard de *Culex pipiens* à 72 heures

Les tests de toxicité sont appliqués sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens* avec des différentes concentrations : 25, 50,100, 150, 200, 300, 350 ppm pendant 24h. Les mortalités corrigées sont mentionnées dans **le tableau 10**, avec des taux variant de 14% à 100 % avec une relation dose-réponse.

Tab.10 : Effet de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 72 heures (m± sem, n=10 répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses	25	50	100	150	200	300	350
1	14	25	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
2	18	19	45.0	56.0	100.0	100.0	100.0
3	10	15	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
4	15	30	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
5	15	20	45.0	65.0	95.0	100.0	100.0
6	14	25	40.0	65.0	100.0	100.0	100.0
7	15	13	45.0	70.0	100.0	100.0	100.0
8	9	15	35.0	70.0	100.0	100.0	100.0
9	15	30	40.0	60.0	100.0	100.0	100.0
10	15	20	45.0	60.0	95.0	100.0	100.0
m± se	14 ± 1.9	21.2± 5.8	41± 3.2	63.65 ± 4.3	99 ± 1.6	100 ± 0	100 ± 0

Les concentrations létales, la CL50, et la CL90 sont déterminées grâce a logiciel Graph Pad Prism (04) Elles sont respectivement de 94,21 ppm intervalle de confiance (60.67 -136.71) et 252,24ppm (intervalle de confiance : 107,19-601,64).

Tab.11 : Efficacité de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (ppm) appliquée sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 72h, analyse des probits.

Plante	Coefficient	slope	CL50 (µg) IC (95%)	CL90 (µg) IC (95%)
<i>R.officinalis</i>	R ² = 0.8955	2.26	94,21 ppm (60,67-136,71)	252,24ppm (107,19-601,64)

III.3 Effet sur la croissance pondérale

Le poids corporel (mg) des larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* a été estimé chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) à différentes périodes 24, 48 et 72 heures après traitement par l'huile essentielle de *R.officinalis* (**tableau 12**).

Chez les séries témoins les résultats obtenus montrent une différence significative ($p < 0,05$) du poids corporel au cours des périodes testées : 24, 48 et 72h. Cependant pour les séries traitées par la CL25, les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative de poids corporel ($p=0.005$) à 24, 48 et 72h. Par contre, chez les séries traitées par la CL50, les valeurs révèlent une diminution significative au cours de la période testée.

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées (CL 25 et CL 50), indique ce qui suit (**Figure12**) :

Chez les séries traitées par CL25, il y'a une diminution non significative de poids corporel à 24 h ($p=0,079$) et à 48h ($p=0.187$) et une diminution hautement significative à 72h ($p=0.008$).

Chez les séries traitées par CL50, il y a une diminution significative de poids corporel à 24h ($p=0,014$) et à 48h ($p=0.049$) et une diminution hautement significative à 72h ($p=0.001$).

Tab.12 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg) des larves 4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes ($m \pm sem$; $n= 3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	2,258 ± 0,081 a A	2,035 ±0.013 b A	1,648±0,041 c A
48	1,985 ± 0,046 a B	1,901 ±0.038 a B	1,721±0,104 b A
72	2,178 ± 0,012 a A	2,051±0.022 a A	1,940±0,016 b B

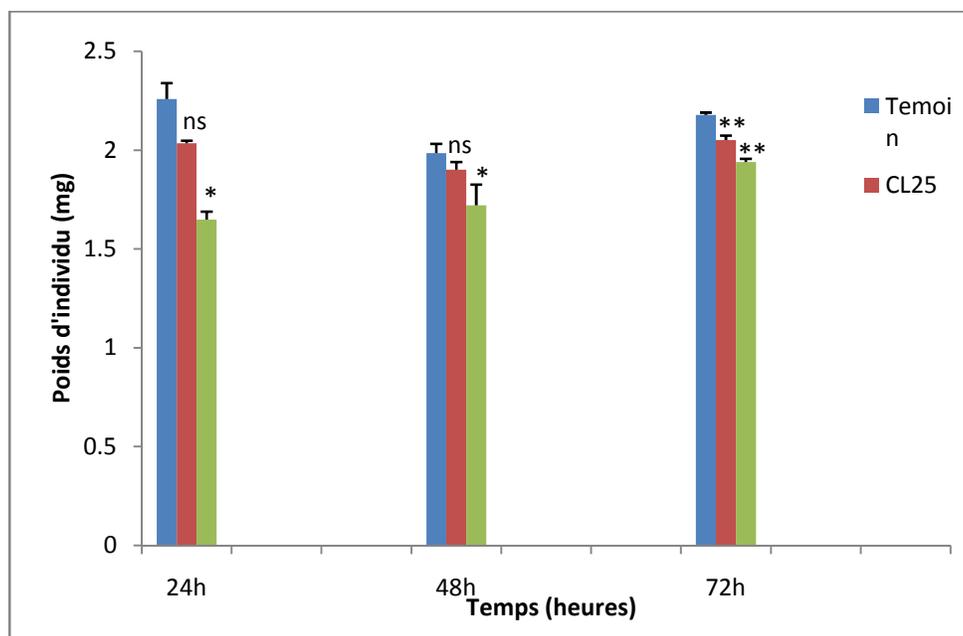


Figure 12 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur le poids (mg/individu) chez les larves du quatrième stade (L4) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative entre les séries témoins et traitées.*Différence significative ($p<0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées.

III.4. Effet sur la croissance linéaire

III.4.1. Largeur du thorax

La largeur du thorax (mm) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* a été observée à différentes période 24, 48 et 72 heures chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) (**Tableau 13**).

Chez les séries témoins les résultats obtenus montrent une différence très hautement significative ($p<0,001$) de la largeur de thorax au cours des périodes testées (24, 48 et 72h). Cependant, pour les séries traitées par la CL25, les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative de la largeur de thorax ($p=0.003$) à 24h, 48h et 72h. Par contre, chez les séries traitées par la CL50, les valeurs révèlent une diminution hautement significative ($p<0,01$) au cours des périodes testées.

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées (CL 25 et CL 50), indique ce qui suit (**Figure 13**).

Chez les séries traitées par la CL25, il y'a une diminution hautement significative de largeur de thorax à 24h ($p=0,005$) et une diminution très hautement significative à 48 et 72h ($p<0.001$). Chez les séries traitées par la CL50, il y'a une diminution très hautement significative de largeur de thorax ($p<0.001$) au cours des périodes testées.

Tab. 13 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves 4 de *Cx. pipiens*, à différentes périodes ($m \pm sem$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	1,076 \pm 0,012 a A	1,007 \pm 0,067 b A	0,885 \pm 0,070 c A
48	1,038 \pm 0,031 a A	0,897 \pm 0,031 b B	0,783 \pm 0,083 c B
72	1,007 \pm 0,044 a B	0,904 \pm 0,038 b B	0,878 \pm 0,022 c A

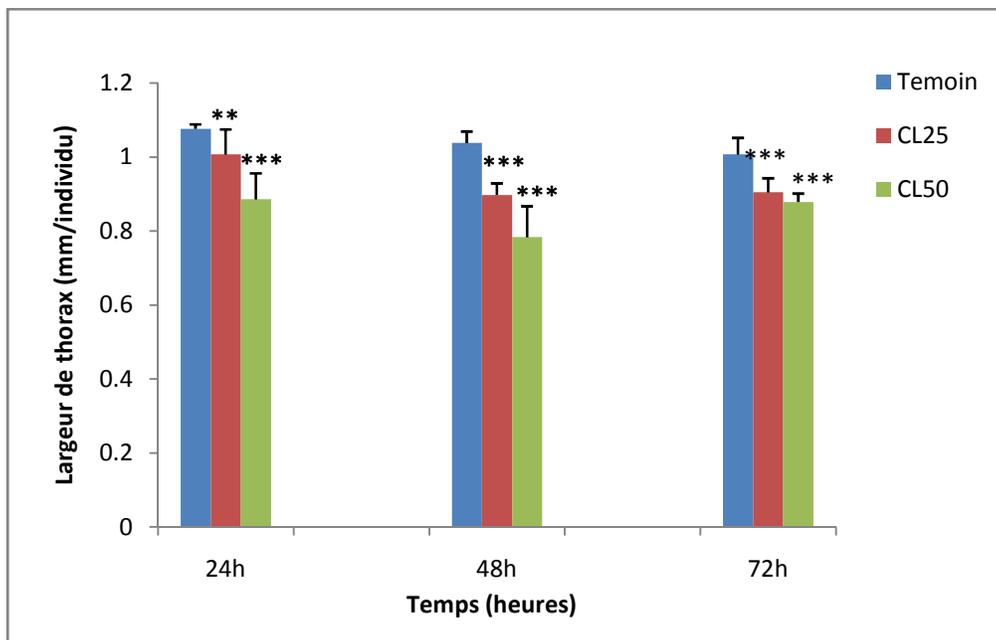


Figure 13 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur la largeur de thorax (mm/ individu) chez les larves du quatrième stade (L4) à différentes périodes (24, 48 et 72 h) ($m \pm sem$, $n=3$). Comparaison des moyennes**Différence hautement significative ($p<0,01$), *** Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.

III.4.2. Effet sur le volume corporel

Le volume corporel (mm³) des larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* a été observé à différentes période (24, 48 et 72 heures) chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) (**Tableau 14**).

Chez les séries témoins et traitées par la CL25, les résultats obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p < 0,001$) du volume corporel au cours des périodes testées : 24, 48 et 72h. Cependant, pour les séries traitées par la CL50, les résultats obtenus montrent une diminution hautement significative du volume corporel ($p=0.003$) au cours des périodes testées (24,48 et 72h).

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées (CL 25 et CL 50), indique ce qui suit (**Figure 14**) :

Chez les séries traitées par la CL25, il y'a une diminution hautement significative de volume corporel à 24h ($p=0,004$) et une diminution très hautement significative à 48 et 72h ($p < 0,001$).

Chez les séries traitées par la CL50, il y'a une diminution très hautement significative du volume corporel au cours des périodes testées.

Tab. 14: Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50) sur le volume corporel (mm³) des larves 4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	1,247 ± 0,043 a A	1,038 ± 0,197 b A	0,717 ± 0,167 c A
48	1,125 ± 0,097 a B	0,729 ± 0,081 b B	0,500 ± 0,153 c B
72	1,030 ± 0,133 a B	0,747 ± 0,096 b B	0,679 ± 0,053 b A

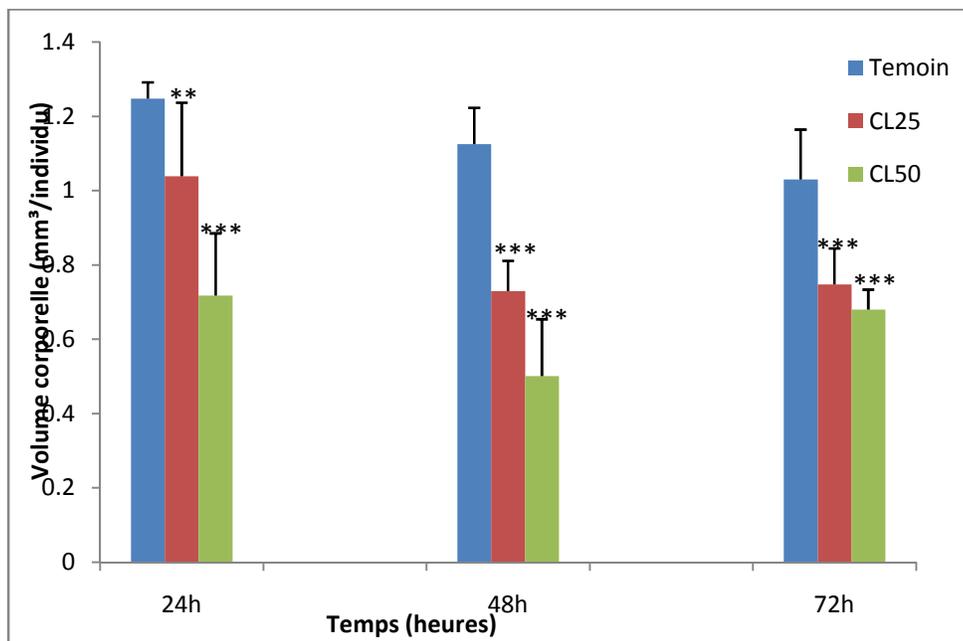


Figure 14 : Effet de l'huile essentielle de *R.officinalis* (CL25 et CL50), sur le volume corporelle (mm³/ individu) chez les larves du quatrième stade (L4), à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, n=3). Comparaison des moyennes : ** Différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les séries témoins et traitées, ***Différence très hautement significative ($p < 0,001$) entre les séries témoins et traitées.

III.5. Effet sur la composition biochimique

III.5.1. Contenu en protéines totales

Le taux des protéines totales a été estimé chez les séries témoins et traitées par l'huiles essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), chez *Culex pipiens*, d'après la méthode de **Bradford (1976)**. Les résultats relatifs au taux des protéines totales sont exprimés en microgramme par milligramme de poids frais ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids frais), D'après une courbe de référence (**Figure 15**) Les résultats du dosage sont donnés dans **le Tableau 15 et la Figure 16**.

Chez les séries témoins et traitées par la CL25 et la CL50, nous remarquons une augmentation non significative du taux des protéines ($p > 0,05$) par rapport aux temps testés (24, 48 et 72h).

Chez les séries traitées par la CL25, les taux de protéines montrent une augmentation non significative ($p > 0,05$) au cours des périodes testées.

Chez les séries traitées par la CL50, les taux de protéines indiquent une augmentation significative après 24h ($p= 0,038$), non significative après 48h ($p=0,133$) et hautement significative (0,004) après 72h, comparativement aux témoins.

Les analyses statistiques effectuées entre les séries témoins et traitées, montrent que l'huile essentielle de *R.officinalis* provoque une augmentation du taux de protéines totales chez *Culex pipiens*.

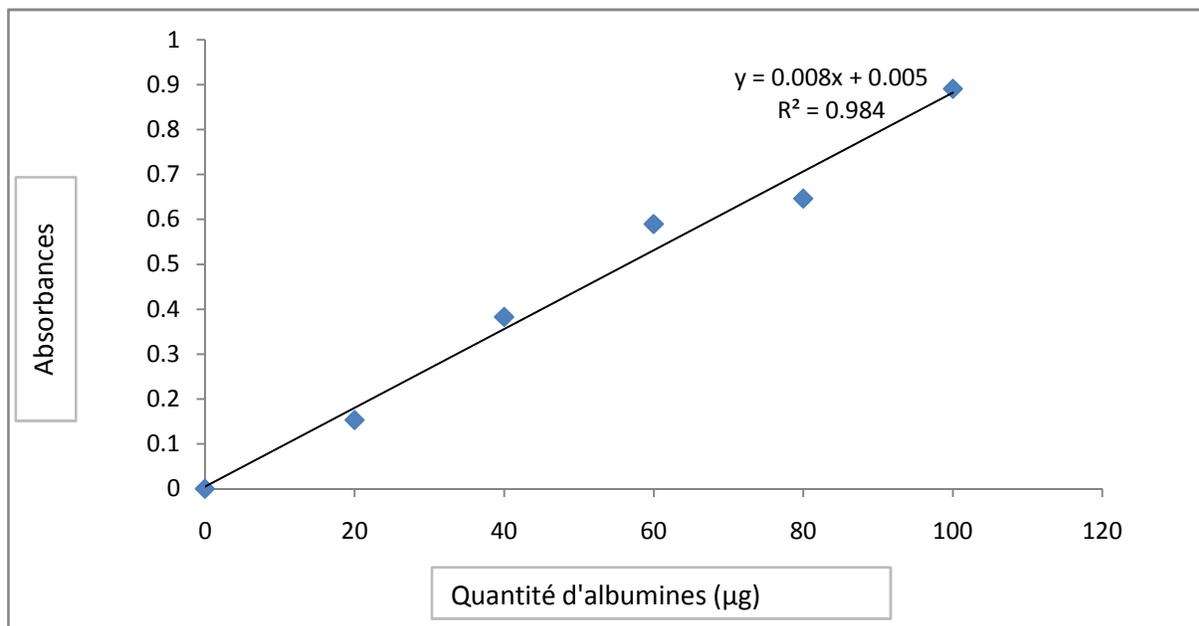


Figure 15 : Dosage des protéines totales chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité d'albumine (μg) (R^2 : coefficient de détermination).

Tab. 15: Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur le contenu en protéines ($\mu\text{g}/$ individu) chez les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx. pipiens* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$33,885 \pm 1,586$ a A	$42,869 \pm 3,366$ a A	$44,686 \pm 1,359$ b A
48	$36,110 \pm 4,563$ a A	$44,121 \pm 2,112$ a A	$45,695 \pm 0,424$ a A
72	$35,229 \pm 1,913$ a A	$36,359 \pm 4,146$ a A	$44,262 \pm 2,6042$ a A

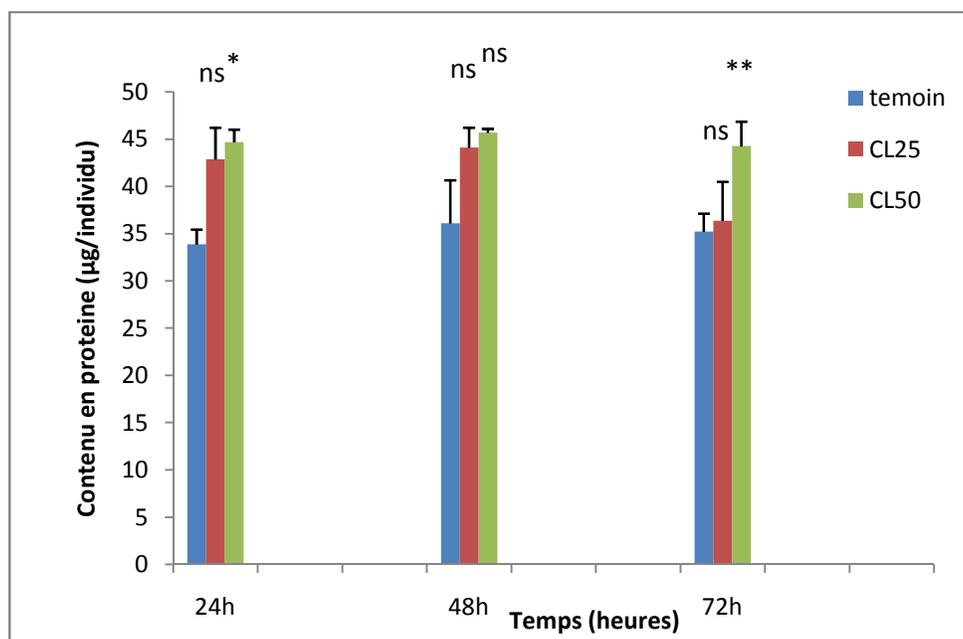


Figure 16: Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves 4 de *Cx. pipiens*, à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p < 0,05$), **Différence hautement significative ($p < 0,01$).

III.5.2. Contenu en lipides totaux

Le contenu en lipides totaux a été déterminé chez les larves de quatrième stade. D'après une courbe de référence (**Figure 17**) les résultats du dosage sont consignés dans le **Tableau 16** et la **Figure 18**.

Chez les séries témoins, les résultats obtenus montrent une différence non significative du taux des lipides mesurés après 24h, 48h et 72h. Cependant, pour les séries traitées par la CL25, une diminution très hautement significative ($p = 0,0001$) est observée par rapport aux temps testés. Chez les séries traitées par la CL50 il y'a une diminution significative ($p = 0,065$) des taux de lipides mesurés après 24h, 48h et 72h.

Chez les séries traitées par la CL25, les taux de lipides prouvent une augmentation hautement significative après 24h ($p = 0,002$) et très hautement significative après 48h et 72h ($p = 0,0001$) comparativement au témoin.

Chez les séries traitées par la CL50, les taux de lipides indiquent une augmentation hautement significative après 24h et 48h ($p=0,003$; $p=0,001$, respectivement) et significative ($p=0,066$) après 72h comparativement au témoin.

Les analyses statistiques effectuées entre les séries témoins et traitées montrent que l'huile essentielle de *R.officinalis* provoque une diminution du taux de lipides totaux chez *Culex pipiens*.

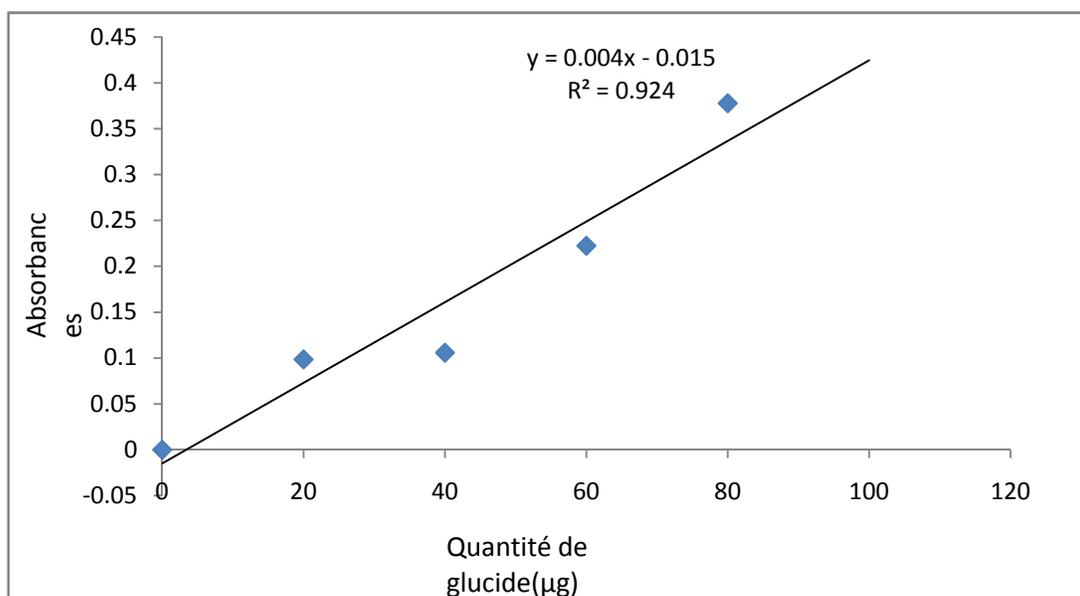


Figure 17: Dosage des lipides totaux chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (μg) (R^2 : coefficient de détermination).

Tab. 16: Effet de l'huile essentielle de *R.officinalis* (CL50 et CL25), sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/$ individu) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$27,554 \pm 0,697$ a A	$16,029 \pm 1,186$ b A	$6,137 \pm 1,291$ c A
48	$26,991 \pm 0,338$ a A	$7,254 \pm 0,247$ b B	$6,587 \pm 0,750$ b A
72	$28,283 \pm 1,427$ a A	$6,254 \pm 0,922$ b B	$3,554 \pm 0,747$ b A

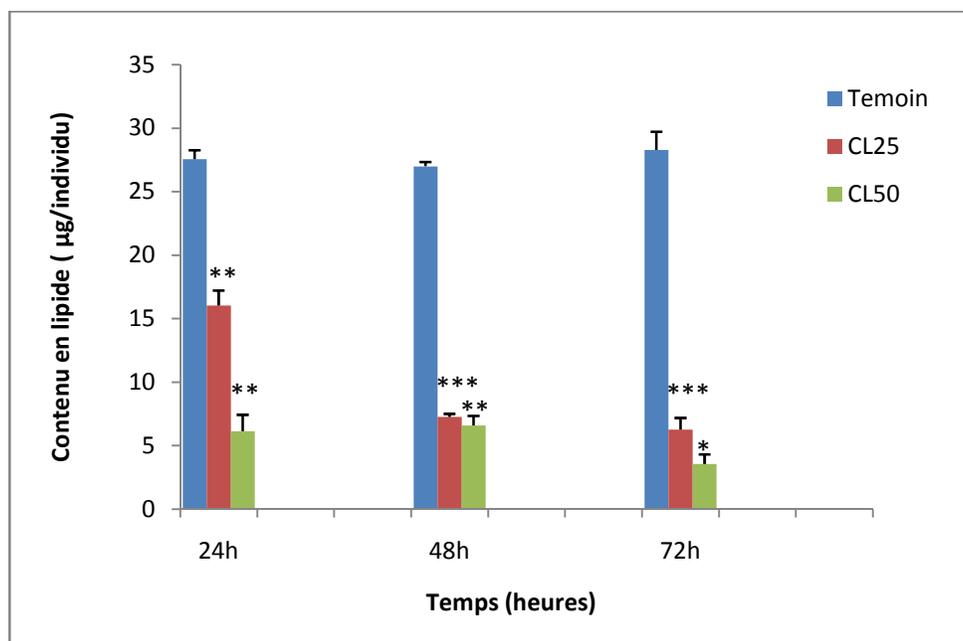


Figure 18 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL50 et CL25), sur le contenu en lipides totaux ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) de *Culex pipiens* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : *Différence significative ($p < 0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les séries témoins et traitées.

III.5.3. Contenu en glucides totaux

Le taux des glucides totaux a été estimé chez les séries témoins et traitées par l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), chez *Culex pipiens*, d'après la méthode de **Duchateau & Florkin (1959)**. Les résultats relatifs au taux des glucides totaux sont exprimés milligramme de poids frais. D'après une courbe de référence (**Figure 19**) Les résultats du dosage sont donnés dans le **Tableau 17**, et la **Figure 20**.

Chez les séries témoins, les résultats obtenus montrent une différence non significative des taux des glucides mesurés après 24h, 48h et 72h. Cependant, pour les séries traitées, les glucides totaux présentent une augmentation significative par la CL25 ($p=0,016$) et très hautement significative par la CL50 ($p = 0,0001$) par rapport aux temps testés 24, 48 et 72h.

Chez les séries traitées par la CL25, les taux de glucides mentrent une augmentation non significative après 24h ($p=0,630$), et hautement significative ($p=0,007$) après 48h et significative ($p=0,076$) après 72h, comparativement aux témoins.

Chez les séries traitées par la CL50, les taux des glucides indiquent une augmentation significative après 24h ($p=0,047$) et très hautement significative ($p 0,001$) après 48 et 72h, comparativement aux témoins.

Les analyses statistiques effectuées entre les séries témoins et traitées montrent que l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50) provoque une augmentation du taux des glucides totaux chez *Culex pipiens*.

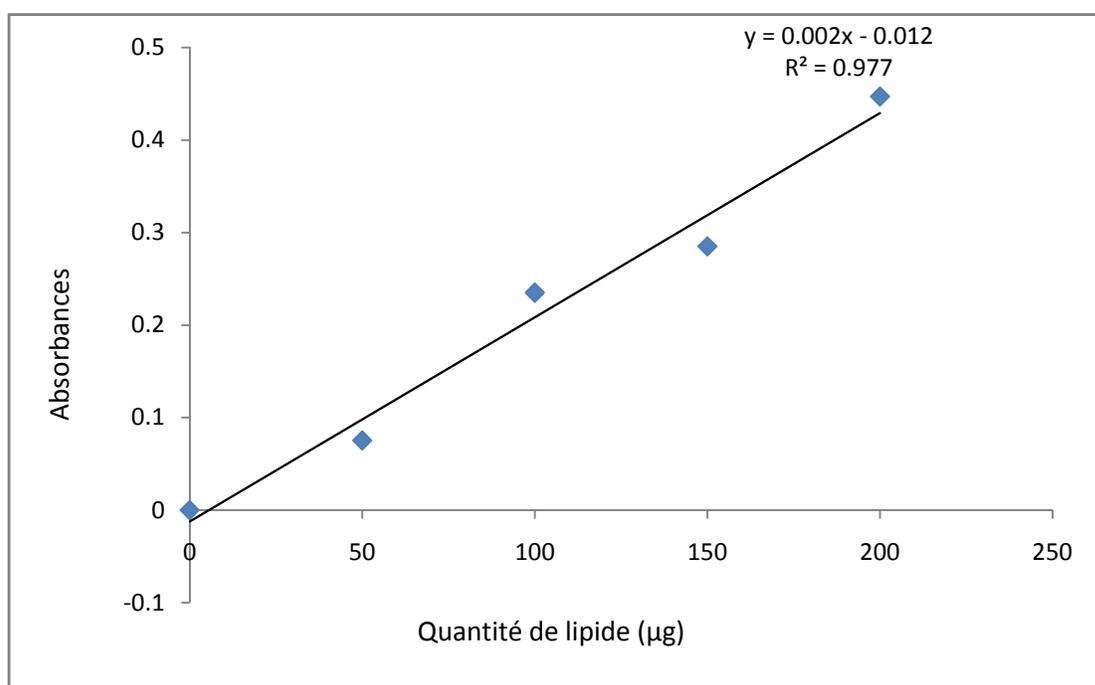


Figure 19: Dosage des glucides totaux chez les moustiques : courbe de référence exprimant l'absorbance en fonction de la quantité de lipide (μg) (R^2 : coefficient de détermination).

Tab. 17: Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis*, sur le contenu en glucides ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$6,079 \pm 2,197$ a A	$7,025 \pm 0,366$ a A	$13,545 \pm 0,388$ b A
48	$4,595 \pm 0,888$ a A	$12,229 \pm 1,130$ b AB	$25,891 \pm 0,761$ c B
72	$7,350 \pm 0,891$ a A	$17,966 \pm 3,947$ b B	$34,225 \pm 0,541$ c C

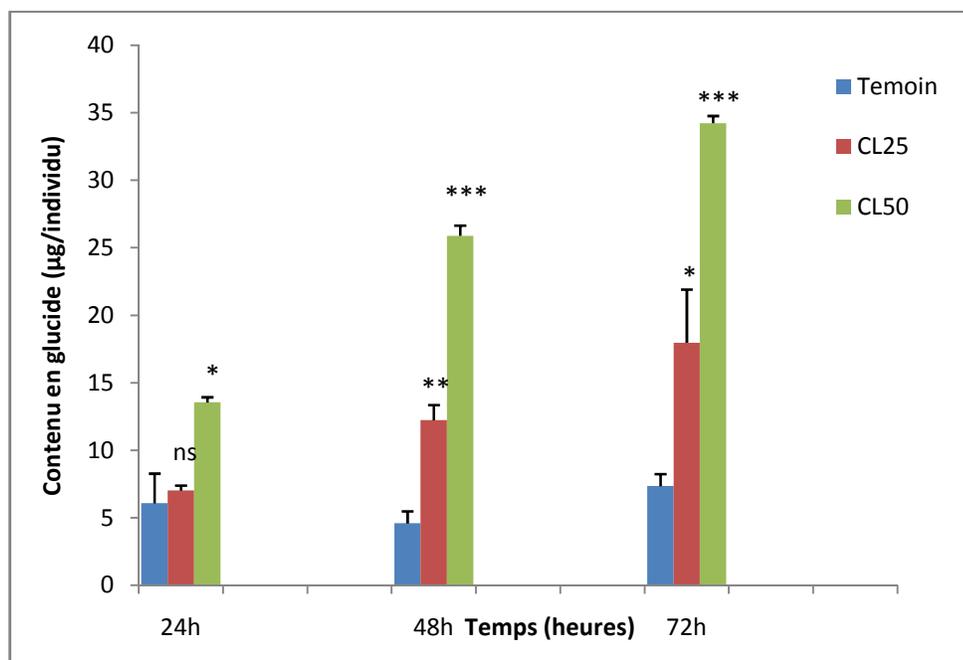


Figure 20 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL50 et CL25) sur le contenu en glucides totaux ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves du quatrième stade (L4) de *Culex pipiens* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0,05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, ***Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.

III.6. Effet sur les biomarqueurs

L'éventuel impact de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur la neurotoxicité et le développement d'une résistance, a été apprécié par le dosage d'un site cible, l'acétylcholinestérase (AChE) et une enzyme du système de détoxification (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH), chez les larves du quatrième stade de *Culex pipiens*.

L'huile essentielle de *R. officinalis* a été appliquée sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées à une concentration de 60,12ppm correspondant à la CL25 et à une concentration de 97,72 ppm correspondant à la CL50. L'effet de cet insecticide a été évalué à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) avec des séries témoins. Les résultats ont été exprimés par rapport à la quantité de protéines (mg) obtenue à partir d'une courbe de référence.

III.6.1. Effet sur le taux de la GSH

Le taux de la GSH a été estimé chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50), par application de la formule de **Weckberker & Cory (1988)**. Les résultats sont exprimés en micromoles par milligramme de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines).

Chez les séries témoins, les résultats obtenus montrent une diminution non significative des taux de GSH ($p>0,05$) par rapport aux temps 24,48 et 72h. Chez les séries traitées (CL25 et CL50), les résultats montrent une variation non significative des taux de ($p>0,05$) par rapport aux temps 24,48 et 72h.

Chez les séries traitées par la CL25, les taux de GSH révèlent une diminution significative après 24 ($p=0,018$), non significative après 48h ($p=0,208$) et hautement significative ($p=0,007$) après 72h par rapport aux témoins.

Chez les séries traitées par la CL50, les taux de GSH révèlent une diminution significative après 24 et 48h ($p = 0,045 ; 0,043$ respectivement) et hautement significative ($p=0,008$) après 72h par rapport aux témoins.

Les analyses statistiques (**Tableau 18, Figure 21**) effectuées entre les séries témoins et traitées montrent que l'huile essentielle de *R. officinalis* provoque une diminution du taux de GSH chez *Culex pipiens*.

Tab.18 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur le taux de la GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement \ Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	2.173 \pm 0.252 a A	0.840 \pm 0.042 b A	0.581 \pm 0.175 b A
48	1.505 \pm 0.266 a A	0.872 \pm 0.182 a A	0.779 \pm 0.061 b A
72	1.695 \pm 0.068 a A	0.928 \pm 0.066 b A	0.818 \pm 0.069 c A

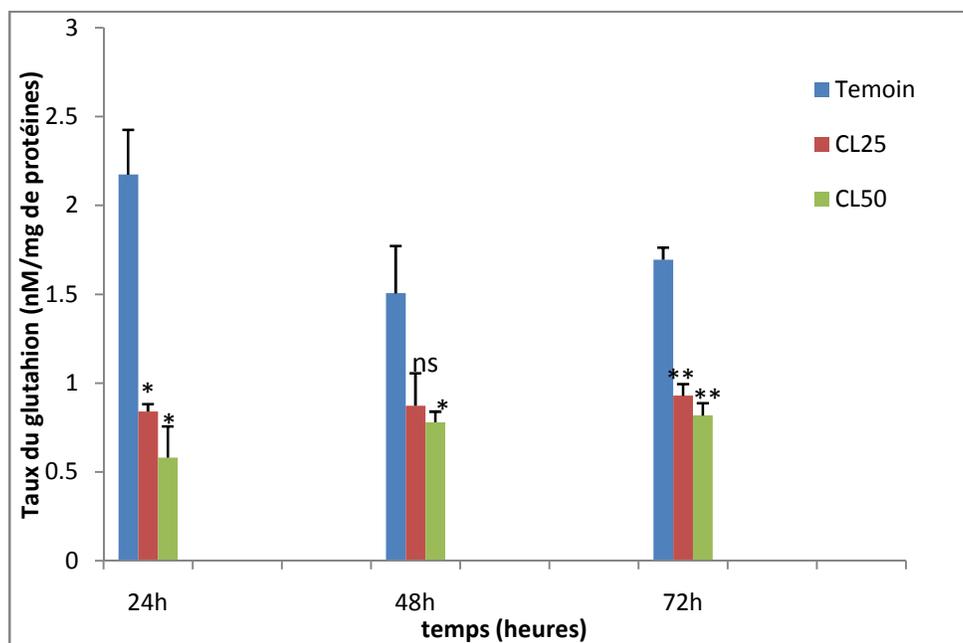


Figure 21 : Effets de l'huile essentielle de *R. officinalis*, sur le taux du GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p < 0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p < 0,01$) entre les séries témoins et traitées.

III.6.2 Effet sur l'activité spécifique de la GST

L'activité spécifique de la glutathion -S-transférase a été estimée chez les séries témoins et traitées, par application de la formule de **Habig et al. (1974)**. Les résultats relatifs à l'activité spécifique de la GST sont exprimés en micromoles par minute et par milligramme de protéines ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

Chez les séries témoins et traités par la CL50, les résultats obtenus montrent une variation très hautement significative de l'activité spécifique de la GST ($p = 0.0001$). Chez les séries traitées par la CL25, l'augmentation de la GST est hautement significative ($p = 0,002$) par rapport aux temps testés 24, 48, et 72h.

Chez les séries traitées par la CL25, l'activité spécifique de la GST montre une augmentation hautement significative après 24h ($p = 0,005$), significative ($p = 0,026$) après 48h et non significative ($p = 0,011$) après 72h, comparativement aux témoins.

Chez les séries traitées par la CL50, l'activité spécifique de la GST indique une induction significative après 24h ($p = 0,015$), non significative ($p = 0,110$) après 48h et hautement significative ($p = 0,001$) après 72h par rapport aux témoins.

Les analyses statistiques (**Tableau 19, Figure 22**) effectuées entre la série témoins et les séries traitées, montrent que l'huile essentielle de *R. officinalis* provoque une augmentation de l'activité de GST chez *Culex pipiens*.

Tab.19 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Culex pipiens* ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$0.0011 \pm 0.0001a$ A	$0.0029 \pm 0.0002b$ A	$0.0067 \pm 0.0002c$ A
48	$0.0026 \pm 0.0003a$ A	$0.0033 \pm 0.0003a$ A	$0.0043 \pm 0.0004b$ B
72	$0.0034 \pm 0.0009a$ B	$0.0037 \pm 0.0003a$ A	$0.0056 \pm 0.0005a$ A

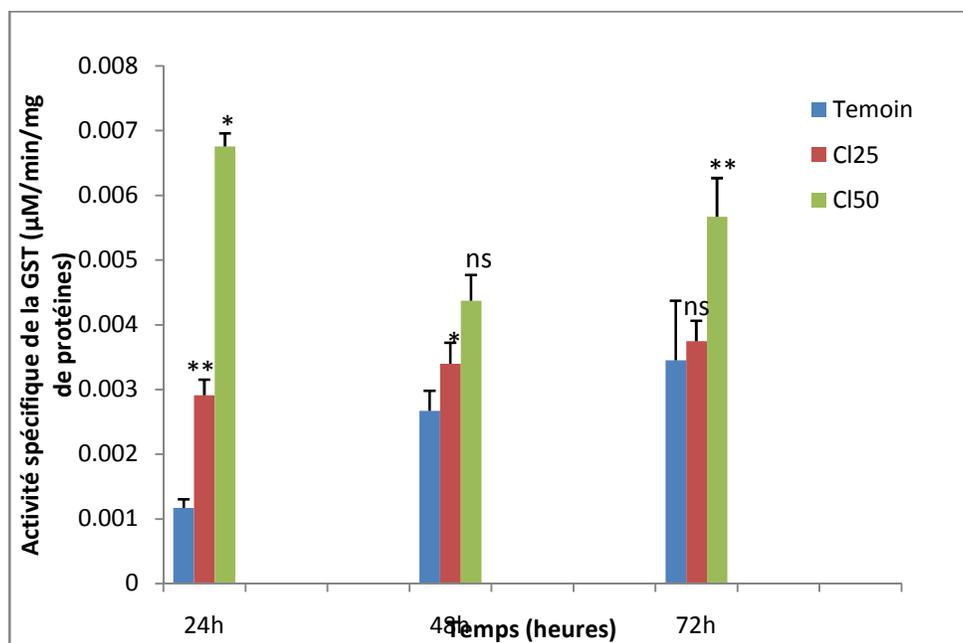


Figure 22 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis*, sur l'activité spécifique de la GST ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$, $n=3$). Comparaison des moyennes : ns Différence non significative, *Différence significative ($p<0.05$) entre les séries témoins et traitées, **Différence hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.

III.6.3 Effet sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase

L'activité spécifique de l'AChE a été estimée chez les séries témoins et traitées par l'application de la formule d'Ellman *et al.* (1961). Les résultats relatifs à l'activité spécifique de l'AChE, sont exprimés en micromoles par minute et par milligramme de protéines ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines).

Chez les séries témoins, les résultats obtenus montrent une variation non significative de l'activité spécifique de la AChE ($p=0,48$) par rapport aux temps testés 24, 48 et 72h. Chez les séries traitées par la CL25, les résultats obtenus montrent une diminution très hautement significative ($p<0.001$) par rapport aux temps testés. Chez les séries traités par la CL50, les résultats montrent une variation significative ($p=0.042$) par rapport aux temps testé.

Chez les séries traitées par la CL25, l'activité spécifique de l'AChE montre une augmentation hautement significative après 24,48 et 72h ($p= 0,003$; $p=0,001$; $p=0,002$ respectivement) par comparaison aux témoins.

Chez les séries traitées par la CL50, l'activité spécifique de l'AChE indique une augmentation hautement significative après 24h ($p= 0,001$), très hautement significative ($p<0,001$) après 48h et hautement significative ($p=0,002$) après 72h par rapport aux témoins.

Les analyses statistiques (**Tableau 20, Figure 23**) effectuées entre la série témoins et les séries traitées, montrent que l'huile essentielle de *R. officinalis* provoque une augmentation de l'activité de l'AChE chez *Culex pipiens*.

Tab. 20: Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *Cx pipiens* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$; $n= 3$). Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Traitement Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	0.234± 0.0403 a A	12.940± 0.0403 b A	5.354± 1.016 c A
48	0.244± 0.032 a A	7.5679± 0.362 b B	5.944±0.0553 c A
72	0.277± 0.022 a A	6.619± 0.754 b C	5.245± 0.308 c A

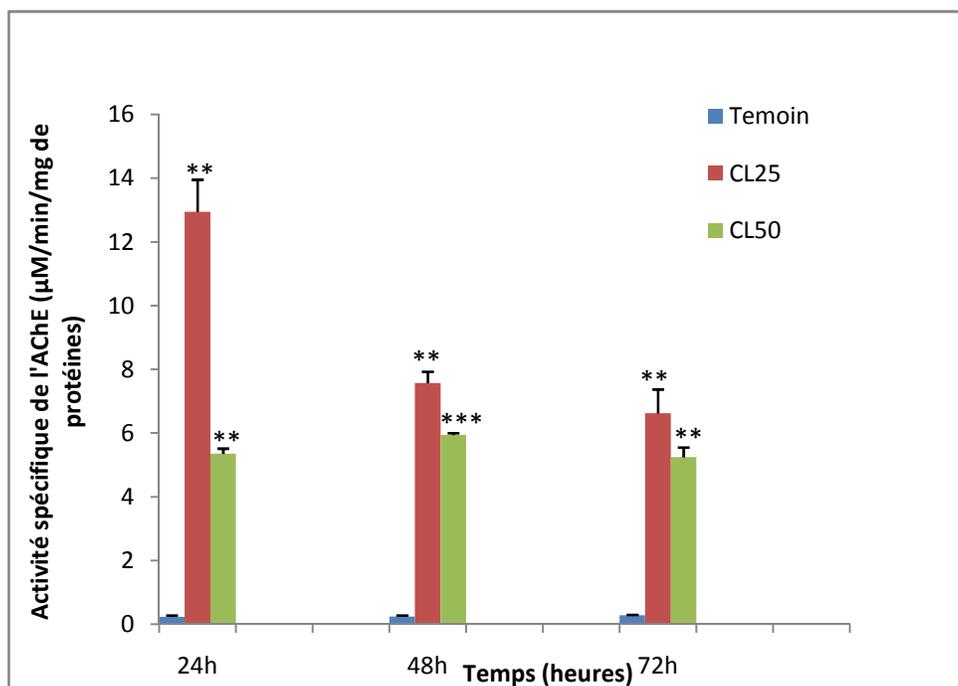


Figure 23 : Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis*, sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase (AChE) ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves 4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes ($m \pm \text{sem}$; $n=3$). Comparaison des moyennes ** Différence significative ($p<0,01$) entre les séries témoins et traitées, *** Différence très hautement significative ($p<0,001$) entre les séries témoins et traitées.

IV. DISCUSSION

IV.1. Rendement en huile essentielle

Parmi plusieurs huiles essentielles, celles de la famille des *Lamiaceae* ont reçu une attention considérable dans la recherche des produits naturels pour lutter contre les insectes (**Benayad, 2008**). Le romarin (*Rosmarinus officinalis*) fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires. C'est une herbe aromatique de la famille des *Labiées*, appréciée pour ses propriétés aromatiques, anti-oxydantes, antimicrobiennes, antispasmodiques, emménagogues et anti-tumorales, largement utilisée dans les produits pharmaceutiques et en médecine traditionnelle (**Atik bekkara et al, 2007**).

La méthode d'obtention des huiles essentielles reste une étape très importante, qui peut agir directement sur la qualité et la quantité des huiles essentielles. Le succès de cette étape est interprété par le calcul des rendements (**Bruneton, 1987**). La norme française AFNOR NF T75-006, définit l'huile essentielle comme «un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur, soit par des procédés mécaniques qui sont séparés de la phase aqueuse par procédés physiques » (**Garnero, 1996**). Le rendement 1.24 % est conforme avec les normes AFNOR. (0,5-2). Le travail de **Fadel et al. (2011)** confirment les résultats obtenus concernant la quantité d'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis*, durant ce travail (1.21%). Par contre, les travaux d'**Atik Bekkara et al. (2007)** et ceux de **Rouabeh (2010)** mentrent une teneur en huile essentielle moins importante qui sont respectivement de 0,8% et 0,9 %. Cela peut être due aux différents facteurs qui rentrent en jeu, parmi eux on cite la nature du sol, la période de la récolte, la durée de séchage, le mode d'extraction. (**Zabeirou Et Hachimou ,2005**).

IV.2. Toxicologie de l'huile essentielle de *R. officinalis*

Les tests toxicologiques sont adoptés pour tester la sensibilité des larves, vis-à-vis des insecticides utilisés en campagnes de lutte (**OMS, 1963**), ils sont nécessaires pour évaluer les concentrations létales (CL25 et CL50).

Nos expériences menées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviés de *Cx. pipiens*, montrent que l'huile essentielle de *R. officinalis* appliquée à différentes concentrations pendant 24h, présente un effet toxique qui varie selon la concentration, avec une mortalité importante observée de 100%, comparativement aux témoins, à la concentration la plus élevée (350 ppm). Cette étude toxicologique a mis en évidence l'activité larvicide de l'huile essentielle de *R. officinalis*, avec une relation concentration-réponse. En

effet, si on peut mettre en évidence une relation entre la quantité d'un produit et des changements conséquents sur une fonction, on caractérise déjà mieux l'efficacité du produit. **(Benayad, 2008)**.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus d'après plusieurs travaux encore plus récents. **Chu & Kemper (2001)**, ont mis en évidence un effet insecticide de 2 espèces de lavande sur *Drosophila auroria*. L'auteur rapporte que de nombreuses études ont montré d'excellents résultats sur les poux, les puces, etc. **Burfield & Reekie (2005)** ont étudié l'activité insecticide de nombreuses huiles essentielles contre le vecteur du paludisme et font de nombreuses observations sur la lavande. **Fanny (2008)** montre un effet larvicide de la lavande sur les mouches stomoxes.

Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les larves d'insectes. Nous citons à cet effet, les travaux de **Jang et al, (2002)** sur *A. aegypti* et *C. 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'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de **Jang et al, (2002)**. Par ailleurs, la protection des cultures contre les ravageurs par des extraits végétaux a été étudiée, aussi bien, sur des larves de lépidoptères (**Lee et al, 2002**) que sur des larves d'acridiens (**Barbouche et al, 2001**).

IV.3. Effet de l'huile essentielle sur la croissance

Le volume corporel des moustiques peut influencer quelques paramètres essentiels, tels que le volume du repas sanguin consommé, le degré de son utilisation dans les voies métaboliques et le nombre d'œufs qui arrive à la maturation (**Hosoi, 1954 ; Van Den Heuvel, 1963**). Le poids corporel chez les insectes dépend généralement de la présence de la nourriture dans leurs habitats, des conditions environnementales et surtout des caractères héréditaires de chaque espèce (**Braquenier, 2009**). (**Landry et al, 1988**) ont montré une variation saisonnière significative du volume corporel chez *Aedestriseriatus* et une corrélation positive entre le volume corporel et les réserves nutritives telles que le glycogène et les lipides.

Nos résultats montrent que le traitement par *R. officinalis* (CL25, CL50), des larves du quatrième stade de *Cx pipiens*, cause une réduction de divers paramètres biométriques tels que, la largeur du thorax, le poids et le volume corporel. Chez la même espèce, **Hamaidia,**

(2006), montre que le traitement par le méthoxyfénazole (DL50) provoque une diminution des paramètres morphométriques. De plus, **Tine-Djebbar (2009)** révèle que l'halofénazole appliqué sur les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* et *Cx pipiens*, perturbe les paramètres biométriques des individus. De sa part, **Briegel (1990)** dans ses travaux a signalé l'existence d'une forte corrélation entre la valeur cubique de la longueur des ailes et les réserves en protéines, lipides et glucides totaux à l'éclosion

D'autres travaux réalisés par **Djeghadar (2014)** sur le régulateur de croissance des insectes, novaluron, menés à l'égard des larves L3 et L4 de *Cx pipiens*, montrent que son application directe à différentes concentrations, présente un effet toxique exprimé par une mortalité relativement importante, comparativement aux témoins. L'efficacité du novaluron a été montrée par plusieurs travaux à l'égard de plusieurs espèces de moustique tels que *Aedes aegypti* (**Apiwat et al, 2007; Nwankwo et al, 2011; Fontoura et al, 2012**) et *Culiseta longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**). Les recherches d'**Arredondo-Jiménez & Valdez-Delgado (2006)** ont montré aussi une grande efficacité du novaluron à l'égard d'*Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, et *Aedes albopictus*. De même, pour les travaux de **Jambulingam et al, (2009)** sur *Culex quinquefasciatus* et **Ijumba et al, (2010)** sur *Anopheles gambiae* qui révèlent aussi un effet toxique du novaluron sur les séries traitées. L'action toxique de ce régulateur de croissance des insectes a été enregistrée contre plusieurs ordres d'insectes, autres que les diptères (**Cetin et al, 2006; Lohmeyer & Pound, 2012**), notamment à l'égard des lépidoptères (**Gupta & Kumar-Gupta, 2013**), des coléoptères (**Arthur & Fontenot, 2012**) et des hémiptères (**Kamminga et al, 2012**). D'autres molécules appartenant à la même classe du novaluron, inhibiteurs de la synthèse de la chitine, ont provoqué une augmentation du taux de mortalités par rapport aux témoins chez les moustiques (**Batra et al, 2005; Chen et al, 2008; Belinato et al, 2010**). L'activité larvicide de ces composés est le résultat de leur interférence avec le processus de la mue, notamment la synthèse de la chitine en réduisant sa quantité dans la cuticule, ce qui affecte les propriétés de cet exosquelette et conduit à un déficit du rejet de l'ancienne cuticule, ce qui est par la suite la cause d'une mue incomplète (**Merzendenroff et al, 2012; Salokhe et al, 2013**). L'effet cumulé du novaluron a provoqué des taux de mortalité de 100% pour les deux stades larvaires étudiés.

Beaucoup d'études ont montré que la plupart des benzoylurées sont efficaces contre les stades larvaires (**Linduska et al, 2001; Cutler et al, 2005**), mais aussi sur le stade nymphale et adulte (**Rehimi & Soltani, 1999; Bakr et al, 2008; Martins et al, 2008**). En effet, la

structure et la physiologie des insectes peuvent varier considérablement au cours de la croissance et du développement, dont certains stades de développement seront plus sensibles aux insecticides que d'autres, tel est le cas de la cuticule qui sa composition varie au cours du développement, ce qui a été lié à des changements dans la sensibilité aux I.G.Rs.

Les inhibiteurs de la synthèse de la chitine, sont des molécules qui perturbent la croissance et le développement des insectes visés, en affectant plusieurs paramètres du développement (**Hassan, 2009**).

Des effets similaires sont indiqués chez plusieurs espèces, après traitement avec certains inhibiteurs de la synthèse de la chitine comme le chlorfluazuron (**Mervat et al, 2010; Behroozi et al, 2011**), l'hexaflumuron (**Zhu et al, 2011**), le lufenuron (**Salokhe et al, 2010**), le flucycloxuron (**Khan & Qamar, 2011**), ainsi que le triflumuron (**Belinato et al, 2009; Arora et al, 2012**). D'autres molécules des I.G.Rs ont également présenté les mêmes effets à l'égard de certaines espèces de moustiques (**El-Shazly & Refaie, 2002; Andrighetti et al, 2008; Mbare et al, 2013**). La diminution du poids des larves traitées, peut aussi prolonger la durée de développement (**Bouaziz et al, 2011**).

La polymérisation de la chitine (dernière étape de la synthèse de la chitine) est catalysée par la chitine synthétase (CHS) (**Zhang et al, 2012**). Il a été rapporté qu'une injection d'un antagoniste de cette enzyme augmente la perméabilité de la membrane péritrophique aux produits toxiques (**Kato et al, 2006; Zhang et al, 2012**). L'accumulation, ainsi, des toxiques dans le corps de l'insecte peut conduire à la mort.

La diminution significative de la taille observée lors du traitement des larves de *Culex pipiens* par le novaluron, peut être expliquée par la perturbation quantitative des éléments métaboliques aux stades larvaires notamment les protéines, lipides et glucides qui sont considérés comme une source d'énergie et de croissance chez les insectes (**Bouaziz et al, 2011**). En générale, les perturbations engendrées par le novaluron sur le développement sont toujours liées à son mode d'action sur la chitine (**Devine et al, 2005; Moussian et al, 2005; Gangishetti et al, 2009**).

Des effets similaires ont été enregistrés lors du traitement avec le même produit à l'égard de *Culisetae longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**). Des inhibiteurs de la synthèse de la chitine entraînent les mêmes observations chez certains ordres d'insectes, tels que les lépidoptères par le diflubenzuron (DFB) (**Soltani & Soltani-Mazouni, 1992**).

Chez les moustiques, seules les femelles sont hématophages. Après la fécondation, elles partent à la recherche d'un hôte pour la prise du sang, afin d'assurer la maturation de leurs œufs. Ce comportement hématophage durant la reproduction, permet la transmission de nombreuses maladies au cours de l'alimentation. De ce fait, la recherche d'un moyen de lutte pour limiter les effets liés à ce phénomène est très importante. La diminution de la taille des larves peut aussi affecter l'ovogénèse des femelles, d'une part, et le nombre d'œufs pondus d'autre part. Dans une étude histologique sur les ovaires des femelles émergées de traitement des L4 d'*Anophele gambiae*, un inhibiteur de la synthèse de la chitine a affecté le développement des ovarioles et a diminué le nombre des follicules ovariens (Fournet *et al*, 1993).

IV.4. Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les compositions biochimiques

Chez les insectes, les dépenses énergétiques tout en volant ou nageant ou exerçant n'importe quelle fonction vitale, exigent la synthèse et la mobilisation des métabolites (protéines, glucides et lipides). Ces métabolites jouent un rôle essentiel dans la physiologie des insectes. Les glucides représentent une source d'énergie importante et servent à l'élaboration des produits génitaux et des structures membranaires. Les lipides représentent 35% de la composition des ovocytes chez l'*Aedes aegypti* (Troy *et al*, 1975) et 40% du poids sec des œufs (Kawooya & Law, 1988). Les protéines, à leur tour, jouent un rôle fondamental dans diverses réactions et peuvent assurer la catalyse biochimique, la régulation hormonale et s'intègrent dans la cellule en tant qu'éléments structuraux en même temps que les glucides et les lipides. Ces métabolites sont synthétisés dans le corps gras (Keely, 1985 ; Van Hensden & Law, 1989) puis transportés vers les organes utilisateurs (Chino *et al*, 1981; Dapporto *et al*, 2008; Zhou & Miesfeld, 2009) via l'hémolymphe (Downer, 1985; Keely, 1985).

IV.4.1. Effet de l'huile essentielle sur le contenu en protéines totales

Chez les insectes, l'hémolymphe subit des modifications métaboliques diverses au cours du développement (larve, pupa et adulte). En effet, ces fluctuations sont liées aux différents états physiologiques de l'insecte tels que la mue, la nymphose et la diapause (Nowosielski & Patton, 1965). Au moment où l'insecte entre en contact avec l'insecticide, ce dernier pénètre dans l'organisme et atteint, plus ou moins rapidement au niveau cellulaire, les protéines et les enzymes cibles dont il entrave le fonctionnement normal (Haubruge & Amichot, 1998).

Les protéines et les acides aminés jouent un rôle principal durant les différentes phases de la vie des insectes, car ils sont caractérisés par des niveaux très élevés. Chez les moustiques autogènes, les protéines stockées aux stades larvaires et qui proviennent de la digestion des couches procuticulaires profondes de l'ancienne cuticule, sont utilisées pour la formation des œufs. Cependant, chez les moustiques anautogènes, le repas sanguin représente la principale source de protéines nécessaires (**Briegel, 1985**).

Les résultats obtenus, montrent que le traitement par l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (CL25, CL50) chez *Culex pipiens*, cause une augmentation du contenu en protéines. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Madaci et al. (2008)** qui indiquent que les extraits hydroalcooliques des feuilles de *Nerium oleander* (Apocynacées), provoquent une augmentation des taux des protéines chez les larves des vers blancs rhizotrogini. De plus, une augmentation du taux de protéines a été signalée chez *Donax trunculus*, exposé aux polluants environnementaux (**Sifi, 2006**), chez *B. germanica* traitée par le pyriproxifène, analogue de l'Hormone juvénile (**Aribi & Lakbar, 2001**) et chez *Corcyra cephalonica* traitée par le RH-5849, agoniste des ecdystéroïdes (**Ashok & Dutta-Gupta, 1991**). Le novaluron (IGR) provoque un taux élevé des protéines totales chez *Cs longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**), et une augmentation du taux des protéines totales a été signalée par **Thenmozhi et al, (2011)** chez les poissons *Labeo rohita* exposés à une concentration de 30 mg/L du malathion.

Par contre, les travaux de (**Tine-Djebbar, 2009**) montrent que le contenu en protéines totales diminue après traitement par le methoxyfénoside et l'halofénoside chez deux espèces, de moustiques, *Cx pipiens* et *Cs longiareolata*. En outre, **Rouibi (2002)** montre que le RH-0345 appliqué sur les femelles adultes de *B. germanica* nouvellement exuvies, réduit le taux des protéines hémolympatiques, de même que l'azadirachtine diminue leurs protéines ovariennes (**Saci, 2006**). Chez *T. molitor*, l'application du KK-42 in vivo réduit les concentrations des protéines hémolympatiques (**Soltani-Mazouni et al, 2001**). Des effets similaires ont été enregistrés lors du traitement avec le novaluron à l'égard de *Culiseta longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**). Mêmes effets ont été enregistrés après traitement, par d'autres inhibiteurs de la synthèse de la chitine, sur certaines espèces de coléoptères (**Soltani-Mazouni et al., 1999; Ghoneim et al., 2003**) comme chez certains orthoptères (**Bakr et al, 2007; Ghoneim et al., 2012; Hamadah et al., 2012; Tanani et al., 2012; Hamadah, 2014**).

IV.4.2. Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les lipides totaux

Les lipides représentent la principale source d'énergie chez les insectes (**Beenakers et al, 1985**). Ils sont transportés du corps gras, site de leurs synthèse et stockage (**Keely, 1985 ; Van Hensden & Law, 1989**) vers les organes utilisateurs *via* l'hémolymphe surtout lors de la vitellogénèse (**Downer, 1985 ; Keely, 1985**). Plusieurs études ont démontré que les triglycérides, dont le corps gras est le site majeur de stockage chez les insectes, sont une réserve métabolique importante (**Tine-Djebbar, 2009**).

Les résultats obtenus, montrent que le traitement par l'HE de *R.officinalis* (CL25 et CL50) chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens*, cause une diminution du contenu en lipides. Des résultats similaires sont observés les mouches *B. germanica* après traitement à l'azadirachtine (**Messiad, 2006**) et à l'halofénozide, un analogue de l'hormone de mue (**Rouibi, 2002**). Le benfuracarbe, un carbamate, l'acétamipride, un néonicotinoïde (**Maiza et al, 2004**) et l'acide borique, un insecticide inorganique (**Kilani-Morakchi et al, 2005**), réduisent également le contenu en lipides ovariens chez la même espèce. Les travaux de **Daas (2006)** ont, également, démontré que l'application de plusieurs mimétiques de l'hormone de mue tels que le RH-2485, le RH-5992 et le RH-0345 sur les femelles de *Eupolybothrus nudicornis* (myriapode), réduisent les concentrations de lipides dans l'hémolymphe et dans les tissus ovariens. Un analogue de l'HJ, le méthoprène, testé chez *Locusta migratoria*, provoque aussi une diminution des concentrations des lipides au niveau du corps gras (**Cotton & Anstee, 1991**). Quelques composés des benzoylurées diminuent la quantité de lipides métabolites (**Ghoneim et al, 2005; Mervat et al, 2010; Assar et al, 2010**).

Par contre, une augmentation du taux de lipides était observée chez les antibiotiques appliqués sur les mouches *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (**Ben Yousef et al, 2008**), de même chez *D. trunculus* exposés aux polluants environnementaux (**Sifi, 2009**). **Djeghader et al, (2013)** montre que le novaluron provoque une augmentation de lipide chez les larves de quatrième stade de *Culex pipiens*, ainsi, le traitement par le methoxyfenozide et l'halofenozide chez les larves *Cs longiareolata* et *Cx pipiens*, affiche les mêmes observations (**Tine-Djebbar, 2009**). Le traitement par le novaluron chez la même espèce révèle une augmentation du contenu des lipides **Djeghader et al, (2013)**. Des effets similaires ont été enregistrés lors du traitement avec le même produit à l'égard de *Culisetae longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**).

IV.4.3. Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les glucides totaux

Les glucides forment un groupe de composés très importants. Certains représentent une source d'énergie pour les organismes vivants, soit immédiatement utilisable (tréhalose), soit sous forme de réserves (glycogène) ; d'autres ont un rôle structural (cellulose, chitine, acide hyaluronique).

Les taux de glycogène et de tréhalose dans les tissus sont étroitement liés aux événements physiologiques tels que le vol, la mue, et la reproduction (**Wiens & Gilbert, 1967**). Le tréhalose est la fraction la plus importante des glucides circulants. Il joue un rôle métabolique de premier plan dans le cycle de développement (**Steel, 1981**) et constitue une source énergétique essentielle en libérant le glucose sous l'action d'une enzyme, tréhalase. Sa concentration dans l'hémolymphe est déterminée par la vitesse de deux processus : son retrait pour les besoins énergétiques de l'insecte et son stockage dans le corps gras (**Wyatt, 1967**).

Les résultats obtenus, montrent que le traitement par l'HE de *R. officinalis* (CL25 et CL50) chez les larves de *Cx pipiens*, cause une augmentation du contenu en glucides. Ceci concorde avec les résultats obtenus chez *D. trunculus* exposés aux polluants environnementaux (**Sifi, 2009 ; Mansour, 2011**) après l'exposition des larves de *Culiseta longiareolata* au spiromesifen. Des effets similaires ont été enregistrés lors du traitement avec le novaluron chez la même espèce **Djehader et al, (2013)** et à l'égard de *Culiseta longiareolata* (**Bouaziz et al, 2011**). Des inhibiteurs de la synthèse de la chitine entraînent les mêmes observations chez certains ordres d'insectes tels que les lépidoptères par le diflubenzuron (DFB) (**Soltani & Soltani-Mazouni, 1992**). Les mêmes effets ont été enregistrés après traitement, par d'autres inhibiteurs de la synthèse de la chitine, sur certaines espèces de coléoptères (**Soltani-Mazouni et al, 1999 ; Ghoneim et al, 2003**) comme chez certains orthoptères (**Bakr et al, 2007 ; Ghoneim et al, 2012 ; Hamadah et al, 2012 ; Tanani et al, 2012 ; Hamadah, 2014**).

Par contre, l'application d'un analogue de l'hormone de mue, le RH-0345, diminue les concentrations des glucides hémolympatiques chez *B. germanica* et un effet dose-réponse est également observé (**Rouibi, 2002**). D'autres régulateurs de croissance, comme le DFB, appliqué aux nymphes de *T. molitor* (**Soltani, 1990**), ou aux femelles adultes de *T. molitor* (**Soltani-Mazouni & Soltani, 1992**) ou encore chez un crustacé *P. kerathurus* (**Morsli, 1994**), affecte les concentrations des glucides hémolympatiques. Des effets similaires sont observés chez deux espèces de moustiques, *Cx. pipiens* et *Cs.*

longiareolata traitées par le methoxyfenozide et l'halofenozide (Tine-Djebbar, 2009). Quelques composés des benzoylurées ont diminué la quantité de glucides (Ghoneim *et al*, 2005; Mervat *et al*, 2010; Assar *et al*, 2010).

IV.5. Effet de l'huile essentielle de *R. officinalis* sur les biomarqueurs

La lutte chimique contre les organismes nuisibles (rongeurs, arthropodes vecteurs de maladies ou destructeurs de récoltes), se traduit invariablement par la sélection d'individus résistants, c'est à dire capable de survivre et de se reproduire malgré la présence dans leur environnement de composés toxiques pouvant tuer des individus dits sensibles (Magnin *et al*, 1985).

On distingue à cet égard deux types de modifications : (a) une activité accrue des systèmes de dégradation des xénobiotiques (et donc des insecticides), et (b) une modification de la cible de l'insecticide devenant capable de fonctionner correctement malgré la présence d'insecticide (Haubruge et Amichot 1998). Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs vont concerner l'étude des changements physiologiques, biochimiques, moléculaires ou comportementaux, révélant l'exposition présente ou passé d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Badiou, 2007).

Plus de 500 espèces d'arthropodes sont maintenant résistantes à au moins, un insecticide ou acaricide. En dépit des diversités chimiques des insecticides et biologiques des ravageurs seulement un petit nombre de mécanismes de résistance sont capable de détoxifier les insecticides en métabolites moins toxiques (Soderlund, 1997).

Pour contribuer à une compréhension de ces mécanismes, nous avons évalué l'effet de l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (CL25 et CL50), sur l'activité d'une enzyme cible, l'acétylcholinestérase, d'une enzyme de détoxification, Glutathion –S-transférase et une protéine, le Glutathion, un biomarqueur de stress oxydatif, chez l'espèce de moustiques *Cx pipiens*.

IV.5.1. Effet sur le taux de la GSH

Le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur dans les cellules ; c'est le thiol cellulaire le plus abondant, impliqué dans le métabolisme, les procédés de transport et dans la protection des cellules contre les effets toxiques des composés endogènes et exogènes, y compris les espèces réactives de l'oxygène, les métaux lourds et les polluants (Habes *et al*,

2006)]. Il intervient dans la défense anti-radicalaire, par son implication dans les réactions de détoxification catalysées par la glutathion-S-transférase (Souissi *et al*, 2008).

L'analyse de nos résultats obtenus après dosage de GSH des larves du quatrième stade chez *Culex pipiens* traitées par l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (CL25 et CL50), à différentes périodes, 24, 48 et 72 heures, révèle une diminution significative du taux de GSH chez les séries traitées, comparativement aux séries témoins. En accord avec nos résultats, plusieurs travaux obtenus aident à mieux expliquer la relation entre la diminution du taux de GSH et l'administration des molécules exogènes. Meghlaoui & Mansouri (2010) ont rapporté une diminution significative du taux de GSH chez les adultes de *B. germanica* traités par le spinosad, comparativement aux séries témoins. Des résultats similaires sont observés chez *D. trunculus* exposés aux polluants environnementaux (Sifi, 2006), *Galleria mellonella* traitée par le malathion (Buyukguzel, 2009) et *Eurytemora affinis* traitée au cadmium (Souissi *et al*, 2008). Outre, le stress oxydatif par l'arsenic conduit à une diminution du taux de GSH chez *S. cerevisiae* (Todorova, 2007).

La diminution du GSH pourrait être expliquée par une consommation accrue de ce cofacteur par les GSTs, afin de détoxifier l'organisme. De plus, cette diminution du GSH traduit également une réduction du système antioxydant non enzymatique. La diminution de cette petite molécule est une conséquence répandue de la formation accélérée des espèces d'oxygène réactives durant les activités cellulaires soutenues (Bounous, 1991).

IV.5.2. Effet sur l'activité spécifique de la GST

Les enzymes du système de détoxification sont, aussi, beaucoup étudiées puisque leurs activités sont susceptibles d'être fortement modifiées après une exposition (Badiou, 2007 ; Dannau *et al*, 2003). Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une grande famille multifonctionnelle des enzymes de la phase II du processus de détoxification dont la fonction principale est de catalyser la conjugaison des composés électrophiles au glutathion (Sheehan *et al*, 2001). Ils ont un rôle important dans la détoxification des substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Jakoby & Habig, 1980).

L'activité spécifique de la GST chez les larves témoins et traitées du quatrième stade de *Culex pipiens* a été évaluée après 24, 48 et 72h de traitement. Les résultats obtenus montrent une augmentation après traitement par l'huiles essentielle extraite de *R. officinalis* (CL25 et CL50), révèle une augmentation significative par rapport aux témoins.

L'augmentation de l'activité de la GST traduit une mise en place du processus de détoxification, qui est une forme de défense de l'insecte contre le pesticide. Cette observation a été également signalée chez *B. germanica* traitée par l'acide borique (Habes *et al*, 2006), un pyréthrianoïde la cyperméthrine (Valles *et al*, 1999), l'azadirachtine (Saci, 2006), l'acétamipride et le benfuracarbe (Morakchi, 2007), le spinosad (Meghlaoui & Mansouri, 2010), mais aussi par le propoxur (Valles *et al*, 1999 ; Lee *et al*. 2000). De plus, les recherches ont montré que la résistance aux insecticides est associée à une augmentation de l'activité de la GST et de cytochrome P450 chez les larves de moustiques : *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus cataphylla*, *Aedes rusticus* traitées par un bactérioinsecticide *Bti* (Boyer, 2006).

L'accroissement de l'activité spécifique de la GST peut provenir soit d'une modification de la conformation de l'enzyme, la rendant plus efficace, soit d'une production accrue de protéine, pouvant parfois représenter jusqu'à 14% des protéines totales d'un individu. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme, et à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour ces enzymes (Cédric, 2008).

IV.5.3. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE

La neurotoxicité correspond généralement à une perturbation de l'influx nerveux, le cas de l'acétylcholinestérase (AChE) enzyme impliquée dans la transmission de l'influx nerveux son inhibition traduit l'exposition à une ou plusieurs substances ayant une action neurotoxique. L'AChE qui se trouve essentiellement dans le système nerveux central est plus sensible à ces pesticides que les enzymes des vertébrés. Cette enzyme est indispensable au bon fonctionnement des synapses cholinergiques (Haubruge & Amichot, 1998).

L'analyse des résultats obtenus après dosage de l'activité enzymatique de l'AChE des larves du quatrième stade chez *Cx pipiens* traitées par l'huile essentielle extraite de *R. officinalis* (CL25 et CL50), à différents temps 24, 48 et 72 heures, révèle une augmentation hautement significative de l'activité de l'AChE chez les séries traitées, comparativement aux témoins.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Boyer, (2006) qui suggèrent une possible relation entre l'induction d'activités enzymatiques et l'augmentation de résistance chez les insectes, avec l'hypothèse que la résistance aux insecticides peut être influencée par des types de produits chimiques autres que des insecticides. La résistance des insectes provient soit d'une augmentation de la quantité d'AChE, soit d'une diminution de l'affinité de celle-ci avec ces insecticides (Cédric, 2008). Donc, ces derniers ne sont pas toujours des inhibiteurs de

l'AChE, parfois les mutations affecteraient la structure de l'enzyme de telle sorte que l'accès au site catalytique est rendu plus difficile pour l'insecticide comme chez *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica*. Quatre points de mutations situés sur le gène Ace-2, rendent l'acétylcholinestérase moins sensible à l'action inhibitrice des insecticides (**Cédric, 2008**).

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En raison des problèmes liés à l'utilisation des insecticides chimiques et leur impact nocif sur la santé et l'environnement, le recours à des alternatifs naturels remplissant le même rôle des insecticides de synthèse et présentant des avantages écologiques et économiques, s'avère nécessaire.

Le travail réalisé, nous a permis d'évaluer chez une espèce de moustiques *Cx. pipiens* l'effet l'huile essentielle extraite *R. officinalis*, sur certains paramètres morphométriques (le poids, la largeur du thorax et le volume corporel) des larves 4 et une étude biochimique a permis de déterminer les contenus des différents métabolites et ainsi sur certains biomarqueurs ; l'acétylcholinestérase (AChE), la glutathion S-transférase (GST) et son cofacteur le glutathion (GSH).

L'huile essentielle de *R. officinalis* testées à la CL25 et CL50 chez le stade larvaire 4 de *Cx pipiens*, entraîne une réduction des paramètres biométriques testés (la largeur du thorax, le poids et le volume corporel). De plus une augmentation du contenu en protéines totales et glucide a été signalée au cours de la période étudiée (24, 48 et 72h). Ainsi une diminution du contenu en lipide.

L'évaluation des biomarqueurs se traduit par une augmentation de l'activité spécifique de l'AChE chez les larves 4 de *Cx. pipiens*. *Le Rosmarinus* ne semble pas être neurotoxique, ce qui le rend intéressant pour les programmes de lutte, du fait que les résistances enregistrées dans la littérature concernent principalement les insecticides à action neurotoxique. Cependant, il induit l'activation du système de détoxification par le biais d'une augmentation significative de l'activité de la GST à 24, 48 et 72 heures après traitement. Enfin, l'H.E diminue le taux du glutathion, cofacteur important pour la détoxification.

L'huile essentielle présente donc des propriétés insecticides car les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes pour son application dans la production des biocides.

En perspectives, il serait intéressant de compléter cette recherche en évaluant l'effet de l'HE sur d'autres mécanismes de résistance, essentiellement les enzymes de détoxifications tels que les estérases, les monooxygénases à cytochrome P 450 et la lactate déshydrogénase (LDH) et aussi sur le système de reproduction chez les femelles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Alaoui Slimani N., Joud N., Benhoussa A., Hajji K. (1999). Typologie des habitats d'*Anopheles* dans une zone urbaine (*DipteraCulicidae*). *Entomologiste* 55(5), 181–190p.

Alayat M. S. (2012). Bio-écologie, position taxonomique et compétence vectorielle 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 Magistère en Biologie environnementale, option de Biologie et écologie animale .Université Annaba .67p

Apiwat T., Usavadee T., Payu B., Jakkrawarn C., Padet S., Preecha A. and Mulla S. 2007. Field evaluation of Novaluron, a chitin synthesis inhibitor larvicide, against mosquito larvae in polluted water in urban areas of Bangkok, Thailand. *Insect Sci.*, 38 (3): 434-440p.

Andreo S. (2003). L'effet anti-gorgement sur chien d'un shampoing a 0,07% de de Itamethrine sur un moustique du complexe *Culex pipiens*. Th.: Med. Vet: Toulouse, 128. 63p.

Andrighetti M.T.M., Cerone F., Rigueti M., Galvani K.C. and Macoris M.L.G. 2008. Effect of pyriproxyfen in *Aedes aegypti* populations with different levels of susceptibility to the organophosphate temephos. *Dengue Bull.*, 32: 186-198p.

Aribi, N. & Lakbar, C. (2001). Effets du pyriproxyffène sur certains aspects physiologiques du développement de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revue synthèse.*, 9: 78 -94p.

Arora M.S., Salokhe S.G. and Mukherjee S.N. 2012. Effect of sub-letahl concentration of lefenuron on growth development and reproductive performance of *Tribolium Castaneum* (Herbest) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Inter. J. Appl. Biol; Pharm.Technol.*, 3 (1): 76-84p.

Arrendondo-Jiménez J.I. and Valdez-Delgado K.M. 2006. Effect of Novaluron (Rimon 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. *J. Medic. Vet. Entomol.*, 20: 377-387p.

Arthur F.H. and Fontenot E.A. 2012. Residual activity of methoprene and novaluron as surface treatments to manage the flour beetles, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. *J. Insect Sc.*, **12 (95)**: 1-11p.

Atik bekkara, F., Bousmaha, L., Taleb bendiab, S.A., Boti, J.B., Casanova J. (2007) Composition chimique de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. *Biologie & Santé*. **7**: 6-11p.

Ashok, M. & Dutta-Gupta, A. (1991). In vitro effect of nonsteroidal ecdysone agonist RH-5849 on fat body acid phosphatase activity in rice moth, *Corcyra cephalonica* (Insecta). *Biochem. Int.*, **24**: 69 – 75p.

Assar A.A., Abo El-Mahasen M.M., Khalil M.E. and Mahmoud S.H. 2010. Biochemical effects of some insect growth regulators on the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Egypt Acad. J. Biolog. Sci.*, **2 (2)**: 33-44p.

-B-

Bakr R.F., Abdel Fattah H.M. and Mohamed E.K. 2007. Effect of chitin synthesis inhibitor, lufenuron on the development, haemolymph and antennal sensilla of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *African J. Biol. Sc.*, **3 (2)**: 35-43p.

Balenghien Thomas.(2007).Les moustiques vecteurs de la Fièvre du Nil Occidental en Camargue. *Insectes*, **146** :13-17p.

Barbouche, N., Hajjem, B., Lognay, G., Ammar, M. (2001). Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **5 (2)** : 85-90p.

Bastien, F. (2008). Effet larvicide des Huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion. *Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat*. Université Paul-Sabatier de Toulouse, 78 p.

Beenakers, A. M. T. H., Vander Host, D. G. & Van Marrewijk, W. J. A. (1985). Insect lipids and lipoproteins and their role in physiological process. *Prog. Lipid. Res.*, **24** : 19-67p.

Behroozi Moghadam E., Izadi H., Samih M.A., Moharramipour S. and Mahdian K. 2011. Effect of insect growth regulators, temperature and overwintering on larvae of pistachio white leaf borer, *Ocneria terebintina* Stgr. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Intern. J. Agric. Biol.*, 13: 375-380p.

Belinato T.A., Martins A.J., Lima J.B.P., De Lima-Camara T.N., Peixoto A.A. and Valle D. 2009. Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro., 104 (1): 43-47p.

Belinato T.A., Martins A.J. and Valle D. 2012. Fitness evaluation of two Brazilian *Aedes aegypti* field populations with distinct levels of resistance to the organophosphate temephos. *Mem. Inst.*, Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 107 (7): 916-922p.

Benayad, N. (2008). Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Université Mohammed V – Agdal. Rabat, 63 p.

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

Ben-Yosef, M., Jurkevitch, E. & Yuval, B. (2008). Effect of gut bacteria on nutritional status and reproductive success of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Israel journal of Entomology*. 38 : 143p.

Bouaziz A., Boudjelida H. and Soltani N. 2011. Toxicity and perturbation of the metabolite contents by a chitin synthesis inhibitor in the mosquito larvae of *Culiseta longiareolata*. *Ann. Biol. Res.*, 2 (3): 134-143p.

Bouguerra A. (2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill, en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, 120 p

Bounous, G. (1991). The biological activity of undenatured dietary whey proteins : role of glutathione. *Clin. Invest. Med.*, 14: 296-309p.

Boyer, S. (2006). Résistance Métabolique des Larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat. Université Joseph Fourier – Grenoble I, 78 p.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of Protein utilising the principale dye binding. *Analytic. Biochem.*, 72: 248 -254p.

Briegel, H. (1985). Mosquito reproduction, incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis. *J. Insect. Physiol.*, 31: 15 – 21p.

Burfield, A. P. & Reekie, S. L. (2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *International J. of Aromatherapy.*, 15 (1): 30-41p.

-C-

Cachareul A. 1997. Les moustiques: cycle de developpement, aspects anatomo-physiologiques et regulation du cycle ovarien. *Th. Med.Vet.*, Nantes. 24: 131p.

Callot J., et Helluy J., 1958 – *Parasitologie médicale*. Ed. Médicales Flammarion, Paris, 645 p.

Carnevale P et Robert V. (2009). Les anophèles, Biologie, transmission du plasmodium et lutte anti-vectorielle .Ed.I.R.D. Marseille.389 p.

Cédric, P. (2008). Interactions entre insecticides non pyréthrinoïdes et répulsifs pour la lutte contre *Anopheles gambiae* : Mécanismes, efficacité et impact sur la sélection de la résistance. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Université de Montpellier I, Formation doctorale : Parasitologie, 65 p.

Cetin H., Erler F. and Yanikoglu A. 2006. Larvicidal activity of novaluron, a chitin synthesis inhibitor, against the house fly, *Musca domestica*. *J. Insect Sci.*, 6: 1- 4 p.

Chen C.D., Seleena B., Chiang Y.F. and Lee H.L. 2008. Field evaluation of the bioefficacy of diflubenzuron (Dimilin) against container-breeding *Aedes* sp. mosquitoes. *Trop. Biomed.*, 25: 80-86 p.

Chu, J. & Kemper, J. (2001). MPH Lavender Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/>.

Chino H., Katas H., Dawner R.C. and Hard Takahashi K. 1981. Diacylglycerol, carrying lipoprotein of haemolymph of the American cockroach: purification, characterization and function. *J. Lipid Res.*, 22: 7-15 p.

Clement A.N. 1999. The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour. *CAB International Publishing*, 576 p.

Cotton, G., Anstee, JH. (1991). A biochemical and structural study on the effects of methoprene on fat body development in *Locusta migratoria*. *J. Insect. Physiol.*, 37: 525- 539 p.

Cutler G.C., Scott-Dupree C.D., Tolman J.H. and Harris C.R. 2005. Acute and sublethal toxicity of novaluron, a novel chitin synthesis inhibitor, to *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Manage. Sci.*, 61: 1060–1068 p.

- D-

Dapporto L., Lambardi D. and Turillazzi S. 2008. Not only cuticular lipids: first evidence of differences between foundresses and their daughters in polar substances in the paper wasp *Polistes dominulus* *J. Insect Physiol.*, 54 (1): 89-95p.

Daas, O. (2006). Eude biologique des deux espèces Myriapodes Chilopodes : *Eupolybothrus nudicornis* et *Lithobius forficatus*. Effets de traitement hormonaux et insecticides sur l'ovogénèse. Thèse de Doctorat d'Etat. Université d'Annaba. Algérie. 180 p.

Dannau, M., Leenaers, L., Amichot, M. & Haubruge, E. (2003). Biomarqueurs d'exposition en milieu terrestre : impact d'hydrocarbures halogénés sur l'activité de trois systèmes enzymatiques chez *Drosophila pseudoobscura*. *Environnement, Risque et Santé*, 2 (6) : 344 – 349p.

Djeghader N., Boudjelida H., Bouaziz A. et Soltani N. (2013). Biological effects of a benzoylphenylurea derivative (Novaluron) on larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Advances in Applied Science Research*, 4(4):449-456 p.

Delille L. 2007. Les plantes médicinales d'Algérie. Édition BERTI. Alger, 122p.

Devine W.P., Lubarsky B., Shaw K., Luschnig S., Messina L. and Krasnow M.A. 2005. Requirement for chitin biosynthesis in epithelial tube morphogenesis. *PNAS.*, 102: 17014-17019p.

Downer R.G.H. 1985. Lipid metabolism. In: Kerkut GA, Gilbert L (Eds.), *Comprehensive insect biochemistry, physiology and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 10: 77-113p.

Duchateau G. and Florkin M. 1959. Sur la trehalosemie des insectes et sa signification. *Arch. Insect Physiol. Biochem.*, 67: 306-314p.

-E-

El-Shazly M.M. and Refaie B.M. 2002. Larvicidal effect of the juvenile hormone mimic pyriproxyfen on *Culex pipiens*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.*, 18:321-328p.

- F -

Faraj C., Elkohli 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. *Bull Soc Pathol Exot*, 99(2) :119-121p.

Fanny B. (2008). Effet larvicide des huiles essentielles sur stomoxys calcitrans a la reunion. Thèse de doctorat, Université Paul-Sabatier, Toulouse. 78 p.

Fontoura N.G., Bellinato D.F., Valle D. and Lima J.B.P. 2012. The efficacy of a chitin synthesis inhibitor against field populations of organophosphate-resistant *Aedes aegypti* in Brazil *Mem. Inst., Oswaldo Cruz*, 107p.

Fournet F., Sannier C. and Monteny N. 1993. Effects of the insect growth regulators OMS-2017 and diflubenzuron on the reproductive potential of *Aedes aegypti*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 9: 426-430p.

-G-

Gangishetti U., Breitenbach S., Zander M., Saheb S.K., Müller U., Schwarz H. and Moussian B. 2009. Effects of benzoylphenylurea on chitin synthesis and orientation in the cuticle of the *Drosophila* larva. *Eur. J. Cell Biol.*, 88: 167-180 p.

Guitsevitch, A. V., Monchadski, A. & Sktakel'Berg, A. A. (1974). Fauna of Diptera. U. S. Departement of Commerce National Technical Information. Va. 22-51 p.

Ghoneim K.S., Al-Dali A.G. and Abdel-Ghaffar A.A. 2003. Effectiveness of Lufenuron (CGA-184699) and Diofenolan (CGA-59205) on the general body metabolism of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Curculionidae: Coleoptera). *Pakistan J. Biol. Sci.*, 6 (13): 1125-1129 p.

Ghoneim K.S., Amer M.S., Bream A.S., Al-Dali A.G. and Hamadah Kh.Sh. 2005. Quantitative protein responsiveness of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to certain IGRs and plant extracts. *Egypt. J. Biomed. Sci.*, 17: 218-230 p.

Ghoneim K.S., Hamadah Kh.Sh. and Tanani M.A. 2012. Protein disturbance in the haemolymph and fat body of the desert locust *Schistocerca gregaria* as a response to certain insect growth regulators. *Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci.*, 1: 73-83 p.

Goldsworthy A.C., Mordue W. and Guthkelch J. 1972. Studies on insect adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 18: 306-314 p.

Gomes B, Sousa CA, Novo MT, Freitas FB, Alves R, Côrte-Real AR, Salgueiro P, Donnelly MJ, Almeida AP, Pinto J (2009). Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evol Biol* 9: 262 p.

Gonzalez-Trujano, M.E., Pena, E.I., Martinez, A.L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P. Deciga-Campos, M, Lopez-Munoz,F.J. (2007) Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J Ethnopharmacol.* 111: 476-482 p.

Gourmelon A. and Ahtiainen J. 2007. Developing test guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances- The OECD perspective. *Ecotoxicol.*, 16:161-167 p.

Gupta M. and Gupta A.K. 2013. Experimental analysis of chitin synthesis inhibitors against the larvae of *Euprotis icilia* stoll: longevity and weight loss. *J. Exp. Zool. India*, 16 (2): 583-590 p.

-H-

Habes, D., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J. P. & Soltani, N. (2006). Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica* : Alterations in midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathion S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, 84 : 17-24p.

Habig, W. H., Pabst, M .J. & Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Tranferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

Hamadah Kh.Sh., Ghoneim K.S. and Tanani M.A. 2012. Effect of certain insect growth regulators on the lipid content of some tissues of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *African J. Res.*, 6 (9): 121-128p.

Hamadah Kh.Sh. 2014. Metabolic activity of the chitin synthesis inhibitor, Flufenoxuron, on the desert locust *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *J. Entomol. Zool. Studies*, 2 (1): 87-95p.

Harbach R.f. (2007). The Culicidae (Diptera): areview of taxonomy, classification and phylogeny *zootaxa* 1668 :591-638p.

Hassan H.A. 2009. Efficiency of some new insecticides on physiological, histological and molecular level of cotton leafworm. *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.*, 2 (2): 197-209p.

Haubruge, E. & Amichot, M. (1998). Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. France. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 2 (3):161–174p.

-I-

Ijumba J.N., Mtana R.R. and Suya T.B. 2010. Bio-Efficacy of Novaluron, a Chitin-Synthesis Inhibitor against Larval Stages of *Culex Quinquefasciatus* and *Anopheles Gambiae* *Sensu Lato*. *Europ. J. Sci. Res.*, 47 (3): 484-494p.

Iserin P, Masson M et Restellini J P, 2007. Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins .Ed Larousse, 11p.

-J-

Jacoby, W. B. & Habig, W. H. (1980). Glutathion transferase. In Jacoby, W.B. Enzymatic basis of detoxification. Academic press. New York., 2: 63-94p.

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

Jambulingam P., Sadanandane C., Nithiyananthan N., Subramanian S. and Zaim M. 2009. Efficacy of novalurn against *Culex quiiquefasciatus* in small- and medium- scale trials, India. *J. Amer. Mosq. Cont. Assoc.*, 25 (3): 315-322p.

Jolivet P. (1980). Les insectes et l’homme .Insecte d’importance médicale .Masson eds Pestic.Sc 55.909-918 p.

-K-

Kammaing K.L., Kuhar T.P. and Wimer A. 2012. Effects of the Insect Growth Regulators Novaluron and Diflubenzuron on the Brown Marmorated Stink Bug. *Plant Health Progress*. Online. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2012-1212-01-RS.

Kato N., Mueller C.R., Fuchs J.F., Wessely V., Lan Q. and Christensen B.M. 2006. Regulatory mechanisms of chitin biosynthesis and roles of chitin in peritrophic matrix formation in the midgut of adult *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 1-9p.

Kawooya J.K. and Law J.H. 1988. Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J. Biol. Chem.*, 263: 8740–8747p.

Keeley L.L. 1985. Physiology and biochemistry of fat body. In: Kerkut GA, Gilbert L (Eds.), *Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 3: 211-248 p.

Khan I. and Qamar A. 2011. Biological activity of andalin (flucycloxon), a novel chitin synthesis inhibitor, on Red Cotton Stainer *Dysdercus koenigii* (Fabricius). *Biology and Medicine*, 3 (2): 324-335 p.

Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farine, J.P., Everaerts, C. & Soltani, N. (2005). Effets de l'acide borique sur les profils d'hydrocarbures cuticulaires chez un insecte à intérêt médical, *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae). *J. Soc. Alger. Chim.*, 15 (2): 225-231 p.

Krida G, Diancourt L, Bouattour A, Rhim A, Chermiti B, Failloux AB (2011). Assessment of the risk of introduction to Tunisia of the Rift Valley fever virus by the mosquito *Culex pipiens*. *Bull Soc Pathol Exot* 104(4): 250-259 p.

-L-

Lee, C.Y., Hemingway, J., Yap, H. H. & Chong, N. L. (2000). Biochemical characterization of insecticide resistance in German cockroach, *B. germanica*, from Malaysia. *Medical Veterinary Entomol.*, 14: 11-18.

Lee, H. K., Park, C. & Ahn, Y. J. (2002). Insecticidal activities of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Jap. Soc. Appl. Entomol. Zool.*, 37 (3): 459–464.

Linduska J.J., Ross M., Abbott B., Steele S. and Eastman R. 2001. Colorado potato beetle control on potatoes. *Arthropod Management Tests* 26. Report n°. E51.

Linné C. 1857. *Systema naturae per regna tria naturae*. Edition 10. *Holmia*. (1): 82 p.

Lohmeyer K.H. and Pound J.M. 2012. Laboratory Evaluation of Novaluron as a Development Site Treatment for Controlling Larval Horn Flies, House Flies, and Stable Flies (Diptera: Muscidae). *J. Med. Entomol.*, **49** (3): 647-651 p.

- M -

Madaci, B., Merghem, R., Doumandji, B. & Soltani, N. (2008). Effet du Nerium oleander, laurier-rose, (Apocynacées) sur le taux des protéines, l'activité de l'AchE et les mouvements des vers blancs rhizotrogini, (Coleoptera : Scarabaeidae). *Science et Technologie.*, 73-78p.

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

Maiza A., Rehamnia F., Bensbaa, F., Kilani-Morakchi, S & Aribi, N. (2013). Activité d'un bio-pesticide, le spinosad chez *Blattella germanica*: analyse quantitative des lipides ovariens et effets sur le malondialdéhyde. 2^{ème} Congrès Franco-Maghrébin de Zoologie et 4^{èmes} Journées Franco-Tunisiennes de Zoologiep.

Mansour H. (2011). Evaluation d'une nouvelle molécule le spiromesifène (inhibiteur des lipides), a l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata* : toxicologie, biochimie et activité enzymatique. *Memoire de master, université de Tébessa, Algérie.* 62p.

Martins A.J., Belinato T.A., Lima J.B.P. and Valle D. 2008. Chitin synthesis inhibitor effect on *Aedes aegypti* populations susceptible and resistant to organophosphate temephos. *Pest Manag. Sci.*, **64**: 676-680p.

Mawussi G. (2008). Bilan environnemental de l'utilisation de pesticides organochlorés dans les cultures de coton, café et cacao au Togo et recherche d'alternatives par l'évaluation du pouvoir insecticide d'extraits de plantes locales contre le scolyte du café (*Hypothenemus hampei* Ferrari). *Thèse de Doctorat. Université de Toulouse.* 187 p.

Mbare O., Lindsay S.W. and Fillinger U. 2013. Dose–response tests and semi-field evaluation of lethal and sub-lethal effects of slow release pyriproxyfen granules (Sumilarv®0.5G) for the control of the malaria vectors *Anopheles gambiae* sensu lato. *Malaria Journal*, 12: 94-103p.

Meghlaoui, Z. & Mansouri, K. (2010). Effet d'un bioinsecticide, le spinosad sur *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) : Activité spécifique de la GST et du GSH. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master, Université de Badji Mokhtar, Annaba, 7-21p.

Mervat A., kandil A.F., Ahmed and Hemat Z.M. 2010. Toxicological and biochemical studies of lufenuron, chlorfluazuron and chromafenozide against *Pectinophora gossypiella* (Saunders). *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.*, 4 (1): 37- 47p.

Merzendorfer H., Kim H.S., Chaudhari S.S., Kumari M., Specht C.A., Butcher S., Brown S.J., M.J., Beeman R.W., Kramer K.J. and Muthukrishnan S. 2012. Genomic and proteomic studies on the effects of the insect growth regulator diflubenzuron in the model beetle species *Tribolium castaneum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 264-276p.

Morakchi-Kilani, S. (2007). Effet de trois groupe de pesticides sur differents aspects physiologiques des adultes de *Blattella germanica* : reproduction, biomaqueurs enzymatiques et hydrocarbures cuticulaires. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Université Badji Mokhtar de Annaba, pp. 45-68p.

Morsli, M. S. (1994). Effet d'un dérivé de la benzoylphenylurée, le Dimilin, sur la physiologie de *Penaeus kerathurus* (Crustacea : Decapoda) : Etude structurale et biologique. Magistère en Physiologie animale, option: Ecotoxicologie, Université d'Annaba. Algérie

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

Moutailler, S., G. Krida, F. Schaffner, M. Vazeille and A.B. Failloux, 2008. *Potential vectors of rift valley fever virus in the mediterranean region.* Vector Borne Zoonotic Dis., 8: 749-753 p.

Moussian B., Schwarz H., Bartoszewski S. and Nüsslein-Volhard C. 2005. Involvement of chitin in exoskeleton morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *J. Morphol.*, 264: 117-130 p.

-N-

Nwankwo E.N., Okonkwo N.J., Ozumba N.A. and Okafor E.G. 2011. Comparative Studies on the Larvicidal Action of Novaluron (Mosquiron 100EC) and Moringa Oliefera (LAM) Seed Oil against *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Larvae. *International Multi-Disciplinary Journal, Ethiopia*. **5 (1)**: 424-437p.

-P-

Paul ,I. (1996).Laarouse des plantes medicinales. Edition andrewchavallier .2 émeédition .116p.

-Q-

QUEZEL P., SANTA S(1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris, (1963) .600p.

-R-

Rehimi N. and Soltani N. 1999. Laboratory evolution of alsystine. A chitin synthesis inhibitor agonist *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Effects on development and cuticle secretion. *J. Appl. Ent.*, **123**: 437-441p.

Rehimi N. and Soltani N. 2002. Laboratory Evaluation of Andalin, an Insect Growth Regulator Interfering with Cuticle Deposition, against Mosquito Larvae. *Revue Scientifique et Technique*. **18**: 106-108p.

Resseguier Pierre. (2011). Contribution à l'étude du repas sanguin de culex pipiens pipiens. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Université Paul – Sabatier de Toulouse.80p.

Reusken C., De Vries A., Ceelen E., Beeuwkes J. and Scholte E.J. 2011. A study of the circulation of West Nile virus, Sindbis virus, Batai virus and Usutu virus in mosquitoes in a

potential high-risk area for arbovirus circulation in the Netherlands De Oostvaardersplassen. *Eur. Mosquito Bull.*, 29: 66-81p.

Rhodain F., Perez C. (1985). Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Maloine .SA Editeur 27, Rue de l'école médecine 75006, Paris .443p.

Rodriguez-Ortega M.J., Grosvik B.E., Rodriguezariza A., Goksoyr A. and Lopez-Barea J. 2003. Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaeleagallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*, **3**: 1535–1543p.

Rouibi, A. (2002). Evaluation d'un mimétique des ecdystéroïdes (RH-0345) sur *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) : Aspects morphométriques et Biochimiques. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister, Université de Badji Mokhtar- Annaba. 95p.

-S-

Saci-Messiad, R. (2006). Effet d'un régulateur de croissance, l'azadrachine chez *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) : physiologie, activité enzymatique et comparaison de la détoxification avec d'autre groupes de pesticides. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master, Université de Badji Mokhtar- Annaba. 94 p.

Salokhe S.G., Mukherjee S.N., Deshpande S.G. and Matthad J.R. 2010. Effect of sub lethal concentrations of insect growth regulator, Lufenuron on larval growth and development of *Aedes aegypti*. *Current Sci.*, **99 (9)**: 1256- 59p.

Salokhe S.G., Deshpandeb S.G., Mukherjib S.N., Pakhale K. and Maniyarc A.B. 2013. IGR, Lufenuron, alters chitin and total soluble protein content of *Aedes aegypti* larvae during development. *Int. J. Curr. Sci.*, **7 (E)**: 134-138p.

Savage H.M, Miller B. (1995). House Mosquitoes of the U.S.A., *Culex pipiens* Complex. *Wing Beats*, 6 : 8-9p.

Seguy E. 1955 - *Introduction à l'étude Biologique et Morphologique des insectes Diptères*. Ed

Muséum Nationale, Rio-de-Janeiro, 260 p. **Soltani N., et Rehim N., Beldi H. & Bendali F.** (1999). Activité du triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, 35 : 502 – 508p.

Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyeck C., New Hall. and Feidman L. 1966. A method for the sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analyt. Biochem.*, 19: 415-528.

Sifi, K. (2009). Biosurveillance de la qualité des eaux du Golf d'Annaba : croissance, composition biochimique et dosage des biomarqueurs du stress environnementale chez *Donax trunculus* (Mollusque : Bivalve). Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université de Annaba. 229 p.

Soltani N. and Soltani-Mazouni N. 1992. Diflubenzuron and oogenesis in the codling moth, *Cydia pomonella* (L.). *pestic. Sci.*, 34: 257-261p.

Soltani-Mazouni N., Khebbeb M.E.H. and Soltani N. 1999. Production d'ecdystéroïdes ovariens durant la maturation des oocytes chez *Tenebrio molitor*. *Ann. Soc. Entomol.*, France, 35: 82-86p.

Soltani-Mazouni N., Taibi F., Berghiche H., Smagghe G. and Soltani N. 2001- RH-0345 restored partly the effects induced by KK-42 on reproductive events in mealworms *Med . Fac Landbouww. Univ. Gent*, 66 (2a): 437-443p.

Steele J. E. (1981). The role of carbohydrate metabolism in physiological function, 103-133p.

-T-

Tanani M.A., Ghoneim K.S. and Hamadah Kh.Sh. 2012. Comparative effects of certain IGRs on the carbohydrates of hemolymph and fat body of *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae). *Florida Entomologist*, 95 (4): 928-935p.

Tchoumboungang F., Dongmo P. M. J., Sameza M. L., Mbanjo E. G. N., Fotso G. B. T.,

Zello P. H. A. & Menut C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1): 77-84p.

Thenmozhi C., Vignesh V., Thirumurugan R. & Arun, S. (2011). Impacts of malathion on mortality and biochemical changes of freshwater fish *Labeo rohita*. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, 8 (4) : 387-391p.

Tine-Djebbar, F. (2009). Bioécologie des moustiques de la région de Tébessa et évaluation de deux régulateurs de croissance (halofenozide, méthoxyfenozide) à l'égard de deux espèces de moustiques *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*: toxicologie, morphométrie, biochimie et reproduction. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université Badji Mokhtar de Annaba. 168 p.

Trari B, Dakki M, Himmi O, El Agbani MA (2002). Les moustiques (Diptera: Culicidae) du Maroc. Revue bibliographique (1916-2001) et inventaire des espèces. *Bull Soc Pathol Exot* 95(4): 329-334p.

Troy S., Anderson W.A. and Spielman A. 1975. Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50 (B): 457-461p.

-U-

Urquhart G.M., Armour J., Duncan J.L. (1996). *Veterinary Parasitology*, 2^o Edition, Oxford:Blackwell sciences, 307 p.

-V-

Valles S. M., Koehler P. G. & Brenner R. J. (1999). Comparative insecticide susceptibility and detoxification enzymes activities among pestiferous Blattodea. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124: 227-232p.

Van Hensden H.C. and Law J.H. 1989. An insect transport particule promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biochem.*, 246: 17287-17292p.

-W-

Wall R., Shearer D. (1997). Veterinary entomology. London : Chapman & Hall, 439 p

Wiens A. W. & Gilbert T. (1967). Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in *Leucophaco maderae*. *J. Insect. Physiol.*, 13: 779 -794p.

Wigglesworth. (1972). The principal of Insect physiology. Seventh Edition. Chapman and Hall, 827p.

Wilson J.D., Morris A.J., Arroyo B.E., Clark S.C. and Bradbury R.B. 1999. A review of the abundance and diversity of invertebrate and plant foods of granivorous birds in northern Europe in relation to agricultural change. *Agricul. Ecosyst. Environ.*, **75**:13-30p.

Wolfgang D., Werner R. (1988). Guide des insectes .Traduction et adaptation Michel Cusin. Paris: 180-208p.

Wyatt G. R. (1967). The biochemistry of insect haemolymph. *A. Rev. Ent.*, 6:75 – 102p.

-Z-

ZABEIROU ; HACHIMOU (2005). Étude comparative entre les Huiles essentielles de la Menthe Verte (*Mentha Spicata L*) et de la Poivree (*Mentha Piperita L*) dans la région d’Ouargla .Mémoire de DES Biochimie –Université de Kasdi Merbbah _Ouargla ,16p.

Zhou G. and Miesfeld R.L. 2009. Energy metabolism during diapause in *Culex pipiens* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 55: 40-46p.

Zhang X., Zhang J.Z., Park Y. and Zhu K.Y. 2012. Identification and characterization of two chitin synthase genes in African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 42: 674-682p.

Zhu Q., He Y., Yao J., Liu Y., Tao L. and Huang Q. 2012. I Effects of sublethal concentrations of the chitin synthesis inhibitor, hexaflumuron, on the development and hemolymph physiology of the cutworm, *Spodoptera litura*. *J. Insect Sci.*, 12-27p.