

Table des matières

TABLE DES MATIERES.....	9
INTRODUCTION.....	11
I- GENERALITES.....	13
1-1 PARTICULARITES DE L'ÎLE.....	13
1-1-1 Géographie.....	13
1-1-2 Particularités morphopédologiques et climatiques	13
1-2 L'ELEVAGE BOVIN A LA REUNION ET LE GRDSBR.....	15
1-2-1 Contexte.....	15
1-2-2 Les principales causes de mortalité à la Réunion	16
1-3 LE PROBLEME DES STOMOXES A LA REUNION	16
1-3-1 Généralités sur les stomoxes.....	16
1-3-1-1 Systématique, morphologie, répartition géographique.....	16
1-3-1-2 Cycle des stomoxes.....	19
1-3-2 Nuisances et pouvoir pathogène.....	20
1-3-2-1 Nuisances directes.....	20
1-3-2-2 Pouvoir pathogène indirect : la transmission mécanique. ...	20
Les hémoparasitoses : l'Anaplasmosse	21
L'Anthrax ou Fièvre Charbonneuse.....	21
La tularémie.....	21
Autres maladies :	21
1-3-2 La lutte intégrée contre les Stomoxes.	22
1-3-2-1 Le programme POSEIDOM.....	22
1-3-2-2 Les différents moyens de lutte.....	23
La lutte environnementale :	23
La lutte physique (Gilles, 2001) [22]:	23
La lutte chimique :	24
La lutte biologique :	24
1-4 LES HUILES ESSENTIELLES.....	25
1-4-1 Généralités	25
1-4-1-1 Définition.....	25
1-4-1-2 Histoire de leur utilisation	26
1-4-1-3 Activité insecticide : mécanismes d'action.....	26
Effets physiologiques :	27
Effet sur l'octopamine :	27
Effets physiques :	27
1-4-2 Les huiles essentielles de la Réunion	27
II- OBJECTIFS DE L'ETUDE	29
III- MATERIEL ET METHODE.....	31
3-1 MATERIEL BIOLOGIQUE : ELEVAGE DE STOMOXES AU GRDSBR	31
3-1-1 Conditions d'élevage au laboratoire du GRDSBR	31
3-1-2 Matériel.....	32

3-1-3 Comptage.....	34
3-2 CHOIX DES HUILES ESSENTIELLES TESTEES.....	34
3-2-1 Le Basilic (<i>Ocimum basilicum</i>).....	34
3-2-2 La Citronnelle (<i>Cymbopogon nardus</i>).....	35
3-2-3 L'Eucalyptus (<i>Eucalyptus citriodora</i>).....	36
3-2-4 Le Géranium (<i>Geranium rosat</i>).....	37
3-2-5 La Lavande (<i>Lavandula officinalis</i>).....	38
3-2-6 Le Moringa (<i>Moringa oleifera</i>).....	38
3-2-7 Le Neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Méliacées)).....	39
3-2-8 Le Tea Tree (<i>Melaleuca alternifolia</i>).....	41
3-2-9 Le Manuka, la Tagetes et le Pyrèthre.....	42
IV- ETUDE PREALABLE	45
V- EXPERIMENTATION 1 : DETERMINATION DE L'EFFET LARVICIDE DE 8 HUILES.....	47
5-1 PROTOCOLE DE LA 1 ^{ERE} EXPERIMENTATION.....	47
5-2 RESULTATS DE LA 1 ^{ERE} EXPERIMENTATION.....	48
5-3 DISCUSSION	51
<i>Effet larvicide sur moustique différent de l'effet larvicide sur mouche</i>	51
<i>Efficacité des huiles en tant que larvicide.</i>	52
<i>Innocuité des Huiles essentielles.</i>	53
VI- EXPERIMENTATION 2 : COMPARAISON DE 2 CONCENTRATIONS DIFFERENTES POUR LES 4 HUILES LES PLUS EFFICACES	55
6-1 PROTOCOLE DE LA 2 ^{EME} EXPERIMENTATION.....	55
6-2 RESULTATS DE LA 2 ^{EME} EXPERIMENTATION.....	56
6-3 DISCUSSION	57
<i>Effet concentration</i>	57
VII- EXPERIMENTATION 3 : COMPARAISON ENTRE LE MELANGE DES HUILES ET LEUR PULVERISATION AU STADE L2.	59
7-1 PROTOCOLE DE LA 3 ^{EME} EXPERIMENTATION :	59
7-2 RESULTATS DE LA 3 ^{EME} EXPERIMENTATION.	60
7-3 DISCUSSION	61
<i>Effet rémanent des huiles essentielles.</i>	61
<i>Pulvérisation des huiles essentielles.</i>	61
VIII- EXPERIMENTATION 4 : COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES 8 HUILES A CONCENTRATION EGALE.	63
8-1 PROTOCOLE DE LA 4 ^{EME} EXPERIMENTATION :	63
8-2 RESULTATS ET DISCUSSION DE LA 4 ^{EME} EXPERIMENTATION :	63
CONCLUSION.....	67
ANNEXES.....	69
BIBLIOGRAPHIE.....	75

Introduction

L'élevage bovin à la Réunion a connu un essor très important ces dernières décennies. En raison des particularités climatiques et insulaires de la Réunion, l'élevage connaît des problèmes sanitaires, d'alimentation et de maîtrise de la reproduction. L'anaplasmose, et les hémoparasitoses en général sont à l'origine de mortalités importantes. Un programme d'éradication de l'anaplasmose et de la babésiose a donc été mis en place en 1994 : le programme POSEIDOM vétérinaire (Programme d'Options Spécifiques à l'Eloignement et à l'Insularité des Départements français d'Outre-mer). La lutte anti-stomoxes combine 4 volets de lutte principaux : (1) la lutte chimique, qui consiste à traiter les animaux à l'aide d'un insecticide, la deltaméthrine, mais qui peut conduire à l'apparition de résistances [17], (2) la lutte biologique qui consiste à effectuer des lâchers de micro-hyménoptères parasitoïdes des stomoxes, (3) la lutte mécanique qui consiste en la capture des vecteurs à l'aide de pièges et de fils de colle, et enfin (4) la lutte environnementale, qui consiste à mieux gérer les effluents et à rendre peu propice l'environnement de l'élevage à la ponte.

Les pullulations de stomoxes sont particulièrement intenses sur l'île, et le transfert d'agents pathogènes à partir d'un hôte infecté vers un hôte sain est largement assuré par ces derniers [29], qui constituent de par leur morphologie d'excellents vecteurs mécaniques [9] [15]. Deux espèces de stomoxes cohabitent à la Réunion : *Stomoxys calcitrans* (Linné, 1758) et *Stomoxys niger niger* Macquart 1851. Outre leur rôle certain dans la transmission d'hémoparasitoses, ils ont un impact considérable sur la productivité des animaux en raison du harcèlement qu'ils infligent aux bovins et de la spoliation sanguine.

Dans un souci de lutte intégrée, le POSEIDOM vétérinaire du Groupement Régional de Défense Sanitaire des Bovins de la Réunion a imaginé cette étude sur l'effet larvicide potentiel de certaines huiles essentielles. De nombreuses études ont été réalisées sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide [49]. La plupart de ces études ont mis en évidence un effet larvicide et/ou répulsif sur les moustiques, et notamment les Culicidés. Les diverses substances concentrées dans les huiles essentielles auraient des propriétés intéressantes.

Avec la crise économique liée au Chikungunya, la Coopérative Agricole des Huiles essentielles de Bourbon (CAHEB) a sorti une nouvelle gamme de produits anti-moustiques, en étroite collaboration avec des laboratoires métropolitains. Des solutions entièrement naturelles conçues à base d'huile essentielle de géranium et de citronnelle ont vu le jour. Ces insecticides naturels possèdent d'énormes avantages en termes de respect de l'environnement,

et de développement économique de l'île. Ces produits 'bio' génèrent en outre une opinion plus que favorable auprès du grand public.

Parallèlement, le GRDSBR a décidé de tester certaines huiles essentielles sur les stomoxes, autre fléau de la Réunion. Depuis 2006, des tests d'utilisation d'huiles essentielles ont donc été réalisés. La pulvérisation d'hydrolat de géranium directement sur les animaux a donné des résultats satisfaisants mais non publiés, qui nous ont été communiqués. Une étude sur l'effet larvicide des huiles essentielles a également été réalisée et nous servira d'étude préalable.

Cette étude est décrite dans cet ouvrage.

Suivant les résultats obtenus alors, et qui nous ont été personnellement communiqués, et pour des raisons d'ordre pratique, les huiles essentielles de Lavande, de Géranium, de Citronnelle, de Tea Tree, de Basilic et d'Eucalyptus, et les huiles végétales de Neem et de Moringa ont été testées dans cette étude.

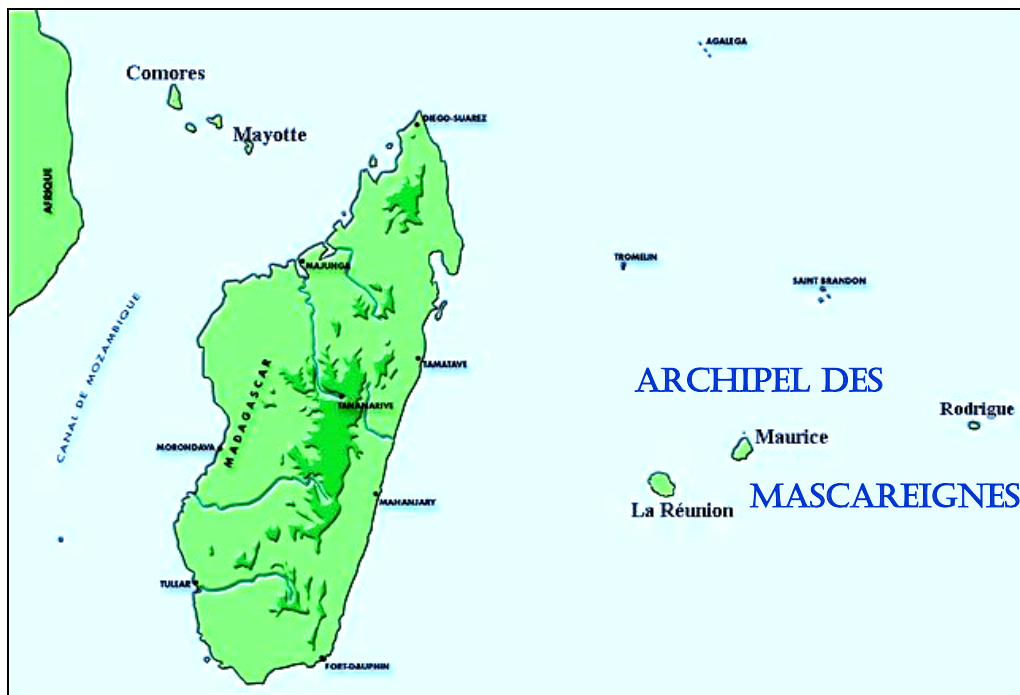
Ce mémoire porte donc sur la réalisation d'un essai en laboratoire pour démontrer l'effet larvicide de certaines huiles essentielles et végétales sur les stomoxes présents à la Réunion.

I- Généralités.

1-1 Particularités de l'île

1-1-1 Géographie.

L'île de la Réunion forme, avec l'île Maurice et Rodrigues, l'archipel des Mascareignes, le groupe le plus méridional de l'océan Indien Tropical. La Réunion est située par 55°3 de longitude Est et 21°5 de latitude Sud et se trouve à 800 Km de Madagascar.



Carte 1 : Madagascar et l'Archipel des Mascareignes (source : <http://madagascar-cartes-plans.blogspot.com>)

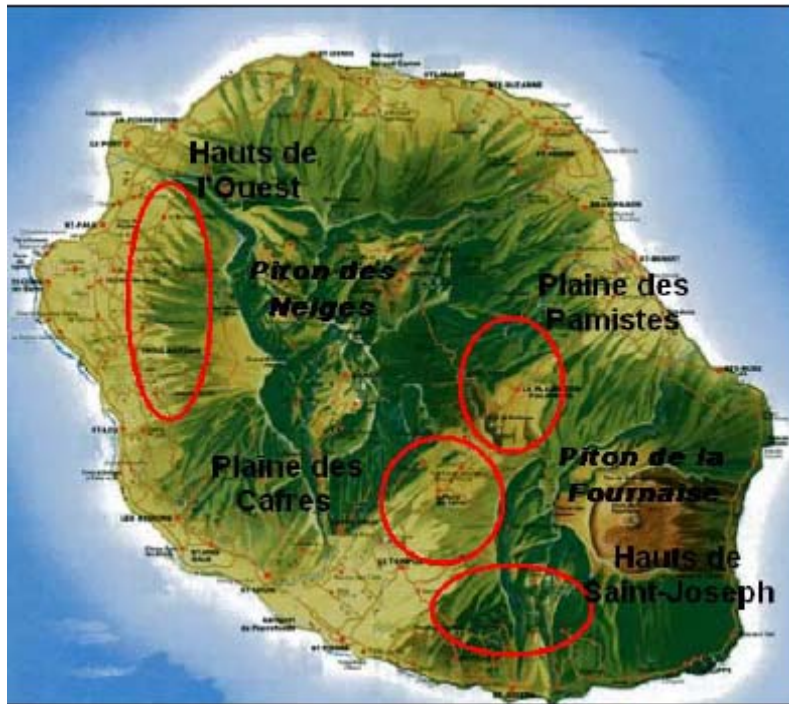
1-1-2 Particularités morphopédologiques et climatiques

La Réunion, de par son origine volcanique, possède une topographie et une pédologie contraignante pour l'élevage et l'agriculture.

Le Piton des Neiges, point culminant de l'île (3070 mètres) est profondément entaillé en son centre par trois larges excavations d'accès difficile : les Cirques (Mafate, Salazie et Cilaos). Le Piton de la Fournaise, volcan toujours en activité, s'est édifié sur les pentes Sud-est du piton des Neiges.

L'élevage bovin est situé dans les zones délaissées par les autres activités. Les Hauts de l'Ouest (situé sur les flancs du Piton des Neiges), La Plaine des Cafres et La Plaine des

Palmistes (plaines d'altitude situées entre les deux massifs) et Les Hauts de Saint Joseph (sur les pentes Sud du Piton de la Fournaise) constituent les zones de pâturages principales. (voir carte)



Carte 2 : Principales zones d'élevage de la Réunion [40]

La mise en culture de ces sols engendre une perturbation importante des couches superficielles et augmente leur sensibilité naturelle à l'érosion, qui se trouve être un problème majeur de l'île. L'élevage protège le sol, et apparaît donc comme l'activité agricole la plus adaptée dans les pâturages des « Hauts ».



Carte 3 : Dissymétrie côte Est/côte Ouest (source : <http://www.wikipedia.org>)

Le climat sur l'île est tropical humide et contrasté : la présence de nombreux gradients altitudinaux engendre des variations climatiques importantes entre le littoral et les zones d'altitude.

L'hiver austral, frais, de mai à octobre est caractérisé par la présence de l'anticyclone de l'océan Indien qui engendre des alizés avec des vents d'Est dominants. L'été austral, de novembre à avril est caractérisé par un air chaud et humide, avec d'intenses précipitations et des vents violents.

Il existe une grande dissymétrie entre la côte Est, exposée aux alizés, très humides (70% des précipitations) et la côte Ouest, protégée par le relief qui connaît donc une saison sèche plus marquée. (Voir carte 3)

Il faut enfin noter la présence d'un gradient altitudinal prononcé qui engendre une baisse de température et une augmentation de la pluviométrie en altitude (« Les Hauts »). C'est dans ces zones que l'élevage est le plus pratiqué.

1-2 L'élevage bovin à la Réunion et le GRDSBR

1-2-1 Contexte

L'agriculture est un secteur clé de l'économie réunionnaise. Avec plus de 10 000 actifs (4% de la population active de l'île) et une surface cultivée de 45 000 hectares, les différentes productions agricoles de l'île sont en constante progression.

L'élevage à la Réunion est récent, mais les bovins sont présents sur l'île depuis beaucoup plus longtemps. Au XXème siècle, les zébus ont été remplacés par des races à viande et des races laitières importées de métropole.

L'essor de la filière a débuté en 1946, au cours de la départementalisation. Les aides de la Région et de l'Union Européenne ont permis des progrès rapides et une organisation de la filière [31].

La SICALAIT (Société d'Intérêt Collectif Agricole en LAIT) a été créée en 1962 et a pour mission de collecter et de commercialiser la production, de représenter et de défendre les intérêts de la profession.

Le SUADER (Service d'Utilité Agricole et de Développement de l'Elevage Réunionnais), agréé en 1976 en tant qu'Etablissement Départemental d'Elevage (EDE), pour le contrôle des performances, le contrôle laitier et l'identification des animaux [31].

La SICAREVIA (Société d'Intérêt Collectif Agricole Réunion Viande) regroupe les principaux producteurs de viande et assure l'approvisionnement de l'île en viande bovine.

1-2-2 Les principales causes de mortalité à la Réunion

Les hémoparasitoses étaient en 2000 la principale cause de mortalité à la Réunion. Le tableau suivant représente les résultats du Réseau d'Epidémiologie-Surveillance de l'Île de la Réunion (RESIR). On peut voir que les mortalités par hémoparasitoses diminuent d'année en année. Depuis 2005, les hémoparasitoses ne sont plus les principales causes de mortalité sur l'île.

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Hémoparasitoses	17%	15%	15%	18%	17%	12%	13%
Pathologies digestives	16%	18%	17%	13%	16%	13%	12%
Infections	10%	11%	9%	14%	11%	11%	13%
Accidents	12%	14%	18%	13%	12%	11%	15%
Entérotoxémie	8%	6%	4%	4%	5%	5%	4%
Pathologies pulmonaires	8%	10%	5%	8%	6%	5%	5%
Pathologies de la reproduction	7%	11%	12%	9%	7%	8%	8%
Pathologies de la mamelle	2%	1%	2%	1%	1%	1%	2%
Pathologies infectieuses	3%	1%	2%	3%	2%	0.5%	0%
Misère physiologique	6%	4%	8%	8%	9%	14%	15%
MLRC	2%	2%	1%	0%	1%	1%	0%
Non classés	5%	4%	4%	5%	5%	13%	9%
Pathologies nerveuses	0%	0%	1%	1%	0%	0.5%	0%
Pathologies des organes digestifs annexes	4%	2%	3%	3%	7%	3%	4%

Tableau 1 : Principales causes de mortalité en élevage bovin à la Réunion.

1-3 Le problème des stomoxes à la Réunion

1-3-1 Généralités sur les stomoxes.

1-3-1-1 Systématique, morphologie, répartition géographique

CI Hexapoda,

O. Diptera,
 SpF. Muscoidea,
 F. Muscidae,
 SsF. Stomoxyinae,
 G. Stomoxys.



Photo 1 : Mouche stomoxe (Duvallat, 2006)

Les Stomoxyinae sont des mouches piqueuses de 3 à 10 mm de longueur, hémaphages et d'allure voisine de celle de la mouche domestique *Musca domestica*.

La principale différence tient dans son appareil buccal adapté à la piqure, le proboscis (cf Figure et annexe 1), capable de traverser la peau.

Cette sous-famille regroupe plusieurs genres dont notamment *Haematobosca* Bezzi, 1907, *Haematobia* Lepletier et Serville, 1828, et *Stomoxys* Geoffroy, 1762.

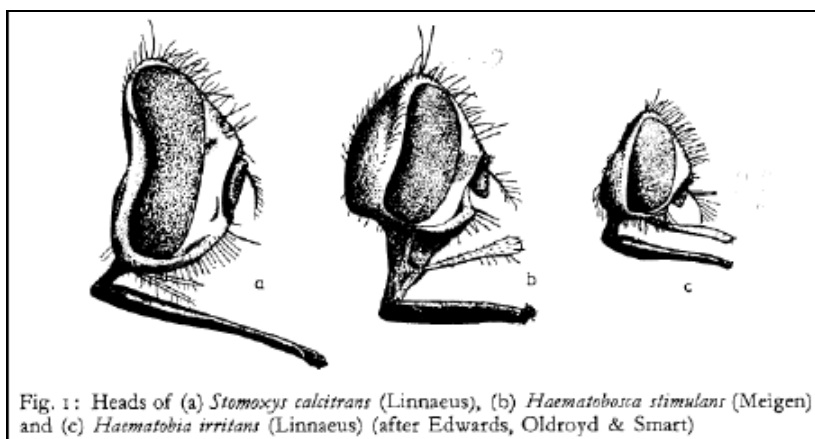


Fig. 1: Heads of (a) *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus), (b) *Haematobosca stimulans* (Meigen) and (c) *Haematobia irritans* (Linnaeus) (after Edwards, Oldroyd & Smart)

Figure 1 : Têtes de stomoxinés [56]

Sur les dix-huit espèces de *Stomoxys* décrites, deux sont présentes sur l'île de la Réunion : *Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger niger*, également appelées « mouches des étables » (« Stable fly » en anglais), ou « mouches-bœufs » à la Réunion. La diagnose entre les 2

espèces est aisée (cf annexe 1 et figure 2) : L'abdomen de *S. niger* apparaît plutôt rayé tandis que celui de *S. calcitrans* possède des taches.



Figure 2 : Abdomen de *S. calcitrans* (à gauche) et *S. niger* (à droite) [56]

Stomoxys calcitrans est une espèce cosmopolite retrouvée sur la plupart des continents : Amérique du Nord, Europe, Afrique, Nouvelle Calédonie...).

S. niger niger (anciennement *S. nigra*) a une distribution plus restreinte à l'Afrique et aux Iles Mascareignes.

En fonction du pays considéré, le ratio *S. niger* / *S. calcitrans* varie. Ainsi, *S. niger* prédomine à l'Ile Maurice. A la Réunion, le ratio des espèces varie en fonction de l'altitude : Il augmente quand l'altitude diminue, ce qui est vraisemblablement lié à l'élévation graduelle de la température. *S. niger* est surtout retrouvée sur la partie littorale de l'île, du niveau de la mer jusqu'à 950 m d'altitude en été, zone où se trouvent les champs de canne à sucre qui représentent l'habitat électif de cette espèce. *S. calcitrans* colonise plutôt les hauteurs de l'île à partir de 900 m jusqu'aux plaines de 1600 m [23].

S. niger se développe mieux sur les végétaux en décomposition dans les champs cultivés ou dans les forêts. La répartition de cette espèce est limitée par les fortes pluies en été et par les faibles températures en hiver.

S. calcitrans ne cause réellement de problèmes qu'au voisinage des étables et des écuries. Elle est surtout présente dans des zones où l'élevage se pratique de manière intensive. La ponte et le développement pré-imaginal de *S. calcitrans* s'effectuent principalement sur la matière organique telle que le fumier ou le lisier mélangé à de la matière végétale en décomposition. C'est pourquoi la maîtrise des pratiques de nettoyage de l'exploitation sont indispensables pour lutter efficacement contre cette espèce [28] [40]. A la différence de *S. niger*, *S. calcitrans* est favorisé lorsque le taux d'humidité dans le milieu est élevé.

Les stomoxes sont plus nombreux pendant la saison chaude et humide. Les pullulations en saison chaude sont des plus intenses [13]. J. Gilles J. (2005) [23] a d'ailleurs noté des

variations importantes de densité apparente en Stomoxes. Il rapporte que ces variations sont corrélées à des variables climatiques.

1-3-1-2 Cycle des stomoxes.

Cycle (6 stades) : œuf, stades larvaires (3 stades), nymphe, adulte.

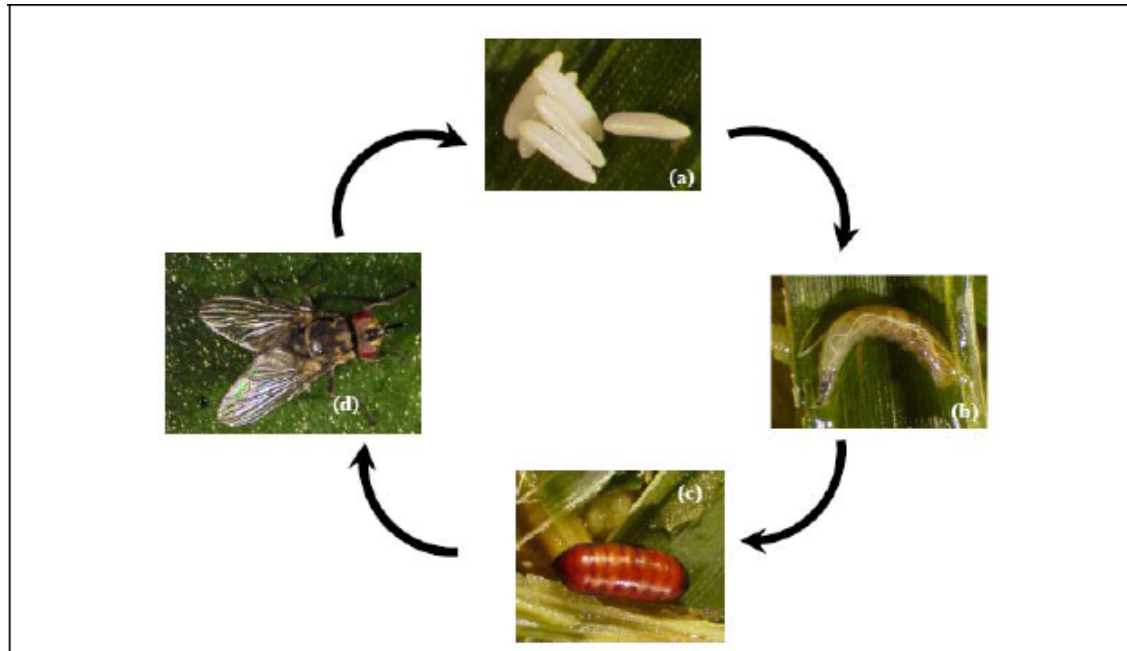


Schéma 1 : Cycle de *S. calcitrans* [23]

Le cycle de développement de *S. calcitrans* est d'environ 12 jours à 30° et 60 jours à 15°.

A 25°, l'éclosion se fait 24 heures après la ponte, la pupaison 10-12 jours plus tard. L'émergence des adultes a lieu 6-8 jours après la pupaison. La durée de vie d'un adulte varie de 2 à 4 semaines.

Les femelles de *S. calcitrans* ne s'accouplent qu'avec un seul mâle, 5 jours après leur émergence.

La ponte se fait préférentiellement dans de la bouse de vache, ou du crottin de cheval mélangés à de la paille. La température doit être comprise entre 22° et 28°. Les végétaux coupés semblent être également un lieu de ponte favorisé (refus alimentaire, déchets de coupes...) Le milieu de ponte doit être poreux et très humide pour favoriser l'oviposition et le développement larvaire. L'oviposition se fait donc généralement en profondeur dans la bouse de vache mélangée à de la paille (pour *S. calcitrans*) et en profondeur dans les végétaux coupés (pour *S. niger*).

Les stomoxes sont un véritable fléau économique à la Réunion, du fait de leur pouvoir pathogène et du coût de la lutte anti-stomoxe. Leur impact économique n'est pas chiffré mais est certainement majeur.

1-3-2 Nuisances et pouvoir pathogène

Les mâles comme les femelles sont capables de piquer les hôtes. Un repas sanguin est nécessaire à la reproduction des mouches. Toutefois, elles peuvent survivre en s'alimentant de nectar et de pollen [20]. Ce sont des mouches qui prennent plusieurs repas par jour [28] et leur piqûre douloureuse entraîne des changements fréquents et rapides d'hôtes au cours du même repas. Ces changements d'hôtes au cours d'un même repas en font d'excellents vecteurs mécaniques pour de nombreuses maladies parasitaires, bactériennes ou virales.

1-3-2-1 Nuisances directes.

La première nuisance notable provoquée par cette espèce de mouche est la spoliation sanguine qui peut être importante : Barré N. (1981) [3] estimait une perte allant de 0,5 à 1 litre par bovin et par jour dans les élevages les plus atteints. Une diminution de 0,7% de production laitière par stomoxe et par vache ainsi qu'une diminution de 0,65% du taux butyreux ont été estimées [6].

Bishopp (1913) [5] nota de nombreuses autres nuisances directes dues à la présence de stomoxes sur les bovins : une anxiété, induite par la douleur et le harcèlement, une diminution des réponses immunitaires et une perte de poids de 10 à 25%, des boiteries...

Il a également été rapporté que le harcèlement empêche de façon importante les bovins de se nourrir correctement [16].

Les bovins réagissent de façon intense aux piqûres de stomoxes [34] : coups de pattes, mouvements de tête, d'oreilles, de queue, trémulations des muscles peauciers... La fréquence de ces diverses réactions peut être rattachée à l'abondance de mouches.

Lors de pullulations excessives, outre les lésions cutanées, Barré (1981) [3] a rapporté des mortalités non expliquées par les pathologies habituelles et qui pourraient être rattachées à la spoliation sanguine et autres nuisances directes.

1-3-2-2 Pouvoir pathogène indirect : la transmission mécanique.

Une transmission est dite biologique lorsque le passage par le vecteur arthropode est nécessaire au développement de l'agent pathogène : multiplication du virus, de la bactérie, ou du protozoaire, réalisation d'une phase du cycle biologique du parasite. Ce n'est pas le cas

des stomoxes, ils n'agissent que comme vecteurs mécaniques des différents parasites qu'ils peuvent transmettre.

Le changement rapide d'hôtes au cours d'un même repas est favorable à la transmission car les parasites n'ont pas le temps de mourir entre les deux piqûres.

La quantité de sang souillant les pièces buccales est d'environ 0,1 nL, ce qui correspond à 1/200^{ième} de celle contenue dans les pièces buccales d'un tabanidé. Les différentes maladies transmises par les stomoxes sont :

Les hémoparasitoses : l'Anaplasmose

L'Anaplasmose (*Anaplasma marginale*) est l'hémoparasitose la plus présente à la Réunion (elle est à l'origine de 67% des mortalités par hémoparasitoses à la Réunion en 2000). Entre 2000 et 2003, 16 à 19% des mortalités bovines étaient dues à des hémoparasitoses.

L'importance que revêt cette maladie à la Réunion est en partie due à la forte diminution de la reproduction des stomoxes pendant l'hiver austral (notamment dans les « Hauts »), et donc une diminution de l'incidence de la maladie chez les veaux. Ceci entraîne une forte probabilité d'apparition de cas cliniques d'une année sur l'autre [9].

L'Anaplasmose, à la Réunion, n'est pas seulement transmise par les stomoxes, mais aussi par les tiques (ou « Carapates ») (surtout *Boophilus microplus*). Quant à la babésiose, elle est surtout transmise par les tiques *Boophilus* mais il semble que les stomoxes puissent également avoir un rôle de vecteur pour cette maladie. Les situations épidémiologiques différentes des 2 maladies suggèrent des différences au niveau de leur mode de transmission respective.

L'Anaplasmose entraîne des troubles de la reproduction (avortements) particulièrement problématiques dans l'élevage laitier de la Réunion.

L'Anthrax ou Fièvre Charbonneuse

La fièvre charbonneuse est une maladie infectieuse d'origine tellurique affectant les mammifères, principalement les herbivores, et transmissible à l'Homme, due à une bactérie : *Bacillus anthracis*. Les stomoxes ont un rôle non négligeable dans la transmission de cette maladie, à qui elle doit le surnom de « mouche charbonneuse ».

La tularémie

Cette maladie n'est pas présente à la Réunion mais peut être transmise par les stomoxes dans l'hémisphère Nord.

Autres maladies :

Les prévalences de la leucose **bovine enzootique** et de **la maladie des muqueuses** étaient respectivement de 44% et de 45% en 1998 [47]. Ces prévalences associées aux fortes pullulations de stomoxes peuvent faire craindre la possibilité d'une transmission mécanique de ces maladies. Le suivi sérologique de la leucose réalisé lors de campagnes de prophylaxie de 2002 et 2003 montre des prévalences très élevées chez les éleveurs laitiers malgré des performances zootechniques et des pratiques vétérinaires qualifiées de très correctes. Les stomoxes ont également été incriminés dans l'extension de l'épizootie de **dermatose nodulaire contagieuse** de 1991.

1-3-2 La lutte intégrée contre les Stomoxes.

1-3-2-1 Le programme POSEIDOM



A la Réunion, la lutte intégrée contre les stomoxes est principalement organisée par le Groupement Régional de Défense Sanitaire du Bétail de la Réunion (GRDSBR) dans le cadre du programme **POSEIDOM** d'éradication des hémoparasitoses.

Ce programme a été mis en place en 1994 avec la vente d'insecticides subventionnés. En 1996, le laboratoire d'élevage de stomoxes et de parasitoïdes est créé. La lutte mécanique se développe après 1999. En 2002, les contrats d'engagement permettent une optimisation de la lutte intégrée, une vulgarisation et une meilleure implication de tous les acteurs.

Les contextes épidémiologiques et parasitaires de l'île de la Réunion ont été à l'origine de la mise en place de ce programme. En effet, contrairement aux Antilles pour lesquelles le programme POSEIDOM Vétérinaire a été mis en place initialement en coordination avec le Caribbean Amblyomma Programme (CAP), la Réunion n'est pratiquement pas confrontée au problème de la Cowdriose, transmise par les tiques *Amblyomma*. Une surveillance sérologique annuelle menée depuis 2003 montre une prévalence de cette maladie de 3 à 4% dans une zone géographique très limitée de l'île où le vecteur est présent.

Par contre, la Réunion est confrontée à la présence de 3 pathogènes largement présents responsables d'hémoparasitoses : *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* et *Anaplasma marginale*, véhiculées par les tiques *Boophilus microplus* et/ou par les mouches hématophages du genre *Stomoxys spp.* Une lutte vectorielle dirigée tant contre les tiques que contre les stomoxes est plus que nécessaire.

1-3-2-2 Les différents moyens de lutte

La lutte environnementale :

Cette lutte consiste à modifier le biotope des stomoxes pour le rendre impropre à la ponte et à la prolifération des larves tout en constituant une barrière naturelle à leur progression. Les caractéristiques propres à chaque élevage sont des paramètres essentiels à prendre en compte pour contrôler l'abondance des populations [40]. L'implication des éleveurs dans une lutte intégrée est primordiale et doit passer par : la gestion des effluents d'élevage, l'élimination des reposoirs à mouches (débroussaillage régulier autour des stabulations), l'élimination des sites de pontes des stomoxes (refus de nourriture, tas de fumier).

Le programme POSEIDOM se base largement sur ce volet de la lutte. En effet, une notation est attribuée à chaque élevage en fonction de leur implication dans cette lutte. Les aides allouées dépendent de cette notation.

La lutte physique [22] :

Elle est très efficace et passe par l'utilisation de plusieurs pièges. Le piège Vavoua, initialement conçu pour la lutte contre les glossines est distribué aux éleveurs dans le cadre des actions du programme POSEIDOM du GRDSBR. Les fils à colle sont également utilisés et donnent d'excellents résultats. Les fils sont mis en place de façon stratégique dans l'exploitation, au-dessus des cornadis pour diminuer le nombre de mouches autour des bovins lorsque ceux ci mangent. Le principe utilise la caractéristique des stomoxes qui ont pour habitude de se poser sur des reposoirs. Les mouches se posent donc dessus, et n'en repartent plus.

Les techniciens du programme POSEIDOM offrent des conseils personnalisés adaptés à chaque configuration d'élevage pour installer correctement les pièges.



Photo 2 : Piège Vavoua (GRDSBR)



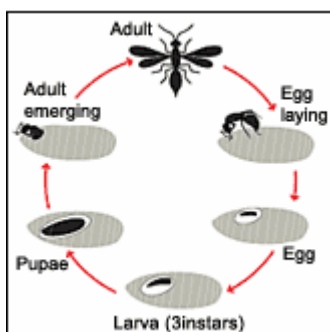
Photo 3 : Fil à colle (GRDSBR) [40]

La lutte chimique :

Le Butox (insecticide pyréthrianoïde (Deltaméthrine)) réduit la taille des populations de stomoxes adultes mais son efficacité varie en fonction des sites [23]. Par ailleurs, la question sur les phénomènes de résistance s'est posée.

Le Neporex (cyromazine) est également utilisé en tant que larvicide. L'utilisation de ce produit nécessite une bonne connaissance des lieux de ponte des stomoxes.

La cyromazine est un régulateur de croissance pour insectes largement utilisé dans la lutte contre les mouches immatures. Elle engendre des modifications morphologiques et physiologiques irréversibles qui peuvent entraîner la mort de l'immature. Les effets varient en fonction du stade de développement de l'insecte : Lorsque la larve est exposée, on assiste à des malformations sur la puppe dues à des interférences entre la digestion et la synthèse de la chitine. Lorsque la puppe est exposée, on assiste à des aberrations morphologiques sur l'adulte, comme une absence d'ailes, ou une absence de génitalia sur les mâles comme sur les femelles [14]. L'auteur rapporte par ailleurs des cas de plus en plus fréquents de résistance.



La lutte biologique :

Schéma 2 : Cycle de *Spalangia*.
(Source :
www.flycontrol.novartis.com)

Le programme **POSEIDOM** organise depuis 1994 des lâchers de masse bimensuels d'un micro-hyménoptère, *Spalangia nigroaenea* Curtis, 1839, parasitoïde des Muscidae. Le parasitoïde pond dans la puppe de Muscidae. L'œuf s'y développe jusqu'à l'émergence de l'adulte. La puppe de Muscidae n'est plus viable.

La lutte biologique est l'unique moyen de lutte présent à l'île Maurice, et ce depuis plus de vingt ans. Elle concerne cependant une autre espèce de mouche (*S. niger*) et de parasitoïde (*Trichopria*). *Spalangia nigroaenea* est élevé au laboratoire du GRDSBR.

La mise en œuvre de la lutte intégrée passe par une prise de conscience de l'éleveur de l'importance de son environnement et de son itinéraire technique sur l'état sanitaire de son troupeau.

Une analyse critique de chaque élevage volontaire permet à l'éleveur d'améliorer son système de production tout en diminuant son risque d'exposition aux hémoparasitoses. Des actions simples et régulières assurent un effet durable à long terme de la lutte contre les stomoxes et les tiques.

1-4 Les huiles essentielles

1-4-1 Généralités

1-4-1-1 Définition

Le terme « Huiles essentielles » est un terme générique qui désigne les composants liquides et hautement volatiles des plantes, marqués par une forte et caractéristique odeur. Les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) de ces composants.

Les huiles essentielles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes (monoterpènes, sesquiterpènes,...). Il est admis que l'effet de ces composés purs peut être différent de celui obtenu par des extraits de plantes.

Les huiles essentielles contiennent un nombre considérable de familles biochimiques (chémotypes) incluant les alcools, les phénols, les esters, les oxydes, les coumarines, les

sesquiterpènes, les terpénols, les cétones, les aldéhydes, etc. On voit qu'elles ne sont pas constituées d'acides gras, ni d'aucun autre corps gras.

Il est important de faire une différence entre les huiles essentielles et les huiles végétales. Les huiles essentielles sont obtenues par expression (réservée aux agrumes) ou par distillation à la vapeur d'eau. Elles sont volatiles, solubles dans l'alcool et dans l'huile, mais pas dans l'eau. Ce sont des substances odorantes.

Une huile végétale est obtenue par pression, et est constituée majoritairement de corps gras.

1-4-1-2 Histoire de leur utilisation

Reconnues pour leurs puissantes propriétés thérapeutiques et utilisées depuis des millénaires en Chine, en Inde, au Moyen Orient, en Egypte, en Grèce, en Amérique Latine (Azèques, Mayas, Incas) et en Afrique, les huiles essentielles tombent dans l'oubli au Moyen Age. A ce moment, l'Europe connaît un retour à la barbarie avec un déclin général du savoir. Il faudra attendre l'arrivée des Arabes pour assister à un nouvel essor de la médecine par les plantes qui retrouvent alors une place de choix dans l'arsenal thérapeutique de l'époque.

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. Dans certaines régions d'Afrique noire, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales.

1-4-1-3 Activité insecticide : mécanismes d'action.

Les huiles essentielles représentent une piste d'avenir et les recherches sur ce sujet sont nombreuses : le tableau de Mohan et Ramaswamy, 2007 [32] (annexe 3) récapitule les différentes études et les différents résultats.

Toutefois, la grande majorité de ces études portaient sur les moustiques, que ce soit sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide [49].

Le mode d'action des huiles essentielles est relativement peu connu chez les insectes [4] [25].

Effets physiques et physiologiques des huiles essentielles :

Effets physiologiques :

Les huiles essentielles ont des effets anti-appétents, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens.

Des travaux récents montrent que les mono terpènes inhibent la cholinestérase [27].

Effets sur l'octopamine :

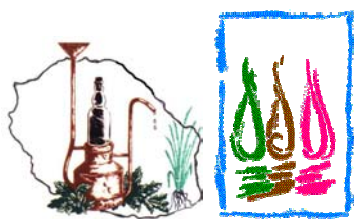
L'octopamine est un neuromodulateur spécifique des invertébrés : Cette molécule a un effet régulateur sur les battements de cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés. Enan (2000) [18] et Isman (2000) [25] font le lien entre l'application de l'eugénol, de l'alpha-terpinéol et de l'alcool cinnamique, et le blocage des sites accepteurs de l'octopamine. Enan (2005) [19] a également démontré un effet sur la Tyramine, autre neurotransmetteur des insectes.

En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des Arthropodes. Ces huiles sont donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud.

Effets physiques :

Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des arthropodes à corps mous. Isman (2000) [25] fait cette hypothèse car plusieurs huiles essentielles semblent plus efficaces sur les arthropodes à corps mou.

1-4-2 Les huiles essentielles de la Réunion



La **Coopérative Agricole des Huiles Essentielles de Bourbon (Caheb)** fait partie intégrante du patrimoine agricole réunionnais.

Fondée en 1963, elle regroupe aujourd'hui 400 producteurs.

Tous viennent y distiller géranium, vétiver, baies roses ou encore cryptomérias. Il s'agit d'une activité agricole destinée principalement à l'export et à la parfumerie.

Pourtant, avec la crise économique liée au Chikungunya, la Caheb a sorti une nouvelle gamme de produits anti-moustiques, en étroite collaboration avec des laboratoires métropolitains. Des solutions entièrement naturelles conçues à base d'huile essentielle de

géranium et de citronnelle ont vu le jour. Produits localement, ces insecticides naturels se rapprochent du « bio » et sont donc bien vus du grand public. Comme nous l'avons dit dans l'introduction, des études ont été réalisées par le GRDSBR depuis 2006.

En effet, certains éleveurs avaient pris l'habitude d'asperger d'eau les animaux, ce qui avait pour effet de diminuer le nombre de piqûres. Pour valoriser l'eau de distillation du géranium, sous-produit de la distillation du Caheb, cet hydrolat a été mélangé à l'eau d'aspersion. Les éleveurs ont rapporté que non seulement cette solution présentait plus de résultats que l'eau seule, mais qu'ils trouvaient beaucoup plus de mouches mortes dans leur élevage. Les bovins restent protégés des stomoxes pendant environ deux heures après application du produit par aspersion. Ces observations ont soulevé la question du pouvoir insecticide (et non pas seulement répulsif) des huiles essentielles.

Des données non publiées, communiquées personnellement par Melle CENICEROS ont confirmé l'effet répulsif des huiles essentielles en mettant en évidence un effet paralysant sur les adultes stomoxes des huiles essentielles de Citronnelle, Eucalyptus et de l'eau de distillation du géranium. L'huile essentielle de Citronnelle aurait plus d'effet que l'Eucalyptus qui aurait lui-même plus d'effet que l'eau de distillation de géranium.

Par ailleurs, une étude préalable, en août 2006 a également été mise en place par Melle CENICEROS au laboratoire d'élevage des Stomoxes du GRDSBR pour tester un éventuel effet larvicide et ovicide des huiles essentielles.

Les résultats de cette étude préalable, quoique non publiés, nous ont été communiqués par leurs auteurs, et ont permis de mettre en place le protocole de la présente étude.

II- Objectifs de l'étude

L'impact majeur des stomoxes sur l'élevage bovin réunionnais, l'intérêt marqué, et l'efficacité de plus en plus prouvée des huiles essentielles comme insecticides contre les moustiques nous a incité à proposer une étude en laboratoire pour tester l'effet larvicide de ces huiles contre les stomoxes.

Une recherche bibliographique ainsi que l'étude des disponibilités locales nous ont permis de choisir les huiles à tester : le géranium, la citronnelle et l'eucalyptus ont été d'emblée incluses dans l'étude. Les recherches bibliographiques ont motivé l'inclusion des huiles essentielles de Tea Tree, de Lavande et de Basilic et les huiles de Neem, de Manuka, de Pyrèthre et de Moringa. Pour des raisons de disponibilité et de coût, les huiles de pyrèthre et de Manuka n'ont finalement pas été testées.

L'objectif de l'étude étant avant tout une potentielle utilisation des huiles essentielles par les éleveurs de la Réunion, il nous est apparu capital de rester le plus proche possible de la réalité du terrain.

Le but est plus d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles en tant que larvicides utilisables en pratique et accessibles aux éleveurs que d'évaluer leur efficacité en soi.

Cette étude se compose donc de quatre expérimentations dont les protocoles sont élaborés au fur et à mesure.

La première expérimentation a pour but d'avoir de vérifier l'effet larvicide de chaque huile. Les concentrations testées sont différentes pour chacune. C'est le coût qui reste stable, il est basé sur le prix du produit larvicide utilisé par les éleveurs, le Neporex ND.

La seconde expérimentation se concentre sur les huiles ayant donné des résultats satisfaisants lors de la première expérimentation. La comparaison de 2 concentrations différentes est réalisée afin de mettre en évidence un effet-dose de l'huile.

La troisième expérimentation étudie l'effet larvicide de l'huile après pulvérisation sur le milieu de développement. C'est en effet le mode d'application qui serait éventuellement réalisé par l'éleveur. Nous avons voulu nous rapprocher au plus des conditions réelles d'utilisation sur le terrain. Cette pulvérisation se fait au stade L2. Les stades œuf et L1 sont des stades minuscules, fragiles, et peu mobiles. Lorsqu'on les dépose sur le milieu de

développement, ils sont tous rassemblés en un même endroit, ce qui est très éloigné des conditions de terrain. Les L2 sont plus mobiles et sont généralement dispersées dans le milieu. Par ailleurs, dans les conditions réelles, il y a dans le milieu de développement des œufs, et des larves de tout stade. Il nous a semblé important d'étudier l'effet des huiles sur des larves dont le stade œuf n'avait pas été en contact avec l'huile.

Une quatrième expérimentation est rajoutée dans laquelle les huiles sont testées à la même concentration. Nous voulions nous affranchir du critère prix et avoir une comparaison de l'activité larvicide intrinsèque de chaque huile.

III- Matériels et Méthodes

3-1 Matériel biologique : Elevage de Stomoxes au GRDSBR

L'élevage du POSEIDOM a été mis en place en 1994 dans le cadre de la lutte biologique contre les stomoxes. Cet élevage permet la multiplication de parasitoïdes qui sont ensuite distribués aux éleveurs et répandus dans les élevages bovins. Ainsi, une partie des exploitations de la Réunion bénéficient toutes les deux semaines de lâchers de *Spalangia nigroaenea*, parasitoïde des Muscidae.

Le laboratoire réalise uniquement l'élevage de *S. nigroaenea* sur des pupes de *S. calcitrans*. En effet, *S. nigroaenea* est particulièrement adapté à cette espèce, et l'utilisation de *S. niger* pourrait diminuer le rendement.

Régulièrement, des stomoxes prélevés sur le terrain permettent de réalimenter l'élevage et donc, de se rapprocher au maximum des conditions naturelles de variabilité génétique.

3-1-1 Conditions d'élevage au laboratoire du GRDSBR

Les adultes sont placés dans des cages cubiques (45x45x45 cm³). L'armature est faite de bois, et les parois de grillage en plastique blanc laissant passer la lumière. Ces cages sont placées dans une salle dont la température est de 29±2°C, l'hygrométrie de 70±10%, et l'éclairement naturel.

Les adultes sont nourris deux à trois fois par jour avec du sang de bovin citraté (1%) récupéré deux fois par semaine à l'abattoir. Le sang est chauffé au bain-marie jusqu'à une température de 45°C. Des éponges imbibées sont placées sur les cages pendant 45 minutes.

Un milieu de ponte (canne fourragère humidifiée à saturation) est placé sur un plateau sous la cage, recouvert d'un tissu noir et humide. Les adultes commencent à pondre au bout de 7 à 10 jours sur ce tissu à travers le grillage en plastique. Les œufs sont ensuite récupérés chaque jour avec une pipette pendant 4 jours, ce qui correspond à la période où le nombre d'œufs pondus est maximal. Au bout de 4 jours, les mouches sont remplacées.

Les œufs sont placés dans des « gamates » (31x43x7 cm) contenant le milieu de développement : **250 g de canne fourragère broyée, 125 g de son de blé, et eau en quantité suffisante (à saturation)**. La canne fourragère permet une aération du milieu et la mobilité des larves, tandis que le son de blé constitue la principale source nutritive des larves. La canne

fourragère verte permet aussi la nutrition des larves car la canne séchée diminue considérablement la production.

On dispose dans chaque gamate 0,5 à 0,6 ml d'œufs soit environ 3000 à 4000 œufs. La gamate est recouverte de mousseline pour éviter la contamination du milieu par d'autres insectes. La gamate est maintenue à 25°C pour favoriser l'éclosion et le développement larvaire.

Un deuxième apport du milieu larvaire est réalisé 4 jours après la première nutrition. Les quantités sont adaptées à la quantité de larves présentes et à leur état de développement. L'avancée de leur développement est vérifiée tous les jours. En moyenne, la pupaison se fait deux à trois jours après la deuxième nutrition des larves. Les pupes sont récupérées par flottaison avec un tamis, puis séchées au ventilateur. Certaines pupes sont conservées pour l'élevage de stomoxes. La plus grande partie de ces pupes est destinée à être parasitée (entre 0 et 3 jours). La mise en contact dure 7 jours dans une salle à 27-28°C, puis les pupes sont récupérées par flottaison. Certaines sont gardées pour l'élevage et d'autres sont lâchées dans les exploitations.

3-1-2 Matériel

Les œufs :

Les œufs sont récupérés le jour même de leur ponte. A l'aide d'une loupe binoculaire et d'un pinceau très fin et doux, on compte 100 œufs par gamate (une gamate par huile testée, plus une gamate-témoin). Les œufs sont disposés par 100 sur des bouts de tissu humidifié régulièrement pour éviter leur dessiccation.

Le mélange d'huiles essentielles :

Parallèlement, on réalise les mélanges d'huiles essentielles dans des bocaux étiquetés. Nous avons décidé d'utiliser les huiles essentielles à une concentration différente selon leurs coûts respectifs, en se basant sur le prix du Neporex ND, afin qu'une éventuelle utilisation future ne coûte pas plus cher aux éleveurs.

Un volume est donc défini pour chaque huile essentielle. Ce volume est mesuré avec une seringue de 2 ml. Une seringue ne sera utilisée que pour une huile essentielle donnée.

Stabilisant :

Il s'agit de Polysorbate 80 ND (monooléate de polyoxyéthylène 20 monoanhydrosorbitol). Il s'agit d'un tensioactif non ionique utilisé pour ses effets fluidifiants et émulsifiants.

Nous l'utilisons donc pour permettre une bonne stabilisation des huiles essentielles en milieu aqueux.

Ses effets sur le développement larvaire ont été étudiés lors de l'étude préalable d'août 2006 afin d'éliminer son influence sur les résultats des tests des huiles essentielles.

Les recherches bibliographiques n'ont pas permis d'avoir une idée précise de la concentration nécessaire en stabilisant. Le volume doit être suffisant pour permettre une stabilisation de l'huile dans l'eau pendant une durée finalement assez courte. En effet, entre la préparation de la solution et le mélange au milieu de développement, on attend moins d'une seconde.

Il est apparu qu'un volume égal à la moitié du volume d'huile est suffisant pour permettre une bonne stabilisation de l'huile dans l'eau.

On rajoute le volume d'eau nécessaire pour avoir 350 mL de solution.

Gamate :



Photo 4 : Gamate, bac d'élevage des mouches.

Cette solution est ensuite incorporée au milieu de culture constitué de canne fourragère et de son de blé.

Lorsque chaque milieu est ainsi préparé, on dépose à l'aide d'une pipette les 100 œufs sur ce milieu.

Chaque gamate est recouverte d'un tissu mousseline retenu par un large élastique, afin

d'empêcher tout insecte d'entrer ou de sortir.

La série de gamates est placée dans une salle dont la température est de 29°C, l'hygrométrie de 70%, et l'éclairage naturel.

Pour la première expérimentation, on teste les 8 huiles essentielles (plus le témoin). On décide de réaliser 5 répétitions pour cette expérimentation.

3-1-3 Comptage

Au bout de 15 à 16 jours, les séries sont récupérées afin de réaliser le comptage des mouches émergées. Les gamates sont placées au congélateur pendant 4 heures, de sorte que toutes les mouches meurent, ce qui facilitera leur comptage.

Les mouches sont récupérées à l'aide d'une pince et déposées sur un support à côté de la gamate. Tout le milieu est retourné pour avoir accès à toutes les mouches.

3-2 Choix des huiles essentielles testées

3-2-1 Le Basilic (*Ocimum basilicum*)



Photo 4: *Ocimum basilicum*
(Source: www.wikipedia.com)

Les effets insecticides du basilic (famille des Labiatae) sont connus depuis longtemps. L'odeur du basilic est en effet réputée pour son effet répulsif.

Prajapati and Tripathi (2005) [42] ont étudié l'effet insecticide, repellent, larvicide et ovicide de l'huile essentielle de *Ocimum basilicum*. Les travaux portaient sur *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*. Sans être le produit le plus prometteur de l'étude, l'huile essentielle de basilic a montré une activité larvicide intéressante et un effet répulsif sur les adultes.

Bekele J. and Hassanali A., 2001 [4] ont également étudié l'effet du camphre, constituant majeur d'une variété de basilic (*Ocimum kilimandsharicum*) sur plusieurs espèces de coléoptères. Leurs résultats ont initié de nombreuses recherches sur l'utilisation potentielle de produits dérivés du basilic dans la lutte contre les insectes ravageurs de cultures dans de nombreux pays en développement.

Usip et al, 2006 [51] ont mis en évidence l'effet répulsif d'une autre espèce de basilic (*Ocimum gratissimum*) sur *Simulium damnosum*, diptère nématocère d'importance en Afrique (vecteur de l'onchocercose).

Ntonifor NN & al, 2006 [39] ont mené une étude participative dans une localité rurale du Cameroun, Bolifamba, pour documenter et tester l'efficacité de traitements insecticides traditionnels locaux. Les 2 plantes testées (*Ocimum basilicum* et *Saccharum officinarum*) ont

donné des résultats différents du témoin, et étaient utilisées de manière importante par les populations locales pour lutter contre les piqûres de moustiques.

Murugan K et al, 2007 [35], ont également obtenu des résultats satisfaisants dans leur étude sur l'effet larvicide et répulsif d'*Ocimum basilicum* sur le vecteur de la dengue, *Aedes aegypti*. Les mêmes résultats ont été obtenus au Brésil [10].

Pavela R. 2004 [41] a mis en évidence l'activité insecticide d'*O. basilicum* sur le 3^{ème} stade larvaire d'*Egyptian coronworm*, notamment leur effet sur le taux de croissance relative (RGR), leur capacité de digestion (Efficiency of conversion of ingested food (ECI), et Efficiency of digested food (ECD)).

Muse W.A. et al, 2002 [36] ont étudié l'effet de 16 plantes dont *O.gratissimum* et *Azadirachta indica* sur le développement larvaire de *A. aegypti*. Le pourcentage de larves vivantes après 5 jours d'exposition à *O. gratissimum* et à *A. indica* s'est révélé significativement inférieur au pourcentage de larves vivantes du lot témoin. Par ailleurs, l'oviposition s'est révélée nettement diminuée après exposition à *A. indica*.

L'effet insecticide du basilic est du à l'Eugénol, un constituant majeur du basilic [25].

3-2-2 La Citronnelle (*Cymbopogon nardus*)



Photo 5 : *Cymbopogon sp*
(www.wikipedia.com)

La citronnelle est extraite du *Cymbopogon nardus*, une plante de la famille des Graminae. L'huile essentielle de Citronnelle est souvent confondue avec les huiles essentielles de Lemongrass, Citron, voire de Citron vert.

L'huile essentielle de citronnelle se compose principalement de citral, qui peut représenter 70 à 85% de son volume. Les autres 15 à 30% restants peuvent varier en fonction de la fraîcheur des feuilles utilisées lors de la distillation et de la variété employée

; cependant toutes les variétés contiennent du géraniol, farnesol, nérol, citronellol, myrcène, et aldéhydes.

Ausloos A. (2004) [2] a démontré un effet aduicticide d'*E. camaldulensis* sur les charançons.

Par application "contact" sur des termites, les solutions diluées de citronnelle sont plus efficaces que celles de lemongrass et d'*E. camaldulensis*. Ces résultats montrent donc que les huiles essentielles de lemongrass, de citronnelle et d'*E. camaldulensis* sont biologiquement actives contre les termites et les charançons par contact direct ou par vaporisation.

L'huile essentielle de *Cymbopogon citratus* montre des effets larvicide, ovicide et répulsif contre le moustique *Culex quinquefasciatus* [43].

3-2-3 L'Eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*)



Photo 6 : *Eucalyptus globulus*
(Source : www.wikipedia.com)

Il existe environ 300 variétés d'eucalyptus. La plante la plus communément distillée est l'eucalyptus commun, encore appelé gommier bleu (*Eucalyptus globulus*). On distille également une espèce moins connue, *Eucalyptus radiata*, qui détient un arôme plus agréable que celui de l'eucalyptus commun, et qui est plus facilement assimilée et moins irritante pour la peau.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* se compose essentiellement d'eucalyptol (environ 80%), mais se compose également d'alcool éthylique, d'alcool amylique, de divers aldéhydes, de camphène, d'eudesmol, de phellandrènes, de pinènes, d'aromadendrène. L'huile essentielle d'*Eucalyptus radiata* se compose d'environ 70% d'eucalyptol, il contient aussi du terpinéol, des alcools et des mono terpènes. Sa composition se rapproche de celle des melaleucas (cf Tea Tree : *Melaleuca alternifolia*)

L'activité toxique par fumigation de l'eucalyptus a été testée sur un insecte adulte parasite des champignons [54]. Dans cette étude, 43 autres huiles essentielles ont été testées (dont la citronnelle, la lavande, le tea tree, le neem et le géranium) mais c'est le Thym (*Thymus vulgaris*) puis l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) qui ont donné les résultats les plus intéressants.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis* Sm. (Myrtaceae) a montré des effets larvicide, pupicide et adulticide contre *Anopheles stephensi* [45], mais également de puissants effets répulsifs anti-moustiques [50].

3-2-4 Le Géranium (*Geranium rosat*)



Photo 7: *geranium rosat*
(source : www.wikipedia.com)

L'huile essentielle de Géranium se compose de 50% de germacrone, d'élémène et d'élémol. D'autres composantes rentrent dans sa composition, ce qui lui procure un arôme complexe.

Le géranium présent à la Réunion est le *Pelargonium rosat* ou *Pelargonium graveolens*.

Originaire d'Afrique, le géranium dit « Rosat » (*Pelargonium graveolens*) fut introduit vers 1870 à l'île de la Réunion. On le cultive aussi en Espagne, en Italie, au Maroc, en Egypte et aussi en Chine qui est actuellement le plus gros producteur d'huiles essentielles de géranium dans le monde.

C'est surtout dans les hauts de l'ouest, et plus précisément à la Petite France, que la culture du Géranium a pris une grande importance.

Il y a deux sortes de géraniums, ceux à grandes fleurs et ceux à feuillage odorant. Ce sont les richesses de ces derniers qui servent à la fabrication de l'essence de géranium. Leurs feuilles sont couvertes de milliers de poils minuscules, reliés à des glandes, qui lorsqu'on les froisse, ou sous l'action de la chaleur, libèrent des huiles aromatiques. C'est cette caractéristique qui leur a valu le nom de pélargoniums odorants.

Jeyabalan et al (2003) [26] ont étudié l'effet d'extraits de feuilles de *Pelargonium citrosa* sur *Anopheles stephensi*. Les durées des différents stades larvaires et du développement global des larves sont augmentées. Ces différences sont notées pour toutes les concentrations testées. Des malformations apparaissent, et la pupaison est incomplète dans beaucoup de cas.

Toutes les concentrations en *P.citrosa* ont permis la mise en évidence d'une activité repellent sur l'adulte de *A. stephensi*. Aux concentrations les plus élevées, on notait une faiblesse des adultes et des mouvements ralentis. Ces mêmes effets étaient également retrouvés sur les larves. Ces résultats suggéraient qu'à partir d'une certaine concentration, les repellents avaient des effets insecticides.

Enfin, cette étude montrait une diminution du nombre de piqûre sous l'effet de l'huile essentielle.

3-2-5 La Lavande (*Lavandula officinalis*)



Photo 8: *lavandula officinalis*
(source : www.wikipedia.com)

L'huile essentielle de lavande est extraite de *Lavandula angustifolia* (ou *L.officinalis*), plante de la famille des Lamiaceae.

Chu C.J. et Kemper K.J. 2001 [11] ont mis en évidence un effet insecticide de 2 espèces de lavande sur *Drosophila auroria*. L'auteur rapporte que de nombreuses études (in

vitro, sur animaux de laboratoire, sur humains) ont montré d'excellents résultats sur les poux, les puces...

Burfield AP. & Reekie S-L. (2005) [7] ont étudié l'activité insecticide de nombreuses huiles essentielles contre le vecteur du paludisme et font de nombreuses observations sur la lavande. La *Lavandula lanata* a été utilisée de tous temps comme produit répulsif contre les insectes.

3-2-6 Le Moringa (*Moringa oleifera*)



Photo 9: *Moringa oleifera*
(source : www.wikipedia.com)

Une étude dans 6 départements du Guatemala a révélé que le *Moringa oleifera* y est connue sous 18 noms différents et est utilisée dans de nombreux domaines : alimentation, fourrage pour bétail, bois de construction, savon, ornement, répulsif contre les insectes, purification de l'eau, thérapeutique (pathologies cutanées, digestives, respiratoires, articulaires...) [8].

Chuang PH. et al (2006) [12] ont également étudié l'activité antimycosique des extraits de cette plante sur différentes espèces : *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* et *Microsporum canis*. L'analyse chimique de la composition de l'huile extraite des feuilles a révélé la présence de 44 composants différents.

L'huile de Moringa n'est pas une huile essentielle. Il s'agit d'une huile végétale, obtenue par pression.

3-2-7 Le Neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (Méliacées))



Photos 10,11 : Neem (source : www.afrik.com (photo1) et www.fao.com(photo2))

Présent dans de nombreux pays subsahariens, le neem est un arbre aux mille vertus. Ses feuilles servent de médicaments pour soigner le paludisme dans la pharmacopée traditionnelle, ses fruits, dont est extraite l'huile, contiennent un parfait insecticide naturel, inoffensif pour l'homme

et les animaux.

Sur le plan de la recherche en laboratoire, il est l'objet d'études approfondies, pour mieux percer ses autres mystères, notamment au sein de l'université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal), avec le chercheur spécialiste du groupe Neem, le docteur entomologiste Lassana Konaté.

L'huile de neem, comme celle de moringa, n'est pas une huile essentielle, mais une huile végétale. Elle est obtenue par pression à froid des graines. Elle se compose principalement d'acides gras (mono-insaturés et poly-insaturés).

L'huile de neem est un produit naturel dont les extraits ont une action extrêmement toxique pour les insectes, mais reste inoffensive pour les animaux à sang chaud. Les substances actives, qui éliminent radicalement les larves de moustiques, se dégradent par ailleurs rapidement sous l'action des rayons du soleil. Utilisée en pulvérisation, l'huile est obtenue à partir du fruit de l'arbre (30 kg de fruits pour 3,75 litres d'huile).

En France, on l'appelle le « Margousier vierge » ; il est « l'arbre qui guérit tout ». Ses principaux constituants sont : les acides oléique, stéarique, palmitique, linoléique, et myristique (source de l'azadirachtine végétale)

Il est maintenant admis que la bioactivité du neem est due à l'azadirachtine (complexe limenoïdes) [37]. Cependant, cette molécule n'est pas la seule responsable de l'effet insecticide des extraits de plante : Gauvin M.J. et al, 2003 [21] n'ont trouvé aucune relation

entre la quantité d'azadirachtine et le pouvoir insecticide des extraits de neem testés. Ces résultats soulignent l'importance d'évaluer l'effet total insecticide des extraits de neem et non pas uniquement leur concentration en azadirachtine.

Cette molécule ou des extraits contenant cette molécule ont montré un effet négatif notable sur un nombre important d'insectes et d'acariens. Les études sur les effets insecticides de cette plante sont nombreuses.

Elle est retrouvée en majorité dans plusieurs plantes :

- le « syringa tree », ou *Melia azedarach* ;
- le « neem tree » ou *Azadirachta indica* A. Juss ;
- le Margousier du Vietnam ou *Azadirachta integrifolia*
- *Azadirachta excelsa* (Jack)
- *Azadirachta siamensis* Valetton

Ces plantes appartiennent toutes à la famille des Meliaceae.

Outre l'azadirachtine, il existe d'autres agents actifs dans le Neem : le nimbin et le salannin. Plusieurs études scientifiques ont prouvé que l'azadirachtine, présente dans le Neem, agit très efficacement en attaquant l'hormone de croissance spécifique des insectes. La croissance normale des insectes est freinée et les capacités de reproduction sont interrompues. L'azadirachtine entraîne aussi des déformations de l'appareil moteur des insectes. De plus, les agents Nimbin et Salannin ont une action très efficace sur l'inhibition de l'appareil digestif des insectes. On constate une très importante diminution des capacités digestives des insectes grâce à ces agents. Ces agents ont aussi une action répulsive.

L'azadirachtine a démontré un effet notable sur la métamorphose des insectes et sur la viabilité des adultes.

L'étude de Nathan Kalaivani et al, 2005 [37] a également montré une forte activité larvicide, pupicide et adulticide de l'azadirachtine sur *A. stephensi*, vecteur du paludisme. Les larves montraient des paralysies importantes ou des malformations et les durées de chaque stade larvaire ont été très augmentées. Enfin on a noté des perturbations importantes de l'oviposition. Les mêmes résultats ont été obtenus par Seljasen R. et Meadow R. (2006) [44] sur le parasite du chou *Mamestra brassicae*. L'éclosion des œufs n'est pas affectée, mais les larves ne survivent pas, et n'atteignent pas le second stade larvaire.

Aedes aegypti, vecteur du virus de la dengue, s'est montré sensible à *M. azedarach* et *A. indica* [53].

L'azadirachtine a été testée sur un acarien, le pou rouge des volailles *Dermanyssus gallinae* à différentes concentrations. En moyenne, le traitement a réduit le nombre d'acarien de 92% [30].

Par ailleurs, Nathan, Kalaivani et al (2006) [38] ont testé plusieurs limenoïdes du neem (dont l'azadirachtine) sur un insecte parasite du riz. Les paramètres biologiques comme la durée des stades larvaires et pupal, la longévité des adultes, leur fécondité, sont affectés. Si plusieurs limenoïdes sont efficaces, c'est l'azadirachtine qui a montré les effets les plus puissants.

D'une manière générale, on voit que le neem (en particulier l'azadirachtine) possède de nombreux effets sur les insectes : modification du comportement alimentaire (piqûre), inhibition de croissance, diminution de la fécondité et stérilisation, répulsivité, troubles de l'oviposition, troubles dans les comportements biologiques. Les auteurs parlent également de troubles du développement de certains agents pathogènes transmis par des vecteurs, (thème qui est repris par Yanes et al, 2004 [55] : le neem aurait des effets sur *T. cruzi*)

Quelques unes de ces activités ont été étudiées chez de nombreuses espèces d'insectes d'intérêt humain ou vétérinaire : moustiques, mouches, triatomes, puces, poux, blattes... [33].

Le neem a également été étudié sur d'autres espèces d'importance : les lymnées [46], les lépidoptères, les hémiptères, les tiques du genre *Hyalomma* [1], etc..

3-2-8 Le Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*)



Photo 12: *Melaleuca alternifolia*
(source :www.okara.it)

Melaleuca alternifolia appartient à la famille des Myrtaceae, originaire d'Australie. On appelle Tea Tree l'huile essentielle extraite des plantes du même genre.

Ces huiles sont connues pour avoir de nombreuses propriétés thérapeutiques. Des études ont déjà été faites sur

leur effet acaricide et insecticide :

Walton et al (2000) [52] ont démontré une efficacité certaine de l'huile essentielle de Tea Tree sur les ectoparasites humains que sont les *sarcoptes scabiei hominis*, agents de gale.

Iori et al, (2005) [24] ont étudié l'effet acaricide de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) sur les nymphes d'*Ixodes ricinus*. Des résultats intéressants ont été obtenus après une exposition supérieure à 90 minutes.

3-2-9 Le Manuka, la Tagetes et le Pyrèthre.

La Manuka (*Leptospermum scoparium*)



Photo 13: Manuka
(source : www.agresponse.com)

L'huile essentielle de manuka a pour origine la Nouvelle-Zélande, elle s'est ajoutée que très récemment au répertoire de l'aromathérapie européenne. Les Maoris l'emploient depuis des temps immémoriaux pour soigner les bronchites et les rhumatismes. L'on surnomme parfois le manuka comme étant le tea-tree de Nouvelle-Zélande ; bien que le tea-tree fasse partie de la famille des Myrtaceae, genre

Melaleuca, tout comme le clou de girofle, le myrte et les leptospermums, le manuka en est assez éloigné d'un point de vue taxonomique. Cependant l'huile essentielle de manuka recoupe bon nombre de propriétés présentes dans le tea-tree et même quelques propriétés supplémentaires.

Parmi ses principaux composants, on trouve : le caryophyllène, le géraniol, le pinène, le linalol, l'humulène, et le leptospermone qui est un élément très peu habituel et très insecticide (répulsif).

La *Tagetes patula* (ou « Œillet de l'Inde »)



Photo 14 : *Tagetes patula*
(source : www.mobot.org)

Originaires des Amériques, les *Tagetes* (famille des Asteraceae) sont des plantes aromatiques et nématicides qui sécrètent des substances nocives pour les insectes et nématodes contenus dans le sol. La plus efficace serait *Tagetes patula*. En Amérique du Sud, cette plante serait utilisée de façon ancestrale comme anti-moustique.

Le Pyrèthre (*Chrysanthemum cinerariaefolium*)



Photo 15 : *Chrysanthemum cinerariaefolium*
(source : www.agrofarm.co.uk)

Le pyrèthre, cousin de la marguerite renferme des pyrèthrines qui paralysent rapidement tous les insectes. Leur action s'exerce essentiellement par contact, d'où la vulnérabilité particulière des larves et insectes à cuticule molle. Le pyrèthre peut être facilement cultivé dans nos jardins.

IV- Etude préalable

Une étude préalable a été réalisée en 2006 au GRDSBR par Raquel CENICEROS, responsable du laboratoire d'élevage de *S. calcitrans* et de *S. nigroanea*.

Le protocole de cette expérimentation a été repris dans celles de mon stage, sauf en ce qui concerne le nombre d'œufs disposés par gamate : 500 œufs étaient comptés pour chaque huile essentielle.

	Stabilisant (0,5%)	Citronnelle (2%)	Géranium (2%)	Hydrolat de Géranium (2%)
Témoin	203	173	238	152
Test 1	315	136	0	32
Test 2	376	66	1	37
Test 3	348	153	2	31

Tableau 2 : Nombre de stomoxes adultes ayant émergé (500 œufs)

L'effet « jour » n'a pas été pris en compte dans l'étude préalable. En effet, les répétitions de chaque huile essentielle ont été réalisées le même jour.

Les concentrations testées sont très différentes des nôtres, nous ne pouvons pas faire de comparaison entre les 2 études. Le résultat qui nous est utile est celui du stabilisant. Nous utilisons donc cette étude pour répondre à la question de l'effet larvicide potentiel du stabilisant, qui est inexistant, ce qui nous permet de l'utiliser dans nos expérimentations.

V- Expérimentation 1: Détermination de l'effet larvicide de 8 huiles.

5-1 Protocole de la 1^{ère} expérimentation.

La première expérimentation consistait comme nous l'avons dit, à tester les 8 huiles à une concentration propre à chacune.

Nous nous sommes basés sur le prix du Neporex ND, produit utilisé de manière générale comme larvicide par les éleveurs. Nous voulions évaluer l'effet larvicide des huiles lorsque son utilisation est réalisable sur le terrain par l'éleveur.

Pour chaque huile, nous avons donc calculé la concentration pour laquelle son utilisation reviendrait au même prix que l'utilisation du Neporex ND. Le tableau suivant expose ces concentrations.

Exemple :

Au GRDSBR, le prix du Neporex est de 3€/10 L (m²)

A la CAHEB, le prix du Flacon d'huile essentielle de Basilic est le suivant :

45€ TTC → 250 mL

3 € → 17 mL (/ 10L) soit 0,17 %

	Prix HT	Prix (8,4%)	TTC	Volume pour 10L ou 10m ²	Volume (/350mL)	Volume de stabilisant
				Concentration		
Neporex	60€ /5kg	61,1€/5kg		250g soit 3€ soit		
				2,5 %		
Basilic	41,3€/250ml	44,81€/250ml		16,74 mL =	0,6 mL	0,3 mL
				0,17%		
Citronnelle	16,54 €	17,95 €		41,78 mL =	1,5 mL	0,8 mL
				0,42%		
Eucalyptus	19,24 €	20,88 €		35,92 mL =	1,3 mL	0,7 mL
				0,36%		
Géranium	50,69 €	55 €		13,63 mL =	0,5 mL	0,3 mL
				0,14%		
Lavande	83,38 €	90,47 €		8,29 mL =	0,3 mL	0,2 mL
				0,083%		
Moringa	24,25 €	26,28 €		28,54 mL =	1 mL	0,5 mL
				0,29%		
Neem	18,39 €	19,93 €		37,63 mL =	1,3 mL	0,7 mL
				0,38%		
Tea Tree	19,01 €	20,63€		36,35 mL =	1,3 mL	0,7 mL
				0,36%		

Tableau 3 : Protocole de la 1^{ère} expérimentation.

5-2 Résultats de la 1^{ère} expérimentation.

Le tableau suivant donne le nombre de mouches ayant émergé, sur 6 répétitions.

Huiles	Série 1-1	Série 1-2	Série 1-3	Série 1-4	Série 1-5	Série 1-6
Témoin	55	63	69	64	75	65
Basilic	14	0	16	9	3	5
Citronnelle	7	27	48	46	23	15
Eucalyptus	31	52	53	42	32	41
Géranium	14	46	51	39	50	43
Lavande	38	58	62	75	79	60
Moringa	NA	48	63	37	76	36
Neem	NA	33	45	31	19	42
Tea Tree	25	31	1	15	33	2

Tableau 4 : Nombre de mouches ayant émergé. 1^{ème} expérimentation.

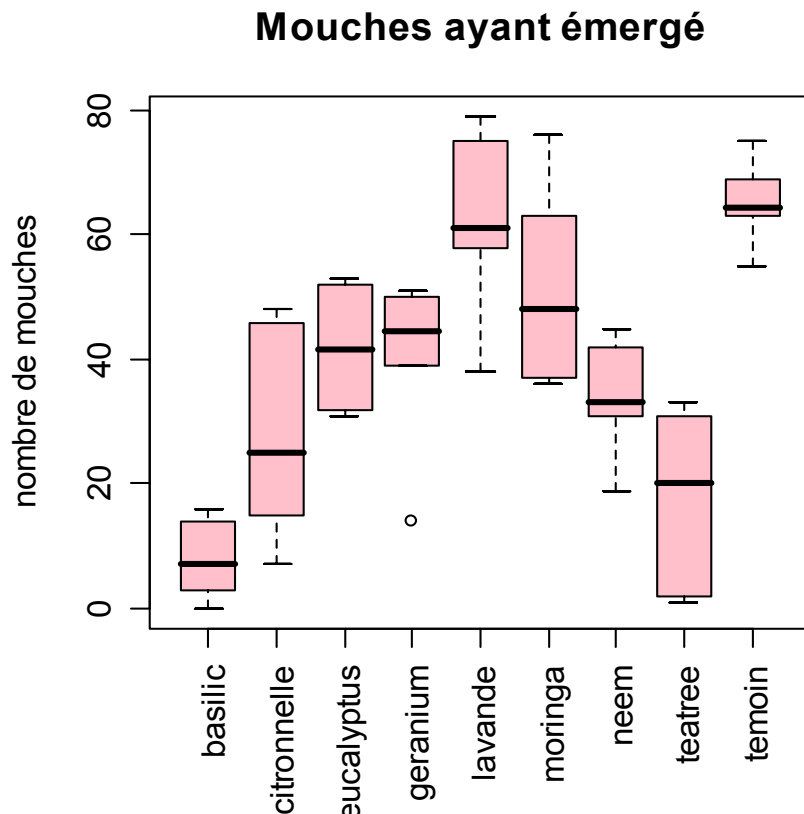


Figure 1 : Nombre de stomoxes ayant émergé pour chaque huile.

- Y a-t-il une répétition aberrante qu'il faudrait éliminer de l'analyse ?

On réalise un modèle linéaire sur la base des répétitions (et non plus sur la base des huiles). On obtient une p-value non significatif ($p = 0.5843$) ce qui nous permet de dire que les répétitions ne présentent pas de différence significative et qu'on a le droit de les prendre toutes en compte.

- Y a-t-il un effet significatif de l'utilisation des huiles en général sur le développement des mouches ?

On utilise un modèle linéaire pour comparer les résultats entre les huiles et le témoin. L'analyse de variance du facteur « nombre de vivants » en fonction du facteur « huile » donne une **différence globale huile/témoin très significative** ($p = 1.073e-09$).

- Quelles sont les huiles qui donnent des résultats significativement différents du témoin ?

Il faut donc comparer chaque huile avec le témoin. On obtient les résultats montrés dans le tableau 5. Les huiles de **basilic**, **citronnelle**, **neem** et **tea tree** donnent des différences très significatives. Le géranium et l'eucalyptus donnent une différence significative (p proche de 0,001 et 0,002). La lavande et le Moringa (et en particulier la lavande) ne montrent aucune différence avec le témoin (cf tableau 5)

Huile	p-value
Basilic	7.01e-10
Citronnelle	6.10e-06
Eucalyptus	0.002532
Géranium	0.001506
Lavande	0.665553
Moringa	0.091613
Neem	0.000189
Tea Tree	6.71e-08

Tableau 5 : Résultats statistiques expérimentation 1.

Classement des huiles en groupes :

Il peut être intéressant de comparer les huiles 2 à 2 et les classer par groupes. Pour cela, on réalise une comparaison multiple avec le test de **TukeyHSD (Honest Significant Differences)**.

R donne la p-value pour chaque comparaison. En utilisant la fonction SI dans Excel, on peut classer les huiles dans 2 groupes a et b d'efficacité :

Le basilic montre une différence significative avec le moringa, donc on place le basilic dans le groupe a et le moringa dans le groupe b. La citronnelle ne montre pas de différence significative avec le basilic, elle appartient donc au groupe a. Cependant elle ne montre pas non plus de différence significative avec le Moringa donc elle appartient également au groupe b.

En procédant de la même manière pour toutes les huiles, on obtient les groupes suivants :

Groupe	a	ab	b
Huiles	Basilic Tea Tree	Citronnelle Géranium Neem	Lavande Moringa Eucalyptus (Témoin)

Tableau 6 : Classement des huiles.

Pourcentages d'efficacité :

Le tableau 7 présente les pourcentages d'efficacité larvicide. L'efficacité des huiles testées est calculée à partir des moyennes de mouches émergées (nbv). Cette formule prend en compte les non-émergences qui ne sont pas dues aux huiles (et qui sont représentées par le témoin). (HE = huile)

$$\% \text{ efficacité} = (\text{nbv témoin} - \text{nbv HE}) \times 100 / \text{nbv témoin}$$

Huile	% Efficacité
Basilic	88 %
Tea Tree	73 %
Citronnelle	58 %
Neem	48 %
Géranium	38 %
Eucalyptus	36 %
Moringa	20 %
Lavande	5 %

Tableau 7 : Pourcentages d'efficacité des huiles testées (pour concentration donnée dans tableau 3)

5-3 Discussion

Un effet larvicide sur moustique différent de l'effet larvicide sur mouche.

La biologie des mouches et la biologie des moustiques étant très différentes, il est difficile d'extrapoler entre les 2 types d'insectes. Les recherches bibliographiques montraient des effets spectaculaires du neem sur les larves de moustiques mais peu de données en revanche traitaient des larves de mouches. Or nos résultats ne montrent pas une activité très importante du neem sur les larves de mouches.

Les produits efficaces contre les moustiques peuvent être (et sont souvent) inefficaces contre les mouches, et vice versa. Le Neporex par exemple, a été développé pour lutter contre les mouches. Le producteur spécifie dans la notice l'utilisation spécifique du produit contre ce type d'insecte.

Les produits à effet larvicide sont efficaces selon diverses méthodes : Ils peuvent inonder le système trachéal de la larve, ou perturber sa flottabilité et donc empêcher la larve de rester en surface (et donc de respirer). Ils peuvent également agir par toxicité.



Photo : larve de moustique
(www.eid-med.org)

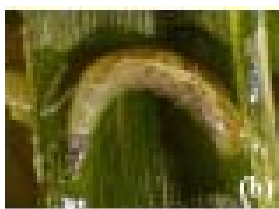


Photo : larve de *S. calcitrans*
(Gillse, 2005)

L'efficacité des huiles essentielles comme traitement larvicide est directement liée au cycle biologique de l'insecte.

La larve de moustique se développe dans l'eau tandis que la larve de mouche se développe dans un milieu bien particulier (cf Chapitre 1-3). Cette simple caractéristique peut rendre une huile inefficace contre les larves de mouches.

On pourrait donc penser que l'huile de Neem est surtout efficace sur les larves de moustiques de par son caractère huileux qui noie les larves.

Cependant, la littérature a montré un effet insecticide vrai : inhibition de l'hormone de croissance, déformation du

squelette de l'insecte, etc. (cf. 3-2-7).

Cet effet insecticide peut exister pour les mouches, et être à l'origine du pourcentage d'efficacité non négligeable que notre étude a mis en évidence pour le neem. Cependant, notre étude n'a pas révélé une efficacité semblable à celle sur les moustiques, et cette différence peut être rattachée à la létalité de toute huile sur les larves de moustiques.

Efficacité des huiles en tant que larvicide.

Les huiles dont on pouvait attendre à priori les meilleurs résultats ne sont pas celles qui montrent la plus grande efficacité dans notre étude. Le Neem bénéficie de multitudes d'études alors que la littérature ne parle pas spécialement d'un effet larvicide important du Tea tree. Par ailleurs, l'effet larvicide d'un produit n'est en rien comparable à l'effet répulsif. Les deux mécanismes sont très différents, et un produit peut être bon répulsif (comme la citronnelle ou le géranium) et mauvais larvicide.

Inversement, le basilic était connu pour avoir des propriétés répulsives et son activité larvicide se révèle intéressante.

Un répulsif agit sur l'adulte grâce à une molécule (ou un complexe de molécules) qui déplaît à l'adulte et induit son éloignement.

Un larvicide agit sur la larve grâce à une molécule (ou un complexe de molécule) qui induit un mauvais développement larvaire (malformations, mort larvaire, augmentation de la durée de stades larvaires).

Un produit comme le basilic peut contenir deux molécules, l'une répulsive et l'autre larvicide ou bien contenir une seule molécule (ou complexe de molécules) pouvant induire les deux phénomènes.

Dans notre étude, l'efficacité d'une huile en tant que larvicide se base sur le nombre de mouches ayant émergé. Les huiles pourraient avoir comme effet des malformations au niveau de la mouche adulte, qui pourraient affecter considérablement sa vie. Nous n'en tenons pas compte dans cette étude.

Innocuité des Huiles essentielles.

Le problème du passage des huiles essentielles dans le lait doit être évoqué. Cependant, au vu des faibles concentrations en huiles essentielles, et au vu de l'utilisation finale (dispersion sur la litière), on peut supposer que le risque d'ingestion puis de passage dans le lait est faible, voire nul.

VI- Expérimentation 2: Comparaison de 2 concentrations différentes pour les 4 huiles les plus efficaces

6-1 Protocole de la 2^{ème} expérimentation.

En nous basant sur les résultats de la première expérimentation, nous décidons que la 2^{ème} expérimentation comprendra les huiles suivantes : le **basilic, le tea tree, la citronnelle et le neem**. En effet, ces 4 huiles présentaient des différences très significatives avec le témoin (voir annexe 4).

Le choix des concentrations à tester s'est fait selon plusieurs critères : Une concentration équivalente et une supérieure à celle déjà testée ont été choisies. Le critère de prix nous a incités à ne pas tester une concentration deux fois plus élevée que la première qui ne serait pas utilisée de toute manière par la suite. Par commodité pratique, un chiffre rond a été choisi pour la concentration 1.

	Concentration de 1 ^{ère} expérimentation (%)	Concentration 1 de 2 ^{ème} expérimentation (%)	Concentration 2 de 2 ^{ème} expérimentation (%)
Basilic	0,17	0,15	0,25
Citronnelle	0,42	0,35	0,45
Eucalyptus	0,36	/	/
Géranium	0,14	/	/
Lavande	0,08	/	/
Moringa	0,29	/	/
Neem	0,38	0,35	0,45
Tea Tree	0,36	0,35	0,45

Tableau 8: Différentes concentrations testées

Le but de cette expérimentation était de mettre en évidence un effet dose, une différence d'efficacité entre 2 concentrations. Pour ce faire, une analyse de variance est réalisée huile par huile.

6-2 Résultats de la 2ème expérimentation.

Huile Essentielle	Série 2-1	Série 2-2	Série 2-3	Série 2-4	Série 2-5	p-value
Témoin	57	78	50	75	71	/
Basilic 0,15 %	0	23	12	14	26	0,0164
0,25 %	0	3	2	0	0	
Citronnelle 0,35 %	1	49	42	31	52	0,348
0,45 %	3	41	32	24	19	
Neem 0,35 %	34	63	46	58	71	0,510
0,45 %	24	55	58	50	54	
Tea Tree 0,35 %	13	37	16	5	46	0,193
0,45 %	5	23	9	3	16	

Tableau 9 : expérimentation 2 : nombre de mouches ayant émergé après le dépôt de 100 œufs de *S. calcitrans*.

Pour déceler une différence entre les 2 concentrations, on réalise le même test que précédemment : une analyse de variance sur un modèle linéaire dans R.

Les p-value sont reportées dans le tableau 9. Les 2 concentrations de basilic donnent des résultats significativement différents. Les autres huiles ne montrent pas de différence entre les 2 concentrations testées.

On peut également observer ces résultats sous forme de box plot.

Huile Essentielle	% Efficacité
Basilic 1	77 %
Basilic 2	98 %
Citronnelle 1	46 %
Citronnelle 2	63 %
Neem 1	17 %
Neem 2	26 %
Tea Tree 1	64 %
Tea Tree 2	83 %

Tableau 10: Pourcentages d'efficacité des huiles testées (pour les concentrations données)

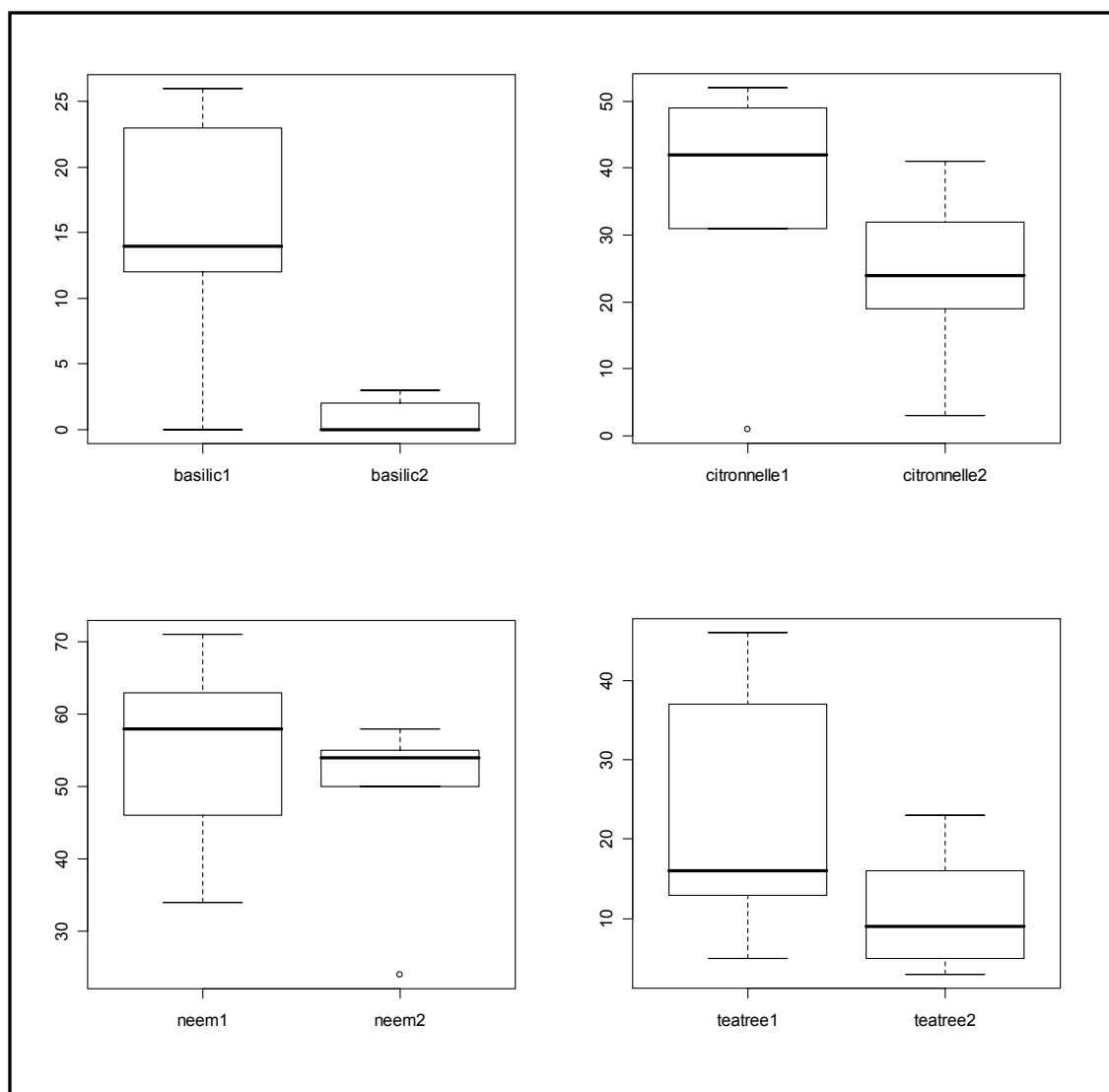


Tableau 10: Pourcentages d'efficacité des huiles testées (pour les concentrations données)

6-3 Discussion

Effet -dose

La 2^{ème} expérimentation a mis en évidence une différence d'efficacité du basilic selon sa concentration. Pour les 3 autres huiles testées, les 2 concentrations n'ont pas montré de différence significative d'efficacité. Toutefois, le pourcentage d'efficacité est toujours plus important à la plus forte concentration.

Cette différence significative nous permet d'orienter les conseils aux éleveurs quant à la concentration à utiliser pour une efficacité optimale couplée à un coût moindre.



De plus, il est très intéressant de démontrer un effet-dose pour un produit. En effet, si on peut mettre en évidence une relation entre la quantité d'exposition à un produit et des changements conséquents sur une fonction, on caractérise déjà mieux l'efficacité du produit.

VII- Expérimentation 3: Comparaison entre le mélange des huiles et leur pulvérisation au stade L2.

7-1 Protocole de la 3^{ème} expérimentation :

Pour la 3^{ème} expérimentation, les 2 concentrations précédentes de Basilic ont été choisies car elles montraient des résultats significativement différents entre elles, et parce que leurs pourcentages d'efficacité étaient les plus élevés. Ainsi, ces 2 concentrations pourront être proposées aux éleveurs : un traitement très efficace mais plus cher, ou bien un traitement un peu moins efficace (mais dont l'efficacité reste toutefois très intéressante) à un coût semblable au traitement Neporex.

Le Neem est retiré de l'étude car suite à cette 2^{ème} expérimentation, son efficacité en tant que larvicide utilisable par les éleveurs n'a pas été confirmée.

Les huiles retenues sont donc : le Basilic (0,15% et 0,25%), la Citronnelle (0,35%) et le Tea Tree (0,35%)

Les œufs sont déposés dans le milieu comme pour les 2 expérimentations précédentes. On ne mélange pas les huiles en même temps que les œufs, mais 4 jours après, lorsque les mouches sont au stade L2. Pour éviter une dessiccation du milieu et des œufs, nous rajoutons au milieu initial 100 mL d'eau. Les 250 mL d'eau restants sont rajoutés 4 jours après, avec les huiles. La concentration en huile est donc calculée non pas par rapport à 350 mL mais par rapport à 250 mL.

La pulvérisation se fait au stade L2. Les stades œuf et L1 sont des stades minuscules, fragiles, et peu mobiles. Lorsqu'on les dépose sur le milieu de développement, ils sont tous rassemblés en un même endroit, ce qui est très éloigné des conditions de terrain. Les L2 sont plus mobiles et sont généralement dispersées dans le milieu.

Par ailleurs, dans les conditions réelles, il y a dans le milieu de développement des œufs, et des larves de tout stade. Il nous a semblé important d'étudier l'effet des huiles sur des larves dont le stade œuf n'avait pas été en contact avec l'huile.

Nous avons voulu nous rapprocher le plus possible des conditions de terrain dans cette 3^{ème} expérimentation.

7-2 Résultats de la 3^{ème} expérimentation.

Trois répétitions sont faites le jour 1 et deux répétitions sont faites le jour 2. Un témoin est réalisé par jour.

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
Basilic 1	5	8	3	12	10
Basilic 2	0	1	2	4	2
Citronnelle	21	17	15	10	19
Tea Tree	7	16	5	9	11
Témoin	59	63	66	65	69

Tableau 11 : Nombre de mouches ayant émergé après dépôt de 100 œufs par répétition.

La comparaison statistique se fait avec les résultats de l'expérimentation 2 qui portaient sur les mêmes concentrations : Comparaison entre l'effet mélange et l'effet pulvérisation au stade L2.

Pour pouvoir comparer ces 2 séries de résultats, il nous faut être sûrs qu'il n'y a aucune donnée aberrante. Pour cela, nous comparons en premier lieu les résultats du témoin.

L'analyse de variance par modèle linéaire ne montre aucune différence entre les résultats des témoins des expérimentations 2 et 3 ($p\text{-value} = 0,759$) (de même, elle ne montre aucune différence entre les témoins de toutes les répétitions de toutes les expérimentations).

huile	p-value
Basilic 1	0,167
Basilic 2	0,408
Citronnelle	0,084
Tea Tree	0,121

Tableau 12 : $p\text{-value}$ représentant la comparaison entre l'effet mélange (exp 2) et l'effet pulvérisation (exp3)

L'analyse statistique ne montre aucune différence, quelle que soit l'huile essentielle testée, entre le mélange des huiles dans le milieu de développement et sa pulvérisation au stade L2.

7-3 Discussion

Effet rémanent des huiles essentielles.

Nous avons testé l'efficacité des huiles essentielles sur une génération de mouches.

Notamment en ce qui concerne la pulvérisation, il est permis de penser que les œufs qui seront déposés postérieurement à la pulvérisation auront plus de probabilité de rentrer en contact avec les huiles que les larves qui sont déjà enfouies.

Les huiles essentielles ont la réputation d'avoir un pouvoir protecteur éphémère. Ngamo Tinkeu LS et al, 2004 [48], ont évalué la durée de cette activité sur 5 plantes aromatiques : *A. senegalensis*, *E. citriodora*, *E. saligna*, *L. rugosa* et *O. gratissimum*. Ces plantes ont montré une activité insecticide sur *S. zeamais* le premier jour d'application, mais cette activité décroissait significativement au bout de 2 à 4 jours, pour atteindre 50% au 8^{ème} jour.

Selon Seljasen R. et Meadow R., (2006) [44], la solution à l'azadirachtine protège les plants de chou contre le parasite *Mamestra brassicae* pendant au moins 3 semaines si la solution est appliquée avant l'oviposition, ou au moins 2 semaines si l'application a lieu au 2^{ème} stage larvaire.

Pulvérisation des huiles essentielles.

Nous avons vu que l'oviposition se faisait en profondeur dans le milieu de ponte, là où l'humidité est favorable à la survie de l'œuf et au développement larvaire.

Le fait de pulvériser les huiles sur le milieu n'est pas favorable au contact entre les œufs et larves, et les huiles essentielles.

Nous n'avons aucune donnée sur l'infiltration potentielle des huiles dans les profondeurs du milieu.

VIII- Expérimentation 4: Comparaison de l'efficacité des 8 huiles à concentration égale.

8-1 Protocole de la 4^{ème} expérimentation :

Cette expérimentation a été mise en place pour mieux connaître les huiles et leur pouvoir larvicide indépendamment de leur prix. Le protocole est le même que pour la 1^{ère} expérimentation à la différence près que toutes les huiles sont testées à la même concentration.

La concentration de 0,5% a été choisie pour permettre une bonne visualisation de l'efficacité pour toutes les huiles soit un volume de 1,75 mL d'huile pour 350 mL de solution.

8-2 Résultats et discussion de la 4^{ème} expérimentation :

	Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 4	Rep 5
Basilic	0	0	0	0	0
Citronnelle	19	5	12	9	14
Eucalyptus	38	5	10	32	26
Géranium	22	9	7	9	16
Lavande	40	13	41	33	39
Moringa	41	20	48	43	47
Neem	21	2	34	39	37
Tea Tree	16	3	0	0	5
Témoin	60	17	64	72	69

Tableau 13: Nombre de mouches ayant émergé pour chaque huile, au cours des 5 répétitions.

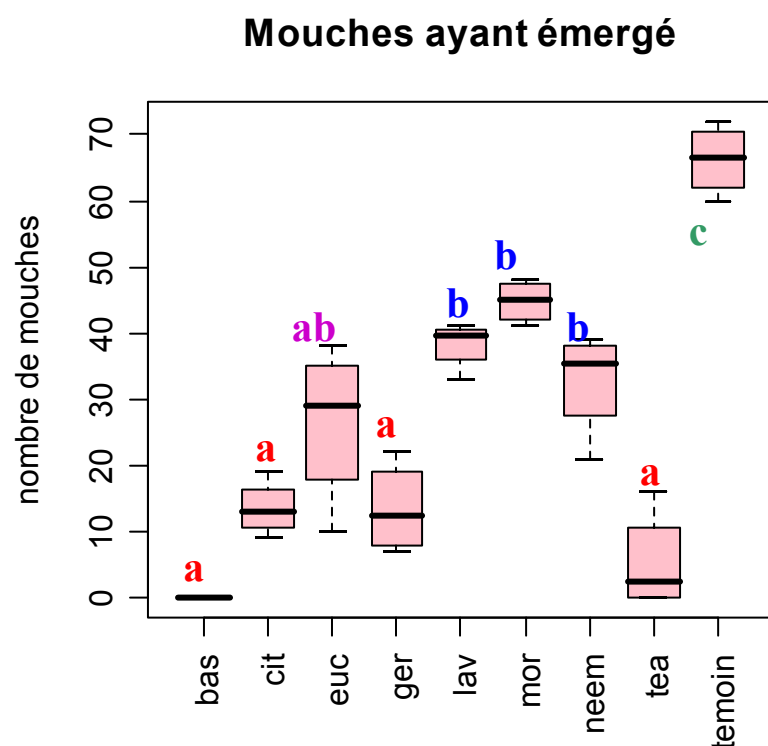
Pour interpréter ces résultats, on suit le même schéma que pour la première expérimentation : il faut d'abord savoir si ces répétitions sont comparables. La répétition 2 semble aberrante et l'inclure dans les analyses statistiques pourrait induire un biais.

L'analyse de la variance par modèle linéaire montre effectivement une différence ($p=0,035$) entre la répétition 2 et les autres répétitions.

Cette répétition est éliminée des données pour la suite de l'analyse statistique.

Ensuite il faut voir s'il y a une différence significative entre le témoin et les huiles essentielles en général. Cette différence existe : $p = 4.823e-14$.

Pour savoir maintenant quelles sont les huiles qui donnent des résultats significativement différents du témoin, il faut comparer chaque huile avec le témoin.



Résultats Excel	p-value
Basilic	3.42e-15
Citronnelle	3.13e-12
Eucalyptus	1.64e-09
Géranium	3.13e-12
Lavande	1.16e-06
Moringa	5.66e-05
Neem	4.85e-08
Tea Tree	9.74e-14

Tableau 14 : p-value de la comparaison de chaque huile avec le témoin.

Classement des huiles essentielles en groupes :

On utilise le même schéma de classement et on obtient les groupes suivants :

a	ab	b	c
Basilic	Eucalyptus	Lavande	Témoin
Citronnelle		Moringa	
Géranium		Neem	
Tea Tree			

Tableau 15 : Classement des huiles essentielles en groupe.

Les pourcentages d'efficacité pour une concentration de 0,5 % :

La même formule est utilisée que pour l'expérimentation 1.

Huile Essentielle	% Efficacité
Basilic	100 %
Tea Tree	91 %
Citronnelle	79 %
Géranium	78 %
Eucalyptus	61 %
Neem	53 %
Lavande	41 %
Moringa	29 %

Tableau 16 : Pourcentage d'efficacité

Discussion

A concentration constante, il est plus aisé de comparer les huiles essentielles pour leur effet larvicide intrinsèque.

Nous remarquons que toutes les huiles essentielles, à cette concentration, possèdent un effet larvicide significatif.

Les différents groupes constitués lors de l'expérimentation 1 se retrouvent à quelques différences près. Les pourcentages d'efficacité sont augmentés.

Les huiles essentielles et végétales que nous avons testées sont donc toutes larvicides, avec un effet concentration-dépendant.

Nous pouvons penser qu'il existe, dans toutes les huiles essentielles, une molécule ou une caractéristique physique commune, qui a un effet larvicide sur les mouches stomoxes.

Conclusion

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticide est connue depuis longtemps.

La biologie des mouches et la biologie des moustiques étant très différentes, il est difficile d'extrapoler entre les 2 types d'insectes. Nos résultats le prouvent. Les huiles dont on pouvait attendre les meilleurs résultats ne sont pas celles qui montrent la plus grande efficacité dans notre étude. Par ailleurs, l'effet larvicide d'un produit n'est en rien comparable à l'effet répulsif. Les huiles essentielles ont la réputation d'avoir un pouvoir protecteur éphémère, mais à une concentration relativement élevée, nos résultats montrent que toutes les huiles essentielles testées possèdent un effet larvicide significatif. Celui-ci peut être dû à une molécule commune, ou à une caractéristique physique commune.

Cette étude a été réalisée dans le but de développer une stratégie nouvelle de lutte contre les stomoxes à la Réunion.

Cette étude en laboratoire a certes montré une activité larvicide intéressante pour certaines huiles essentielles, un essai « terrain » semble nécessaire pour étudier cette même efficacité dans des conditions naturelles.

AGREMENT ADMINISTRATIF

Je soussigné, A. MILON, Directeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, certifie que

Mlle Fanny, Louise BASTIEN

a été admis(e) sur concours en : 2002

a obtenu son certificat de fin de scolarité le : 12 Juin 2008

n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

Je soussigné, Philippe JACQUIET, Maître de Conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, autorise la soutenance de la thèse de :

Mlle Fanny, Louise BASTIEN

intitulée :

« Effet larvicide des huiles essentielles sur stomoxys calcitrans à la Réunion »

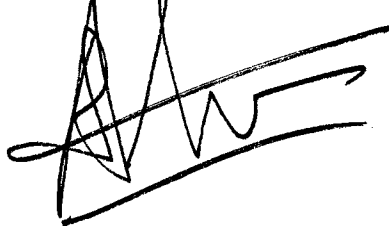
**Le Professeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Docteur Philippe JACQUIET**



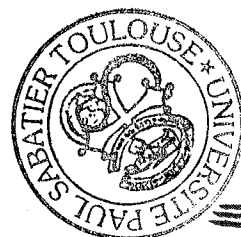
**Vu :
Le Directeur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON**



**Vu :
Le Président de la thèse :
Professeur Alexis VALENTIN**



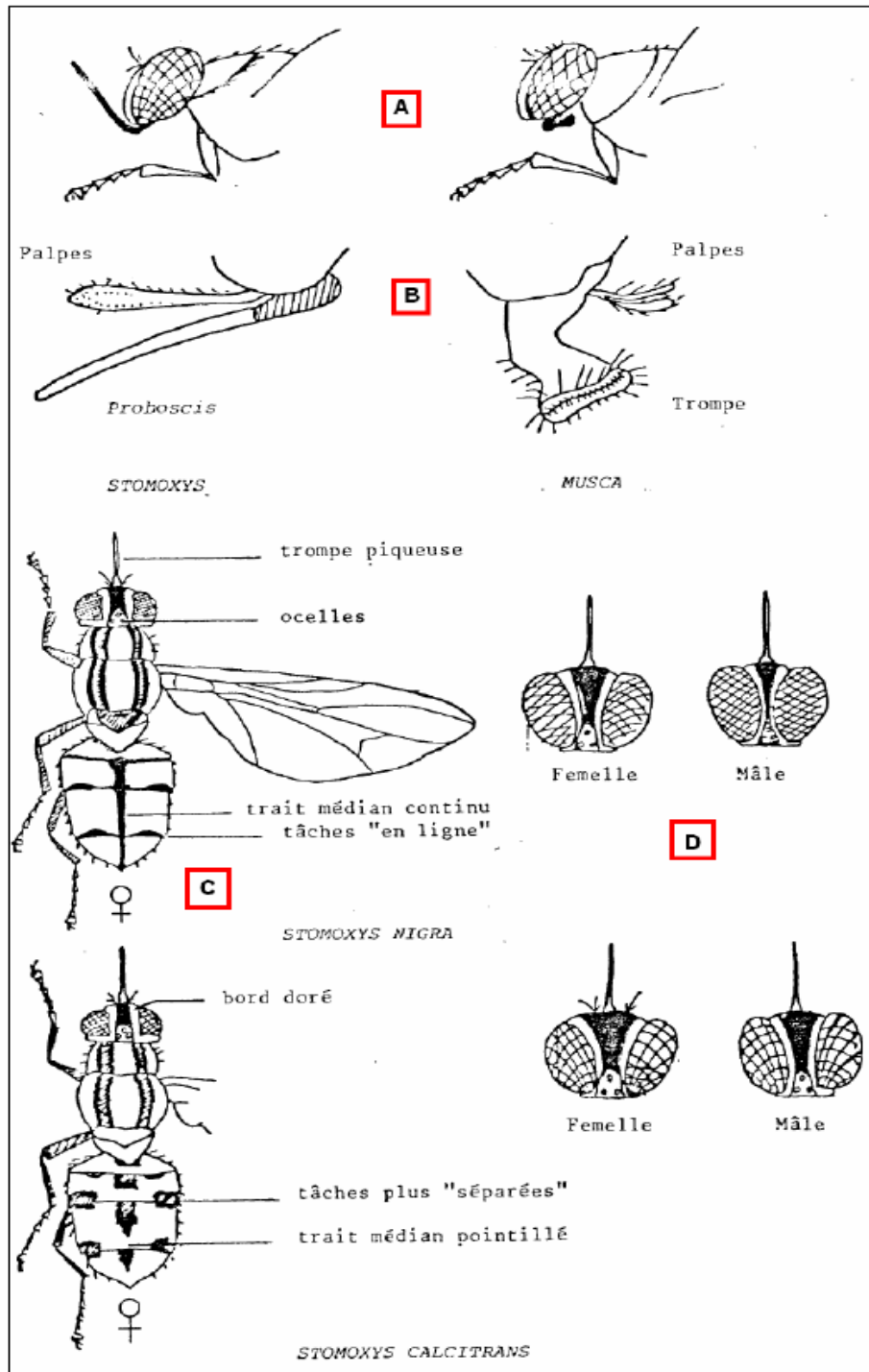
**Vu le : 09 OCT. 2008
Le Président
de l'Université Paul Sabatier
Professeur Gilles FOURTANIER**



Annexes

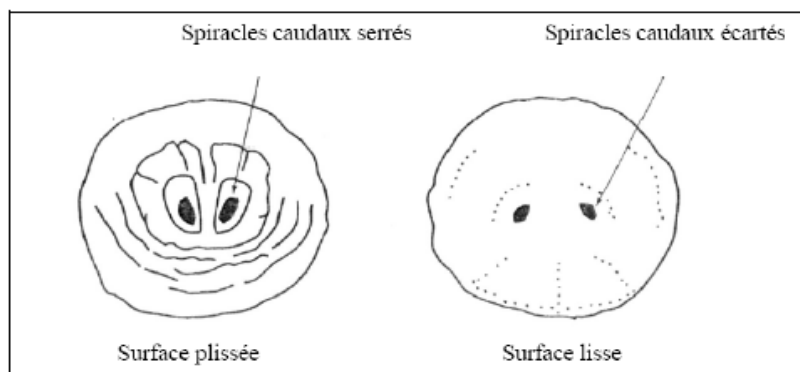
Annexe 1

Annexe 1

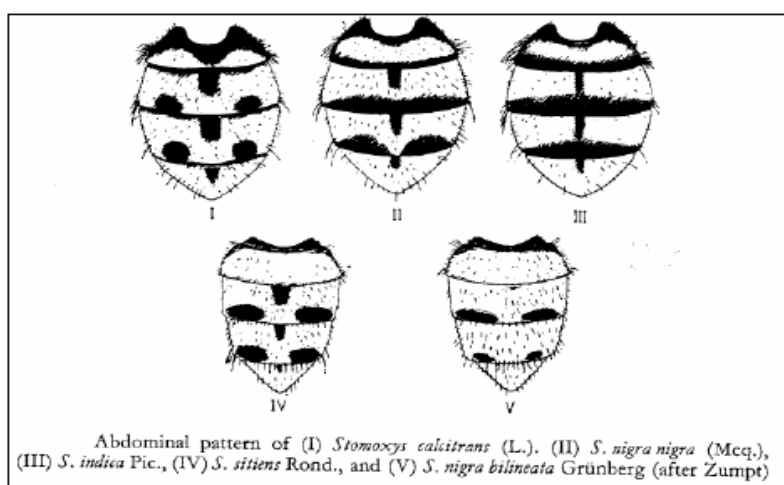


Différences fondamentales à retenir concernant *Stomoxys*, dessin de N. Barré (1981).

Annexe 2



Distinction des pupes de *stomoxys niger* et *stomoxys calcitrans* (d'après Barré, 1981)



Abdominal pattern of (I) *Stomoxys calcitrans* (L.), (II) *S. nigra nigra* (Mcq.), (III) *S. indica* Pic., (IV) *S. sitiens* Rond., and (V) *S. nigra bilineata* Grünberg (after Zumpt)

Motifs des tergites abdominaux de Stomoxyinés (d'après Zumpt, 1973)

Annexe3

Table 1. Plants reported for insecticidal, growth inhibition and repellent against mosquito vectors.

Plant species (Family)	Plant product	Species tested	Type of activity	References
<i>Tagetes minuta</i> (Compositae)	Essential oil, Whole plant flowers	<i>Anopheles stephensi</i>	Adulticidal	Green et al., 1991
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Deoiled neem cake powder	<i>Culex</i> spp. <i>Anopheles</i> spp.	Larvicidal, Growth regulator	Rao et al., 1992
<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae)	Fruit peel oil	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Adulticidal, Larvicidal	Mwaiko, 1992
<i>Annona squamosa</i> (Annonaceae)	Whole plant extract	<i>Anopheles stephensi</i>	Larvicidal, Growth regulator, Chemosterilant	Saxena et al., 1993
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Neem oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>Anopheles stephensi</i>	Larvicidal	Mittal et al., 1993
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	2% Neem oil	<i>An. culicifacies</i>	Repellent	Sharma et al., 1993
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	5-10 % Neem oil	<i>An. culicifacies</i>	Repellent	Sharma et al., 1993
<i>Tagetes minuta</i> (Compositae)	Essential oil, Whole plant flowers	<i>Aedes aegypti</i>	Larvicidal	Tyagi et al., 1994
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Deoiled neem cake powder	<i>An. fluviatilis</i>	Repellent	Rajnikant and Bhatt, 1994
<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae)	Fruit peel oil	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Adulticidal, Larvicidal	Mwaiko and Savelli, 1994
<i>Cymbopogon</i> spp (Gramineae)	Oil as topical application	<i>An. Culicifacies</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Repellent	Ansari and Razdan, 1995
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Neem oil-Oil water emulsion on wood scrapping	<i>Aedes aegypti</i>	Anti - pupational	Nagpal et al., 1995
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	5% neem oil in a cream-base topical application	<i>Aedes aegypti</i>	Repellent	Dua et al., 1995
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Neem oil volatiles	<i>An. Culicifacies</i> , <i>An. stephensi</i>	Oviposition inhibitor	Dhar et al., 1996
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	2% Neem oil mixed with coconut/mustard oil as topical application	<i>Aedes aegypti</i>	Repellent	Sharma et al., 1996
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	5% neem oil in a cream-base topical application	<i>Ae. albopictus</i>	Repellent	Singh et al., 1996
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	1% neem oil in kerosene (Smoke)	<i>An. Culicifacies</i> , <i>An. Annularis</i> , <i>Culex</i> spp.	Repellent	Ansari and Razdan, 1996
<i>Eucalyptus maculate</i> (Myrtaceae)	PMD spray 50% ai based on essential oil	<i>An. Gambiae</i> <i>An. funestus</i>	Repellent	Trigg, 1996
<i>Lantana camara</i> (Verbnaceae)	Flower-Methanol extract + Coconut oil	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. aegypti</i>	Repellent	Dua et al., 1996
<i>Artimisia cina</i> (Compositae)	Aquous extract	<i>Culex pipiens</i>	Larvicidal	M.Z.Yali et al., 1996
<i>Cleome droserifolia</i> (Capparidaceae)	Aquous extract	<i>Culex pipiens</i>	Larvicidal	M.Z.Yali et al., 1996
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Neem leaves extract + Malathian	<i>Culex fatigans</i>	Larvicidal	Mohammad Arshad et al., 1996
<i>Polyalthia longifolia</i> (Annonaceae)	Leaf extract	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	Larvicidal	Murty et al., 1997
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Neem oil-Oil water emulsion on wood scrapping	<i>An. stephensi</i>	Larvicidal, Growth regulator	Batra et al., 1998
<i>Mentha piperita</i> (Labiatae)	Essential oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>An. Stephensi</i> , <i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal, Repellent	Ansari et al., 1999
<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae)	Fruit peel oil	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Adulticidal, Larvicidal	Al Dakhil and Morsy., 1999
<i>Tagetes erecta</i> (Compositae)	Acetone extract, Steam distilled essential oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>An. Stephensi</i> , <i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal,	Pathak et al., 2000
<i>Mentha piperita</i> (Labiatae)	Essential oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>An. Stephensi</i> , <i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal, Repellent	Pathak et al., 2000
<i>Ocimum sanctum</i> (Labiatae)	Steam distilled essential oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>An. Stephensi</i> , <i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal	Pathak et al., 2000
<i>Dalbergia sisco Roxb.</i> (Leguminasae)	Essential oil	<i>Cx. quinquefasciatus</i> , <i>An. Stephensi</i>	Larvicidal, Repellent	Ansari et al., 2000
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	5% neem oil in a cream-base topical	<i>Ae. albopictus</i> , <i>Ae. aegypti</i> , <i>Culex</i> spp	Repellent	Nagpal et al., 2001
<i>Citrus</i> spp. (Rutaceae)	Fruit peel oil	<i>Cx. pipiens</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Adulticidal, Larvicidal	Ezenou et al., 2001
<i>Ferronia elephantum</i> (Rutaceae)	Leaves, Methanolic extract	<i>Ae. aegypti</i>	Repellent	Venkatachalam and Jebanesan, 2001
<i>Solanum nigrum</i> Linn. (Solanaceae)	Ethanol leaf extract	<i>Ae. Caspius</i> , <i>Cx. pipiens</i>	Larvicidal, Growth regulator	Ahmed et al., 2001
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	2% Neem oil mixed with coconut/mustard oil as topical application	<i>Ae. darlingi</i>	Repellent	Moore et al., 2002
<i>Solanum nigrum</i> Linn. (Solanaceae)	Crude leaf extract	<i>An. Culicifacies</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal	Singh et al., 2002
<i>Quillaja saponaria</i>	Plant extract	<i>Ae. aegypti</i> , <i>Cx. pipiens</i>	Bio active	Zeev Wiesman, 2003
<i>Atlantia monophylla</i> (Rutaceae)	Methenol extract	<i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i> , <i>Anopheles</i> spp.	Larvicidal & Pupicidal	Sivagnaname et al., 2004
<i>Cinnamomum cassia</i>	Methenol extract	<i>Ae. aegypti</i>	Repellent	Young-cheol Yang et al., 2004
<i>Artemesia orgy</i> , <i>Eucalyptus robusta</i>	Plant extract	<i>Ae. aegypti</i>	Repellent	Gates malaria partnership (2005)
<i>Balanites aegyptiaca</i>	Aqueous extract	<i>Cx. pipiens</i>	Larvicidal	Bishnu Chapagain et al., 2005
<i>Azadirachta indica</i> (Meliaceae)	Aqueous extract	<i>An. gambia</i> , <i>Cx. quinquefasciatus</i>	Larvicidal	Obomanu et al., 2006
112 Plants	Medicinal Plant extract	<i>Ae. aegypti</i>	Larvicidal	Suwannee et al., (2006)
<i>Momordica charantia</i> (Cucurbitaceae)	Plant extract	<i>Cx. quinquefasciatus</i> <i>Ae. aegypti</i> , <i>Anopheles</i> spp.	Larvicidal	Singh et al (2006)

Tableau : Plants reported for insecticidal, growth inhibition and repellent against mosquito vectors. (Mohan et Ramaswany, 2007) [32]

Annexe 4
1^{ère} expérimentation.

	p-value	p<0,05 différence	=
citronnelle-basilic	0,1690801	0	
eucalyptus-basilic	0,000902	différence	
geranium-basilic	0,0015906	différence	
lavande-basilic	0,0000001	différence	
moringa-basilic	0,0000247	différence	
neem-basilic	0,0329521	différence	
teatree-basilic	0,9011824	0	
temoin-basilic	0	différence	
eucalyptus-citronnelle	0,5864317	0	
geranium-citronnelle	0,7044093	0	
lavande-citronnelle	0,0007816	différence	
moringa-citronnelle	0,0601646	0	
neem-citronnelle	0,9952316	0	
teatree-citronnelle	0,9092666	0	
temoin-citronnelle	0,0001958	différence	
geranium-eucalyptus	1	0	
lavande-eucalyptus	0,1539354	0	
moringa-eucalyptus	0,9157175	0	
neem-eucalyptus	0,9810233	0	
teatree-eucalyptus	0,0459162	différence	
temoin-eucalyptus	0,0575643	0	
lavande-geranium	0,1037324	0	
moringa-geranium	0,8460661	0	
neem-geranium	0,9943193	0	
teatree-geranium	0,0717243	0	
temoin-geranium	0,0364127	différence	
moringa-lavande	0,9226864	0	
neem-lavande	0,0173945	différence	
teatree-lavande	0,0000097	différence	
temoin-lavande	0,9999569	0	
neem-moringa	0,3886811	0	
teatree-moringa	0,0016521	différence	
temoin-moringa	0,7278954	0	
teatree-neem	0,4747079	0	
temoin-neem	0,0053712	différence	
temoin-teatree	0,0000023	différence	

Test de Tukey HSD : Comparaisons multiples 1^{ère} expérimentation.

2^{ème} expérimentation

	Concentration	Volume (mL) pour 350 mL	Volume Stabilisant
BASILIC	0,15%	0,5	0,3
	0,25%	0,9	0,5
CITRONNELLE	0,35%	1,2	0,6
	0,45%	1,6	0,8
NEEM	0,35%	1,2	0,6
	0,45%	1,6	0,8
TEA TREE	0,35%	1,2	0,6
	0,45%	1,6	0,8

Tableau : 2^{ème} expérimentation

3^{ème} expérimentation

	Concentration	Volume mL pour 250 mL	Volume Stabilisant
Basilic 1	0,15 %	0,3	0,2
Basilic 2	0,25 %	0,6	0,3
Citronnelle	0,35 %	0,8	0,4
Tea Tree	0,35 %	0,8	0,4

Tableau : Protocole de la 3^{ème} expérimentation

	p-value
Basilic 1	0,167
Basilic 2	0,408
Citronnelle	0,084
Tea Tree	0,121

Tableau : Résultats de la 3^{ème} expérimentation : p-value.

Bibliographie

- [1] **Abdel-Shafy S. et Zayed AA.**, 2002 : In vitro acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea : Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 106 (2002) 89-96.
- [2] **Ausloos A.**, 2004 : Action insecticide des Huiles Essentielles : Tests et Réalité. Infor-Essences n°17 W.R.L Masamba, J.F. Kamanula, E.M.T. Henry, Department of Chemistry, Chancellor College P.O. Box 280, Zomba, Malawi
- [3] **Barré N.** (1981) : Les stomoxes ou mouches bœuf à La Réunion. Pouvoir pathogène, écologie, moyen de lutte. Maisons-Alfort (FRA) - GERDAT - IEMVT: 90p.
- [4] **Bekele J. and Hassanali A.**, 2001 : Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of *Ocimum kilimandscharicum* and *Ocimum kenyense* (Labiatae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry*, 57 : 385 - 391.
- [5] **Bishopp F.C.** (1913). : The stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.), an important live-stock pest. *Journal of Economic Entomology*, 6: 112-126.
- [6] **Bruce W.N and G.C. Decker.** 1958 : The relationship of stable fly to milk production in dairy cattle. *Journal of Economic Entomology* 51 (3) : 269-275.
- [7] **Burfield AP. & S-L. Reekie** 2005 : Mosquitoes, malaria and essential oils. *International J. of Aromatherapy* (2005) Vol15(1), 30-41
- [8] **Caceres A. and al**, 2003 : Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 1991 Jul;33(3):213-6.
- [9] **Camus E. et Uilenberg G.** (2000). : "L'anaplasmose", dans Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail en Europe et en Régions Chaudes de Lefèvre P.C. Edition Tec&Doc, 2 vol. p. 1099-1107
- [10] **Cavalcanti ES., et al**, 2004 : Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004 Aug;99(5):541-4. Epub 2004 Nov 3
- [11] **Chu J. and Kemper J.**, 2001 : MPH Lavender Longwood Herbal Task Force: <http://www.mcp.edu/herbal/>
- [12] **Chuang PH. and al** 2006 : Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource Technology* Vol.88(1) pp 232-236.
- [13] **Cléro M.** (2004). : Les stomoxes (*Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger*) dans les élevages bovins laitiers du sud de la Réunion. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes : 133p.
- [14] **Crespo DC., et al**, 2002 : Strategies for controlling House Fly populations resistant to Cyromazine. *Neotropical Entomology* 31 (1) : 141-147 (2002).
- [15] **Desquesnes M., L.Dia Mamadou, Acapovi G., Yoni W.** (2005). Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animales, généralités, morphologie, biologie, impacts et contrôle. Identification des espèces les plus abondantes en Afrique de l'Ouest. CIRDES et CIRAD.

- [16] **Dougherty and al**, 1995 : Behavior of grazing cattle exposed to small populations of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.) *Applied Animal Behaviour Science* 42 (1995) 231-248.
- [17] **Ehrhardt N.** (2006). : Etude de l'activité d'une formulation à 50% de deltaméthrine sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion : résistance et rémanence. Thèse de doctorat vétérinaire. 90p
- [18] **Enan E.** 2000 : Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology & Pharmacology*. Vol 130 (3) Nov 2001, p 325-337.
- [19] **Enan** 2005 : Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect biochemistry and molecular biology*. Vol 35(4) pp 309-321
- [20] **Foil L.D. and J.A Hogsette** (1994). : Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique de l'Office International des Epizooties*, 13(4). 1125-1158
- [21] **Gauvin M.J et al**, 2003 : *Azadirachta indica* : l'azadirachtine est-elle le seul ingrédient actif? *Phytoprotection* 84 : 115-119.
- [22] **Gilles J.** (2001). : Test d'efficacité de différents types de pièges dans la lutte contre les stomoxes. Introduction à l'étude de la biologie des stomoxes présents à l'île de la Réunion. Mémoire de stage, DEA de parasitologie, Montpellier I et II.
- [23] **Gilles J.** (2005). : Les stomoxes, *Stomoxys calcitrans* et *Stomoxys niger niger* dans les élevages bovins réunionnais. Thèse de Doctorat de l'Université de la Réunion : Biologie des Populations et Ecologie.
- [24] **Iori et al**, 2005 : Acaricidal properties of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree oil) against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Veterinary Parasitology* 129 (2005) 173-176.
- [25] **Isman**, 2000 : Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19 (2000) 603-608.
- [26] **Jeyabalan et al**, 2003 : Studies on effects of *Pelargonium citrosa* leaf extracts on malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston. *Bioresource Technology* 89 (2003) 185-189.
- [27] **Keane S., et Ryan MF.** 1999 : Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). *Insect biochemistry and molecular biology* Vol 29(12) 1097-1104.
- [28] **Kunz & Monty** (1976). : Biology and ecology of *Stomoxys niger* (M.) and *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera, Muscidae) in Mauritius. *Bull Ent Res*, 66, 745-755
- [29] **Lefèvre P.C., Blancou J., Chermette R.** (2000). : Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail en Europe et en Régions Chaudes, Editions Tec&Doc.
- [30] **Lundh et al**, 2005 : Azadirachtin-impregnated traps for the control of *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology* 130 (2005) 337- 342.
- [31] **Mandret G.** (2000) : Les grands mutations de la société réunionnaise. In: G. Mandret, L'élevage bovin à la Réunion : synthèse de 15 ans de recherche. Saint-Pierre, Réunion, CIRAD, 19-34.

[32] **Mohan D. et Ramaswamy M.**, 2007 : Evaluation of larvicidal activity of the leaf extract of a weed plant, *Ageratina adenophora*, against two important species of mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *African Journal of Biotechnology* Vol.6(5), pp.631-638, 5 March, 2007.

[33] **Mulla MS. et Su T.**, 1999 : Activity and biological effects of neem products against arthropods of medical and veterinary importance. *J Am Mosq Control Assoc.* (1999 Jun); 15(2) : 133-52.

[34] **Mullens BA., et al** (2006). : Behavioural responses of dairy cattle to the stable fly, *Stomoxys calcitrans*, in an open field environment. *Medical and Veterinary Entomology* 20 : 122-137.

[35] **Murugan K et al**, 2007 : Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta:Diptera:Culicidae). *Bioresour Technol.* 2007 Jan;98(1):198-201. Epub 2006 Feb 10.

[36] **Muse W.A., et al**, 2002 : Effect of some pulverized plant extracts on oviposition, hatching and development of larvae of *Aedes aegypti* (L.). *Environment and Ecology* (2002) 20 (4) 810-817.

[37] **Nathan S., Kalaivani K. et al**, 2005 : Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera : Culicidae). *Acta Tropica* 96 (2005) 47-55.

[38] **Nathan S., Kalaivani K. et al**, 2006 : The toxicity and behavioral effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée), the rice leaffolder. *Chemosphere* 62 (2006) 1381-1387.

[39] **Ntonifor NN et al**, 2006 : Traditional use of indigenous mosquito-repellents to protect humans against mosquitoes and other insect bites in a rural community of Cameroon. *East Afr Med J.* 2006 Oct;83(10):553-8.

[40] **Pannequin M.**, 2006 : Mise en place d'un protocole de recherche pour l'étude des pratiques de conduite environnementales influençant l'abondance des populations de stomoxes dans les élevages bovins laitiers réunionnais. Mémoire du CEAV PARC, 2006.

[41] **Pavela R.**, 2004 : Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia.* 2004 Dec;75(7-8):745-9

[42] **Prajapati S. and Tripathi B.**, 2005 : Insecticidal, repellent and oviposition-deterrent activity of selected essential oils against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Bioresource Technologie* Vol 96 (16), Nov 2005, p 174961757

[43] **Pushpanathan T. et al**, 2006 : Larvicidal, ovicidal and repellent activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) essential oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera : Culicidae). *Tropical Biomedicine*(2006) 23(2) : 208-212

[44] **Seljasen R. et Meadow R.**, 2006 : Effect of neem on oviposition and egg and larval development of *Mamestra brassicae* L :Dose response, residual activity, repellent effect and systemic activity in cabbage plants. *Crop Protection* 25 (2006) 338-345.

[45] **Senthil Nathan**, 2007 : The use of *Eucalyptus tereticornis* SM. (Myrtaceae) oil (leaf extract) as a natural larvicidal agent against the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera : Culicidae). *Bioresource Technology* Vol98 (9), July 2007, p 1856-1860.

- [46] **Singh G. et al**, 1996 : Bioefficacy and mode-of-action of some limonoids of salannin group from *Azadirachta indica* A. Juss and their role in a multicomponent system against lepidopteran larvae. *J Biosci.* 2004 Dec;29(4):409-16.
- [47] **Tillard E., Messad S.** (1998). : Bilan statistique et épidémiologique des données sérologiques, entomologiques, cliniques et zootechniques du POSEIDOM VETERINAIRE "Eradication des babésioses et de l'anaplasmose à la Réunion" CIRAD 323-356.
- [48] **Tinkeu LS et al**, 2004 : Persistence of the insecticidal activity of five essential oils on the maize weevil *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae). *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2004;69(3):145-7
- [49] **Traboulsi AF. et al**, 2002 : Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* 2002 May;58(5):491-5.
- [50] **Traboulsi AF. et al**, 2005 : Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag Sci.* 2005 Jun;61(6):597-604.
- [51] **Usip LPE. et al**, 2006 : Longitudinal evaluation of repellent activity of *Ocimum gratissimum* (Labiatae) volatile oil against *Simulium damnosum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 Mar;101(2):201-5
- [52] **Walton SF. et al** 2000 : Acaricidal activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: in vitro sensitivity of *sarcoptes scabiei* var hominis to terpinen-4-ol. *Arch Dermatol.* 2004 May;140(5):563-6.
- [53] **Wandscheer CB. , Duque JE. et al**, 2004 : Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon* 44 (2004) 829-835.
- [54] **Won-Sik Choi C. et al**, 2006 : Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crop Protection* 25 (2006) 398-401.
- [55] **Yanes A. et al**, 2004 : Effects of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts from leaves on *Trypanosoma cruzi* growth and ultrastructure. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 Apr;36(2):149-54
- [56] **Zumpt F.** (1973). : The Stomoxyine biting flies of the world. Taxonomy, biology, economic importance and control mesures. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 175p.