

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la vie  
Département de Biologie des êtres vivants



MEMOIRE DE MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Santé et Environnement



Thème :

**Etude de l'effet des huiles essentielles d'une plante larvicide,  
*Laurus nobilis* sur une espèce de moustique, *Culex pipiens*:  
Toxicité, morphométrie, biochimie et biomarqueurs.**

Présenté par :

**Melle Kouider Sofia**

**Melle Attia Laila**

Devant le jury :

Dr. TINE Samir	MCA	Université de Tébessa	Président
Dr. TINE-DJEBBAR Fouzia	MCA	Université de Tébessa	Rapporteur
Dr. BOUZERAA Hayette	MCB	Université de Tébessa	Examineur

Date de soutenance : Le 31 Mai 2016

Note : .....

Mention : .....

## *Dédicace*

*Avec un énorme bonheur et une extrême joie  
je dédie ce modeste travail à tous ceux qui j'aime et que j'apprécie énormément  
leur aide et leur soutien durant ma vie*

*À*

*Mes chers parents*

*À ma sœur **Hiba***

*À mon cher fiancé **Walid Tatar***

*À ma famille et mes amies*

*À mon cher Encadreur **Dr Tine-Djebbar F.***

*Merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre disponibilité  
permanente.*

***Sofia Kouider***



## *Dédicace*

*Avec un énorme bonheur et une extrême joie  
je dédie ce modeste travail à tous ceux qui j'aime et que j'apprécie énormément  
leur aide et leur soutien durant ma vie*

*À*

*Mes chers parents*

*À mes sœurs **Asma, Abir***

*À mes chers oncle **Mohamed** et **Mourad** – mon cher frère **Oussama***

*À ma famille et mes amies*

*À mon cher Encadreur **Dr Tine-Djebbar F.***

*Merci pour votre patience, Vos efforts intenses, et votre disponibilité  
permanente.*

*Laila Attia*



## Remerciements

*Nous tenons d'abord à remercier le tout puissant, notre DIEU, le clément et le miséricordieux, de nous avoir donné la clair voyance et la persévérance, pour mener à terme ce travail, prière et salut sur notre prophète MOHAMED.*

*A nos parents et tous nos frères et sœurs de leur soutien et leur grande affection et les grands efforts pour nous aider à réaliser ce travail.*

*Nos plus vifs remerciements à notre professeur et encadreur Dr. Tine-Djebbar F, son savoir, son ouverture d'esprit, ses conseils ont marqué à jamais notre pensée.*

*Un grand remerciement aux honorables membres du jury :*

*Dr. Tine SAMIR d'avoir accepté la présidence du jury de notre travail, qu'il trouve ici toutes nos expressions respectueuses.*

*Dr. Bouzeraa Hayette d'avoir accepté de faire partie des membres du jury*

*Nos remerciements s'adressent également à ceux qui ont contribué*

*De loin ou de près à la réalisation de ce travail*

*Merci* 

*Kouider Sofia, Attia Laila*

# Sommaire

# Sommaire

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>2. MATERIEL ET METHODES</b> .....	4
2.1. Techniques d'élevage à l'état larvaire.....	4
2.2. Présentation de l'espèce <i>Culex pipiens</i> .....	4
2.3. Présentation de <i>Laurus nobilis</i> (Linné, 1753).....	6
2.4. Collecte de la plante et extraction des huiles essentielles .....	7
2.5. Tests de toxicité .....	9
2.6. Etude morphométrique.....	9
2.7. Extraction et dosage des métabolites .....	10
2.7.1. Dosage des protéines totales .....	12
2.7.2. Dosage des glucides totaux .....	12
2.7.3. Dosage des lipides totaux .....	13
2.8. Dosage des biomarqueurs.....	13
2.8.1. Dosage du glutathion.....	13
2.8.2. dosage des glutathion S-transférases.....	16
2.8.3. Activité de l'acétylcholinestérase.....	18
2.9. Analyse statistique.....	20
<b>3. RESULTATS</b> .....	22
3.1. Rendement en huiles essentielles de <i>Laurus nobilis</i> .....	22
3.2. Essais toxicologiques.....	22
3.2.1. Toxicologie des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> à l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 24 heures. ....	22
3.2.2 Toxicologie des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 48 heures.....	23
3.2.3. Toxicologie des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 72 heures ...	24
3.3. Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> sur la croissance pondérale de <i>Cx pipiens</i> .....	25
3.4. Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> sur la croissance linéaire de <i>Cx pipiens</i> .....	27
3.4.1. Largeur du thorax.....	27
3.4.2. Volume corporel.....	28
3.5. Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> sur la composition biochimique de <i>Cx pipiens</i> .....	30
3.5.1. Contenu en glucides totaux.....	30
3.5.2. Contenu en lipides totaux.....	31
3.5.3. Contenu en protéines totales.....	33
3.6. Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> sur les biomarqueurs.....	34
3.6.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE.....	35
3.6.2. Effet sur le taux du glutathion.....	36
3.6.3. Effet sur l'activité spécifique des GSTs.....	37
<b>4. DISCUSSION</b> .....	41
4.1. Rendement en huile essentielle.....	41
4.2. Toxicité des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> .....	41
4.3. Effet sur la croissance.....	43
4.4. Effet sur la composition biochimique.....	44
4.5. Effet sur les biomarqueurs.....	46
4.5.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE.....	47
4.5.2. Effet sur l'activité spécifique des GSTs.....	49
4.5.3. Effet sur le taux de la GSH.....	50
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	52
<b>6. RESUME</b> .....	54
<b>7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	58

Liste  
Des  
Tableaux

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Dosage des protéines totales chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>12</b>
Tableau 02	Dosage des glucides totaux chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>12</b>
Tableau 03	Dosage des lipides totaux chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.	<b>13</b>
Tableau 04	Effet des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures ( $m \pm \text{sem}$ , n=3 répétitions comportant chacune 20 individus).	<b>22</b>
Tableau 05	Efficacité des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement excuviées de <i>Cx pipiens</i> à 24heures : analyse des probits.	<b>23</b>
Tableau 06	Effet des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 48 heures ( $m \pm \text{sem}$ , n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).	<b>23</b>
Tableau 07	Efficacité des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 48 heures : analyse des probits.	<b>24</b>
Tableau 08	Effet des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 72 heures ( $m \pm \text{sem}$ , n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).	<b>24</b>
Tableau 09	Efficacité des huiles essentielles extraites de <i>Laurus nobilis</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 72heures : analyse des probits.	<b>25</b>
Tableau 10	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg/individu) des larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ , n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).	<b>26</b>
Tableau 11	Effet des H,E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ , n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison	<b>27</b>

	des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	
Tableau 12	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le volume corporel (mm <sup>3</sup> ) des larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> (m±sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>29</b>
Tableau 13	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en glucides totaux (µg/individu) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> (m±sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>30</b>
Tableau 14	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en lipides totaux (µg/individu) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes (m±sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>32</b>
Tableau 15	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales (µg/individu) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes (m±sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>33</b>
Tableau 16	Effets des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur l'activité spécifique de l'AChE (µM/min/mg de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>35</b>
Tableau 17	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le taux du glutathion GSH (nM/mg protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	<b>37</b>
Tableau 18	Effet des H.E de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéine) chez les larves du quatrième stade au cours de différentes périodes (m ± sem, n=3 répétitions comportant chacune 20	<b>38</b>

	individus) (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).	
--	--	--

Liste  
Des  
Figures

## Liste des figures

Figure	Titre	Page
Figure 01	Sites d'élevage (Photo personnelle).	05
Figure 02	Techniques d'élevage (Photo personnelle)	05
Figure 03	L'arbuste de <i>Laurus nobilis</i> (Forest & Kim Starr, Wikipédia).	07
Figure 04	Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger (Photo personnelle).	08
Figure 05	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko <i>et al</i> , 1967).	11
Figure 06	Extraction et dosage du glutathion (GSH) (Weckberker & Cory, 1988).	15
Figure 07	Extraction et dosage des glutathion S-transférases (Habig <i>et al.</i> , 1974).	17
Figure 08	Extraction et dosage de l'acétylcholinestérase (Ellman <i>et al.</i> , 1961).	19
Figure 09	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg/individu) des larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS : Différence non significative).	26
Figure 10	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves 4 chez <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS: Différence non significative ( $p>0,05$ ); *: Différence significative ( $p<0,05$ )).	28
Figure 11	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le volume corporel ( $mm^3$ ) des larves du quatrième stade chez <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS : Différence non significative ; *: Différence significative ( $p<0,05$ )).	29
Figure 12	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en glucides totaux ( $\mu g$ /individu) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS : Différence non significative).	31
Figure 13	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en lipides totaux ( $\mu g$ /individu) chez les individus du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS : Différence non significative).	32
Figure 14	Effet des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm sem$ , $n=3$ ) (NS :	34

	Différence non significative).	
Figure 15	Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Laurus nobilis</i> sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ , $n=3$ ) (*: Différence significative ( $p<0,05$ ); (NS: Différence non significative ( $p>0,05$ )).	36
Figure 16	Effets des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50), sur le taux du glutathion ( $\text{nM}/\text{mg}$ de protéine) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> ( $m \pm \text{sem}$ , $n=3$ ) (**: Différence hautement significative ( $p<0,01$ ); NS: Différence non significative ( $p>0,05$ )).	37
Figure 17	Effets des H.E extraites de <i>Laurus nobilis</i> (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine) chez les larves du quatrième stade de <i>Culex pipiens</i> à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ , $n=3$ ).	39

Liste  
Des  
Abréviations

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**CL50** : Concentration létale de 50% de la population

**CL90** : Concentration létale de 90% de la population

**H.E** : huile essentielle

**GST** : glutathion S-transférase

**GSH** : glutathion S-déshydrogénase (glutathion réduit).

**ACh** : acétylcholine

**AChE** : acétylcholinestérase

**trs** : tours

**1V/1V** : deux solutions avec un même volume

**m** : moyenne

**SEM** : écart- moyen

**n** : nombre de répétitions

**p** : coefficient de signification

**ppm**: partie par million

# Introduction

## 1. INTRODUCTION

Les insectes sont les premiers Arthropodes, à avoir peuplé la terre. Ils constituent le groupe d'êtres vivants numériquement le plus important, puisqu'ils regroupent environ les trois quarts des espèces animales décrites à ce jour (Gourmelon & Ahtiainen, 2007).

Les insectes sont pratiquement indispensables au bon fonctionnement de tous les écosystèmes, la plupart sont inoffensifs, certains ont un intérêt économique, par contre d'autres tels que les diptères hématophages ont un impact sur la santé humaine et animale (Maquardt, 2005). Ces diptères en raison de leur hématophagie occupent une place toute particulière à cause des nuisances considérables qu'ils peuvent occasionner, mais surtout à cause de leur rôle de vecteur potentiel de divers agents pathogènes (virus, bactéries, protozoaires, etc...) (Takken & Knols, 2007 ; Mavoungou *et al.*, 2008).

Parmi ces diptères, les Culicidae qui sont, sans doute, les plus connus et les plus redoutés en raison de leur importance médicale et vétérinaire (Harwood & James, 1979; Peters, 1992; Service, 1993; Anonyme, 2005; Rueda, 2008; Manguin & Boëte, 2011; Versteirt *et al.*, 2012), et la nuisance générée par leur prolifération particulièrement dans les régions urbaines et touristiques (Schaffner *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2010).

Les moustiques sont les vecteurs de plusieurs agents pathogènes tels que: les parasites, les microfilaires et les arbovirus (Braks *et al.*, 2011; Coosemans *et al.*, 2011; Gouagna *et al.*, 2012; Medlock *et al.*, 2012; Jolyon *et al.*, 2012), transmettant à l'homme et aux animaux domestiques diverses maladies telles que le paludisme (655 000 morts) (WHO, 2011); les filarioses lymphatiques (120 millions de personnes atteints), la dengue (OMS, 2007), le chikungunya et l'infection par le virus du Nil occidental.

Pour toutes ces raisons pathogéniques, l'homme a utilisé plusieurs moyens de lutte qui sont pour la plupart des insecticides chimiques (Ahmad *et al.*, 2009; Tolle, 2009; Becker *et al.*, 2010). En effet, en plus de leur coût élevé qui entrave le développement socio-économique, ils peuvent être à l'origine de divers problèmes environnementaux tels que la pollution (Ishaaya & Horowitz, 1998; Gagne *et al.*, 1999; Paoletti & Pimentel, 2000; Kielak *et al.*, 2011), l'apparition d'espèces résistantes (Rodriguez *et al.*, 2002; Konan *et al.*, 2003; Hemingway *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2007; Asidi *et al.*, 2012), et l'atteinte des organismes non visés (Amonkar *et al.*, 1988). De ce fait, des méthodes alternatives plus accessibles, sélectives et non polluantes ont été développées telles que les pesticides d'origine végétale (encore appelés bio-insecticides).

Plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées (Philogéne *et al.*, 2008), dont 344 espèces recensées ont un pouvoir anti Culicidien (Sukumar *et al.*, 1991). Les Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Lamiaceae et Canelleceae sont les principales familles les plus prometteuses comme source de bioinsecticides (Benayad, 2008).

Le pouvoir insecticide des extraits de plantes varie non seulement en fonction de l'espèce végétale, de l'espèce de moustiques, de la répartition géographique, mais aussi de la technique d'extraction adoptée et du solvant utilisé lors de l'extraction (Ghosh *et al.*, 2012). De nombreuses études ont démontré l'effet répulsif, larvicide, adulticide, anti oviposition ou inhibiteur de croissance des huiles essentielles extraites de ces plantes (Carvalho *et al.*, 2003; Cavalcanti *et al.*, 2004; Ansari *et al.*, 2005 ; Bastien, 2008).

Ce travail propose donc d'étudier l'efficacité des huiles essentielles extraites d'une plante, *Laurus nobilis* à l'égard d'une espèce de moustique, *Culex pipiens*, la plus répandue dans la région de Tébessa (Tine-Djebbar *et al.*, 2016). Plusieurs aspects ont été déterminés :

1. Aspect toxicologique pour déterminer les concentrations létales (CL50 et CL90) des huiles essentielles de *Laurus nobilis* à l'égard des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Culex pipiens* à 24, 48 et 72heures.
2. Aspect morphométrique des larves 4 témoins et traitées avec une concentration sous létale (CL25) et une concentration létale (CL50) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures).
3. Aspect biochimique des larves 4 témoins et traitées (CL25 et CL50) de *Culex pipiens* par la détermination du contenu en protéines, glucides et lipides au cours de la même période.
4. Biomarqueurs de neurotoxicité, AChE et de détoxication, les glutathions S-transférases (GSTs) et son cofacteur, le glutathion réduit (GSH) après traitement avec deux concentrations (CL25 et CL50).

Matériel

Et

Méthodes

## 2. MATERIEL ET METHODES

Le présent travail consiste à évaluer l'activité des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation de la partie aérienne de *laurus nobilis* cultivé dans la région de Tébessa, à l'égard de *Culex pipiens*, agent de nuisance. Plusieurs aspects ont été étudiés : la toxicité, la morphométrie, la biochimie et les biomarqueurs chez les larves du quatrième stade.

### 2.1. Présentation de l'espèce *Culex pipiens*:

Le matériel biologique est représenté par *Culex pipiens*, l'espèce de moustique la plus abondante dans la région de Tébessa (Tine-Djebbar *et al.*, 2016). C'est un moustique capable de coloniser différents biotopes, grâce à sa forte capacité d'adaptation (Savage & Miller, 1995). Cette espèce est très abondante pendant les mois d'été et d'automne, les imagos femelles hivernent dans les caves, étables, grottes et autres abris naturels. *Culex pipiens* est souvent appelé : moustique domestique.

Les diptères du genre *Culex* sont des agents nuisant 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; Krida *et al.*, 2011; Reusken *et al.*, 2011).

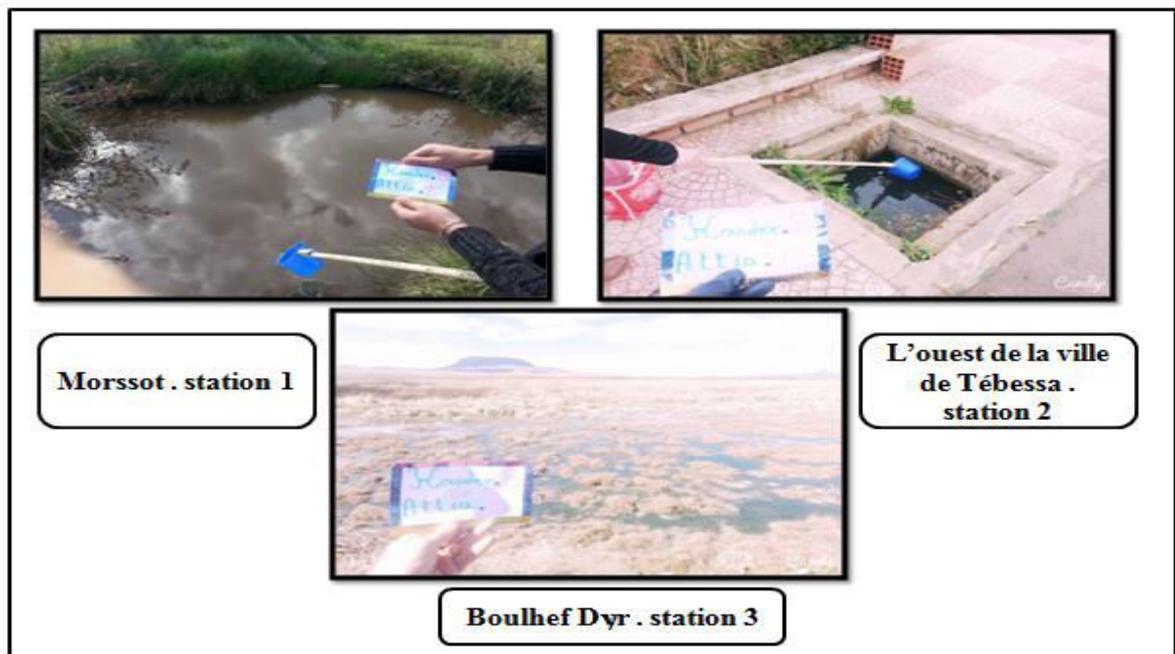
La position systématique de cette espèce est la suivante :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Classe : Insecta
- Ordre : Diptera
- Famille : Culicidae
- Sous-famille : Culicinae
- Genre : *Culex*
- Espèce : *Culex pipiens* Linné (1758).

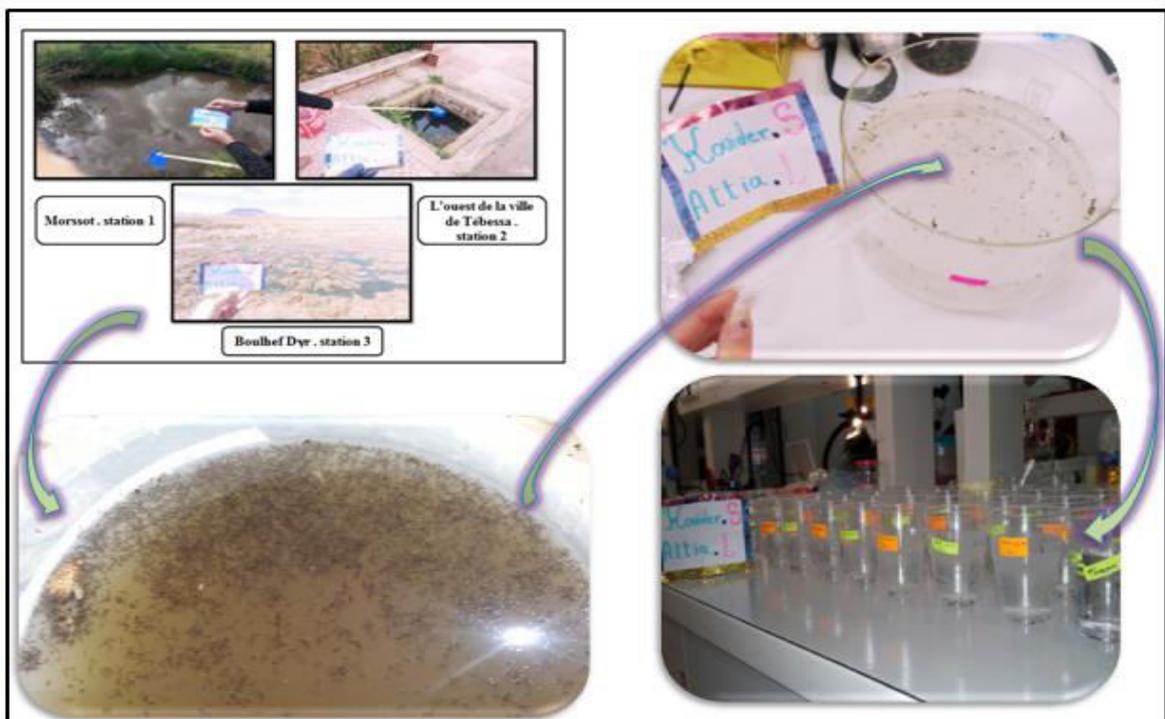
### 2.2. Techniques d'élevage à l'état larvaire

Les œufs et les larves de moustiques sont récoltés de 3 sites d'échantillonnages non traités de la ville de Tébessa (Fig. 01). Les larves sont élevées au laboratoire dans des récipients en plastique contenant 150 ml d'eau déchlorurée à une température ambiante (25°C) et nourries avec 0,04 g du mélange biscuit 75% - levure 25% (Soltani & Rehim, 1999) (Fig.02). L'eau

est renouvelée chaque deux jour. Le régime alimentaire joue un grand rôle dans la fécondité car les protéines permettent à la femelle de pondre plus d'œufs par rapport aux femelles nourries de sucre seulement (Wigglesworth, 1972).



**Figure 01 :** Sites d'élevage (Photo personnelle).



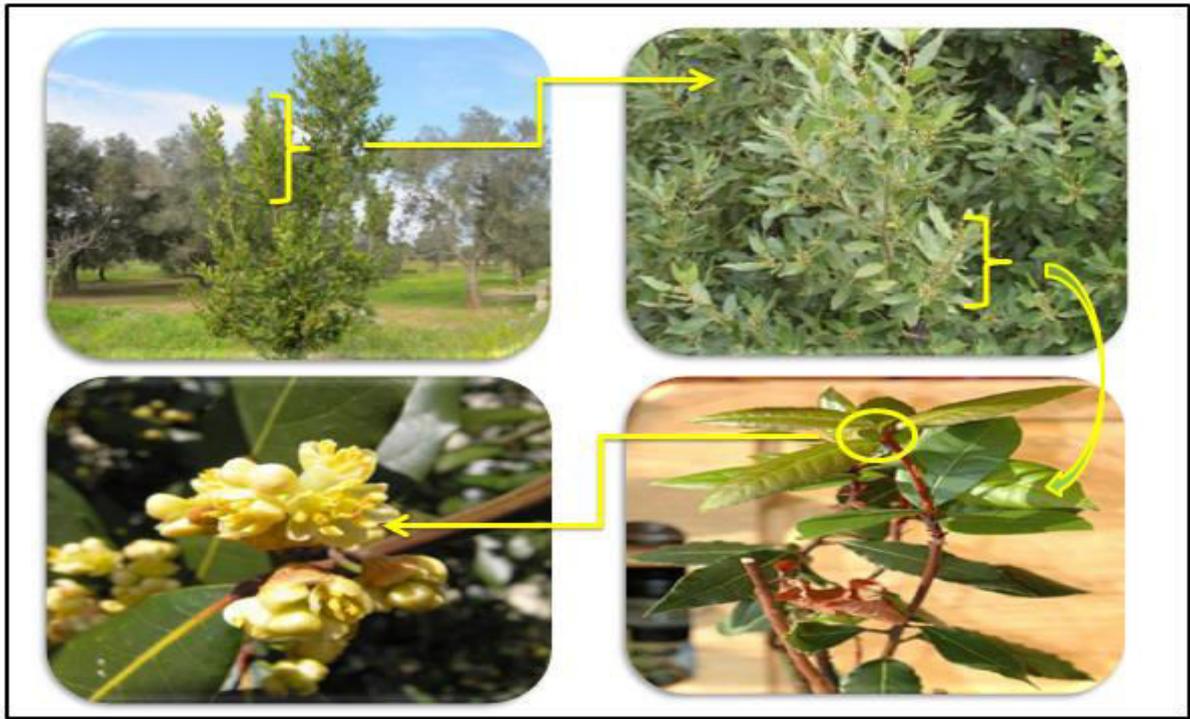
**Figure 02 :** Techniques d'élevage (Photo personnelle)

### 2.3. Présentation de *Laurus nobilis* (Linné, 1753):

Le laurier est un [arbuste](#) mesurant de 2 à 6 m et jusqu'à 15 m de haut, à [tige](#) droite et grise dans sa partie basse, verte dans le haut. Les [feuilles](#) de forme lancéolée, alternes, coriaces, à bord ondulé, sont vert foncé sur leur face supérieure et plus clair à la face inférieure. Elles dégagent une odeur aromatique quand on les froisse. Les [fleurs](#), blanchâtres, groupées par 4 à 5 en petites [ombelles](#), apparaissent en mars-avril. C'est une plante [dioïque](#) : les fleurs mâles et femelles sont sur des pieds séparés. Le [fruit](#) est une petite [drupe](#) ovoïde, noir violacé et nue (fig. 03).

La position systématique de cette plante est la suivante :

- Règne : Plantae
- Sous règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Classe : Magnoliopsida
- Sous classe : Magnoliidae
- Ordre : Lurales
- Famille : Lauraceae
- Genre : *Laurus*
- Espèce : *Laurus nobilis* (linné, 1753)



**Figure 03 :** [Arbuste](#) de *Laurus nobilis* (Forest & Kim Starr, Wikipédia).

#### **2.4. Collecte de la plante et extraction des huiles essentielles :**

La matière végétale (La plante de laurier) destinée à l'hydrodistillation pour l'obtention des huiles essentielles a été récoltée durant la période janvier-avril, 2016. Elle est originaire de la région de Tébessa (nord Est d'Algérie) à partir de différentes stations de la ville. Fraîchement collectée, la plante a été séchée à l'ombre et dans un endroit sec et aéré.

Les huiles essentielles (H.E) sont extraites à partir de la partie aérienne de *laurus nobilis* (Fig. 05). Une biomasse de 50g de matériel végétal et 500 ml d'eau distillée est soumise à une hydrodistillation en utilisant un montage d'hydrodistillation CLEVANGER durant 3 heures (Fig. 04). L'H.E recueillie par décantation à la fin de la distillation est ensuite conservée à 4°C dans des petits flacons bien fermés en verre ombré avant son utilisation.

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante. Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé selon la formule suivante :

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

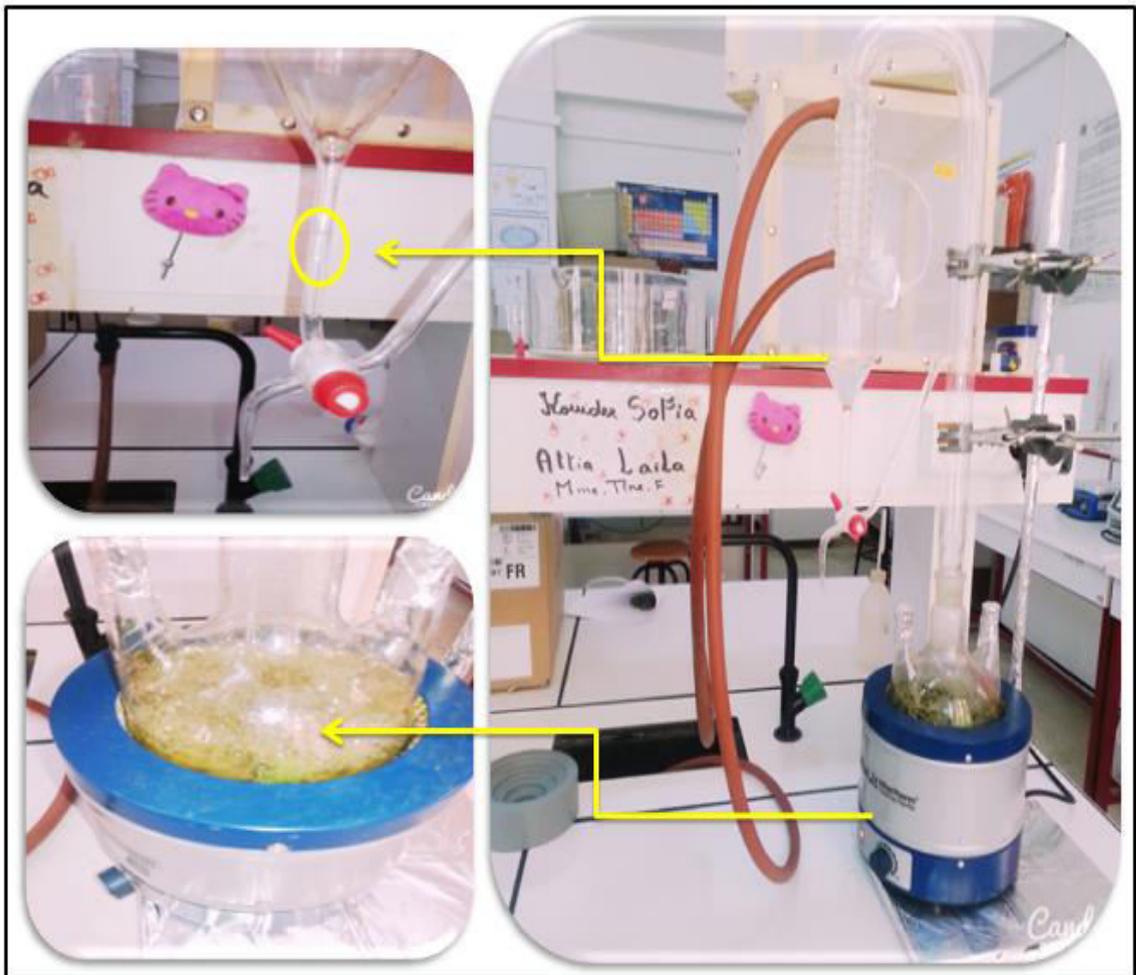
Ou

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

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 04** : Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger (Photo personnelle)

## **2.5. Tests de toxicité :**

Une étude toxicologique a été menée chez *Culex pipiens* afin de mettre en évidence l'efficacité des huiles essentielles de *Laurus nobilis* et de définir les concentrations létales (CL50 et CL90).

L'essai est conduit en utilisant différentes concentrations : 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 150 ppm. Pour chaque concentration, trois répétitions ont été réalisées, comportant chacune 20 individus. Par ailleurs, une série témoin est conduite en parallèle. Après 24 heures de traitement, les larves sont rincées puis placées dans de nouveaux récipients contenant de l'eau propre et de la nourriture. Le suivi des individus témoins et traités a été effectué au cours de différentes périodes : 24, 48 et 72h après traitement.

Les pourcentages de la mortalité observée sont corrigés par la formule d'Abbott, (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et de connaître la toxicité réelle du biopesticide. La détermination des concentrations létales (CL50 et CL90) a été faite grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4.

## **2.6. Etude morphométrique :**

Plusieurs paramètres morphométriques ont été pris en considération pour les larves du quatrième stade témoins et traitées à CL25 (63,09ppm) et CL50 (75.79ppm).

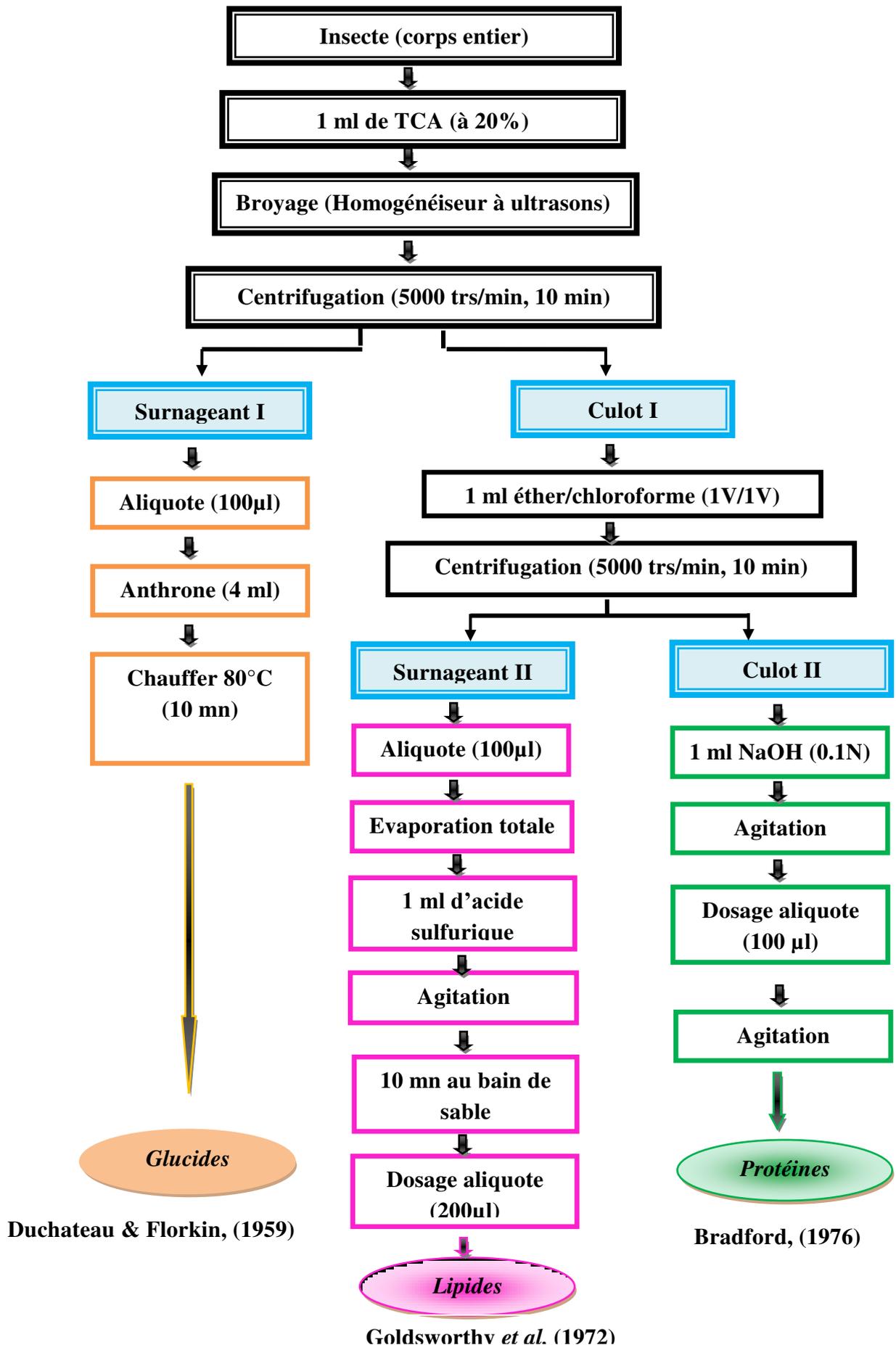
- Poids des individus.
- Largeur du thorax.
- Volume corporel des larves évalué à partir de la valeur cubique de la largeur du

thorax (Timmermann & Briegel, 1998).

Les mensurations ont été réalisées à l'aide d'un micromètre gradué et une loupe binoculaire préalablement étalonnée.

## **2.7. Extraction et dosage des métabolites :**

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon le procédé de (Shibko *et al.*, 1966), et les principales étapes sont résumées dans la Figure 5. Les échantillons (larves du quatrième stade de *Cx pipiens*) sont placés dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyés. Après une première centrifugation (5000 trs / min, 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 de la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon Bradford, (1976).



**Figure 05 :** Extraction des glucides, protéines et lipides totaux (Shibko *et al.*, 1967).

### 2.7.1. Dosage de protéines totales :

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de Bradford (1976) dans une fraction aliquote de 100  $\mu$ l à laquelle on ajoute 4 ml de réactif du bleu brillant de comassie (BBC) G 250 (Merck). 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 (BSA) titrant 1 mg/ml (Tableau 1).

**Tableau 01:** Dosage des protéines totales chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu$ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité d'albumine ( $\mu$ g)	0	20	40	60	80	100

### 2.7.2. Dosage des glucides totaux :

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon la méthode de Duchateau & Florkin (1959). Cette méthode consiste à additionner 100  $\mu$ l 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 gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml) (Tableau 2)

**Tableau 02:** Dosage des glucides totaux chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose ( $\mu$ l)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée ( $\mu$ l)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de glucose ( $\mu$ g)	0	20	40	60	80	100

### 2.7.3. Dosage des lipides totaux :

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de Goldsworthy *et al.* (1972) en utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de gamme étalon auxquelles 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 µl 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. 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 et on ajoute 1 ml d'éther chloroforme (1V/1V) (Tableau 3).

**Tableau 03 :** Dosage des lipides totaux chez les moustiques : 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

### 2.8. Dosage des biomarqueurs :

Les larves du quatrième stade (L4) des séries témoins et traitées aux huiles essentielles (CL25: 63,09 ppm et CL50: 75,79 ppm à 24 heures) ont fait l'objet d'un dosage de l'acétylcholinestérase (AChE), des glutathion S-transférases (GST) et du glutathion (GSH) à différentes périodes après traitement : 24, 48 et 72 heures. Par ailleurs, le contenu en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminé, afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques et le taux du glutathion.

#### 2.8.1. Dosage du glutathion

Le glutathion (GSH) est un composé thiol constitué d'une succession de trois acides aminés : l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Il joue un rôle antioxydant. Dans les conditions normales, le glutathion se trouve, soit sous forme réduite et libre (GSH) soit sous la forme oxydée (GSSG) ou bien lié à des protéines (GSS-prot) ou à des résidus

appropriés comme le coenzyme A, la fonction thiol lui confère ses principales propriétés biochimiques.

Les larves du quatrième stade (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées à la CL25 et la CL50 sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) puis pesées. Elles sont ensuite homogénéisées dans une solution 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. L'homogénat (800 µl) additionné d'acide sulfosalicylique ASS (200 µl) est vortexé et laissé pendant 15 min dans un bain de glace. Après centrifugation (1000 trs/ mm pendant 5 min), le surnageant est récupéré et utilisé comme source d'enzyme (Fig. 06).

Le dosage est réalisé selon la méthode de Weckberker & Cory, (1988) comme la suite: Une aliquote de 500 µl du surnageant récupéré est ajoutée à 1 ml du tampon tris / EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500 µl d'eau distillée. Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante :

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

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

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

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH)(Mm<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

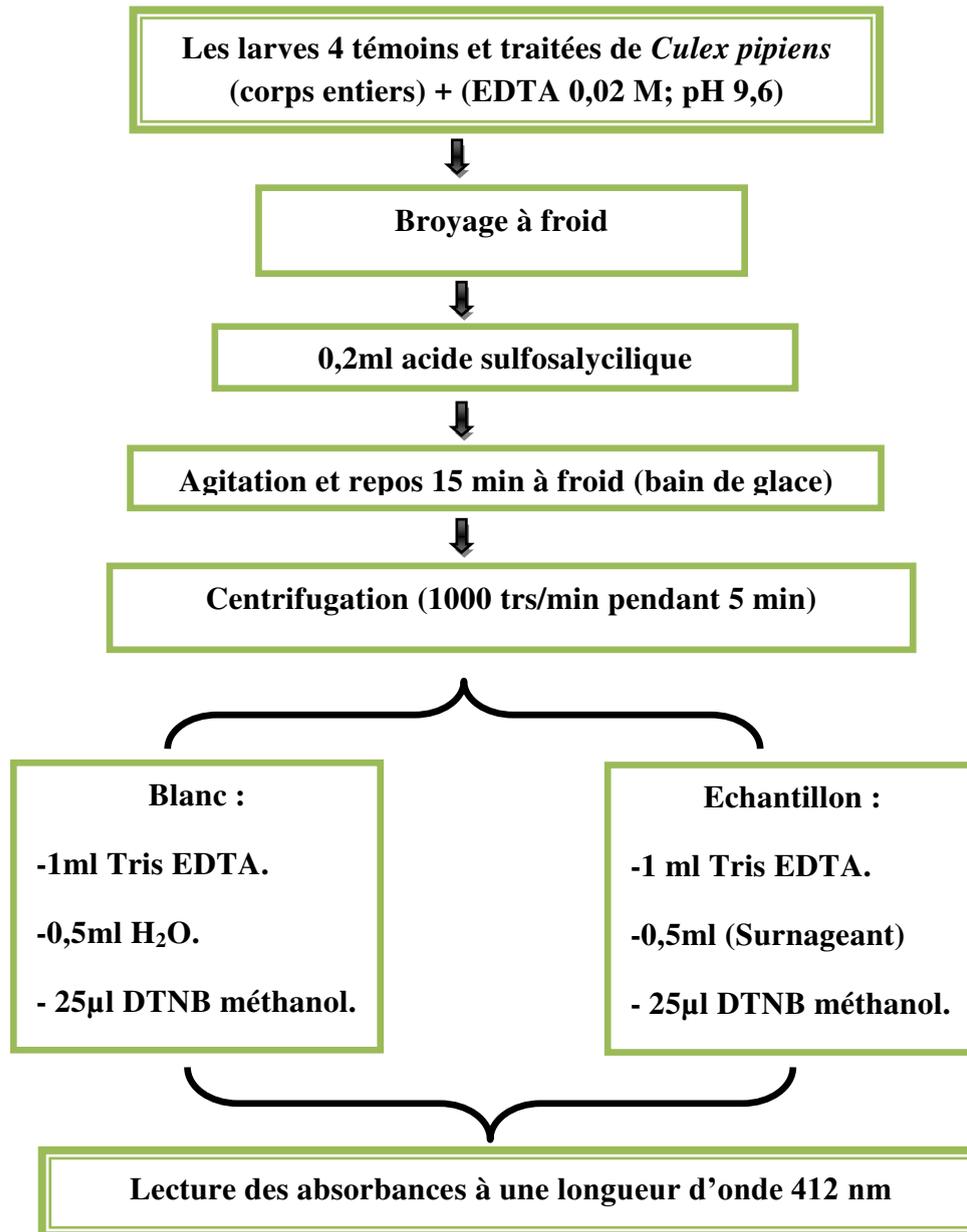
Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

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.



**Figure 06 :** Extraction et dosage du glutathion (GSH) (Weckberker & Cory, 1988).

### 2.8.2. Dosage des glutathion S-transférases :

Les glutathion S-transférases (GSTs) représentent une famille d'enzymes multifonctionnelles, essentiellement cytosoliques, impliquées dans diverses opérations de transports et de biosynthèse intracellulaire. Les GSTs, jouent un rôle important dans la détoxification des xénobiotiques ; elles catalysent souvent la conjugaison des molécules électrophiles avec le glutathion réduit (GSH). Les produits sont ensuite métabolisés en acide mercapturique et excrétés au niveau de la bile et des urines (Habig *et al.*, 1974).

Les larves du quatrième stade (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées à la CL25 et la 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 (14000 trs/min à 4°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira au dosage de l'activité des GSTs (Fig. 07).

Le dosage est réalisé selon la méthode de Habig *et al.*, (1974), il consiste à faire réagir 200 µl de surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM)/GSH (5mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 mn pendant 5 minutes à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta Do/mn}{9,6} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

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

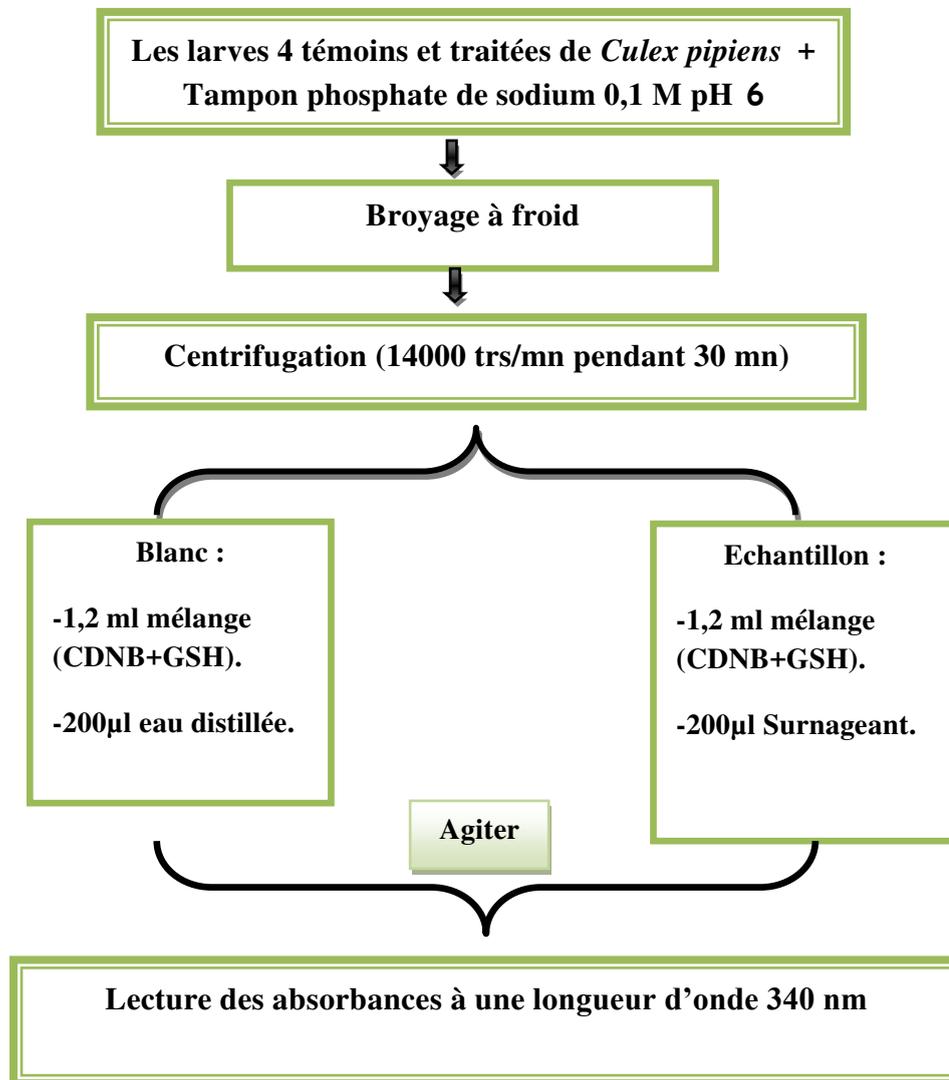
$\Delta Do$  : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB ( $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

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.



**Figure 07 :** Extraction et dosage des glutathion S-transférases (Habig *et al.*, 1974).

### 2.8.3. Activité de l'acétylcholinestérase:

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). Grâce à la neurotoxicité de la plupart des insecticides, notre travail consiste à étudier l'effet des huiles essentielles sur un biomarqueur, l'acétylcholinestérase (AChE).

Les larves du quatrième stade (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées par les huiles essentielles (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,  $\beta$ -aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1ml Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10mM, pH 7)] qui solubilise les membranes. Après centrifugation (5000 trs/ min pendant 5 min), le surnageant est récupéré et servira comme source d'enzyme (Fig.08). L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus, avec une série témoin.

Le dosage de l'activité spécifique de l'AChE est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.*, (1961) sur une fraction aliquote de 100  $\mu$ l à laquelle on ajoute 100  $\mu$ l de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO<sub>3</sub>HNa (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  $\mu$ l de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 ml eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 minutes à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100  $\mu$ l de solution détergente remplace les 100  $\mu$ l de surnageant.

$$X = \frac{\Delta Do / mn}{1.36 \times 10^4} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines ( $\mu$ M/min/mg de protéines).

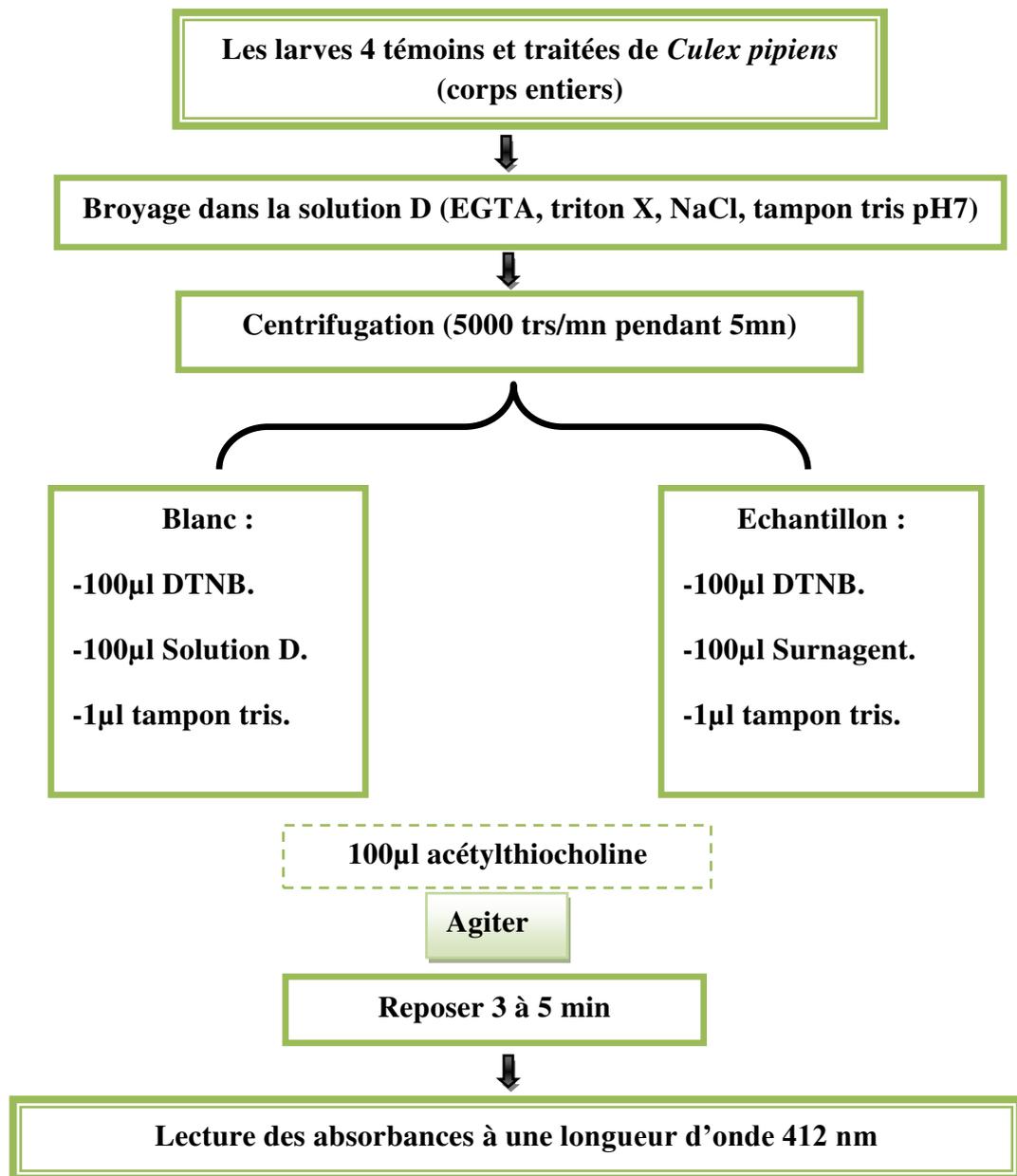
$\Delta$  Do : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

1,36 x 10<sup>4</sup> : 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.



**Figure 08 :** Extraction et dosage de l'acétylcholinestérase (Ellman *et al.*, 1961).

## **2.9. Analyse statistique**

Les moyennes  $\pm$  SEM sont calculées pour chaque groupe d'expérience. Le test t de student, l'analyse de la variance à un critère de classification ont permis de mettre en évidence les différences entre les échantillons pour toutes les expérimentations (MIITAB version 2007 et EXCEL).

# Résultats

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Rendement des huiles essentielles de *Laurus nobilis* :

Les huiles essentielles de *Laurus nobilis* obtenues par hydrodistillateur de type cleverger sont de couleur jaune claire ayant une odeur très forte, et avec un rendement de 0,96% de la matière sèche de la partie aérienne de la plante.

#### 3.2. Essais toxicologiques :

Les essais toxicologiques ont permis de déterminer l'efficacité des huiles essentielles de *Laurus nobilis*, évaluée à partir de la mortalité enregistrée chez les individus à différentes périodes 24, 48 et 72 heures après traitement.

##### 3.2.1. Toxicologie des H.E extraites de *Laurus nobilis* à l'égard de *Culex pipiens* à 24 heures :

Différentes concentrations : 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ppm ont été appliquées sur les larves du quatrième stade nouvellement exuviées. Les mortalités corrigées sont mentionnées dans le tableau 4, avec des taux variant de 1,67% (25 ppm) à 100% (150 ppm) avec une relation dose-réponse.

**Tableau 04 :** Effet des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses Répétitions	25ppm	50ppm	60ppm	70ppm	80ppm	90ppm	100ppm	150ppm
1	0	5	25	40	50	80	90	100
2	0	5	20	45	60	70	85	100
3	5	10	15	45	55	70	95	100
$m \pm \text{SEM}$	1,67±2,22	6,67±2,22	20,0±3,33	41,67±2,22	55,0±3,33	73,33±4,44	90,0±3,33	100±0,00

Les concentrations létales, la CL50 et la CL 90 sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4. Elles sont respectivement de 75,79 ppm (intervalle de confiance : 72,78 -78,94) et 109,14ppm (intervalle de confiance : 97,05 - 122,74), avec un slope de 6,01 (Tableau 05).

**Tableau 05:** Efficacité des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement excuviées de *Cx pipiens* à 24heures : analyse des probits.

H.E	R <sup>2</sup>	Slope	CL50 (ppm) IC (95 %)	CL90 (ppm) IC (95%)
<i>Laurus nobilis</i>	0,98	6,01	75,79 (72,78 -78,94)	109,14 (97,05 -122,74)

### 3.2.2. Toxicologie des H.E extraites de *Laurus nobilis* 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 différentes concentrations : 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 150 ppm. Les mortalités corrigées après 48h de traitement sont mentionnées dans le tableau 06 avec des taux variant de 5% (25ppm) à 100% (150ppm) avec une relation dose-réponse.

**Tableau 06 :** Effet des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 48 heures (m ± sem, n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses Répétitions	25ppm	50ppm	60ppm	70ppm	80ppm	90ppm	100ppm	150ppm
1	0	25	30	45	50	85	90	0
2	5	10	25	55	60	75	85	0
3	10	15	25	45	65	80	95	0
<b>m ± SEM</b>	5,00±3,33	16,67±5,56	26,67±2,22	48,33±4,44	58,30±5,56	80,00±3,33	90,00±3,33	100±0,00

Les concentrations létales, la CL50 et la CL90 sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4. Elles sont respectivement de 71,92 ppm (intervalle de confiance : 67,98 – 76,09) et 109,90 ppm (intervalle de confiance : 93,54 – 129,12), avec un slope de 5,178 (Tableau 07).

**Tableau 07 :** Efficacité des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 48 heures : analyse des probits.

H.E	R <sup>2</sup>	Slope	CL50 (ppm) IC (95%)	CL90 (ppm) IC (95%)
<i>Laurus nobilis</i>	0,97	5,17	71,92 (67,98 – 76,09)	109,90 (93,54 – 129,12)

### 3.2.3. Toxicologie des H.E extraites de *Laurus nobilis* à l'égard de *Culex pipiens* à 72 heures :

Différentes concentrations sont appliquées sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens* : 25, 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 150 ppm. Les mortalités corrigées après 72h de traitement sont mentionnées dans le tableau 08 avec des taux variant de 8,33% (25ppm) à 100% (150ppm), avec une relation dose-réponse.

**Tableau 08 :** Effet des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 72 heures (m ± sem, n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses Répétitions	25ppm	50ppm	60ppm	70ppm	80ppm	90ppm	100ppm	150ppm
1	5	25	35	45	60	85	90	0
2	5	20	40	55	70	85	85	0
3	15	25	25	65	80	80	95	0
<b>m± sem</b>	8,33 ± 4,44	23,33 ± 2,22	33,33 ± 5,56	55 ± 6,67	70 ± 6,67	83,33 ± 2,22	90 ± 3,33	100 ± 0,00

Les concentrations létales (CL50 et CL90) sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4. Elles sont respectivement de 67,07 ppm (intervalle de confiance : 62,93 - 71,49) et 105,20 ppm (intervalle de confiance : 88,71 - 124,45), avec un slope de 4,88 (Tableau 09).

**Tableau 09** : Efficacité des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 72heures : analyse des probits.

H.E	R <sup>2</sup>	Slope	CL50 (ppm) IC (95%)	CL90 (ppm) IC (95%)
<i>Laurus nobilis</i>	0,97	4,88	67,07 (62,93 – 71,49)	105,20 (88,71 – 124,45)

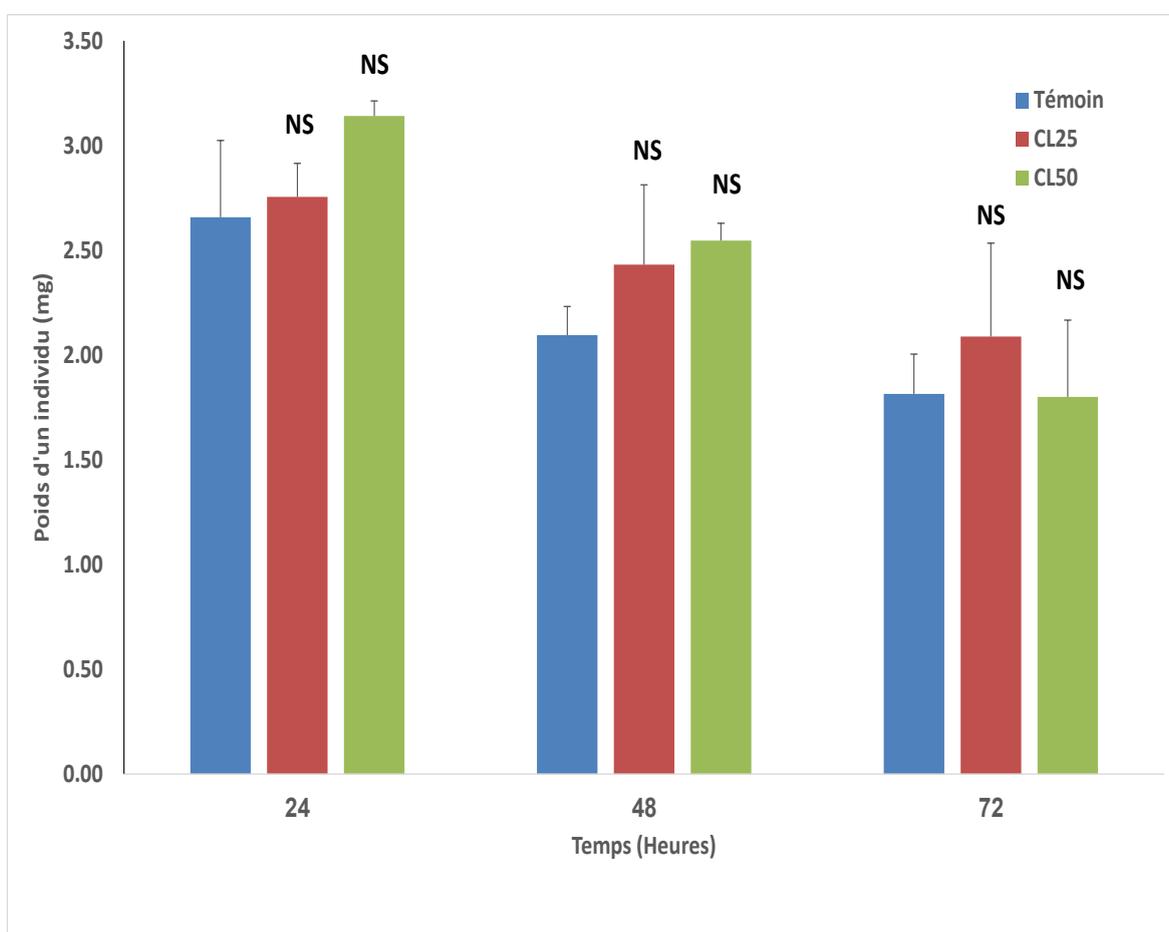
### 3.3. Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* sur la croissance pondérale de *Cx pipiens* :

Les résultats de l'évolution du poids corporel des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* sont mentionnés dans le tableau 10 et la figure 09. Pour les séries témoins et traitées à la CL50, on remarque une diminution significative ( $p=0,049$  et  $0,004$  respectivement) du poids corporel des larves au cours de la période testée (24, 48 et 72h) et non significative ( $p>0,05$ ) pour les séries traitées à la CL25.

La comparaison des moyennes entre les séries témoins et traitées par le test *t* de Student, révèle une diminution non significative ( $p>0,05$ ) du poids corporel des larves 4 à 24, 48 et 72h. De plus, aucun effet dose n'a été signalé chez les séries traitées durant les temps étudiés.

**Tableau 10 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg/individu) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (Heures)	Témoins	CL25	CL50
24	2,66 $\pm$ 0,37 a A	2,76 $\pm$ 0,16 a A	3,14 $\pm$ 0,07 a A
48	2,10 $\pm$ 0,14 a B	2,43 $\pm$ 0,38 a A	2,55 $\pm$ 0,08 a B
72	1,82 $\pm$ 0,19 a C	2,09 $\pm$ 0,45a A	1,80 $\pm$ 0,37 a C



**Figure 09 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg/individu) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (NS : Différence non significative).

### 3.4. Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* sur la croissance linéaire de *Cx pipiens* :

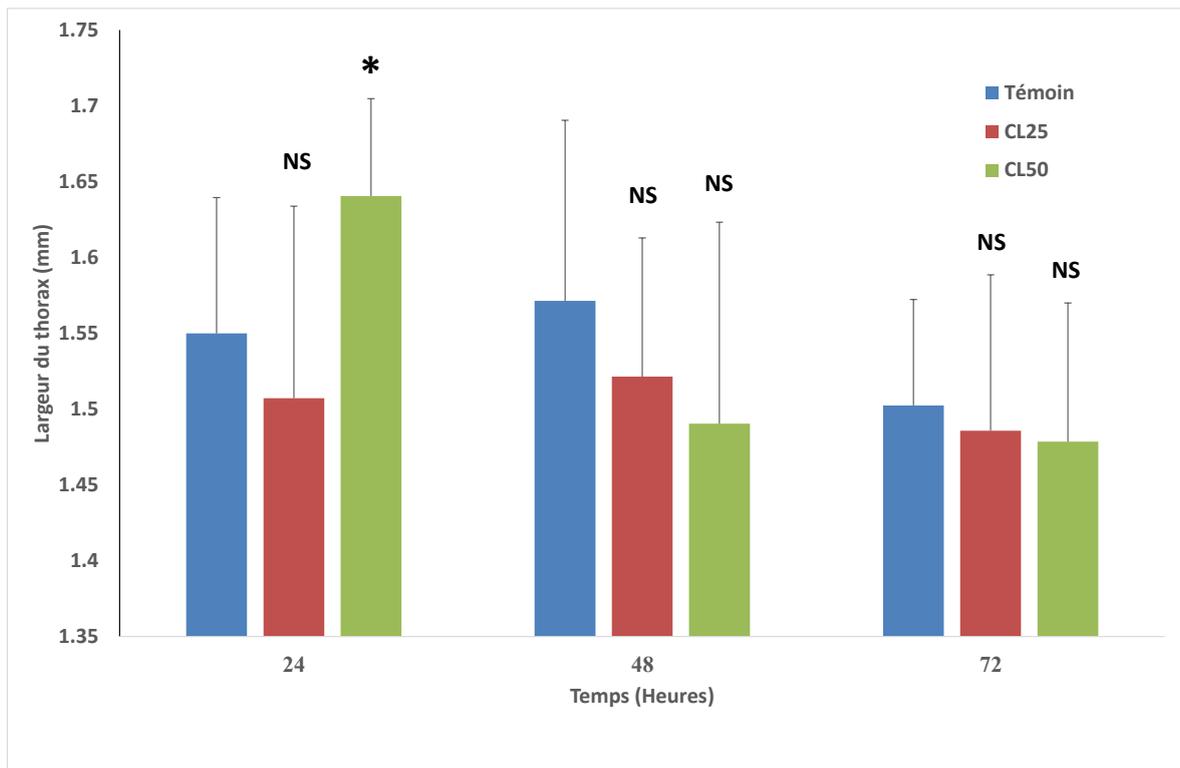
#### 3.4.1. Largeur du thorax :

La largeur du thorax des larves 4 marque une variation non significative ( $p > 0,05$ ) et cela aussi bien chez les séries témoins que chez les séries traitées à la CL25. Par contre chez les séries traitées avec la dose la plus forte (CL50) on remarque une diminution très hautement significative ( $p = 0,001$ ) au cours de la période testée (24, 48 et 72 h).

La comparaison des valeurs moyennes montre une différence non significative ( $p > 0,05$ ) entre les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) à 48 et 72 heures, excepté à 24h où on note une augmentation significative ( $p = 0,022$ ) de la largeur du thorax des larves traitées avec la CL50. De plus, un effet dose a été signalé uniquement à 24 h après traitement ( $p = 0,009$ ) (Tableau 11 et fig 10).

**Tableau 11 :** Effet des H,E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (Heures)	Témoin	CL25	CL50
24	$1,55 \pm 0,08$ a A	$1,50 \pm 0,12$ a A	$1,64 \pm 0,06$ b A
48	$1,57 \pm 0,11$ a A	$1,52 \pm 0,09$ a A	$1,49 \pm 0,13$ a B
72	$1,50 \pm 0,06$ a A	$1,48 \pm 0,10$ a A	$1,47 \pm 0,09$ a C



**Figure 10 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur la largeur du thorax (mm) des larves 4 chez *Cx pipiens* à différentes périodes (m±sem, n=3). (NS: Différence non significative ( $p>0,05$ ); \*: Différence significative ( $p<0,05$ )).

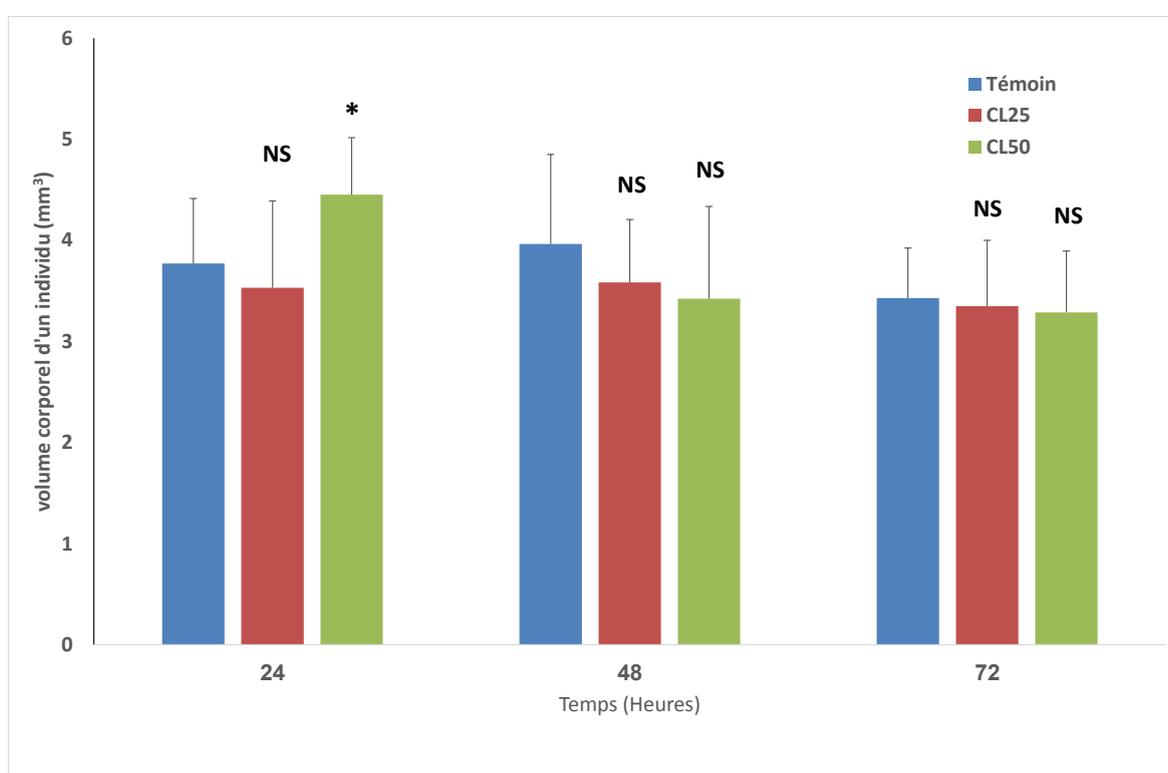
### 3.4.2. Volume corporel :

Les résultats obtenus montrent que le volume corporel diminue d'une façon non significative ( $p>0,05$ ) chez les séries témoins et traitées à la CL25 et très hautement significative ( $p=0,001$ ) chez les séries traitées à la CL50 à 24, 48 et 72h après traitement (Tableaux 12 et Fig. 11).

La comparaison des valeurs moyennes montre une variation non significative ( $p>0,05$ ) entre les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) à 48 et 72 heures, excepté à 24h où on note une augmentation significative ( $p=0,023$ ) du volume corporel des individus traités avec la plus forte dose. De plus, un effet dose a été signalé uniquement à 24 h après traitement ( $p=0,011$ ).

**Tableau 12 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le volume corporel (mm<sup>3</sup>) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* (m±sem, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules).

Temps (Heures)	Témoin	CL25	CL50
24	3,77 ± 0,64 a A	3,53 ± 0,85 a A	4,45 ± 0,56 b A
48	3,96 ± 0,88 a A	3,58 ± 0,62 a A	3,42 ± 0,91 a B
72	3,42 ± 0,49 a A	3,34 ± 0,64 a A	3,28 ± 0,60 a C



**Figure 11 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le volume corporel (mm<sup>3</sup>) des larves du quatrième stade chez *Cx pipiens* à différentes périodes (m ± sem, n=3). (NS : Différence non significative ; \*: Différence significative (p<0,05)).

### 3.5. Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* sur la composition biochimique de *Cx pipiens* :

La CL25 et la CL50 des H.E extraites de *Laurus nobilis* ont été appliquées sur les larves du quatrième stade nouvellement exuviés de *Cx pipiens*, L'effet de ces huiles a été évalué sur le contenu en glucides, lipides et protéines au cours de différentes périodes après traitement (24, 48 et 72h).

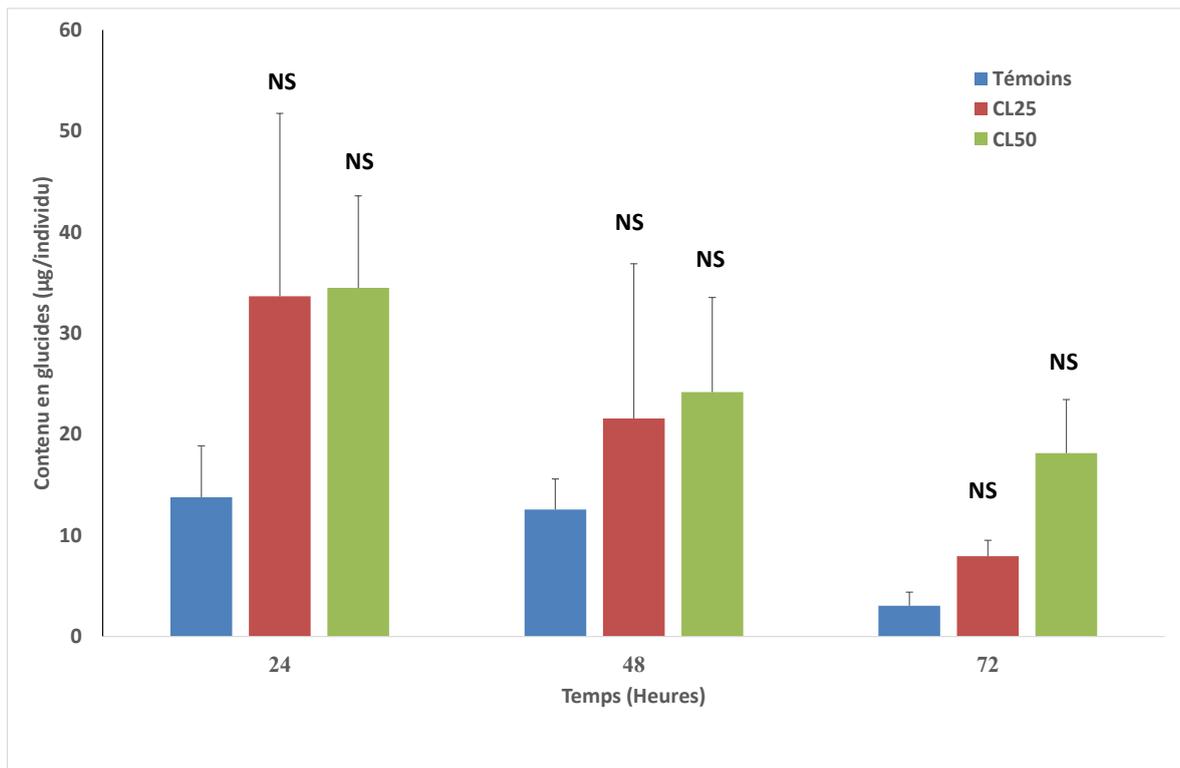
#### 3.5.1. Contenu en glucides totaux :

Le contenu en glucides ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) marque une diminution non significative ( $p>0,05$ ) au cours de la période testée et cela aussi bien chez les témoins que chez les traités (CL25 et CL50).

La comparaison des valeurs moyennes ne montre aucune différence entre témoins et traités à la CL25 et CL50 à 24, 48 et 72h. De plus, aucun effet dose n'a été signalé durant les temps étudiés (Tableau 13 et fig 12).

**Tableau 13 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* ( $m\pm\text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (Heures)	Témoin	CL25	CL50
24	$13,77 \pm 5,09$ a A	$33,66 \pm 18,09$ a A	$34,48 \pm 9,09$ a A
48	$12,57 \pm 3,02$ a A	$21,58 \pm 15,29$ a A	$24,19 \pm 9,36$ a A
72	$3,04 \pm 1,35$ a A	$7,94 \pm 1,58$ a A	$18,14 \pm 5,30$ a A



**Figure 12 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en glucides totaux ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (NS : Différence non significative).

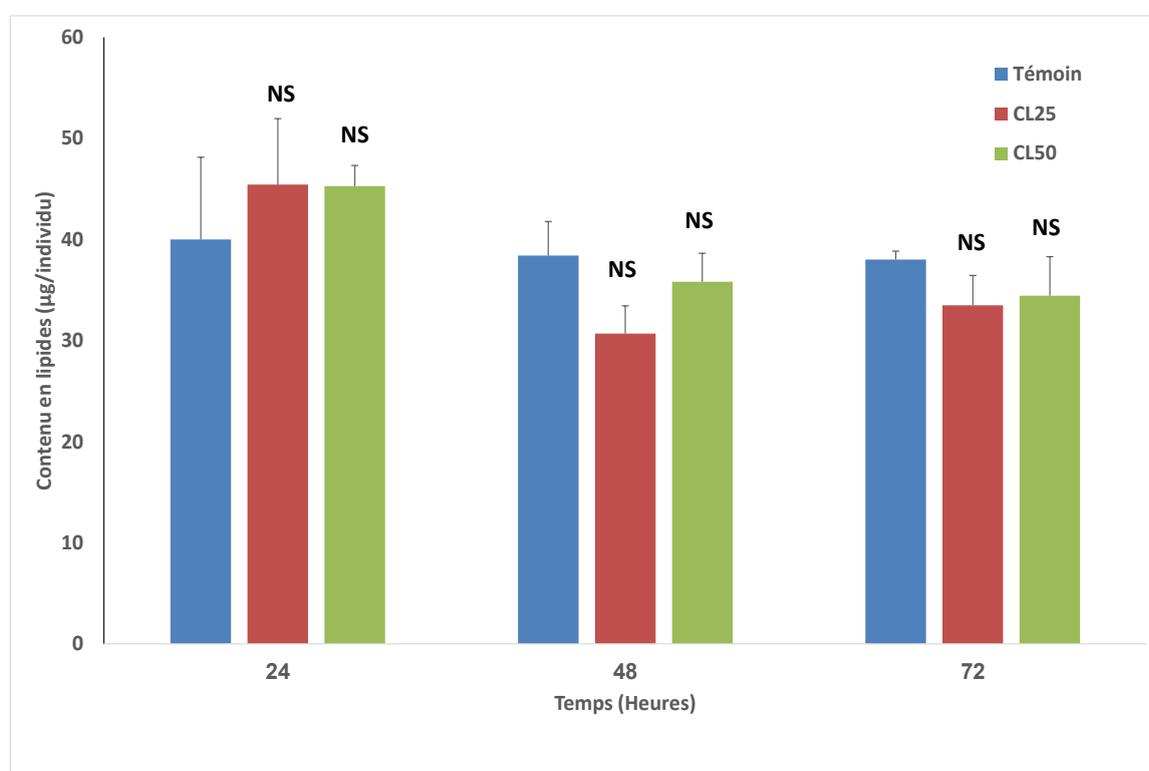
### 3.5.2. Contenu en lipides totaux :

D'après les résultats présentés dans le tableau 14 et la figure 13, on note une variation non significative du contenu en lipides totaux chez les larves témoins ( $p>0,05$ ). Par contre chez les séries traitées à la CL25 et la CL50 une variation significative ( $p=0,05$  et  $p=0,037$  respectivement) est signalées au cours des temps testés (24, 48 et 72h).

La comparaison des valeurs moyennes met en évidence des variations non significatives ( $p>0,05$ ) de ce contenu entre témoins et traités au cours de la période testée. De plus, aucun effet dose n'a été signalé chez séries traitées durant les mêmes périodes.

**Tableau 14 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (Heures)	Témoin	CL25	CL50
24	$40,00 \pm 8,13$ a A	$45,42 \pm 6,53$ a A	$45,27 \pm 2,03$ a A
48	$38,40 \pm 3,37$ a A	$30,69 \pm 2,74$ a B	$35,82 \pm 2,81$ a B
72	$38,02 \pm 0,81$ a A	$33,49 \pm 2,95$ a C	$34,43 \pm 3,86$ a C



**Figure 13 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en lipides totaux ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) chez les individus du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (NS : Différence non significative).

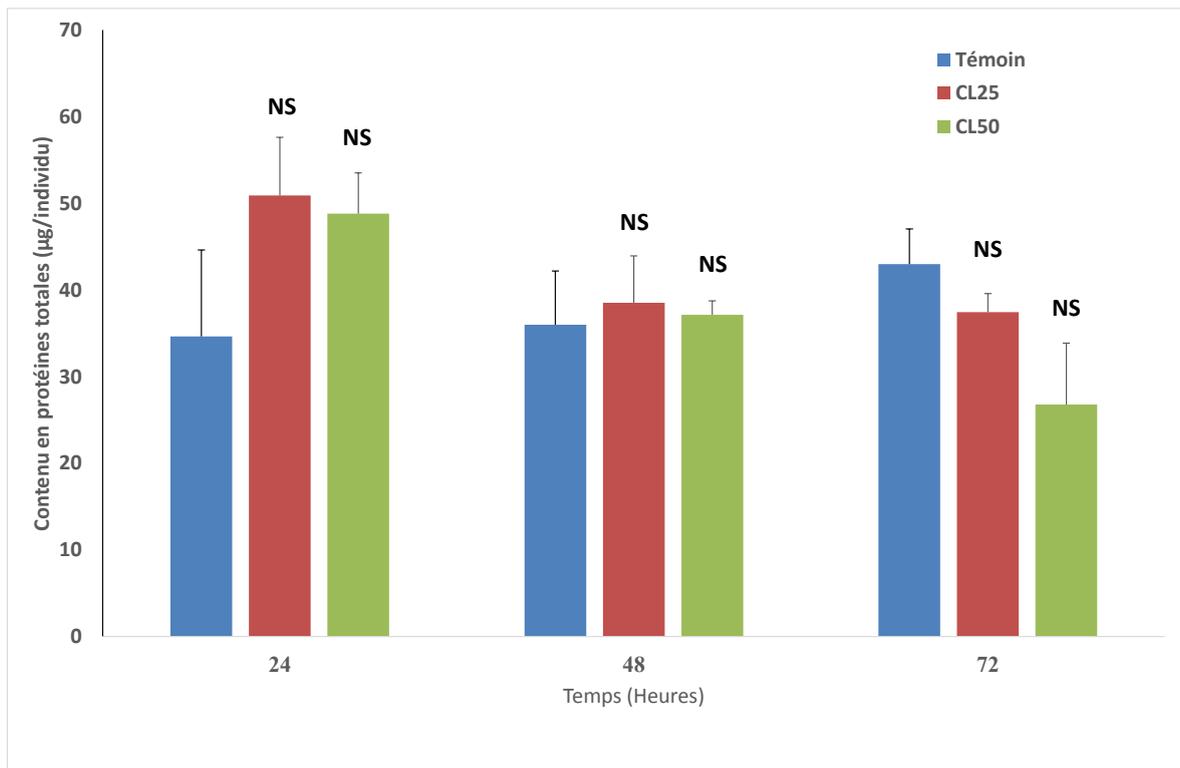
### 3.5.3. Contenu en protéines totales :

Les résultats du dosage sont mentionnés dans le tableau 15 et la figure 14. Les valeurs affichent une variation non significative ( $p>0,05$ ) du contenu en protéines aussi bien chez les séries témoins que chez les séries traitées de 24h jusqu'à 72h.

Le test t de Student révèle une variation non significative ( $p>0,05$ ) du contenu en protéines chez les séries traitées à la CL25 et la CL50 comparativement aux témoins au cours de la période testée (24, 48 et 72 h). De plus, aucun effet dose n'a été signalé.

**Tableau 15 :** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales ( $\mu\text{g}/\text{individu}$ ) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* au cours de différentes périodes ( $m\pm\text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (Heures)	Témoin	CL25	CL50
24	$34,64 \pm 9,96$ a A	$50,89 \pm 6,70$ a A	$48,81 \pm 4,68$ a A
48	$35,99 \pm 6,19$ a A	$38,51 \pm 5,42$ a A	$37,13 \pm 1,60$ a A
72	$42,98 \pm 4,05$ a A	$37,43 \pm 2,14$ a A	$26,77 \pm 7,087$ a A



**Figure 14:** Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (NS : Différence non significative).

### 3.6. Effet des H.E extraites de *Laurus nobilis* sur les biomarqueurs :

L'éventuel impact des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* sur la neurotoxicité 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 *Cx pipiens* à différentes périodes.

Les huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* ont été appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées à deux concentrations : 63,09 ppm et 75,79 ppm correspondant à la CL25 et CL50 respectivement. L'effet de ces huiles a été évalué à différentes périodes (24, 48, 72 heures) avec des séries témoins. Les résultats ont été exprimés par rapport à la quantité de protéines (mg) obtenues à partir d'une courbe de référence.

### 3.6.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE :

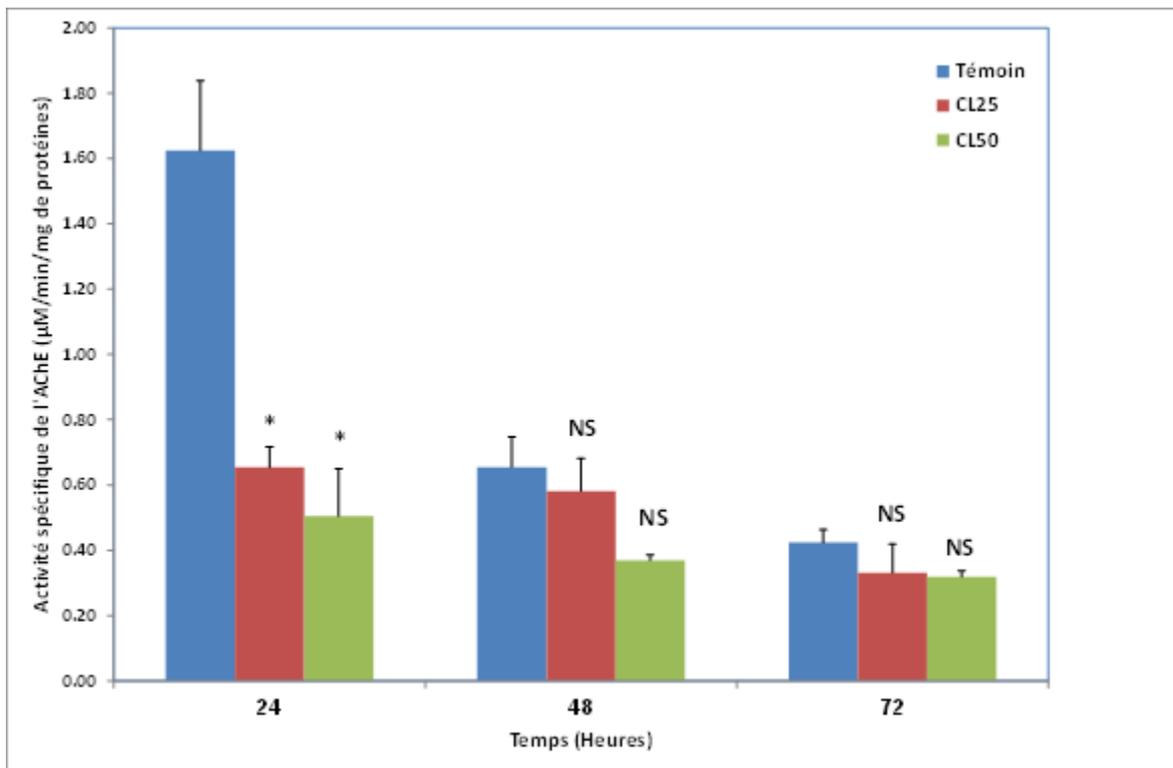
L'activité de l'AChE a été estimée chez les séries témoins et traitées par l'application de la formule d'Ellman *et al.* (1961). Les résultats relatifs à l'activité spécifique de l'AChE sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéine ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines).

Les résultats du dosage sont mentionnés dans le tableau 16 et la figure 15, où on observe une diminution significative du contenu en protéines chez les séries témoins ( $p < 0,001$ ) et les séries traitées à la CL25 ( $p = 0,031$ ). Par contre chez les séries traitées à la CL50, cette diminution n'est pas significative ( $p > 0,05$ ) au cours de la période étudiée.

Le test t de Student révèle une diminution significative ( $p = 0,02$  et  $p = 0,03$ ) de l'activité spécifique de l'AChE chez les séries traitées à la CL25 et la CL50 respectivement à 24 heures comparativement aux témoins. Aucun effet dose n'a été signalé au cours des temps testés.

**Tableau 16 :** Effets des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (Heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$1,624 \pm 0,214$ a A	$0,653 \pm 0,063$ b A	$0,504 \pm 0,145$ c A
48	$0,654 \pm 0,092$ a B	$0,581 \pm 0,100$ a B	$0,369 \pm 0,016$ a A
72	$0,423 \pm 0,040$ a C	$0,331 \pm 0,088$ a C	$0,319 \pm 0,018$ a A



**Figure 15 :** Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Laurus nobilis* sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (\*: Différence significative ( $p<0,05$ ); (NS: Différence non significative ( $p>0,05$ )).

### 3.6.2. Effet sur le taux du glutathion :

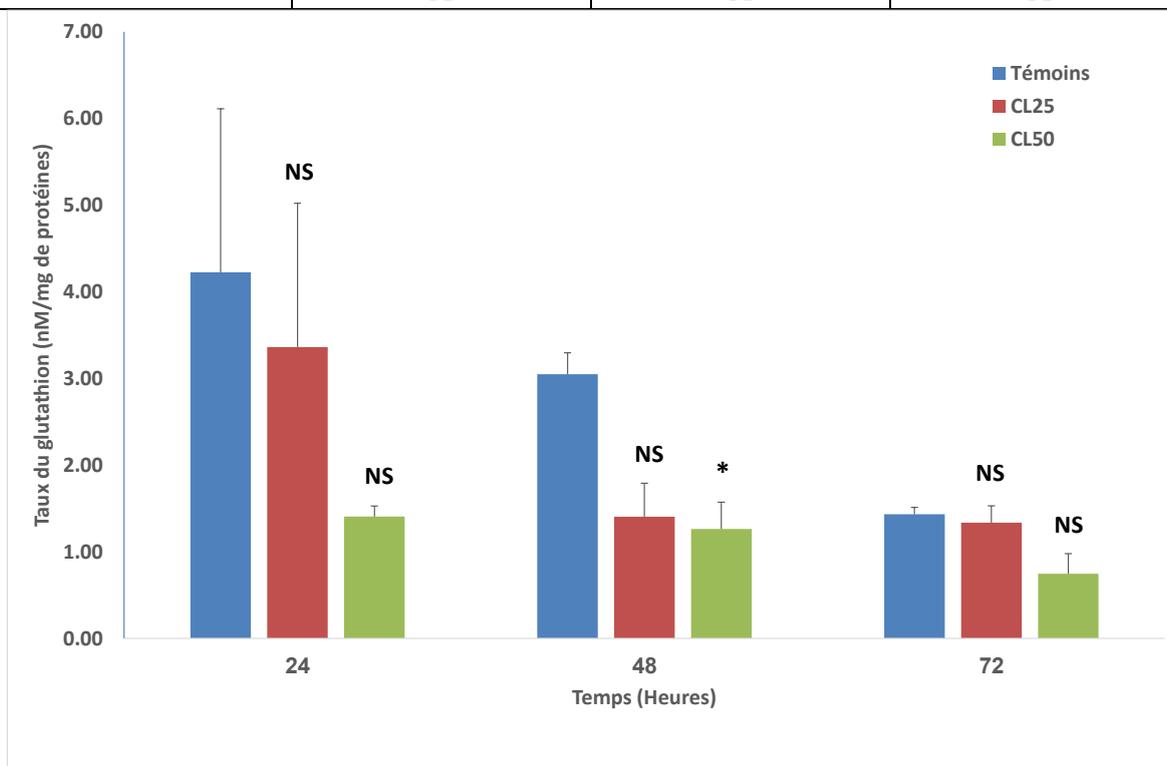
Le taux du glutathion ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines) a été estimé chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) par application de la formule de Weckberker & Cory (1988). Les résultats sont exprimés en nanomoles par milligramme de protéines ( $\text{nM}/\text{mg}$  de protéines).

D'après le tableau 17 et la figure 16, on observe une diminution non significative de l'activité spécifique de la GSH ( $p>0,05$ ) chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) de 24h jusqu'à 72h.

Le test t de Student ne révèle aucune différence significative ( $p>0,05$ ) entre témoins et traités (CL25 et CL50) au cours de la période testée, sauf à 48h où on remarque une diminution significative ( $p=0,006$ ) chez la série traitée avec la plus forte dose (CL50).

**Tableau 17 :** Effet des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Laurus nobilis* sur le taux du glutathion (nM/mg de protéines) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	4,23 $\pm$ 1,89 a A	3,36 $\pm$ 1,66 a A	1,41 $\pm$ 0,12 a A
48	3,05 $\pm$ 0,25 a A	1,40 $\pm$ 0,39 a A	1,26 $\pm$ 0,31 b A
72	1,43 $\pm$ 0,08 a A	1,34 $\pm$ 0,19 a A	0,75 $\pm$ 0,23 a A



**Figure 16 :** Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Laurus nobilis*, sur le taux du glutathion (nM/mg de protéine) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (\*\*: Différence hautement significative ( $p<0,01$ ); NS: Différence non significative ( $p>0,05$ )).

### 3.6.3. Effet sur l'activité spécifique des GSTs :

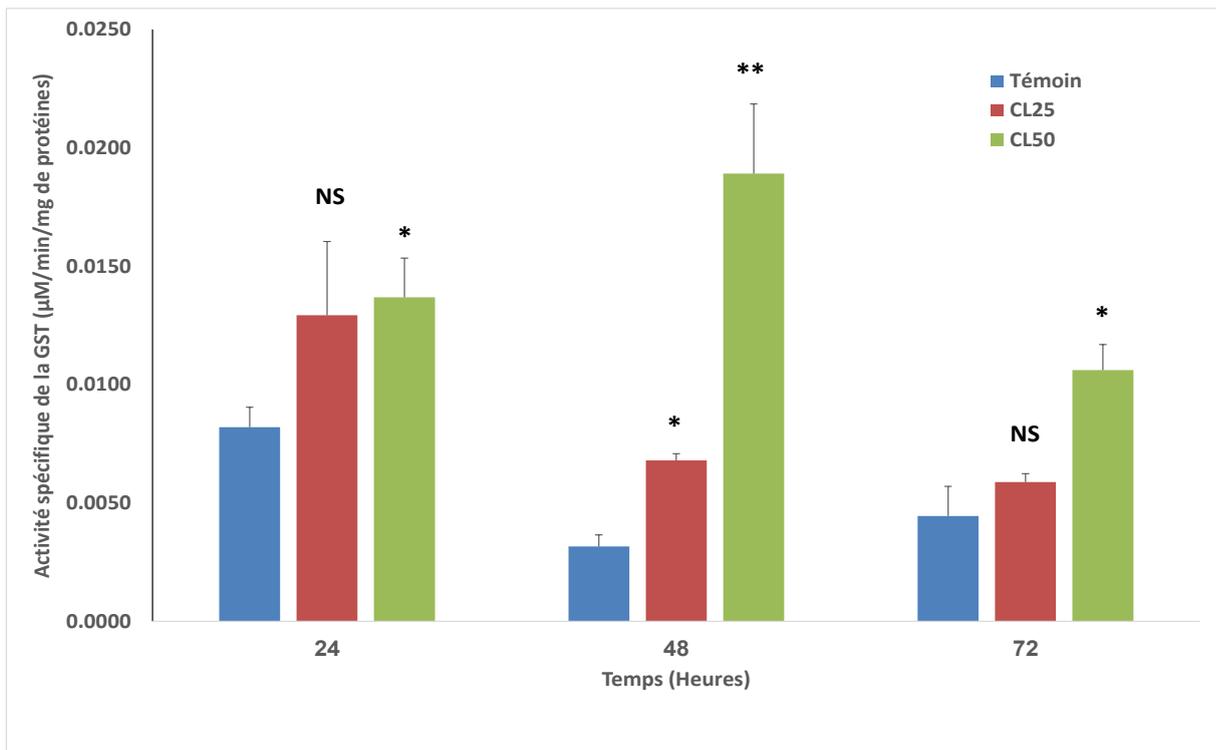
L'activité spécifique des glutathion-S-transférases a été estimée chez les séries témoins et traitées par application de formule de Habig *et al.* (1974). Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de

protéines ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines). Ils sont mentionnés dans le tableau 18 et la figure 17, où on observe une variation significative de l'activité spécifique de la GST aussi bien chez les séries témoins ( $p=0,007$ ) que chez les séries traitées à la CL25 ( $p= 0,030$ ) et la CL50 ( $p=0,029$ ) au cours des temps testés.

Le test t de Student révèle une augmentation significative de l'activité spécifique de la GST à 24 ( $p=0,047$ ) et 72h ( $p=0,046$ ) chez les séries traitées avec la dose la plus forte (CL50) et à 48h chez les traités avec les deux concentrations appliquées (CL25:  $p=0,028$  et CL50:  $p=0,002$ ). Par ailleurs, on note un effet dose à 48h ( $p=0,04$ ) et à 72h ( $p=0,041$ ).

**Tableau 18 :** Effet des H.E de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50) sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine) chez les larves du quatrième stade au cours de différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$  répétitions comportant chacune 20 individus). (Comparaison des moyennes à différents temps pour une même série (lettres majuscules) et pour un même temps entre les différentes séries (lettres minuscules)).

Temps (heures)	Témoins	CL25	CL50
24	$0,0082 \pm 0,008$ a A	$0,0129 \pm 0,0031$ a A	$0,0137 \pm 0,0017$ b A
48	$0,0032 \pm 0,0005$ a B	$0,0068 \pm 0,0003$ b B	$0,0189 \pm 0,0029$ c B
72	$0,0044 \pm 0,0012$ a C	$0,0106 \pm 0,0004$ a C	$0,0106 \pm 0,0011$ b C



**Figure 17 :** Effets des H.E extraites de *Laurus nobilis* (CL25 et CL50), sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine) chez les larves du quatrième stade de *Culex pipiens* à différentes périodes ( $m \pm \text{sem}$ ,  $n=3$ ). (NS: Différence non significative; \*: Différence significative ( $p<0,05$ ); \*\*: Différence hautement significative ( $p<0,01$ )).

# Discussion

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Rendement en huiles essentielles :

Les huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* obtenues sont de couleur jaune très pâle, d'odeur aromatique épicée, et avec un rendement de 0,96% à partir de la partie aérienne de la plante.

Ce rendement varie d'une plante à une autre, il est de 0,5% chez *Artemisia meslantica*, de (0,1-0,35%) chez la rose, de (0,5-1%) chez la menthe poivrée et le néroli, de (1-3%) chez l'anis, de (0,8-2,8%) chez la lavande, de (1-2,5%) chez le romarin, de (2-2,75%) chez le thym (Edward *et al.*, 1987) et de (1,3-1,6)% chez le basilic (Badani, 2014). Une autre espèce, *Lavandula stoechas* a enregistré un rendement de 0,77 à 1,2% (Mohammedi & Atik, 2011). Cette variation en huile essentielle, tant au niveau de leur composition, que rendement, peut s'expliquer par différents facteurs : d'origine intrinsèque, lié au bagage génétique de la plante ou extrinsèque, liés aux conditions de la croissance et du développement de la plante (in Bouguerra, 2012). D'autres facteurs peuvent également influencer ce rendement : l'espèce, la période de récolte, les pratiques culturales, la technique d'extraction, la température et la durée de séchage et l'état physiopathologique de la plante (Svoboda & Hampson, 1999; Smallfield, 2001; Tchoumboungang *et al.*, 2005 ; 2006). De plus, ces variations ont été notées entre les espèces du même genre tel que *Ocimum*, avec un rendement de 1,71% chez *Ocimum minimum* (Özcan et Chalchat, 2002), et de 1,46% chez *Ocimum gratissimum* (Camara, 2009) et *Ocimum canim* (Akantetou *et al.*, 2001).

### 4.2. Toxicité des huiles essentielles extraites de *laurus nobilis* :

Les huiles essentielles sont des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (Csek & Kaufman, 1999). Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes. Leur mécanisme d'action est méconnu et relativement peu d'études ont été réalisées à ce sujet (Isman, 2000). On considère que ces mécanismes sont uniques et que les biopesticides à base d'huiles essentielles peuvent être des outils de choix dans les programmes de gestion de résistance aux biopesticides. Avec ces mécanismes d'action particuliers, ces biopesticides peuvent être utilisés seuls et à répétition sans potentiellement inciter le développement de la résistance chez les insectes (Csek et Kaufman, 1999).

L'activité biologique d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique qui détermine son niveau de toxicité (Akono *et al.*, 2012).

L'efficacité des composés chimiques d'origine végétale contre les larves de moustiques peut varier considérablement en fonction de l'espèce végétale (Singh *et al.*, 2007 ; Yadav *et al.*, 2002), de la partie de la plante utilisée (Rajkumar *et al.*, 2005, Chowdhury *et al.*, 2008), de l'âge de ses parties (jeune, mature ou sénescant), le solvant utilisé lors de l'extraction ainsi que l'espèce cible (Choochate *et al.*, 2005; Chansang *et al.*, 2005).

Notre étude a pour but de tester la toxicité des huiles essentielles extraites de *laurus nobilis* à l'égard des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Culex pipiens* à 24, 48 et 72 heures. Les résultats montrent une activité larvicide avec une relation dose-réponse. Les concentrations létales, la CL50 et la CL90 sont respectivement de : (75,79 et 109,14 ppm) à 24 heures, (71,92 et 109,90 ppm) à 48 heures et (67,07 et 105,20 ppm) à 72 heures.

Plusieurs plantes ont prouvé ce même pouvoir larvicide contre cette espèce de moustique (*Cx pipiens*) telles que : *Allium sativa* et *Citrus limon* (Thomas *et al.*, 1999), *Alnus glutinosa* (Rey *et al.*, 1999), *Anthemis nobilis* (Soliman *et al.*, 1995) et *Cassia obtusifolia* (Jang *et al.*, 2002). Une variété d'extrait a montré des CL50 variables en fonction de la plante utilisée : 24,8 ppm pour *l'Origanum inutiflorum* (Cetin & Yanikoglu, 2006), 49 ppm pour *Thymus capitatus* (Mansour *et al.*, 2000) et 53,80 et 32,52 ppm à 24 et 48 heures respectivement pour *Citrus aurantium* (Kassir, 1989). Par ailleurs, les expérimentations menées à l'intérieur de notre laboratoire ont montré des concentrations létales différentes en fonction de l'espèce de moustique et de la plante utilisée : de 100ppm chez *Culex pipiens* traité par *l'Ocimum basilicum* (Khamene, 2014), de 77,09 et 12,02 ppm respectivement chez *Culiseta longiareolata* traitée par *Lavandula dentata* (Gouasmia & Bouchagoura, 2013), et *Mentha piperita* (Chettat, 2013).

Les mêmes observations ont été faites chez *An stephensi* et *Cx quinquefasciatus* respectivement, où on a noté une diversification du pouvoir larvicide des extraits qui se traduit par des concentrations létales différentes en fonction de l'espèce de plante utilisée. Elles sont de 8,29 et 87,68 ppm pour *l'Ocimum basilicum* (Maurya *et al.*, 2009), 69,86 et 81,12 ppm pour *Eucalyptus citriodora* (Singh *et al.*, 2005), 6,25 et

12,25 ppm pour *Solanum nigrum* (Raghavendra *et al.*, 2009) et 28,18 et 43,07 ppm pour *Annona squamosa* (Kamaraj *et al.*, 2010).

Les mêmes résultats ont été obtenus après application des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata*) appliqués sur les larves du deuxième et quatrième stade de quatre espèces de moustiques : *Culex pipiens*, *Aedes caspius*, *Culiseta longiareolata* et *Anopheles maculipennis*. Les résultats sont comparables entre les espèces testées, sauf que *Cs longiareolata* est l'espèce la plus sensible comparativement aux autres, avec des DL50 de 110 mg/L pour l'extrait de ricin et 250 mg/L pour le bois de thuya, contrairement à *A. maculipennis* où ces extraits sont moins toxiques (Aouinty *et al.*, 2006).

#### **4.3. Effet sur la croissance :**

Le volume corporel peut influencer divers paramètres essentiels chez les moustiques 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 b; Van Den Heuvel, 1963). Une corrélation positive entre le volume corporel et la fécondité a été observée chez certaines espèces de moustiques incluant *Ae. sierrensis* (Hawley, 1985 a, b), *Ae. triseriatus* (Grimstad & Haramis, 1984 ; Haramis, 1985) et *Ae. albopictus* (Hien, 1976).

Le poids corporel des 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).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation montrent que les H.E (CL25 et CL50) appliquées sur les larves du quatrième stade de *Culex pipiens* n'affectent pas les paramètres biométriques étudiés.

Contrairement à nos résultats et chez la même espèce (*Culex pipiens*), l'application des H.E extraites d'*Eucalyptus globulus* (Kheled & Dib, 2015) et de *Lavandula dentata* (Sahbi & Aouni, 2015) a provoqué une diminution de la largeur du thorax, le poids et le volume corporel des larves 4. De plus, chez une autre espèce de moustique, *Culiseta longiareolata*, le traitement par l'*Ocimum basilicum* (CL50) révèle les mêmes résultats (Bouzidi & Ziani, 2015).

#### 4.4. Effet sur la composition biochimique :

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).

Le dosage des principaux constituants réalisé dans le corps entier des larves 4, témoins et traitées chez *Cx pipiens*, révèle une modification non significative des réserves énergétiques ; protéines, glucides et lipides après traitement par *Laurus nobilis*.

Les protéines jouent un rôle fondamental dans l'organisme de toutes les espèces biologiques vivantes connues (Mahler *et al.*, 1968). Chez les insectes, les protéines et les acides aminés jouent un rôle majeur durant les différentes phases de leur vie car ils sont caractérisés par des niveaux très élevés. Les travaux réalisés sur des lépidoptères *Diatraea grandiosella* (Chippendale, 1970) et *Pieris brassicae*, indiquent que les fortes concentrations de protéines sont observées au cours du stade larvaire et diminuent par la suite au stade nymphal (Van Der Geest & Borgsteede, 1969).

Les protéines proviendraient, de la digestion des couches procuticulaires profondes de l'ancienne cuticule d'une part et d'une origine exogène, alimentaire d'autre part (Munoz & Sevilla, 1982 ; Munoz & Ceccaldi, 1987). Chez les moustiques autogènes, les protéines larvaires stockées sont utilisées pour l'oogenèse. Cependant chez les moustiques anautogènes, le repas sanguin représente la principale source des protéines nécessaires (Larsen & Bodestein, 1959 ; Spielman & Wong, 1974 ; Chang & Judson, 1977, Briegel, 1985).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation, montrent que le traitement par *Laurus nobilis* avec la CL25 et la CL50 chez *Cx pipiens*, n'affecte pas le contenu en protéines. Ce qui ne concorde pas avec les résultats obtenus chez la même espèce traitée par l'*Eucalyptus globulus* (Kheled & Dib, 2015), l'*Ocimum basilicum* (Sayada & Messai (2015), et *Lavandula dentata* (Sahbi & Aouni, 2015) et chez *Culiseta longiareolata* traitée par le basilic (Bouzidi & Ziani, 2015). Cependant, une augmentation de ce contenu a été signalée chez *Cx pipiens* après traitement avec l'*Ocimum basilicum* (Khamene, 2014).

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). Le 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).

Concernant le contenu en glucides, nos résultats montrent que le traitement par *Laurus nobilis* avec la CL25 et la CL50 chez *Cx pipiens*, n'a aucun effet au cours de la période testée.

Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont montré des résultats différents, avec une réduction de ce contenu chez la même espèce après traitement par l'*Eucalyptus globulus* (Khaled & Dib, 2015), *Lavandula dentata* (Sahbi & Aouni, 2015) et chez *Cs longiareolata* traitée par l'*Ocimum basilicum* (Bouzidi & Ziani, 2015). Par contre, une augmentation de ce composé biochimique a été signalée chez *Cx pipiens* après traitement par l'*Ocimum basilicum* (Khamene, 2014).

Les lipides représentent la principale source d'énergie chez les insectes (Beenakers *et al.*, 1985), transportés aux corps gras, site de leurs synthèse et

stockage (Keely, 1985 ; Van Hensdan & Law, 1989) vers les organes utilisateurs, notamment les ovaires (Kilby, 1963 ; Chino *et al.*, 1981), via l'hémolymphe pour être utilisés lors de la vitélogénèse (Downer, 1985 ; Keely, 1985). Par contre Chez *Tribolium confusum*, le maximum d'acides gras est observé au stade larvaire (activité locomotrice) et au stade adulte (activité locomotrice et maturité sexuelle), durant lesquels le métabolisme est le plus intense (Beaudoin & Lemonde, 1970).

Nos résultats montrent que le traitement par *Laurus nobilis* avec la CL25 et la CL50 chez *Cx pipiens*, cause une variation non significative de ce contenu tantôt forte tantôt faible au cours de la période testée.

Par contre les travaux réalisés sur la même espèce traitée par *Eucalyptus globulus* (Kheled & Dib, 2015), *Lavandula dentata* (CL90) (Sahbi & Aouni, 2015), et sur *Cs longiareolata* traitée par *Ocimum basilicum* (Bouzidi & Ziani, 2015), montrent une diminution du contenu en lipide chez les stades testés (larve, pupe et adulte mâle et femelle).

#### **4.5. Effet sur les biomarqueurs :**

Les marqueurs biologiques ou biomarqueurs concernent 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 qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition à un ou plusieurs contaminants (Badiou, 2007).

Les principaux biomarqueurs utilisés sont des marqueurs enzymatiques comme la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase. Les enzymes du système de détoxification sont aussi beaucoup étudiées puisque leurs activités sont susceptibles d'être fortement modifiées après une exposition.

Plus de 500 espèces d'arthropodes sont maintenant résistantes à au moins, un insecticide ou larvicide. Un petit nombre de mécanismes sont capable de détoxifier les insecticides en métabolites moins toxiques (Soderlund, 1997). Ces mécanismes sont généralement classés en trois:

Le premier est dû à une diminution de la pénétration cuticulaire qui est un mécanisme de résistance de moindre importance mais qui peut contribuer en association avec d'autres à augmenter le niveau de résistance (George, 1994; Pasteur & Reymond, 1996; Taylor & Feyereison, 1996).

Le deuxième mécanisme, assure une bonne détoxification des différents tissus de l'organisme, est lié à une augmentation du taux des diverses enzymes de détoxification (Sodrlund, 1997) telles que les monooxygénases à cytochrome P450 (Kassi *et al.*, 19914; Scott, 1999), l'estérase (Field *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1999, Harold & Ottea, 2000), la glutathion-S-transférase (Parapanthadara *et al.*, 2000; Yu & Abo-Elghar, 2000; Sun *et al.*, 2001), et la lactate déshydrogénase entre autre (Saleem & Shakoori, 1987; Ribeiro *et al.*, 1999);

Enfin, le troisième mécanisme, aussi important que le second, traite de l'altération des sites cibles et leur insensibilité aux insecticides. Parmi ces sites cibles, on note les canaux sodium, les récepteurs GABA et surtout une enzyme du système nerveux, l'acétylcholinestérase (Rufingier *et al.*, 1999 ; Tomita *et al.*, 2000 ; Siegfried & Scharf, 2001).

#### **4.5.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE :**

L'acétylcholinestérase appartenant à la famille des hydrolases, a été découverte en 1938 par Nachmanshn. C'est est une enzyme clés du système nerveux des insectes, et la mieux connue en tant que cible des organophosphorés et des carbamates qui ont une structure analogue à l'acétylcholine; c'est pourquoi chez les insectes, 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).

Dans les jonctions interneuronales, la terminaison nerveuse libère un médiateur chimique, l'acétylcholine (ACh) qui a une durée de vie très courte et qui permet la transmission de l'influx nerveux. Lorsque l'ACh est libérée dans l'espace synaptique, elle se fixe sur des récepteurs cholinergiques qui se trouvent sur la membrane post-synaptique. Cette fixation provoque une dépolarisation de la membrane post-synaptique, générant ainsi un potentiel d'action qui assure la transmission du signal nerveux.

L'AChE, en inactivant rapidement l'ACh, permet au système de revenir immédiatement à son état de repos. Le rôle de l'acétylcholinestérase est d'hydrolyser l'acétylcholine en acétate et choline afin de stopper la stimulation du

récepteur et par conséquent la repolarisation de la membrane (Soreq & Zakut, 1993 ; Charpentier *et al.*, 2000). Si l'action de cette enzyme est bloquée, la membrane post-synaptique se trouve continuellement excitée (Haubruge & Amichot, 1998).

En effet l'exposition à des doses données d'insecticide, peut conduire progressivement à une inhibition irréversible de l'AChE, et produit un effet toxique ; neurotoxicité qui est définie par un changement structural ou une altération fonctionnelle du système nerveux (Braquenier, 2009 ; Samuel & Laurent, 2005).

Rattan (2010) a examiné le mécanisme d'action des métabolites secondaires des plantes sur le corps des insectes et il a enregistré plusieurs perturbations physiologiques, telles que l'inhibition de l'acétylcholinestérase (par les huiles essentielles), canaux chlorure GABA-dépendants (par le thymol), perturbation des échanges d'ion sodium et potassium (par la pyréthrine) et l'inhibition de la respiration cellulaire (par le roténone), et le blocage mitotique (par l'azadirachtine).

L'analyse des résultats obtenus après dosage de l'activité enzymatique de l'AChE chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* traitées par les H.E extraites de *Laurus nobilis* révèle une diminution significative à 24h. Cette diminution est probablement due à l'inhibition de cette enzyme par le traitement.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Chettat (2013) qui a signalé une diminution non significative de l'activité enzymatique de l'AChE, chez les larves du quatrième stade de *Cs longiareolata* traitées par *Mentha piperita*. Par contre les travaux de Sayada & Messai (2015) réalisés sur la même espèce étudiée ont enregistré une augmentation de l'activité de l'AChE chez les larves du quatrième stade traitées par l'*Ocimum basilicum* à différents temps 24, 48 et 72 heures. Par ailleurs, une diminution significative a été observée chez *Cx pipiens* et *Cs longiareolata* après traitement par l'*Ocimum basilicum* (Kemache & Meziani 2015).

#### 4.5.2. Effet sur l'activité spécifique des GSTs :

Les GSTs sont des enzymes multifonctionnelles impliquées dans l'étape de conjugaison du « glutathion réduit » à un grand nombre de xénobiotiques (Boyer, 2006). Elles sont surtout localisées dans le cytoplasme des cellules, du corps gras et des muscles alaires (Haubruge & Amichot, 1998). Elles ont un rôle important dans la détoxification de substances xénobiotiques et interviennent en catalysant la conjugaison de ces substances avec le groupement thiol du glutathion endogène (Jakoby & Habig, 1980). Ceci résulte en synthèse d'un acide mercapturique qui est ensuite facilement éliminable. Donc, le rôle majeur du glutathion est de convertir des composés lipophiles en molécules hydrophiles facilement excrétables (Habig *et al.*, 1974). Les GSTs permettent le développement de la résistance envers les agents chimiothérapeutiques, les insecticides, les herbicides et les antibiotiques microbiens. Elles jouent un rôle important dans la physiologie du stress, le transport intracellulaire et dans les différentes voies de biosynthèse (George, 1994).

L'activité spécifique de la GST chez les larves traitées de *Cx pipiens* a marqué une augmentation au cours de la période testée et qui se traduit par une mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense de l'insecte contre le pesticide.

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus chez *Culex pipiens* traité par *Ocimum basilicum* (Sayada & Messai, 2015) et *L'avendula dentata* (Gheraibia & Abaidia, 2014), et chez *Cs longiareolata* traitée par *Mentha piperita* (Chettat, 2013), par *Ocimum basilicum* (Kemache & Meziani, 2015) et par *L. dentata* (Gouasmia & Bouchagoura, 2013).

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 (Cédric, 2008).

### 4.5.3. Effet sur le taux de la GSH

L'activité du système antioxydant peut subir une augmentation ou une inhibition sous l'effet d'un produit toxique ou un polluant, ces deux types de réponse dépendent de la durée d'exposition d'une part et de la sensibilité de l'espèce exposée d'autre part (in Sifi, 2009).

Le glutathion est un tripeptide soluble dans l'eau constitué de trois acides aminés ; glutamate, cystéine et glycine, produit naturellement dans le corps (Meister & Anderson, 1983). Le glutathion est un biomarqueur non-enzymatique joue un rôle central dans le processus de défense intracellulaire. C'est le principal système impliqué dans la détoxification des ions peroxydes et dans la lutte contre le stress oxydatif (Gannagé-Yared *et al.*, 1998). Il existe sous deux formes, oxydée GSSG et réduite GSH, et ces enzymes comprennent la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion S-transférase (GST) qui sont impliqués dans la détoxification (Yu, 1994 ; Kizek *et al.*, 2004 ; Zehnalek *et al.*, 2004). Une déficience en GSH expose les cellules à un risque de dommage oxydatif. Grâce à la fonction thiol (-SH) de la cystéine, le glutathion sous sa forme réduit est un composé important pour le maintien de l'équilibre redox de la cellule. Cette fonction thiol peut aussi fixer des fonctions électrophiles et sert donc à la détoxification de nombreux pesticides qui contiennent une telle fonction (Habig *et al.*, 1974). Certains insecticides agissent sur un nombre très limité d'espèces, en augmentant l'activité des différents enzymes impliquées dans la détoxification (Lagadic *et al.*, 1997).

L'analyse de nos résultats ne montre aucun effet des H.E de *laurus nobilis* sur le taux du glutathion au cours de la période testée, excepté à 48 heures, où on a noté une diminution significative après le traitement avec la plus forte dose.

Par ailleurs, les expérimentations menées dans notre laboratoire ont mis en évidence une diminution du taux de la GSH chez *Cs longiareolata* traitée par *Mentha piperita* (Chettat, 2013), chez *Cx pipiens* (Khamene, 2014 ; Sayada & Messai, 2015) et *Culiseta longiareolata* (Kemache & Meziani 2015) traités par l'*Ocimum basilicum*.

La diminution du GSH pourrait être expliquée par une consommation accrue de ce cofacteur par les GSTs afin de détoxifier l'organisme. De plus, elle traduit également une réduction du système antioxydant non enzymatique.

Conclusion

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé, nous a permis d'évaluer chez une espèce de moustiques *Culex pipiens*, l'effet des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis*, sur la toxicité, la morphométrie, la composition biochimique (protéines, glucides et lipides) et l'activité spécifique de quelques biomarqueurs enzymatiques (AChE, GST) et le taux du GSH.

L'application des huiles essentielles extraites de *Laurus nobilis* sur les larves nouvellement exuviées de *Culex pipiens*, a permis d'établir les concentrations létales, CL50 et CL90. Ces huiles montrent des effets doses significatifs et manifestent une toxicité avec une relation dose-réponse.

*Laurus nobilis* testé à la CL25 et la CL50 sur les larves du quatrième stade de *Cx pipiens*, ne semble pas avoir des effets sur les différents paramètres biométriques et biochimiques étudiés au cours de la période testée (24, 48 et 72heures).

L'évaluation des biomarqueurs indique que les huiles essentielles de *Laurus nobilis* semblent être neurotoxiques puisqu'une diminution significative de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été enregistrée à 24 heures après traitement.

De plus, Ces huiles induisent le système de détoxification par le biais d'une augmentation de l'activité de la GST et une diminution du taux du glutathion, important cofacteur pour la détoxification.

A l'avenir, il serait intéressant de compléter ces résultats par une analyse qualitative des protéines et un dosage de la vitellogénine et de tester l'effet de ces huiles sur la viabilité des œufs ainsi que sur le potentiel de reproduction. Par ailleurs, le dosage d'autres enzymes du système de détoxification (estérases, mono-oxygénase à P450) et les techniques de biologie moléculaire, pourraient contribuer à mieux comprendre la mise en place du mécanisme de résistance et d'identifier les gènes affectés dans ce processus, afin d'établir un programme de lutte intégrée.

# Résumé

## Résumé

Notre travail a pour but d'évaluer l'effet des huiles essentielles de *Laurus nobilis* sur *Culex pipiens*, espèce de moustique la plus répandue dans la région de Tébessa. Plusieurs aspects ont été déterminés :

**Aspect toxicologique :** a permis d'établir les concentrations létales, à 24 (CL50 : 75,79 et CL90 : 109,14 ppm), 48 (CL50 : 71,92 et CL90 : 109,90 ppm) et 72h (CL50 : 67,07 et CL90 : 105,20 ppm) après traitement. Les huiles essentielles de *Laurus nobilis* montrent une toxicité à l'égard des larves 4 de *Culex pipiens* avec une relation dose-réponse.

**Aspect morphométrique :** plusieurs paramètres morphométriques ont été considérés ; la largeur du thorax, le poids et le volume corporel des larves 4 de *Cx pipiens*. Les résultats montrent que *Laurus nobilis* n'affecte pas ces paramètres au cours de la période testée (24, 48 et 72h).

**Aspect biochimique :** a été déterminé par le dosage des réserves métaboliques chez les larves 4 témoins et traitées à différents temps. Les résultats montrent une variation de ces contenus après traitement.

**Biomarqueurs :** Les H.E inhibent de manière significative l'activité spécifique de l'AChE avec des effets plus marqués à 24 heures. Une induction de l'activité de la GST est également observée au cours de la période étudiée (24, 48 et 72 heures). Enfin, une diminution de la GSH est enregistrée à 48 heures pour la concentration la plus élevée (CL50).

**Mots clés :** *Culex pipiens*, huiles essentielles, *Laurus nobilis*, toxicité, morphométrie, biochimie, biomarqueurs,

## Abstract

Our work aims to evaluate the effect of *Laurus nobilis* essential oils on *Culex pipiens*, the most widely distributed mosquito in the Tébessa area. Several aspects have been determined:

**Toxicological aspect:** has allowed the determination the lethal concentrations at: 24 (LC50: 75.79 and LC90: 109.14 ppm), 48 (CL50: 71.92 and LC90: 109.90 ppm) and 72hours (LC50: 67.07 and LC90: 105.20 ppm) after treatment. Essential oils of *Laurus nobilis* exhibited insecticidal activity against fourth instar larvae of *Culex pipiens* with dose-response relationship.

**Morphometric Aspect:** several morphometric parameters were considered : thorax width, body weight and body volume of fourth instar larvae of *Cx pipiens*. The results shows that the *Laurus nobilis* does not affect these parameters during tested period (24, 48 and 72h).

**Biochemical aspect:** was determined by measurement of metabolic reserves in control and treated fourth instar larvae at different times. The results show a variation of this content after treatment.

**Biomarkers:** The H.E inhibit significantly the specific activity of the AChE with more important effects at 48 hours. Induction of the GST activity is also observed during the studied period (24, 48 and 72 hours). Finally, a decrease in the GSH is recorded at 48 hours with elevated concentration (LC50).

**Key words:** *Culex pipiens*, essential oils, *Laurus nobilis*, toxicity, morphometry, biochemical aspect, Biomarkers.

يهدف عملنا إلى تقييم مفعول الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات الغار ضد نوع من البعوض

(*Culex pipiens*) الأكثر انتشاراً في ولاية تبسة. وقد تم دراسة عدة جوانب :

**الجانب السمي :** سمح بإيجاد الجرعات المميتة بعد 24 ( CL50: 75,79 ppm ) و

( CL90:109,14 ppm )، 48 ( CL50: 71,92 ppm و CL90:109,90 ppm ) ، 72 ساعة (

CL50:67,07 ppm و CL90:105,20 ppm ) . الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات الغار

أظهرت سمية على يرقات الطور 4 بتناسب طردي جرعة - استجابة.

**الجانب المرفوقياسي :** تم الأخذ بعين الاعتبار العديد من المؤشرات القياسية : الوزن, عرض

الصدر و حجم الجسم ليرقات الطور 4 (*Culex pipiens*) النتائج بينت ان نبات الغار لا يؤثر على هذه

المؤشرات خلال فترة الدراسة (24, 48 و 72 ساعة).

**الجانب البيوكيميائي :** تم تحديده بواسطة معايرة المدخرات الاستقلابية ليرقات الطور 4

الشواهد و المعالين خلال أوقات مختلفة, أظهرت النتائج تفاوتاً في المحتوى خلال فترات زمنية مختلفة.

**المؤشرات الحيوية :** الزيوت المستخلصة ثبتت بشكل ملحوظ النشاط الإنزيمي لـ AChE عند

24 ساعة بعد المعالجة, وقد تم تسجيل ارتفاع في نشاط GST خلال الفترات المدروسة (24, 48 و 72

ساعة) و انخفاض في GSH بعد 48 ساعة عند العينات المعالجة بأعلى تركيز (CL50)

**الكلمات المفتاحية :** *Culex pipiens*, الزيوت الأساسية, *Laurus nobilis*, السمية, مورفوقياسية,

بيوكيمياء, مؤشرات حيوية.

# Références

# Bibliographiques

## A

**Ahmad M., Saleem M.A., Sayyed A.H.**, 2009. Efficacy of insecticide mixtures against pyrethroid and organophosphate resistant population of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manage. Sci.*, **65** : 266-274.

**Akono Ntonga P., Belong P., Tchoumboungang F., Bakwo Fils E.M., Fankem H.**, 2012. Effets insecticides des huiles essentielles des feuilles *Ocimum spp.* sur les adultes d'*Anopheles funestus* ss vecteur du paludisme au Cameroun. *J. App. Biosc.*, **59** : 4340– 4348.

**Amankar, S.V., Rao, A.S. & Narayaman, N.**, 1988. Application of *Bacillus sphaericus* in the

**Anonyme**, 2005. Mosquito borne diseases. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia.

**Aouinty B., Oufra S., Mellouki F. & Mahari S.**, 2006. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis L.*) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques Culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **10 (2)** : 67-71.

**Asidi A., N'Guessan R., Akogbeto M., Curtis C., Rowland M.**, 2012. Loss of household protection from use of insecticide-treated nets against pyrethroid-resistant mosquitoes, *Benin. Emerging Infectious Diseases.*, **18**: 1101–1106.

control of *Culex fatigans*. International symposium on changing perspectives in glochemicals isotopies 24-11-1987, Vienne: 277-287.

## B

**Badani S.**, 2014. Etude de l'activité des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique *Culiseta logiareolata*. Mémoire du diplôme de Master. Fac des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, Tébessa. 24p.

**Badiou A.**, 2007. Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur acétylcholinestérase chez l'abeille, *Apis mellifera*. Thèse de Doctorat, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, FRA.

**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.

**Beaudoin & Lemonde.**, 1970. Evolution des glycérides et des acides gras durant la croissance et la métamorphose de *Tribolium confusum*. *J. Insect. Physiol.*, 16: 71–78.

**Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Dahl C., Madon M., Kaiser A.**, 2010. Mosquitoes and their Control. New York, USA, Kluwer Academic/Plenum. Service M. W. 1993. Mosquitoes (Culicidae). In: Lane R. P., Crosskey R. W. (eds), *Medical Insects and Arachnids*. Chapman & Hall, London, 120-240.

**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** : 19-67.

**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. 63p.

**Bouguerra A.,** 2012. Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des grains de *Foeliculum vulgare* Mill. En vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de Magister. Université Mentouri Constantine. 120 p.

**Bouguerra N.,** 2012. Effets de la nouvelle molécule, Spiromésifène sur le taux des acides nucléiques (ADN et ARN) corporels et sur l'activité enzymatique chez une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire du diplôme Master. Université des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie-Tébessa. 40p.

**Bouzidi O. Ziani R.,** 2015. Etude de l'impact des huiles essentielles d'une plante larvicide, l'*Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique *Culiseta longiareolata* : aspect morphométrique et biochimique. Mémoire du diplôme de Master. Université des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie-Tébessa. 28p.

**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 - 254.

**Braks M., Van Der Giessen J., Kretzschmar M., Van Pelt W., Scholte E. J., Reusken C., Zeller H., Van Bortel W., Sprong H.,** 2011. Towards an integrated approach in surveillance of vector-borne diseases in Europe. *Parasites & Vectors.*, **4**: 192.

**Braqueunier J.B.,** 2009. Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat, Université de Liège. 217p.

**Briegel H.,** 1985. Mosquito reproduction, incomplete utilization of blood meal protein for oogenesis. *J. Insect. Physiol.*, **31**: 15-21.

## C

**Camara A.,** 2009. Lutte contre *Sitophilis oryzae* L. (Coleoptera : Curculionidae) et *Tribolium castaneum*, herbst (Coleoptera : Tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales. Thèse du Doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal.

**Cédric P.,** 2008. Interactions entre insecticides non pérythrinoïdes 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 N., Yanikoglu A., Cilek J.E.** 2006. Evaluation of the naturally derived insecticide Spinosad against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) larvae in spetia tank water in Antalya, Turkey. *J. Ecol.*, **30**: 151-154.

**Chang Y.H. & Judson C. L.**, 1977. The role of isoleucine in differential egg production by the mosquito *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera: Culicidae) following feeding on human or guinea pig blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, **57 (A)**: 23-28.

**Chansang U., Zahiri N.S., Bansiddhi J., Boonruad T., Thongsrirak P., Mingmuang J.**, 2005. Mosquito larvicidal activity of crude extracts of long pepper (*Piper retrofractum vahl*) from Thailand. *J. Vector. Ecol.*, **30**: 195-200.

**Charpentir A., Menozzi P., Marcel V., Villate F. & Fournier D.**, 2000. A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Analytical. Biochemistry.*, **285** : 76-81.

**Chettat H.**, 2013. Etude des huiles essentielles de *Mentha piperita* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire du diplôme de Master. Université de Tébessa 45p.

**Chino H., Katase H., Downer R.C. & Hard Takahashi K.**, 1981. Diacylglycerol carrying lipoprotein of haemolymph of the American cockroach: Purification, characterisation and function. *J. Lipid Res.*, **22**: 7- 15.

**Chippendale G.M.**, 1970. Metamorphic changes in Fat body proteins of the south western corn border, *Diatraea grandiosella.*, *J. Insect physiol.* **16** : 1057 -1068.

**Choochate W., Chaiyasit D., Kanjanapothi D., Rattanachanpichai E., Jitpakdi A., Tuetun B.**, 2005. Chemical composition and antimosquito potential of rhizome extract and volatile oil derived from *Curcuma aromatica* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Vector. Ecol.*, **30**: 302-9.

**Chowdhury S.S., Salahuddin M., Jamila M., Mazumder M.E.H.**, 2008. Infrared spectroscopic characterization of chitosan extracted from the exoskeleton of *Scylla serrata*. Primeasia Studies.

**Coosemans M., Hendrickx G., Grootaert P., Hance T., Versteirt V., Van Bortel W.**, 2011. Mosquito vectors of disease: spatial biodiversity, drivers of change, and risk. Final Report. Brussels: Belgian Science Policy 2009. *Research Programme Science for a Sustainable Development*.

**Cseke, L.J., Kaufman P.B., Warber S., Duke J.A., Brielmann H.L.**, 1999. Natural products from plants. *CRC Press LLC, Boca Raton, USA*.

## D

**Díaz P.C., Alvarez Gavilán Y., Armas Rodríguez Y., Bisset Lazcano J.A.**, 2007. Determination of insecticide-resistance and resistance mechanisms of *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattellidae). *Rev. Cubana Med. Trop.*, **59 (2)** : 159-65.

**Djaffali M.** 2015. Etude de l'impact des huiles essentielles d'une plante larvicide sur les paramètres de reproduction d'une espèce de moustiques *Culiseta longiareolata*. Mémoire du diplôme de Master. Université des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie-Tébessa 30p.

**Downer R.G.H.**, 1985. Lipid metabolism. In *Compr. Insect. Physiol. Biochem. And Pharm.* (G. A. Kerkert & L. I. Gilbert, eds). Pergamon Press. Oxford., **10** : 77-113.

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

## E

**Edwards M., Stuber C., Wendell J.**, 1987. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution, and types of gene action. *Genetics.*, **116**:113-125.

**Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. & Featherstone R.M.**, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, **7**: 88 – 95.

## F

**Field, L. M., Blackman, R. L., Tyler-Smith, C. & Devonshire, A. L.** 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistance *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.*, **339**: 737-742.

## G

**Gagne F., Pardos M., Blaise C.**, 1999. Estrogenic effects of organic environmental extracts with the hepatocyte vitellogenin assay. *Bull. Environ. Toxicol.*, **62** : 723-730.

**Gannagé-Yared M., Khneisser I., Salem. N., Gouyette A., Loiselet J., Halaby G.**, 1998. Glutathion et glutathion-S-transférase sanguins et leucocytaires : relation avec la cholinérolémie chez des volontaires sains. *Ann. Biol. Clin.*, **56 (3)**: 321-327.

**George S.G.**, 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic conjugating enzymes in fish. In Malins, D.C., Ostrander, G. K. *Aquatic. Toxicology, Molecul. Biochem and Cell. Perspect.* Lewis, Boca Raton, FL, pp. 37-85.

**Gheraibia S. & Abaidia W.**, 2014. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide de l'huile essentielle de *Lavandula dentata* à l'égard de moustique *Culex pipiens*. Mémoire du diplôme de Master. Université de Tébéssa.

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

**Gouasmia H., Bouchagoura M.**, 2013. Etude insecticide des huiles essentielles de *Lavandula dentata* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire de Master. Université de Tébéssa.

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

**Grimstad P.R. & Haramis L.D.**, 1984. *Aedes triseriatus* (Dipt : Culicidae) and La Crosse virus III. Enhanced oral transmission by nutrition-deprived mosquitoes. *J. Med. Ent.*, **21**: 249-256.

## H

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

**Haramis L.D.**, 1985. Increased adult size correlated with parity in *Aedes triseriatus*. *Mosq. News.*, **43**: 77-79.

**Harold J.A. & Ottea J.A.**, 2000. Characterization of esterases associated with profenofos resistant in the tobacco budworm *Heliothis virescens* (F). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **45** : 47-59.

**Haubruege 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)**: 161-174.

**Hawly W.A.**, 1985a. The effect of larval density on adult longevity of mosquito, *Aedes sierrensis*: epidemiological consequences. *J. Anim. Ecol.* **54**: 955-964.

**Hawly W.A.**, 1985b. A high fecundity aedine, factors affecting egg production of the western treehole mosquito *Aedes sierrensis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Ent.*, **22**: 220-225.

**Hemingway J., Hawkes N.J., Mc Carroll L., Ranson H.**, 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **34 (7)**: 653-65.

**Hien D.S.**, 1976. Biology of *Aedes aegypti* (L. 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera : Culicidae). *Acta. Parasitol. Pol.*, **24**: 37-55.

**Hosoi T.**, 1954. Egg production in *Culex pipiens pallens* coquillet. I.V. Influence of breeding conditions on wing length, body weight and follicule production. *J. Med. Sci. Biol.*, **7**: 129-134.

## I

**Ishaaya I., Horowitz A.R.**, 1998. Insecticides with novel modes of action: An overview. In: Insecticides with novel modes of action: Mechanism and application, ed. Ishaaya I. & Degheele D. Springer, Berlin. 1-24.

**Isman M.B.**, 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.*, **19**: 603-608.

## J

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

**Jang Y.S., Kim M.K., Ahn Y.J. & Lee H.S.**, 2002. Larvicidal activity of Brazilian plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Agri. Chem. Biotechnology.*, **45 (3)**: 131-134.

## K

**Kamaraj C., Rahuman A.A., Bagavan A., Abduz Zahir A., Elango G., Kandan P., et al.**, 2010. Larvicidal efficacy of medicinal plant extracts against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Trop. Biomed.*, **27**: 211-9.

**Kassi L.A., Berger Y.M., Bradford G.E., Boukhliq R., Tibary A., Derqaoui L. & Boujenane I.**, 1989. Performance of D'man and Sardi sheep on accelerated lambing. I. Fertility, litter size, post- partum anoestrus and puberty. *Small. Rum. Res.*, **2**: 225-239.

**Kassi N.**, 1991. This Land Has Sustained Us, *Alternatives.*, **18 (2)**: 20-21.

**Keely L.L.**, 1985. Physiology and biochemistry of Fat body, pp. 211-248. In GA Kerkut & L. I. Gilbert (eds): *Comprehensive Insect Biochemistry, physiology and pharmacology*, vol. 3, Pergamon Press, Oxford. 181.

**Kemache A. & Meziani H.**, 2015. Etude de l'effet des huiles essentielles d'*Ocimum basilicum* sur les biomarqueurs à l'égard de deux espèces de moustiques *Culiseta longiareolata* et *Culex pipiens*. Mémoire de Master. Université de Tébessa.

**Khaled I. & Dib D.**, 2015. Evaluation de l'activité des huiles essentielles de *Eucalyptus globulus* à l'égard d'une espèce de moustiques *Culex pipiens* : toxicologie, développement, morphométrie et biochimie. Mémoire de Master. Université de Tébessa. p : 39-44.

**Khamene I.** 2014. Etude de l'activité insecticide d'extrait de *Ocimum basilicum* à l'égard d'une espèce de moustiques *Culex pipiens*. Mémoire du diplôme de Master. Université de Tébessa 43p.

**Kielak E., Sempruch C., Mioduszewska H., Klocek J., Leszczyński B.**, 2011. Phytotoxicity of roundup ultra 360 SL in aquatic ecosystems: biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. *Pest. Biochem. and Physiol.*, **99** : 237-243.

**Kilby B.A.**, 1963. The biochemistry of the insect Fact. *Adv. Insect physiol.*, **1**: 112-174.

**Kizek R., Vacek J., Trnková L., Jelen F.** 2004. Cyclic voltammetric study of the redox system of glutathione using the disulfide bond reductant tris (2-carboxyethyl) phosphine. *Bioelectrochemistry.*, **63**: 19-24.

**Konan O.Y.L., Koffi A.A., Doannio J.M.C., Darriet F.**, 2003. Résistance de *Culex quinquefasciatus* (SAY, 1823) à la Deltaméthrine et l'utilisation de la moustiquaire imprégnée en milieu urbain de Bouaké, Côte d'ivoire. *Ent. Méd.*, **2380** : 128-129.

## L

**Lagadic L., Caquet T., Amirad J.C & Ramade F.,** 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie « Aspects fondamentaux ». Masson. Paris. 419 pages.

**Lakbar C.,** 2000. Effets de deux régulateurs de croissance, le RH-0345 et le Pyriproxifène sur le développement de *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae). Magistère en Développement et Reproduction. Université d'Annaba. Algérie.

**Larsen J.R. & Bodestein D.** 1959. The humoral control of egg maturation in the mosquito. *J. Exp. Zool.*, **140** : 343-381.

## M

**Mahler H. & Cordes E.,** 1968. Biological chemistry, Harper and Row.

**Manguin S. & Boëte C.,** 2011. Global impact of mosquito biodiversity, human vector-borne diseases and environmental change. The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity. *Winchester, UK, In Tech*, pp 27–50 in Pujol, J.L. (Ed.).

**Mansour S.A., Messeha S.S. & EL Gengaihi S.E.,** 2000. Botanical biocides. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. *J. Nat. Tox.*, **9** : 49-62.

**Marquardt W.C.,** 2005. Biology of disease vectors, second edition. *Clin. Infect. Dis.*, **41** (11): 1692-1693.

**Maurya P., Sharma P., Mohan L., Batabyal L. & Srivastava C.N.,** 2009. Evaluation of the toxicity of different phytoextracts of *Ocimum basilicum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Asia-Pacific. Entomol.*, **12** : 113-5.

**Mavoungou J.F., Simo G., De Stordeur E. & Duvallet G.,** 2008. Ecologie des stomoxes (Diptera : Muscidae) au Gabon II. Origine de repas de sang et conséquences épidémiologiques. *Parasite.*, **15** : 611-615.

**Medlock J.M., Hansford K.M., Schaffner F., Versteirt V., Hendrickx G., Zeller H. & Van Bortel W.,** 2012. A review on the invasive mosquitoes of public health concern in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases.*, **12**: 435–447.

**Meister A. & Anderson M.E.,** 1983. Laboratory observations on the toxicity of *Swartzia madagascariensis* (Legumimosal) extract to mosquito larvae. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **80** (3) : 460-461.

**Mohammedi, Z. and Atik, F.** 2012. HPLC-UV Analysis and Antioxidant Potential of Phenolic Compounds from Endemic Shrub of Arid Environment *Tamarix pauciovulata* J. Gay. Natural Products Laboratory, Department of molecular and cellular biology, faculty of sciences, university of Abou Bakr Belkaid, BP 119 Tlemcen 13000, Department of Biology, faculty of life and natural sciences, university Mustapha Stambouli, BP 305 Mascara 29000, Algeria.

**Moutailler S., Krida G., Schaffner F., Vazeille M. & Failloux A.B.,** 2008. Potentiel vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean Region. *Vector Borne Zoonot Dis.*, **8** : 749-753.

## N

**Nowosielski J.W. & Patton R.L.**, 1965. Variations in the haemolymph protein, amino acid, and lipid levels in adult house crickets, *Acheta domesticus* L., of different ages. *J. Insect. Physiol.*, **11** : 263-270.

## O

**OMS.**, 2007. Paludisme : lutte anti vectorielle et protection individuelle : rapport d'un groupe d'étude de l'OMS. OMS, Série de rapports techniques ; 93.6. Genève, Suisse.

**Özcan M. & Chalchat J.C.**, 2012. Essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minimum* L. in Turkey. *Czech J. Food Sci.*, **20**: 223-228.

## P

**Paoletti M.G., Pimentel D.**, 2000. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *J. Agr. Environ. Ethic.*, **12 (3)** : 279-303.

**Parapanthadara L., Promtet N., Koottathep S., Sombon P. & Ketterman A.J.**, 2000. Isoenzymes of glutathion S-transferase from mosquito Anopheles species B: the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. *Insect. Biochem. Mol Biol.*, **30**: 395-403.

**Pasteur N. & Raymond M.**, 1996. Insecticide resistance genes in mosquitoes: their mutations, migration and selection in field population. *Journal of Heredity.*, **87** : 444-449.

**Peters W.**, 1992. A Colour Atlas of Arthropods in Clinical Medicine. Wolfe Publishing, London. 304 p.

**Philogène B.J.R., Regnault R.C. & Vincent C.**, 2008. Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. In Regnault- Roger C., Philogène, B. J. R., Vincent, C. Biopesticides d'origine végétale. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, 546 p.

## R

**Raghavendra K., Singh S.P., Subbarao S.K., Dash A.P.**, 2009. Laboratory studies on mosquito larvicidal efficacy of aqueous & hexane extracts of dried fruit of *Solanum nigrum* Linn. *Indian. J. Med. Res.*, **130**: 74-77.

**Rajkumar S., Jebanesan A.**, 2005. Larvicidal and adult emergence inhibition effect of *Centella asiatica* Brahmi (Umbelliferae) against mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Afr. J. Biomed. Res.*, **8** : 31-3.

**Rattan R.S.**, 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop. Protec.*, **29**: 913-20.

**Rebeiro S., Guilhermino L., Sousa J.P. & Soares A.M.V.M.**, 1999. Novel bioassay based on acetylcholinesterase and lactate deshydrogenase activities to evaluate the toxicity of chemicals to soil isopods. *Ecotoxicol. Environ. Safety.*, **44** : 287-293.

**Reusken C., De Vries A., Ceelen E., Beeuwkes J. & 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** : 66-81.

**Rey D., Cunay A., Pautou M., Meryan J.,** 1999. Differential sensitivity of mosquito taxa to vegetable tannin, *J. Chem. Ecol.*, **25** : 161-169.

**Rodriguez M., Bisset J., De Ruiz M., Soca A.,** 2002. Cross-Resistance to Pyrethroid and Organophosphorus Insecticides Induced by Selection with Temephos in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Cuba: *J. Med. Entomol.*, **39** (6) : 882-888.

**Rueda L.M.,** 2008. Global diversity of mosquitoes (Insecta: Diptera: Culicidae) in freshwater. *Hydrobiologia.*, **595** : 477-487.

**Rufeingier C., Pasteur N., Lagnel J., Martin C. & Navajas M.,** 1999. Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nesonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera : Aphididae) from France. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **29** : 385-391.

## S

**Sahbi F., Aouni M.,** 2015. Impact des huiles essentielles de *Lavandula dentata* sur la biochimie, la morphométrie chez une espèce de moustique *Culex pipiens*. Mémoire de Master. Université de Tébessa. p : 28-32.

**Saleem M.A. & Shakoori A.R.,** 1987. Joint effects of dimilin and Ambush on enzyme activities of *Tribolium castaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **29** : 127-137.

**Samuel O. & Laurent L.S.,** 2005. Profil toxicologique des insecticides retenus pour le contrôle des insectes adultes impliqués dans la transmission du virus du Nil occidental au Québec. Institut national de santé publique de Québec. Canada. N° 378. Vol 86.

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

**Sayada N. & Messai S.,** 2015. Etude de l'effet des huiles essentielles d'une plante larvicide *Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique, *Culex pipiens* : aspect morphométrique et biomarqueurs. Mémoire de Master. Université de Tébessa 37p.

**Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hevry J.P., Rhaïem A. & Brunhes J.,** 2001. Moustique d'Europe. Institut de recherche pour le développement IRD. Logiciel d'identification.

**Scott J.G.,** 1999. Cytochrome P450 and insecticide resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, **29**: 757-777.

**Shibko S., Koivistoinen P., Tratnyneck C., New Hall. & 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.

**Siegfried B.D. & Scharf M.E.,** 2001. Mechanisms of organophosphate resistance in insect. Department of Entomology. *University of Nebraska Lincoln NE, USA.* p: 269-291.

**Sifi K.,** 2009. Biosurveillance de la qualité des eaux au Golf d'Annaba : croissance, composition biochimique et dosage de biomarqueurs du stress environnementale chez *Donax*

*trunculus* (Mollusque : Bivalve). Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat. Université de Annaba. 229 p.

**Singh J.P., Pandey D.P., Panday M.B., Singh A. & Singh R., 2005.** Alkaloids of *Heliotropium indicum*. *J. Indian. Chem. Society.*, **82** : 175-176.

**Singh S., Kumar S., Sunil K. & Ram P., 2007.** Toxicological and Biochemical Alterations of Cypermethrin (Synthetic Pyrethroids) Against Fresh water Teleost Fish *Colisa fasciatus* at different season. *Yadav. W. J. Zool.*, **5 (1)** : 25- 32.

**Smallfield B., 2001.** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research.*, **45**: 4.

**Soderlund D.M., 1997.** Molecular mechanisms of insecticide resistance. In situ V (Ed). Molecular mechanisms of resistance to agrochemicals, Chemistry of plant protection. *Springer, Berlin Heidelberg New York.*, **13** : 21-56.

**Soliman B.A. & El-Sherif L.S., 1995.** Larvicidal effect of some plant oils on mosquito *Culex pipiens* L (Diptera : Culicidae), *J. Egypt. Ger. Soc. Zool.* **16** : 161-169.

**Soltani N., Rehim N., Beldi H. & Bendali F., 1999.** Activité du triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvivores non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr (N.S.)*, **35** : 502-508.

**Soreq H. & Zakut H., 1993.** Human cholinesterases and anticholinesterases. *San Diego : Academic Press.*

**Spielman A. & Wong J., 1974.** Dietary factors stimulation oogenesis in *Aedes aegypti*. *Biol. Bull.*, **147**: 433 - 442.

**Steel J.E., 1981.** The role of carboxydrate metabolism in physiological function. Pp : 103-133. IM R. G. H. Downer (eds) : *Energy metabolism insects plenum press*, New york.

**Sukumar K., Perich M.J., Boobar L.R., 1991.** Botanical derivatives in mosquito control: a review. *J Am Mosq Control Assoc.*, **7** : 210-37.

**Sun C.N., Huang S.Y., Hu N.T. & Chung W.Y., 2001.** Gluthations S-transferase and insect resistance to insecticides. *National Chang-hsing university, Taichung, Taiwan, Republic of China.*, p: 254-269.

**Svoboda K.P. & Hampson J.B., 1999.** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. <http://www.csl.gov.uv/ienica/seminars/>.

## T

**Takken W. & Knols B.G.J., 2007.** Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe. *Wag. Acad. Publ.* 500p.

**Taylor M. & Feyereisen R., 1996.** Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Mol. Biol. Evol.*, **13** : 719 – 734.

**Tchoumboungang F., Avam Zollo P., Dagne E., Mekonnen Y., 2005.** *In vivo* anti- malarial activity of essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Ocimum gratissimum* on mice infected with *Plasmodium berghei*. *Planta Medica.*, **71**: 20-23.

**Thomas C.J. & Callaghan A., 1999.** The use of garlic (*Allium sativa*) and lemon peel (*Citrus limon*) extracts as *Culex pipiens* larvicides: persistence and interaction with an organophosphate resistance mechanism, *Chemosphere.*, **39** : 2489-2496.

**Timmermann S.E. & Briegel H.**, 1998. Molting and metamorphosis in mosquito larvae: a morphometric analysis. *Mitt. Schweiz. Entomol. Ges.*, **71** : 373-387.

**Tine-Djebbar F.**, 2009. Bioécologie des moustiques de la région de Tébessa et évaluation de deux régulateurs de croissance (halofénoside, méthoxyfénoside) 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. 168p.

**Tine-Djebbar F., Bouabida H. & Soltani N.**, 2016. Répartition spatio-temporelle des culicidés dans la région de Tébessa. Edition Universitaire Européennes. ISBN: 978-3-639-50856-7.

**Tolle M.**, 2009. Mosquito-borne diseases. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care.*, **39** : 97-140.

**Tomita T., Hidoh O & Kono Y.**, 2000. Absence of protein polymorphism attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. *Insect. Biochem. Mole. Biol.*, **30** : 325-333.

## V

**Van Hendsen H.C. & Law J.H.**, 1989. An insect transports particulate promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biol. Chem.*, **264** : 287-292.

**Versteirt V., Pecor J.M., Fonseca D., Coosemans M., Van Bortel W.**, 2012. Confirmation of *Aedes koreicus* (Diptera: Culicidae) in Belgium and description of morphological differences between Korean and Belgian specimens validated by molecular identification. *Zootaxa.*, **3191**: 21–32.

## W

**Weckberker G. & Cry J.G.**, 1988. Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia 1210 cells *in vitro*. *Cancer letters.*, **40**: 257-264.

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

**Wigglesworth V.B.**, 1972. The principles of insect physiology. Seventh Edition. Chapman and Hall, 827p.

**Wyatt G.R.**, 1967. The biochemistry of insect haemolymph. *A. Rev. Ent.*, **6** : 75-102.

## Y

**Yu S.J. & Abo-Elghar G.E.**, 2000. Allelochemicals as inhibitors of Glutathione-S-transferase in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **68** : 173-183.

**Yu B.P.**, 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **74** : 139-162.

## Z

**Zehnalek J., Adam V. & Kizek R.,** 2004. Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Lis. Cukrov. Reparske.*, **120** : 222-224.

**Zhu K.Y., Dowdy A.K. & Barker J.E.,** 1999. Detection of single-base substitution in an esterase gene and its linkage to malathion resistance parasitoid *Anisoptromalus calandrae* (Hymenoptera : Pteromalidae). *Pest. Scie.*, **55** : 398-404.

### Webographie

**Forest & Kim Starr,** Operculums at Makawao Forest Reserve, Maui-Credit : Forest and Kim Starr- Plants of Hawaii – Image licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Licence, permitting sharing and adaptation with attribution. Wikipedia.fr.

**W.H.O., 2011.** Mortality database: tables [online database]. Geneva, World Health Organization, ([www.who.int/healthinfo/morttables](http://www.who.int/healthinfo/morttables)).