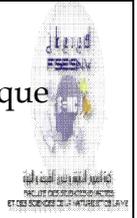




République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi



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,  
*Thymus vulgaris* sur une espèce de moustique, *Culex pipiens*:  
Toxicité et biomarqueurs.**

Présenté par:

**Melle. Delloum Amina**

**Melle. Rami Imane**

Devant le jury:

Dr. TINE Samir	MCA	Université de Tébessa	Président
Dr. TINE-DJEBBAR Fouzia	MCA	Université de Tébessa	Rapporteuse
Dr. BOUZERAA Hayette	MCB	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : Le 31 Mai 2016

## ملخص

الهدف الأساسي من هذا العمل هو تقييم مفعول الزيوت الأساسية المستخلصة من نبات الزعتر المنتمي إلى عائلة *lamiacea* على نوع من البعوض *Culex pipiens* الأكثر انتشاراً في منطقة تبسة الذي بات عاملاً ازعاجاً في هاته المنطقة.

مردود الزيوت الأساسية المستخلصة من هذه النبتة يقدر بـ 1.58 % بالنسبة للمادة الجافة. وقد تم تقييم عدة جوانب :

**السمية :** أظهر تطبيق عدة تراكيز من الزيوت الأساسية لنبتة الزعتر على يرقات الطور الرابع لنوع *Culex pipiens* مفعول ضد الحشرات يتناسب طردي للجرعة مع الاستجابة .

بعد المعالجة بين حساب الجرعات المميّنة تغيرات مع الوقت :

24 ساعة (ال CL25 : 72.04 ppm و CL50 : 190.54 ppm )

48 ساعة (ال CL25 : 68.61 ppm و CL50 : 190.54 ppm )

و 72 ساعة (ال CL25 : 68.61 ppm و CL50 : 169.82 ppm )

**تطور الوزن :** في غضون فترة التجريب ، تطبيق الزيوت الأساسية بالتركيزين CL25 و CL50

لم يسجل أي تأثير على وزن اليرقات.

**التركيب البيوكيميائي :** أدى تطبيق التركيزين CL25 و CL50 على يرقات الطور الرابع الي انخفاض محسوس في كمية البروتين و ذلك بعد 72 ساعة من المعالجة .

**المؤشرات الحيوية:** أظهرت معايرة المؤشرات الحيوية بعد (24 . 48 و 72 ساعة ) ارتفاع معتبر في النشاط الإنزيمي لـ GST مع انخفاض النشاط الإنزيمي للـ AChE و GST.

**الكلمات المفتاحية :** *Culex pipiens* ، البيوكيمياء، الزيوت الأساسية، نبات الزعتر، المؤشرات الحيوية .

**ABSTRACT**

Our work aims to evaluate the effects of essential oils extracted from a plant of the Lamiaceae family, *Thymus vulgaris* on *Culex pipiens*, the most widely distributed mosquito in Tébessa and nuisance factor in the urban areas. This plant provided an essential oil yield of 1.58 % of the dry plant material. Several aspects were studied:

**Toxicity:** The application of the various concentrations of *Thymus vulgaris* essential oil on fourth instar larvae of *Cx pipiens* exhibited insecticidal activity with dose-response relationship. The lethal concentrations show a variations according to the periods after treatment: 24 (LC50: 72.04 and LC90: 207.01 ppm), 48 (LC50: 68.61 and LC90: 190.54 ppm) and 72 hours (LC50: 62.12 and LC90: 169.82 ppm).

**Weight growth:** The application of essential oil with two concentrations (CL25 and CL50) does not affect the body weight of fourth instar larvae of *Cx pipiens* during the tested period (24, 48 and 72 hours).

**Biochemical composition:** The LC25 and the LC50 applied to fourth instar larvae cause an important reduction in the protein contents at 24, 48 and 72 hours after treatment.

**Biomarker:** dosed at various times (24, 48 and 72 hours), the biomarkers indicate a moderate induction of the GST activity, and a significant reduction of the GSH rate and AChE specific activity at 72 hours after treatment.

**Keywords:** *Culex pipiens*, *Biochemistry*, *Essential oils*, *Thymus vulgaris*, *Biomarkers*.

---

**RESUME**

Notre travail a pour but d'évaluer les effets des huiles essentielles extraites d'une plante de la famille des Lamiaceae, *Thymus vulgaris* sur *Culex pipiens*, espèce de moustique la plus répandue dans la région de Tébessa et agent de nuisance dans les zones urbaines.

Cette plante a fourni un rendement en huiles essentielle de 1,58% de la matière végétale sèche. Plusieurs aspects ont été étudiés:

**Toxicité** : L'application des différentes concentrations des H.E de *Thymus vulgaris* sur les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* a montré une activité insecticide avec une relation dose-réponse. Les concentrations létales calculées marquent des variations en fonction des périodes après traitement : 24 (CL50 :72,04 et CL90 : 207,01ppm), 48 (CL50 : 68,61 et CL90 : 190,54 ppm) et 72 heures (CL50 : 62,12 et CL90 : 169,82 ppm).

**Croissance pondérale** : L'application des huiles essentielles avec deux concentrations (CL25 et CL50) n'affecte pas le poids des larves 4 de *Cx pipiens* au cours de la période testée (24, 48 et 72 heures).

**Composition biochimique** : La CL25 et la CL50 appliquées sur les larves 4 provoquent une diminution très marquée du contenu en protéines à 24, 48 et 72 heures après traitement.

**Biomarqueurs** : dosés à différents temps (24, 48 et 72h), les biomarqueurs indiquent une induction modérée de l'activité de la GST, une réduction significative marquée du taux de GSH et de l'activité spécifique de l'ACHé à 72 heures après traitement.

**Mots clé** : *Culex pipiens*, biochimie, huiles essentielles, *Thymus vulgaris*, Biomarqueurs.

## DÉDICACES

*Pour la source d'amour et de tendresse qui a enjolivé ma vie*

*Pour qui ma veillée toute sa vie et m'a donnée l'espoir de continuer mon long trajet.....bien sur c'est pour toi que je dedie ce travail Mama, tu es une amie extraordinaire, tu es gentille et sincère, tout simplement je t'aime je t'adore.*

*Je dedie ce travail à toi le grand cœur,*

*mon père pour tes encouragements, soutiens et tendresse.*

*Je te remercie du fond du cœur*

*A mes chers frères ; SAIF , HAMID , SEDIK*

*Mon âme, chère sœur ; AHLEM*

*A mon grand père ABD ALLAH que dieu te protège*

*Mon grand père SALEH SOLTANI «Rabi yarehmou»*

*A mes grand-mère, mes tante, mes oncles, mes cousins, à toute la famille DELLOUM et SOLTANI*

*Mes amies DALEL, MARIEM, SABAH, NOURHANE, HIBA, FATMA, RANIA, FATIMA, HAJER, notamment mon binôme la courageuse Imane en souvenir des bons moments que nous avons passés ensemble.*

*A tous mes collègues pour leur soutien moral et à toutes les personnes que j'aime je dédie ce travail.*

*AMINA*

# *Dédicace*

*Avec un énorme bonheur et une extrême joie, je dédie ce modeste travail à :*

- *Mon père «Abd Elhamid» qui ma aidé et ma soutenu et ma encouragé et dirigé, ma permis et à mis à ma disposition tous les moyens de réussite.*
- *Ma mère «Djaïda» la femme la plus chère, la bougie qui éclaire ma vie et qui a été la base de ma réussite la plus adorable et la fontaine d'amour, la femme qui est la source de ma force et de mon réconfort grâce a ses conseils et sa tendresse.*
- *Mes chers frères à qui je souhaite une longue vie*

*Omar et sa femme Hanifa*

*Et le plus beau gosse Kheir Eddine*

- *Mes charmantes sœurs à qui je souhaite le bonheur dans leurs vies personnelles:*

*Fouzia et son époux Belgacem et leur enfant Adam*

*Et la plus proche de mon cœur, mon âme sœur, chère amie qui n'a jamais cessé de me donner tous les sens d'amour et d'amitié Hadia*

- *Sans oublier les fleurs de paradis : Zizou, Sabah, Nourhane, Dalel, Ahlem, Meriame, Hiba, Salma, Touta, Malak, notamment mon binôme la courageuse Amina*
  - *A toutes la famille RAMI de près ou de loin*
- En fin, mes meilleurs vœux de réussir pour l'ensemble.*

*IMANE*

# Remerciements

*Tout d'abord, on tient à remercier Dieu tout puissant de nous avoir donné la force, le courage et la patience pour mener à terme notre formation Master.*

*Ce travail a été effectué au laboratoire de molécules bioactive et applications de l'université de tebessa, nous remercions vivement Dr. Tine Samir pour avoir accepté de présider ce jury.*

*Nous tenons tout particulièrement à exprimer notre plus vifs remerciements et notre profonde gratitude à Dr. Tine- Djebbar Fouzia cher maître nous sommes très honorés de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de diriger ce travail. C'est ici l'occasion de vous rendre un hommage mérité, vous dire combien nous avons été séduit par votre rigueur scientifique, ainsi que vos qualités humaines. Même si les mots de remerciement sont très petits par rapport à vos efforts. Pour nous aider et nous orienter -Vraiment Merci-*

*Notre plus profonde gratitude au Dr. Bouzeriaa Hayatte pour l'immense privilège qu'elle nous fait en acceptant d'examiner ce travail.*

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

## Table de matière

<b>1. INTRODUCTION.</b>	01
<b>2. MATERIEL ET METHODES.</b>	03
2.1. Présentation de l'insecte ; <i>Culex pipiens</i> (Linné, 1758).	03
2.2. Techniques d'élevage.	04
2.3. Présentation de la plante ; <i>Thymus vulgaris</i> (Martinove, 1820).	05
2.4. Extraction des huiles essentielles.	06
2.5. Traitement.	07
2.6. Etude toxicologique.	07
2.7. Dosage des biomarqueurs.	08
2.7.1. Dosage de l'acétylcholinestérase.	08
2.7.2. Dosage des glutathion S-transférases.	09
2.7.3. Dosage du glutathion.	10
2.8. Dosage des protéines totales.	11
2.9. Analyse statistique.	12
<b>3. RESULTATS.</b>	13
3.1. Rendement des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> .	13
3.2. Essais toxicologiques.	13
3.2.1. Toxicologie des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> à l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 24 heures après traitement.	13
3.2.2. Toxicologie des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> à l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 48 heures après traitement.	14
3.2.3. Toxicologie des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> à l'égard de <i>Culex pipiens</i> à 72 heures.	15
3.3. Effet des H.E xtraites de <i>Thymus vulgaris</i> sur la croissance pondérale	15

de <i>Culex pipiens</i> .	
3.4. Effet des huiles essentielles extraites de <i>Thymus vulgaris</i> sur le contenu en protéines totales chez <i>Culex pipiens</i> .	17
3.5. Effet sur les biomarqueurs.	18
3.5.1. Effet sur le taux de la GSH.	19
3.5.2. Effet sur l'activité spécifique des GSTs.	20
3.5.3. Effet sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase.	21
<b>4. DISCUSSION.</b>	24
4.1. Rendement en huiles essentielles.	24
4.2. Toxicologie des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i> .	25
4.3. Effet sur la croissance pondérale.	26
4.4. Effet sur le contenu en protéines.	27
4.5. Effet sur les biomarqueurs.	27
4.5.1. Effet sur le taux de glutathion.	28
4.5.2. Effet sur le taux de la GST.	30
4.5.3. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE.	31
<b>5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.</b>	33
<b>6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.</b>	34

## Liste des Tableaux

Tableaux	Titres	Pages
<b>Tableaux 01</b>	Dosage des protéines totales chez les moustiques : réalisation de la gamme d'étalonnage.	11
<b>Tableaux 02</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (ppm) appliquées sur des larves de quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> , sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures ( $m \pm$ SEM, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus).	13
<b>Tableaux 03</b>	Efficacité des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement excuviées de <i>Cx pipiens</i> à 24 heures, analyse des probits.	14
<b>Tableaux 04</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</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 ( $m \pm$ SEM, n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).	14
<b>Tableaux 05</b>	Efficacité des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 48 heures, analyse des probits.	14
<b>Tableaux 06</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</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 ( $m \pm$ SEM, n= 3 répétitions comportant chacune 20 individus).	15
<b>Tableaux 07</b>	Efficacité des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de <i>Cx pipiens</i> à 72 heures, analyse des probits.	15
<b>Tableaux 08</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (CL 25 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 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)).	16
<b>Tableaux 09</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales ( $\mu$ g/individu) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes ( $m \pm$ 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)).	17
<b>Tableaux 10</b>	Effet des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Thymus vulgaris</i> sur le taux du glutathion (nM/mg protéines) chez les larves du	19

	quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes ( $m \pm SEM$ , $n=3$ 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>Tableaux 11</b>	Effet des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Thymus vulgaris</i> sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu M/min/mg$ de protéine) chez les larves du quatrième stade au cours de différentes périodes ( $m \pm SEM$ , $n=3$ 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)).	21
<b>Tableaux 12</b>	Effets des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (CL25 et CL50) sur l'activité spécifique de l'AChE ( $\mu M/min/mg$ de protéines) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> au cours de différentes périodes ( $m \pm SEM$ , $n=3$ 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)).	22

## Listes des figures

Figures	Titre	Pages
<b>Figures 01</b>	Mentum de <i>Cx pipiens</i> (Gr:X 300) (Tine-Djebbar, 2009).	3
<b>Figures 02</b>	Ecailles du 8 <sup>ème</sup> segment abdominal de <i>Cx pipiens</i> (Gr:X 200) (Tine-Djebbar, 2009).	3
<b>Figures 03</b>	Cycle de développement des Culicidés (www.memoireonline.com).	4
<b>Figures 04</b>	<i>Thymus vulgaris</i> (Photo Delloum & Rami, 2016).	5
<b>Figures 05</b>	Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger (photo personnelle).	7
<b>Figures 06</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</i> (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg) des larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> à différentes périodes (m ± SEM, n=3). (NS: Différence non significative).	16
<b>Figures 07</b>	Effet des H.E extraites de <i>Thymus vulgaris</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±SEM, n=3). (*Différence significative (p<0,05), **Différence hautement significative (p<0,01)).	18
<b>Figures 08</b>	Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Thymus vulgaris</i> , sur le taux du glutathion (nM/mg de protéine) chez les larves du quatrième stade de <i>Cx pipiens</i> (m ± SEM, n= 3). (* Différence significative (p<0,05), NS différence non significative).	20
<b>Figures 09</b>	Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Thymus vulgaris</i> , sur l'activité spécifique des GSTs (µM/min/mg de protéine) chez les larves du quatrième stade de <i>Culex pipiens</i> à différentes périodes (m ± SEM, n=3). (* Différence significative (p<0,05), NS Différence non significative entre les séries témoins et traitées (p>0,05)).	21
<b>Figures 10</b>	Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de <i>Thymus vulgaris</i> 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). (* Différence significative (p<0,05); ***Différence très hautement significative (p<0,001). NS Différence non significative (p>0,05)).	23

## **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

**m** : moyenne

**SEM** : écart- moyen

**n** : nombre de répétitions

**p** : coefficient de signification

**ppm**: partie par million

## 1. INTRODUCTION

La place importante qu'occupent les moustiques dans la faune terrestre comme dans la faune aquatique d'une part, et la lutte contre les maladies transmises par leurs piqûres d'autre part, font de ces arthropodes un matériel d'étude important pour les biologistes (Himmi *et al.*, 1998).

Les moustiques peuvent transmettre plusieurs maladies potentiellement mortelles comme le paludisme, la dengue, la fièvre jaune, le chikungunya, la filariose, l'encéphalite, l'infection de virus West Nile, ce qui a permis de les déclarer "ennemi public numéro 1" dans le monde (WHO, 1996). Ces maladies sont répandues dans presque toutes les régions tropicales et subtropicales et aussi, dans beaucoup d'autres parties dans le monde (Russell *et al.*, 2009).

Pour prévenir la prolifération de ces maladies et améliorer la qualité de l'environnement et la santé publique, la lutte contre les moustiques s'avère indispensable. Elle est basée sur l'application d'insecticides synthétiques tels que les organochlorés et les organophosphorés. Ces préparations, bien qu'elles soient efficaces, présentent plusieurs inconvénients d'ordre techniques, économiques et écologiques (Ghosh *et al.*, 2012). A tous ces inconvénients s'ajoute aussi un grand nombre de problèmes tels que l'apparition des espèces résistantes, l'impact sur les organismes non visés et la contamination des chaînes trophiques (Domingues *et al.*, 2010).

Pour toutes ces raisons, et dans le cadre d'un programme de lutte biologique contre les moustiques, les études se sont orientées vers la recherche de nouvelles approches alternatives plus efficaces, plus spécifiques et biodégradables et l'exploration de la biodiversité florale qui entre dans le domaine de l'utilisation des insecticides d'origine végétale (Anupam *et al.*, 2012).

Plus de 2000 espèces végétales dotées de propriétés insecticides ont été répertoriées (Philogène *et al.*, 2008). Elles sont riches en composés phytochimiques tels que les alcaloïdes, les stéroïdes, les terpènes, les huiles essentielles et les composés phénoliques (Shaalán *et al.*, 2005), dont certains ont prouvé leur efficacité contre les moustiques (Kishore *et al.*, 2011). Les familles des Solanacées, Asteraceae, Cladophoraceae, Labiatae, Miliaceae, Oocystaceae et Rutaceae possèdent diverses activités, larvicides, adulticides ou répulsives contre différentes espèces de moustiques (Shaalán *et al.*, 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 thymol), perturbation des échanges d'ion sodium et potassium (par pyréthrine) et l'inhibition de la respiration cellulaire (par roténone), le blocage mitotique (parazadirachtine).

Dans ce contexte, notre travail s'intéresse à évaluer la réponses des populations d'une espèce de moustique, *Culex pipiens*, la plus répandue dans la région de Tébessa (Tine-Djebbar *et al.*, 2016) à l'impact des huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris*, sur plusieurs aspects :

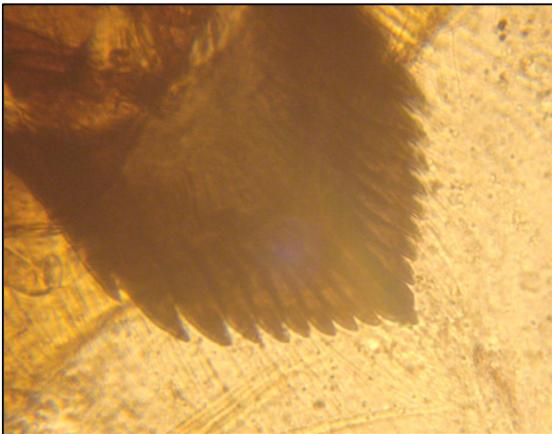
1. Aspect toxicologique pour déterminer les concentrations létales CL50 et CL90 de ces huiles à l'égard des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Culex pipiens* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) après traitement.
2. Aspect morphométrique : pour déterminer l'efficacité de ces composés sur le poids des larves traitées par les deux concentrations (CL25 et CL50).
3. Aspect biochimique : pour évaluer l'effet de ces huiles sur les réserves énergétiques (protéines).
4. Biomarqueurs: par la détermination des biomarqueurs de détoxication, les glutathion-S-transférases (GSTs), la GSH et un biomarqueur de neurotoxicité l'Acétylcholinestérase.

## 2. MATERIEL ET METHODES

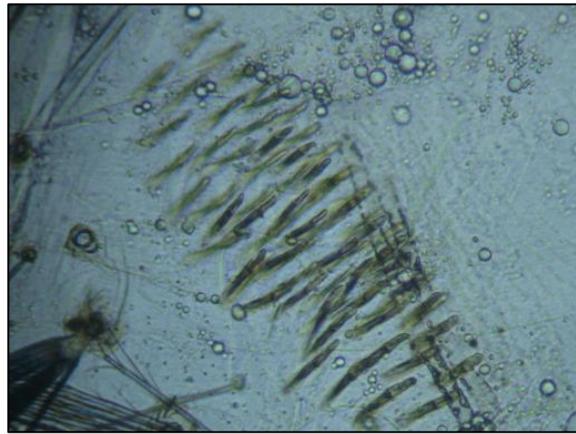
### 2.1. Présentation de l'insecte ; *Culex pipiens* (Linné, 1758).

*Culex pipiens* est le moustique le plus fréquent dans le monde. C'est un moustique ubiquiste capable de s'adapter à différents biotopes ; il se développe aussi bien dans les milieux urbains que ruraux, dans les eaux polluées que propres. Dans plusieurs régions, il est actif pendant toute l'année et atteint son maximum de développement pendant les saisons chaudes. Ses préférences trophiques sont très variables car il est plutôt ornithophile, mais il s'attaque volontiers aux humains et aux mammifères lorsqu'ils cohabitent (Savage & Miller, 1995). *Cx pipiens* est connu comme étant vecteur de plusieurs maladies notamment des arboviroses. On le considère comme l'un des principaux vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint-Louis et du virus West Nile (Palmisano *et al.*, 2005).

Cette espèce se caractérise chez la larve, par un mentum qui contient 8 dents ou plus de part et d'autre de la dent médiane (Fig. 1), les écailles du 8<sup>ème</sup> segment sont toutes sans épine médiane (Fig. 2), la dent distale du peigne siphonale est formée de 3 à 5 denticules basaux et l'indice (longueur/largeur) du siphon est de 4,6 à 5,9 (Bruhnes *et al.*, 1999).



**Figure 1 :** Mentum de *Cx pipiens*(Gr:X 300) (Tine-Djebbar, 2009).



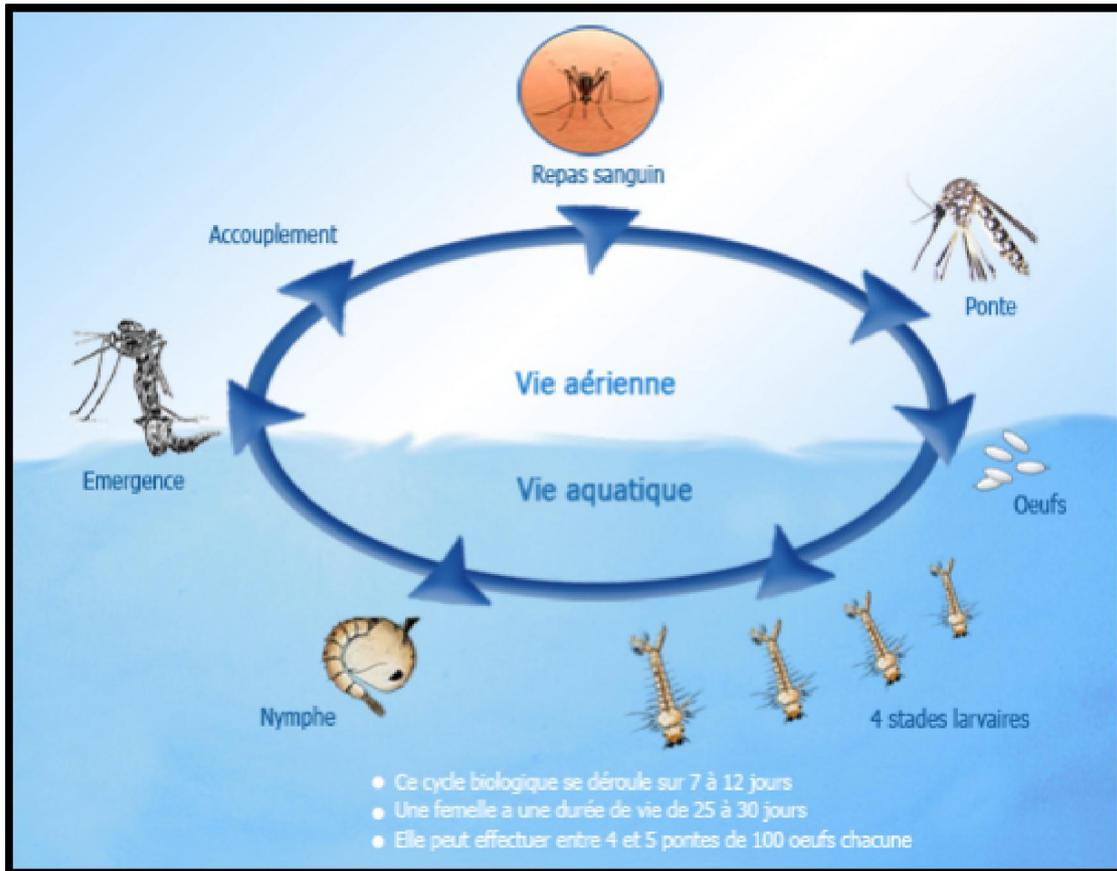
**Figure 2 :** Ecailles du 8<sup>ème</sup> segment abdominal de *Cx pipiens*(Gr:X 200) (Tine-Djebbar, 2009).

La position systématique de *Cx pipiens* est la suivante:

Règne	Animal
Embranchement	Invertébré
Classe	Insecte
Sous- classe	Ptérygote
Ordre	Diptère

Sous-ordre	Nématocère
Famille	Culicidae
Sous-famille	Culicinae
Genre	<i>Culex</i>
Espèce	<i>Culex pipiens</i> (Linée, 1758).

Le cycle de développement des Culicidés est schématiquement représenté dans la figure 3 :



**Figure 3 :** Cycle de développement des Culicidés (www.memoireonline.com).

## 2.2. Techniques d'élevage :

Les œufs et les larves de moustiques sont récoltés des différents sites d'échantillonnages non traités de la ville de Tébessa. Les larves sont élevées au laboratoire dans des récipients en plastique contenant 150 ml d'eau déchlorurée, à une température ambiante et nourries avec du mélange biscuit 75% - levure 25% (Soltani & Rehim, 1999). L'eau est renouvelée chaque deux jours. 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 avec du sucre seulement (Wigglesworth, 1972). Lorsque les larves atteignent le stade

nymphal, elles sont placées dans des récipients et déposées dans des cages où elles se transformeront en adulte.

### 2.3. Présentation de la plante ; *Thymus vulgaris* (Martinove, 1820).

Le genre *Thymus* est l'un des 220 genres les plus diversifiés de la famille des labiées, avec pour centre de diversité la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002). Comme beaucoup de labiées, elles sont connues pour leurs huiles essentielles aromatiques. L'espèce la plus connue est sans conteste, *Thymus vulgaris* L. localement connu (Zaatar).

Le nom *Thymus* dérive du mot grec « Thymos » qui signifie (parfumer) à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariante, 2001). Cette espèce se présente toujours dans un état sauvage en plaines et collines, comme la lavande, le romarin, la sauge et beaucoup d'autres plantes sauvages (Kaloustian *et al.*, 2003). Cette plante spontanée pousse abondamment dans les lieux arides, caillouteux et ensoleillés des bords de la mer à la montagne (Poletti, 1988).



**Figure 4** : *Thymus vulgaris* (Photo Delloum & Rami, 2016).

La Classification botanique de *Thymus vulgaris* est la suivante:

Règne	Plante
Sous règne	Plante vasculaire
Embranchement	Spermaphytes

Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Labiales
Famille	Lamiacées
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i> (Martinove, 1820).

#### 2.4. Extraction des huiles essentielles:

La matière végétale destinée à l'hydrodistillation pour l'obtention des huiles essentielles a été prélevée entre janvier et février 2016. La plante utilisée est originaire de la région de Zéralda qui est située à environ 26 km au sud-ouest d'Alger sur une vaste plaine du sahel algérois en légère déclivité et qui débouche sur des plages de sable fin.

La plante fraîchement collectée, a été séchée à l'ombre et dans un endroit sec et aéré. L'extraction des huiles essentielles a été réalisée au niveau du laboratoire Santé et Environnement. Une biomasse de 50g de matériel végétal et 750 ml d'eau distillée est soumise à une hydrodistillation en utilisant un montage d'hydrodistillation CLEVENGER durant 3 heures (Fig. 5). L'huile essentielle recueillie par décantation à la fin de la distillation est ensuite conservée à 4°C avant son utilisation dans des petits flacons bien fermés, en verre ombré.

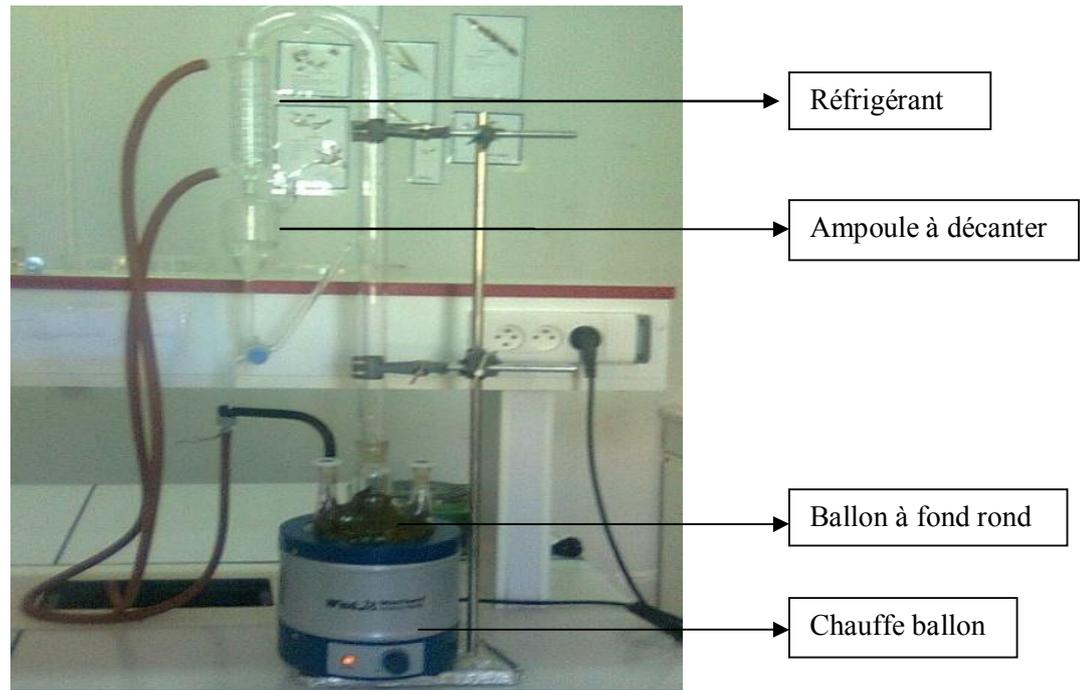
Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante, il est exprimé en pourcentage est calculé selon la formule suivante :

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

R : Rendement en huile en %

P<sub>A</sub> : Poids de la matière sèche de la plante en g

P<sub>B</sub> : Poids de l'huile en g.



**Figure 5 :** Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger ( photo personnelle).

### 2.5. Traitement :

Différentes concentrations des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* (25, 50, 100, 150, 200 ppm) ont été appliquées dans des récipients contenant 150ml d'eau et 20 larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Culex pipiens*. Après 24h de traitement, les larves sont rincées et placées dans de nouveaux récipients contenant de l'eau propre et de la nourriture.

### 2.6. Etude toxicologique :

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

L'essai est conduit en utilisant différentes concentrations : 25, 50, 100, 150 et 200 ppm. Pour chaque concentration, trois répétitions ont été réalisées, comportant chacune 20 individus. Par ailleurs, une série témoin est conduite en parallèle. Après 24h de traitement, selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé, 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.

## **2.7. Dosage des biomarqueurs :**

Les larves du quatrième stade (L4) des séries témoins et traitées aux huiles essentielles (CL25 : 42,46 ppm et CL50 : 72,04 ppm) 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 activités spécifiques des enzymes et le taux du glutathion.

### **2.7.1. Dosage 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. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant 20 individus chacune avec une série témoin.

Le dosage de l'activité AChE est réalisé selon la méthode d'Ellman *et al.*(1961) sur une fraction aliquote de 100  $\mu$ 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 ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines).

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

$1,36 \times 10^4$  : coefficient d'extinction molaire du DTNB ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

$Vt$  : 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.

### 2.7.2. 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.

Le dosage est réalisé selon la méthode de Habig *et al.*, (1974), il consiste à faire réagir 200  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  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.

### 2.7.3. 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 d'EDTA (0,02 M) [7,448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] à raison de 0,8 ml par 200 mg de poids. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec une série témoin. L'homogénat (800  $\mu\text{l}$ ) additionné d'acide sulfosalicylique ASS (200  $\mu\text{l}$ ) 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.

Le dosage est réalisé selon la méthode de Weckberker & Cory, (1988) comme la suite: Une aliquote de 500  $\mu\text{l}$  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) [3,96g 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 :

$$X = \frac{\Delta D_o}{13,1} \times \frac{V_d}{V_h} \times \frac{V_t}{V_s} \quad / \quad \text{mg de protéines}$$

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.

### 2.8. Dosage des protéines totales :

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

**Tableau 1:** 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

### 2.9. 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.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Rendement des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

Les huiles essentielles de *Thymus vulgaris* obtenues par hydrodistillateur de type clewenger sont de couleur jaune claire ayant une odeur très forte, et avec un rendement de 1,58 % de la matière sèche de la partie aérienne de la plante.

#### 3.2. Essais toxicologiques :

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

##### 3.2.1. Toxicologie des H.E extraites de *Thymus vulgaris* à l'égard de *Culex pipiens* à 24 heures après traitement :

Différentes concentrations : 25, 50, 100, 150, 200 ppm ont été appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées. Les mortalités corrigées sont mentionnées dans le tableau 2, avec des taux variant de 11,67% (25 ppm) à plus de 90% (200 ppm) avec une relation dose-réponse.

**Tableau 02 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 24 heures (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses(ppm) Répétitions	25	50	100	150	200
1	10	20	60	80	95
2	15	40	55	85	100
3	10	45	60	85	100
<b>M ± SEM</b>	11,67 ± 2,22	35,00 ± 10,00	58,33 ± 2,22	83,33 ± 2,22	98,33 ± 2,22

Les concentrations létales, la CL50 et la CL 90 sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4. Elles sont respectivement de 72,04 ppm (intervalle de confiance : 52,82 – 98,25) et 207,01ppm (intervalle de confiance : 112,71 – 380,18), avec un slope de 2,08 (Tableau 3).

**Tableau 03 :** Efficacité des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 24 heures :analyse des probits.

H.E	R <sup>2</sup>	Slope	CL50 (ppm) IC (95 %)	CL90 (ppm) IC (95%)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,96	2,08	72,04 (52,82 – 98,25)	207,01 (112,71 –380,18)

**3.2.2. Toxicologie des H.E extraites de *Thymus vulgaris* à l’égard de *Culex pipiens* à 48 heures après traitement :**

Les tests de toxicité sont appliqués sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens* avec différentes concentrations : 25, 50, 100, 150, 200 ppm. Les mortalités corrigées après 48h de traitement sont mentionnées dans le tableau 4 avec des taux variants de 11,75% (25ppm) à plus de 90% (200ppm) avec une relation dose-réponse.

**Tableau 04 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (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 (ppm) Répétitions	25	50	100	150	200
1	15	30	60	90	95
2	15	40	55	90	100
3	5,26	42,11	63,16	84,21	100
<b>m ± SEM</b>	11,75 ± 4,33	37,37 ± 4,91	59,39 ± 2,92	88,07 ± 2,57	98,33 ± 2,22

Les concentrations létales, la CL50 et la CL90 sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4, Elles sont respectivement de 68,61ppm (intervalle de confiance : 49,40 – 95,30) et 190,54 ppm (intervalle de confiance: 102,32 – 366,43), avec un slope de 2,11 (Tableau 5).

**Tableau 05 :** Efficacité des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (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>Thymus vulgaris</i>	0,96	2,11	68,61 (49,40 - 95,30)	190,54 (102,32 – 366,43)

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

Différentes concentrations : 25, 50, 100, 150 et 200 ppm sont appliquées sur des larves du quatrième stade (L4) nouvellement exuviées de *Cx pipiens*. Les mortalités corrigées enregistrées après 72h de traitement sont mentionnées dans le tableau 6, avec des taux variant de 10,26% (25ppm) à 100% (200ppm) avec une relation dose-réponse.

**Tableau 06 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, sur le taux de mortalité corrigée à 72 heures ( $m \pm SEM$ ,  $n= 3$  répétitions comportant chacune 20 individus).

Doses (ppm) Répétitions	10	50	100	150	200
1	10,53	36,84	63,16	89,47	100
2	15,00	45,00	65,00	95,00	100
3	5,26	47,37	68,42	84,21	100
<b>m <math>\pm</math> SEM</b>	10,26 $\pm$ 3,33	43,07 $\pm$ 4,15	65,53 $\pm$ 1,93	89,56 $\pm$ 3,63	100 $\pm$ 0,00

Les concentrations létales (CL50 et CL90) sont déterminées grâce à un logiciel GRAPH PAD PRISM 4. Elles sont respectivement de 61,12 ppm (intervalle de confiance : 45,92 -84,05) et 169,82 ppm (intervalle de confiance: 94,84 - 306,80), avec un slope de 2,17 (Tableau 7).

**Tableau 07:** Efficacité des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (ppm) appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens* à 72 heures: analyse des probits.

H.E	R <sup>2</sup>	Slope	CL50(ppm) IC(95%)	CL90(ppm) IC(95%)
<i>Thymus vulgaris</i>	0,97	2,17	62,12 (45,92 - 84,05)	169,82 (94,84 – 306,90)

### 3.3. Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* sur la croissance pondérale de *Culex pipiens* :

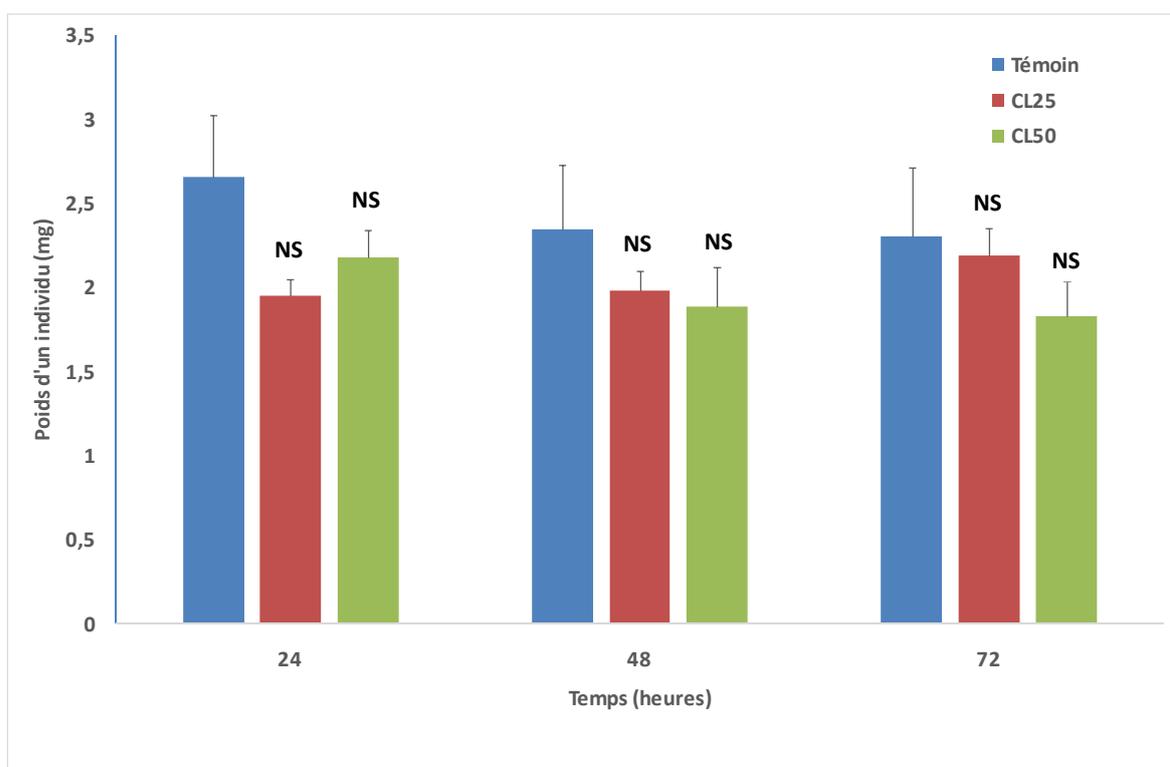
Les résultats de l'évolution du poids corporel des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* sont mentionnés dans le tableau 08 et la figure 06, où on note une diminution significative ( $p=0,05$  et  $0,005$ ) chez les séries témoins et les séries traitées à la CL50 respectivement. Par contre, chez les séries traitées à la CL25, on remarque une

augmentation significative ( $p=0,039$ ) du poids corporel des larves au cours de la période testée (24, 48 et 72h).

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) par le  $t$  de Student, ne montre aucune différence significative ( $p>0,05$ ) du poids corporel des larves 4 après 24, 48 et 72h de traitement.

**Tableau 08 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg/individu) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$  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	2,65 $\pm$ 0,36 a A	1,95 $\pm$ 0,10 a A	2,18 $\pm$ 0,15 a A
48	2,34 $\pm$ 0,38 a B	1,97 $\pm$ 0,11 a B	1,88 $\pm$ 0,23a B
72	2,30 $\pm$ 0,41a C	2,19 $\pm$ 0,16 a C	1,83 $\pm$ 0,19a C



**Figure 06 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (CL25 et CL50) sur le poids corporel (mg) des larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$ ). (NS: Différence non significative).

### 3.4. Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* sur le contenu en protéines totales chez *Culex pipiens* :

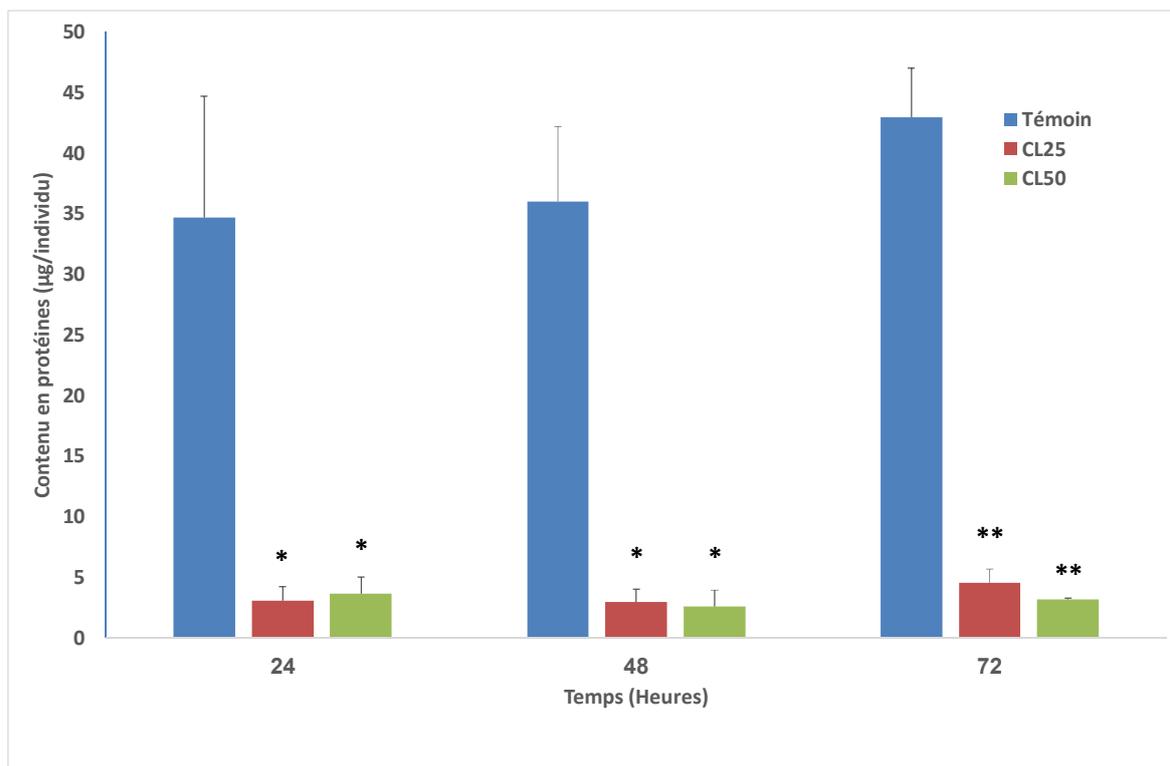
La CL25 et la CL50 des H.E extraites de *Thymus vulgaris* ont été appliquées sur les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*. L'effet de ces huiles a été évalué sur le contenu en protéines au cours de différentes périodes après traitement (24, 48 et 72h).

Les résultats du dosage sont mentionnés dans le tableau 09 et la figure 07. Chez les séries témoins et traitées à la CL25 et la CL50, le contenu en protéine marque une variation non significative ( $p > 0,05$ ) au cours de la période testée (24, 48 et 72h).

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées (CL25 et CL50 respectivement) montrent que les H.E induisent une diminution significative du contenu en protéines totales à 24 ( $p=0,047$  et  $0,043$ ), 48 ( $p=0,025$  et  $0,026$ ) et 72h ( $p=0,006$  et  $0,006$ ).

**Tableau09:** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (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)	Témoins	CL25	CL50
24	$34,67 \pm 10,01$ a A	$3,05 \pm 1,16$ b A	$3,67 \pm 1,35$ b A
48	$35,99 \pm 6,19$ a A	$2,97 \pm 1,03$ b A	$2,58 \pm 1,35$ b A
72	$42,98 \pm 4,05$ a A	$4,57 \pm 1,10$ b A	$3,16 \pm 0,10$ b A



**Figure 07 :** Effet des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (CL25 et CL50) sur le contenu en protéines totales chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$ ). (\*Différence significative ( $p<0,05$ ), \*\*Différence hautement significative ( $p<0,01$ )).

### 3.5. Effet sur les biomarqueurs :

L'éventuel impact des huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* sur la neurotoxicité et le développement d'une résistance a été apprécié par le dosage d'un site cible, l'acétylcholinestérase (AChE) et une enzyme du système de détoxification (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH), chez les larves du quatrième stade de *Culex pipiens* à différentes périodes.

Les huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* (CL25 : 42,46 ppm et CL50 : 72,04 ppm) ont été appliquées sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées et l'effet a été évalué à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) avec des séries témoins. Les résultats ont été exprimés par rapport à la quantité de protéines (mg) obtenue à partir d'une courbe de référence.

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

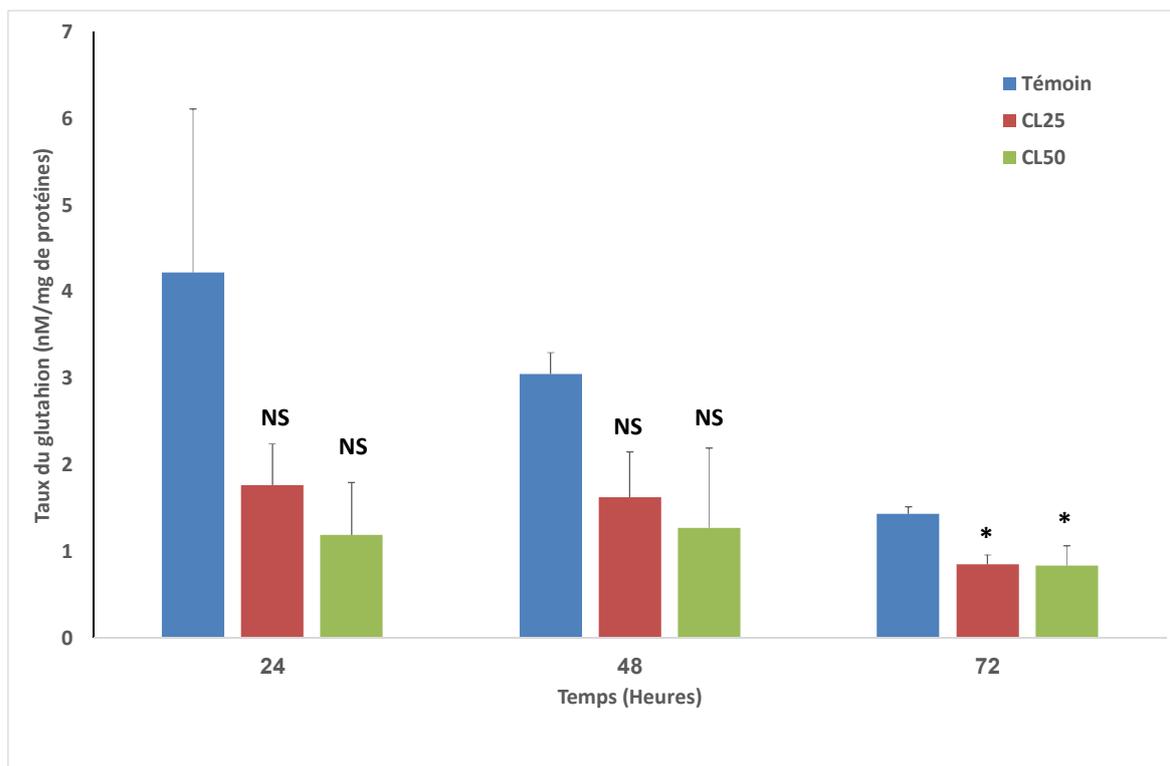
Le taux de la GSH (nM/mg de protéines) a été estimé chez les séries témoins et traitées (CL25, CL50) par application de la formule de Weckberker & Cory (1988). Les résultats sont exprimés en micromoles par milligramme de protéines (nM/ mg de protéines).

D'après le tableau 10 et la figure 08, on observe une diminution non significative ( $p > 0,05$ ) du taux de glutathion chez les séries témoins et traitées (CL25 et CL50) de 24 jusqu'à 72h.

Le test t de Student ne révèle aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) entre témoins et traités (CL25 et CL50) à 24 h et 48 h; par contre à 72h, on remarque une diminution significative du taux du glutathion chez les séries traitées avec les deux concentrations (CL25 :  $p = 0,05$  et CL50:  $p = 0,038$ ).

**Tableau 10:** Effet des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Thymus vulgaris* sur le taux du glutathion (nM/mg 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	4,22 ± 1,88 a A	1,76 ± 0,47a A	1,19 ± 0,60 b A
48	3,04 ± 0,24 a A	1,62 ± 0,52 a A	1,26 ± 0,92 a A
72	1,43 ± 0,07 a A	0,85 ± 0,10 b A	0,83 ± 0,22 b A



**Figure 08 :** Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Thymus vulgaris*, sur le taux du glutathion (nM/mg de protéine) chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* à différentes périodes ( $m \pm SEM$ ,  $n=3$ ) (\*Différence significative ( $p<0,05$ ), NS différence non significative).

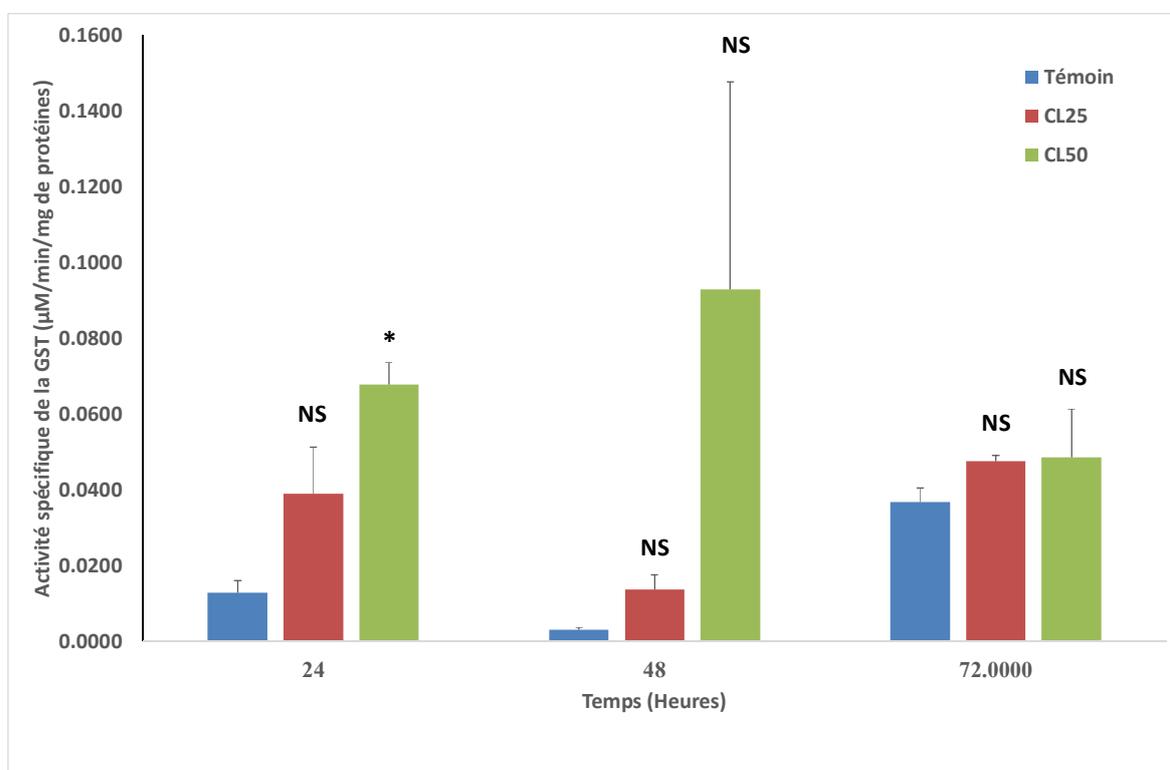
### 3.5.2. Effet sur l'activité spécifique des GSTs :

L'activité spécifique des glutathion -S-transférases a été estimée chez les séries témoins et traitées par application de la formule de Habig *et al.* (1974). Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines ( $\mu M/min/mg$  de protéines). Ils sont mentionnés dans le tableau 11 et la figure 09. Pour les séries témoins et traitées à la CL25, on remarque une variation significative ( $p<0,001$  et  $p=0,022$  respectivement). Par contre pour les traités à la CL50, aucune variation significative ( $p>0,05$ ) n'a été observée au cours de la période testée (24, 48 et 72 h).

La comparaison des valeurs moyennes entre les séries témoins et traitées par le test *t* de Student, ne révèle aucune différence significative ( $p>0,05$ ) à 48 h et 72 h. par contre, à 24 h on remarque une augmentation significative ( $p=0,013$ ) chez les traités avec la plus forte concentration (CL50) comparativement aux témoins.

**Tableau 11:** Effet des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Thymus vulgaris* sur l'activité spécifique des GSTs ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéine) 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	0,012 $\pm$ 0,003 a A	0,038 $\pm$ 0,012 a A	0,067 $\pm$ 0,005 b A
48	0,003 $\pm$ 0,000 a B	0,013 $\pm$ 0,003 a B	0,092 $\pm$ 0,054 a B
72	0,036 $\pm$ 0,003 a C	0,047 $\pm$ 0,001a C	0,048 $\pm$ 0,012 a C



**Figure 09 :** Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Thymus vulgaris*, 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 ( $m \pm \text{SEM}$ ,  $n=3$ ) (\* Différence significative ( $p<0,05$ ), NS Différence non significative ( $p>0,05$ )).

### 3.5.3. Effet sur l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase :

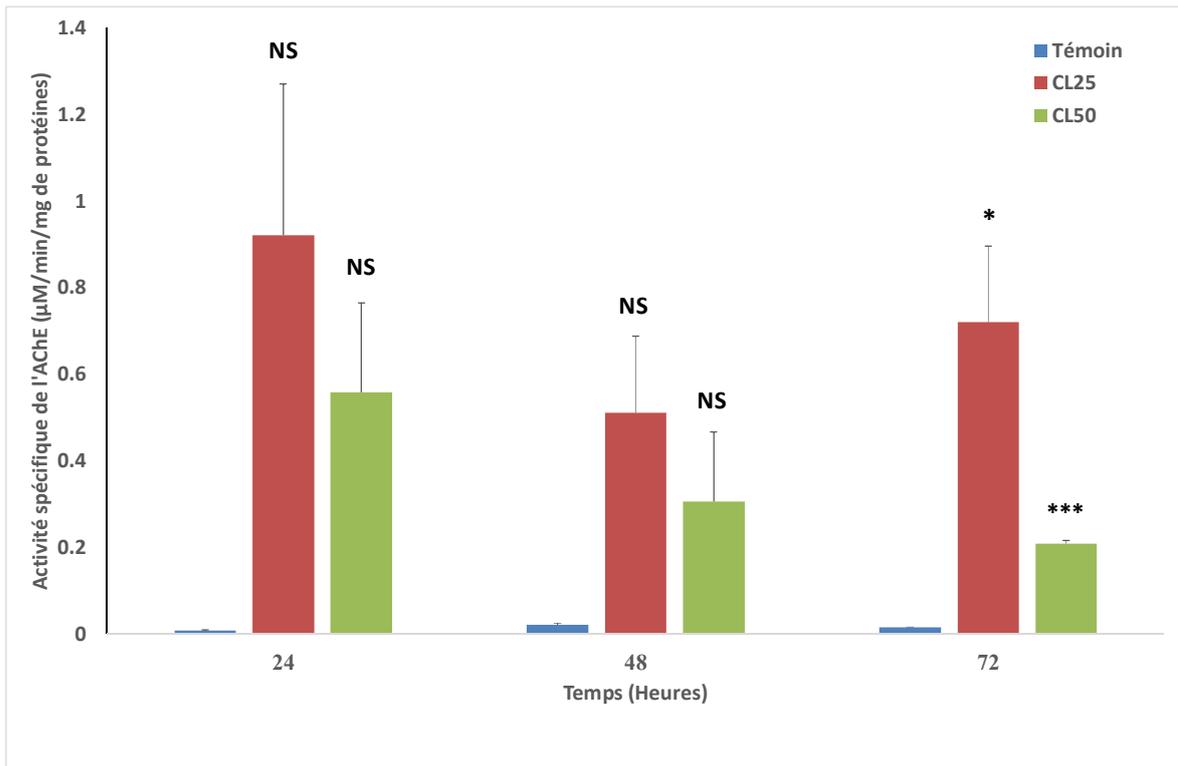
L'activité spécifique de l'AChE a été estimée chez les séries témoins et traitées par l'application de la formule d'Ellman *et al.* (1961). Les résultats sont exprimés en micromoles par minutes et par milligramme de protéines ( $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de protéines). Ils

sont mentionnés dans le tableau 12 et la figure 10. Chez les séries témoins, les résultats obtenus montrent des variations significatives ( $p=0,008$ ) de l'activité spécifique de l'AChE au cours des temps testés (24, 48 et 72h). Par contre chez les séries traitées à la CL25 et CL50, l'évolution de cette activité n'affiche aucune évolution significative ( $p>0,05$ ).

Le test t de student ne montre aucune différence significative entre les séries témoins et traitées avec les deux concentrations à 24 et 48h. Par contre à 72h, une différence significative est signalée entre les témoins et les traités à la CL25 ( $p=0,041$ ) et la CL50 ( $p=0,001$ ).

**Tableau 12:** Effets des H.E extraites de *Thymus vulgaris* (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	$0,0075 \pm 0,0022$ a A	$0,9204 \pm 0,3503$ a A	$0,5582 \pm 0,2061$ a A
48	$0,0210 \pm 0,0035$ a B	$0,5109 \pm 0,1773$ a A	$0,3059 \pm 0,1606$ a A
72	$0,0146 \pm 0,0013$ a C	$0,7211 \pm 0,1749$ b A	$0,2083 \pm 0,0069$ b A



**Figure 10 :** Effets des H.E (CL25 et CL50) extraites de *Thymus vulgaris* 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 ( $p<0,05$ ), \*\*\*Différence très hautement significative ( $p<0,001$ ), NS Différence non significative ( $p>0,05$ )).

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Rendement en huiles essentielles :

La méthode d'obtention des huiles essentielles reste une étape très importante qui peut agir directement sur la qualité et la quantité des huiles essentielles. Le succès de cette étape est interprété par le calcul des rendements (Bruneton, 1993).

Les huiles essentielles ont des propriétés biologiques très intéressantes (antimicrobiennes, fongicides et insecticides) (Koba *et al.*, 2009). Le rendement d'extraction des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* a enregistré une valeur de 1,58 % de la matière sèche de la plante. Cette valeur diffère de celle trouvée chez la même espèce au Maroc et qui affiche un rendement de 1% (El Akhal *et al.*, 2014; Imelouane *et al.*, 2009). En revanche Bruneton en 1999, déclare que la teneur en huile essentielle de la plante varie de 5 à 25 ml/Kg et sa composition fluctue selon le chémotype considéré. Ce rendement est relativement faible par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source d'huiles essentielles (El Ouali *et al.*, 2013).

Le rendement varie d'une plante à une autre, il est 0,5% chez *Artemisia mesatlantica*, de 0,1 à 0,35% chez la rose, de 0,5 à 1% chez la menthe poivrée et le néroli, de 1 à 3 chez l'anis, de 0,8 à 2,8% chez la lavande, de 1 à 2,5% chez le romarin et de 2 à 2,75% chez le thym (Bencheqroun *et al.*, 2012). Cette variabilité en huile essentielle sur le plan composition et rendement peut s'expliquer par deux facteurs : intrinsèques liés au bagage génétique de la plante et extrinsèques liés aux conditions de la croissance et du développement de la plante (Bruneton, 1993).

Cette variation est observée également dans le même genre tel que *Eucalyptus* où le rendement affiche des valeurs de 5% pour *Eucalyptus salmonophloia* (Zrira *et al.*, 1994), de 0,9% pour *Eucalyptus saligna* (Tapondjou *et al.*, 2004), de 0,99% pour *Eucalyptus camadulensis* (Mehani *et al.*, 2014), et de 1,76% pour *Eucalyptus globulus* (khaled & Dib, 2015).

Plusieurs facteurs déterminent le rendement des plantes en huiles essentielles à savoir l'espèce de plante utilisée, l'aire de sa répartition géographique, 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 (Tchoumboungang *et al.*, 2005 ; 2006).

#### 4.2. Toxicologie des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

L'utilisation des insecticides chimiques conduit à un désordre écotoxicologique accompagné d'une augmentation spectaculaire du nombre d'espèces résistantes. L'application des produits naturels reste la méthode qui présente beaucoup d'avantages pour la santé de l'être vivant et son environnement (Benayad, 2008).

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

La toxicité a été évaluée à partir du taux de mortalité enregistrées après chaque traitement et qui dépend des doses ou des concentrations administrées. Notre étude a pour but de tester la toxicité des huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* à l'égard des larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx pipiens*, dont les résultats montrent une activité larvicide avec une relation dose-réponse. Cependant, les concentrations létales des huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* affichent des valeurs variables en fonction du temps : CL50 (72,04 ; 68,61 et 62,12 ppm) et CL90 (207,01; 190,54 et 169,82) à 24, 48 et 72 heures après traitement respectivement. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés chez *Thymus capitatus* appliqué sur *Cx pipiens* (49ppm) (Mansour *et al.*, 2000), chez *Ocimum basilicum* appliqué sur *An. Stephensi* et *Cx quinquefasciatus* (8,29 et 87,68 ppm respectivement) (Maurya *et al.*, 2009), chez *Kelussia odoratissima mozaffarian* appliquée sur *Culex pipiens* et *Anopheles stephensi* (2,69 et 7,90 ppm respectivement) (Vatandoost *et al.*, 2012).

Les extraits aqueux de *Ricinus communis* et de *Tetraclinis articulata* appliqués sur les larves de quatre espèces de moustiques, montrent une sensibilité marquée chez les larves 2 de *Cx pipiens* et *Cs longiareolata* avec des CL50 de 140 mg/l et de 110 mg/l respectivement (Aouinty *et al.*, 2006). D'autre part, l'application de *Citrus sinensis* sur les larves d'*An stephensi*, d'*Ae aegypti* et de *Cx quinquefasciatus* a provoqué des CL50 de 272,19 ; 289,62 et 320,38 ppm respectivement (Murugan *et al.*, 2012).

Des résultats similaires ont été trouvés par Traboulsi *et al.* (2002) et qui ont montré l'activité insecticide de quatre plantes médicinales récoltées au Liban (*Myrtus communis* L., *Lavandula stoechas* L., *Origanum syriacum* L. et *Mentha microphylla* K.) à l'égard de *Culex pipiens molestus*. Les CL50 obtenues étaient comprises entre 16 et 89 mg/L.

Les expérimentations antérieures menées au niveau de notre laboratoire, ont permis d'établir les concentrations létales (CL50 et CL90 respectivement) de diverses huiles essentielles extraites de différentes plantes telles que : *Ocimum basilicum* (73,45 et 101,20ppm) appliqué sur *Cx pipiens* (Khamene, 2014), *Mentha piperita* (12,02 et 33,99 ppm) appliquée sur *Cs. longiareolata* (Chettat, 2013) et *L. dentata* (77,09 et 104,45ppm) appliquée sur la même espèce (Gouasmia & Bouchagoura, 2013).

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

Le volume corporel des moustiques peut influencer plusieurs paramètres, 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). Colless & Chellapah (1960) ont démontré la relation entre la fécondité d'*Aedes aegypti* et la quantité de sang ingéré qui sont tous deux sous le contrôle du volume corporel, déterminant d'une part l'oogenèse et d'autre part, le nombre d'œufs produits.

Le poids corporel chez les insectes dépend généralement de la présence de la nourriture dans leurs habitats, des conditions environnementales et surtout des caractères héréditaires de chaque espèce (Braquenier, 2009).

Nos résultats montrent que l'application des H.E de *Thymus vulgaris* (CL25 et CL50) sur les larves de *Cx pipiens*, n'affecte pas le poids des larves 4 au cours de la période testée (24, 48 et 72 h).

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. Les mêmes observations ont été faites par Ziani & Bouzidi, (2015) où le traitement par *Ocimum basilicum* cause une réduction des paramètres morphométriques chez les larves, les pupes et les adultes de *Cs longiareolata*.

#### 4.4. Effet sur le contenu en protéines :

Les protéines jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'organisme, les divisions cellulaires et la catalyse biochimique (Mahler & Cordes, 1969 ; Hassan, 2002). Elles assurent également la régulation hormonale et peuvent être intégrées dans les cellules comme composant structuraux tels que les lipides et les sucres (Cohen, 2010 ; Sugumaran, 2010).

Chez les moustiques autogènes, les protéines stockées aux stades larvaires et qui proviennent de la digestion des couches proticulaires profondes de l'ancienne cuticule sont utilisées pour la formation des œufs. Cependant, chez les moustiques anautogènes, le repas sanguin représente la principale source de protéines nécessaires (Briegel, 1985).

Nos résultats montrent que le traitement par les huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* (CL25 et CL50) chez *Cx. pipiens*, cause une diminution très marquée du contenu en protéines au cours de la période testée (24, 48 et 72 heures).

Les résultats obtenus dans notre laboratoire et chez la même espèce, *Cx pipiens* 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), révèlent une diminution du contenu en protéines au cours des périodes testées. Cependant, une augmentation de ce contenu a été signalée chez *Cx pipiens* après traitement avec l'*Ocimum basilicum* (Khamene, 2014), chez les vers blancs, *rhizotrogini* après traitement avec les extraits de *Nerium oleander* (Apocynacées) (Madaci *et al.*, 2008) et chez *Culiseta longiareolata* traitée par *Lavandula dentata* (Gouasmia & Bouchagoura, 2013).

#### 4.5. Effet sur les biomarqueurs

Les biomarqueurs mesurent l'interaction entre un système biologique et un agent environnemental. Ils peuvent être chimiques, physiques ou biologiques (WHO, 1993). L'inhibition ou l'induction des biomarqueurs sont de bons outils écotoxicologiques pour évaluer l'exposition et les effets potentiels des xénobiotiques sur l'organisme (Ozmen *et al.*, 1999 ; Strum *et al.*, 2000 ; Varo *et al.*, 2001). Les principaux biomarqueurs utilisés sont des marqueurs enzymatiques comme la catalase, la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase.

Plus de 500 espèces d'arthropodes sont maintenant résistantes à au moins, un insecticide ou larvicide. En dépit des diversités chimiques des insecticides et

biologiques des insectes, seulement un petit nombre de mécanismes de résistance sont capables 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 & Feyereisen, 1996).

-Le deuxième mécanisme, relativement le plus important, assure une bonne détoxification des différents tissus de l'organisme. Il est lié à une augmentation du taux de diverses enzymes de détoxification (Soderlund, 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 le taux de glutathion :**

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, 2006).

Le glutathion est un tripeptide constitué de trois acides aminés ; glutamate, cystéine et glycine, produit naturellement dans le corps (Meister & Anderson, 1983), que l'on trouve en concentration assez élevée (1-10 mM) dans presque toutes les cellules vivantes (animale, végétale et humaine) (Gauthier, 1997 ; Barbaro *et al.*, 1997). Le glutathion, 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 peroxyde et dans la lutte contre le stress oxydatif (Gannagé-Yared *et al.*, 1998). Grâce à la fonction thiol (-SH) de la cystéine, le glutathion sous sa

forme réduite 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). L'oxydation du glutathion réduit se fait par la glutathion peroxydase et la réduction du glutathion oxydé par la glutathion réductase (Gannagé-Yared *et al.*, 1998). Certains insecticides agissent sur un nombre très limité d'espèces, en augmentant l'activité des différentes enzymes impliquées dans la détoxification.

En plus de la détoxification et la défense cellulaire, le GSH joue un rôle dans les autres réactions cellulaires, comme la catalyse, le métabolisme, la transduction du signal, l'expression des gènes, la régulation des protéines, l'apoptose, et également empêchant le dommage de l'ADN et les autres macromolécules par la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides (Barbaro *et al.*, 1997 ; Bounous, 1991).

L'analyse des résultats du dosage de la GSH chez les larves du quatrième stade de *Cx pipiens* traité par les huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* à deux concentrations létales (CL25 et CL50) à différentes périodes (24, 48 et 72 heures), révèle une diminution non significative du taux de GSH.

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, 2013 ; Sayada & Messai, 2015), et *Culiseta longiareolata* (Kemache & Meziani 2015) traités par l'*Ocimum basilicum* et chez la même espèce étudiée traitée par *Lavendula dentata* (Gouasmia & Bouchagoura, 2013). Meghlaoui & Mansour, (2010), ont rapporté une diminution significative du taux de GSH chez les adultes de *B. germanica* traités par le spinosad comparativement aux séries témoins. Des résultats similaires sont observés chez *Donax trunculus* exposé aux polluants environnementaux (Sifi, 2006) et chez *Gambusia affinis* traitée au cadmium (Souissi *et al.*, 2008).

La diminution du glutathion pourrait être expliquée par une consommation accrue de ce cofacteur par les GSTs afin de détoxifier l'organisme et une réduction du système antioxydant non enzymatique.

#### 4.5.2. Effet sur l'activité spécifique de la GST :

Les insecticides sont soumis à une panoplie de réactions enzymatiques visant à détoxifier le produit initial et accélérer son excrétion. Les enzymes impliquées, se divisent en 2 groupes ; enzymes de la phase I dites *les enzymes fonctionnelles* (oxydase, réductase, hydrolase) permettant de démasquer les éléments électrophiles des insecticides, conférant à la molécule une augmentation d'hydrophilie, et les rendant moins toxiques, et les enzymes de la phase II dites *les enzymes de la conjugaison* qui fixe des dérivés endogènes hydrophiles comme le sucre, les acides aminés (glutathion, glucoside, phosphate, sulfate ou acide glycuronique) sur les groupements fonctionnels révélés en phase I. Ces enzymes de conjugaison sont des transférases dont les plus connues sont les GSTs (Cassier *et al.*, 1997).

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). Ils 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.

L'activité spécifique de la GST chez les larves traitées de *Cx pipiens* a été évaluée à différentes périodes. Les résultats obtenus montrent une augmentation significative de l'activité spécifique de la GST à 24 heures après traitement. Des résultats similaires ont été observés chez la même espèce traitée par *Ocimum basilicum* (Sayada & Messai, 2015) et *L. dentata* (Gheraibia & Abaidia, 2014), et chez *Cs longiareolata* traitée par *Mentha piperita* (Chettat, 2013), *Ocimum basilicum* (Kemache & Meziani, 2015) et *L. dentata* (Gouasmia & bouchagoura, 2013).

L'augmentation de l'activité de la GST se traduit par la mise en place du processus de détoxification qui est une forme de défense de l'insecte contre le pesticide (Clark, 1989). Cette observation a été également signalé chez *B. germanica* traité par l'acide borique (Habes *et al.*, 2006), l'azadirachtine (Saci, 2006),

l'acétamipride et le benfuracarbe (Morakchi, 2007) et le spinosad (Meghlaoui & Mansouri, 2010).

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 12% des protéines totales d'un individu. La surproduction d'enzymes peut être due à une modification d'un gène régulateur contrôlant le degré d'expression de l'enzyme, et à une augmentation du nombre de copies du gène qui code pour ces enzymes (Cédric, 2008).

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

Plus de 90 % des insecticides de synthèse sont des organophosphorés, des carbamates et des pyréthrinoïdes, avec des sites d'action localisés dans le système nerveux, dont l'acétylcholinestérase (AChE) est le plus important (Haubruge & Amichot, 1998).

L'acétylcholinestérase est une enzyme clés du système nerveux des insectes, c'est 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).

Les organophosphorés et les carbamates agissent en inhibant l'activité catalytique de l'AChE. Ils se fixent en effet sur le site actif de l'enzyme, à la place de l'acétylcholine ; au cours de la liaison de ces insecticides à l'enzyme, l'AChE des insectes est inactivée par phosphorylation ou carbamylation des résidus de la sérine dans le site actif (Eldafrawi, 1985 ; Haubruge & Amichot, 1998). L'accumulation de l'ACh dans la région synaptique provoque une transmission permanente de l'influx nerveux, causant finalement la mort de l'insecte par tétanie. La mort fait suite à une liaison de manière covalente du groupement acétyl de l'acétylcholinestérase empêchant ainsi toute liaison ultérieure de l'enzyme avec une molécule d'acétylcholine (Estrada-Mandaca *et al.*, 1998 ; Bairy, 2000).

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).

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation révèlent une augmentation significative de l'activité de l'AChE chez les séries traitées à la CL25 suivie d'une diminution après traitement avec la CL50. Des résultats similaires ont été obtenus chez *Cx pipiens* (Sayada & Messai, 2015) et *Cs longiareolata* (Kemache & Meziani, 2015; Chettat, 2013) traités par l'*Ocimum basilicum* et *L. dentata* respectivement.

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), les 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).

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans notre étude, nous avons évalué l'activité larvicide des huiles essentielles d'une plante, *Thymus vulgaris* sur une espèce de moustique, *Culex pipiens*, la plus répandue dans la région de Tébessa. Ces huiles ont une couleur jaune claire avec un rendement de 1,58% de la matière sèche de la partie aérienne de la plante. *Thymus vulgaris* a montré un pouvoir larvicide intéressant, avec des concentrations létales qui varient en fonction de la période après traitement: CL50 (72,04 ; 68,61 et 62,12 ppm) et CL90 (207,01; 190,54 et 169,82) à 24, 48 et 72 heures après traitement respectivement.

*Thymus vulgaris* testé à la CL25 et la CL50 sur les larves du quatrième stade de *Cx pipiens*, ne semble pas avoir des effets sur le poids des individus traités, mais affecte de façon significative le contenu en protéines au cours de la période testée (24, 48 et 72heures).

L'évaluation des biomarqueurs indique que les huiles essentielles ne semblent pas être neurotoxiques sauf à 72heures où on note une diminution de l'activité spécifique de l'AChE, ce qui les rend intéressant pour les programmes de lutte, du fait que les résistances enregistrées dans la littérature concernent principalement les insecticides à action neurotoxique.

Les huiles essentielles extraites de *Thymus vulgaris* induisent relativement le système de détoxification par le biais d'une augmentation de l'activité de la GST (à 24heures après traitement) et une diminution du taux du glutathion, important cofacteur pour la détoxification à 72 heures après traitement.

A l'avenir, il serait intéressant de compléter ces résultats par une analyse qualitative de ces huiles essentielles par la CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) pour pouvoir déterminer le composant actif et de le tester sur certains paramètres tels que le potentiel de reproduction. Par ailleurs, le dosage d'autres enzymes du système de détoxification (estérases, mono-oxygénase à P450) pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes de lutte contre ces produits. Les huiles essentielles présentent donc des propriétés insecticides car les résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes pour son application dans la production des biocides.

## 6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### -A-

- [1] **Abbott, W. B.** (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, **18** : 265-267.
- [2] **Ait Aissa, S., Palluel, O. & Porcher, J.M.** (2003). Biomarqueurs précoce d'écotoxicité. INERIS, rapport final DRC, 00-102. 49p.
- [3] **Amrani, I., Zerguine, K., Farine, J.P., Smaghe, G. & Soltani-Mazouni, N.** (2004). Imidazole derivative kk-42 reduces ecdysteroid titers and interfere with reproductive processes in adult females of *Tenebrio molitor*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **80** :161-172.
- [4] **Aouinty, B., Oufara, S., Mellouki, F. & Mahari, S.** (2006). Évaluation 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.
- [5] **Armstrong, K.F. & Sukung, D.M.** (1998). Correlation of azinphomethyl resistance with detoxification enzyme activity in the light brown apple moth *Epiphyas postvittana* (leptoptera : Tortricidae). *Pest. Biochem. Physiol.*, **36** : 281-289.

### -B-

- [6] **Badiou, A.** (2007). Caractérisation cinétique et moléculaire du biomarqueur Acétylcholinestérase chez l'Abeille, *Apis mellifera*. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université de Paul Cezanne AIX-MARSEILLE III. 147 p.
- [7] **Bainy, A.C.D.** (2000). Biochemical reponses in peneids caused by contaminants. *Aquaculture.*, **191** :163-168.
- [8] **Barbaro, G., Di Lorenzo, G., Soldini, M., Bellomo, G., Belloni, G. & Grisorio B.** (1997). Glutathion. *Scand. J. Gastroenterol.*, **32**(12): 1261-6.
- [9] **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.
- [10] **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.

- [11] **Bencheqroun, H. K., Ghanmi, M., Satrani, B., Aafi, A. & Chaouch, A.** (2012). Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia mesatlantica*, plante endémique du Maroc. *Bulletin de la société Royale des sciences de liège*, **81** : 4-21.
- [12] **Bounous, G.** (1991). The biological activity of undenatured dietary whey proteins: role of glutathione. *Clin. Invest. Med.*, 14:296-309.
- [13] **Boyer, S.** (2006). Résistance Métabolique des larves de Moustiques aux Insecticides : Conséquences Environnementales. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat, Laboratoire d'Ecologie Alpine. 78 p.
- [14] **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 p.
- [15] **Braquenier, 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 Liege. 217 p.
- [16] **Briegl, H.** (1985). Mosquito reproduction, incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis. *J. Insect. Physiol.*, **31** : 15-21 p.
- [17] **Bruneton J.** (1993) *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France.*
- [18] **Bruneton J.** (1999) *Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Ed Tec&Doc. Paris.*
- [19] **Brunhes, J., Rhaim, A., Geoffroy, B., Angel, G. & Hervy, J. P.** (1999). Les Culicidae de l'Afrique méditerranéenne. Logiciel de l'institut de recherche et de développement de Montpellier (France). *Lavoisier*. 278-279 p.
- C-
- [20] **Carton, B., Smagge .G & Tirry, L.** (2003). Toxicity to two ecdysone agoniste, halofenozide and méthoxyfinozide agonist the multicolourd Asian labybeette *Harmonica axyridis* (col : coccinellidae) .*J. applied. Entomol.*, 127. P 240.
- [21] **Cassier, P., Lafont, R., Descamps, M. & Soye, D.** (1997). La reproduction des invertébrés : stratégies, modalités et régulation. Edition Masson., 354 p.
- [22] **Cédric, P.** (2008). Interactions entre insecticides non pyréthrinoides 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 doctoral : Parasitologie. 65 p.

[23] Charpentier, A., Menozzi, P., Marcel, V., Villatte, F. & Fournier D. (2000). A method to estimate acetylcholinesterase-active sites and turnover in insects. *Analytical Biochemistry*, 285 :76-81.

[24] Chettat, H, 2013, Etude insecticide des huiles essentielles de *Mentha piperita* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiorelata*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 61 p.

-D-

[25] Domingues, I. Agra, AR. Monaghan, K. Soares, AM. Nogueira, AJ. (2010). Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in fresh water invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environ Toxicol Chem*; 29: 5-18.

-E-

[26] El Ouali Lalami A., El-akhal F., Oudrhiri W., Ouazzani C.F., Guemmouh R., Grech H., (2013) Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: thymus vulgaris et thymus satureioidis., les technologies de laboratoire. 8 (31) 27-33.

[27] El-Akhal, F., Greche, H., Ouazzani Chahdi F., Guemmouh R., El Ouali Lalami A., (2014) Composition chimique et activité larvicide sur *Culex pipiens* d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* cultivées au Maroc Chemical composition and larvicidal activity of *Culex pipiens* essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Morocco. p 216.

[28] Eldafrawi, A.T. (1985). Acetylcholinesterase and anticholinesterase. In: Kerkut, G.A. & Gilbert, L.I. (Eds). *Compressive Insect Physiology, Biochem. Pharmacol. New York, Pregamon press.*, 12:115-130.

[29] 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.

[30] Estrada-Mandaca, S., Lougarre, A. & Fournier, D. (1998). *Drosophila* acetylcholinesterase: Effect post-traditional modifications on the production in the baculovirus system and substrat metabolization. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 38:84-90.

**-F-**

[31] **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-**

[32] **Gallageher, E.P., Gross, T.S. & Sheehy, K.M.** (2001). Decreased glutathion S-transférase expression and activity altered sex steroids in lake Apoka brown bulheads (*Ameriurus nebulosus*). *Aqua. Toxicol.*, 55 : 223-237.

[33] **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 cholestérolémie chez des volontaires sains. *Ann. Biol. Clin.*, **56 (3)** : 321-327.

[34] **Gauthier, R.** (1997). GSH complex pour votre système immunitaire. *Nutraxis*. 38 p.

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

[36] **Ghosh, A. Chowdhury, N. Chandra, G. (2012).** Plant extracts as potential 22. Mosquito larvicides. *Indian J Med Res* .135 : 581-98.

[37] **Gilles, B., Sébastien, C., Christelle. C., Emilie, B., Dominique, M., Bernard, R., Christophe.M., Thierry, B., Annie, P.L. & Jean-François, N.** (2004). Biological effects of the Erika oil spill on the common mussel (*mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.*, 17: 309-316.

[38] **Gouasmia, H. & Bouchagoura, M.** (2013) Etude insecticide des huiles essentielles de *lavandula dentata* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta Longiareolata*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de master. Université des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie-Tébessa, p 27-32.

[39] **Gouasmia, H., Bouchagoura, M.** (2013). Etude insecticide des huiles essentielles de *Lavendula dentata* à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa . 68 p.

**-H-**

[40] **Habes, D., Kilani-Morakchi, S., Aribi, N., Farinde, J.P. & Soltani, N.** (2006). Boric acid toxicity to the German cockroach, *Blattella germanica* : Alterations in

midgut structure, and acetylcholinesterase and glutathion S-transferase activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology.*, 84 :17-24.

[41] **Habig, WH., Pabst, MJ. &Jakoby, WB.** (1974). Glutathione S-Tranferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130-7139.

[42] **Harold, J. A. &Ottea, J. A.** (2000). Characterization of Esterases associated with profenofos resistant in the tabacco budworm *Heliothisvirescens* (F.). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 45: 47 – 59

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

[44] **Himmi, O. Dakki, M. Trari, B. & EL Agbani, M.A.** (1995). Les Culicidae du Maroc, clé d'identification avec données biologiques et écologiques. Travaux Institut Scientifiques, Série Zoologie.

[45] **Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satran, B., Ghanmi, M. & El Ajjouri, M.** (2011). Evaluation du potentiel Antifongique des Huiles essentielles de *Mentha Pulegium* Et d'*Eucalyptus Camaldulensis* Dans La Lutte Biologique Contre Les champignons Responsables de La Détérioration Des Pommes En Conservation, Vol.80, p.824-836.

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

[47] **Hugget, R.J., Kimerle, R.A., Mehler, P.M. & Bergman, H.L.** (1992). Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, *Lewis Publisher*, 347 p.

-I-

[48] **Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J.P., Ankit, M., Khedid, K., El Bachiri, A.,** (2009) Chemical composition of the essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco., *Int. J. Agric. Biol.* 11 : 205-208.

-J-

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

**-K-**

- [50] **Khaled, I., Dib, D.** (2015), Evaluation de l'activité des huiles essentielles de l'Eucalyptus globulus à l'égard d'une espèce de moustique *Culex pipiens* : toxicologie, développement, morphométrie et biochimie. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 61 p.
- [51] **Kaloustian, J., El-Moselhy, T. F., Portugal, H.** (2003) Chemical and thermal analysis of the biopolymers in thyme (*Thymus vulgaris*). *Therm. Ochimica. Acta.* 401 : 7786.
- [52] **Khamene, I.** (2014). Etude de l'activité insecticide d'extrait de *Ocimum basilicum* à l'égard d'une espèce de moustique *Culex pipiens*, Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 43 p.
- [53] **Kasai, S., Weerashinghe, I.S. & Shano, T.** (1998). P 450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus*. Say larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.*, **37**: 47 – 56.
- [54] **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 pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 82 p.
- [55] **Kishore, N. Mishra, BB. Tiwari, VK. Tripathi, V.** (2011). A review 1. on natural products with mosquitocidal potentials. In: Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry. Trivandrum, Kerala: Trans World Publishers, Research Signpost. p. 223-53.
- [56] **Koba, k., Poutouli, PW., Raynaud, C., Chaumont, J-P., Sanda K.** (2009). Chemical composition and antimicrobial properties of different basil essential oils chemotypes from Togo. Bangladesh. In : *J. Pharmacol.*, 4 : 1-8.

**-L-**

- [57] **Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, JC. & Ramade, F.** (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie <<Aspects fondamentaux>>. Masson. Paris. 419 p.
- [58] **Lakbar, C.** (2000). Effets de deux régulateurs de croissance, le RH-0345 et le Pyriproxyfène sur le développement de *Tenebrio molitor* (Coleoptera : Tenebrionidae). Magistère en Développement et Reproduction. Université d'Annaba. Algérie.

**-M-**

- [59] **Madaci, B., Merghem, R., Doumandji, B. & Soltani, N.** (2008). Effet du *Nerium oleander*, laurier-rose, (Apocynacées) sur le taux des protéines, l'activité de l'AchE et

les mouvements des vers blancs rhizotrogini, (Coleoptera : Scarabaeidae). *Science et technologie*. 27 : 73 – 78.

[60] **Mansour, SA. Messeha, SS. EL-Gengaihi, SE.** (2000). Botanical 17. biocides. Mosquitocidal activity of certain *Thymus capitatus* constituents. *J Nat Tox* . 9 : 49-62.

[61] **Maurya, P. Sharma, P. Mohan, L. Batabyal, L.** (2009). Srivastava 23. CN. Evaluation of the toxicity of different phytoextracts of *Ocimum basilicum* against *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J Asia-Pacific Entomol* 12 : 113-5.

[62] **Mehani, M. & Segni, L.** (2014). Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *camaldulensis* sur certaines bactéries pathogène, Vol.6, N° 1.

[63] **Meister, A. & Anderson, M.E.** (1983). Glutathion. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:711 – 760.

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

[65] **Morakchi, S.** (2000). Evaluation de l'activité d'un insecticide inorganique, l'acide borique a l'égard de *Blattelle germanica* (Dictyoptera: Blattellidae): aspects toxicology, résidu, structural et biochimique. Thèse de Magister en Biologie Animale option Physiologie animale applications agronomique et médicale. 62p.

[66] **Morakchi-kilani, S.** (2007). Effet de trois groupe de pesticides sur différent aspects physiologiques des adultes de *Blattella germanica*: reproduction, biomarqueurs enzymatiques et hydrocarbures cuticulaires. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat, université Badji Mokhtar de Annaba, p. 45-68.

[61] **Morales, R.** (2002) The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In : *Thyme : the genus Thymus*. Ed. *Taylor & Francis, London*. p. 1-43.

-N-

[62] **Nadir, M. & Mukrim, A.** (2012). Impact des eaux usées traitées du grand Agadir: techniques d'évaluation utilisées. 2<sup>ème</sup> Colloque International sur la Gestion et la Préservation des Ressources en Eau. Meknès. Faculté des Sciences. Université Moulay Ismail.

[63] **Nijhout, H. F.** (1994). *Insect Hormones*. In: Princeton University Press, New Jersey, USA.

## -O-

[64] OMS, 1996. Weekly epidemiological record: 17-22.

[65] Ozmen, N., Sener, S., Mete, A. & Kucukbay, H. (1999). *In vitro* and *In vivo* acetylcholinesterase inhibition effect of new class of organophosphorus compounds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 241- 246.

## -P-

[66] Palmisano, CT., Taylor, V., Caillouet, K., Byrd, B. et WES-SON DM. (2005). Impact of West Nile virus outbreak upon St. Tammany Parish Mosquito Abatement District. *J Am Mosq Control Assoc*, 21, 33-38.

[67] Parapanthadara, L., Promtet, N., Koottathep, S., Somboon, P. & Ketterman, A.J. (2000). Isoenzymes of glutathion S-transferase from mosquito *Anopheles dirusspecies* B: the purification, partial characterization and interaction with various insecticides. *Insect. Biochemistry. Molecular Biology.*, **30**: 395 – 403.

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

[69] Philogène, B. J.R., Regrnault, R. C. & Vincent, C. (2008). Produits phytosanitaires insecticides d'origine végétale : promesses d'hier et d'aujourd'hui. In [70] Regnault-Roger, C., Philogène, B.J.R., Vincent, C. *Biopesticides d'origine Végétale. Lavoisier, Tec & Doc*, Paris, 546.

[71] Poletti A. (1988) Fleurs et plantes médicinales. 2ème Ed. Delachaux & Nistlé S. A. Suisse. Pp : 103 et 131.

## -R-

[72] Rattan, RS. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary 98. Metabolites of plant origin. *Crop Protec.* 29: 913-20.

[73] Reidy, G.F., Rose, H. A., Visetson, S. & Murray, M. (1990). Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribilium cataneum* (herbst). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 36 : 269-276.

[74] Ribeiro, 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.

[75] Rouibi, A. (2002). Evaluation d'un mimétique des ecdystéroïdes (RH-0345) sur *Blattella germanica* (Dictyoptera : Blattellidae) : Aspects morphométriques et

Biochimiques. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister Université de Badji Mokhtar- Annaba. 14-95p.

[76] **Rufingier, C., Pasteur, N., Lagnel, J., Martin, C. & Navajas, M.** (1999). Mechanisms of insecticide resistance in the aphid *Nasonoviaribisnigri*(Mosley) (*Homoptera :Aphididadae*) from France. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 29 : 385–391.

[77] **Russell, TL. Kay, BH. Skilleter, GA.** (2009). Environmental effects of 3. Mosquito insecticides on saltmarsh invertebrate fauna. *Aquat Biol.* 6 : 77-90.

-S-

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

[79] **Sahbi, F. Aouni, M.** (2015).impact des huiles essentielles de lavandula dentata sur la biochimie, la morphometrie chez une espece de moustique culex pipiens. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébéssi-Tebessa. P.

[80] **Saleem, M.A. &Shakoori, A.R.** (1987). Joint effects of Dimilin and Ambush on enzyme activities of *Triboliumcastaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 29: 127 – 137.

[81] **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 du Québec. Canada. N° 378. Vol 86.

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

[83] **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 pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébéssi-Tebessa. 50 p.

[84] **Scott, J.G.** (1999). Cytochrome p 450 and insecticide resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757 – 777.

[85] **Shalan, EAS. Canyonb, D. Younesc, MWF. Abdel-Wahaba, H. Mansoura, AH.** (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. *Environ Int* 3: 1149-66.

- [86] **Siegfried, B. D. & Scharf, M. E.** (2001). Mechanisms of organophosphate resistance in insects. Department of Entomology, 202 Plant Industry Bldg, *University of Nebraska, Lincoln NE, USA*. pp: 269 – 291.
- [87] **Sifi, K.** (2009). Biosurveillance de la qualité des eaux du 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.
- [88] **Smagghe, G. & Degheele, D.** (1992). Effects of RH-5849, the first non steroidal ecdysteroid agonist on larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 21: 119-128.
- [89] **Smagghe, G. & Degheele, D.** (1994). Action of a nonsteroidal ecdysteroid mimics RH-5849 on larval development and reproduction of insects of different orders. *Invert. Reprod. Develop.*, 25: 227-236.
- [90] **Smagghe, G. & Degheele, D.** (1995). Biological activity and receptor binding of ecdysteroid agonists RH 5849 and RH 5992 in imaginal wing discs of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: noctuidae). *Eur. J. Entomol.*, 92: 333-340.
- [91] **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.
- [92] **Soltani, N., et Rehim, N., Beldi, H. & Bendali, F.** (1999). Activité du triflumuron sur *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) et impact sur deux espèces larvaires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)*, 35 : 502 – 508.
- [93] **Soreq, H. & Zakut, H.** (1993). Human cholinesterases and anticholinesterases. San Diego : Academic Press.
- [94] **Sturm, A., Worgam, J., Segner, H. & Liess, M.** (2000). Different sensitivity to organophosphate of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus vaculeatus*): application on biomonitoring. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1607 – 1617.
- [95] **Sun, C. N., Huang, S. Y., Hu, N. T. & Chung, W. Y.** (2001). Glutathione –S-transferases and insect resistance to insecticides. *National Chang-hsing university, Taichung, Taiwan 40227, Republic of China*, pp: 254-269.

-T-

- [96] **Taïbi, F., Smaghe, G., Amrani, L. & Soltani-Mazouni, N.** (2003). Effect of ecdysone agonist, RH-0345, on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp. Biochem. Physiol.* 135: 257-267.
- [97] **Tapondjoua, A.L., Adlerb, C., Fontemc, D. A., Boudaa, H ., Reichmuthb, C.** (2004). bioactivities of cymol and essential oils of cupressus sempervirens and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val, laboratory of Environmental and Applied chemistry, Faculty of Science, University of P.O. Box 183, 41, 91-102.
- [98] **Taylor, M. & Feyereisen, R.** (1996). Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Molecular biology and evolution.* 13: 719 – 734.
- [99] **Tchoumboungang, F, Dongmo, P.M.J, Sameza, M.L, E.G.N., Fotso, G.B.T., Zello, P.H.A. & Menut, C.** (2009). Activité Larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13 (1) : 77-84.
- [100] **Tine-Djebbar, F.** (2009). Bioécologie des moustiques de la région de Tébessa et évaluation de deux régulateurs de croissance (halofénozide, méthoxyfénozide) à l'égard de deux espèces de moustiques *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*: toxicologie, morphométrie, biochimie et reproduction. Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat Université Badji Mokhtar de Annaba. 168 p.
- [101] **Todorova-Todorava, T.** (2007). Glutathione S-transferases and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat Université de Louis Pasteur, Strasbourg et de l'Université de Sofia St. Kliment Ohridski. 160 p.
- [102] **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 Biochemistry and Molecular Biology.*, 30: 325 – 333.
- [103] **Traboulsi, AF. Taoubi, K. El-Haj, S. Bessiere, JM.** (2002). Salma R. 19. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Sci* 58: 491-5.
- [104] **Trari, B., Dakki, M., Himmi, O., El Agbani, MA.** (2002). Les moustiques (Diptera: Culicidae) du Maroc. *Revue bibliographique (1916-2001) et inventaire des espèces.* *Bull Soc Pathol Exot* 95(4): 329-334.

## -V-

[105] **Van Den Heuvel.** (1963). The effect of rearing temperature on the wing length, thorax length, leg length and ovariol number of the adult mosquito, *Aedes aegypti* (L). *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, 115 : 197-216.

[106] **Varo, I., Navarro, J.C., Amat, F. & Guilhermino, L.** (2001). Characterization of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemiasalina* and *Artemiaparthenogenetica*. *Chemosphere*. **48**: 563 – 569.

[107] **Vatandoost, H. Sanei Dehkordi, D.A. Sadeghi, S.M.T. Davari, B. Karimian F. Abai, M.R. Sedaghat, M.M.** (2012). Identification of chemical constituents and larvicidal activity of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian essential oil against two mosquito vectors *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), *Exp parasitol.* 132(4) 470-474.

## -W-

[108] **Warholm. M., Gutemberg, C., Mannervik, B. & Von Bahr, C.** (1981). Humain liver having higher activity with ben (a') pyrene a' 4, 5-Oxide. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 98 (2):512-519.

[109] **Weckberker, G & Cry, J. G.** (1988). Ribonucleotide reductase activity abdgrouth of glutathione-depleted mouse leukemial 1210 cells in vitro. *Cacerlettres*. 40: 257-264.

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

## -Y-

[111] **Yu, B. P.** (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.*, **74**: 139 – 162.

[112] **Yu, S. J. & Abo –Elghar, G. E.** (2000). Allelochemicals as inhibitors of Glutathion –S– transferase in the fall armyworm. *Pestic. Biochem. Physiol*, **68**: 173 – 183.

## -Z-

[113] **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 .

[114] **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 in parasitoid *Anisoptromaluscalandrae* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Pest. Scie.* **55**: 398 – 404.

[115] **Ziani, R. Bouzid, O.** (2015). Etude de l'impact des huiles essentielles d'une plante larvicide, *Ocimum basilicum* sur une espèce de moustique *Culiseta longiareolata* : aspect morphométrique et biochimique. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 36 p.

[116] **Ziani, T. Slama, B.** (2012). Evaluation d'une nouvelle molécule le Kinoprène à l'égard d'une espèce de moustique *Culiseta longiareolata* : potentiel reproducteur, biochimie et morphométrie. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université Larbi Tébessi-Tebessa. 51 p.

**Site web**

[117] [www.memireonline.com](http://www.memireonline.com).