

Table des matières

Remerciements	i
Listes des tableaux	iv
Listes des figures	iv
Abréviations	vi
Glossaire.....	vii
Introduction	1
Chapitre 1 : Revue de la littérature	4
1. Généralités sur les moustiques	3
1.1. Position systématique.....	3
1 .2. Morphologie générale des stades de développement de <i>Anopheles</i> et de <i>Culex</i> : œufs, larves, nymphe, adulte	4
1.3. Cycle biologique du moustique	10
1.4. Importances médicales de <i>Culex</i> et de <i>Anopheles</i>	13
1.5. Mode de transmission du virus ou parasite par le vecteur	13
2. Généralités sur les plantes étudiées	15
2.1. Description des familles et des genres	15
2.2. Compositions chimiques des plantes étudiées	17
3. Généralités sur les huiles essentielles et extraits de plante.....	17
3.1. Huiles essentielles	17
3.2. Extraits de plante.....	18
3.3. Les composés chimiques à activités insecticide et insectifuge d'origine végétale	19
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	22
1. Sites de capture des femelles adultes de <i>An. gambiae s.l</i> et de collecte des larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	22
2. Matériels	23
3. Méthodes	27
3. Analyses des données	37
Chapitre 3 : Résultats	38
1. Durée de cycle biologique de <i>Culex quinquefasciatus</i> et de <i>Anopheles gambiae s.l</i>	38
2. Test à vide et témoin.....	39
3. Effets répulsifs et effets insecticides des huiles essentielles sur les moustiques :.....	40
4. Effets insecticides des extraits de plantes sur les moustiques	44
Chapitre 4: Discussions.....	48

1. Durée de cycle biologique des moustiques.....	48
2. Mesure de répulsion des huiles essentielles	49
3. Mesure de toxicité des huiles essentielles et des extraits de plantes	50
Conclusion et perspectives.....	52
Bibliographie	54
Annexes	52
Résumé	64

Listes des tableaux

Tableau 1 : Les principales caractéristiques morphologiques des Anophelinés (genre : <i>Anopheles</i>) et des Culicinés (genre : <i>Culex</i>).....	9
Tableau 2 : Vecteurs et maladies transmises.....	13
Tableau 3 : Indice de répulsion	35
Tableau 4 : Durée de développement des différents stades de <i>Culex quinquefasciatus</i>	38
Tableau 5 : Durée de développement des différents stades de <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	39
Tableau 6 : Test à vide et témoin	39
Tableau 7 : Pourcentage de répulsion avec <i>O.trichophlebia</i> et <i>O.auriculiformis</i> vis-à-vis de <i>Culex quinquefasciatus</i>	40
Tableau 8 : Test de mortalité de <i>Cx. quinquefasciatus</i> avec l'huile essentielle de <i>O. trichophlebia</i> et celle de <i>O. auriculiformis</i>	42
Tableau 9 : Pourcentage de répulsion avec <i>Rinorea arborea</i> vis-à-vis de <i>An. gambiae s.l.</i>	43
Tableau 10 : Test de mortalité de <i>An. gambiae s.l</i> avec l'huile essentielle <i>Rinorea arborea</i> ..	44

Listes des figures

Figure 1 : Tête de moustique mâle	5
Figure 2 : Tête de moustique femelle.....	5
Figure 3 : Morphologie générale d'un moustique adulte	7
Figure 4 : Cycle de vie du moustique.....	11
Figure 5 : Cycle gonotrophique du moustique	12
Figure 6 : relation entre hôte, vecteurs et agents pathogènes	14
Figure 7 : Types de composés responsables de l'activité insecticide (en %).....	20
Figure 8 : Types de composés responsables de l'activité insectifuge (en %)	21
Figure 9 : Sites de captures des larves de <i>Cx. quinquefasciatus</i> et des femelles adultes de <i>An. gambiae s.l</i>	22
Figure 10 : Godet.....	23
Figure 11 : Aspirateur et gobelet à voile (à gauche) ; glacière (à droite).....	23
Figure 12 : Insectarium	24
Figure 13 : Olfactomètre	25
Figure 14 : Micropipettes (à gauche) et papier Whatman (à droite)	26
Figure 15 : Tubes OMS	27
Figure 16 : Collecte des larves de <i>Culex quinquefasciatus</i> à Ampefiloha	28
Figure 17 : Gîte de repos (étable) de l'espèce <i>Anopheles gambiae s.l.</i>	28
Figure 18 : Capture des Anophèles adultes dans les étables	29
Figure 19 : Etapes d'élevage des moustiques (<i>Cx. quinquefasciatus</i> et <i>An gambiae s.l</i>) dans l'insectarium	31
Figure 20 : Femelle de <i>Cx. quinquefasciatus</i>	32
Figure 21 : Pattes (à gauche) et palpe (à droite) d' <i>An. gambiae s.l.</i>	33
Figure 22 : Aile d' <i>An. gambiae s.l.</i>	33
Figure 23 : déroulement du test de répulsion sur l'olfactomètre.....	34
Figure 24 : Capture des moustiques femelles.....	36

Figure 25 : Préparation des tubes d'exposition	36
Figure 26 : Transfert des moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition	36
Figure 27 : Mise en observation à l'insectarium.....	37
Figure 28 : Courbe de durée d'efficacité répulsive de <i>O.tricophlebia</i> et <i>O.auriculiformis</i> à 50%	41
Figure 29 : Courbe de durée d'efficacité répulsive <i>O.tricophlebia</i> et <i>O.auriculiformis</i> à 100%	41
Figure 30 : Courbe de durée d'efficacité répulsive de <i>Rinorea arborea</i> à 50 et à 100%	43
Figure 31 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait hydroalcoolique d' <i>O.auriculiformis</i>	45
Figure 32 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait à froid d' <i>O.auriculiformis</i>	45
Figure 33 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait à chaud d' <i>O.auriculiformis</i>	45
Figure 34 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de tige de <i>Gnidia daphnifolia</i>	47
Figure 35 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de racine de <i>Gnidia daphnifolia</i>	47
Figure 36 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de feuille de <i>Gnidia daphnifolia</i>	47
Figure 37 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait d'écorce de <i>Gnidia daphnifolia</i>	47

Abréviations

- CL : Concentration létale
- CNRE : Centre National de Recherche sur l'Environnement
- *Cx. quinquefasciatus* : *Culex quinquefasciatus*
- DL : Dose létale
- H.E : Huile essentielle
- *O. tricophlebia* : *Ocotea trichophlebia*
- *O. auriculiformis* : *Ocotea auriculiformis*
- OMS : Organisation Mondial de la Santé
- P.R : Pourcentage de répulsion
- T.e : Taux d'éclosion
- Tem : Taux d'émergence
- tm : Taux de mortalité

Glossaire

Agent pathogène	: Tout facteur capable d'engendrer une lésion ou de causer une maladie.
CL50	: Concentration létale qui provoque 50% de mortalité dans la population étudiée, pendant un temps donné.
DL50	: Dose provoquant 50% de mortalité dans la population étudiée, pendant un temps donné.
Extrait de plante	: Préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes) ou solide (extrait secs), obtenues à partir de drogues végétales généralement à l'état sec.
Hôte	: Personne ou un animal qui reçoit des intrus (virus, parasite)
Huile essentielle	: Fraction odorante volatile extraite des végétaux.
Insecticide	: Produit qui tue les insectes.
Insectifuge	: Produit qui repousse les insectes.
Insecte holométabole	: Insecte qui effectue une métamorphose complète (avec un stade nymphal).
Maladie vectorielle	: Maladie causée par un agent parasite véhiculé et inoculé ou déposé par un vecteur vivant.
Parasite	: Organisme (animal ou végétal) qui vit aux dépens d'un autre (appelé hôte), lui portant préjudice, mais sans le détruire.
Vecteur	: Organisme susceptible de transmettre un agent infectieux d'un sujet à un autre, directement ou après multiplication de l'agent dans son organisme.
Virus	: Micro-organisme infectieux composé d'un acide nucléique entouré d'une capsidé, parasite absolu des cellules vivantes, capable de se répliquer dans celles-ci et de passer de l'une à l'autre.

Introduction

Les insectes ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies. Les maladies à transmission vectorielle (arboviroses, bactérioses, parasitoses) sont responsables de millions de victimes (Rhodain, 1996). Généralement associées aux pays tropicaux, les maladies à transmission vectorielle par piqûres de moustiques touchent chaque année des dizaines de millions de personnes. En 2010, le paludisme a fait 655 000 victimes dont 90% des décès enregistrés ont frappé des enfants de moins de 5 ans en Afrique, y compris Madagascar (Andrianjafy, 2014). Le parasite du paludisme découvert par Laveran en 1880 en Algérie n'est pas véhiculé par le mauvais air « mal'aria » mais transmis d'homme à homme par l'intermédiaire d'un vecteur biologique, un moustique du genre *Anopheles* (étymologiquement, du grec « a » privatif et « Opheles » utile, autrement dit insecte dénué d'utilité) (Carnevale et Robert, 2009). Une autre espèce de moustique, *Culex quinquefasciatus*, qui en plus de sa nuisance peut être à l'origine d'un problème de santé publique en zone urbaine. En effet, cette espèce est le vecteur de la filariose lymphatique à *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877) en Afrique orientale et dans l'océan indien, y compris Madagascar.

Depuis l'antiquité, l'homme a cherché des moyens de lutte contre les moustiques. Les stratégies de contrôle des moustiques sont essentiellement basées sur les méthodes de lutte suivantes : mécanique, chimique, génétique, biologique. La lutte mécanique a pour but de limiter la prolifération des insectes vecteurs et de réduire le contact : homme/moustique. Elle se fait par l'élimination des gîtes larvaires potentiels de moustiques autour des habitations humaines en assèchant et en remblaiant des marais, en creusant de dépression etc...; par l'utilisation des moustiquaires, et par l'amélioration de l'habitat (Carnevale et Mouchet, 1990). La lutte chimique se fait en employant des produits synthétiques qui tuent les insectes par ingestion ou par contact. Le mode d'application des produits est fonction de l'écologie du vecteur et du stade visé. Dans les campagnes de lutte anti-moustique, les matières actives des insecticides utilisés appartiennent aux familles suivantes : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. Bien qu'elles se soient révélées très efficaces sur les Culicidés, ces préparations présentent plusieurs inconvénients. L'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes traités (aquatiques et terrestres) est un problème de pollution (Barbouche *et al.*, 2001). Par ailleurs, les substances actives des produits utilisés présentent un large spectre d'action donc elles peuvent tuer les organismes non cibles. A tous ces inconvénients, s'ajoute aussi un grand problème de développement de résistance aux

insecticides chimiques chez les moustiques (Georghiou *et al.*, 1975 ; Senegre *et al.*, 1977). La lutte génétique est basée sur la manipulation du patrimoine génétique des moustiques afin d'obtenir des individus transgéniques qui peuvent être soit stériles, soit réfractaires aux parasites qu'ils transmettent habituellement (Tabachnick, 2003). Les manipulations intéressent également les plantes telles les algues qui se reproduisent dans les gîtes larvaires. Ces algues génétiquement modifiées par intégration de gènes de toxines bactériennes agissent sur les larves de moustiques. La lutte biologique repose sur l'utilisation d'organismes vivants ou de produits qui en dérivent pour contrôler les vecteurs et les ravageurs. Ces organismes sont de virus, de bactéries, de protozoaires, de champignons, de plantes. Pour assurer une meilleure intervention, tout en préservant au maximum le milieu naturel, de nouvelles méthodes préventives ainsi que de nouveaux produits sont constamment recherchés. Ainsi, pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de contrôle des moustiques est d'avantage encouragée. Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie comme anti-malaria, bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement. L'utilisation des extraits de plantes et des huiles essentielles comme insecticides et insectifuges, sont connues depuis longtemps. En effet, le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (Crosby *et al.*, 1966). Dans certaines régions d'Afrique, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau sont utilisées pour lutter contre les moustiques et les odeurs du Basilic *Ocimum basilicum*, Basil (Labiée) et de Sarghina, *Corriola telephifolia* (Caryophyllacée) sont des répulsifs très efficaces (Aouinty *et al.*, 2006).

Très peu d'études ont été réalisées sur l'activité insecticide et insectifuge des plantes endémiques de Madagascar contre les vecteurs d'arbovirose telle que *Culex quinquefasciatus* et contre les vecteurs du paludisme comme *Anopheles gambiae s.l.* Le présent travail consiste à évaluer les effets répulsifs des huiles essentielles de *Ocotea tricophlebia*, *Ocotea auriculiformis* et effets insecticides de l'extrait de *Ocotea auriculiformis* sur *Culex quinquefasciatus* ; et évaluer les effets répulsifs de l'huile essentielle de *Rinorea arborea* et les effets insecticides de l'extrait de *Gnidia daphnifolia* sur *Anopheles gambiae s.l.*

L'objectif du présent mémoire est de rechercher les techniques de protection individuelle contre les moustiques. Pour la réalisation de ce travail, des larves de *Culex quinquefasciatus* et des adultes de *Anopheles gambiae s.l* sont collectées, et ont été élevées dans l'insectarium du CNRE. Le stage au sein du laboratoire d'Entomologie du CNRE a commencé le mois de mai 2015 et s'est terminé le mois de novembre 2015.

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Chapitre 1 : Revue de la littérature

1. Généralités sur les moustiques
 - 1.1. Position systématique

Position taxonomique des moustiques (d'après Knight et Stone, 1977)

Règne	: ANIMAL
Embranchement	: ARTHROPODA (= pattes articulées)
Classe	: INSECTA (= corps segmenté en trois parties)
Sous-classe	: PTERYGOTA (= avec des ailes)
Ordre	: DIPTERA (= avec 2 ailes)
Sous-ordre	: NEMATOCERA (= avec antennes rondes et longues)
Famille	: CULICIDAE (= moustiques)

Les moustiques sont des insectes diptères nématocères c'est-à-dire possédant deux paires d'ailes et deux antennes rondes et longues. Ils appartiennent à la famille des Culicidae, synonyme du terme courant « moustiques », comprenant plus de 3 300 espèces regroupées en 37 genres. La classification des moustiques a connu une évolution dans le temps. La famille des Culicidae généralement divisée en trois sous-familles :

- Toxorhynchitinae, avec un seul genre : *Toxorhynchites* (Théobald, 1901), regroupant 66 espèces, ce sont de gros moustiques non vulnérants dont la trompe ne permet pas de piquer ; les larves sont carnivores et ont été utilisées en lutte biologique sans donner de résultats durables. (Harbach & Kitching, 1998)
- Culicinae : on les subdivise en 10 tribus et 30 genres : *Culex*, *Aedes*, *Mansonia*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Haemagogus*, *Eretmapodites*, *Sabethes*, etc; ce sont des moustiques vulnérants et, pour certains, vecteurs de maladies humaines (fièvre jaune, dengue, Chikungunya, filarioses, etc.) et animales (*Plasmodium* d'oiseaux et de reptiles, fièvre de la vallée du Rift, West Nile, filarioses, etc.). (Ouedraogo, 2011)
- Anophelinae qui comprend les vecteurs de toutes les espèces de *Plasmodium* parasitant les sujets humains. Le genre *Anopheles* comprend 484 espèces selon Harbach (2004), mais le

nombre est variable selon les auteurs avec les récents travaux de morphotaxonomie, de cytotaxonomie ou de taxonomie moléculaire.

1 .2. Morphologie générale des stades de développement de *Anopheles* et de *Culex*: œufs, larves, nymphe, adulte

1.2.1. Ressemblances entre Culicinés et Anophelinés

➤ **Œufs**

Les œufs sont généralement de petite taille d'environ un millimètre de long, de forme elliptique, ovoïde à coque dure et lisse.

➤ **Larves**

La larve ressemble à des vers et dépourvue de patte et d'aile ; le corps de la larve est divisé en trois parties: tête, thorax et l'abdomen. La tête porte une paire de brosses buccales (qui servent à créer un courant d'eau apportant les particules alimentaires au niveau de la bouche qui est en position ventrale), et de nombreuses soies. Le thorax est globuleux et porte de très nombreuses soies. L'abdomen est composé de 9 segments bien visibles, chacun portant différentes ornementation notamment la plaque tergale et les plaques accessoires, des soies (Holstein, 1949).

➤ **Nymphe**

Son aspect général est celui d'une « virgule » à corps ou de point d'interrogation. La tête et le thorax sont unis en un céphalothorax, il est muni d'une paire de trompettes respiratoires, tandis que la pointe correspond à l'abdomen composé de huit segment qui se termine par des palettes natatoires (Mattingly, 1969).

➤ **Adulte**

- Tête est constituée de :

Une paire d'yeux composés mais pas d'ocelles, une paire d'antennes, composées de 15 articles chez la femelle et de 16 articles chez le mâle. Les mâles ont des antennes avec des soies longues et plumeuses (« antennes plumeuses ») comprenant les organes récepteurs de l'olfaction (pour la perception des phéromones et de l'audition) et un long proboscis appelé également trompe. Les femelles ont des antennes avec des soies verticillées, courtes et moins fournies que celles des mâles. La tête porte aussi un appareil buccal, de type suceur chez le mâle et de type piqueur suceur chez la femelle. (Figure 1, 2)

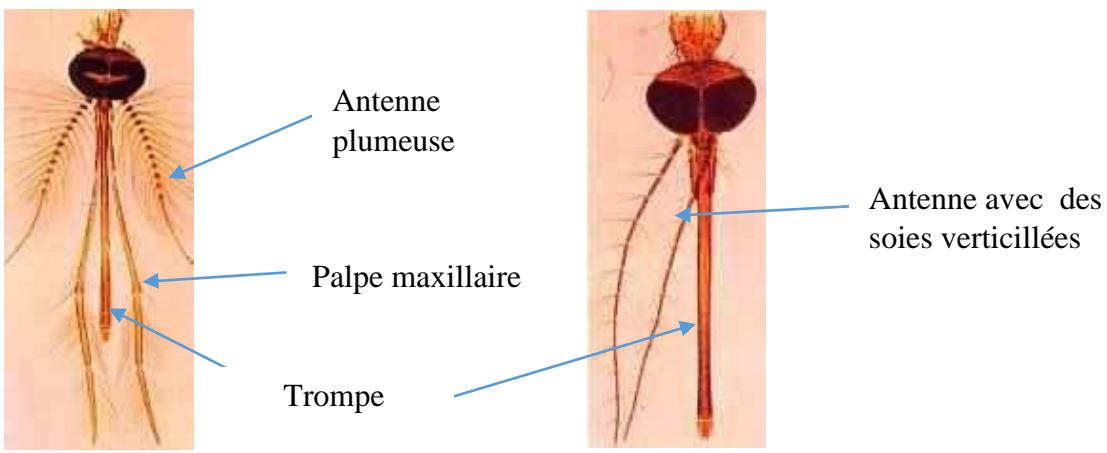


Figure 1 : Tête de moustique mâle

Figure 2 : Tête de moustique femelle

(Source : Source : <http://www.ilm.pf/infomoustiques>)

- Thorax

Il est composé de nombreuses plaques chitinisées sur la face dorsale (tergites), ventrale (sternites) et latérales (pleurites) ; il porte aussi deux paires de stigmates latéraux (pour la respiration) et de nombreuses soies et écailles dont la forme et la disposition sont utilisées dans la systématique. Il est divisé en 3 parties :

- le prothorax qui est réduit ;
- le mésothorax formant à lui seul presque le thorax, porte dorsalement la paire (antérieure) d'ailes fonctionnelles (figure 3) ;
- le métathorax est réduit dans sa partie dorsale, sa partie pleurale est mieux développée, il porte une paire d'ailes vestigiales ou haltères.

Chaque segment thoracique porte en position ventrale une paire de pattes longues et fines, formée chacune de neuf articles: la hanche ou coxa, le trochanter, le fémur, le tibia et les 5 articles du tarse dont le dernier porte deux griffes latérales (figure 3). Elles peuvent préserver des ornementations variées, formées d'écailles et de soies colorées. (Hamon *et al*, 1961).

- Abdomen

C'est la partie postérieure du corps. Il contient la plupart des organes de l'insecte (cœur, l'estomac, l'appareil respiratoire...). Il est constitué de dix segments, dont les huit premiers sont nettement visibles, les 9ème et 10 segments peu visibles et rétractiles (Hamon *et al*, 1961). Chez la femelle, le 8 ème segment reste bien visible ; le 9 ème segment « génital », portant le

vagin, est réduit à une petite plaque tergale à laquelle font suite les deux cerques dorsaux, sous lesquels s'ouvre le rectum porté par le 10 ème segment « anal ». Chez le mâle, au niveau du 8 ème segment se croise l'intestin qui devient dorsal et le spermiducte qui devient ventral. Le 9 ème segment (génital) est très modifié, avec le 10 ème, il constitue l'hypopigium (ou genitalia) dont la morphologie, est très complexe et variable (Roth, 1980).

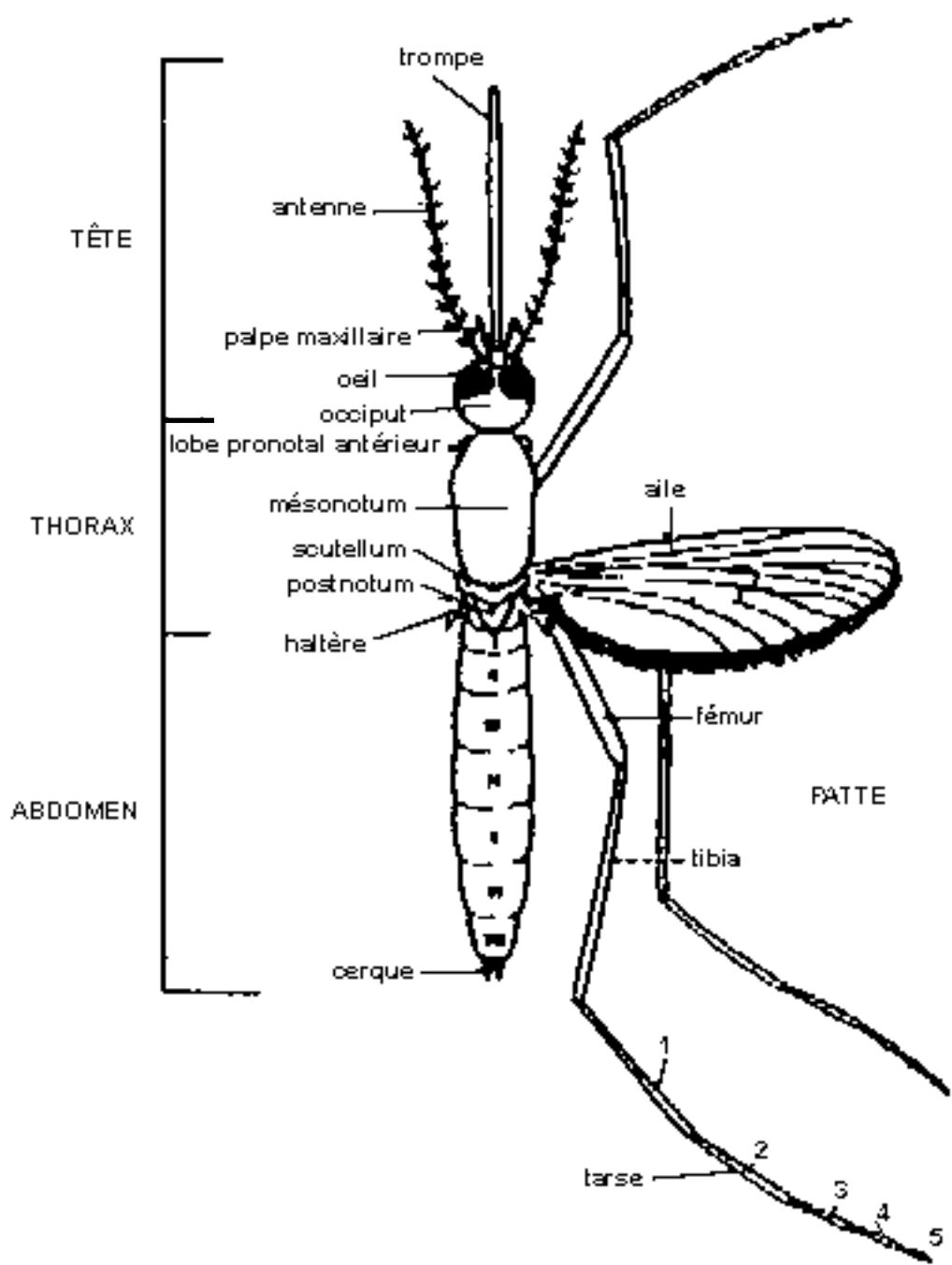


Figure 3 : Morphologie générale d'un moustique adulte

(D'après OMS 1973)

1.2.2. Différences entre Anophelinés et Culicinés

Les caractères distinctifs des deux sous familles sont illustrés dans le tableau n°1 :

- Œufs

Les œufs des Anophelinés sont pondus isolément avec des flotteurs à la surface de l'eau, tandis que ceux des Culicinés sont pondus également isolément pour certains genres comme Aedes mais ceux des Culex sont groupés en radeaux.

- Larves

Les larves des Anophelinés se trouvent parallèlement et immédiatement en dessous de la surface de l'eau. Ces dernières respirent directement l'air extérieur à travers de petits orifices appelés spiracles, ce qui leurs imposent cette position parallèle au repos. Par contre, les larves des Culicinés s'inclinent par rapport à la surface de l'eau. Ces larves se distinguent des Anophelinés par l'existence de siphon respiratoire long.

- Nymphes

Ces nymphes sont très mobiles et sont pourvues d'une paire de trompettes respiratoires. La trompette respiratoire des Anophelinés est courte avec une large ouverture tandis que celle des Culicinés est plus large et fine à ouverture étroite.

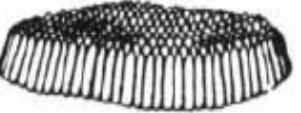
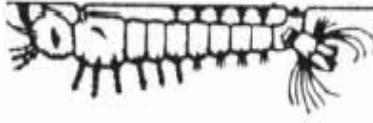
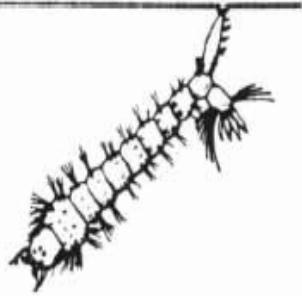
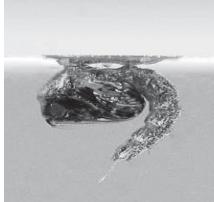
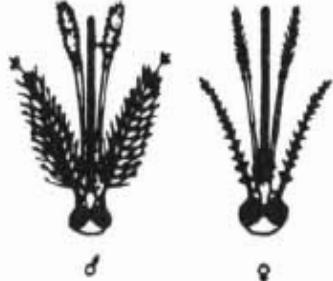
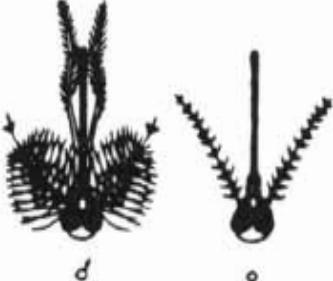
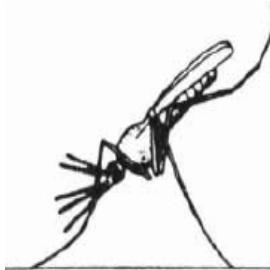
- Adultes

La différence se situe au niveau de la tête et du sexe. En effet chez les femelles, les palpes maxillaires des Anophelinés sont aussi longs que le proboscis alors que ceux des Culicinés sont plus courts que le proboscis. Chez les mâles, les palpes maxillaires des Anophelinés ont une extrémité renflée, mais ceux des Culicinés ont une extrémité effilée.

Leur position au repos n'est pas aussi identique : par rapport au support, les Anophelinés sont inclinés et les Culicinés sont parallèle.

Tableau 1 : Les principales caractéristiques morphologiques des Culicinées (genre : *Culex*) et des Anophelinées (genre : *Anopheles*)

[Source : Bruce-Chwatt; 1985]

Super-Famille	ANOPHELINAE	CULICINAE
Genre	<i>Anopheles sp</i>	<i>Culex sp</i>
Oeufs		
Larves		
Nymphe		
Tête		
Position au repos		

1.3. Cycle biologique du moustique

Un moustique passe par quatre stades de développement : œuf, larve, nymphe et adulte. C'est un insecte holométabole c'est-à-dire insecte à métamorphose complète car l'adulte, la larve et la nymphe ont des morphologies, mode de vie, et mœurs alimentaire très différentes (Guillaumot, 2009). Ainsi, le cycle biologique du moustique se décompose en deux phases :

- Une phase aquatique pré-imaginale (« avant les adultes » : œuf, larve et nymphe),
- Une phase aérienne (stade adulte).

Les différents stades de développement du moustique sont montrés dans la figure 4.

Après accouplement avec le mâle, la femelle fécondée fait un premier repas de sang pour prélever les nutriments nécessaires à la maturation de ses œufs. Elle n'a besoin d'être fécondée qu'une fois puisqu'elle dispose d'un système de stockage des spermatozoïdes qui lui permet de pondre de façon répétée jusqu'à la fin de sa vie. Environ trois jours plus tard, la femelle est prête à pondre et recherche activement un gîte d'eau stagnante propice au développement de ses larves. La majorité des gîtes sont créés par l'homme : ils peuvent être domestiques (vases d'appartement, soucoupes de pots de fleurs, etc.) ou péri-domestiques (ornements de jardins, coupelles de plantes vertes, vieux pneus, poubelles, puits, bassins, abreuvoirs pour animaux, récipients abandonnés, etc.). Il existe en effet des différences de typologie de gîtes larvaires selon les genres et espèces de moustiques : les gîtes larvaires sont très variées tels que les eaux douces ou saumâtres et eau minéral, les flaques d'eaux temporaires ensoleillées comme les rizières, d'autres espèces préfèrent les eaux permanent (le méandre, lac ...), dans les gîtes naturels comme les marais et marécages, tronc d'arbre creux pour *Anopheles*, eaux plutôt riches en matières organiques et les eaux plus ou moins pollués riches en ammoniaque (Chauvet, 1973) d'une manière générale dans les zones tropicales en milieu urbain pour *Culex*. (Guillaumot, 2009).

Le moustique femelle pond environ 50 à 400 œufs à la surface de l'eau. Les œufs peuvent être très résistants et s'adaptent aux conditions climatiques : si les conditions sont défavorables (sécheresse, basse température), ils entrent en phase de dormance (diapause), sinon ils sont prêts à éclore en 1 ou 2 jours pour laisser place à des larves d'environ 2 millimètres. Les larves subissent trois mues avant d'atteindre leur taille maximale d'environ 10 millimètres en 6 à 12 jours selon les conditions environnementales (Guillaumot, 2009 ; Institut Louis Malardé, 2012). Elles respirent généralement grâce à un siphon en se collant à la surface de l'eau et se nourrissent de plancton, de matière organique ou de petits animaux aquatiques.

Au bout de 6 à 10 jours, la larve de stade 4 donne naissance à une nymphe. C'est par la suite qu'a lieu l'émergence : la nymphe va s'ouvrir au niveau du thorax pour laisser le moustique adulte ou « imago » s'élever en déployant ses pattes, ses ailes et ses antennes pour ensuite s'envoler. Les moustiques adultes mesurent, selon les espèces, de 5 à 20 millimètres (le mâle est généralement plus petit que la femelle et possède des antennes plumeuses). Le mâle se nourrit exclusivement de jus sucrés. La femelle s'alimente non également de jus sucrés pour se procurer de l'énergie nécessaire au vol mais aussi de sang humain ou animal qui permet le développement des ovaires. Ce dernier est illustré par le cycle gonotrophique. (Guillaumot, 2009 ; Institut Louis Malardé, 2012)

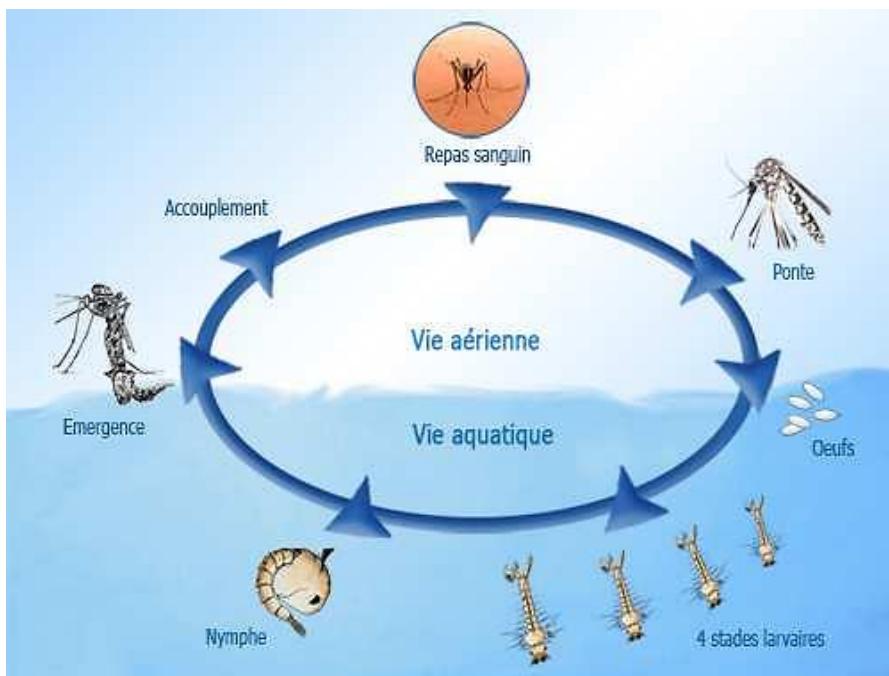


Figure 4 : Cycle de vie du moustique

(Institut Louis Malardé, 2012)

Le temps qui s'écoule entre le repas sanguin et la ponte des œufs s'appelle cycle gonotrophique dont la durée est différente chez les femelles qui n'ont pas encore pondus, les nullipares et celles qui ont déjà effectué au moins une oviposition : les pares (Robert et Carnevale, 2009). Etymologiquement gonotrophique appelé également trophogonique vient de deux mots: « gono » (gonade) et « trophique » (nourriture), autrement dit, le cycle gonotrophique est le développement et la maturation des œufs en fonction de la nourriture. Beklemishev (1940) a précisé trois phases du cycle gonotrophique :

- Phase 1: la recherche de l'hôte par la femelle à jeun pour son repas sanguin.
- Phase 2: l'ingestion et la digestion du sang accompagnée de la maturation des follicules ovariens.
- Phase 3: la recherche du lieu de ponte par la femelle gravide et l'oviposition.

Les phases 1 et 3 correspondent à une intense activité des femelles, contrairement à la phase 2 qui s'effectue au repos. La durée de chacune de ces 3 phases est influencée par le biotope (disponibilité des hôtes et des lieux de ponte), les conditions climatiques (température, humidité relative, photopériode) et micro-climatiques (intérieur/extérieur des maisons, etc.). (Figure 5)

Lorsque les œufs arrivent à maturité la femelle pond puis se nourrit à nouveau et le cycle recommence.

Dans la nature, l'évaluation de la durée de vie des adultes est complexe car de nombreux paramètres interviennent, notamment l'espèce et les conditions écologiques et climatiques générales et locales tels que le degré d'humidité et la température, l'influence des prédateurs, etc. La durée de vie des mâles est nettement inférieure à celle des femelles, et se limite à quelques jours, d'après Keener en 1945. Il faut noter que les Anophèles et les *Culex* sont nocturnes. Selon leurs abris Ross a classé les moustiques comme suit les moustiques domestiques (qui passent la plus grande partie de leur existence à l'intérieur de la maison), les moustiques sub-domestiques (qui entrent dans la maison pour se nourrir et après sort), les moustiques sauvages (qui ne pénètrent jamais dans la maison).

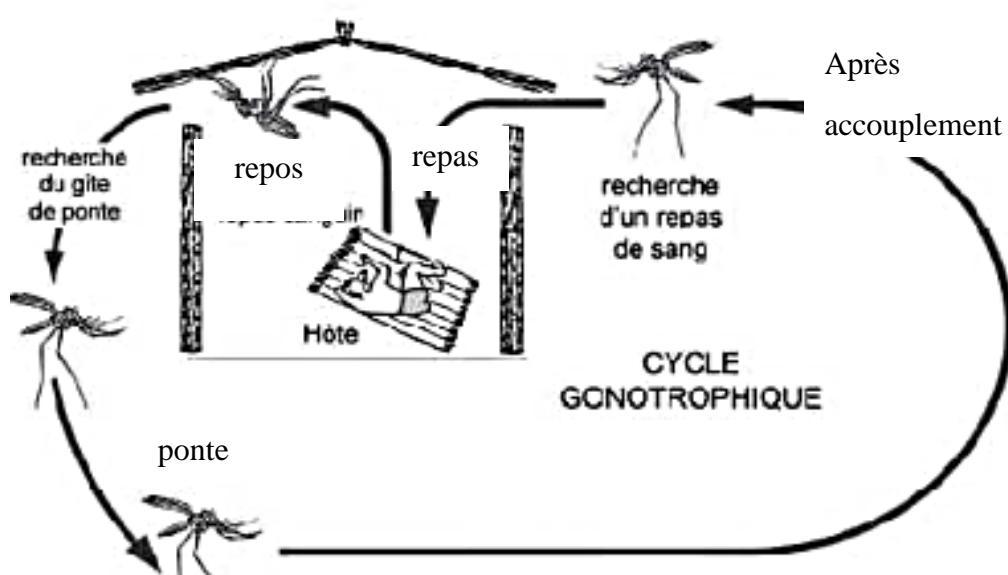


Figure 5 : Cycle gonotrophique du moustique

(Source : Carnevale et Robert, 2009)

1.4. Importances médicales de *Culex* et de *Anopheles*

Les moustiques du genre *Culex* sont présents en Afrique, au Moyen-Orient, en Inde, en Europe ou en Amérique du Nord. Ils sont les principaux vecteurs du virus de l'encéphalite japonaise (Bourgeade et Marchou, 2003) qui est une anthropozoonose virale du continent asiatique et du virus du Nil occidental isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda. L'espèce *quinquefasciatus* est le vecteur majeur de filariose dont l'agent est *Wuchereria bancrofti* dans les régions tropicales du monde et notamment dans les îles de l'Océan Indien incluant Madagascar (Tableau2).

Le paludisme, appelé aussi malaria, est la parasitose la plus répandue dans des pays tropicaux et subtropicaux. Il existe 300 à 500 millions de cas dont des millions de décès sont déclarés chaque année. Les Anophèles sont les principaux vecteurs de parasites du genre *Plasmodium*. (Pasvol et Casalino, 2004). Les espèces du complexe *An. gambiae* sont les principaux responsables du fléau qui sévit en Afrique tropicale (Tableau 2).

Tableau 2 : Vecteurs et maladies transmises

Moustiques vecteurs	Maladies transmises	Les régions touchées
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Filariose, encéphalite japonaise, virus du Nil	Afrique, îles d'océan indien, Sud-Est asiatique, Amérique du Nord
<i>Anopheles gambiae</i>	Paludisme, filariose	Afrique, Asie, Amérique latine, îles de l'Océan Indien

1.5. Mode de transmission du virus ou parasite par le vecteur

La transmission des maladies infectieuses est un phénomène complexe qui fait intervenir l'hôte, le vecteur et l'agent pathogène (Figure 6). La première étape du cycle de transmission d'une maladie vectorielle correspond à la contamination de l'arthropode par un malade dont l'agent pathogène circule dans son sang. Le sang contaminé est aspiré par le moustique. L'agent pathogène traverse ensuite la paroi de l'estomac pour se répliquer dans les glandes salivaires du vecteur. La phase qui sépare la contamination du moustique vecteur par un repas de sang et l'infection de ses glandes salivaire est appelée période d'incubation extrinsèque (Guillaumot, 2009). Lors de son prochain repas de sang, le moustique femelle

prélèvera du sang par le labre et injectera également de la salive par l'hypopharynx, comme à chaque piqûre puisqu'elle contient des composants anesthésiants et anticoagulants. La salive étant contaminée par l'agent pathogène présent dans les glandes salivaires, cette nouvelle piqûre inocule l'individu.

Le cycle de transmission est lancé, tant que le contact vecteur hôte-pathogène subsiste. L'étape de développement du pathogène dans le vecteur peut être plus ou moins longue selon l'espèce vectrice et la nature de l'agent pathogène. Ainsi, le moustique infecté peut transmettre les agents pathogènes durant toute sa vie à la génération suivante (transmission transovarienne). Il joue ainsi le rôle de vecteur et de réservoir (OMS, 2012).

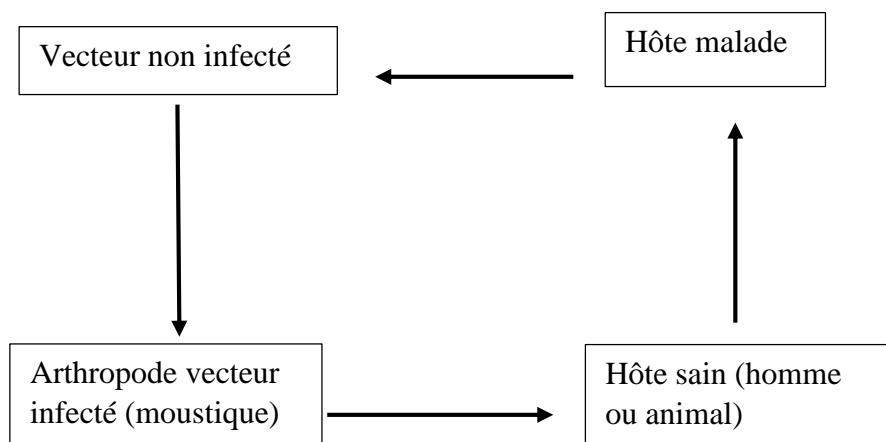


Figure 6 : relation entre hôte, vecteurs et agents pathogènes

1.6.1. Les conditions d'installation d'une maladie vectorielle

Pour qu'une pathologie à transmission vectorielle s'installe, plusieurs conditions doivent être exigées comme une population suffisamment dense de vecteurs compétents et d'hôtes, et l'introduction de l'agent pathogène par l'arrivée de sujets virémiques malades (cas d'importation). Certains facteurs sont également reconnus comme associés à un risque d'épidémie. Il s'agit de facteurs propres à la population (densité, immunité, facteurs socio-économiques, etc.), à l'environnement (vecteur, conditions climatiques, etc.) et à l'agent pathogène (sérotype, pathogénicité, etc.) (La Ruche *et al.*, 2010a).

2. Généralités sur les plantes étudiées

2.1. Description des familles et des genres

-Règne : VEGETAL

-Embranchement : SPERMAPHYTES

-Sous-embranchement : ANGIOSPERMES

-Classe : DICOTYLEDONES

- **Famille :** LAURACEAE

La famille des Lauracées est une famille de plantes angiospermes, qui comprend plus de 2000 espèces réparties en une cinquantaine de genres. Ce sont des arbres ou des arbustes à feuilles quasipersistantes, généralement aromatiques. Les feuilles sont alternes, plus rarement opposées, sub-opposées ou verticillées, sans stipule, les fleurs sont actinomorphes (symétrie radiale : étoile). (http://www.plantes-botanique.org/famille_lauraceae)

Parmi ces genres, il y a le genre *Ocotea* (Varongy). Il s'agit d'arbre ou d'arbuste persistant, aux feuilles alternes ou pseudo-verticillées, simples et aromatiques. Les fleurs régulières et unisexuées, sont assemblées en cymes axillaires ou en panicules subterminaux. Toutes se composent d'un périanthe possédant 6-8 tépales disposés sur deux verticilles. Les fleurs mâles sont constituées de 3 verticilles de trois étamines entourant un pistillode, tandis que les femelles le sont par quelques staminodes entourant un ovaire ovoïde, supère et uniloculaire. Les fruits sont des drupes ellipsoïdes à demi-enchassées dans le périanthe accrescent. (http://www.plantes-botanique.org/genre_ocotea). Les deux espèces utilisées dans cette étude sont : *Ocotea trichophlebia* et *Ocotea auriculiformis*. Ces plantes sont rencontrées dans les parties Nord et Est de Madagascar.

- **Famille :** VIOLACEAE

La famille des Violacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend 16 à 23 genres distribué sur 800 espèces. C'est le botaniste August Batsch qui crée cette famille sous le nom de Violariae dans son ouvrage « *Tabula affinitatum regni vegetabilis* » en 1802, d'après le nom classique latin du genre type *Viola*. Cette famille comprend des arbustes ou des herbes vivaces, rarement annuelles. Les tiges, dressées ou ascendantes, sont parfois rhizomateuses et

portent des feuilles alternes, rarement opposées, simples, aux formes les plus variées. Les fleurs ont un pétales inférieur transformé en éperon où se concentrent le nectar et sont habituellement hermaphrodites, rarement polygames et parfois cléistogames, c'est-à-dire que leur corolle n'éclot pas et que par conséquent la fécondation est nécessairement autogame. Le calice, formé de 5 sépales, est persistant et les 5 pétales inégaux ont des couleurs vives et variées. Certaines espèces sont très parfumées, tandis que d'autres ont des fleurs totalement inodores. Leur fruit est une capsule qui s'ouvre en 3 valves, ou une baie, et contient des graines munies d'un petit appendice. (<http://fr.m.wikipedia.org/wiki/Violaceae>)

L'espèce a étudié est *Rinorea arborea* (Hazompasy). C'est une plante qui n'a pas encore fait l'objet d'une étude. Elle est répartie dans les régions d'Analambana, Diana, Sava, Antsimo-Atsinanana, Haute Matsiatra, Vatovavy-Fitovinany, Betsiboka, Melaky, Sofia, Alaotra-Mangoro, Analanjirofo, Antsinanana, Androy, Anosy, Atsimo-andrefana, Menabe (<http://www.tropicos.org>)

- **Famille : THYMELAEACEAE**

D'après « La Flore Générique des Arbres de Madagascar », c'est une famille cosmopolite de taille moyenne représentée par 50 genres dont 7 sont rencontrés à Madagascar et 720 espèces dont 33 sont présents sur l'île. (George, 2001)

Ce sont essentiellement des arbres et arbustes, rarement des lianes ou des plantes herbacées, certains des zones arides, largement répandus des régions tempérées à tropicales, avec une diversité plus marquée dans l'hémisphère sud. Les feuilles sont simples, entières, les stipules sont absentes.

Le genre *Gnidia* fait partie des plantes utilisé dans les tests. Ce sont des sous arbrisseaux à souche forte avec beaucoup de rejets et résistant au feu. Ils ont des calices colorés, filiformes, allongés ; leur limbe à quatre divisions, couronné de quatre écailles. Ils ont huit étamines, un style, un stigmate et une noix monospermes. Ils se propagent par des boutures et des marcottes. (<http://fr.m.wikipedia.org/wiki/Thymelaeaceae>)

A notre connaissance, *Gnidia daphnifolia* est une espèce endémique de Madagascar, et n'avait pas fait l'objet d'étude biologique antérieure. Cette plante se trouve dans la région de Diana. Toutes les parties de la plante sont employées en pharmacopée malagasy. La décoction de la plante entière est utilisée pour soigner la diarrhée et les dysenteries, celle de l'écorce est

consommée pour lutter contre la fatigue et celle de tiges feuillées est recommandée pour le traitement des affections du foie comme l'hépatite ou la jaunisse.

2.2. Compositions chimiques des plantes étudiées

- Compositions chimiques de l'huile essentielle de *Rinorea arborea*

Le chromatogramme de l'huile totale de *Rinorea arborea* montre 108 composés dont 103 sont identifiées (95.37%) et les restes sont inconnus (4.63%). Les principaux composés sont les terpènes (11.29%), les sesquiterpènes (26.06%) et les Produits Oxygénés (58.02%). (Roseline, 2015)

- Compositions chimiques de *Gnidia daphnifolia*

D'après le criblage phytochimique de *Gnidia daphnifolia*, les alcaloïdes sont présents dans toutes les parties de la plante de *Gnidia daphnifolia*. Ils sont très abondants dans les tiges et les troncs, moyens dans les fleurs et faibles dans les feuilles, les écorces et ainsi que dans les racines ; les polyphénols sont présents dans toutes les différentes parties de la plante *Gnidia daphnifolia*. Leur quantité est très importante dans tous ses organes sauf dans ses troncs où la quantité est faible. (Zahara, 2015)

3. Généralités sur les huiles essentielles et extraits de plante

3.1. Huiles essentielles

3.1.1 Définitions

Voici une définition suivant la norme ISO 9235 (Matières premières aromatiques d'origine naturelle – vocabulaire) selon laquelle une huile essentielle est un « produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche. »

Voici d'autres définitions relatives aux huiles essentielles proposées par des chercheurs. En premier lieu, une huile essentielle est la fraction odorante volatile extraite des végétaux. C'est le parfum concrétisé de la plante, un véritable concentré. Elle peut être extraite de différentes parties d'un végétal : les feuilles (ex : l'eucalyptus), les fleurs (ex : la camomille), l'écorce (ex : la cannelle), le bois (ex : le cèdre), le zeste (ex : le citron) et bien d'autres encore : les graines, les baies, les fruits, le bulbe. (Festy, 2008)

En second lieu, l'huile essentielle, au sens strict du terme, est le produit obtenu à partir de la matière première végétale par les techniques traditionnelles de distillation ou d'expression à froid. Cette définition ne comprend pas les extraits aromatiques obtenus par d'autres

techniques d'extractions. L'essence est la substance aromatique sécrétée par la plante, qui par distillation devient une huile essentielle (Bonnafous, 2013)

Les huiles essentielles sont des produits de composition assez complexe, contenant des principes volatiles. Quant à l'extraction de ses composés volatils, il existe différents modes qui peuvent être classés en deux catégories (voir annexe 1) :

- Les méthodes classiques qui comprennent l'expression, l'hydrodiffusion, l'hydrodistillation, l'enfleurage, l'extraction par les solvants volatils ;
- Les méthodes modernes qui sont l'extraction par fluide supercritique et la distillation assistée au four micro-onde. (Rakotomalala, 2001 ; Smadja, 2004)

3.1.2. Composition chimique

Ce sont des mélanges complexes de composants appartenant principalement à deux groupes, caractérisés par des origines biogénétiques apparentes dont les terpinoïdes qui sont les plus volatiles : mono et sesquiterpènes, et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane. (Bruneton, 1993) (voir annexe 2)

3.1.3. Utilisation des huiles essentielles en tant que biopesticides

- Activité insecticide des huiles essentielles

L'effet insecticide des huiles essentielles par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les prédateurs des denrées entreposées ; de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer et de rentabiliser leurs activités insecticides (Isman, 1994).

- Activité acaricide, fongicide et bactéricide

Contre *Varroa jacobsoni*, parasite des colonies d'abeilles, plusieurs travaux ont été menés sur l'effet toxique de certaines essences et de leurs composantes. Contre les bactéries, contre les champignons, les alcools et les lactones sequiterpéniques sont d'excellents inhibiteurs (Calderone *et al.*, 1995).

3.2. Extraits de plante

3.2.1. Définitions

La définition même d'extrait végétal semble rester floue pour certains. Il n'est pas rare, en effet, que de simples poudres de plantes broyées soient commercialement appelées

« extraits », considérant que le fait de retirer l'eau par séchage des plantes autorise cette appellation.(<http://www.berkem.com/content/tout-sur-l-extraction-vgetale-25>)

Les extraits sont des préparations liquides (extraits fluides et teintures), de consistance semi-solide (extraits mous ou fermes) ou solide (extraits secs), obtenues à partir de drogues végétales généralement à l'état sec. (<http://www.floranet.pagesperso.fr>)

Quant à l'extraction, il existe différentes méthodes : macération à chaud, macération à froid, fractionnement liquide-liquide, lyophilisation. La dernière étape pour l'obtention d'un extrait c'est la filtration : qui consiste à séparer les particules solides qui se trouvent dans un liquide. (Voir annexe 4)

Les différentes familles chimiques qui peuvent exister dans une plante : les alcaloïdes, les flavonoïdes, les leucoanthocyanes, les anthocyanes, les anthraquinones, les tanins et polyphénols, les stérols insaturés et triterpènes, les polysaccharides, les coumarines, les héterosides cyanogènes, les saponosides et les cardenolides et bufadiénolides. (FONG *et al.*, 1974,1977)

3.2.2. Utilisation des extraits de plante en tant qu'insecticide

Les plantes peuvent fournir des solutions de rechange potentielles aux agents actuellement utilisés contre les insectes parce qu'elles constituent une source riche en produits chimiques bioactifs. Beaucoup d'efforts ont été donc concentrés sur les matériaux dérivés de plante pour les produits potentiellement utiles en tant qu'agents commerciaux de lutte contre les insectes (Kim *et al.*, 2003). Les plantes aromatiques sont parmi les insecticides d'origine botanique les plus efficaces (Shaaya *et al.*, 1997).

3.3. Les composés chimiques à activités insecticide et insectifuge d'origine végétale

- Les composés insecticides

Une revue bibliographique exhaustive de 1965 références (de 1923 à 2010) a été réalisée par Isabelle Boulogne en 2010, en utilisant les bases de données scientifiques, des bases de données de chimie, des bases de données botaniques et des livres pour identifier les composés chimiques à activité insecticide, et insectifuge issus d'espèces végétales.

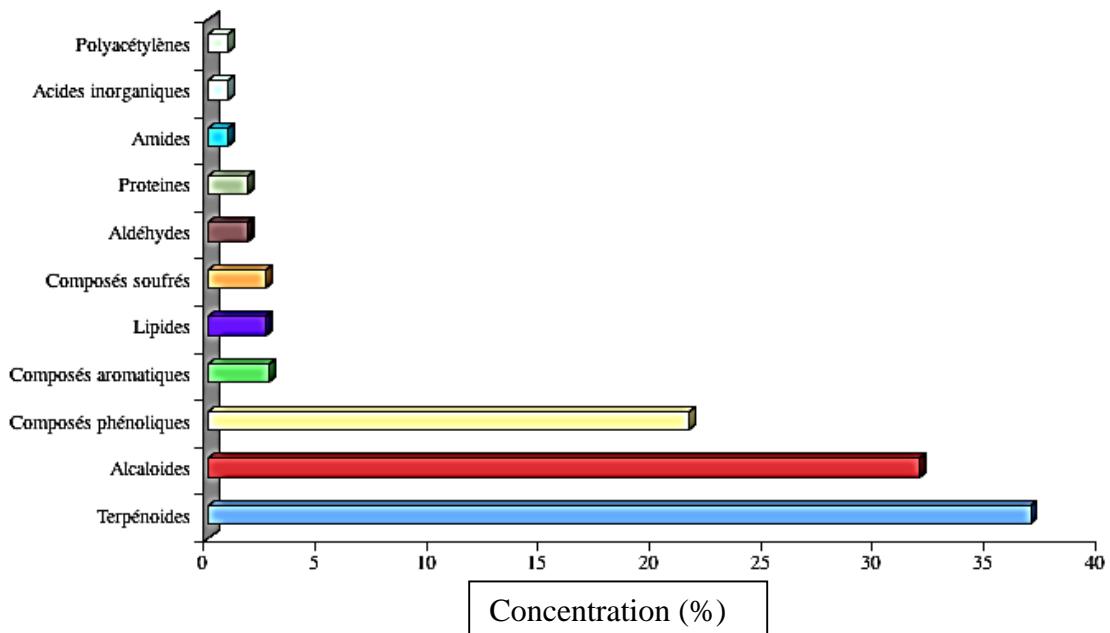


Figure 7 : Types de composés responsables de l'activité insecticide (en %)

(Boulogne, 2010)

La figure 7, présente le pourcentage des types de molécules responsables de l'activité insecticide trouvées dans la littérature. Elle indique que les trois types de molécules les plus souvent responsables de l'activité insecticide sont respectivement les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques.

- Les composés insectifuges

La figure 8, présente le pourcentage des types de molécules responsables de l'activité insectifuge trouvées dans la littérature. Elle indique que ce sont très majoritairement les terpénoïdes qui sont responsables de l'activité insectifuge, suivis par les composés phénoliques et les alcaloïdes. (Boulogne, 2010)

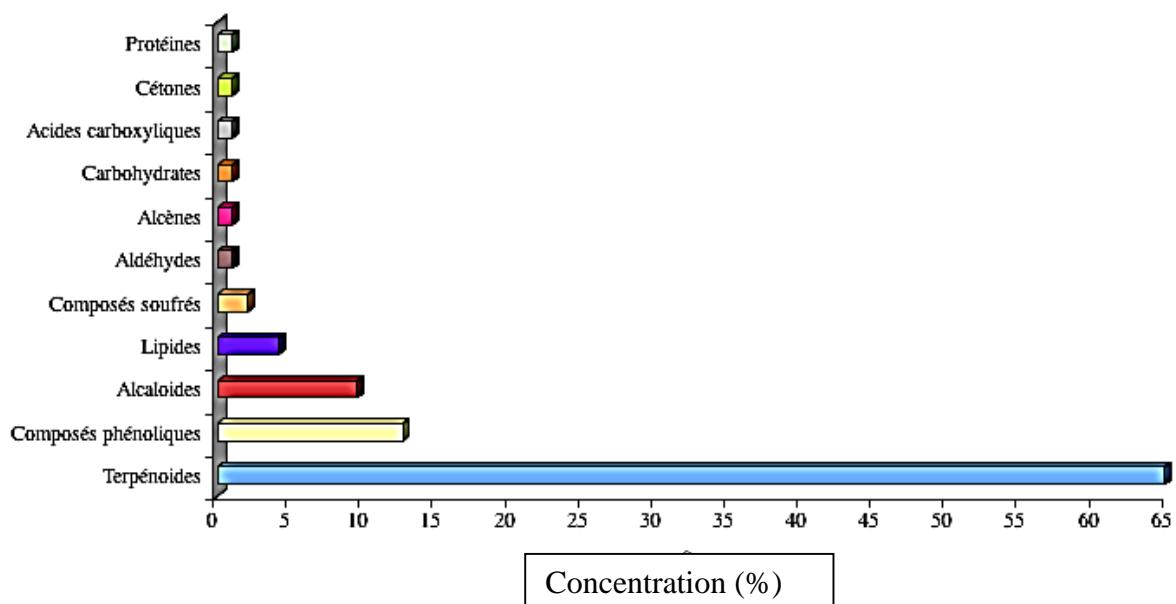


Figure 8 : Types de composés responsables de l'activité insectifuge (en %)

(Boulogne, 2010)

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériaux et méthodes

1. Sites de capture des femelles adultes de *An. gambiae s.l* et de collecte des larves de *Cx. quinquefasciatus*

Les sites sont situés dans la partie Sud-Est de la région Analamanga et sont répartis dans deux districts différents (Antananarivo II et Atsimondrano). Quelques sites urbains ont été prospectés, entre autres Ankatsos, Ampefiloha. Les Hauts-Plateaux se situent entre les latitudes de 18° à 21° 30' et les longitudes est de 46°15' à 47°45' (Lacan, 1953). Ces districts possèdent quatre saisons annuelles, bien définies par leurs caractéristiques particulières. Pour le site de capture des Anophèles adultes à Ankatsos : c'est une zone urbanisée, elle fait partie du 2^{ème} arrondissement de la commune urbaine d'Antananarivo. En général, les quartiers présentent des rizières qui, dans sa partie supérieure, sont bordées par des champs de légumes. Les riziculteurs y pratiquent également la riziculture inondée et d'autres cultures maraîchères. Pour le site de collecte des larves de *Culex* à Ampefiloha : c'est aussi une zone urbanisée, il fait partie du 4^{ème} arrondissement de la commune urbaine d'Antananarivo, aux alentours du chemin de fer, il n'y a que des canaux d'évacuation d'eaux par les maisons situées autour.

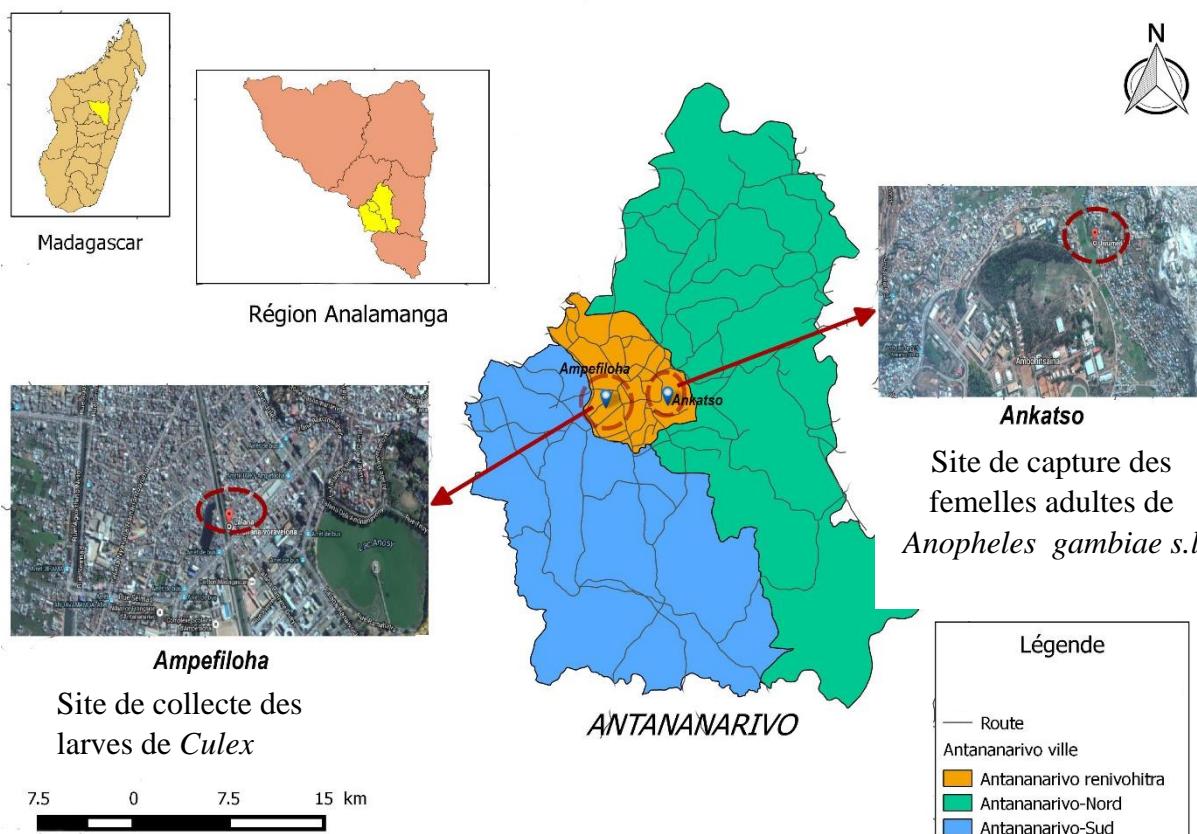


Figure 9 : Sites de captures des larves de *Cx. quinquefasciatus* et des femelles adultes de *An. gambiae s.l*

2. Matériels

2.1. Matériels biologiques

- Les moustiques : *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae s.l.*

- Les huiles essentielles (*O. tricophlebia* , *O. auriculiformis* et *Rinorea arborea*) ; les extraits (*O. auriculiformis* et *Gnidia daphnifolia*)

2.2. Matériels pour les collectes des larves de *Culex* et captures de *Anopheles* adultes

- Matériels de collecte des larves de *Culex quinquefasciatus*

- Godet

- Bouteille plastique



Figure 10 : Godet

- Matériels de capture des Anophèles adultes :

- Aspirateur à bouche

- Gobelets à voile retenue par une élastique et bouchés avec du coton

- Glacière

- Lampe torche

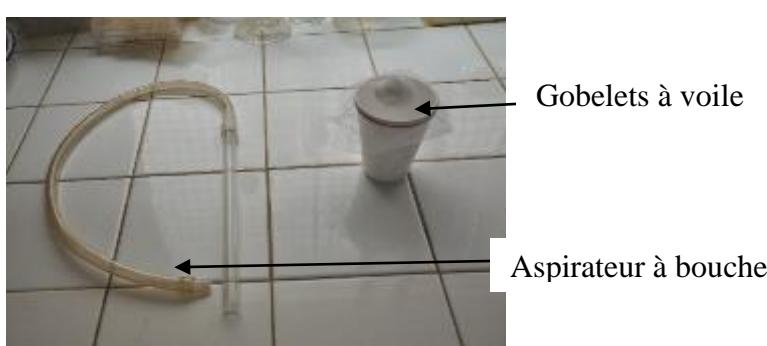


Figure 11 : Aspirateur et gobelet à voile (à gauche) ; glacière (à droite)

2.3. Matériels d'élevage: insectarium

L'insectarium du CNRE est composé de plusieurs cages en tulle moustiquaire qui sont utilisées pour l'élevage des adultes. A l'intérieur de certaines cages se trouvent des cuvettes contenant les nymphes ; des serpillières mouillées sont placées sur l'étagère et des cuvettes remplies d'eau sont mises par terre pour maintenir l'humidité entre 70 à 80%; la température est maintenue à 27°C par un radiateur. Un thermomètre et un hygromètre sont placés dans l'insectarium pour la surveillance des températures et d'humidité.

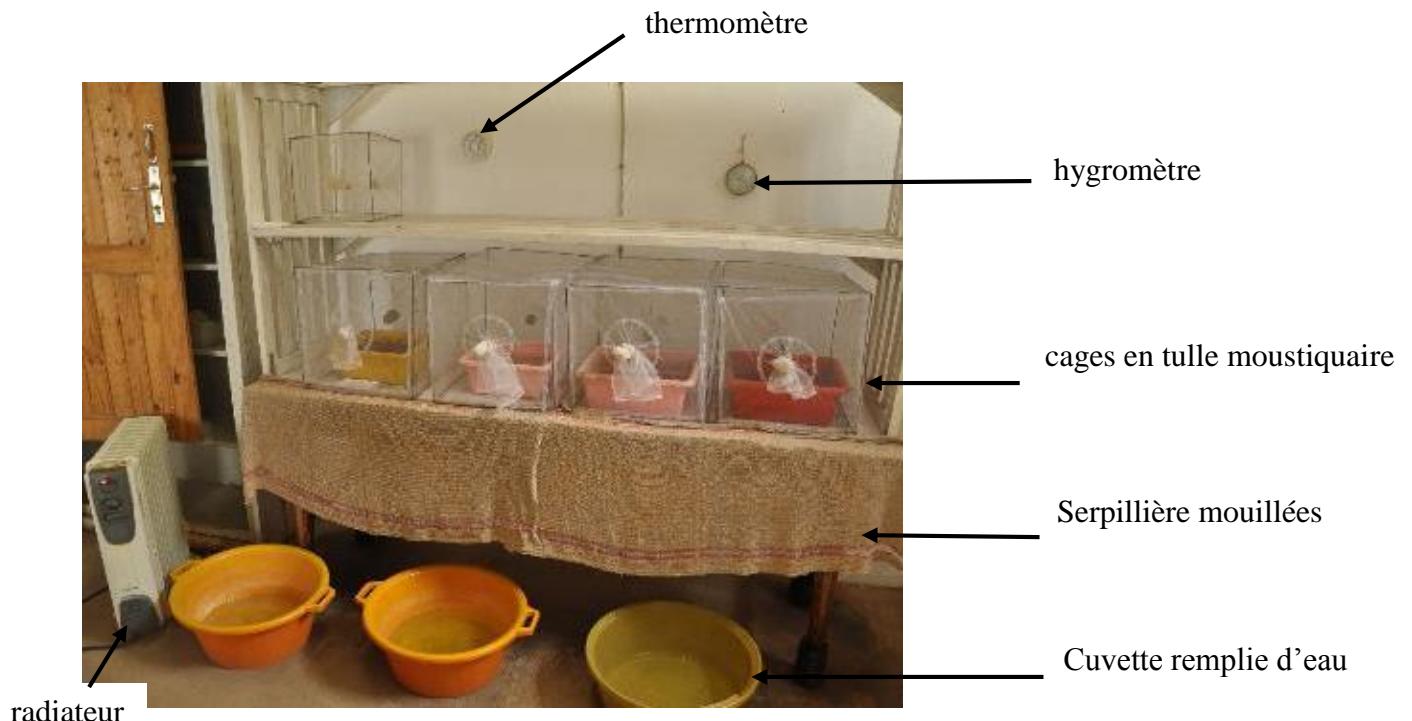


Figure 12 : Insectarium

2.4. Matériels pour les tests de répulsion :

➤ Les produits testés :

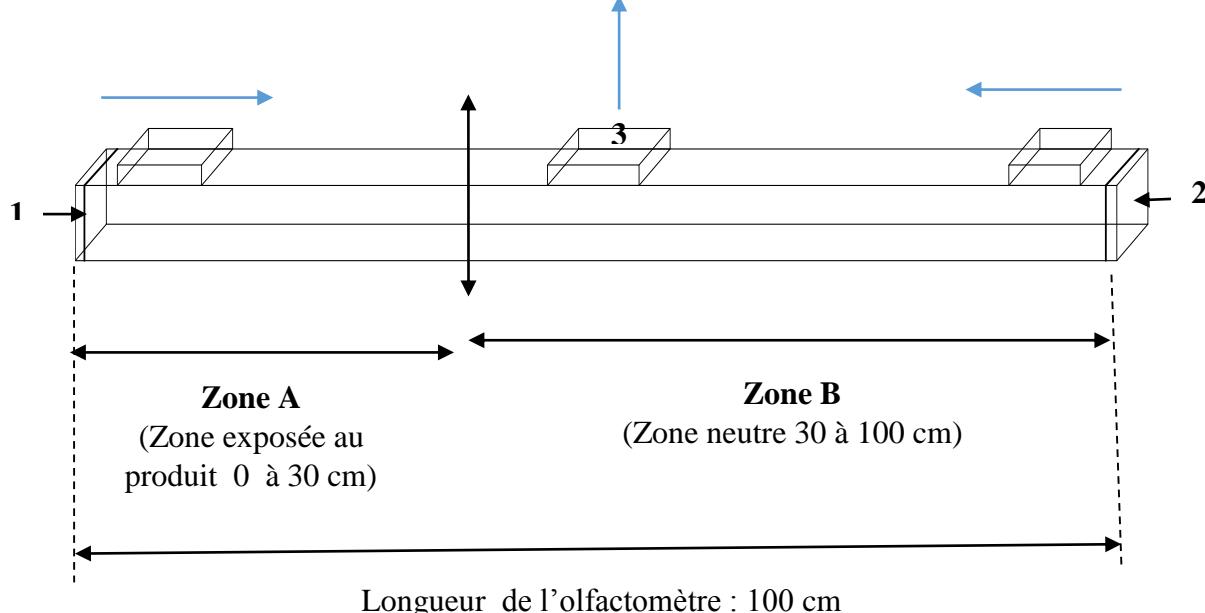
- Les huiles essentielles (fournis par le laboratoire de chimie du CNRE) :

Ocotea trichophlebia, *Ocotea auriculiformis*, *Rinorea arborea* : méthode d'extraction par hydrodistillation (voir annexe 2)

➤ Matériels utilisés pour les tests de répulsion :

- Olfactomètre (ce matériel est inspiré du tube OMS)

L'olfactomètre est un long tube en verre de forme carrée (de 5 cm de côté) de 1m de long, l'olfactometre sert à tester l'effet repulsif d'une huile essentielle. Les deux extrémités sont munies de ventilateur, et au centre se trouve un aspirateur. Ces ventilateurs soufflent de l'air vers le centre et l'aspirateur au centre aspire de l'air vers l'extérieur. Ces deux ventilateurs et aspirateur fonctionnent avec un adaptateur qui est réglé en 4,5 V et le flux d'air dégagé égale à 0,18 m/s. Cet olfactomètre est divisé en deux zones il y a la zone A (zone d'exposition de 0cm jusqu'à 30cm vers le centre) et la zone B (le reste). (Figure 13)



1, 2 : emplacement du ventilateur

3 : emplacement de l'aspirateur

→ : Direction de l'air ($v = 0,18 \text{ m/s}$)

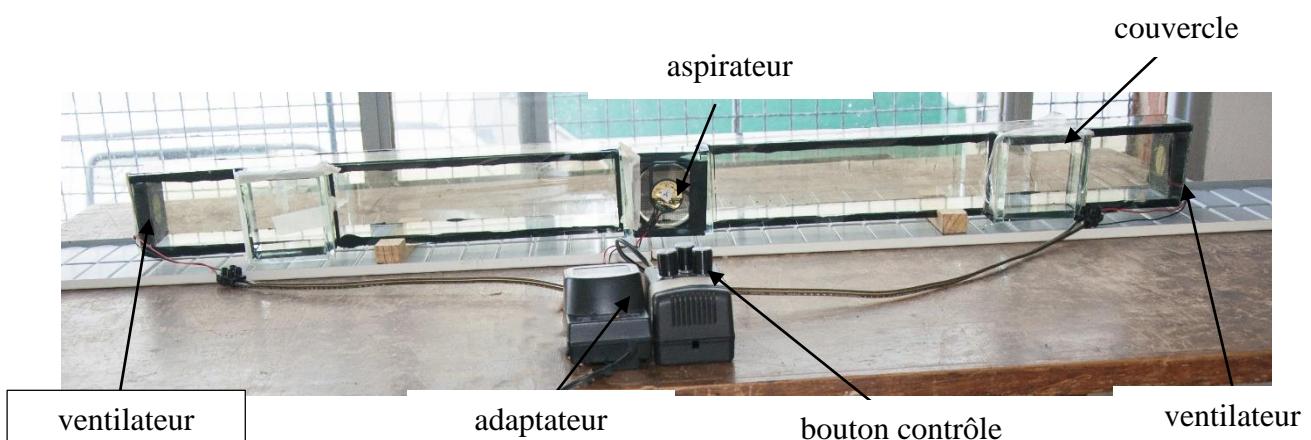


Figure 13 : Olfactomètre

- Micropipettes 200 et 100 μ l
- Papier Whatman N° 1 coupé en 2cm \times 2cm
- Alcool 45 °C



Figure 14 : Micropipettes (à gauche) et papier Whatman (à droite)

2.5. Matériels pour les tests de mortalité

➤ Les produits testés :

- les extraits de plantes (fournis par le laboratoire de chimie du CNRE) :

Ocotea auriculiformis 20 mg/ml (type d'extraction : hydroalcoolique, à chaud, à froid, voir annexe 2) ; *Gnidia daphnifolia* 20mg/ml (type d'extraction : hydroalcoolique, voir annexe 2)

➤ Les matériels utilisés :

- Tubes OMS : composés de deux tubes en plastiques de 44 mm de diamètre et de 125mm de hauteur. Chaque tube est muni en une extrémité d'un écran de 16 mailles (figure 15). Un des tubes est marqué d'un point rouge utilisé comme « tube d'exposition » car ils servent à mettre les moustiques en contact avec l'insecticide, l'autre tube marqué d'un point vert sert de « tube d'observation » : pour l'observation après les expositions. Le tube d'observation est connecté à une plaque d'une ouverture de 20mm de diamètre par lequel en introduit les moustiques. Ces plaques sont fixés sur les deux côtés les bouts libres de deux tubes OMS tel que le tube d'exposition sur la face à bande rouge et le tube d'observation du côté de la plaque à bande verte.

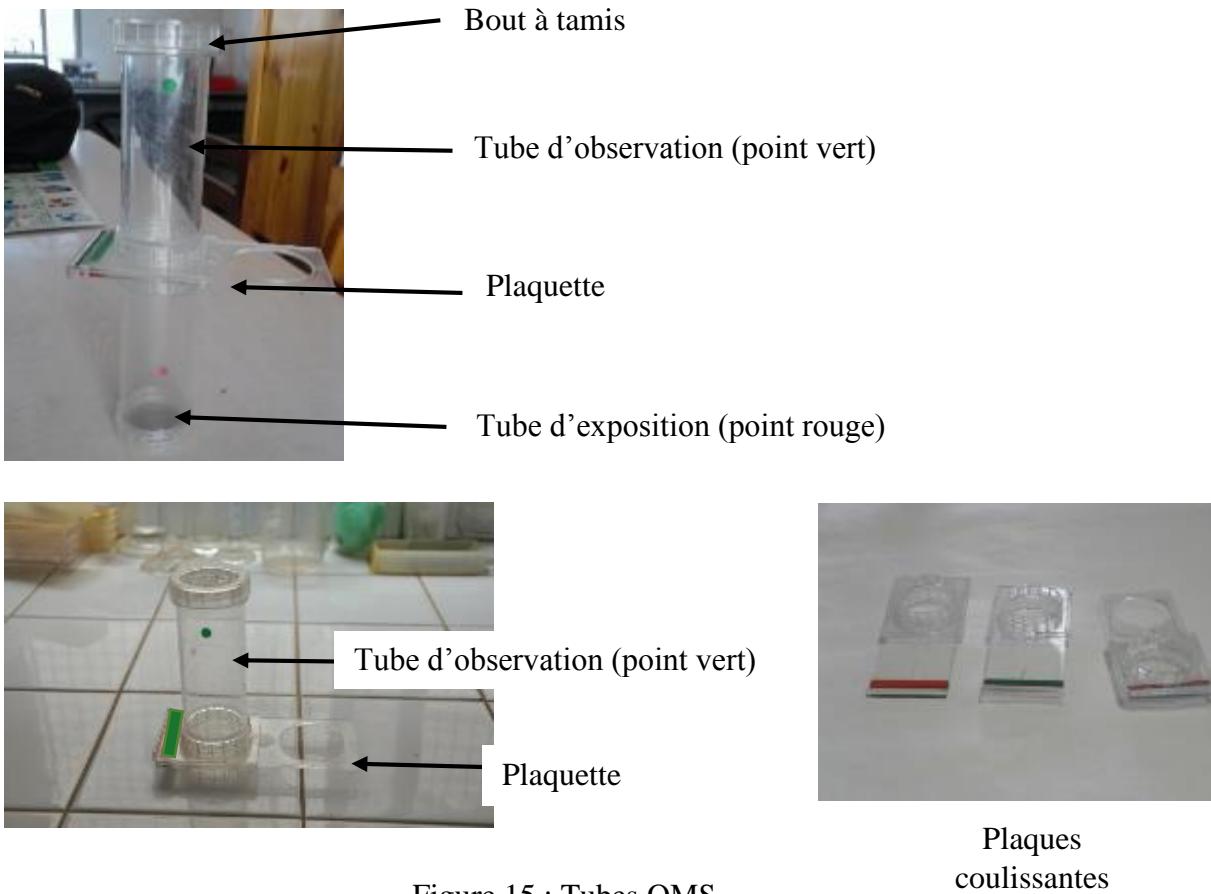


Figure 15 : Tubes OMS

- papier Whatman N° 1 coupé en 2cm × 2cm
- aspirateur à bouche : nécessaire pour transférer les moustiques de la cage au tube OMS (ou éprouvette en plastique). On peut également introduire les moustiques dans les tubes OMS
- micropipettes : 100 et 200 µl

3. Méthodes

3.1. Méthode pour la collecte des larves de *Culex quinquefasciatus*

La collecte des larves a été effectuée à 9h du matin à Ampefiloha, dans les canaux d'évacuation d'eaux.

La méthode avec le godet est habituellement utilisée pour collecter des échantillons dans des plans d'eau relativement étendus tels que les marécages, les fossés par exemple. Elle consiste à abaisser le godet doucement suivant un angle d'environ 45° pour minimiser la perturbation, puis ratisser la surface de l'eau ou alors abaisser suffisamment le godet pour que l'eau et les larves y pénètrent. Il faut veiller à ne pas éclabousser quand on fait sortir le godet. (Figure 16)

Les larves sont recueillies à l'aide d'une pipette et transférées dans des récipients en plastique avec l'eau de gîtes et mis dans une glacière pour le transport au laboratoire.



Figure 16 : Collecte des larves de *Culex quinquefasciatus* à Ampefiloha

3.2. Méthode pour la capture des adultes de *Anopheles gambiae s.l.*

La capture des moustiques adultes a été effectuée à Ankatso à 9h du matin, dans les gîtes de repos à l'extérieur des maisons dans notre cas, les moustiques sont capturés dans une étable.



Figure 17 : Gîte de repos (étable) de l'espèce *Anopheles gambiae s.l.*

À l'aide d'une lampe torche, on éclaire l'endroit où peuvent se cacher les moustiques. Après les avoir repérer, aspirer l'insecte à l'aide de l'aspirateur à bouche puis le transférer dans le gobelet en carton recouvert d'une voile et bouché par un morceau de coton.

Avant de placer le gobelet dans une glacière (pour éviter de tuer certains individus lors du transport), un bout de coton imbibé de sucre est déposé sur le voile du gobelet en carton pour nourrir les individus, puis ramené au laboratoire.



Figure 18 : Capture des Anophèles adultes dans les étables

3.3. Méthodes d'élevage de *Culex quinquefasciatus* et de *Anopheles gambiae s.l.*

- Elevage de *Culex quinquefasciatus*

Après les collectes des larves, elles sont mises dans des bacs contenant de l'eau de gîte. L'eau de gîte a été remplacée tous les 2 jours pour éviter la formation des pellicules. Les larves ont été nourries avec des biscuits en poudre. Au bout de quelques jours, les larves du stade IV subissent des mues nymphales et se transforment en nymphes. Les nymphes ont été séparées puis transférés dans des bacs, ensuite, elles sont placées dans des cages d'élevage. Après quelques jours, les nymphes se transforment en adultes.

Les adultes issus de l'émergence ont été mis dans une nouvelle cage où ils sont engorgés avec un cobaye pendant une demi-journée. Le repas sanguin est nécessaire pour la maturation des œufs. Après 24h, un pondoir a été placé dans la cage. Ce pondoir est constitué de papier filtre humide (pour garder l'humidité). Les papiers filtres recouverts d'œufs ont été recueillis et mis dans un bac contenant de l'eau de gîtes pour l'éclosion. Les œufs éclos donnent de petites larves. Les nymphes issues des larves ont été recueillies puis transférées dans des cuvettes remplies d'eau. Ensuite ces cuvettes sont placées dans des cages en tuile moustiquaire, en attendant leur émergence. Les nymphes se transforment en adultes après un à deux jours de leur mise en cage et l'on obtient des imagos constituant la génération F1. Les moustiques sont ensuite placés dans des cages. Les adultes sont nourris avec du coton imbibé de solution sucré suspendu à l'intérieur de la cage d'élevage.

➤ Elevage de *Anopheles gambiae s.l.*

Arrivées au laboratoire, les femelles ont été mises dans des cages en tuile moustiquaire et nourris avec du coton imbibé de solution sucré suspendu à l'intérieur de la cage d'élevage. Celles qui étaient dans un état d'engorgement ont effectué leurs pontes dans des boîtes de pétri, contenant du coton couvert du papier filtre (Whatman n°1) humide qu'on appelle pondoir. Mise à leur disposition un cobaye a été systématiquement offert comme repas de sang aux femelles

adultes; leur engorgement est effectué dans le noir. Les œufs pondus dans le pondoir sont mis dans des bacs contenant de l'eau de puits ou de l'eau distillée pour l'éclosion ; après éclosion, les larves ont été nourries avec des biscuits en poudre et de l'ombrage ; les nymphes ont été recueillies dans des cuvettes et placées dans des cages en attendant leur émergence. A l'émergence de la première génération F1, les moustiques sont placés dans des cages de dimension 30 x 30 cm ; constitués d'une armature métallique soutenant les parois de tulle recouvertes de toile moustiquaire. Une des faces du cadre ainsi recouverte comporte une ouverture pourvue d'une manche permettant de faire passer les bras pour effectuer les diverses manipulations à l'intérieur de la cage.

Nous avons réalisé pour les moustiques adultes deux types d'alimentation:

- Pour les mâles, une alimentation de maintien qui était constituée d'eau sucrée. Nous avons imbibé de cette solution sucrée un coton et nous l'avons suspendu à l'intérieur de la cage.
- Pour les femelles, En plus de l'alimentation du maintien, une alimentation au sang dans le noir (cage recouverte de tissu mouillé noir) a été réalisée sur cochon d'inde, une fois toutes les 48h. Une partie du corps du cobaye est dépourvu de poils pour faciliter le repas du sang, ce dernier était placé dans la cage. Une boîte de pétri contenant du papier filtre imbibé d'eau a été placé à l'intérieur de la cage pour servir de pondoir.



Mise en cage des imagos



Incubation des œufs



Collecte des nymphes



Emergence



Engorgement des moustiques



Figure 19 : Etapes d'élevage des moustiques (*Cx. quinquefasciatus* et *An. gambiae s.l.*) dans l'insectarium

3.4. Méthodes d'identification des moustiques

- Identification de *Culex quinquefasciatus*

L'identification des espèces d'adulte de moustiques a été faite avec les clés d'identification des moustiques adultes de Madagascar par Didier Fontenille, juin 1989. Il mesure de 3 à 6 mm de long, caractérisé par les écailles scutales ordinairement plus chamois : cellule de la fourche supérieure chez la femelle à peine 2,5 fois aussi longue que son tronc ; palpe du males moins long. Voici les clés faite par Didier Fontenille pour l'identification de *Culex quinquefasciatus* :

- la trompe n'est pas annelée de pâle
- sur le sternite il y a des bandes longitudinales
- sur le tibia postérieur il n'y a pas de bande longitudinale



Figure 20 : Femelle de *Cx. quinquefasciatus*

(Source : <http://www.moustique.org/Culexquinquefasciatus>)

- Identification de *Anopheles gambiae s.l.*

L'identification des spécimens vivant se fait individuellement dans des tubes à hémolysé, sous la loupe binoculaire et en se servant des clés de détermination d'Alexis Grjebin (1966) basés sur des critères morphologiques (ailes, pattes, palpes).

An. gambiae s.l. :

- Ailes : ailes largement pâles ; taches costales étendues ; frange alaire tachée de pâle au point d'aboutissement des nervures 3, 4, 5, 6 ; une tache claire supplémentaire sur la 3^{ème} aire sombre de la nervure 1.
- Palpes : lisses à 3 bandes pâles, la bande blanche apicale des palpes est large, et recouvre le 5^{ème} article et l'apex du 4^{ème} article; la bande médiane est étroite, mesurant moins de la moitié de l'apicale, et recouvrant l'apex du 3^{ème} et la base du quatrième article. La bande basale est égale à la médiane, et recouvre l'apex du 2^{ème} article.
- Pattes : Fémurs, tibias et premier article des tarses tachetés de pâles.

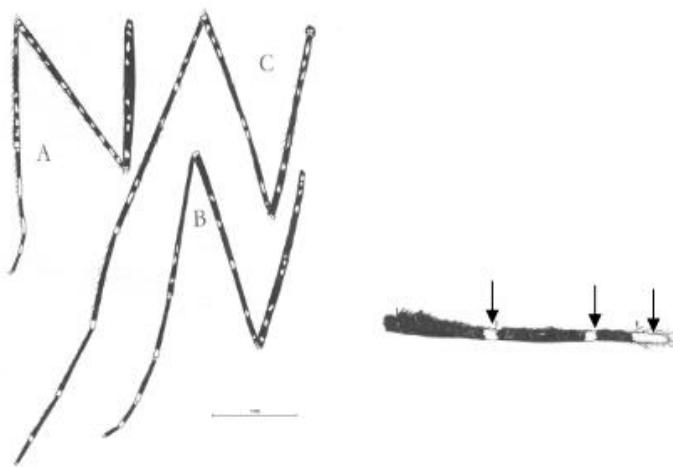


Figure 21 : Pattes (à gauche) et palpe (à droite) d'*An. gambiae s.l.*
(Grjebin, 1966)

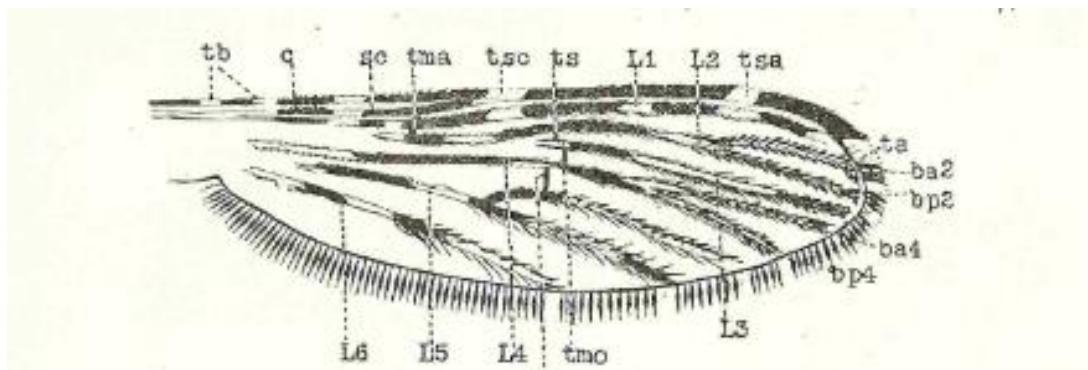


Figure 22 : Aile d'*An. gambiae s.l.*
J. DOUCET (1951)

ba. 2 - 4, branche antérieure de la deuxième et quatrième nervure ; bp. 2 - 4, branche postérieur de la deuxième et de la quatrième nervure ; c., nervure costale ; L 1-6, première à sixième nervure longitudinale ; sc., nervure sous-costale ; ta., tache apicale ; tb., tache basale ; tma., nervure transverse marginale ; tmo., nervure transverse moyenne ; tp., nervure transverse postérieur ; ts., Nervure transverse surnuméraire ; tsa., tache subapicale ; tsc., tache sous costale

3.5. Méthodes pour les tests de répulsion

L'effet répulsif des huiles essentielles ont été évaluées sur les adultes de *Cx. quinquefasciatus* et *An. gambiae s.l* ; 5 lots de 10 moustiques ont été utilisés pour le test, et le test est répété cinq fois ; au total 200 moustiques ont été utilisés pour le test de répulsion d'un produit. Quatre concentrations différentes (100%, 50%, 25%, 12%), ont été testées, avec un lot de 10 moustiques, pour le test à vide. La dilution successive pour obtenir la gamme de concentration s'est fait selon N'Guessan *et al.* (2003 à 2007) voir annexe 3 ; chaque huile

essentielle a été diluée avec de l'alcool 45°. En effet selon les expériences et les résultats préliminaires, l'alcool à 45°C n'a aucun effet répulsif ou toxique sur les moustiques adultes. (Rahanira R. : Chef d'unité de substances naturelles du CNRE)

Les moustiques femelles ont été aspirés dans la cage à voile, puis introduites dans les gobelets à voile par lots de 10 moustiques grâce à l'aspirateur. Elles ont été ensuite introduites dans l'olfactomètre en enlevant le ventilateur au centre. Une fois introduite, le ventilateur est remis en place. Avant de placer le papier filtre imprégné d'huile essentielle dans la zone A avec la gamme de concentration respectives et le papier filtre contenant de l'alcool à 45°C dans la zone B, on laisse les moustiques une minute dans l'olfactomètre : ce temps est appelé temps d'adaptation.



Capture des femelles de moustiques



Introduction des moustiques dans l'olfactomètre



Imprégnation du produit sur papier Whatman n°1



Introduction du produit

Figure 23 : déroulement du test de répulsion sur l'olfactomètre

Des tests préliminaires ont été réalisés, 5 mn sont largement suffisantes pour le test, puis après on note le nombre de moustiques se trouvant dans les deux zones (zone A et zone B); le pourcentage de répulsion est calculé suivant la formule de Mc Donald *et al.* (en 1970):

$$PR(\%) = \frac{NB-NA}{NB+NA} \times 100$$

Où NA : Nombre de moustiques présents dans la partie exposée au produit

NB : nombre de moustiques présents dans la partie neutre

Le pourcentage de répulsion moyen pour chaque huile essentielle est calculé et attribué à l'une des différentes classes répulsives variant de 0 à V (Mc Donald *et al*, 1970) qui sont présentés par le tableau n°3 suivant :

Tableau 3 : Indice de répulsion

Classe	Intervalle de répulsion	propriétés
Classe 0	PR \leq 0,1%	N'est pas répulsif
Classe I	0,1 < PR \leq 20%	Très faiblement répulsif
Classe II	20 < PR \leq 40%	Faiblement répulsif
Classe III	40 < PR \leq 60%	modérément répulsif
Classe IV	60 < PR \leq 80%	Répulsif
Classe V	80 < PR \leq 100%	Très répulsif

Après les tests de répulsions avec les huiles essentielles, des tests de rémanences des huiles essentielles sont faites pour savoir la durée de l'efficacité du produit ; seules les concentrations qui ont une propriété répulsive et très répulsive ont été testées, le test a été effectué toutes les 2 heures pendant 6 heures.

3.6. Méthodes pour les tests de mortalité

Le test de mortalité est fait selon la norme de l'OMS en 2003 :

- Les moustiques femelles sont soigneusement prélevés dans les cages d'adultes à l'aide de l'aspirateur (avec une manipulation douce pour éviter de les tuer par traumatismes), 25 moustiques sont transférés dans le tube d'observation au travers de l'ouverture centrale. On laisse les moustiques reposer 60 minutes dans le tube d'observation, les tubes sont posés verticalement, tamis en haut; (figure 26)
- Les papiers Whatman n° 1 ont été imprégné de l'extrait : concentration de 20mg/ml avec les doses respectives de 150µl ; 200µl ; 250µl, et sont placés à l'intérieur des tubes d'exposition, fixés à l'extrémité du tube (figure 25). Un lot de 25 moustiques a été testé pour chaque extrait de plantes à raison de 3 répliques, un lot identique de moustique dans un autre tube contenant un papier filtre non traité qui a servi comme témoin.

- En connectant le tube d'exposition et l'observation (y compris le tube témoin), l'ouverture est dégagée en coulissant la plaque et en le soufflant délicatement pour faire passer les moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition, ce dernier est refermé en repoussant la plaque, le tube de mise en observation est ensuite détaché.

Les tubes d'exposition sont placés à la verticale, tamis en haut, pendant une heure dans l'insectarium, et durant une heure on note l'effet knock-down toutes les 15 minutes.

- A la fin de cette période, les moustiques sont à nouveau transférés dans le tube d'observation et laisser pendant 24 heures dans l'insectarium. On place un coton hydrophile imbibé de jus sucré de 5 à 10% sur maille du tube puis on place le tube au laboratoire à une température de 23 ± 2 et une humidité de $50\pm 10\%$. La mortalité est enregistrée après 24 heures, les moustiques incapables de se déplacer sont comptés comme mortes.



Figure 24 : Capture des moustiques femelles



Figure 25 : Préparation des tubes d'exposition



Figure 26 : Transfert des moustiques du tube d'observation vers le tube d'exposition



Figure 27 : Mise en observation à l'insectarium

➤ Conditions de validation du test

Suivant le taux ou pourcentage de mortalité dans le lot témoin, le test peut être valide ou non.

- ⇒ Lorsque le pourcentage de mortalité en témoin est inférieur à 5% : le test est valide.
- ⇒ Lorsque le pourcentage de mortalité en témoin est supérieur à 20% : le test est invalide.
- ⇒ Lorsque le pourcentage de mortalité en témoin est compris entre 5% et 20% : on doit procéder à des corrections.

La correction du taux de mortalité du test se fait suivant la formule d'Abbott:

$$\text{Pourcentage de mortalité corrigé} = \frac{\% \text{ de mortalité observé} - \% \text{ de mortalité témoin}}{100 - \% \text{ de mortalité témoin}} \times 100$$

➤ Interprétation des mortalités

Lorsque le taux de mortalité des moustiques est supérieur ou égal à 98% : on a une population sensible. (OMS, 2011)

3. Analyses des données

Les résultats obtenus sont analysés par le logiciel xl stat 2014. Les données obtenues sur les tests à vide et témoins ont été analysés par le test t pour voir la différence significative entre les deux zones A et B. Pour les tests de sensibilités, les données obtenus ont été représenté par une courbe de régression logistique (log probit) à effet dose pour déterminer la CL50 et la DL50.

Chapitre 3 : Résultats

Chapitre 3 : Résultats

1. Durée de cycle biologique de *Culex quinquefasciatus* et de *Anopheles gambiae s.l*

➤ Pour *Cx. quinquefasciatus*

Les adultes qui émergent ont été élevés à l'insectarium pour les tests. On a noté pour chaque lot le nombre d'œufs pondus, la durée d'incubation, la durée de stade larvaire, la durée de stade nymphale, et la durée du cycle sont notés. Le nombre d'œufs est en moyenne de 250 ± 50 par femelle, la durée d'incubation des œufs est de 3 à 5 jours à une température variant entre 23 à 26°C (<27°C) et d'une humidité relative variant de 50 à 60% (<70-80%). Le rapport de nombre d'œuf éclos par rapport au nombre total récoltés ont permis de déterminer le taux d'éclosion (Te) qui est de 60%. La durée moyenne des stades larvaires (L1, L2, L3, L4) est de 10 à 12 jours et celle qui sépare les différents stades larvaires varient de 2 à 4 jours. Le taux d'émergence (Tem) est le rapport entre le nombre des adultes et le nombre des nymphes obtenues : ce taux est de 40%. Les proportions d'émergence des adultes mâles est de 33 % et 66% pour les femelles (sexe ratio : 0,50). On note que les mâles émergent avant les femelles. La longévité des adultes obtenues en génération F1 est de 15 à 20 jours. Elle dépend de la variation des conditions externes telles que la température et l'humidité. La durée du cycle de développement de *Cx. quinquefasciatus* est de 16 à 20 jours.

Tableau 4 : Durée de développement des différents stades de *Culex quinquefasciatus*

Stades	durées
Œufs	3-5 jrs
Larves (L1-L2-L3-L4)	10-12 jrs
Nymphes	3-4 jrs
Durée du cycle : 16 à 20 jrs	

➤ Pour *An. gambiae s.l.*

L'élevage de groupe ne permet pas de suivre avec précision le passage d'un stade larvaire à un autre. Il nous a permis de noter pour chaque lot, la durée de stade larvaire, la durée du stade nymphal, et la durée du cycle. L'étude de la première génération d'*An. gambiae s.l* au laboratoire a permis de déterminer le nombre moyen d'œufs pondus dans les cages à $m = 200 \pm 50$. La durée d'incubation des œufs est de 48 h pour une température comprise entre 23 à 26°C et une humidité relative entre 50 à 60 %. Le rapport du nombre d'œufs éclos par rapport

au nombre d'œufs total récoltés a permis de calculer le taux d'éclosion (Te) (Laboudi *et al.*, 2014) ; il est de 80 %. La durée moyenne des stades larvaires (L1-L2-L3-L4) est de 8 à 9 jours (L1 à L2 : 2jrs ; L2 à L3 : 2jrs ; L3 à L4 : 2jrs ; L4 : 2 à 3jrs); durant le développement de différents stades larvaires, le taux de survie larvaire a été calculé par rapport au nombre de larves qui arrivent au stade IV, il est estimé de 70 %. Le stade nymphale a une durée de 2 à 4 jours puis il y a lieu l'émergence des imagos, Le taux d'émergence (Tem) est de 50%, c'est toujours les mâles qui émergent en premier lieu puis les femelles un peu plus tard après 24 h, environ la proportion de la colonie issue d'un même lot d'œufs est composée en moyenne de 30 % mâle et 70 % femelle (sexratio[c'est le rapport de proportion entre les deux sexes à l'émergence] : 0,42). En moyenne le cycle de développement de *An. gambiae s.l.* dure de 15 à 18 jours.

Tableau 5 : Durée de développement des différents stades de *Anopheles gambiae s.l*

Stades	durées
Œufs	2 jrs
Larves (L1-L2-L3-L4)	8-9 jrs
Nymphes	2-4 jrs
Durée du cycle : 15 à 18jrs	

2. Test à vide et témoin

Les tests à vide et témoin ont été réalisés avant le test de répulsion et répétés trois fois, au total 60 moustiques sont testés, les résultats obtenus sur les tests à vide et témoin ont été représentés par le tableau n° 6 :

Tableau 6 : Test à vide et témoin

Nombre de moustiques		
	Zone A	Zone B
Test à vide	6	4
Témoin	5	5

D'après les résultats obtenus, le nombre de moustiques présents dans les deux zones (zone A et zone B) sont presque égale, d'après le test statistique effectué qui donne la valeur de p ($P=0,20$; $P \geq 0,05$), il n'y a pas de différence significative entre le témoin et le test à vide.

Les moustiques se répartissent aléatoirement dans les deux zones de l'olfactomètre ce qui confirme que le dispositif n'est pas biaisé.

3. Effets répulsifs et effets insecticides des huiles essentielles sur les moustiques :

Au total, 600 moustiques sont utilisés pour le test de répulsion, dont 400 *Culex quinquefasciatus* et 200 *Anopheles gambiae s.l.*

- Effets répulsifs de *O.trichophlebia* et *O.auriculiformis* vis-à-vis de *Culex quinquefasciatus*

Le pourcentage de répulsion des différentes concentrations des huiles essentielles est récapitulé dans le tableau n°7. Après 5 minutes d'exposition, l'activité insectifuge sur les différentes concentrations 12%, 25%, 50%, 100% a donné les pourcentages de répulsion respective 16%,48%,60%,88% pour *O. trichophlebia* et 32%, 52%, 68%, 96% pour *O.auriculiformis*. L'effet répulsif des huiles essentielles sur Culex dépend de la concentration, c'est-à-dire l'effet répulsif sur Culex augmente lorsque la concentration du produit augmente.

Tableau 7 : Pourcentage de répulsion avec *O.trichophlebia* et *O.auriculiformis* vis-à-vis de *Culex quinquefasciatus*

Huiles essentielles	Concentration en%	Pourcentage de répulsion	Propriétés
<i>O.trichophlebia</i>	12	16	Très faiblement répulsive
	25	48	Modérément répulsive
	50	60	Répulsive
	100	88	Très répulsive
<i>O.auriculiformis</i>	12	32	Faiblement répulsive
	25	52	Modérément répulsive
	50	68	Répulsive
	100	96	Très répulsive

- Test de la durée d'efficacité répulsive de *O.trichophlebia* et *O.auriculiformis* vis-à-vis de *Culex quinquefasciatus*

Au total, 120 *Cx. quinquefasciatus* sont utilisés pour ce test.

D'après les résultats obtenus sur les tests de rémanence de *O.trichophlebia* et *O.auriculiformis* effectués sur *Cx. quinquefasciatus*, l'efficacité des produits sur les moustiques diminuent au cours du temps (figure 28 et 29). La durée de l'efficacité de ces deux produits est très courte, car au bout deux heures seulement, elles ne sont plus répulsives.

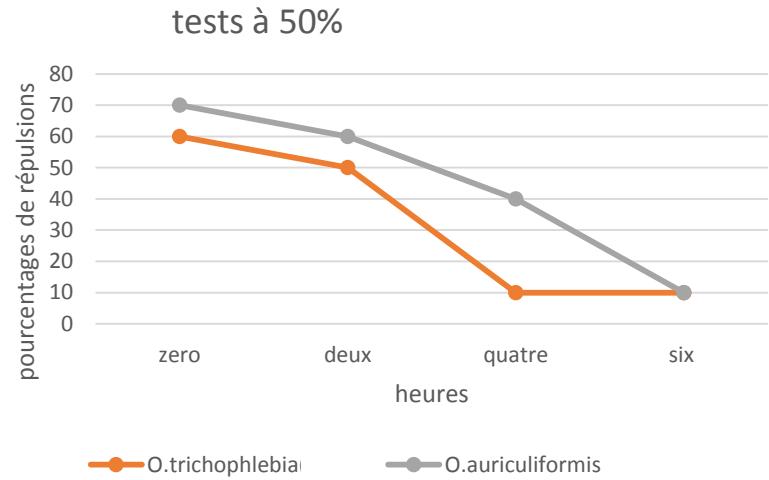


Figure 28 : Courbe de durée d'efficacité répulsive de *O.tricophlebia* et *O.auriculiformis* à 50%

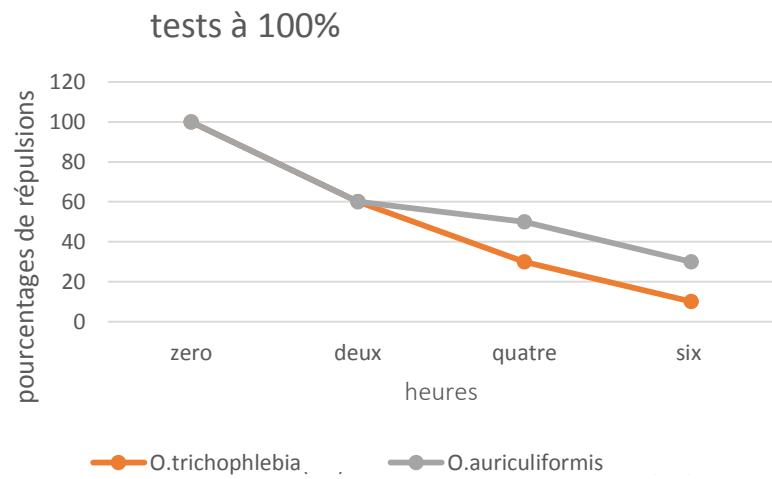


Figure 29 : Courbe de durée d'efficacité répulsive *O.tricophlebia* et *O.auriculiformis* à 100%

- Effet insecticide des huiles essentielles de *O.trichophlebia* et *O.auriculiformis* vis-à-vis de *Culex quinquefasciatus*

Pour le test de mortalité avec les huiles essentielles, seules les concentrations qui ont une propriété faiblement répulsive et modérément répulsive sont testées (12% et 25%); 150 moustiques ont été testés par produit. Au total, 300 *Cx. quinquefasciatus*.

A une concentration de 12 % et 25 %, le taux de mortalité des adultes de *Cx. quinquefasciatus* est faible. Pour *O. trichophlebia* le tm est de 8% et de 44% ; et pour *O. auriculiformis* le tm est de 20% et de 36% (tableau 8).

D'après ces faibles taux de mortalités, les deux huiles essentielles n'ont pas un effet insecticide sur *Cx. quinquefasciatus*.

Tableau 8 : Test de mortalité de *Cx. quinquefasciatus* avec l'huile essentielle de *O. trichophlebia* et celle de *O. auriculiformis*

Huiles essentielles	<i>O. trichophlebia</i>		<i>O. auriculiformis</i>	
Concentration (%)	12	25	12	25
Taux de mortalité (%)	8	44	20	36

➤ Effet répulsif de *Rinorea arborea* vis-à-vis de *An. gambiae s.l*

Après 5 minutes d'exposition, l'activité insectifuge sur les différentes concentrations 12%, 25%, 50%, 100% a donné les pourcentages de répulsion respective 12%, 40%, 60%, 84% pour *Rinorea arborea*, ceci montre que le pourcentage de répulsion augmente en fonction de la concentration.

Tableau 9 : Pourcentage de répulsion avec *Rinorea arborea* vis-à-vis de *An. gambiae s.l*

Huile essentielle	Concentration en %	Pourcentage de répulsion	Propriétés
<i>Rinorea arborea</i>	12	12	très faiblement répulsive
	25	40	Modérément répulsive
	50	60	Répulsive
	100	84	Très répulsive

- Test de durée d'efficacité répulsive de *Rinorea arborea* vis-à-vis de *An. gambiae s.l*

Au total, 60 *An. gambiae s.l* sont testés.

D'après les résultats obtenus lors du test de rémanence de l'huile essentielle de *Rinorea arborea* sur *An. gambiae s.l*, l'effet répulsif de l'huile essentielle diminue au cours du temps, très visible sur la figure 30. Au bout de deux heures, elle n'est plus répulsive.

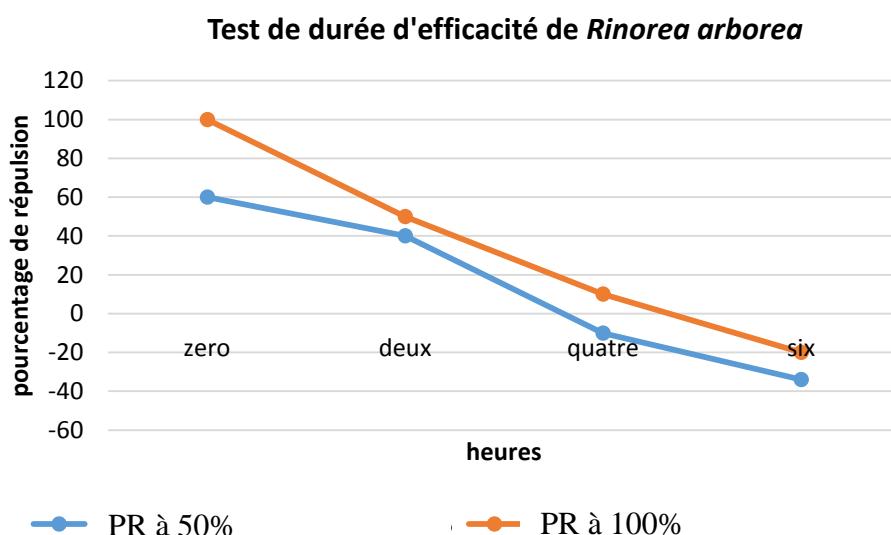


Figure 30 : Courbe de durée d'efficacité répulsive de *Rinorea arborea* à 50 et à 100%

- Effet insecticide de l'huile essentielle de *Rinorea arborea* vis-à-vis de *An. gambiae s.l*

Au total, 150 *An. gambiae s.l.* sont testés.

Après 24h, le taux de mortalité de l'huile essentielle *Rinorea arborea* est très élevé à faible dose : Tm = 88% à 12% et Tm = 100% à 25%. (Tableau 10)

Tableau 10 : Test de mortalité de *An. gambiae s.l* avec l'huile essentielle *Rinorea arborea*

Huiles essentielle	<i>Rinorea arborea</i>	
concentration	12	25
Taux de mortalité (%)	88	100

4. Effets insecticides des extraits de plantes sur les moustiques

Les tests de mortalité ont été effectués avec les femelles 4 à 13 jours issue d'élevage pour *Cx. quinquefasciatus*, et avec les femelles de *An. gambiae s.l.* de souches sauvages. Au total 950 moustiques ont été utilisés pour le test, dont 450 sont *Cx. quinquefasciatus* et 500 sont *An. gambiae s.l.*

- Test de mortalité avec l'extrait de *O.auriculiformis* qui ont été extrait en trois mode d'extraction (extraction hydroalcoolique, à chaud et à froid) sur *Cx. quinquefasciatus*

Après 24h, les tests de sensibilités avec l'extrait d'*O.auriculiformis* révèlent qu'à chaque type d'extraction, les résultats sont différents : comparé à l'extraction à chaud et à froid, l'extraction hydroalcoolique est très efficace, avec DL50 estimé à 168 µl. Et la DL50 de l'extraction à chaud est estimé à 1972 µl, et pour l'extraction à froid la DL50 est égale à 975µl. L'extraction à chaud et à froid ne sont pas efficaces même à forte dose.

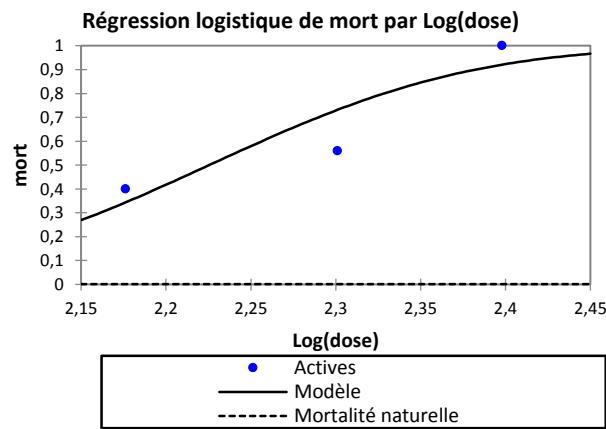


Figure 31 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait hydroalcoolique d'*O. auriculiformis*

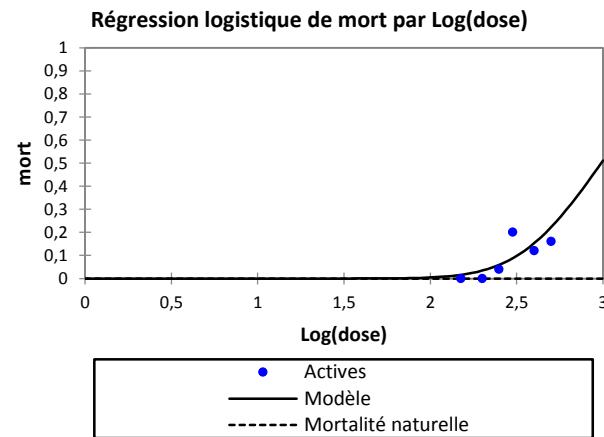


Figure 32 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait à froid d'*O. auriculiformis*

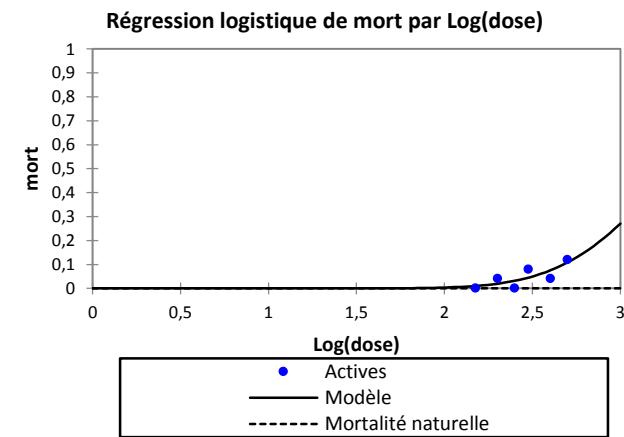


Figure 33 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait à chaud d'*O. auriculiformis*

- Test de mortalité avec l'extrait de racine, tige, écorce, feuille de *Gnidia daphnifolia* : mode d'extraction hydroalcoolique sur *An. gambiae s.l.*

Après 24h, les tests de mortalité avec les extraits de racine, tige, écorce, feuille de *Gnidia daphnifolia* révèlent que les résultats sont presque semblables. A faible dose, c'est-à-dire à 100 µl, le taux de mortalité est de 20% ; et avec une dose égale à 150 µl, le taux de mortalité est de 44% ; et lorsque la dose est égale à 200 µl, le taux de mortalité est égal à 80% ; et pour 250 µl, on a observé un taux de mortalité de 98% (voir annexe 5). Le taux de mortalité augmente avec la dose. Pour l'extrait de racine la DL50 est égale 139 µl pour l'extrait de tige, la DL50 est égale à 137 µl; pour l'extrait d'écorce, la DL50 est égale à 154µl; pour l'extrait de feuille, la DL50 est égale à 160 µl (Figure 34, 35, 36, 37).

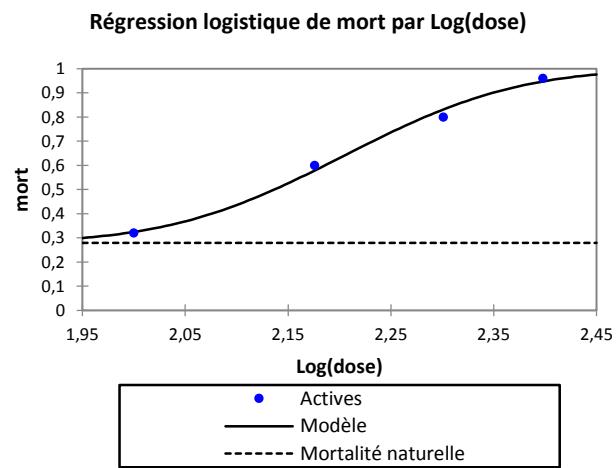


Figure 34 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de tige de *Gnidia daphnifolia*

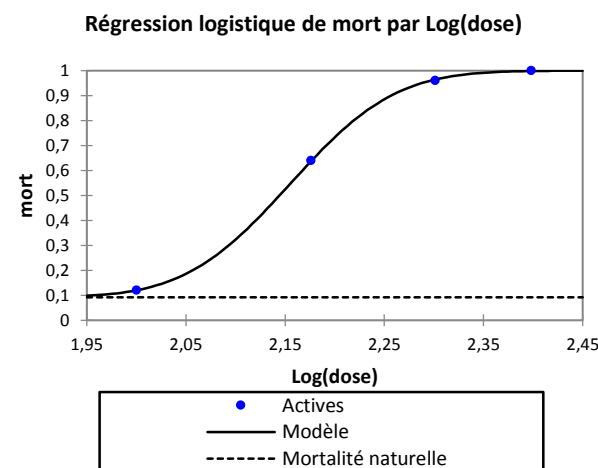


Figure 35 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de racine de *Gnidia daphnifolia*

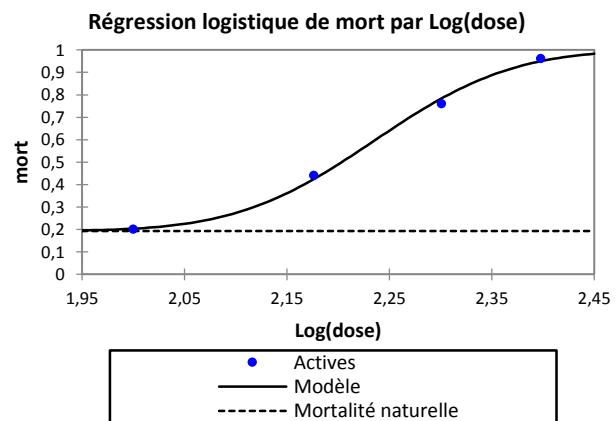


Figure 37 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait de feuille de *Gnidia daphnifolia*

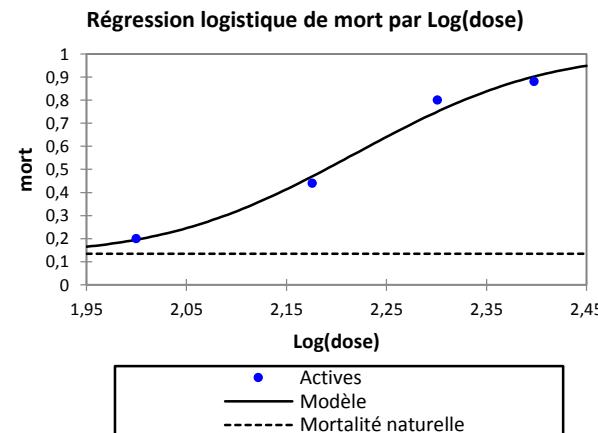


Figure 36 : Courbe montrant la régression logistique de mort par dose avec l'extrait d'écorce de *Gnidia daphnifolia*

Chapitre 4: Discussions

Chapitre 4: Discussions

1. Durée de cycle biologique des moustiques

La durée de développement des moustiques, de l'œuf à l'adulte varie suivant les conditions du milieu. La durée du stade aquatique dépend étroitement de la température. Au cours de l'élevage, le descendant F1 ont été obtenus au bout de treize à dix-huit jours pour *Anopheles gambiae s.l.*

Pour *An. gambiae s.l.* seule la génération F1 a été obtenue au cours de cet élevage. Par contre, Diop et al. (1997) ont pu obtenir trois générations : F1, F2, F3 avec des rendements respectifs de 93,9%, 90,6%, 92,9%.

Plusieurs facteurs peuvent être la cause de cette non obtention d'autres générations que F1 :

- la température de l'insectarium : la baisse de la température malgré l'effort de garder la température à plus de 27°C. La coupure de courant électrique est l'un des problèmes fréquemment rencontrés soit dû au fusible endommagé par surtension ou une sous-tension, soit due à la coupure de la résistance chauffante. Holstein et al., (1952) ont rapporté que la durée de développement préimaginal d'*An. gambiae* est influencée par la température de l'eau, elle est de 6 à 8 jours pour une eau de 30 à 34 °C et de 12 à 16 jours pour une eau de 24 °C. Concernant la durée de la vie préimaginaire, Golvan (1983) a noté que plus la température de l'eau se rapproche de l'optimale (25 à 30 °C) pour l'espèce, plus l'évolution larvaire est rapide. Une observation similaire a été rapportée par Mouchet et Carnevale (1991) qui ont noté qu'*An. gambiae s.l* a accompli son cycle préimaginal en moins de 10 jours dans les mares temporaires ensoleillées où la température de l'eau dépasse 30 °C.

- l'alimentation des larves : l'utilisation ponctuelle des nourritures riches en protéines et en substances comme le poudre de biscuit permet d'avoir une bonne survie des larves. La durée de développement larvaire est liée étroitement à la qualité et la disponibilité de nourritures. La durée du stade nymphal a été courte (2 à 4 jours), mais le taux de mortalité des nymphes a été très élevé. Ceci peut être expliqué par le fait que les nymphes sont très sensibles aux variations des conditions environnementales : la température, l'humidité relative, la photopériode et l'apport en oxygène et ainsi que la qualité des nourritures pendant le quatrième stade larvaire.

- l'humidité relative : au cours de l'élevage, l'hygrométrie n'a pas été maintenue stable à 70 à 80 % selon la norme de l'OMS en 1994. Cela est dû à la coupure de courant et d'eau par le JIRAMA.

2. Mesure de répulsion des huiles essentielles

A notre connaissance, *O.trichophlebia*, *O.auriculiformis*, *Rinorea arborea*, sont des espèces endémiques de Madagascar, et n'avaient pas fait l'objet d'étude biologique antérieure.

La température, l'humidité et la vitesse du vent sont les facteurs qui peuvent influencer l'efficacité des répulsifs : à une température élevée, une humidité élevée et avec une forte vitesse du vent l'effet répulsif est généralement faible. Ensuite, la volatilité des produits joue également un rôle important dans l'efficacité de ces répulsifs, plus la volatilité du produit est élevée, plus le moustique le détecte rapidement, par contre sa durée d'action reste faible. (Maibach et al., 1974). La température et l'humidité sont maintenues constantes durant les tests, la vitesse du flux d'air à l'intérieur de l'olfactomètre est de 0,18 m/s. D'après les recherches de Festy D., en 2008, les huiles essentielles sont très volatiles.

Les résultats obtenus, mettent en évidence un effet « concentration » pour les trois huiles essentielles, c'est-à-dire, l'effet de l'huile essentielle varie en fonction de la concentration, plus on augmente la concentration, plus l'effet est positif sur les moustiques. Cas d'*O.trichophlebia*, *O.auriculiformis* sur *Culex quinquefasciatus*, à concentration 12%, elles sont très faiblement répulsives, et à partir de 25%, elles sont devenues modérément répulsives, et à 100%, elles sont très répulsives. Cas de *Rinorea arborea* sur *Anopheles gambiae s.l.*, à partir de 25%, elle est modérément répulsive, à 100% elle est très répulsive. La concentration du produit est un autre facteur important qui conditionne l'efficacité des huiles essentielles.

D'après ces résultats, *O.trichophlebia*, et *O.auriculiformis* ont provoqué un effet répulsif sur *Culex quinquefasciatus* et *Rinorea arborea* a aussi provoqué un effet répulsif sur *Anopheles gambiae s.l.* même à faible concentration (25%). D'après, la classification de Mc Donald, à faible concentration, ces huiles essentielles sont de classe III. Elles sont de classe V à 100%.

D'après les recherches de Boulogne (2010), ces plantes contiennent tous majoritairement des terpénoïdes. Ces derniers sont responsables de l'activité insectifuge. D'après le chromatogramme réalisé par Roseline (2015), le taux de terpénoïdes dans l'huile essentielle de *Rinorea arborea* est de 40% environ. Pour *Ocotea*, le chromatogramme n'a pas encore été effectué.

D'après le test de rémanence des trois huiles essentielles, les effets répulsifs diminuent au cours du temps. Sur *Cx. quinquefasciatus*, l'efficacité de *O. trichophlebia* dure 2h, pour *O. auriculiformis* c'est 4h. Sur *An. gambiae s.l.*, l'efficacité de *Rinorea arborea* ne dure que 2h. Ce qui confirme encore que les huiles essentielles sont très volatiles.

3. Mesure de toxicité des huiles essentielles et des extraits de plantes

Pour le test de mortalité avec les huiles essentielles, seules les concentrations qui ont une propriété faiblement répulsive et modérément répulsive (12% et 25%) sont testées. Après 24h, les tests ont révélés que le *Cx. quinquefasciatus* issu de l'élevage n'est pas sensible aux huiles essentielles de *O. auriculiformis* et *O. trichophlebia* et *An. gambiae s.l.* est sensible à l'huile essentielle de *Rinorea arborea*, et présente une CL50 de 7,6%. *O. auriculiformis* et *O. trichophlebia* ne contiennent donc pas de substances actives toxiques pour *Cx. quinquefasciatus*, contrairement à *Rinorea arborea* sur *An. gambiae s.l.*. Ces résultats montrent que même si elles ne sont pas répulsives à faibles concentration, elles peuvent être toxiques, cas de *Rinorea arborea* sur *An. gambiae s.l.*

➤ Le test de mortalité avec l'extrait de *O. auriculiformis* qui a été extrait en trois modes d'extraction (extraction hydroalcoolique, à chaud et à froid) sur les femelles de *Cx. quinquefasciatus*

Les résultats ont montré que l'extraction hydroalcoolique présente une activité sur les adultes de *Culex quinquefasciatus*, la DL50 est de 168µl. Les méthodes d'extraction, à chaud et à froid, n'ont aucune activité sur les adultes de *Culex quinquefasciatus*, en supposant que les valeurs données par le logiciel sont exactes, la dose n'est pas suffisante pour avoir une DL50. D'après la classification des résistances aux insecticides mis au point par l'OMS en Octobre 2011, lorsque la mortalité est inférieure à 90%: on est en présence d'une population insensible et lorsque la mortalité du test trouvée est supérieure ou égale à 98%: on a une population sensible. Avec nos résultats, après 24h, l'extrait hydroalcoolique de *O. auriculiformis* à 20mg/ml présente une mortalité de 99 % à 323,5 µl, ainsi *Cx quinquefasciatus* sont sensibles ; et avec l'extraction à chaud on a une mortalité inférieure à 5%, et avec l'extraction à froid, on a une mortalité inférieure à 5%, donc ces deux types d'extraction n'ont pas un effet sur *Cx quinquefasciatus*. D'après ces résultats, on peut conclure que l'efficacité des extraits de *O. auriculiformis* dépend du type d'extraction et ceci est confirmé par Diakite (2008).

Et selon Boulogne en 2010, les trois types de molécules les plus souvent responsables de l'activité insecticide sont respectivement les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques. Et dans l'extraction hydroalcoolique, tous ces composées actifs sont présent, tandis qu'à l'extraction à chaud et à froid, il y a une perte d'un ou plusieurs de ces composées actifs. Ceci a été confirmé par Roseline, et Ratsimba (2015).

➤ Le test de mortalité avec l'extrait de racine, tige, écorce, feuille de *Gnidia daphnifolia* : mode d'extraction hydroalcoolique sur *An. gambiae s.l.*

D'après les résultats, le facteur qui influence l'efficacité de l'extrait sur *An. gambiae s.l* est la dose, plus on augmente la dose et plus les extraits des différentes parties de la plante sont efficaces. A faible dose, l'extrait de l'écorce, de la racine, de la feuille, de la plante ne présentent aucune activité sur les adultes de *An. gambiae s.l*, après 24h, le taux de mortalité est inférieur à 5%, contrairement à l'extrait des tiges (à 100µl, le taux de mortalité est de 72%). Et lorsqu'on augmente la dose à 150µl, le taux de mortalité s'accroît, et on obtient un taux de mortalité maximal (98%), à 250 µl, on dit que *An. gambiae s.l* est sensible à tous les extraits des différentes parties de la plante de *Gnidia daphnifolia*. Vue ces résultats, les compositions chimiques des différents extraits des parties de plante sont différentes, dans l'écorce, racine, feuille, on a un peu moins de substances actifs que dans les tiges. Ceci est confirmé par le criblage phytochimique réalisé par Zahara (2015), les alcaloïdes sont présents dans toutes les parties de la plante ; ils sont très abondants dans les tiges et les troncs, moyens dans les fleurs et faibles dans les feuilles, les écorces et ainsi que dans les racines. Et d'après Boulogne, les trois types de molécules les plus souvent responsables de l'activité insecticide sont respectivement les terpénoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques.

Conclusion et perspectives

Ce travail a été réalisé grâce au partenariat entre le Département d'Entomologie de l'université d'Antananarivo et le Centre National de Recherche sur l'Environnement à Tsimbazaza. Il nous a permis de tirer un certain nombre de conclusions.

L'élevage qui a été développé au Laboratoire du CNRE a montré un rendement moyen. Seule la génération F1 est obtenue. Pour avoir plus de génération que F1, toutes les conditions écologiques naturelles devraient être respectées et étudiées minutieusement point par point.

Les insecticides et insectifuges végétaux en particulier les huiles essentielles et les extraits de plante ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le but de diminuer les dégâts causés par l'utilisation des insecticides de synthèse : ce sont des produits biodégradables, et respectueux de l'environnement.

Notre étude vise à évaluer les effets répulsifs des huiles essentielles et les effets insecticides des extraits de plantes sur des espèces de moustiques vecteurs, comme *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae s.l.*. Ces plantes sont toutes endémiques de Madagascar et n'avaient pas fait l'objet d'étude biologique antérieure.

Concernant la mesure d'activité des moustiques, *Cx. quinquefasciatus* a été plus actif vis-à-vis des répulsifs des huiles essentielles de *Ocotea trichophlebia* (50% et 100%) et *Ocotea auriculiformis* (50% et 100%) ; la durée de l'efficacité de *O. trichophlebia* est 2h et l'efficacité de *O. auriculiformis* dure 4h. Ensuite il a été démontré que *Cx. quinquefasciatus* est très sensible à faible doses (250µl) de l'extrait hydroalcoolique de *Ocotea auriculiformis*. Et *An. gambiae s.l.* a été plus actif vis-à-vis de répulsif de l'huile essentielle de *Rinorea arborea* (50% et 100%); la durée de l'efficacité de *Rinorea arborea* est 2h. Pour le test de mortalité, *An. gambiae s.l.* est très sensible à faibles doses (200µl) de l'extrait hydroalcoolique des différentes parties de *Gnidia daphnifolia*. Enfin on a pu dégager de ces expériences qu'il existe des concentrations optimales pour lesquelles un effet répulsif et une activité insecticide maximale a été enregistrée. On peut donc en conclure que le biotest nous a permis de tester l'efficacité des répulsifs et des insecticides sur *Cx. quinquefasciatus* et *An. gambiae s.l..*

Même si ces huiles essentielles et ces extraits de plantes offrent une activité insecticide et insectifuge très intéressante, elles restent encore moins efficaces par rapport aux insecticides de synthèse, dont le problème d'utilisation de ces derniers réside dans la destruction néfaste de l'environnement. L'emploi des insecticides à base d'huile essentielle et d'extrait respectent

bien l'environnement, car ces produits sont biodégradables et ne présentent pas de danger pour la santé humaine sauf à une dose élevée.

Une étude sur l'efficacité à long terme et la rémanence des produits utilisés est recommandée afin de chercher une formulation pouvant augmenter la rémanence de ces huiles essentielles et être utilisée localement comme bioinsecticide à long terme contre les moustiques. Une fois que le test est positif, l'extraction devrait être faite à grande échelle avec des matériels adéquats.

Pour améliorer les résultats dans le futur, nous suggérons une étude approfondie au laboratoire (purification des extraits) et sur le terrain de chaque produit:

- isolement et détermination de la ou des molécule(s) active(s) toxiques pour les moustiques vecteurs du paludisme et/ou de la filariose,
- et étude sur le terrain pour vérifier la toxicité au laboratoire de la ou des molécule(s) active(s).

Les recherches similaires au présent rapport sont utiles pour Madagascar et devraient être soutenues financièrement par l'Etat.

Bibliographie

- Allaoui Ahamadi Allaoui, 2013. Etude comparative de la sensibilité des populations de vecteurs du paludisme aux insecticides dans les communes rurales de Vohitrindry, Ankijabe et Iakora (MADAGASCAR), DEA, Université D'Antananarivo Faculté des Sciences Departement d'Entomologie, 48p.
- Tovo A., 2014. Bioessais pour l'évaluation de la sensibilité de *Aedes albopictus* (Diptères Culicidae) à des répulsifs et attractants naturels ou de synthèse, Master 2, Université D'Antananarivo, Faculté des Sciences Departement d'Entomologie, 31p.
- Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., et Mahari S., 2006. Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis L.*) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006 10 (2), 67 – 71.
- Barbouche N., Hajjem B., Lognay G., et Ammar M., 2001. Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui L'Herit.* (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 5 (2), p. 85-90.
- Beklemishev W.N., 1940. Le cycle trophogénique, principe de base de la biologie de *Anopheles*. *Vop. Fiziol. Ekol. Malar. Komara*, 1 : 3.
- Isabelle B., 2010. Evaluation du potentiel insecticide et antifongique sur *Acromyrmex octospinosus* (Reich) d'une sélection de plantes à usages ethnopharmacologiques Tramil, thèse de Doctorat d'Agrosystèmes Tropicaux de l'Université des Antilles et de la Guyane, 130p.
- Bourgeade A. and Marchou B., 2003. Fièvre jaune, dengue, encéphalite japonaise et virose West Nile, 4 arboviroses majeures. *Yellow fever, Dengue, Japanese encephalitis and West Nile virus infection: four major arbovirus diseases.* *Med. Maladies Infect.*, 33, 385-395.
- Boyd M.F., 1949. *Malaria. A Comprehensive Survey of All Aspects of This Group of Diseases from a Global Standpoint.* Saunders Company, 1643 p.
- Bruce Chwatt L.J.; 1985. *Essential Malaria. Second edition;* Londre ; 452p.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie et phytochimie. In : Plantes médicinales. Lavoisier, Paris, France, 278-279.

- Calderone, N.W. and Spivak, M., 1995. Plants extracts for control of the parasite mite *Varroa jacobsoni* (Acari:Varroidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). J.Econ. Entomol., 88, 1211–1215.
- Carnevale P. et Mouchet J., 1990. Mémoire et travaux originaux. Lutte antivectorielle et lutte antipaludique. Médecine. Tropicale, 1990, vol. 50, n4, pp. 391-398.
- Casalino E., 2004. Paludisme. EMC - Médecine, 1, 580-591.
- Catherine B., 2013. Traité scientifique : Aromathérapie, aromatologie et aromachologie
- Charles P., 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie-gérontologie et soins palliatifs ; thèse, Université de Lorraine.
- Chauvet G., et Rajaonarivelo E., 1973. Modification de comportement d'une espèce et variation de la composition d'une population appartenant au complexe *Anopheles gambiae* pendant et après des pulvérisations d'insecticides intradomiciliaires dans les environs de Tananarive (Madagascar). 11: 155-167 Cah ORSTOM, Série Entomol Med Parasitol.
- Chippaux A., 2003. Généralités sur arbovirus et arboviroses. Overview of arbovirus and arbovirosis. Médecine et Maladies Infectieuses, 33, 377-384.
- Crosby D., 1966. Natural pest control Agents. Adv. Chem. Ser. 53, p. 1-16.
- Diakite B., 2008. LA susceptibilité des larves d'*Anopheles gambiae s.l.* à des extraits de plantes medicinale du Mali, thèse. Université de Bamako, 79p.
- Diop A., Faye D., et Molez J. F., 1998. Mise en place d'un insectarium d'une souche d'*Anopheles arabiensis*, Entomologie médicale, manuscrite n°1917.
- Festy D., 2008. Ma bible des huiles essentielles, 560p.
- Fong H.H.S., 2005. Phytochemical screening review. Chicago: University of Illinois, 1977 : 73-126
- Fontenille D., 1989. Clés de déterminations des moustiques adultes de Madagascar, Institut Pasteur de Madagascar, 48p.
- Georghiou G., Ariaratnam V., Pasternak M. E., et Lin C. S., 1975. Organophosphorus multiresistance in *Culex quinquefasciatus* in California. J.Econ. Entomol. 1975 Aug; 68(4):4617.

- Golvan, Y, J., 1983. Paludisme. In Eléments de parasitologie médicale. Flammarion médecine Science éd. Paris: 275-319.
- Grjebine A., 1966. Insectes Diptères Culicidae Anophelinae, Faune de Madagascar; Muséum d'Histoire Naturelle; fascicule 22; Paris; 500p.
- Guillaumot L. (Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie), 2009. Les moustiques et la dengue. [En ligne], <http://www.institutpasteur.nc/spip.php?article160#generalites>.
- Harbach R.E., and Kitching I.J., 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). Systematic Entomol., 23 : 327-370.
- Hamon J., et Mouchet J., 1961. Les vecteurs secondaires du paludisme humain en Afrique. Méd. Trop., 21 : 643-660.
- Hervy J.P. et Coosemans, 1979. L'élevage des Aedes et des Anophèles, Réalisation et intérêt pratique ; 15p.
- Holstein M., 1949. Guide pratique de l'anophélisme en Afrique de l'Ouest française (A.O.F). Service Général d'hygiène Mobile et de Prophylaxie, Dakar, pp.54.
- Isman M., 1999. "Pesticides based on plant essential oils," Pesticide Outlook, vol.10, no.2, pp.68-72.
- Knight K.L., et Sstone A., 1977. A catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera : Culicidae).Washington, Thomas Say Foundation, 611 p.
- Lacan A. et Grjebine A., 1953. Présentation de la carte anophélienne de la Province de Tananarive. Bull. Soc. Pathol. exot., 46 : 1115-12 16 (Soc. Sci. méd. Madagascar).
- La Ruche G., Dejour-Salamanca D., et Debruyne M., 2010. Surveillance par les laboratoires des cas de dengue et de chikungunya importés en France métropolitaine 2008-2009. Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire ; 31-32 ; 325-329.
- Maibach Hi, Khan AA, and Akers W., 1974. Use of insect repellents for maximum efficacy. Arch Dermatol; 109:32e5
- Mattingly P., 1969. The biology of mosquito-borne disease, in The science of biology, Series I, ed by Carthy J D and Sutcliff J D , Allen & Unwin, London, pp 13183.
- Mc Donald L.L., Guy RH and Speirs R.D., 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as oxicants, repellents and attractants against stored product insects, marketing

research report n° 882, Agriculture Research services, US Departement of agriculture, Washington, 183p.

- Mouchet J., Blanchy S., Rakotonjanambelo A., Ranaivoson G., Rajaonarivelo E., Laventure S., Rosella M., et Aknouche F., 1993. Stratification épidémiologique du paludisme à Madagascar. Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 60 : 50-59.
- Mouchet, J., et Carnevale, P., 1991. Les vecteurs et la transmission. In Paludisme. Ellipses. AUPELF UREF. Paris: 240p.
- N'guessan R., Darriet F., Guillet P., Carnevale P., Lamizana M., Corbel V., Koffi A., et Chandre F., 2003. Resistance to carbosulfan in *Anopheles gambiae* from côte d'ivoire based on reduced sensitivity of acetylcholinesterase. Medical and Veterinary Entomology, 17:19-25.
- N'guessan R., Boko P., Odjo A., Akogbéto M., and Rowland M., 2007. Chlорfenапyr: A pyrrole insecticide for the control of pyrethroid or DDT resistant *Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae) mosquitoes. 69-78.
- Nosais J., Datry A., et Danis M., 1996. Traité de parasitologie médicale. Pradel, Paris, pp817.
- OMS, 1994. Techniques entomologiques pratiques pour la lutte antipaludique ; Part. I, Guide du stagiaire. Genève, publication hors-série, 77 p.
- OMS; 2003. Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs ; Guide du stagiaire ; Genève ; 104p.
- OMS; 2010. World Malaria Report 2010; 238p.
- OMS; 2012. Plan mondial pour la gestion de la résistance aux insecticides chez les vecteurs du paludisme(GPIRM); 288p.
- Ouedraogo T., 2011. Lutte bio-écologique contre *Culex pipiens quinquefasciatus* en milieu urbain au Burkina Faso, thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Appliquées de l'Université de Ouagadougou, 127p.
- Pasvol G., 2005. Malaria, Medicine, 33, 39-43.
- Rakotomalala H., 2004. Etude des huiles essentielles de *Cedrelopsis grevei* Caractérisation-Identification des constituants-Activités biologiques, Thèse de Doctorat : Sciences, La Réunion : Université de la Réunion: pp 15-16.

- Narindra R., 2015. Etude chimico-biologique d'une plante aromatique endémique de Madagascar : la plante RJD du genre *Ocotea* de la famille de Lauraceae, master 2, ISPM.
- Rhodain F., 1996. «Problèmes posés par l'expansion d'*Aedes albopictus*.» Bull Soc.path EX, n° 89 :137-141.
- Rhodain F., et Perez C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.Ch: 3: Les moustiques : systématique et biologie. Maloine S.A. 77-111p.
- Robert V., Carnevale P., Manguin S., Corbel V., Fontenille D., Garros C. et Rogier C., 2009. Les Anophèles, biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Institut de Recherche pour le Développement, 1 : 389 p.
- Raissa R., 2015. Etude chimico-biologique d'une plante aromatique endémique de Madagascar, famille : Violaceae code Bx3, master 2, ISPM.
- Roth M., 1980. Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. Doc.Tech. ORSTOM, n°23 : 213 pp
- Senegre G., Jilien J. L. and Gaven B., 1977. Acquisition progressive de la résistance au chlorpyrifos chez les larves de *Culex pipiens* (L.) dans le midi de la France. Parasitologia 19 (1-2), p. 79-94.
- Tabachnick W.J., 2003. Reflections on the *Anopheles gambiae* genome sequence, transgenic mosquitoes and the prospect for controlling malaria and other vector borne diseases. J. Med. Entomol. 2003 Sep; 40(5):597-606
- WHO, 1995. Vector Control for Malaria and other Mosquito-borne Disease. Technical Report Series 857.
- Faida Z., 2015. Etude chimique et biologique d'une plante codée GMF de famille : Thymelaeaceae endémique de Madagascar, Master 2, ISPM.

Webographie :

- ANSM. Recommandations relatives aux critères de qualité des huiles essentielles. Site Web de l'ANSM. [En ligne] 2008. <http://ansm.sante.fr/>.
- <http://www.berkem.com/content/tout-sur-l-extraction-vgetale-25>
- <http://www.floranet.pagesperso.fr>
- <http://wwwilm.pf/infomoustiques>

- <http://www.moustique.org/Culexquinquefasciatus>
- http://www.plantes-botanique.org/famille_lauraceae
- http://www.plantes-botanique.org/genre_ocotea
- <http://www.tropicos.org>
- <http://fr.m.wikipedia.org/wiki/Thymelaeaceae>
- <http://fr.m.wikipedia.org/wiki/Violaceae>

ANNEXES

Annexes

Listes des annexes

Annexe 1 : Différents méthodes d'extraction

Annexe 2 : Composition chimique des huiles essentielles

Annexe 3 : Table de Gay-Lussac

Annexe 4 : Méthodes d'extraction des extraits

Annexe 5 : Résultats des tests de répulsion et de sensibilité sur *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae*

Annexe 6 : Tableau de correspondance log dose

Annexe 1 : Différents méthodes d'extraction

Les méthodes classiques qui comprennent l'expression, l'hydrodiffusion, l'hydrodistillation, l'enfleurage, l'extraction par les solvants volatils.

❖ L'hydrodiffusion

Dans l'hydrodiffusion, la masse végétale est traversée par de la vapeur d'eau du haut vers le bas, à très faible pression.

Cette méthode est basée sur l'action osmotique exercée par la vapeur d'eau, libérant l'huile essentielle sous forme de mélange hétérogène. Il s'agit d'entrainer les composés volatils avec la vapeur d'eau en utilisant la pesanteur, la gravité favorisant la diffusion de l'huile essentielle. Celle-ci est ensuite recueillie au bas de l'alambic.

Il faut noter que le produit obtenu par hydrodistillation sera différent de celui obtenu par hydrodiffusion. En plus le rendement est plus élevé pour cette dernière que pour l'hydrodistillation.

❖ L'hydrodistillation de type Clevenger

Il s'agit d'une distillation simultanée de deux substances non miscibles (huile essentielle et eau). L'ébullition de ces deux substances se produit à une température inférieure au point d'ébullition de la substance la plus volatile, c'est-à-dire l'essence contenue dans la plante.

Sous l'effet de la chaleur, les cellules de stockage libèrent les principes aromatiques qui sont entraînés par la vapeur d'eau. Cette vapeur hétérogène passe par un circuit réfrigérant. Une fois condensés, les deux liquides sont recueillis et forment deux phases, l'huile, plus légère, surnageant au-dessus de l'eau. L'huile essentielle est ensuite récupérée puis mise dans un flacon teinté pour être conservée dans un endroit frais.

❖ L'expression

Cette méthode s'applique uniquement aux épicarpes des fruits de la famille des Rutacées (citron, orange, bergamote, pamplemousse,...).

Il s'agit d'exercer une action abrasive sur la surface du fruit, sous un courant d'eau.

Les déchets solides sont éliminés et la phase liquide est soumise à une centrifugation qui sépare l'huile essentielle de la phase aqueuse (jus de fruit). Dans une variante de ce procédé, les poches sécrétrices sont rompues sous faible pression et l'huile essentielle est directement recueillie sans utiliser de l'eau.

❖ L'enfleurage

Cette technique, comme son nom l'indique, s'applique aux fleurs. Elle permet d'éviter les changements dus à la chaleur et restitue l'odeur des fleurs au plus près. Elle repose sur la capacité qu'ont les corps gras d'absorber les essences.

Elle consiste à mettre les pétales en contact avec une huile purifiée qui s'imprègne de l'huile essentielle. Les pétales sont régulièrement changés jusqu'à saturation de l'huile. Une fois saturée, cette dernière peut être laissée telle quelle et donner une pommade parfumée ou être traitée avec de l'alcool pour ne laisser qu'un résidu très parfumé appelé « absolue ».

Les huiles couramment utilisées sont l'huile d'olive et l'huile d'amande douce.

❖ L'extraction par des solvants organiques volatils

Il s'agit d'une extraction solide-liquide entre la matière végétale et le solvant. Elle met en œuvre des solvants comme l'hexane, l'éther de pétrole, le benzène ou le toluène. Cette technique permet de préserver les composés hydrolysables ou thermolabiles contenus dans certaines essences.

Elle se fait soit :

- par simple macération qui consiste en un contact entre le matériel végétal et le solvant;
- par une extraction au Soxhlet au cours de laquelle il y a contact répété entre le matériel végétal et le solvant, ce dernier étant renouvelé à chaque fois.

Les produits obtenus sont appelés :

- «concrètes ou essences concrètes», concentrés aromatiques sous forme cireuse, obtenus à partir de matières végétales fraîches ou de fleurs fanées ;
- «résinoides ou oléorésines» s'ils sont issus de matières végétales sèches ou de produits animaux desséchées (par exemple le musc).

Les méthodes modernes qui sont l'extraction par fluide supercritique et la distillation assistée au four micro-ondes.

❖ L'extraction par fluide supercritique

Lorsque le CO₂ est soumis à la pression et à une certaine température (31°C), il se trouve dans un état intermédiaire entre l'état liquide et l'état gazeux, c'est l'état supercritique.

Il acquiert ainsi les qualités d'un solvant c'est-à-dire l'inertie chimique, la sélectivité et la facilité d'élimination.

Le matériel végétal est traversé par un courant de CO₂ à l'état supercritique, sous pression. L'huile essentielle est entraînée par ce courant puis le mélange (CO₂-huile essentielle) est recueilli dans un vase d'expansion où la pression est sensiblement réduite.

Dans ces conditions, le CO₂ s'évapore et il ne reste plus que l'huile essentielle.

Cette technique est très intéressante du fait que le produit obtenu est très proche de l'essence contenue dans la plante et qu'il ne reste aucune trace résiduelle de solvant.

❖ La distillation assistée au four à micro-ondes

C'est une technique mise au point à la fin des années 80. La matière végétale est introduite dans le four et soumise aux micro-ondes. L'eau contenue dans les cellules végétales entre en ébullition et provoque la rupture des tissus, libérant ainsi les composés volatils.

Le mélange de vapeur d'eau et d'huile essentielle est condensé puis laissé décanter.

L'huile essentielle est ensuite récupérée.

Il existe deux versions de cette technique :

- la distillation sous micro-ondes à pression atmosphérique qui s'applique aux matériaux végétaux à teneur en eau supérieure à 80 % ;
- la distillation sous micro-ondes à pression réduite (VMHD : Vacuum Microwave Hydrodistillation) qui peut s'appliquer aux produits secs ou humides

Annexe 2 : Composition chimique des huiles essentielles

1. Les terpinoïdes

Les terpinoïdes retrouvés dans les huiles essentielles sont les terpènes les plus volatiles, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono et sequiterpènes. (Bruneton, 1993).

a) Les monoterpènes

Toujours présents, les carbures monoterpiniques, sont constitués de 05 molécules de carbones C5, peuvent être acyclique myrcène, ocimene..., monocyclique α et β-terpène, para-cymène... où bicycliques: pinènes, delta-3-caréne, camphène, sabinène .Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle : Citrus, térébenthines (Bruneton ,1993).

Mise à part les carbures d'autres molécules fonctionnalisées sont rencontrées comme :

-Les alcools : ils peuvent être acycliques : geraniol, linalol, monocycliques menthol, où bien bicycliques comme bornéol, fenchol.

-**Les phénols** : Thymol, carvacrol, eugenol et anéthol.

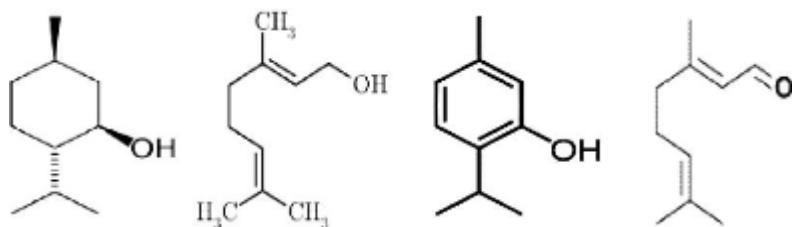
-**Les aldéhydes**: acycliques le plus souvent : géraniol, néral,citronelal

-**Les esters** : pouvant être acycliques, acétate ou propionate de linalyle, acétate de citronellyle, monocyclique: acétate de menthyle et bicycliques: acétate d'isobornyle.

-**Les cétones** : acyclique tagétone, monocyclusques menthone, carvone et bicyclique, Thuyone, fenchone, camphre.

-**Les pyroxydes**: ascaridole

-**Les phénols**: thymol et carvacrol *Menthol*



Géraniol Thymol Citral

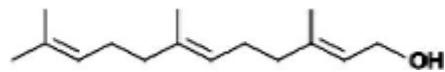
Figure 11: les monoterpènes

b) Les sesquiterpènes

Dans cette famille de produits, nous trouvons les mêmes groupements fonctionnels que dans le cas des monoterpènes, à savoir carbures, alcools, cétones étant les plus courants. Comme exemple nous citons quelques composés caractéristiques des huiles essentielles :

- **les carbures**: α -bisaboléne, α -caryophyllène, les alcools farnésol, carotol
- **les cétones**: α vétivone, les aldéhydes comme sinenals
- **les esters**: acétate de cédryl

Cette famille est constituée de 10 carbonnes (Bruneton ,1993)



Farnésol

Figure 12 : Les sesquiterpènes

2. Les composés aromatiques

Les dérivés phénylpropane (C6-C3) sont beaucoup moins courants que les précédents. Ce sont habituellement des Allyl et Propyphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil). Anethole. Anisaldéhyde, apiole, methyl-chavicol, mais aussi de celles du girofle de la muscade de l'estragon, Eugénol, Myristicine. Cinnamaldéhyde, on retrouve également des composés en (C6-C1) comme la vanilline ou comme l'anthramilate de méthyle. (Bruneton, 1993).

3. Les composées d'origines diverses

Selon le mode de récupération utilisé, les huiles essentielles peuvent renfermer divers composés aliphatiques, généralement de faible masse moléculaire, entraînables lors de l'hydrodistillation, carbure (linéaires et ramifiés, saturés ou non), acides (C3 à C10), alcools, aldéhydes, esters acycliques, lactones.

Dans les concentrations, il n'est pas rare de trouver des produits de masse moléculaire plus importante non entraînables à la vapeur d'eau ; homologues des phénylpropanes, diterpènes coumarines. (Bruneton, 1993).

Annexe 3 : Table de Gay-Lussac

Table pour la dilution de l'alcool (Table de Gay-Lussac) appelée aussi Table de mouillage de l'alcool

		Concentration initiale													
		100	99	98	97	96	95	90	85	80	75	70	65	60	50
Concentration finale		95	6,5	5,15	3,83	2,53	1,25								
		90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41							
		85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	6,56						
		80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	13,79	6,83					
		75	37,58	35,9	34,28	32,67	31,08	29,52	21,89	14,48	7,2				
		70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	31,05	23,14	15,35	7,64			
		65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15		
		60	72,82	70,80	68,8	65,85	64,92	63	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76	
		55	88,6	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	67,87	57,9	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47
		50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47
		45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46
		40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	130,8	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43
		35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08
		30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71
		25	308,9	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	266,12	245,15	224,3	203,61	182,83	162,21	141,65
		20	408,5	403,13	397,79	392,47	387,17	381,9	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43
		15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	505,27	471	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07
		10	907,09	896,73	886,4	876,1	865,15	855,15	804,5	753,65	702,89	652,21	601,6	551,06	500,50

Les chiffres en noir indiquent la quantité d'eau en mL à ajouter à 100mL d'alcool de concentration initiale x (en bleu) pour obtenir la concentration désirée.

Exemple : la table indique qu'il faut ajouter 105,34 ml d'eau à 100 mL d'alcool à 90° pour obtenir de l'alcool à 45°.

Attention : Le volume final est inférieur à la somme des volumes mis en jeu ! C'est le phénomène dit de « contraction de volume », variable en fonction du titre de l'alcool initial.

Annexe 4 : Méthodes d'extraction des extraits

Les différents procédés d'extraction (Smadja, 2001 *in* Rakotomalala, 2004)

1. Macération à chaud :

La matière végétale pulvérisée est trempée dans un solvant bien défini (EtOH 80° ou Eau Distillée) dans un erlenmeyer à col rodé ; l'ensemble est chauffé à reflux à une température de 70°C pendant une heure, qui, permettant d'en extraire les constituants solubles de la plante étudiée. Après filtration sur Buchner, le résidu sera remis dans le récipient d'extraction avec une nouvelle portion de solvant. Le processus est répété jusqu'à épuisement (trois fois en général).

2. Macération à froid :

La matière végétale est mélangée avec une quantité suffisante d'eau distillée. L'ensemble est mélangé avec un agitateur magnétique pendant 24 heures à la température ambiante. Après filtration, le résidu sera rendu dans le récipient d'extraction avec une nouvelle quantité d'eau distillée. Le procédé est répété de nombreuse fois selon la nécessité.

3. Fractionnement liquide-liquide

L'isolement d'une substance, naturelle ou synthétique nécessite, en général, un fractionnement en utilisant des solvants de polarités différentes.

4. Lyophilisation :

On distingue trois phases majeures dans un cycle de lyophilisation :

- la congélation, où les produits sont réfrigérés à des températures de l'ordre de -20 °C à -80 °C ; l'eau se transforme alors en glace.
- la dessiccation primaire, sous vide, qui consiste à sublimer la glace libre (interstitielle), donc sans effet d'ébullition (pas d'eau en phase liquide).
- la dessiccation secondaire, qui permet d'extraire par désorption les molécules d'eau piégées à la surface des produits séchés.

5. Extraction hydroalcoolique

Avant de commencer l'extraction, le broyat de plantes est macéré dans de l'éthanol pendant au moins 24 heures. Après la macération s'effectue la filtration. Le filtrat est évaporé sous-vide jusqu'à l'élimination complète de l'éthanol. L'extrait éthanolique ainsi obtenu est conservé à basse température (-25°C) dans une boîte bien fermée.

Annexe 5 : Résultats des tests de répulsion et de sensibilité sur *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae* s.l

- Test de répulsion avec les huiles essentielles

Test sur les Culex

g: *Ocotea trichophlebia* (Bx1)

concentration	100%		50%		25%		12%	
Nombre de répétition	Zone A	Zone B						
R1	1	9	2	8	3	7	3	7
R2	0	10	1	9	2	8	4	6
R3	0	10	2	8	3	7	5	5
R4	1	9	3	7	3	7	5	5
R5	1	9	2	8	2	8	4	6

g : *Ocotea auriculiformis kost* (RVB F)

concentration	100%		50%		25%		12%	
Nombre de répétition	Zone A	Zone B						
R1	0	10	2	8	3	7	3	7
R2	0	10	2	8	2	8	4	6
R3	0	10	3	7	3	7	4	6
R4	0	10	3	7	3	7	3	7
R5	1	9	2	8	2	8	3	7

Test sur les Anophèles

g: *Rinorea arborea* (Bx3)

concentration	100%		50%		25%		12%	
Nombre de répétition	Zone A	Zone B						
R1	0	10	1	9	3	7	4	6
R2	1	9	2	8	3	7	5	5
R3	1	9	2	8	4	6	5	5
R4	1	9	3	7	2	8	4	6
R5	1	9	2	8	3	7	4	6

- Tests de mortalité avec les huiles essentielles et extraits

Tests avec les *Cx. quinquefasciatus*

g: *Ocotea trichophlebia* (Bx1)

Bx1 (huile essentielle)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
12	25	0	25	0	25	0	25	0	23	2
25	25	0	25	0	25	0	25	0	14	11

g: *Ocotea auriculiformis* (RVB F)

RVB F (huile essentielle)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
12	25	0	25	0	25	0	25	0	20	5
25	25	0	25	0	25	0	25	0	16	9

g: *Ocotea auriculiformis*

- Extraction à froid (RVBF)

Extrait : RVBF (extraction à froid) (<i>Culex</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 60min		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
150	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
200	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
250	25	0	25	0	25	0	25	0	24	1
300	25	0	25	0	25	0	25	0	20	5
400	25	0	25	0	25	0	25	0	22	3
500	25	0	25	0	25	0	25	0	21	4

- Extraction hydroalcoolique (RVB HA)

Extrait RVB HA (extraction hydroalcollique) (<i>Culex</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 60min		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
150	0	25	0	25	0	25	0	25	15	10
200	0	25	0	25	0	25	0	25	11	14
250	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25

- Extraction à chaud (RVB C)

Extrait RVB C (extraction à chaud)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
150	25	0	25	0	25	0	25	0	24	0
200	25	0	25	0	25	0	25	0	24	1
250	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
300	25	0	25	0	25	0	25	0	23	2
400	25	0	25	0	25	0	25	0	24	1
500	25	0	25	0	25	0	25	0	22	3

Tests avec les *An. gambiae s.l*

g: *Rinorea arborea* (Bx3)

Bx3 (huile essentielle)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
12	1	24	0	25	0	25	0	25	3	22
25	2	23	0	25	0	25	0	25	0	25

g: *Gnidia daphnifolia*

➤ RMC1 (extrait racine)

Extrait RMC1 (20mg/ml) (<i>Anopheles</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
100	1	24	1	24	1	24	3	22	22	3
150	0	25	2	23	2	23	3	22	9	16
200	0	25	0	25	0	25	0	25	1	24
250	0	25	0	25	0	25	0	25	0	25

➤ TMC1 (extrait tige)

Extrait TMC1 (20mg/ml) (<i>Anopheles</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
100	1	24	6	19	8	17	7	18	7	18
150	1	24	5	20	5	20	3	22	10	15
200	0	25	0	25	0	25	0	25	5	20
250	0	25	0	25	0	25	0	25	1	24

➤ EMC1 (extrait écorce)

Extrait EMC1 (20mg/ml) (<i>Anopheles</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
100	20	5	17	8	20	5	21	4	20	5
150	18	7	18	7	21	4	21	4	15	11
200	6	19	5	20	5	20	5	20	5	20
250	2	22	0	25	1	24	0	25	1	24

➤ FMC1 (extrait feuille)

Extrait FMC1 (20mg/ml) (<i>Anopheles</i>)										
durée dose en µl	Après 15 min		Après 30 min		Après 45 min		Après 1h		Après 24h	
	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	KD	vivant	mort
témoin	25	0	25	0	25	0	25	0	25	0
100	0	25	1	24	3	22	4	21	20	5
150	0	25	0	25	0	25	0	25	14	11
200	0	25	0	25	0	25	0	25	6	19
250	0	25	0	25	0	25	0	25	1	24

Annexe 6 : Tableau de correspondance log dose

Probabilité	dose	Borne inférieure 95%	Borne supérieure 95%	extraits
0,50	168,0427	165,6366	1854,7366	<i>Ocotea auriculiformis</i> (H.A)
0,50	1972,3179			<i>Ocotea auriculiformis</i> (chaud)
0,50	975,5183	536,7330	20782,8298	<i>Ocotea auriculiformis</i> (froid)
0,50	139,4221	87,7768	156,0279	<i>Gnidia daphnifolia</i> (racine)
0,50	137,0632	8,1589	175,9968	<i>Gnidia daphnifolia</i> (tige)
0,50	154,6270	36,7097	189,5958	<i>Gnidia daphnifolia</i> (écorce)
0,50	159,7290	106,6935	182,5938	<i>Gnidia daphnifolia</i> (feuille)

Auteur : ANDRIANAJA Anjatiana

Contact : Email : anja.andrianaja@gmail.com/ **Tel :** 0334532325

Titre : « EVALUATION DES EFFETS REPULSIFS DES HUILES ESSENTIELLES DE *Ocotea trichophlebia*, *Ocotea auriculiformis*, ET EFFETS INSECTICIDES DES EXTRAITS DE *Ocotea auriculiformis* SUR *Culex quinquefasciatus*. EVALUATION DES EFFETS REPULSIFS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Rinorea arborea* ET EFFETS INSECTICIDES DE L'EXTRAIT DE *Gnidia daphnifolia* SUR *Anopheles gambiae s.l* »

Résumé

Les maladies à transmission vectorielle (arboviroses, bactérioses, parasites,) sont responsables de millions de victimes dans le monde. Les moustiques Culicidae des genres *Aedes*, *Anopheles*, et *Culex* sont les vecteurs majeurs d'agents pathogènes. L'objectif de cette étude est d'évaluer la sensibilité des moustiques aux huiles essentielles et aux extraits de plantes. Les huiles essentielles des feuilles de *Ocotea trichophlebia*, *Ocotea auriculiformis* et *Rinorea arborea*, sont endémiques de Madagascar. Du point de vue activité biologique, les tests de toxicité aiguë montrent que ces huiles essentielles possèdent une propriété insectifuge et insecticide envers les femelles adultes de *Cx. quinquefasciatus* et de *An. gambiae s.l*. L'extrait hydroalcoolique de *Ocotea auriculiformis* possède une propriété insecticide envers les femelles adultes de *Cx. quinquefasciatus*, la DL 50 ayant été estimée graphiquement à 168 µl. L'extrait hydroalcoolique de *Gnidia daphnifolia* possède une propriété insecticide envers les femelles de *An. gambiae s.l*, la DL 50 est de 139 µl pour l'extrait de racine de *Gnidia daphnifolia*, 137 µl pour l'extrait de tige de *Gnidia daphnifolia*, 154 µl pour l'extrait d'écorce de *Gnidia daphnifolia*, 160 µl pour l'extrait des feuilles de *Gnidia daphnifolia*. Des principes faiblement toxiques ont été obtenus par extraction aqueuse à froid et à chaud à partir des feuilles de *Ocotea auriculiformis*. Les extraits utilisés au cours de cette étude sont encore à l'état brut et mérite une étude plus approfondie en poussant la purification jusqu'à la caractérisation des molécules actives et à leur mode d'action.

Mots clés : maladies vectorielles, *Cx. quinquefasciatus*, *An. gambiae s.l*, Huiles essentielles, extrait de plante, test de toxicité, propriété insectifuge, propriété insecticide.

Abstract

The diseases at vectorial transmission (arboviroses; bacteria; parasites) are responsible of one million of victim in the world. The mosquitos Culicidae of the genres *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* are the major vectors of pathogens. The objective of this study is to evaluate the sensibility of the mosquitos to the essential oils and to the excerpts of plants. The oils essential of the sheets of *Ocotea trichophlebia*, *Ocotea auriculiformis* and *Rinorea arborea*, are endemic of Madagascar. Of the biological viewpoint activity, the tests of acute toxicity show that these essential oils own a property insectifuge and insecticide towards the adult females of *Cx. quinquefasciatus* and *An. gambiae s.l*. The hydro-alcoholic excerpt of *Ocotea auriculiformis* own an insecticidal property send the adult females of *Cx. quinquefasciatus*, the DL 50 being estimated graphically around 168 µl. Hydro-alcoholic excerpt *Gnidia daphnifolia* Own an insecticidal property towards the females *An. gambiae s.l* the DL 50 is of 139 µl for excerpt of root *Gnidia daphnifolia* 137 µl for the excerpt of stem of *Gnidia daphnifolia*, 154 µl for the excerpt of bark of *Gnidia daphnifolia* 160 µl for the excerpt of the sheets of *Gnidia daphnifolia*. Weakly toxic principles were gotten by extraction aqueous at cold and at hot starting with the sheets of *Ocotea auriculiformis*. The used excerpts in the process of this study are still at the crude state and deserves more thorough pushing the purification to the characterisation of the active molecules and at their fashion of action.

Keywords: Vectorial diseases, *Cx. quinquefasciatus*, *An. gambiae s.l*, Oils essential, excerpt plants, test of toxicity, insectifuge property, insecticide property.

Rapporteur : Dr RANDRIANARISOA Ernest

« Maître de conférences »