
Année Universitaire : 2010-2011
Master Sciences et Techniques : CMBA
Chimie des Molécules Bio Actives



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et
Techniques

**Activité larvicide des extraits de plantes aromatiques
sur les larves de moustiques vecteurs de maladies
parasitaires**

Présenté par:

SAYAH Mohamed Yassine

Encadré par:

- Nom et prénom : Dr.El OUALI LalamiAbdelhakim
- Nom et prénom : Pr. GRECHEHassane
- Nom et prénom : Pr. MOUGHAMIR Khadija

Soutenu Le 23 Juin 2011 devant le jury composé de:

- **Pr. OUZZANI CHAHDI Fouad. Pr FST : Président**
- **Dr. El OUALI LALAMI Abdelhakim. Responsable LRDEHM: Encadrant**
- **Pr. GRECHE Hassane. Pr INPMA :**
Encadrant
- **Pr.MOUGHAMIRKhadija. Pr FST :**
Encadrante
- **Pr. OUMOKHTAR Bouchra. Pr Faculté de Medecine :**
Examinatrice

**Stage effectué au : Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et
d'Hygiène du Milieu de Fès / L'Institut National des Plantes Médicinales et
Aromatiques**

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Nom et prénom: SAYAH Mohamed Yassine

Année Universitaire : 2010/2011

Titre: Activité larvicide des extraits de plantes aromatiques sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires

Résumé

Devant les problèmes engendrés par l'utilisation des insecticides de synthèse dans la lutte antivectorielle (pollution environnementale, résistance, impact sur la santé humaine...), les récentes recherches s'orientent vers la substitution de ces produits par d'autres produits naturels : les bio-insecticides.

Ce travail a pour but, l'évaluation et la comparaison de l'activité larvicide des extraits naturels (extraits aqueux et huiles essentielles issus des plantes aromatiques) et les insecticides chimiques sur les larves de moustique du *Culex pipiens*.

Après une recherche bibliographique avancée, les plantes sélectionnées pour l'extraction des huiles essentielles sont : *Pistacia lentiscus*, *Citrus aurantium* (orange amère), *Citrus sinensis* (orange), *Cymbopogon citrate* (citronnelle), *Juniperus communis* (genévrier), *Cupressus sempervirens* (cypres). Celles réservées aux extraits aqueux sont : *Pistacia lentiscus*, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citrate* et *Argania spinosa*.

Conformément au protocole des tests de sensibilité OMS pour les insecticides chimiques, des tests larvicides ont été réalisés pour les six extraits aqueux, les six huiles essentielles et pour quatre insecticides chimiques ; Téméphos, Malathion, Fenthion, et le Fenitrothion.

Les extraits aqueux ont présenté un faible effet larvicide, tandis que les huiles essentielles de *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis* et *Pistacia lentiscus*, ont montré une activité larvicide très intéressante, avec des valeurs de DL50 et DL90 respectives de 0,035% et 0,07%, 0,064% et 0,12% et de 0,062% et 0,16%. Les résultats des tests de sensibilité employant les insecticides, ont montré une importante activité larvicide, notamment pour le Téméphos avec une DL90 = 0,0015mg/l.

Les insecticides chimiques ont présenté une grande efficacité en terme de toxicité vis-à-vis de l'espèce *Culex pipiens* par rapport aux extraits naturels des plantes aromatiques.

Mots clés: huiles essentielles, extraits aqueux, insecticides chimiques, test de sensibilité, larves de moustiques.

Sommaire

Remerciements

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviation

Introduction générale

I- Généralités	3
I.1- Maladies à transmission vectorielle	3
I.1 .1- Définition	3
I.1.2- Quelques maladies à transmission vectorielles	3
I.2- Situation épidémiologique mondiale	4
I.3- Situation épidémiologique nationale	6
I.4- Situation épidémiologique de la région Fès Boulemane.....	7
I.4.1- Présentation de la ville de Fès	8
I.4.2- Découpage administratif de la ville	8
I.4.4- Données climatiques	9
I.5- Facteurs amplifiant le danger des maladies à transmission vectorielle.....	10
II- Parasite	11
II.1- Définition	11
II.2- exemples de certains parasites responsables de maladies parasitaires.....	12
II.3- Classification de quelques parasites.....	12
II.4- Cycle parasitaire	13
III- Vecteurs	14
III.1 Moustiques vecteurs.....	14
III.2- Classification	15
III.3- Cycle de développement des moustiques.....	15
III.3.1- Les œufs	16
III.3.2- Les larves.....	16

III.3.3- Les nymphes	17
III.3.4- Les adultes	17
III.4- Intérêts des moustiques dans l'écosystème	18
IV- Lutte antivectorielle (LAV).....	18
IV.1- Surveillance des gites	19
IV.2- Méthodes de lutttes antivectorielle	19
IV.2.1- Limiter ou empêcher le contact homme-vecteur	19
IV.2.2- Diminuer la densité vectorielle	20
V- Plantes aromatiques.....	23
V.1- Huiles essentielles : définition.....	23
V.2- Utilisation des huiles essentielles.....	24
V.3- Extraction.....	24
V.3.1- Extraction à la vapeur d'eau.....	24
V.3.2- Hydrodistillation	24
V.3.3- Distillation à la vapeur saturée.....	25
V.3.4- Hydrodiffusion	25
V.3.5- L'expression à froid	25
V.3.6- Autres méthodes	25
V.4- Composition chimique des huiles essentielles.....	26
V.5- Localisation et lieu de synthèse	27
V.6- Facteurs influençant la composition	27
V.7- Activité insecticide : mécanismes d'action.....	27
V.7.1- Effets physiologiques :.....	27
V.7.2- Effets sur le system nerveux :.....	28
VI- Extraits aqueux	28
VI.1- Macération	28
VI.2- Infusion	28
VI.3- Décoction.....	28
Matériels & Méthodes	29
I- Lieu et période d'étude.....	29
I.1- Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique de Taounat	29

I.2- Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès.....	29
I.3- Gites dans la ville de Fès.....	30
II- Matériels végétales.....	31
II.1- Choix des plante	31
II.2- Récolte des plantes.....	31
II.3- Identification des plantes	32
II.4- Taux d'humidité et rendement (plante et HE) :	32
II.5- Extraction des huiles essentielles	32
II.5.1- Extraction par Alambique	33
II.5.2- Hydrodistillation par Clevenger :	34
II.6- Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	34
II.7- Préparation des extraits aqueux.....	35
II.8- Estimation du résidu sec des extraits aqueux	35
III- Matériel biologique	35
III.1- Choix des larves	35
III.2- Collecte et conservation des larves.....	35
III.3- Identification des larves.....	36
IV- Produits chimique : insecticides.....	36
V- Tests de sensibilités	37
V.1- Test de sensibilité en employant les extraits aqueux	37
V.2- Test de sensibilité en utilisant les huiles essentielles	37
V.3- Test de sensibilité en utilisant les insecticides.....	38
Résultats et Discussion	39
I- Matériels végétales.....	39
I.1- Identification des plantes	39
I.1.1- <i>Pistacia lentiscus</i>	40
I.1.2- <i>Juniperus communis</i>	40
I.1.3- <i>Cupressus sempervirens</i>	40
I.1.4- <i>Citrate cymbopogon</i>	40
I.1.5- <i>Citrus aurantium</i> et <i>sinensis</i>	40
I.2- Evaluation du résidu sec des extraits aqueux	41

I.3- Rendement des huiles essentielles.....	41
I.4- Composition des huiles essentielles.....	42
I.4.1- Composition chimique <i>Pistacia lentiscus</i>	42
I.4.2- Composition chimique de <i>Juniperus communis</i>	43
I.4.3- Composition chimique de <i>Cupressus sempervirens</i>	44
I.4.4- Composition chimique de <i>Cymbopogon citratus</i>	45
I.4.5- Composition de l'huile essentielle <i>Citrus aurantium</i>	46
I.4.6- Composition de l'huile essentielle <i>Citrus sinensis</i>	46
II- Matériel biologique	47
II.1- Gîtes retenus pour les tests de sensibilité.....	47
II.2- Espèces rapportées lors des prospections	48
II.3- Espèces retenue pour les tests de sensibilité.....	48
III- Résultats des tests de sensibilité	49
III.1- Résultat des tests réalisés par les Extraits aqueux.....	49
III.2- Résultats des tests réalisés par les huiles essentielles.....	50
III.2.1- Résultats du test de sensibilité en utilisant <i>Citrus aurantium</i>	50
III.2.2- Résultat du test de sensibilité en utilisant <i>Pistacia lentiscus</i>	52
III.2.3- Résultat du test de sensibilité en utilisant <i>Cymbopogon citrate (citronnelle)</i>	53
III.2.4- Résultat du test de sensibilité en utilisant <i>Juniperus communis (genévrier)</i>	55
III.2.5- Résultat du test de sensibilité en utilisant <i>Citrus sinensis</i>	56
III.2.6- Résultat du test de sensibilité en utilisant <i>Cupressus sempervirens (cypre)</i>	57
III.3- Synthèse des résultats des tests de sensibilité utilisant les huiles essentielles.	58
III.4- Résultats des tests réalisés par les insecticides.....	60
III.5- Comparaison de l'activité larvicide des huiles essentielles et des insecticides .	63

Références bibliographiques

Annexe

GÉNÉRALITÉS

Introduction générale

Anophèles, aèdes, culex et mansonias des genres de moustiques dont l'impact est nocif vis-à-vis la santé publique, ces moustiques sont capables de véhiculer différentes maladies au sein de la société, des maladies dites vectorielles.

En effet parmi les moustiques évoqués on trouve les Anophèles et spécialement les "*A.labbranchiae*" (Falleroni 1926:564 (E*; claviger var.)), qui sont responsables de la transmission du paludisme en étant son vecteur biologique. Le Maroc qui a déclaré en 2005 l'élimination du paludisme de son territoire se voit classé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans la colonne des pays œuvrant pour éviter une réintroduction du paludisme (WORLD MALARIA REPORT 2009).

Parmi les raisons qui poussent à la continuité de la surveillance des maladies parasitaires notamment le paludisme :

- La présence permanente le long de l'année de ces moustiques vecteurs de maladies parasitaires (notamment *A.labbranchiae*), ce qui constitue une menace non négligeable pour la population avoisinante des gîtes (lieu de reproduction par excellence de ces moustiques) ;
- L'expansion des constructions a plongé les gîtes larvaires au milieu des habitations ce qui procure aux moustiques qui émergent des eaux, des cibles potentielles en nombre, augmentant ainsi le danger en cas de déclenchement d'une épidémie ;
- Le climat favorable à la prolifération de ces insectes ;
- De nombreux produits chimiques synthétiques qui ont été utilisés dans la lutte contre les moustiques ont été signalés comme cause de déséquilibre écologique ;
- La position géographique (carrefour entre les différentes villes du pays) et la nature touristique de la ville augmente le facteur de l'introduction du paludisme importé ;
- Le développement d'une résistance aux pesticides (ou larvicide) chimiques (OMS, 2008).

Sous le poids des contraintes précédentes, la communauté scientifique se voit obligée d'orienter ses recherches vers de nouvelles alternatives à faible coût et avec une efficacité irréprochable.

Dans la dernière décennie une nouvelle chimie a vu le jour, elle se caractérise par le respect de l'environnement et vise sa préservation, une chimie dite "chimie verte", ainsi l'intérêt à trouver des substituts d'origine naturelle aux produits de synthèse commence à prendre une grande ampleur.

Ce travail, réalisé en collaboration entre le laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et Hygiène de Milieu de Fès et l'institut national des plantes médicinales et aromatiques de Taounat (INPMA), vise l'évaluation et la comparaison de l'effet larvicide des extraits aqueux et des huiles essentielles de plantes aromatiques et des insecticides chimiques vis-à-vis des moustiques de culicidés.

I- Généralités

I.1- Maladies à transmission vectorielle

I.1.1- Définition

Les maladies à transmission vectorielle sont responsables de près de 20 % de la charge mondiale que l'on estime due aux maladies infectieuses. Ce sont des maladies qui sont transmises principalement par des espèces d'arthropodes qui jouent un rôle essentiel dans le maintien d'une partie du cycle de vie d'un agent pathogène (Comité régional de la Méditerranée orientale, 2005).

I.1.2- Quelques maladies à transmission vectorielles

I.1.2.a- Le paludisme

Le paludisme est dû à un parasite, le *Plasmodium*, transmis par les moustiques qui en sont porteurs. Chez l'être humain, ces parasites se multiplient dans le foie puis s'attaquent aux globules rouges.

Le paludisme se manifeste par de la fièvre, des maux de tête et des vomissements. Ces symptômes apparaissent généralement dix à quinze jours après la piqûre de moustique. En l'absence de traitement, le paludisme peut entraîner rapidement le décès par les troubles circulatoires qu'il provoque. Dans de nombreuses régions du monde, les parasites sont devenus résistants à plusieurs médicaments antipaludéens.

Quatre espèces plasmodiales peuvent être responsables de l'infection chez l'homme, la forme la plus grave du paludisme est causée par *Plasmodium falciparum*, responsable d'une grande majorité des décès. *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* provoquent des formes de paludisme « bénignes » qui ne sont généralement pas mortelles. Il est transmis par les *anophèles*.

I.1.2.b- Les leishmanioses

Les leishmanioses sont un groupe de maladies dues à des protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania*. Ces parasites affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme, auxquelles ils sont transmis par la piqûre infestante d'un insecte vecteur, le phlébotome. Largement répandues à la surface du globe, les leishmanioses connaissent une aire géographique globalement circumterrestre, mais débordant largement sur les zones tempérées d'Afrique du Nord, du Sud de l'Europe et d'Asie. Présentes sur quatre continents, elles affectent 88 pays, dont 72 parmi les plus faiblement développés. La population exposée au risque des leishmanioses est estimée à 370 millions de personnes et le nombre de nouveaux cas annuellement diagnostiqués, toutes formes cliniques confondues, est évalué entre 1,5 et 2 millions (Desjeux P et al., 1999).

Les leishmanioses incluent des affections viscérales ou tégumentaires dont les taux de morbidité-mortalité sont variables et comprennent des formes mortelles (leishmaniose viscérale : LV) et d'autres sévèrement mutilantes (leishmaniose cutanéomuqueuse : LCM), des formes spontanément curables (leishmanioses cutanées localisées : LCL) et d'autres rebelles à toute thérapeutique (leishmaniose cutanée diffuse : LCD).

I.1.2.c- La dengue

La dengue est une maladie due à un virus transmis par les moustiques, qui existe sous quatre formes distinctes (stéréotypes 1 à 4). Cette maladie représente une menace pour près de la moitié de la population mondiale. On estime à 220 millions le nombre annuel de personnes infectées, dont deux millions - essentiellement des enfants - développent une dengue hémorragique (DH) forme grave de la maladie.² La dengue hémorragique est une des principales causes d'hospitalisation ; elle entraîne une surcharge pour les systèmes de santé aux ressources limitées, avec un impact économique et social important.

Le tableau clinique de la dengue se caractérise par un syndrome fébrile et de violents maux de tête, accompagnés ou non d'éruption, avec parfois des complications hémorragiques (Mackenzie et al., 2004). La dengue peut évoluer en dengue hémorragique qui peut entraîner un syndrome de choc toxique et la mort (Wilder-Smith A., 2005).

1.1.2.d- Chikungunya

Le Chikungunya est une maladie virale transmise par des virus. Il s'agit d'un alphavirus. Le nom de "Chikungunya" vient d'un verbe de la langue kimakonde qui signifie "devenir tordu" ce qui décrit l'apparence voûtée de ceux qui souffrent de douleurs articulaires.

Le virus est transmis d'un être humain à l'autre par les piqûres de moustiques femelles infectées. Les moustiques incriminés sont le plus souvent *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, deux espèces qui peuvent également transmettre d'autres virus, notamment la dengue.

Le chikungunya se caractérise par l'apparition brutale de fièvre souvent accompagnée d'arthralgie. Les autres signes et symptômes communs sont notamment myalgies, céphalées, nausée, fatigue et éruption.

Il existe d'autres maladies à transmission vectorielles qui sont aussi ou plus graves que celles invoquées précédemment.

I.2- Situation épidémiologique mondiale

Malgré les efforts réalisés dans le domaine de la lutte contre les différentes maladies à transmission vectorielle, aucune région dans le monde ne peut se féliciter d'avoir éradiqué une quelconque épidémie. En raison d'une mondialisation accrue, chaque pays est sous la menace d'une réémergence d'une maladie éliminée par le passé. En effet le danger d'une introduction d'une maladie parasitaire dans le temps et dans l'espace, peut se manifester par son importation depuis d'autres pays, comme il est le cas pour le paludisme importé que connaît la ville de Fès malgré que le paludisme autochtone a disparu depuis 1998 (El Ouali Lalami et al., 2009a). Les changements climatiques peuvent également affecter la distribution des maladies à transmission vectorielle dans le temps, en d'autres mots affecter le cycle de l'apparition de certaines maladies (Institut National de Santé Publique du Québec, 2007).

La figure 1 montre l'aire de la répartition mondiale quelques maladies à transmission vectorielles.

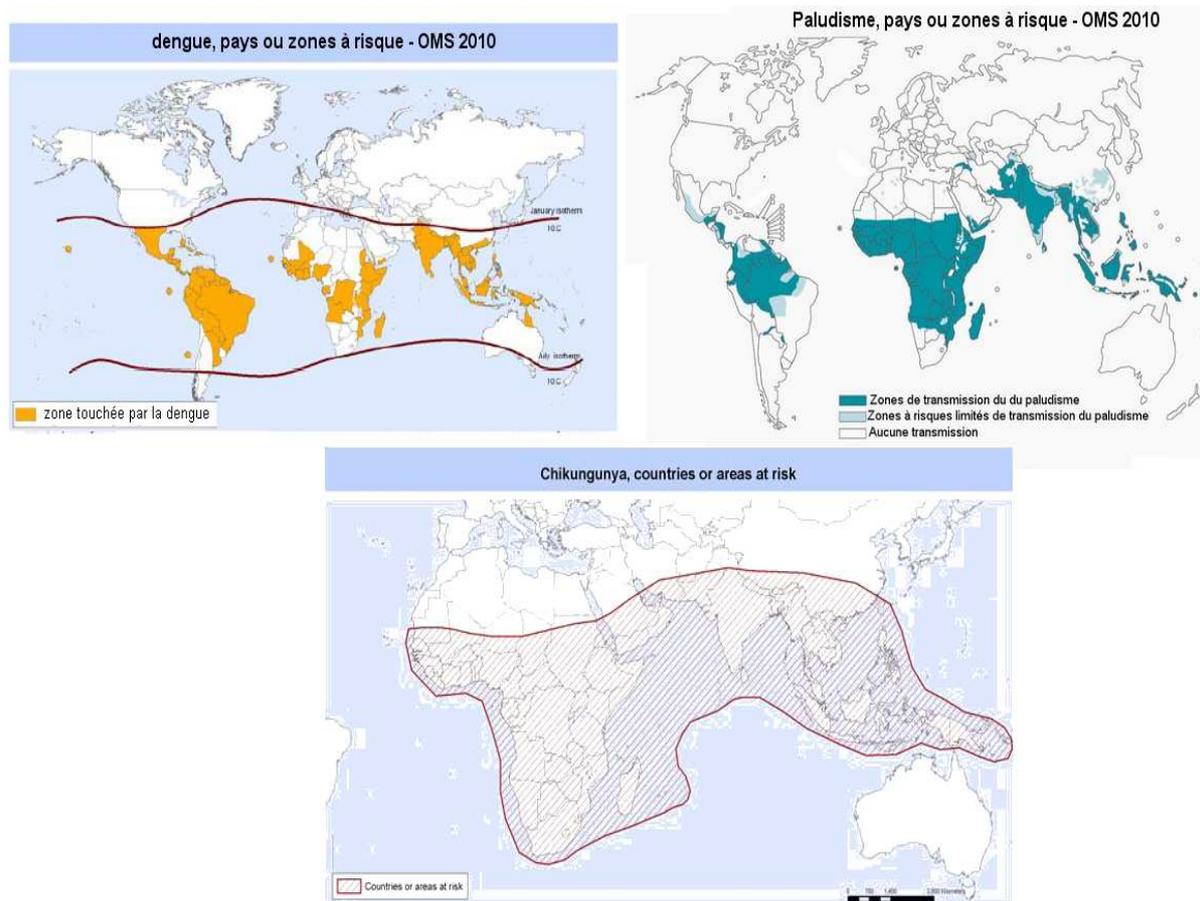


Figure1: Cartes de distribution du paludisme (à droite), la dengue (à gauche) et la Chikungunya(Williams & Wilkins 2008)(en bas) -OMS 2010

En raison de sa localisation géographique, le Maroc est l'ultime porte qui relie les deux continents ; l'Europe et l'Afrique, et constitue en lui-même une destination touristique de choix, ce qui fait de lui une station incontournable, soit comme escale ou destination finale. Ce facteur rend le Maroc très exposé à des cas d'importation de différentes maladies transmissibles, notamment celle qui trouve son origine dans les pays subsahariens. La présence de différents vecteurs capables de remplir la tâche de la transmission, amplifie le risque d'un déclenchement d'une épidémie.

Une fois la situation épidémiologique mondiale est éclaircie il faut se tourner vers le plan national et d'analyser par la suite la situation de la ville afin de définir les différents facteurs internes (nationaux) qui peuvent affecter le déclenchement et l'évolution d'une épidémie.

I.3- Situation épidémiologique nationale

Le Maroc a connu des épidémies dues aux maladies parasitaires. Comme le paludisme, éradiqué depuis 2004, actuellement le Royaume ne recense que des cas importés (DELM, 2009 ; El ouali et al.,2009a), ou les épidémies du virus West Nile qui ont touché le pays en 1996 (Harracket al., 2001), et en 2003 (Schuffenecker et al., 2003) ou encore la leishmaniose qui continue d'enregistrer des chiffres.

Au Maroc, la charge de morbidité due aux maladies transmissibles, reste relativement élevée, et celle liée aux maladies transmises par vecteurs, en constitue une part non négligeable. Si certaines parmi ces dernières sont éliminées (paludisme) ou voie d'élimination (bilharziose), l'incidence des leishmanioses demeure par contre relativement importante.

Selon la Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies (DELM), les résultats des lames examinées sur tout le Royaume, la leishmaniose représente 98% des cas de maladies parasitaires, suivie du paludisme qui lui ne représente que 2% des cas de lames positives, ces cas ont été tous des cas de paludisme importé.

Seulement 4 cas de bilharziose ont été répertoriés dans le pays (moins de 0,1%)(DELM, 2009).

En ce qui concerne le paludisme importé, on trouve que les quatre provinces les plus touchées sont : Grand Casablanca avec 44 lames positives, Rabat-Salé-Zemmour-ZAër avec 26 cas positifs, Marrakech-Tensift-El

Haouz 12 cas et Souss-Massa-Draa 11 cas, ce qui représente un pourcentage de 35%, 20%, 9% et 9% (valeur attribuées respectivement).

Pour la leishmaniose deux provinces sont sévèrement touchées ; Méknès-Tafilalet avec 2429 cas ce qui représente 45% de l'ensemble des cas signal dans le pays, et Souss-Massa-Draa avec 1648 cas soit 30% (DELM, 2009).

Le graphique suivant montre l'évolution des maladies parasitaires qui touchent notre pays.

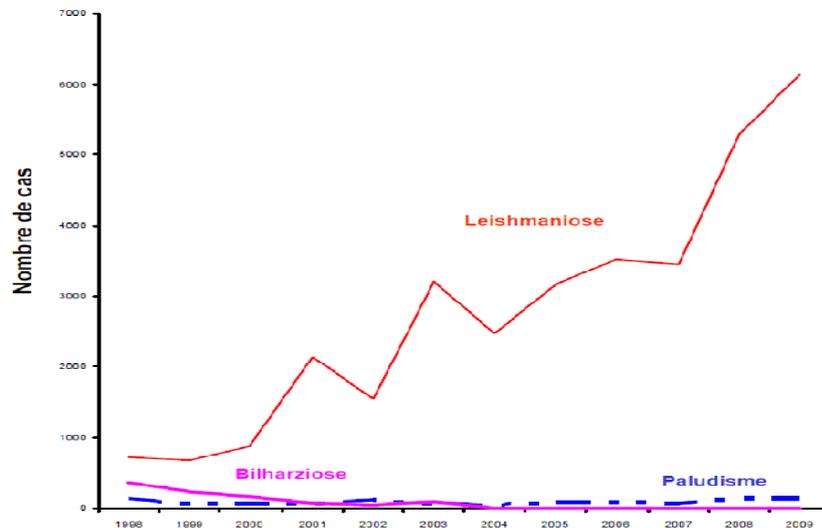


Figure 2 : Evolution du nombre des maladies parasitaires(DELM, 2009).

I.4- Situation épidémiologique de la région Fès Boulemane

Bien que depuis 1999 aucun cas de paludisme autochtone n'a été signalé dans la région de Fès Boulemane, les cas importés ont été recensés toutes les années dans la période comprise entre 1998 et 2011 (14 cas signalé en 2011).

La figure 3 illustre les données épidémiologiques concernant les deux formes du paludisme ; autochtone et importé, dans la période comprise entre 1998 et 2011.

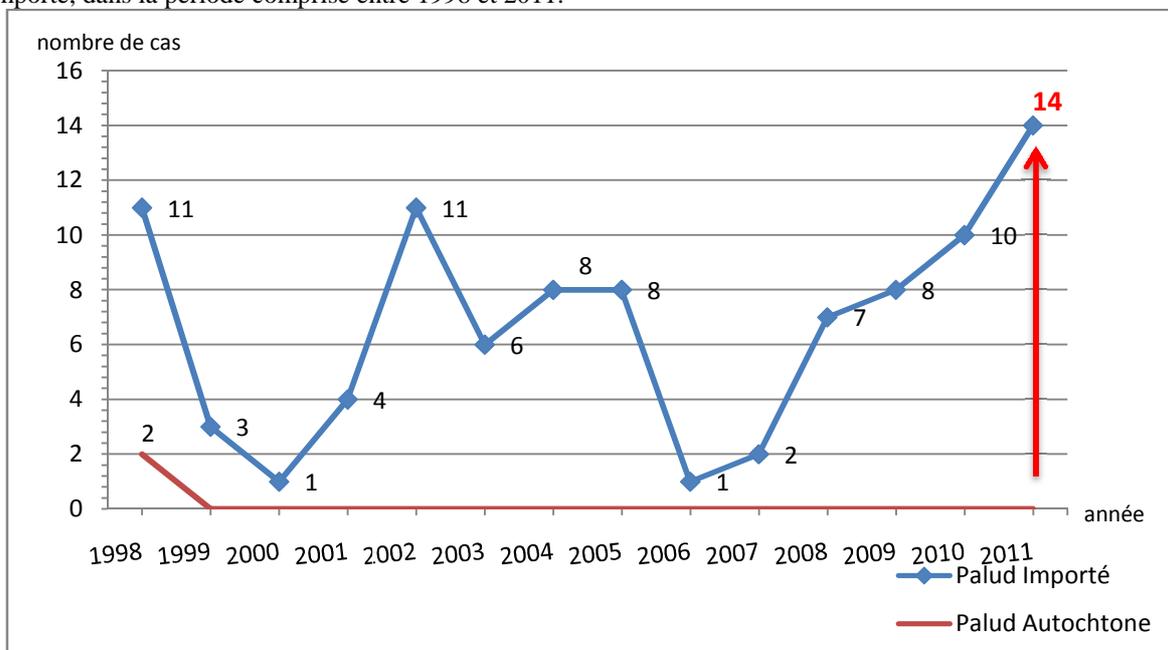


Figure 3 : Situation Epidémiologique du paludisme à la région de Fès 1998-2011

Source : Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès.

1.4.1- Présentation de la ville de Fès

Doyenne des villes impériales, Fès fut fondée en 789 après JC par Idriss Ier. Son fils, le sultan Idriss II, décide en 809 d'y établir le siège de la dynastie. A-traves 12 siècles la ville de Fès a su garder sa majestuosité impériale. (PROJET Gold Maghreb, Région Fès- Boulemane, 2006).

Située au centre nord du pays, englobant une partie du plateau de saïss, du pré-rif et du moyen Atlas, la région de Fès-Boulemane s'étend sur une superficie de 20.318 km², soit 2,8% de la superficie totale du pays. Elle est limitée au Nord-est par la région Taza- El Hoceima, Taounate, à l'Est et au Sud-est par la région de l'orientale, à l'Ouest et au Sud-ouest, par la région Meknès-Tafilalet et au Nord-ouest par la région du Gharb-Chrarda-Béni Hssen.

La position de Fès fait d'elle la plaque tournante qui relie les différentes villes du nord du Maroc entre elles, ce qui le rend obligatoire le passage par elle.

1.4.2- Découpage administratif de la ville

Crée par le dahir N°1-97-84 du 2 avril 1997La région regroupe la préfecture de Fès ainsi que 3 provinces (Boulemane, Sefrou et Moulay Yacoub) et comprend 15 communes urbaines ainsi que 48 communes rurales. Elle a pour chef-lieu la ville de Fès et abrite comme principales localités les villes de Sefrou à 28 Km de Fès, MyYacoub à 17 Km, Boulemane à 100 Km et Missour à 200 Km.

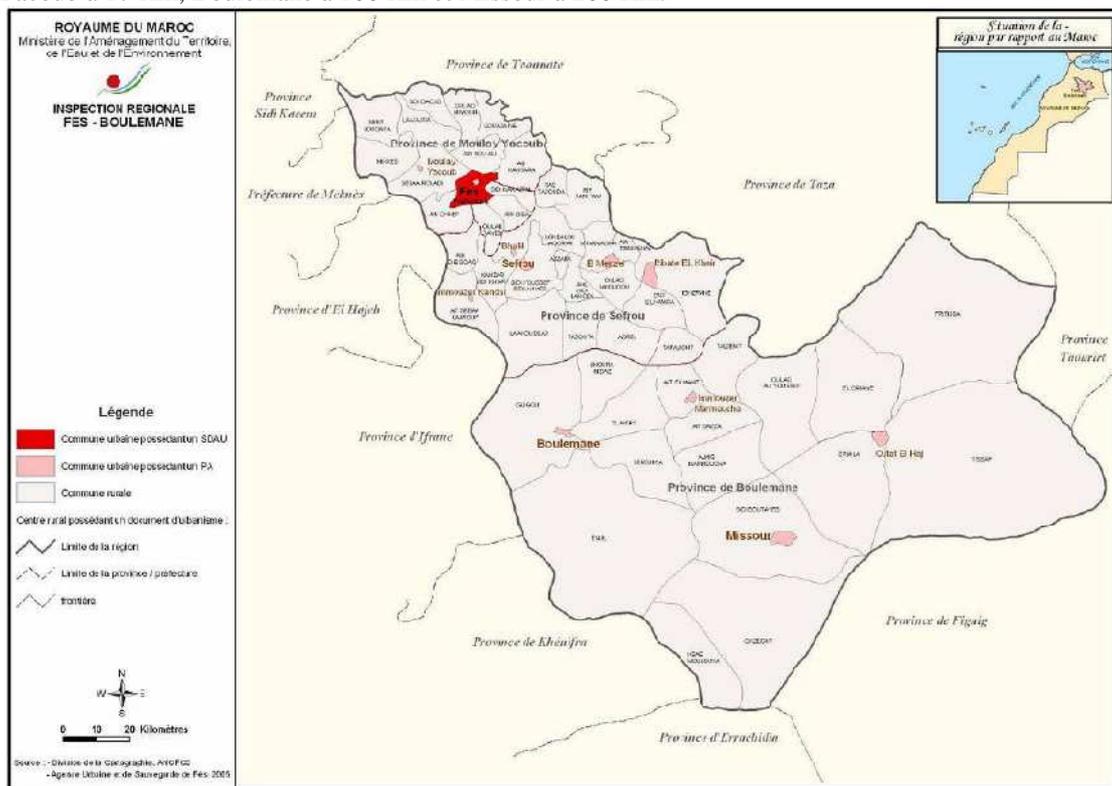


Figure 4 : Carte administrative de la Région de Fès-Boulemane

1.4.3- La population

Selon la Direction de la Planification et des Ressources Financières (DPRF) et le Service des Etudes et de l'Information Sanitaire (SEIS) la région de Fès-Boulemane comptait 1 682 milles habitants en 2009, soit 5,3 % de la population du Royaume. La population urbaine en représente 73% et la rurale 27%, Sa densité moyenne est de 81 hab/Km², elle connaît des disparités remarquables entre les différents provinces et préfecture de la région (PROJET GOLD MAGHREB, 2006).

1.4.4- Données climatiques

Le climat de la région est continental dans sa partie nord (hiver froid et sec et été chaud), la moyenne des précipitations y est de 450mm ; humide et froid dans les zones montagneuses du centre et moyenne des précipitations dépasse les 600 mm, et semi désertique dans les hauts plateaux de la province de Boulemane, au sud où la moyenne des précipitations n'excède pas le cap de 250 mm (PROJET GOLD MAGHREB, 2006).

1.4.4.a- Température moyenne durant la période d'étude

Le suivi de la température est très important, ceci est due au fait que le développement des larves s'affect beaucoup par les changements de la température, ce qui provoque soit une évolution normale ou lente. La figure

5 représente Le graphique illustrant la variation de la température moyenne durant les mois : Mars, Avril et Mai qui ont respectivement comme moyenne des températures 12C°, 16C° et 20C° (GMFF, 2011).

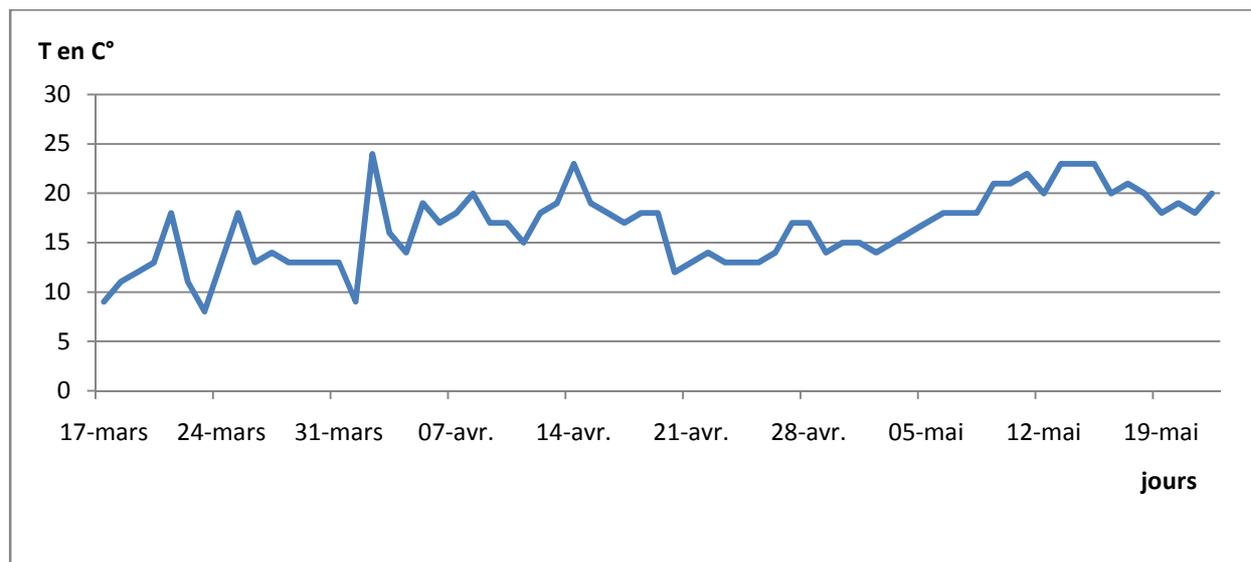


Figure 5: Variation de la température moyenne durant les mois de Mars, Avril et Mai 2011

1.4.4.b- Humidité

La figure 6 représente la variation de l'humidité au cours de la période d'étude. La moyenne des humidités des trois mois Mars, Avril et Mai 2011 respectivement 73,54%, 67,41% et 67%. (GMFF, 2011)

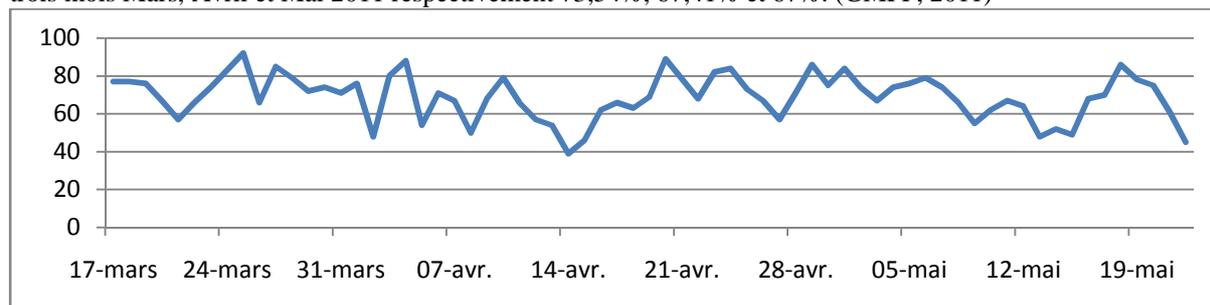


Figure 6 : Variation de l'humidité moyenne durant les mois de Mars, Avril et Mai 2011

1.4.4.c- Pluviométrie

La pluie est un facteur qui perturbe le cycle du développement des insectes, diminuant ainsi leur densité. Entre le 17 et fin Mars il n'y a eu aucune précipitation, cependant le mois d'avril a connu 9 jours de pluie (2, 3, 4, 22, 23, 24, 28, 29 et le 30 avril). Le mois de Mai a connu lui aussi 9 jours de précipitations réparties entre le premier et le 19 Mai (GMFF, 2011).

1.4.4.d- Le vent

Le vent joue un rôle très important dans le déplacement des moustiques, car il leur permet d'atteindre des endroits éloignés facilement en les emportant, ces endroits peuvent être habitable et les moustiques peuvent y trouver des gîtes artificiels créés par l'activité humaines (pots de plantes, récipients non couverts ...).

1.5- Facteurs amplifiant le danger des maladies à transmission vectorielle

La ville de Fès est entourée par des régions a passé épidémiologique, tel que les provinces de Chefchaouen, Khouribga, Khémisset et Taounate, la rend sous une menaced'une réapparition de l'épidémie en provenance de ces régions (Faraj. et al.,2003).

La situation géographique de la ville fait d'elle un point de passage obligatoire pour se rendre aux autres villes du pays, ce qui augmente le nombre de passagers et de visiteurs à travers cette ville (El OualiLalami et al., 2009a).

En plus, la nature culturelle de la ville, fait d'elle un lieu d'organisation de différentes manifestations culturelles, qui constitue une véritable attraction. Comme le festival de la music sacrée de Fès, ou d'autres manifestations plus traditionnelles comme les moussem.

La présence des vecteurs le long de l'année augmente le danger du déclenchement des épidémies (El OualiLalamiet al.,2009b).

Le climat de la ville permet lui également, d'offrir des conditions favorables aux différents vecteurs capables de transmettre différentes maladies.

Les changements climatiques pourraient modifier l'aire de distribution de certains parasites et de certaines maladies transmises par des animaux, des insectes et des tiques, ce qui entraînerait l'apparition de nouvelles maladies infectieuses ou l'augmentation de maladies infectieuses déjà présentes. Le climat influence effectivement plusieurs aspects des cycles de maladies infectieuses tels celui de la reproduction des animaux, des insectes et des tiques, la facilité avec laquelle les insectes vecteurs peuvent transmettre la maladie ainsi que le comportement humain qui mène à l'exposition aux différents vecteurs (Institut National de Santé Publique du Québec, 2007), ce qui rend très possible une réémergence d'une épidémie supprimée dans le passé.

II- Parasite

II.1- Définition

Un parasite, et tout organisme qui se développe aux dépens d'un être vivant pendant toute ou une partie de son existence. Il peut entraîner la détérioration de la santé ou la mort de son hôte.

Le mode de vie parasitaire est très répandu et est observé aussi bien chez les végétaux que chez les animaux. Les parasites, eux-mêmes, appartiennent soit au monde des champignons, soit au monde animal (protozoaires, vers, arthropodes...). Les modes de transmission des parasites sont très variés : voie orale, pénétration transcutanée, voie sexuelle, voie transfusionnelle... (J Dupouy – Camet, 2010)

On distingue trois types de parasites :

- ectoparasite : vit à la surface (pou) ou dans l'épiderme de l'hôte ;
- mésoparasites : occupent les cavités naturelles, reliées au milieu extérieur De leur hôte (poumons, vessie, voies génitales...) ;
- endoparasite: vivent dans des microbiotopes fermés: sang, muscles...

II.2- exemples de certains parasites responsables de maladies parasitaires

Comme il été cité précédemment, les parasites vivent au dépend de leur hôte. Et pour atteindre cette hôte, ils ont besoin d'un vecteur qui assurera le transfert de ce parasite.

Une fois l'hôte atteinte, le parasite s'y développe, et au cours de ce processus il peut causer une détérioration de la santé de son hôte pouvant même causer sa mort.

Le tableau suivant regroupe quelques parasites responsables de différentes maladies parasitaires.

Tableau 1 : Quelques parasité responsables de maladies parasitaires

Parasite	Maladies	Vecteur
<i>Plasmodium falciparum</i>	paludisme	<i>Anophèles</i>
<i>Plasmodium vivax</i>		
<i>Plasmodium ovale</i>		
<i>Plasmodium malariae</i>		
<i>Leishmania</i>	Leishmaniose	<i>Phlébotome</i>
<i>virus de la dengue</i>	Dengue	<i>Aedes</i>
Virus du Nil occidental	Fièvre du Nil	<i>culex</i>

II.3- Classification de quelques parasites

Tableau 2 : Classification de quelques parasites

	Plasmodium \ paludisme	Leishmania\leishmaniose
Domaine	<i>Eukaryota</i>	<i>Eukaryota</i>
Embranchement	<i>Apicomplexa</i>	<i>Euglenozoa</i>
Classe	<i>Aconoidasida</i>	<i>Kinetoplastea</i>

Ordre	<i>Haemosporida</i>	<i>Kinetoplastida</i>
Famill	<i>Plasmodiidae</i>	<i>Trypanosomatida</i>
Genre	<i>Plasmodium</i>	<i>Leishmania</i>
	Marchiafava et Celli, 1895	Ross, 1903

Tableau 3 : Classification de quelques virus

Type	Virus	Virus
Groupe	Groupe IV	Groupe IV
Famille	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>
Genre	<i>Flavivirus</i>	<i>Flavivirus</i>
Espèce	Virus de l'encéphalite japonais	Virus de la Fièvre du Nil occidental

II.4-

Cycle

parasitaire

Il y a deux types de cycle parasitaire, simple ou complexe.

- Le cycle simple : cycle monoxène ou direct : passage direct du parasite de l'homme infesté à l'homme sain (1 hôte) court : sans passage dans le milieu extérieur, le parasite directement infestant, dès leur sortie de l'hôte ;

- cycle complexe : cycle hétéroxène ou indirect : nécessite l'intervention d'hôtes intermédiaires ou de vecteurs.

Selon son type, le cycle parasitaire nécessite les intervenants suivants :

- le parasite : agent pathogène ;
- l'hôte définitif (HD) : héberge la forme adulte ou sexuée (cas du cycle simple) ;
- l'hôte intermédiaire (HI) : héberge la forme larvaire ou non-sexuée, assure la maturation et/ou la multiplication du parasite, elle peut servir de vecteur ou de réservoir pour le parasite.

Dans le cas du paludisme les parasites ont un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez l'anophèle femelle. Au cours de la piqûre, un moustique infecté injecte les formes infestantes qui gagnent rapidement le foie (cycle exo-érythrocytaire). Après une phase de multiplication, les parasites sont libérés dans la circulation sanguine et pénètrent dans les hématies (cycle intra-érythrocytaire). A ce stade la personne peut contaminer le moustique si ce dernier effectue son repas de sang, et par suite il peut contaminer d'autres personnes dans les repas de sang qui suivent.

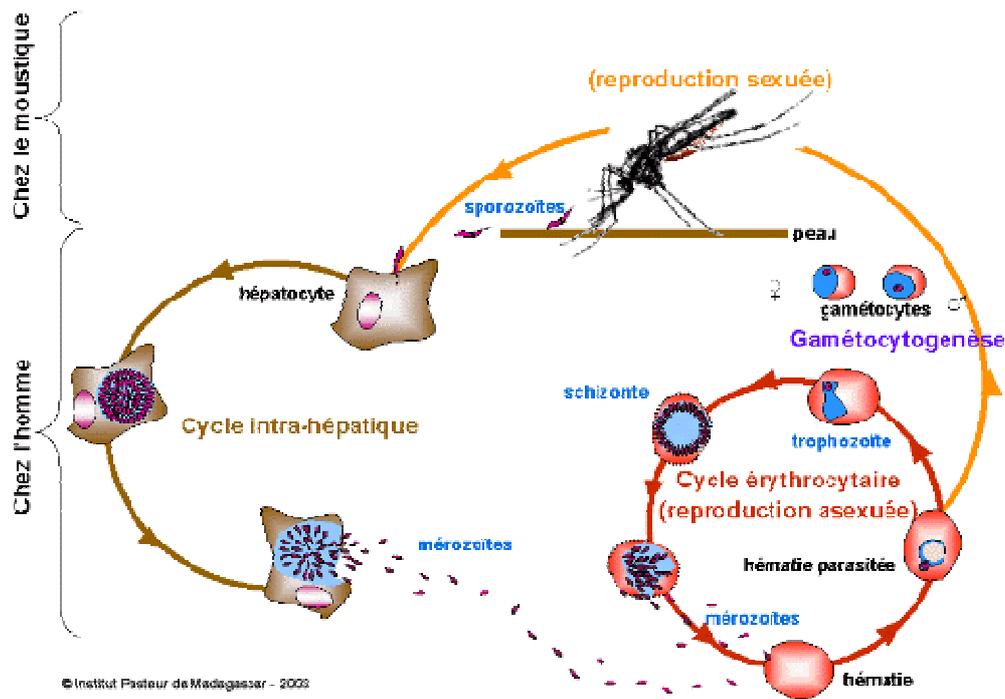


Figure7 : Cycle du plasmodium

III- Vecteurs

III.1 Moustiques vecteurs

Le vecteur est l'agent responsable qui assure une transmission, est dans notre cas cet agent transmetteur est le moustique qui assure la transmission d'agent pathogène depuis une origine contaminée à une cible saine. Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète. Cela signifie que, durant leur vie, ils passent successivement par des stades bien différenciés : œuf, larve, nymphe puis adulte (imago). Les trois premiers stades évoluent en milieu aquatique. L'éclosion des œufs libère dans ce gîte, des larves qui, après quatre mues, se transforment en nymphes. Les formes adultes (imagos) émergent à l'air libre en fendant l'enveloppe nymphale qui leur sert de flotteur pour déplier leurs ailes avant de s'envoler (PASCAL D. et al., 2001).

La durée de ce cycle biologique varie considérablement en fonction de la température atmosphérique et de la nourriture des larves et des femelles. Larves, nymphes et imagos ont une respiration aérienne (PASCAL D. et al., 2001).

En ce qui concerne la respiration des larves, l'air s'introduit par un « siphon » tubulaire (réduit chez les « *Anophelines* » à une simple plaque respiratoire). La nymphe respire par une paire de trompettes. Chez les imagos, les trachées qui conduisent l'air aux organes débouchent de chaque côté du thorax par deux « spiracles » (stigmates).

Les femelles, rapidement après l'émergence, s'accouplent et conservent les spermatozoïdes dans des sortes de sacs, les œufs sont fécondés au fur et à mesure de leur sortie des ovaires. La longévité des femelles peut aller d'une semaine à plusieurs mois.

Selon les espèces, le mode de vie est très variables, les plus dangereuses se nourrissent sur l'homme et se développent près des habitations (PASCAL D. et al., 2001).

Il existe environ 3450 espèces de moustiques décrites et réparties entre 38 genres et 3 sous-familles (*toxorhynchitines*, *anophélinés* et *culicinés*) constituant la famille des *Culicidae* dans l'ordre des diptères. Trois genres regroupent les principaux vecteurs : *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* (de launay p et al., 2011).

III.2- Classification

Règne :	Animal				
Embranchement :	Invertébré				
Classe :	Insecte				
Sous-classe :	Ptérygota				
Ordre :	Diptère				
Sous-ordre :	Nématocère				
Famille :	Culicidae				
Sous-famille :	Toxorhynchitinae	Anophelinae	Culicine		
Genre :	Toxorhynchite	Anophele	Culex	Aedes	Mansonia

Figure 8 : Classification des espèces de la famille des culicidae (IFMT-MS-Paludisme-Entomol-2007)

III.3- Cycle de développement des moustiques

Le cycle du moustique, comme chez tous les insectes diptères, est un cycle bi-phasique:

- Un cycle préimaginal qui se déroule en milieu aquatique et regroupe l'œuf, les quatre stades larvaires et la nymphe ;
- La phase aérienne qui concerne l'adulte ailé ou imago (IGA, ICAS, IGE, 2006).

Comme ils vivent en milieu aquatique avant d'atteindre la maturité, tous les moustiques ont besoin d'eau pour se développer

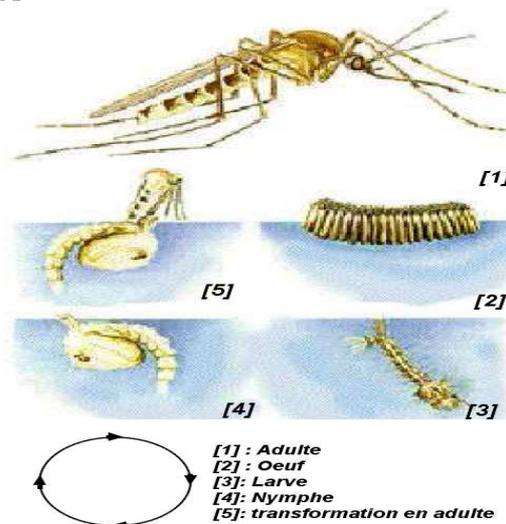


Figure 9 : Cycle de développement des moustiques

III.3.1- Les œufs

Les œufs sont très différents suivant les genres et même les espèces. Ils mesurent environ 1 mm de long. Blanchâtre au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent.

- Ils sont pondus isolément à la surface de l'eau et munis de flotteurs chez les *anophèles*, ce qui les rend insubmersibles ;
- Ils sont groupés en nacelles flottantes de 50 à 200 œufs chez les *culex* ;
- Les *aèdes* pondent leurs œufs
- sur des supports à proximité immédiate de la surface de l'eau, ou à même le sol sec.

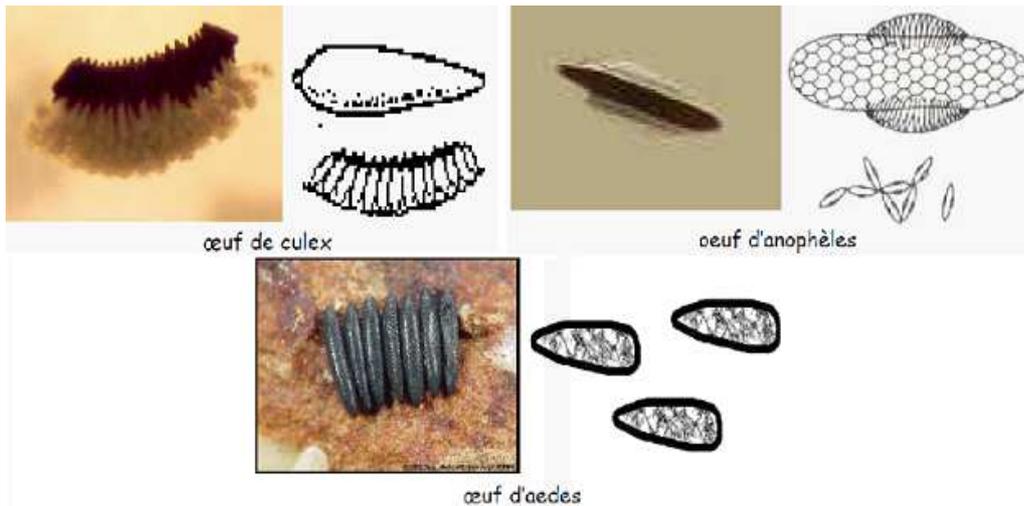


Figure 10 : Œufs de culex, anophèle et aèdes(Bruce,C 1985)

III.3.2- Les larves

Les larves de moustiques ressemblent à des vers et sont dépourvues de pattes et d'ailes. Les larves ont une croissance discontinue et subissent 4 mues, lui permettant de passer d'environ 2 à 12 mm. Les larves sont le plus souvent détritivores mais certaines sont prédatrices ou même cannibales. Elles se déplacent par saccades et se nourrissent généralement par filtration, soit à la surface, soit au fond du gîte larvaire

- les larves d'*anophèles* respirent directement l'air extérieur par des stigmates dorsaux, ce qui leur impose une position de repos parallèle à la surface de l'eau ;
- Les larves d'*aèdes* et de *culex* respirent par un siphon situé à l'extrémité de l'abdomen et sont donc obliques par rapport à la surface de l'eau.

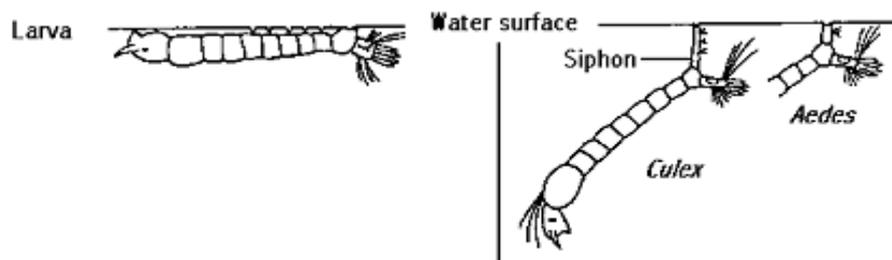


Figure 11: Différences entre *anophèles,culex* et *aèdes*(OMS, 2003).

III.3.3- Les nymphes

Les transformations qui permettent au moustique de passer du milieu aquatique au milieu terrestre débutent à la fin du développement larvaire par la lyse des muscles et se poursuivent chez la nymphe par l'élaboration d'un système totalement nouveau. Ce stade est de courte durée 24 à 48 heures. Les nymphes qui ont la forme d'une virgule, restent généralement à la surface de l'eau mais plongent lorsqu'elles sont dérangées, en déployant et repliant l'abdomen terminé par deux palettes natatoires. Elles ne peuvent pas se nourrir et elles respirent à l'aide de deux trompettes situées sur le céphalothorax et non au bout de l'abdomen comme chez la larve.

III.3.4- Les adultes

Au moment de l'émergence de l'adulte, la cuticule se fend longitudinalement. L'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau.

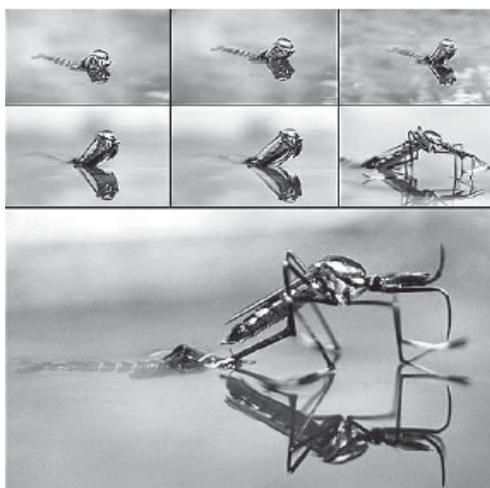


Figure 12: Transformation d'une nymphe en adulte (IRD, 2009)

- *Les anophèles* :

Sans écailles sur l'abdomen, ont des palpes aussi longs que la trompe chez la femelle ou renflés à leur extrémité chez le mâle. *Les anophèles* se développent dans des eaux calmes, douces, rarement dans des gîtes de petites dimensions. Les femelles piquent généralement à partir du crépuscule.

- *Les aèdes* :

Ils ont des écailles sur l'abdomen et des soles insérées en arrière des spiracles antérieurs. Les femelles ont des palpes plus courts que la trompe et des crèques apparents à l'extrémité de l'abdomen. Les plus dangereux, *aèdes aegypti* et *Aedes albopictus*, se développent dans des gîtes créées par l'homme (récipients servant à stocker l'eau ou abandonnés autour des maisons), notamment dans les pneus au rebut. Ils se propagent dans le monde entier depuis la fin des années 1970 (Guillet P et al., 1999).

- *Les culex* :

Ils ont des écailles mais sans soie en avant ou en arrière des spiracles antérieurs. Les femelles ont des palpes plus courts que la trompe et sans crèques apparents à l'extrémité de l'abdomen qui est tronquée. Les *Culex* se développent dans des gîtes très variés suivant les espèces (PASCAL D. et al., 2001).

III.4- Intérêts des moustiques dans l'écosystème

Le moustique représente un maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique. En effet, par sa présence en grand nombre, il représente une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). Ils sont ainsi un maillon important de la chaîne trophique des zones humides. De plus, de par leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique. Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques. Enfin, au stade adulte, il est indéniable que le rôle de vecteur du moustique est prépondérant dans notre environnement. Aujourd'hui, nous ne connaissons pas d'effets a priori positifs dans la transmission de ces microorganismes. Par contre, nous percevons plus facilement son rôle néfaste dans la transmission de maladies.

IV- Lutte antivectorielle (LAV)

La lutte anti vectorielle c'est « la lutte et la protection contre les arthropodes, vecteurs d'agents pathogènes à l'homme et aux vertébrés, et leur surveillance. Elle inclut les arthropodes nuisant lorsque ceux-ci sont des vecteurs potentiels ou lorsque la nuisance devient un problème de santé publique ».

L'objectif de la LAV est d'améliorer l'état de la santé publique, ceci peut être atteint suivant deux principaux objectifs opérationnels :

- Surveillance des gîtes
- Réduire, limiter ou empêcher le contact homme-vecteur,
- Diminuer la densité vectorielle et/ou augmenter la mortalité des vecteurs.

A chacun de ces objectifs correspondent une stratégie et des méthodes de LAV. Ces objectifs pourront en partie être atteints grâce à l'emploi combiné de plusieurs méthodes.

IV.1- Surveillance des gîtes

Le premier pas dans la lutte antivectorielle, est la surveillance des gîtes larvaires. Ceci en organisant des prospections destinées à déterminer la nature des gîtes (temporaire, permanent) et à évaluer les espèces présentes dans les gîtes, et évaluer leur densité.

La détermination de la nature des gîtes, et leur localisation, permet de cibler ceux qui doivent être bien surveillés le long de la période de l'activité des vecteurs (moustique). La prospection des gîtes est organisée toutes les quinze jours, ceci en raison du cycle biologique des larves, elle cible la détermination des espèces présentes en ramenant les échantillons au laboratoire afin de les identifier, ceci en suivant la clé de l'identification des culicidés au Maroc (Himmi, 1995). L'évaluation de leur densité est réalisée en calculant le rapport larves / coups de plateau lors du puisage, où il faut réaliser une série de 10 prélèvements minimum avec un plateau en l'inclinant (45°) afin de recueillir les spécimens à la surface de l'eau grâce à la force de la tension créée qui les aspire vers le plateau.

IV.2- Méthodes de lutte antivectorielle

IV.2.1- Limiter ou empêcher le contact homme-vecteur

Cette méthodologie de lutte se focalise sur l'homme, elle vise l'empêchement d'entrer en contact direct avec un quelconque vecteur, ceci soit par :

- L'installation de moustiquaire imprégnée d'insecticide (MII) cette méthode permet la protection de l'individu des piqûres de moustique mais son utilisation reste très faible en raison de son côté esthétique. En 2001 4% d'utilisateur de la MII en Côte d'Ivoire (Dimi T D. et al., 2006);
- L'application cutanée directe de substance répulsive vis-à-vis des moustiques, mais il apparaît difficile d'établir des programmes de lutte contre le paludisme avec des applications cutanées pour des raisons sociales et économiques. Néanmoins, l'application cutanée journalière reste un bon moyen de se protéger (H. Wajcman et al., 2004);
- La sensibilisation des ressortissants qui se dirigent vers des régions à danger épidémiologique par la distribution de dépliant expliquant la nature du danger et les précautions à prendre pour éviter une quelconque infection (HRT, 2007).

IV.2.2- Diminuer la densité vectorielle

Afin de diminuer la densité du vecteur la lutte antivectorielle doit perturber le cycle de développement des moustiques ceci soit en agissant directement sur les œufs et les larves soit en visant les adultes soit indirectement en se concentrant sur leur milieu naturel et le rendre défavorable.

Les moyens employés pour cet objectif sont différents, et s'étendent des plus simples au plus sophistiqués, ceci est présent dans les trois formes de lutte : physique, chimique et biologique

IV.2.2.a- Lutte physique

Lutte mécanique qui permet l'éradication pérenne d'un gîte larvaire, en aménageant l'environnement (assèchement des marais, drainage...). Ces actions permettent en outre, de réduire la productivité des gîtes en adultes ou d'éliminer complètement ces gîtes. Cette méthode de lutte présente un réel intérêt lorsqu'il s'agit de moustiques dont le mode de vie est domiciliaire ou péri-domiciliaire. Il s'agit d'éliminer tous les récipients naturels ou anthropiques pouvant contenir de l'eau stagnante, soit en éliminant ces gîtes potentiels ou en les vidant de leur eau, soit en les couvrant afin d'empêcher les femelles de venir y pondre.

IV.2.2.b- Lutte biologique

La lutte biologique se base sur le principe de l'introduction dans le biotope des larves ou des moustiques d'un prédateur naturel. Ainsi, de nombreux prédateurs de larves de moustiques existent mais ceux qui présentent un intérêt pour la LAV sont les poissons larvivores comme le Gambusia et insectes aquatiques entomophages (se nourrissent d'insectes) ou de microorganisme (bactérie, parasite, virus...) cette méthode se caractérise par son grand respect envers l'environnement.

IV.2.2.c- Lutte génétique

La lutte génétique vise à contenir, réduire ou éliminer une population en lâchant des insectes partiellement ou complètement stériles en nombre suffisant pour diminuer la capacité reproductrice de la population naturelle (Ministère de la santé, 1997).

IV.2.2.d- Lutte chimique, historique et caractéristiques

La lutte chimique repose sur l'utilisation de produits chimiques (insecticides) à effet toxique envers les insectes cibles. Ces insecticides chimiques utilisés à l'encontre à la fois des adultes et des larves de moustiques ont connu une forte utilisation dans la deuxième moitié du siècle dernier, suite à la seconde guerre mondiale.

On classe les insecticides chimiques en trois catégories. La première génération d'insecticides de synthèse date d'avant 1940 (ex : dinitro-o-cresylate de potassium, dinitro-orthocrésol) et côtoyaient des insecticides inorganiques (aceto-arsenate de cuivre), fluores (fluore de sodium), soufres (sulfure de carbone). La deuxième génération correspond aux insecticides organiques de synthèse divisés en organochlorés (DDT, lindane, endosulfan) le traitement des larves au Maroc par le DDT a commencé dans les années 1950 (OMS, 2007), il y a aussi les organophosphorés (dichlorvos, chlorpyrifos, téméphos) en 1978 le téméphos (Abate 500 CE) a été introduite, et depuis lors, il a été utilisé comme insecticide pour la lutte, il y a aussi les carbamates (carbaryl, aldicarbe, propoxur). La troisième génération d'insecticides, apparue plus tard, comprend les pyrethrinoides de synthèse, les phenylpyrazoles (fipronil), les neonicotinoides (imidaclopride) et aussi les régulateurs de croissance d'insectes (fenoxycarbe, lufenuron) (Regnault- Roger 2005).

L'histoire de la lutte chimique à connue quelques échecs comme celui du DichloroDiphenylTichloroethane communément connu sous l'abréviation DDT.

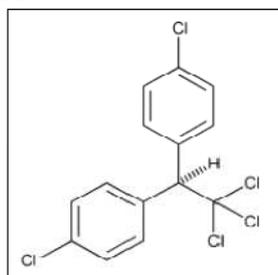


Figure 13 : Formule chimique du DDT : <http://en.wikipedia.org/wiki/Ddt> (20/05/2011)

Bien que préparé dès 1874 par Zeidler (BUDAVARI S. et al., 1989), cet organochloré fut décrit par Muller pour son efficacité insecticide reconnue en 1939 seulement et lui valut le Prix Nobel de Physiologie Médicale en 1948, il s'agit d'un insecticide de la famille des organochlorés agissant au niveau des cellules nerveuses, il s'accumule dans les membranes cellulaires et perturbe les équilibres cationiques K^+/Na^+ conduisant à des convulsions et des paralysies, puis à la mort. Mais ensuite vinrent des études plus poussées sur ses propriétés et son rôle au sein de l'écosystème. Il possède une solubilité dans l'eau quasiment nulle (3 g/L) et une solubilité forte dans les lipides, il possède de fortes propriétés de bioaccumulation (accumulation d'une substance dans un organisme). C'est ainsi que, dans les années 60, on observe des dysfonctionnements d'écosystèmes aquatiques et terrestres parfois situés très loin des zones traitées.

L'exemple le plus frappant est l'atteinte de l'enzyme qui conditionne le dépôt de Ca^{2+} sur les coquilles des œufs chez les manchots polaires. Cet exemple démontre à lui seul le fort pouvoir de circulation planétaire de cet insecticide. De plus des populations d'insectes sont devenues résistantes au DDT comme le cas observé chez les larves *An.labranchia* (Farajaet al., 2008).

Ces insecticides chimiques, très utilisés et très efficaces, ceci grâce à leur multiple voies d'action, comme l'organophosphoré téméphos qui est un neurotoxique.

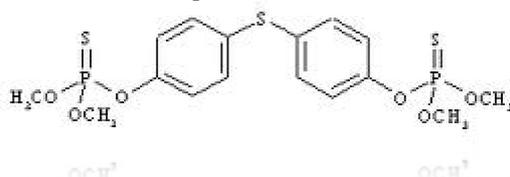


Figure 14: Formule chimique du téméphos : <http://en.wikipedia.org/wiki/Temefos> (20/05/2011)

Le téméphos comme tous les organophosphorés, bloque l'acétylcholinestérase (Ishaaya 2001), mais comme la majorité des produits de synthèse, il possède aussi des points négatifs, tels les dysfonctionnements environnementaux, dont l'un est le développement de résistance des populations traitées.

Au début des années soixante, le message de Rachel Carson dans l'ouvrage « *Silent Spring* » (Carson 1962) a fait prendre conscience des effets pervers des pesticides de synthèse et a obligé les gouvernements à se préoccuper des problèmes environnementaux et de santé associés à l'utilisation des pesticides.

En raison des problèmes cités précédemment, le choix d'une alternative qui regroupe le respect de l'environnement ; chose caractéristique des méthodes de lutte biologique et l'efficacité touchée dans la méthode de lutte chimique devient une nécessité absolue.

Les huiles essentielles renferment en eux un potentiel prometteur, qui pourra élucider l'équation efficacité et respect de l'environnement, à laquelle les méthodes de lutte sont confrontées.

Récemment, les recherches se sont orientées dans le sens du respect de la nature et sa préservation, ceci en utilisant des produits issus de la nature.

Une de ces orientations est l'utilisation des huiles essentielles comme alternative à l'utilisation des produits chimiques dans la lutte antivectorielle.

V- Plantes aromatiques

La diversification des bioclimats présents dans le pays permet l'installation d'une flore riche et variée (plus de 4200 espèces). À côté de cette richesse naturelle, l'extraction des principes aromatiques promet de grandes avancées dans différents domaines.

La valeur de ces ressources naturelles végétales réside dans l'extraction de leurs huiles essentielles.

V.1- Huiles essentielles : définition

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés tels l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid dans le cas des agrumes, les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante. Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme de l'Association Française de Normalisation (AFNOR). Ceux-ci portent alors les noms de (Bruneton, 1993 ; AFNOR, 2000).

Ils sont constitués par les hydrocarbures (terpènes et sesquiterpènes) et des composés oxygénés (alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, lactones, phénols et des éthers de phénol) (Smallfield et al., 2001). Ils sont fréquemment responsables de l'odeur caractéristique des plantes. Selon la Food and Agriculture Organization (FAO), Environ 3000 des huiles essentielles sont connues, et 10% d'entre eux ont une importance commerciale dans la cosmétique, alimentaire, et les industries pharmaceutiques

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu (Rai et al., 2003).

Il y a beaucoup de spéculation au sujet du " rôle " d'huiles essentielles des plantes.

Certainement plusieurs effets apparents " utiles " ont été décrits, tel que la réduction de la compétition des autres espèces de plante par inhibition chimique de la germination des graines, protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et

Bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux (Porter, 2001).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques et conserve l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaïche, 1979).

Leur composition peut varier considérablement selon les espèces de plantes, et au sein de la même espèce de différentes zones géographiques.

L'utilisation des huiles essentielles touche beaucoup de domaines, ceci en raison de leurs multiples avantages et caractéristiques.

V.2- Utilisation des huiles essentielles

Outre l'emploi strictement médical des huiles essentielles, celles-ci sont utilisées dans de nombreux domaines tels que la parfumerie, la cosmétologie, l'agro-alimentaire et l'industrie chimique. Deux industries se partagent ce marché mondial florissant ; il s'agit de l'industrie agroalimentaire et la parfumerie. Les huiles essentielles interviennent dans la fabrication :

- des produits alimentaires: jus de fruits, crèmes glacées, bonbons, etc. ;
- de tabac pour cigarettes ;
- des produits d'hygiène et de beauté ;
- des parfums, la désinfection des locaux (elles sont antiseptiques) ;
- des colles et vernis dans l'industrie chimique (VERLET N., 1997).

V.3- Extraction

Les méthodes d'extraction des huiles essentielles sont très variées, elles s'étalent des plus traditionnelles à celles qui font appel aux techniques récentes.

V.3.1- Extraction à la vapeur d'eau

Dans cette méthode on fait appelle à la vapeur d'eau pour extraire l'huile essentielle.

La vapeur d'eau entraîne les composés de l'huile essentielle, ceci en raison de leur point d'ébullition nettement inférieur à celui de l'eau. La vapeur se charge de ces composé, une fois condensée, nous avons deux phases liquides ; l'eau et 'huiles essentielle, selon leur densité elles se séparent par décantation, dans ce cas on a soit :

- L'huile essentielle en haut et l'eau en bas si cette dernière est plus dense ;
- L'huile en bas et l'eau en haute si cette dernière est plus légère.(Bruneton, 1993)

L'extraction des huiles essentielle par la vapeur d'eau peut se réaliser on opérant de différentes manières et selon la méthode on parlera soit d'hydrodistillation, distillation à vapeur saturée ou d'hydrodiffusion.

V.3.2- Hydrodistillation

La plantes est mise en contact avec l'eau soit dans un ballon (échelle du laboratoire) soit dans un alambic (échelle industrielle et semi-industrielle), on chauffe jusqu'à ébullition, les composés volatiles contenu dans la plantes sont libérés avec la vapeur d'eau, une fois condensé, on obtient deux phases distinctes en raison de leur densités différentes.

L'hydrodistillation possède des limites. Le chauffage prolongé et puissant engendre une détérioration de certains végétaux et la dégradation de certaines molécules aromatiques. L'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters mais aussi des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et/ou des oxydations (BRUNETON J., 1999).

V.3.3- Distillation à la vapeur saturée

La matière végétale et déposée sur un substrat perforé, cette fois elle n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau traverse la plante et en extrait les composés volatiles constituant l'huile essentielle. Cette méthode permet d'opérer a pression atmosphérique et à une température avoisinant les 100C°, ce qui permet d'éviter une quelconque détérioration vis-à-vis l'huile essentielle, pour cette raison la distillation à la vapeur saturée est largement utilisée dans différents secteurs.

V.3.4- Hydrodiffusion

Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau, il est placé sur une grille perforée au-dessus de la base de l'alambic. Les composés volatils entraînés par la vapeur d'eau vont pouvoir être séparés par décantation du distillat refroidi.

Comme il est difficile d'éliminer complètement les traces de solvants, on utilise que très exceptionnellement ces Huiles essentielles en médecine (Roulier G., 1999).

V.3.5- L'expression à froid

On procède par écrasement de plantes (surtout les agrumes). En pressant les zestes on obtient une émulsion d'eau et d'huile essentielle qui doit ensuite être centrifugée et filtrée (wernner M., 2002).

V.3.6- Autres méthodes

- L'enfleurage : Cette technique, la plus ancienne, très coûteuse et peu employée aujourd'hui. On l'emploie pour des fleurs sensibles, ne supportant pas un chauffage trop élevé, comme par exemple le jasmin, la violette et la rose. Les fleurs sont mises à macérer dans des graisses ou des huiles et chauffées (bain-marie ou soleil) et étalées sur des châssis en bois pendant plusieurs jours. Une fois gorgés de parfum, les corps gras sont filtrés au

travers de tissus de lin ou de coton. Les huiles sont ensuite lavées à l'alcool pur, filtrées et évaporées (Brian, 1995) ;

- Utilisation des microondes : cette méthodes permet de facilité la récupération des huiles essentielles ; ceci grâce au chauffage par microondes qui fragilisent les structures enfermant les huiles essentielles facilitant ainsi leur libération ;(Mompon, 1994 ; Brian ,1995)

- L'extraction au CO₂ supercritique : La technique se base sur la solubilité des constituants dans le CO₂. Il permet l'extraction dans le domaine supercritique et la séparation dans le domaine gazeux ; le CO₂ sous pression et à température supérieure à 31°C, le gaz carbonique se trouve dans un état "supercritique", la matière végétale est chargée dans l'extracteur puis le CO₂ est introduit sous pression. Le mélange est recueilli dans un vase d'expansion. La pression y étant réduite, le CO₂ reprend sa forme gazeuse et est complètement éliminé. L'extrait végétal est isolé, les matières premières ainsi obtenues sont proches du produit naturel d'origine sans trace résiduelle de solvant (B. Yepez et al., 2002) ;

L'extraction par solvants : Elle est utilisée pour les plantes fragiles qui sont plongées dans une préparation chimique provoquant la dissolution des substances aromatiques. Après séparation du solvant par distillation, on obtient un produit cireux qui doit être dissout avec de l'alcool. Ce dernier est ensuite éliminé par évaporation. L'HE ainsi obtenue est dite « absolue » (Werner M., 2002 ; Brian, 1995).

V.4- Composition chimique des huiles essentielles

On estime qu'il y a plus de 1000 monoterpènes et 3000 de structures sesquiterpènes. D'autres composés incluent des phenylpropanes et des composés spécifiques contenant le soufre ou l'azote (Svoboda et Hampson, 1999). La figure 15 présente la structure de quelques composants retrouvés dans l'huile essentielle.

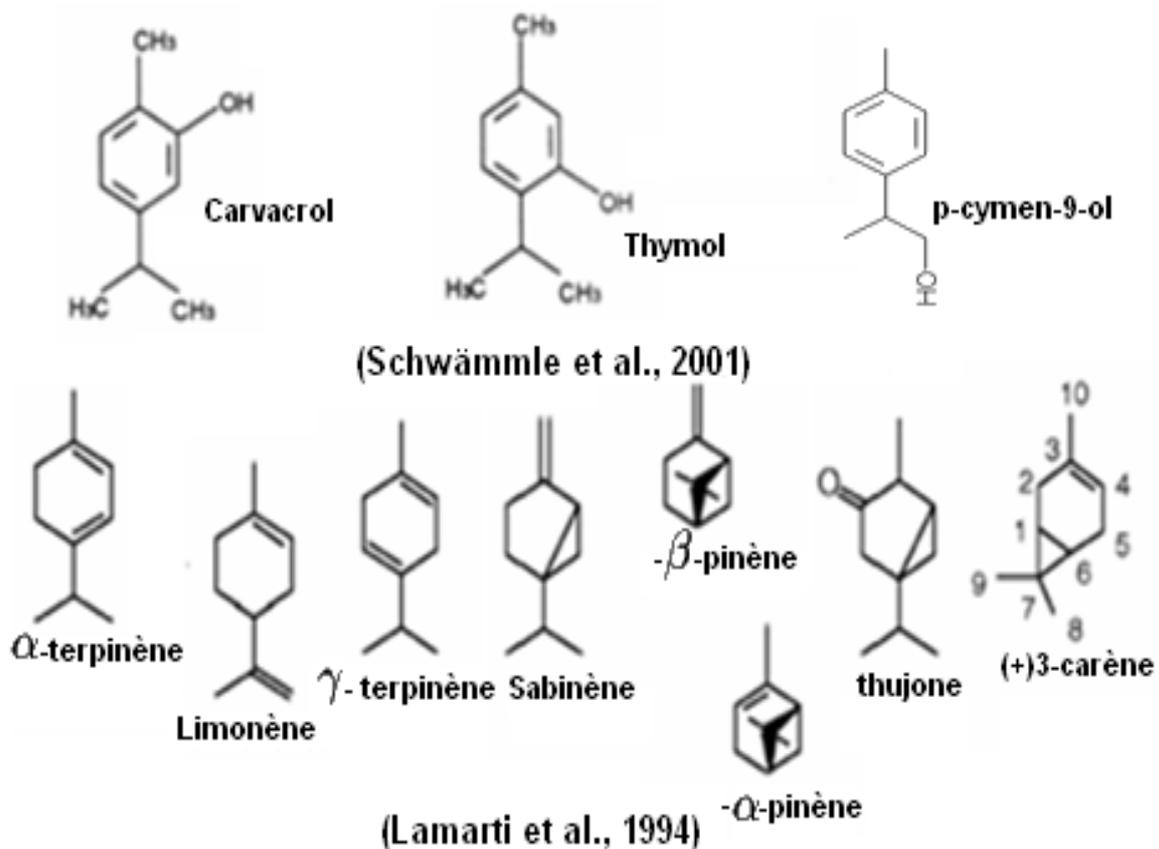


Figure 15 : Structure de quelques substances rencontrées dans les huiles essentielles.

V.5- Localisation et lieu de synthèse

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, fleurs, écorces, bois, racines, fruits et des graines. La synthèse et l'accumulation sont généralement associées à la présence de structures spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante : poils sécréteurs des Lamiacées, des poches sécrétrices des Myrtaceae ou des Rutaceae, canaux sécréteurs des Apiaceae ou des Asteraceae (Bruneton, 1993). Plusieurs catégories de tissus sécréteurs peuvent coexister simultanément chez une même espèce, voire dans un même organe.

V.6- Facteurs influençant la composition

La composition chimique et le rendement en huiles essentielles varient suivant diverses conditions : L'environnement, le génotype, origine géographique, la période de récolte, les parasites, les virus et mauvaises herbes (Svoboda et Hampson, 1999), (Smallfield, 2001). C'est ainsi que l'action des huiles est le résultat de l'effet combiné de leurs composés actifs et inactifs, ces composés inactifs pourraient influencer la disponibilité biologique des composés actifs et plusieurs composants actifs pourraient avoir un effet synergique (Svoboda et Hampson, 1999). Ajouter à la complexité d'huiles volatiles (Svoboda et Hampson, 1999), les proportions des différents constituants d'une huile essentielle peuvent varier de façon importante tout au long du développement, aussi les chemotype ou races chimiques sont très fréquents chez les plantes aromatiques exemple, on compte pour *Thymus vulgaris*; espèce morphologiquement homogène sept chemotype différents (BRUNETON J. 1999).

V.7- Activité insecticide : mécanismes d'action

Les huiles essentielles se disposent de grands potentiels, qui les rend une piste de recherche très prometteuse, et particulièrement leur effet insecticide (Glitho A.I., 2002).

La grande majorité de ces études portaient sur les moustiques, que ce soit sur l'effet répulsif des huiles essentielles (MA Oshaghi et al., 2003) ou sur leur effet ovocide (Martin Ket al., 2006) ou larvicide (Markouk et al., 2000).

Le mode d'action des huiles essentielles est relativement peu connu chez les insectes (Isman, 2000).

V.7.1- Effets physiologiques :

Les huiles essentielles ont des effets anti-appétent, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens. Des travaux récents montrent que les monoterpènes inhibent le cholinestérase (Keane et al., 1999).

V.7.2- Effets sur le system nerveux :

L'octopamine est un neuromodulateur spécifique des invertébrés : Cette molécule a un effet régulateur sur les battements de cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés. Enan (Enan, 2000) et Isman (Isman, 2000) font le lien entre l'application de l'eugénol, de l'alpha-terpinéol et de l'alcool cinnamique, et le blocage des sites accepteurs de l'octopamine. Enan (Enan, 2000) a également démontré un effet sur la Tyramine, autre neurotransmetteur des insectes. En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des Arthropodes. Toutefois, la grande majorité de ces études portaient sur les moustiques, que ce soit sur l'effet répulsif des huiles essentielles ou sur leur effet larvicide.

A côté des huiles essentielle nous nous somme proposer d'étudier l'action d'un autre genre d'extrait naturelle ; « les extraits aqueux », l'idée est d'utiliser l'eau pour extraire depuis la plante différents composés, en but de tester leur effet larvicide. Le choix de l'eau n'est pas un hasard, il été choisi afin d'éviter l'emploi de solvants organiques ou tout autres produits de synthèse pouvant nuire à l'environnement.

VI- Extraits aqueux

La préparation des extraits aqueux suit trois protocoles ; macération, infusion ou décoction, le but c'est de faire passer le maximum des principes actif depuis la plante vers l'eau.

VI.1- Macération

Pour avoir un extrait aqueux au billet de la macération, il faut laisser la matière végétale en contact de l'eau froide durant quelques heures.

VI.2- Infusion

L'infusion consiste à maitre la plante dans l'eau bouillante, et de la laisser infuser pendent quelque minutes, cette méthode est utiliser dans la préparation de beaucoup de médicament traditionnel, et même dans la préparation du thé.

VI.3- Décoction

La décoction permet d'extraire les principes actifs d'une plante en la faisant bouillir dans l'eau durant quelques minutes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériels & Méthodes

I- Lieu et période d'étude

Notre travail a pour objectif, l'évaluation et la comparaison de l'activité larvicide des extraits aqueux et des huiles essentielles de plantes aromatiques, avec les insecticides sur les larves de moustique vecteur de maladies parasitaires notamment les *culicides*. Ces larves sont originaires des gîtes larvaires de la ville de Fès.

Ce travail a été réalisé durant cinq mois et comprend deux volets:

- le premier volet concerne l'obtention des huiles essentielles et des extraits aqueux à partir des plantes aromatiques. Ce volet a été réalisé du 17 Janvier au 17 Mars 2011 au laboratoire de valorisation et application industrielle de l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA);

- le deuxième volet comporte l'évaluation et la comparaison de l'activité larvicide des huiles essentielles et des extraits aqueux, avec les insecticides utilisés par le ministère de la santé dans le cadre de la lutte antivectorielle. Cette partie a été réalisée entre le 17 Mars et fin Mai au sein de l'unité d'entomologie du Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu (LRDEHM).

I.1- Institut National des Plantes Médicinales et Aromatique de Taounat

L'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques (INPMA) se situe à Taounate dans la région du Nord du Maroc à 80 km de Fès, le siège est situé à Sahel Boutaher, Préfecture de Taounate situé à 12 Km du Barrage Alwahdaa. Il constitue le premier établissement au Maroc spécialisé dans le secteur des plantes aromatiques et médicinales. Le décret de création dans le Bulletin Officiel du 04 juin 2002, montre que les missions attribuées à l'INPMA lors de la création sont originales, spécifiques mais innovantes. Le décret de création précise que l'INPMA a pour «vocation tout ce qui concerne la filière des plantes médicinales et aromatiques»(annexe 1).

I.2- Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès

Le Laboratoire Régional de Diagnostic Épidémiologique et d'Hygiène du Milieu (L.R.D.E.H.M), constitue une structure d'appui indispensable pour la surveillance épidémiologique, des maladies infectieuses et transmissibles et pour les programmes sanitaires du Ministère de la Santé dans le cadre de l'Hygiène de l'environnement. Ce laboratoire dispose d'une unité d'entomologie, la seule de toute la région de Fès-Boulemane, chargée de l'identification microscopique des vecteurs de culicides et la réalisation des tests de sensibilité vis-à-vis des insecticides (annexe 1).

I.3- Gîtes dans la ville de Fès

La préfecture de Fès compte 25 gîtes, dont 5 sont temporaires, la prospection de ces gîtes, permet d'évaluer la densité des espèces capables d'être des vecteurs pour certaines maladies à transmission vectorielle ; tel que les *Culex* et les *Anophèles*. La carte ci-dessous représente les gîtes de la préfecture de Fès.

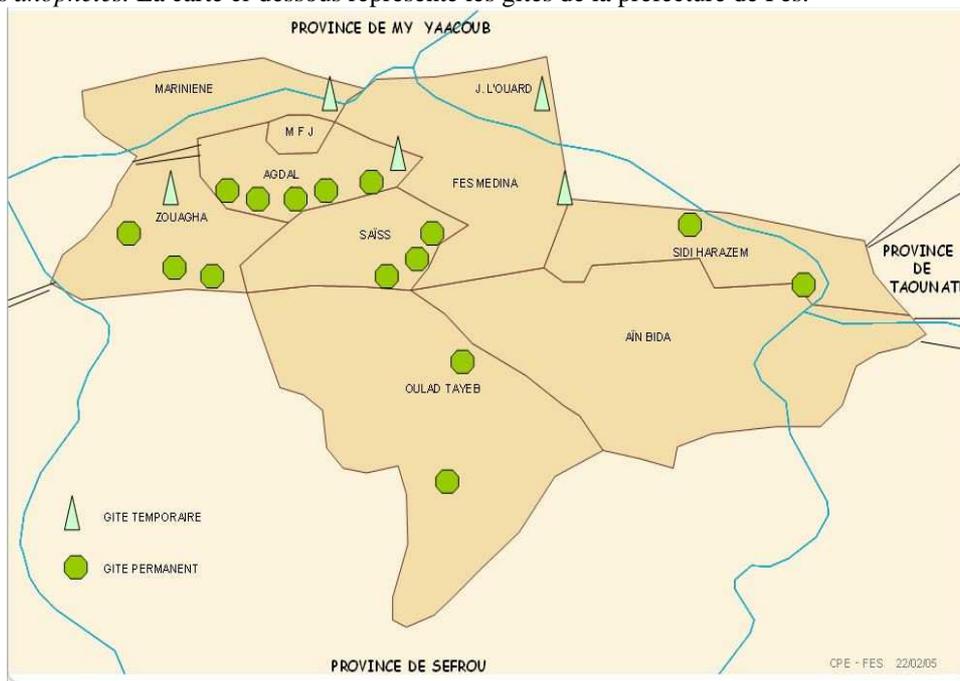


Figure 16 : Carte des gîtes de la préfecture de Fès

Les gîtes visités au Cours des prospections sont :

Tableau 4: Gîtes prospectés entre les mois d'Avril et Mai 2011

Gîtes	Nature	Espèces rencontrées	densité	Lutte antivectorielle
Oued Fès	Permanent	<i>Culex pipiens</i>	Faible	Lutte biologique (gambusia)
		<i>Anopheleslabranchiae</i>	Faible	
Grand Canal	Permanent	<i>Culex pipiens</i>	Importante	Lutte biologique (gambusia)
Marjet El Ouazzani	Permanent	<i>Culex pipiens</i>	Importante	Lutte biologique (gambusia) et chimique
		<i>Anopheleslabranchiae</i>	faible	
Gîtes	Nature	Espèces rencontrées	densité	Lutte antivectorielle
Jardin Jnanesbil	Permanent	<i>Culex pipiens</i>	Très faible	Lutte biologique (gambusia)
Diamant vert	Permanent	-	-	Lutte biologique (gambusia)
Ain Chkef	Permanent	-	-	Lutte biologique (gambusia)
Hafa de MyDris	Permanent	-	-	Lutte biologique (gambusia)

Les critères retenus pour le choix des gîtes sont :

- Passé épidémiologique du gîte ;
- Présence d'une forte densité de larves de culicidés dans le gîte ;
- Mouvement de la population près du gîte.

II- Matériels végétales

II.1- Choix des plante

Le choix des plantes est fondé sur une recherche bibliographique basée sur l'activité larvicide. Cette recherche ciblait aussi la disponibilité des plantes aromatiques, et elle s'intéressait particulièrement aux plantes non testées sur les larves du *Culex pipiens*.

II.2- Récolte des plantes

Le tableau 5 regroupe l'origine des plantes utilisées dans cette étude. Ces échantillons ont été prélevés entre le 29 Février et le 9 Mars 2011.

Tableau 5 : Provenance des espèces végétales utilisées

Espèces végétales	Origine	Espèces végétales	Origine
Citrus aurantium L	INPMA	Juniperus communis L	Ifrane
Citrus sinensis L	Marrakech	Cymbopogon citratus DC	INPMA
Pistacia lentiscus L	Environs de Taounat	Cupressus sempervirens L	Ifrane

II.3- Identification des plantes

Les espèces végétales ont été identifiées à l'Institut National des Plantes Médicinales et Aromatiques de Taounate.

Tableau 6 : Espèces végétales identifiées

Espèces végétales	Famille	Nom populaire	Espèces végétales	Nom populaire	Famille
Citrus aurantium L	Rutaceae	Bigaradier Orange amère	Juniperus communis L	Genevrier	Cupressaceae
Citrus sinensis L	Rutaceae	Orange douce	Cymbopogon citratus DC	citronnelle	Poaceae
Pistacia lentiscus L	Anacardiaceae	Arbre à mastic	Cupressus sempervirens L	cypres	Cupressaceae

II.4- Taux d'humidité et rendement (plante et HE) :

20 g de la matière végétale ont été introduites dans une étuve portée à 60°C pendant 24h, Cela permet d'exprimer la teneur en eau et avoir par suite un rendement représentatif.

Le taux d'humidité TH est calculé comme suivant:

$$TH = (A/B) \times 100$$

A = masse initiale moins la masse après le séchage (en g).

B = masse initiale (en g).

Après extraction, le rendement R en huile essentielle est calculé par la formule suivante :

$$R = \frac{m_{HE}}{m_v} \times 100$$

m_{HE} : masse de l'huile essentielle
 m_v : masse végétale utilisée
 TH : taux d'humidité

II.5- Extraction des huiles essentielles

Nous avons réalisé l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau suivant deux méthodes :

- Extraction par Alambique (échelles semi-industrielle) ;
- Extraction par hydro distillation (à l'échelle du laboratoire).

II.5.1- Extraction par Alambique

La distillation à la vapeur d'eau est le principal procédé d'obtention des huiles essentielles.

La plante est récoltée et chargée dans un large alambic (180 litres), la vapeur d'eau passe à travers la plante à une température inférieure à 120C° pour briser les cellules végétales, libérer les molécules aromatiques et les entraîner dans un serpentin de refroidissement.

Les vapeurs refroidies retournent à l'état liquide, et recueillies dans un essencier, l'huile essentielle se sépare par simple différence de densité avec l'eau florale.

La figure 15 illustre le déroulement de l'extraction des huiles essentielles en utilisant l'alambic.



Alambic Colonne réfrigérante

Essencier Récepteur réfrigèrent

Figure 17 : Hydrodistillation par alambique

[1] : une photo montrant l'alambic utilisé lors de l'extraction.

[2] : la colonne réfrigérante elle permet la condensation de la vapeur issue de l'alambic.

[3] : récepteur réfrigèrent permet d'assurer la maintenance de l'état liquide avant de recueillir l'huile essentielle et l'eau florale dans l'essencier.

[4] : essencier où se passe la séparation entre notre huile essentielle et l'eau florale par phénomène de décantation.

II.5.2- Hydrodistillation par Clevenger :

L'Hydrodistillation par clevenger permet d'obtenir l'huile essentielle en l'entraînant par la vapeur d'eau qui est en contact avec la matière végétale. La figure 16 représente l'appareillage de cette extraction.

(1) : Ballon

(2) : Clevenger

(3) : Réfrigèrent

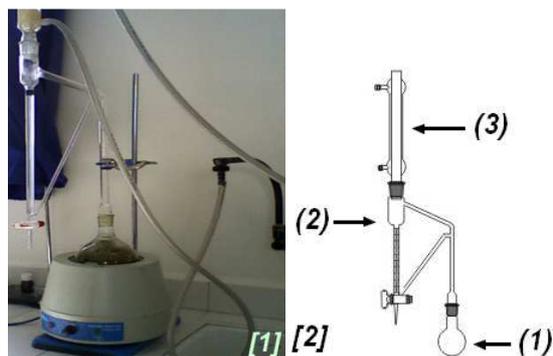


Figure 17 : Hydrodistillation par Clevenger

II.6- Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique de l'huile essentielle a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CG/MS) ; ce qui permet une détermination qualitative et quantitative de ses composés.

L'appareillage suivant : chromatographe à phase gazeuse (*Trace GC ULTRA*) couplé à un spectromètre de masse (*Polaris Q MS* à trappe ionique), l'ionisation été réalisée par impact électronique (70 eV). La base de données utilisée : NIST MS Search. Le tableau suivant résume les conditions de l'injection ainsi que le type de colonne et solvant utilisés :

Tableau 7 : Information générale sur l'analyse CG-SM

<i>Solvant</i>	<i>Acétate d'éthyle (C₄H₈O₂)</i>
<i>Type de colonne</i>	<i>VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), 30 m * 0.25 mm * 0.25 µm.</i>
<i>Volume d'injection</i>	<i>1 µl</i>
<i>Température d'injection</i>	<i>220°C</i>
<i>Température d'interface</i>	<i>300°C</i>
<i>Mode d'injection</i>	<i>Split</i>
<i>Gaz vecteur</i>	<i>Hélium</i>

Tableau 8 : Conditions de séparation

Rampe (°C/min)	Température finale (°C)	Temps (min)
	40	2.00
4	180	0.00
20	300	2.00

II.7- Préparation des extraits aqueux

La préparation des extraits aqueux été réalisé comme suivant :

Les extrait aqueux ont été préparés par une décoction ; 10g de la matière végétale est portée à ébullition durant 30 min dans 100 ml d'eau distillée, afin d'avoir une solution à 10%. Le choix de la décoction est imposé par le fait que la préparation de l'extrait ne doit contenir aucun produit de synthèse, ceci est imposé par le caractère environnemental du sujet qui vise à trouver une alternative aux produits de synthèses utilisés comme pesticides. La décoction dure 30 min, et on récupère l'extrait aqueux après filtration. L'appareillage utilisé est constitué d'un chauffe-ballon, un ballon et un réfrigèrent.

II.8- Estimation du résidu sec des extraits aqueux

Pour avoir une idée quantitative sur la matière végétale extraite par l'eau, on procèdera une concentration dans 40°C durant 48H, après l'obtention du résidu dont la masse est exprimée en mg.l⁻¹ (Brahim et al., 2006).

III- Matériel biologique

III.1- Choix des larves

Les larves ciblées sont *anopheleslabranchia* et *culex pipiens*. En effet ces dernières sont respectivement responsables du paludisme autochtone et de la nuisance que connaît la plus part des villes dans notre pays. Le *culex pipiens* était l'agent causal de la transmission des épidémies du virus West Nile qui ont touché le Maroc en 1996 (Harrack et al., 2001), et en 2003 (Schuffenecker et al., 2003) est fortement suspecté. Sa forte densité qui coïncide dans le temps et dans l'espace avec la date de dépistage des cas équités fait de lui le vecteur le plus probable (FARAJ C. et al, 2009).

III.2- Collecte et conservation des larves

Les larves sont collectées à l'aide de plateau rectangulaire en plastique, qu'on incline de 45° par rapport à la surface de l'eau, la force de tension qui en résulte attire les larves vers le plateau. Leur conservation est réalisée dans l'éthanol à 75% dans des tubes étiquetés.

III.3- Identification des larves

Au laboratoire les larves sont mises entre lame et lamelle, afin d'étudier leurs caractéristiques morphologiques qui permettent leur identification suivant la clé d'identification des culicidés du Maroc (Himmi, 1995).

IV- Produits chimique : insecticides

Les kits d'insecticides sont fournis par l'organisation mondiale de la santé, ils sont préservés à basse température. Le tableau suivant regroupe les insecticides utilisés au cours des tests de sensibilités.

Tableau9 : Pesticides utilisés

Nom	Formule	Nom scientifique	action
Téméphos	$C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$	O,O'-[thiodi-4,1-phenylene]bis[O,O-dimethylphosphorothioate	neurotoxique
Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	2-(diméthoxyphosphinothioylthio) butanedioic	neurotoxique
Fenthion	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	O,O-Diméthyl O-4-méthylthio-m-tolyl phosphorothioate	neurotoxique
Fenitrothion	$C_9H_{12}NO_5PS$	O,O-Diméthyl O-4-nitro-m-tolyl phosphorothioate	neurotoxique

La figure 22 représente les formules développées des insecticides utilisés.

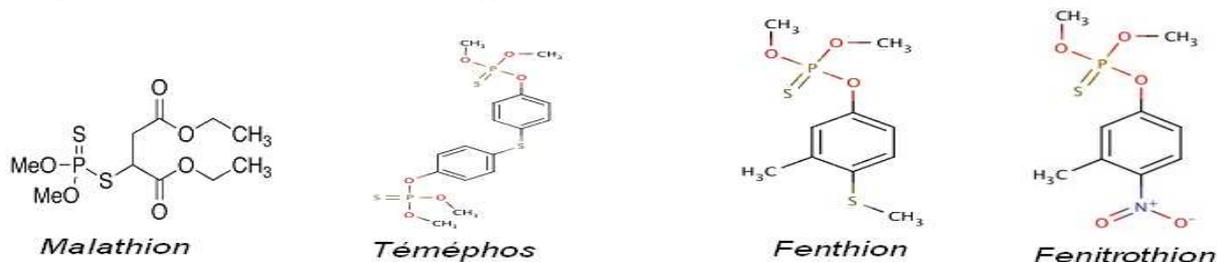


Figure 17 : Formules développées des pesticides utilisés

<http://fr.wikipedia.org> (31/05/2011)

V- Tests de sensibilités

Les tests de sensibilité ont été réalisés conformément au protocole des tests de sensibilité des insecticides réalisés par l'OMS.

Ce test est réalisé sur les larves des stades 3 et 4. Cinq concentrations d'insecticide sont préparées, plus le témoin, avec trois béchers par concentration, contenant chacun 20 larves. Après 24h de contact on dénombre les larves mortes et vivantes.

On calcule les pourcentages de mortalité par la formule suivante :

$$\% \text{ Mortalité} = \frac{\text{Nombre de larve morte ou morbidonde}}{\text{Nombre totale de larves} - \text{Nombre de nymphes}}$$

Si le pourcentage de mortalité chez le témoin ne dépasse pas les 5%, le test est considéré comme valide. S'il est compris entre 5% et 20%, le test est valide mais une correction des pourcentages de mortalité doit être réalisée, ceci en utilisant la formule d'Abbott (OMS, 2004a).

$$\% \text{ Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{Mort. Observée} - \% \text{Mort. Témoin}}{100 - \% \text{Mort. Témoin}} \times 100$$

Ce protocole est adopté pour les tests utilisant les extraits aqueux, huiles essentielles et insecticides.

V.1- Test de sensibilité en employant les extraits aqueux

Dans le but de révéler leur activité larvicide, nous nous sommes proposé d'utiliser les extraits aqueux avec leur concentration maximale. Nous avons pris 1ml de chaque extrait après l'avoir filtré, et nous l'avons ajouté aux béchers contenant les 99 ml de l'eau et 20 larves. Le témoin est constitué de l'eau distillée.

V.2- Test de sensibilité en utilisant les huiles essentielles

La préparation des solutions des huiles essentielles testées, a été réalisée comme suit :

Nous avons préparé une solution stock à 0,1% d'huile essentielle dans l'éthanol et par une série de dilution, nous avons obtenu la gamme des solutions suivantes : 0,01%, 0,04%, 0,06%, 0,08%. L'éthanol joue le rôle de diluant et d'émulsifiant de l'huile essentielle dans l'eau.

1ml de chaque solution préparée est mis dans des béchers contenant 99ml d'eau distillée en contact avec 20 larves. Le témoin est constitué de l'éthanol absolu. Trois béchers ont été réservés par concentration.

V.3- Test de sensibilité en utilisant les insecticides

Le test est réalisé suivant le protocole décrit précédemment. Nous avons préparé les différentes dilutions dans l'éthanol. Le tableau 12 résume les proportions de l'éthanol et d'insecticide dans chaque concentration. Ceci a été réalisé de la même manière pour tous les insecticides.

Tableau10 : Concentrations d'insecticides utilisées.

Solutions mères (mg /l)	Concentration à utiliser (mg/l)	V éthanol (µl)	V insecticide (µl)
1,25	0,00125	900	100
	0,0025	800	200
	0,005	600	400
	0,0125	0	1000
6,25	0,025	600	400

V éthanol : volume d'éthanol. V insecticide : volume d'insecticide

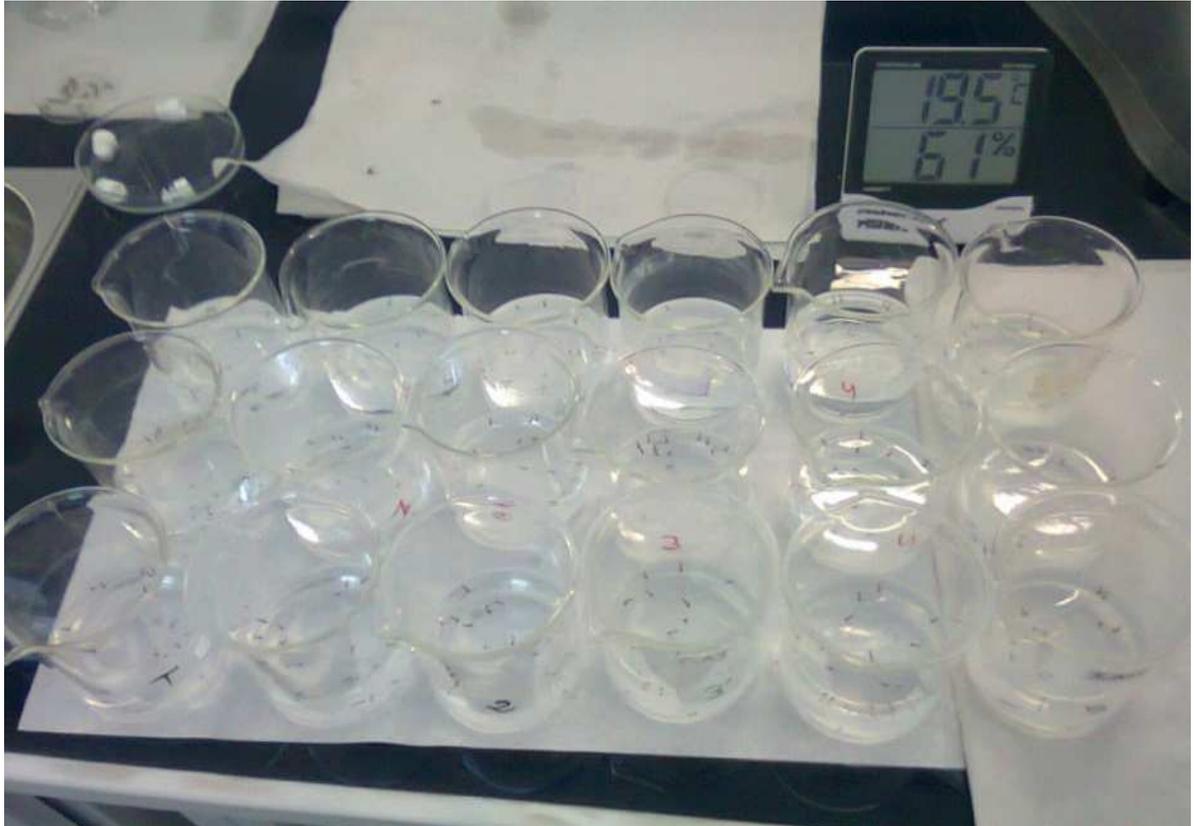


Figure 18: Tests de sensibilités réalisés sur les larves de moustiques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Résultats et Discussion

I- Matériels végétales

I.1- Identification des plantes

Les plantes utilisées ont été identifiées par le botaniste de l'institut.

Tableau 11 : Tableau de classification des espèces végétales testées (<http://fr.wikipedia.org> (site visité le 27/05/2011)).

			
Règne	<i>Plantae</i>	<i>Pinophyta</i>	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Pinopsida</i>	<i>Coniferophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Pinales</i>	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Sapindales</i>	<i>Cupressaceae</i>	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Anacardiaceae</i>	<i>Juniperus</i>	<i>Cupressaceae</i>
Genre	<i>Pistacia</i>	<i>Pinophyta</i>	<i>Cupressus</i>
Espèce	<i>Pistacialentiscus</i>	<i>Juniperuscommunis</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>
			
Règne	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>	<i>Plantae</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Liliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Cyperales</i>	<i>Sapindales</i>	<i>Sapindales</i>
Famille	<i>Poaceae</i>	<i>Rutaceae</i>	<i>Rutaceae</i>
Genre	<i>Cymbopogon</i>	<i>Citrus</i>	<i>Citrus</i>
Espèce	<i>Citrate cymbopogon</i>	<i>Citrus aurantium</i>	<i>Citrus sinensis</i>

I.1.1- *Pistacialentiscus*

Le lentisque, ou pistachier lentisque, est un arbuste poussant dans les garrigues méditerranéennes. Plante de la famille des *Anacardiaceae*, à feuillage persistant, elle donne des fruits, d'abord rouges, puis noirs. C'est une espèce dioïque (Les fleurs mâles et les fleurs

femelles sont portées par des pieds différents). Les fleurs femelles sont de couleur vert Les fleurs males sont rouge foncé. On l'appelle aussi arbre à mastic, car sa sève est utilisée pour la pâtisserie, en confiserie, et pour la fabrication de réalisation d'une gomme à l'odeur prononcée. Dans l'Antiquité, cette gomme faisait office de gum. Cette gomme est aussi employée en cosmétiques. Dans son milieu naturel le pistachier peut atteindre une hauteur de 1 à 3 m Baseflor. (Julve. Ph, 1998)

I.1.2- *Juniperuscommunis*

Le *Juniperuscommunis* appelé aussi genevrier commun, est un arbuste diffus ne dépassant guère 2 à 6 m de hauteur, à écorce gris brun, avec de gros bourgeons nus, et des rameaux presque cylindriques. Les feuilles sont très petites, réduites à des sortes d'écailles, imbriquées sur 5 ou 6 rangs. Les fleurs sont monoïques. Les fruits sont bleuâtres et glauques à maturité (HMAMOUCI M., 1999).

I.1.3- *Cupressus sempervirens*

Conifère qui résiste jusqu'à -20°C. Comme beaucoup de plantes méditerranéennes, c'est le froid humide en hiver qui peut être préjudiciable à sa longévité. Il faut veiller à planter dans un sol bien drainé l'hiver. Les vieux cyprès peuvent atteindre 30 m de hauteur. Pàssed un Feuillage sous forme d'aiguilles vertes sombres persistantes aromatiques. (INRA France).

I.1.4- *Citrate cymbopogon*

Cette herbe vivace pousse en touffe de trente à soixante centimètres de hauteur. Les feuilles sont garnies de poils rêches. Toute la plante dégage une odeur de citron quand on la froisse.

I.1.5- *Citrus aurantium et sinensis*

Deux plantes très connues, *Citrus aurantium* ou orange amère ou bigaradier, et le *Citrus sinensis* qui est l'orange. Ces huiles essentielles étés choisies du fait de leur abondance dans notre pays.

I.2- Evaluation du résidu sec des extraits aqueux

Les résultats des résidus secs obtenus après 48 H de concentration des extraits aqueux à 40C° dans une étuve sont exprimés en ordre décroissant dans le tableau suivant :

Tableau 12 : Résidus sec des extraits aqueux utilisés.

	masse totale (g)	résidu sec (g)	% résidu sec
<i>Citrus limon</i>	0,99973	0,37369	37,38
<i>Pistacialentiscus</i>	1	0,02541	2,54
<i>Citrus aurantuim</i>	1,00345	0,01776	1,77
<i>Arganiaspinosa</i>	1,002759	0,01649	1,64

<u>Limonène</u>	<u>17,12</u>
4-Terpinéol	9,54
o-Cymène	8,40
α -Terpinéol	7,04
β -Pinène	6,91
Sabinène	6,19
Camphène	4,57
Acétate de bornyl	3,21
Oxyde de caryophyllène	2,71
Acétate de butyle	1,80

La fraction monoterpénique représente 92,1% de l'ensemble des composés constituant l'huile essentielle de *Pistacia lentiscus*, l' α -Pinène en présente 32,51%, cette huile est composée aussi d'esters terpéniques 3,21%, d'oxyde 2,71% et enfin des esters 1,8%.

I.4.2- Composition chimique de *Juniperus communis*

Aspect: liquide mobile limpide

Couleur : incolore à jaune-vert

Odeur: légèrement boisée, agréable

Composition :

Composé	Pourcentage(%)
<u>α-Pinene</u>	<u>49,0</u>
<u>β-Phellandrene</u>	<u>9,2</u>
α -Cadinol	3,1
α -Phellandrene	2,7
Myrcene	2,3

δ -Cadinene	2,1
δ -3-Carene	1,6
Sabinene	1,4
epi- α -Cadinol	1,0
Germacrene D-4-ol	0,5
Terpinen-4-ol	0,4
Limonene	- (<0,1)

Les monoterpènes sont présentement majoritairement avec 66,6%, l' α -Pinène en présente 49%, tandis que les sesquiterpènes ne pressentent que 6,7%.

I.4.3- Composition chimique de *Cupressus sempervirens*

Aspect : liquide mobile limpide

Couleur : jaune très pâle à jaune orangé

Odeur : de térébenthine puis boisée et ambrée, très fine

Composition :

Composé	Pourcentage (%)
<u>α-Pinene</u>	<u>30,0</u>
<u>delta-3-Carene</u>	<u>24,0</u>
Terpinolene	6,6
α -Terpenyl acetate	6,6
Myrcene	4,1
Limonene	4,0
Germacrene D	4,0
β -Pinene	2,6
Sabinene	2,0

α -Humulene	1,3
β -Caryophyllene	1,2
Bornyl acetate	<0,1%

Les monoterpènes sont présent en masse dans cette huile, ils dominent avec un pourcentage de 73,3%, les sesquiterpène représente 6,5%, les ester terpéniques sont présent également avec un pourcentage de 6,6%.

I.4.4- Composition chimique de *Cymbopogon citratus*

Aspect : liquide mobile limpide

Couleur : jaune pâle à vert pâle

Odeur : fraîche, herbacée, citronnée

Composé	Pourcentage(%)
<u>Geranial</u>	<u>39,5</u>
<u>Neral</u>	<u>33,3</u>
<u>Myrcene</u>	<u>11,4</u>
Geraniol	3,1
Linalool	1,3
6-methyl-5-Hepten-2-one	1,2
(Z)- β -Ocimene	0,7
2-Undecanone	0,5
2-Tridecanone	0,4
(E)- β -Ocimene	0,3
6,7-Epoxyocimene	0,3
Nerol	0,3
β -Citronellol	0,3
Geranyl acetate	0,2
α -Cadinol	0,2
Citronellal	0,1

(E)-Caryophyllene	0,1
α -(E)-Bergamotene	0,1
δ -Cadinene	0,1
5-epi-7-epi-a-Eudesmol	0,1
α -Pinene	<0,1
Rosefuran epoxide	<0,1

Les monoterpènes représentent 91,7% de la composition de l'huile essentielle de *Cymbopogon citratus*.

I.4.5- Composition de l'huile essentielle *Citrus aurantium*

Composé	Pourcentage (%)
<u>Limonene</u>	<u>90,0</u>
<u>α-Terpenylacetate</u>	<u>5,1</u>
β -Pinene	1,5
Myrcene	1,3
α -Pinene	0,9
Sabinene	0,5
β -Caryophyllene	<0,1%
α -ylangene	<0,1%
Valencene	<0,1%
Terpinolene	<0,1%
Bornylacetate	<0,1%

Comme le montre le résultat de la composition chimique du *Citrus aurantium*, le composé majoritaire est le limonène avec 90%, qui est un monoterpène.

I.4.6- Composition de l'huile essentielle *Citrus sinensis*

Aspect : liquide huileux mobile

Couleur : orangé rougeoyant

Odeur : fraîche, sucrée, fruitée et acidulée

Composé	Pourcentage (%)
<u>limonène</u>	<u>95.36</u>
<u>myrcène</u>	<u>1.98</u>
alpha-pinène	0.52
sabinène	0.44
linalol	0.38
décanal	0.24
delta-3-carène	0.17
géranial	0.10
néral	0.05

II- Matériel biologique

II.1- Gîtes retenus pour les tests de sensibilité

Le gîte retenu pour les tests de sensibilité, est le gîte nommé Grand canal, il se trouve en prenant le départ de Fès vers Meknès à environ 500 mètres avant l'intersection des deux routes nationales ; N6 en destination de Meknès avec la N4 qui permet d'aller vers douyet (figure 20).

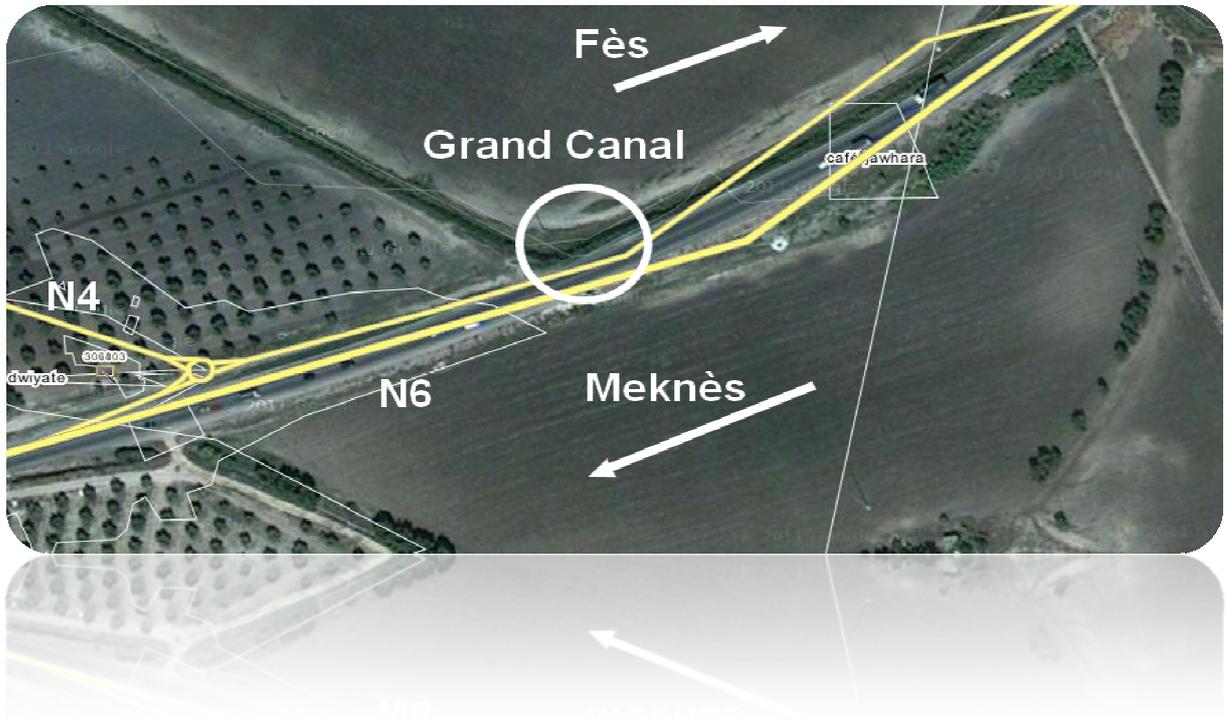


Figure 20 : Image satellitaire du gîte grand canal.

Ce gîte se caractérise par, une très forte densité, ceci grâce à son eau chaude issue de la source Ain Lah, ce qui permet un bon développement des larves et grâce aussi aux roseaux qui le couvre leur formant ainsi une protection (Figure 21).



Figure 21 : Gîte Grand Canal.

La figure 21 montre l'opération de la pêche larvaire en utilisant un filet.

II.2- Espèces rapportées lors des prospections

Lors des prospections des gîtes, nous avons rencontré deux espèces ; *L'anopheleslabranchia* et le *culex pipiens*. La densité de la première espèce a été très faible, et elle ne permettait pas de réaliser de tests de sensibilité, sa faible densité s'explique d'une part par sa grande exigence envers les caractéristiques de son biotope (eau claire, stagnante et ensoleillée...) et d'autre part par la mise en place de la lutte antivectorielle qui la cible (El Ouali Lalami et al., 2009b)

II.3- Espèce retenue pour les tests de sensibilité

L'espèce retenue pour les tests de sensibilité est le *culex pipiens*. Ceci en raison de sa forte densité et de sa responsabilité dans la transmission de certains maladies dans d'autres pays où elle est considérée comme l'un des principaux vecteurs du virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLE) aux États-Unis, pays dans lequel il a été considéré aussi comme le principal responsable de l'épidémie

du virus West Nile en 2002 (PALMISANO CT. et al., 2005) et au Maroc en 1996 (Harrack et al., 2001), et en 2003 (Schuffenecker et al., 2003).

III- Résultats des tests de sensibilité

III.1- Résultat des tests réalisés par les Extraits aqueux

Conformément au protocole précédemment décrit et afin de révéler l'activité des extraits aqueux, nous nous sommes proposé de tester leur concentration maximale. En cas de constatation d'une activité intéressante, une série de dilutions sera préparée et testée.

Les extraits aqueux utilisés sont : *Pistacialentiscus*, *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus limon*, *Cymbopogon citrate* et *Arganiaspinosa*.

Le tableau 13 regroupe les résultats obtenus des tests de sensibilité sur les larves du *Culex pipiens* (stade 3 et 4) exposés aux extraits aqueux durant 24h.

Tableau 14 : Résultats des tests de sensibilité utilisant les extraits aqueux.

Conditions du test		Témoïn				Exposés					
T C°	%HR	Vivants	Morts	Total	%mortalité	Extraits	Concentration %	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée
23,3	61	53	2	55	3,64	<i>P.leniscus</i>	10	51	6	57	10,53
						<i>C.limon</i>	10	49	6	55	10,91
						<i>C.sinensis</i>	10	48	9	57	15,79
						<i>C.aurantium</i>	10	44	9	53	16,98
						<i>C.citratus</i>	10	53	5	58	8,62
						<i>A.spinosa</i>	10	55	4	59	6,78

La figure 22 illustre les pourcentages de mortalité des extraits aqueux testés sur les larves de *Culex pipiens*.

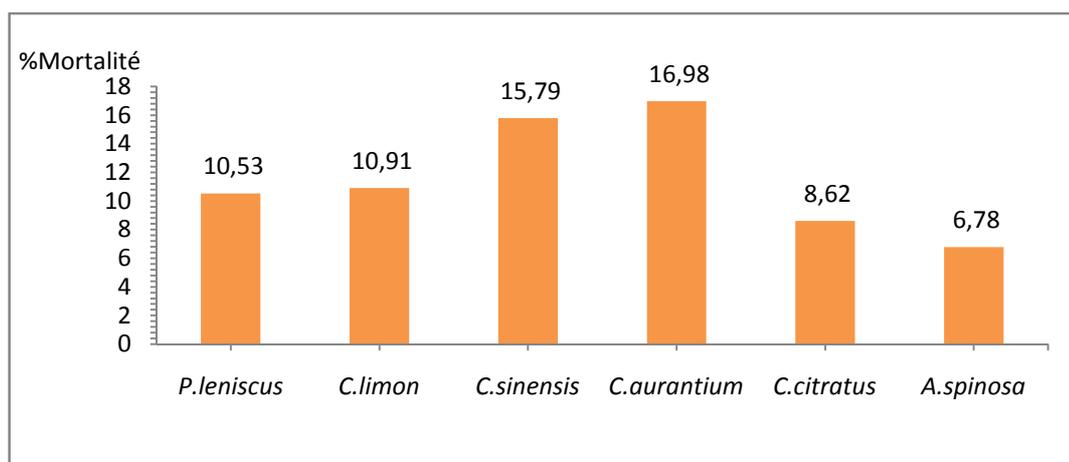


Figure 22 : Pourcentages de mortalité enregistrés dans le test de sensibilité par les extraits aqueux.

Tableau 15: Résidus sec, pourcentage de mortalité des tests de sensibilités des extraits aqueux

Extraits aqueux	% résidu sec	% de mortalité
<i>Citrus limon</i>	37,38	10,91
<i>Pistacialentiscus</i>	2,54	10,53
<i>Citrus aurantuim</i>	1,77	16,98
<i>Arganiaspinosa</i>	1,64	6,78
<i>Citrus sinensis</i>	1,52%	15,79
<i>Citronnelle</i>	0,40%	8,62

Les extraits aqueux utilisés pour les tests de sensibilité sur les larves du *Culex pipiens*, ont montré une activité larvicide faible ne dépassant pas les 17%.

D'après le tableau 14 nous remarquons qu'un pourcentage élevé en résidus sec ne permet pas d'obtenir une forte activité larvicide.

III.2- Résultats des tests réalisés par les huiles essentielles

Dans un premier temps nous avons testé les huiles essentielles avec des pourcentages allant de 0,2% jusqu'à 1% en huile essentielle. Ceci a pour but, la détermination de la dose minimale qui cause 100% de mortalité. Ensuite nous avons préparé des dilutions dans l'éthanol pour déterminer les doses létales 50% et 90%.

T1 : Tests de sensibilité des huiles essentielles avec des concentrations comprises entre 0,2% et 1%.

T2 : Tests de sensibilité des huiles essentielles avec des concentrations comprises entre 0,01% et 0,1%.

III.2.1- Résultats du test de sensibilité en utilisant *Citrus aurantium*

Le tableau 15 illustre les résultats obtenus sur les larves du *Culex pipiens* pour différentes doses de l'huile essentielle *Citrus aurantium*.

Tableau 16 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle *C. aurantium*.

	Témoin			<i>Citrus aurantium</i>						Test	
	Vivants	Morts	Total	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90	
T2	53	7	60	0,01	39	21	60	26,42	0,035	0,07	

				0,04	23	37	60	56,59
				0,06	8	52	60	84,89
				0,08	1	59	60	98,10
				0,10	0	60	60	100
T1	58	2	60	0,20	0	60	60	100
				0,40	0	57	57	100
				0,60	0	57	57	100
				0,80	0	59	59	100
				1	0	60	60	100

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	18-avr	67%	23C°	22,3C°
T2	27-avr	60%	22,8C°	22C°

Le graphique 23 illustre la variation de la mortalité en fonction de la concentration de l'huile essentielle *C. aurantium*.

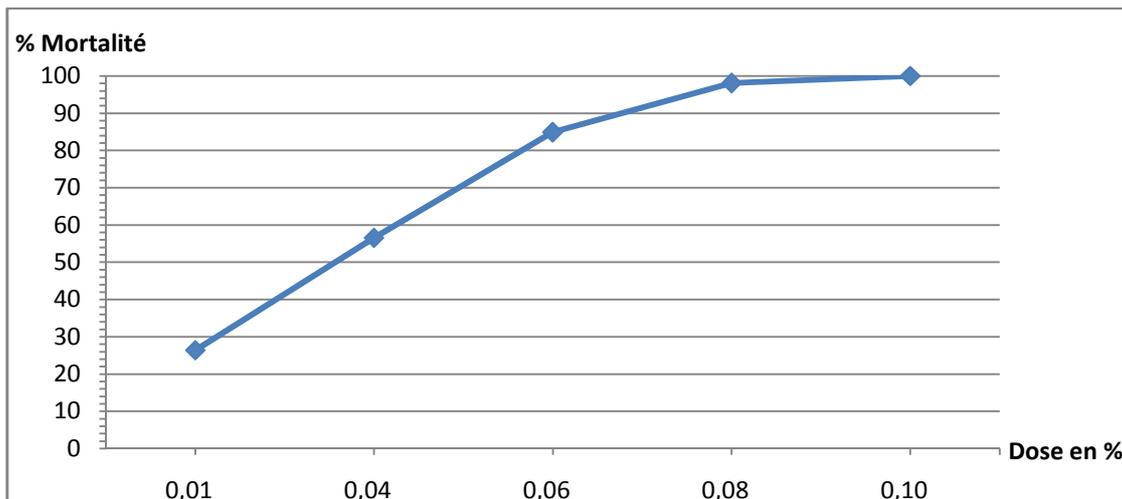


Figure 23 : effet larvicide de citrus aurantium.

L'huile essentielle *citrus aurantium* possède une activité larvicide intéressante, avec DL50 égale à 0,035% et DL90 de l'ordre de 0,07%. L'activité larvicide du *C.aurantium* a été moyennement appréciée dans l'étude menée par « Waseemakram » en 2010, sur les larves des *aedesalbopic* (Waseemakram et AL, 2010), où les pourcentages de mortalité ne dépassaient pas les 50% après 24h d'exposition, pour une concentration maximale de 0,8%. Mais après 72h d'exposition l'huile essentielle a causé plus de 80% de mortalité.

Cette différence peut être expliquée par :

- La méthode de la réalisation des tests de sensibilité ;
- La différence des espèces exposées aux tests de sensibilité ; *culex pipiens* dans notre cas et *aedesalbopic* pour « Waseemakram » ;

- Les différences de la composition chimique des deux huiles essentielles à cause de facteurs intrinsèques (cycle végétatif, chemotype) ou extrinsèques (météo, nature du sol...).

Le composé majoritaire de l'huile *C.aurantium* est le limonène avec 90% qui est un monoterpènes. Les monoterpènes sont connus pour leurs effets larvicides (PapachristosetStamopoulos, 2002).

III.2.2- Résultat du test de sensibilité en utilisant *Pistacialentiscus*

Le tableau 16 regroupe les résultats obtenus après l'exposition des larves de *Culex pipiens* à *Pistacialentiscus* durant 24h.

Tableau 17 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle

Pistacialentiscus

	Témoïn				<i>Pistacialentiscus</i>					Test	
	Vivants	Morts	Total	%Mortalité	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90
T2	53	5	58	8,62	0,01	47	13	60	14,27	0,062	0,160
					0,04	40	20	60	27,04		
					0,06	26	30	56	49,19		
					0,08	13	47	60	76,28		
					0,10	8	52	60	85,40		
T1	55	3	58	5,17	0,20	0	58	58	100		
					0,40	0	58	58	100		
					0,60	0	60	60	100		
					0,80	0	60	60	100		
					1	0	59	59	100		

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	19-avr	73%	21C°	19,5C°
T2	02-mai	62%	20C°	19,7C°

La figure 24 représente l'évolution du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration de l'huile essentielle *Pistacialentiscus*.

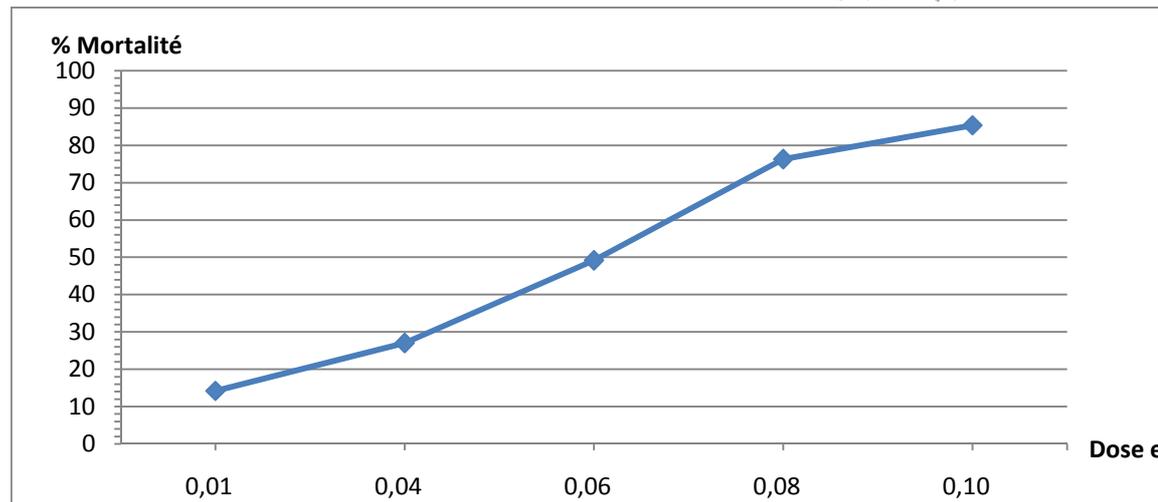


Figure 24 : Pourcentage de mortalité des larves de culex pipiens en fonction de la concentration de *Pistacialentiscus*.

Pistacialentiscus présente une activité larvicide intéressante, avec une DL50 de 0,062% et une DL90 de 0,16%. Mais cette activité reste faible par rapport à celle constatée pour l'huile essentielle *C.aurantium*. sa composition chimique est dominée par les composés monoterpéniques ; limonène et α -pinène connus pour leurs effets larvicides (LUCIA Alejandro et al., 2007).

II.2.3- Résultat du test de sensibilité en utilisant *Cymbopogon citrate* (citronnelle)

Le tableau 17 présente les résultats obtenus en utilisant la *citronnelle*.

Tableau 18 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle *Cymbopogon citrate*.

	Témoïn				<i>Cymbopogon citrate</i>					Test	
	Vivants	Morts	Total	%Mortalité	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90
T2	53	7	60	11,66	0,01	47	12	59	9,81	0,075	0,68
					0,04	40	19	59	23,25		
					0,06	36	24	60	32,08		
					0,08	26	34	60	50,93		
					0,10	19	41	60	63,77		
T1	55	2	57	3,51	0,20	13	45	58	77,59		
					0,40	7	50	57	87,72		
					0,60	5	52	59	88,14		
					0,80	0	59	59	100		
					1	0	57	57	100		

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	18-avr	62%	22C°	21,2C°
T2	28-avr	62%	23,5C°	22,6C°

Le graphique 25 montre l'évolution des pourcentages de mortalité concernant l'huile essentielle *C. citratus*.

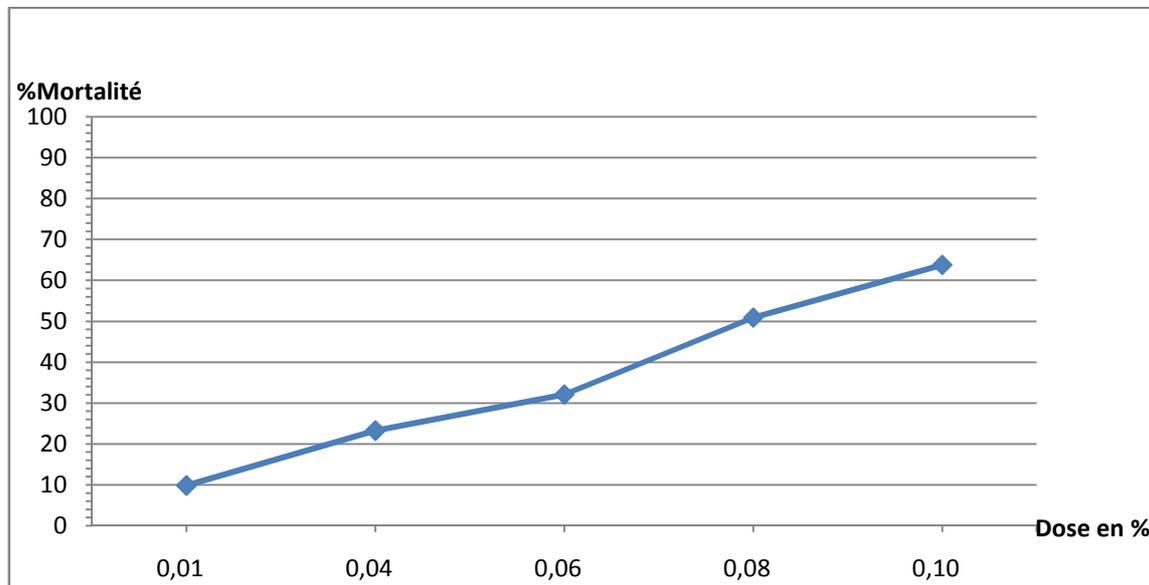


Figure 25 : Pourcentage de mortalité des larves de culex pipiens en fonction de la concentration de la citronnelle

La citronnelle a montré un effet larvicide très faible par comparaison aux deux précédentes huiles essentielles. Ceci est confirmé par les valeurs : DL50(0,075%) et DL90% (0,68%).

La composition chimique de la citronnelle montre qu'elle est composée majoritairement de citral, sous ses deux formes isomères ; géranial 39,50% et le neral 33,30%.

L'étude menée par Eveline et al. (2004) a montré que la citronnelle a une intéressante activité larvicide sur les larves d'*aedes aegypti*. D'après cette étude la dose responsable de la mortalité de 100% est de 100ppm. Ce résultat a été obtenu suivant un protocole de tests de sensibilité différent de celui de l'Organisation Mondiale de la Santé.

III.2.4- Résultat du test de sensibilité en utilisant *Juniperuscommunis* (*genevrier*)

Les résultats obtenus en utilisant le *genevrier* sont détaillés dans le tableau 18.

Tableau 19 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle

Juniperus communis

		Témoïn				<i>Juniperus communis</i>					Test	
		Vivants	Morts	Total	%Mortalité	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90
T2	56	3	59	5,08	0,01	49	11	60	13,95	0,064	0,21	
					0,04	39	19	58	29,15			
					0,06	33	25	58	40,05			
					0,08	20	35	55	61,17			
					0,10	11	46	57	79,66			
T1	55	2	58	3,45	0,20	6	52	58	89,66			
					0,40	0	57	57	100			
					0,60	0	59	59	100			
					0,80	0	57	57	100			
					1	0	57	57	100			

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	20-avr	72%	19°C	18,3°C
T2	12-mai	62%	22,8°C	22°C

Le graphique 26 illustre l'évolution du pourcentage de mortalité chez les larves de *Culex pipiens* en fonction des concentrations du genévrier.

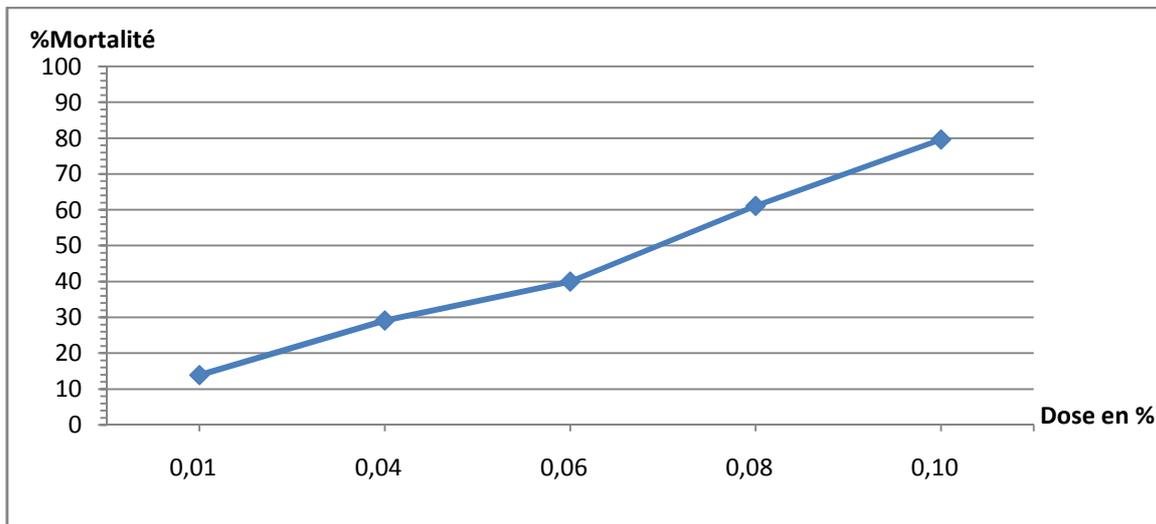


Figure 26 : Pourcentage de mortalité des larves en fonction de la concentration du genévrier

Cette huile essentielle possède une activité larvicide avec des concentrations de DL50 de l'ordre de 0,064% et DL90 de 0,21%. En comparant ces résultats avec ceux obtenus en utilisant la citronnelle, le genévrier montre une activité plus importante que celle de la citronnelle. Cette

activité larvicide peut être attribuée aux monoterpènes qui constituent la majorité des composés chimiques de cette huile essentielle.

III.2.5- Résultat du test de sensibilité en utilisant *Citrus sinensis*

Les résultats de l'exposition des larves de *Culex pipiens* à l'huile de *Citrus sinensis* durant 24h sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 20 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle *Citrus sinensis*

		Témoin				<i>Citrus sinensis</i>				Test	
	Vivants	Morts	Total	%Mortalité	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90
T2	55	4	59	6,77	0,01	45	14	59	18,18	0,064	0,12
					0,04	34	25	59	38,18		
					0,06	29	30	59	47,27		
					0,08	12	45	57	77,41		
					0,10	6	52	58	88,89		
T1	57	2	59	3,39	0,20	0	57	57	100		
					0,40	0	60	60	100		
					0,60	0	59	59	100		
					0,80	0	59	59	100		
					1	0	58	58	100		

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	25-avr	72%	19C°	18,3C°
T2	18-mai	76%	23,5C°	22,8C°

La figure 27 représente Evaluation de l'effet larvicide en fonction de la concentration du *C. sinensis*.

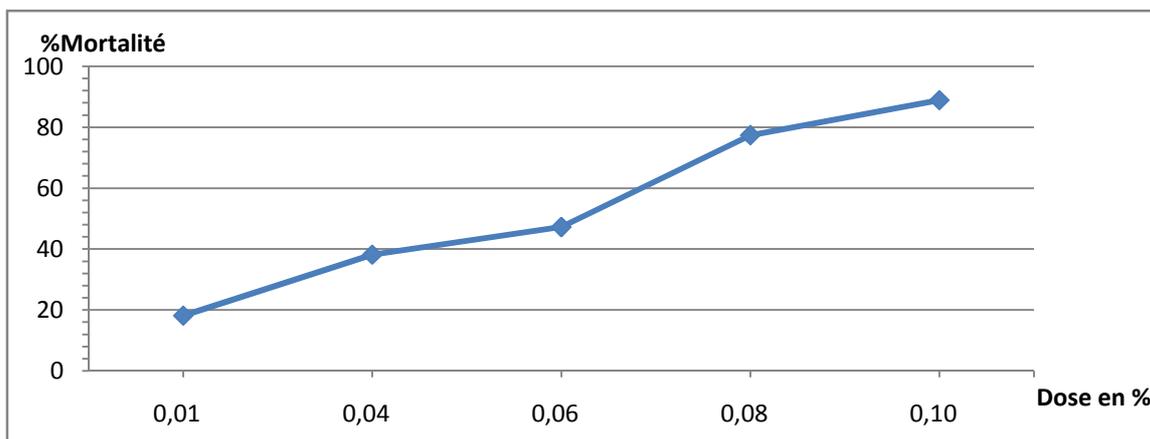


Figure 27 : variation du pourcentage de mortalité en fonction de la concentration du *C. sinensis*.

Le *C. sinensis* présente une forte activité larvicide avec des DL50 de 0,06% et DL90 de l'ordre 0,12%. Le pourcentage de mortalité est proportionnel à la concentration de l'huile essentielle. Cette activité pourrait être due à sa composition chimique constituée majoritairement de

limonène, appartenant aux monoterpènes, célèbres pour leur effet insecticide envers plusieurs espèces d'insectes (Papachristos et Stamopoulos, 2002).

III.2.6- Résultat du test de sensibilité en utilisant *Cupressus sempervirens*(cypre)

Le tableau 20 résume l'ensemble des résultats obtenus après l'exposition des larves de *Culex pipiens* vis-à-vis de l'huile *Cupressus sempervirens* durant 24h.

Tableau 21 : Résultats du test de sensibilité concernant l'huile essentielle *Cupressus sempervirens*

	Témoïn				<i>Cupressus sempervirens</i>					Test	
	Vivants	Morts	Total	%Mortalité	Concentration	Vivants	Morts	Total	%Mortalité corrigée	DL 50	DL 90
T2	56	2	58	3,44	0,01	46	9	55	16,36	0,094	-
					0,04	48	9	57	15,79		
					0,06	44	14	58	24,14		
					0,08	45	11	56	19,64		
					0,10	26	31	57	54,39		
T1	59	1	60	1,67	0,20	23	33	56	58,93		
					0,40	24	34	58	58,62		
					0,60	23	34	57	59,65		
					0,80	23	33	56	58,93		
					1	19	38	57	66,67		

Conditions de réalisation des tests T1 et T2 :

	Date	Humidité	Synergiste	Température de l'eau
T1	25-avr	72%	19C°	18,3C°
T2	18-mai	76%	23,5C°	22,8C°

La figure 26 représente l'effet des concentrations croissantes du *Cupressus sempervirens* sur l'évolution des pourcentages de mortalités envers les larves du *Culex pipiens*.

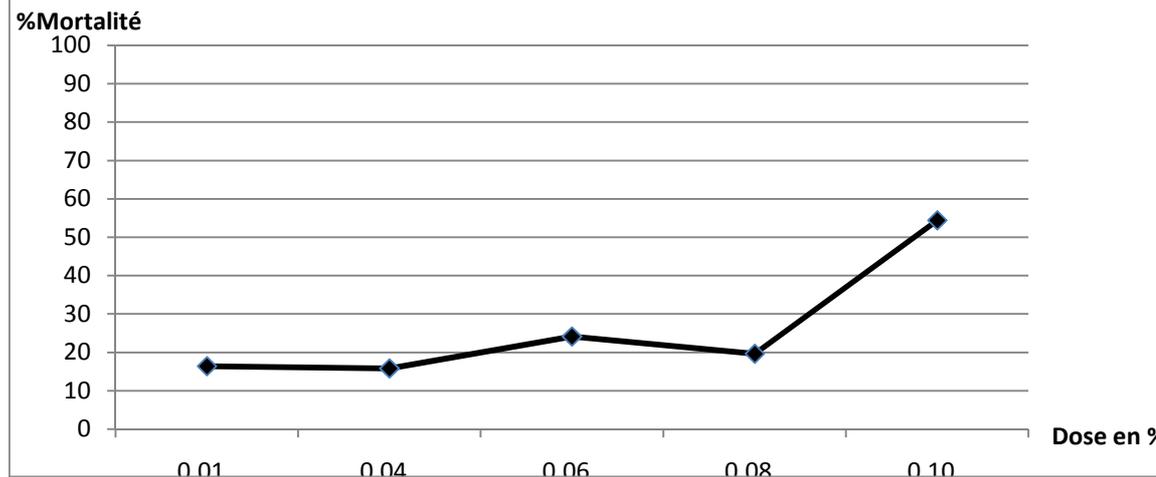


Figure 28 : Effet larvicide du cypre sur les larves du culex pipiens.

En comparant le *Cupressus* avec les huiles essentielles précédentes, le *Cupressus* montre la plus faible activité larvicide, avec une DL50 de 0,094% et un pourcentage de mortalité, qui n'excède pas les 54,39% pour une concentration de 0,1%. Elle est constituée majoritairement des monoterpènes suivant ; α -pinene 30% et le delta-3-carene 24%.

III.3- Synthèse des résultats des tests de sensibilité utilisant les huiles essentielles

L'ensemble des résultats relatifs à l'activité larvicide de toutes les huiles essentielles est représenté sur la figure 29.

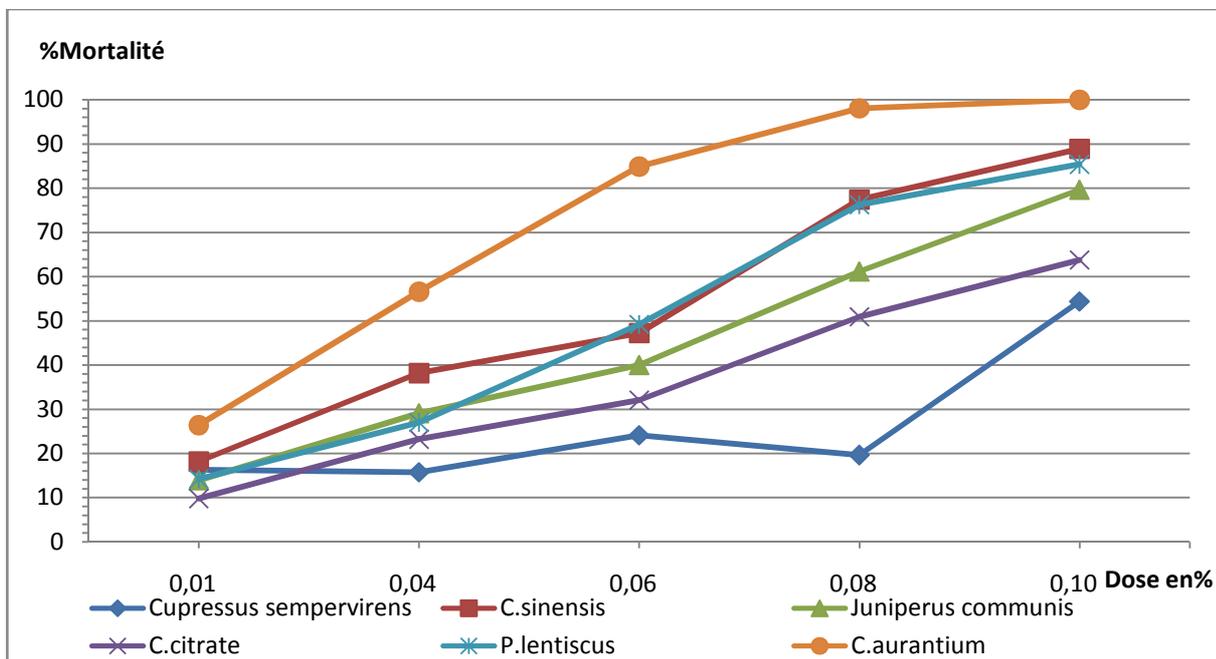


Figure 29: Effet larvicide des huiles essentielles de *C.sempervirens*, *C.sinensis*, *C.aurantium*, *J.communis*, *C.citratu*s et *P.lentiscus* sur les larves du culex pipiens

D'après la figure 28, le *C. aurantium* possède une activité larvicide intéressante par rapport aux autres huiles essentielles. Le *C. siensis* et *P. lentiscus*, présentent des activités larvicides

approximativement identiques, avec une légère différence. L'effet larvicide de ces deux dernières huiles essentielles reste faible par rapport à celui du *C.aurantium*.

L'activité larvicide du *J. communis* est faible par rapport aux trois huiles précédentes, mais elle est supérieure à celle du *C. citratus* qui est supérieure au *C. sempervirens*.

La figure 29 illustre les résultats des DL50 et DL90 pour les six huiles essentielles.

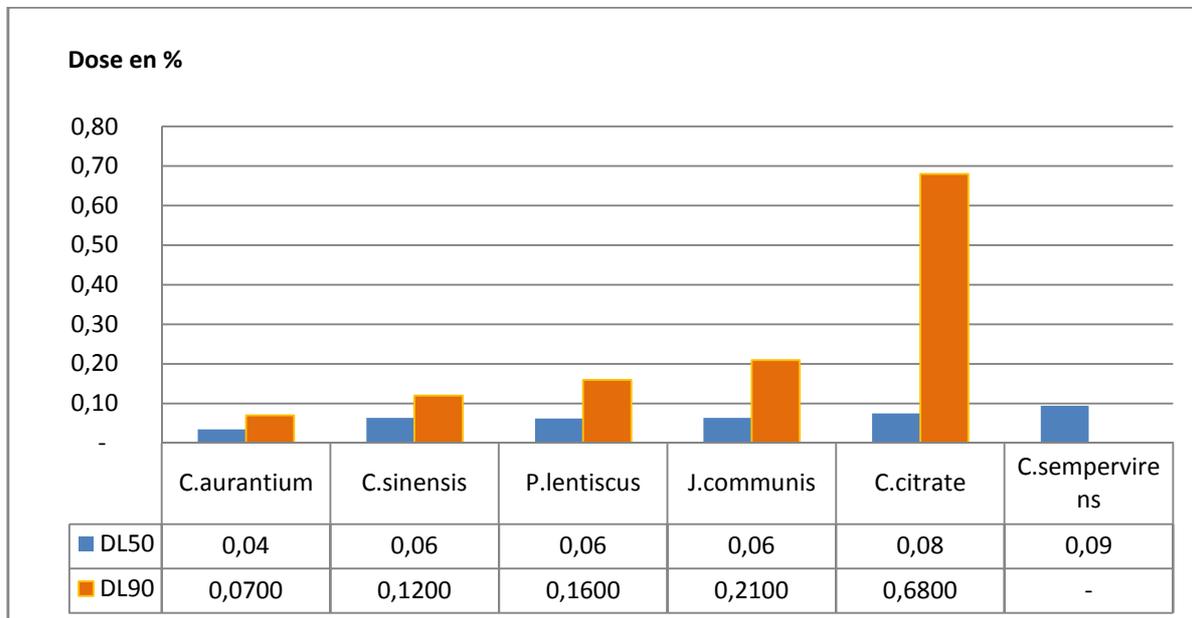


Figure 30: Graphique représentant les différentes doses létales 50% et 90% des six huiles essentielles utilisées sur les larves de culex pipiens

D'après le graphique ci-dessus les DL50 et DL90 confirment l'analyse effectuée pour l'ordre d'efficacité des huiles essentielles testées. Le *C.aurantium* présente la plus faible DL50 (0,035%) et la plus faible DL90 (0,07%), tandis que la plus faible activité larvicide est attribuée à *C. sempervirens* avec une DL50 de l'ordre de 0,094%.

III.4- Résultats des tests réalisés par les insecticides

Les tableaux 21 et 22 regroupent les résultats des tests de sensibilités obtenus en utilisant les insecticides suivant : Téméphos, Malathion, Fenthion et Fenitrothion

Tableau 22 : Pourcentage de mortalité des larves du *Culex pipiens* en fonction de la concentration du Téméphos, Malathion.

	Témoin				Fenthion				Test		Taux de résistance*	
	V	M	Total	%M	[C]	V	M	Total	%MC	DL 50 (mg/l)		DL 90 (mg/l)
Téméphos	56	2	58	3,45	0,00125		52	59	88,13	-	0,0015	0,63
					0,0025	4	55	59	93,22			
					0,005	0	59	59	100			
					0,0125	0	59	59	100			
					0,025	0	59	59	100			
Malathion	55	3	58	5,17	0,00125	52	7	59	7,05	0,0096	0,105	45,65
					0,00250	47	12	59	15,98			
					0,00500	31	26	57	42,64			
					0,01250	27	31	58	50,90			
					0,02500	26	33	59	52,53			

V : nombre des larves vivantes. M : nombre de larves mortes. [C] : concentration. %M : pourcentage de mortalité. %MC : pourcentage de mortalité corrigée.

* Taux de résistance : c'est le rapport entre la CL90 de la souche testée/CL90 S-Lab (0,0023 mg/l) du Téméphos

Tableau 23 : Pourcentage de mortalité des larves du *Culex pipiens* en fonction de la concentration du Fenthion et de Fenitrothion

	Témoin				Fenthion				Test		Taux de résistance*	
	V	M	Total	%M	[C]	V	M	Total	%MC	DL 50 (mg/l)		DL 90 (mg/l)
Fenthion	56	3	59	5,08	0,00125	48	10	58	17,24	0,0048	0,041	17,83
					0,0025	39	21	60	31,52			
					0,005	28	32	60	50,83			
					0,0125	19	40	59	66,06			
					0,025	7	53	60	87,70			
Fenitrothion	56	3	59	5,08	0,00125	50	9	59	10,71	0,0066	0,068	29,57
					0,0025	40	18	58	27,33			
					0,005	34	26	60	40,29			
					0,0125	18	41	59	62,58			
					0,025	14	46	60	75,41			

V : nombre des larves vivantes. M : nombre de larves mortes. [C] : concentration. %M : pourcentage de mortalité. %MC : pourcentage de mortalité corrigée.

* Taux de résistance : c'est le rapport entre la CL90 de la souche testée/CL90 S-Lab (0,0023 mg/l) du Téméphos

Les tests ont été réalisés dans les conditions suivantes :

	Téméphos et Malathion	Fenthion et Fenitrothion
Humidité	83%	75%
Synergie	23°C	22,7°C
Température de l'eau	22,5°C	22,2°C

La représentation graphique suivante (figure 31) illustre la variation de la mortalité en fonction de la concentration des insecticides utilisés.

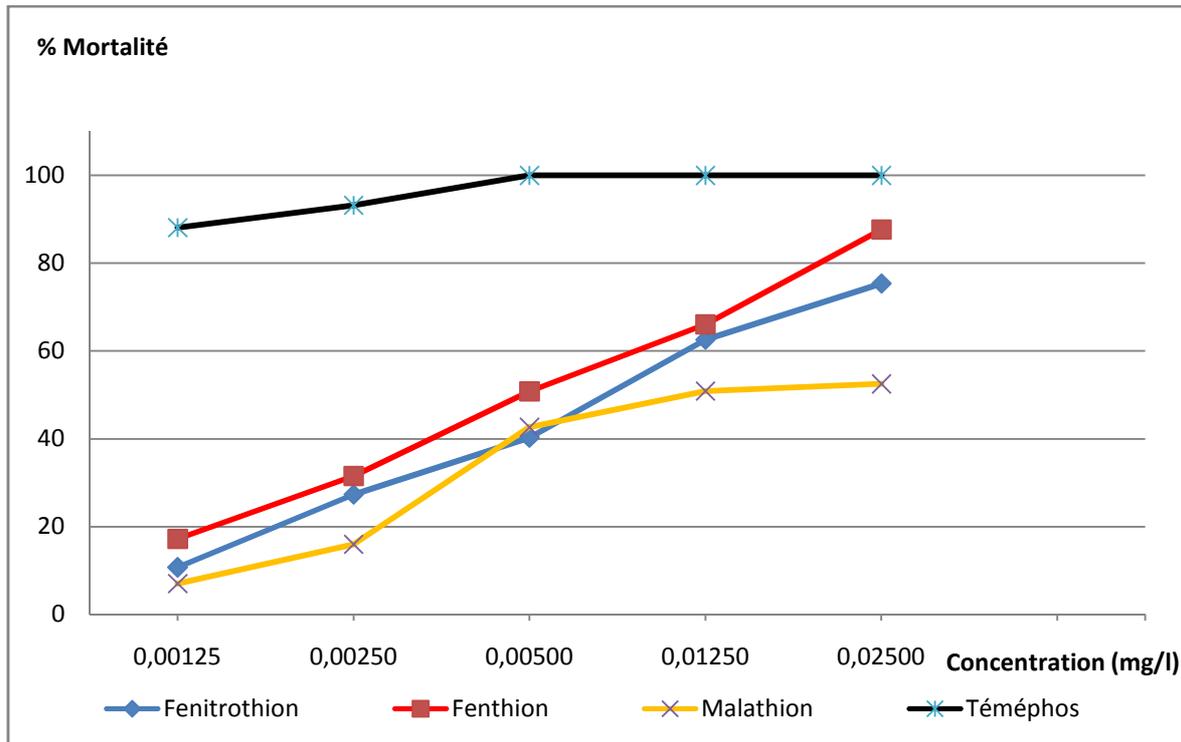


Figure 31 : Effet des insecticides sur les larves de *Culex pipiens*

Le Téméphos représente la plus importante activité larvicide, suivit du Fenthion, Fenitrothion et en dernier le Malathion.

L'effet toxique des précédents insecticide, peut être mis en évidence en déterminant leur DL50 et DL90 (ou CL50, CL90). Le graphique 32 représente les doses létales 50 et 90 des insecticides utilisés.

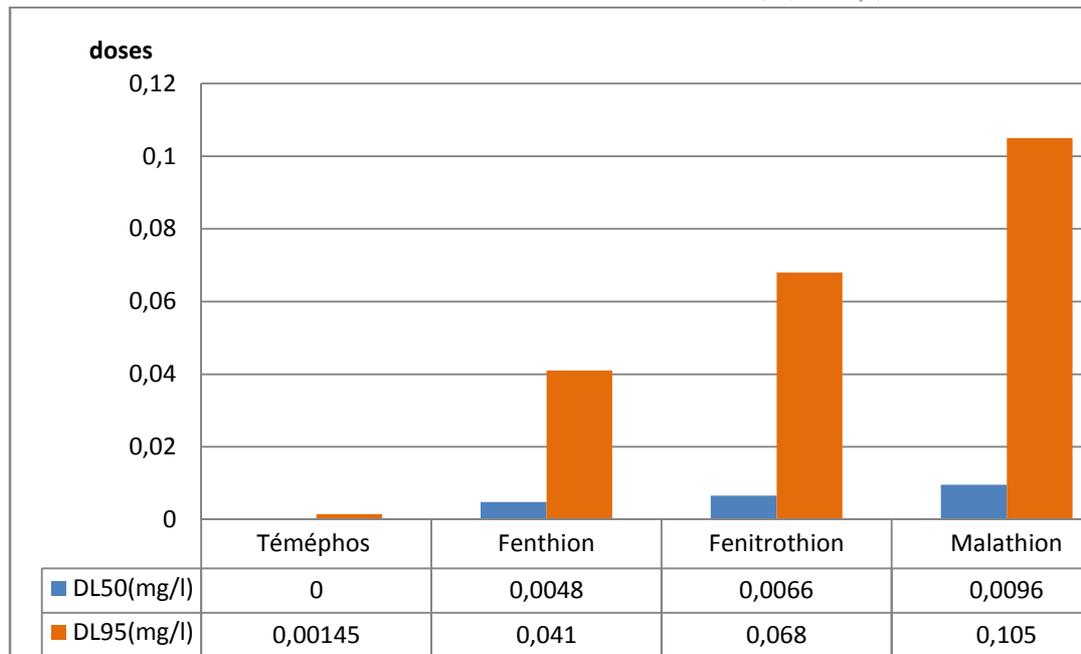


Figure 32 : Doses létales 50%et 90% des insecticides Téméphos, Malathion, Fenthion et le Fenitrothion.

L'effet larvicide du Téméphos s'avère le plus important avec une DL90 de 0,00145 mg/l et avec un taux de résistance de 0,68.

Cette étude a pour objectif, l'évaluation et la comparaison des effets larvicides des extraits naturels avec les insecticides de synthèse. Cette comparaison ne va concerner que les huiles essentielles et les insecticides chimiques ;l'exclusion des extraits aqueux de cette comparaison est due à leurs faibles effets larvicides.

La comparaison qui suit portera sur les doses létales DL50 et DL90 des insecticides et des huiles essentielles.

III.5- Comparaison de l'activité larvicide des huiles essentielles et des insecticides

Afin d'évaluer l'activité larvicide des huiles essentielles, nous les avons comparé avec les insecticides. Les DL50 et DL90 des huiles essentielles et des insecticides sont représentés dans le graphique suivant :

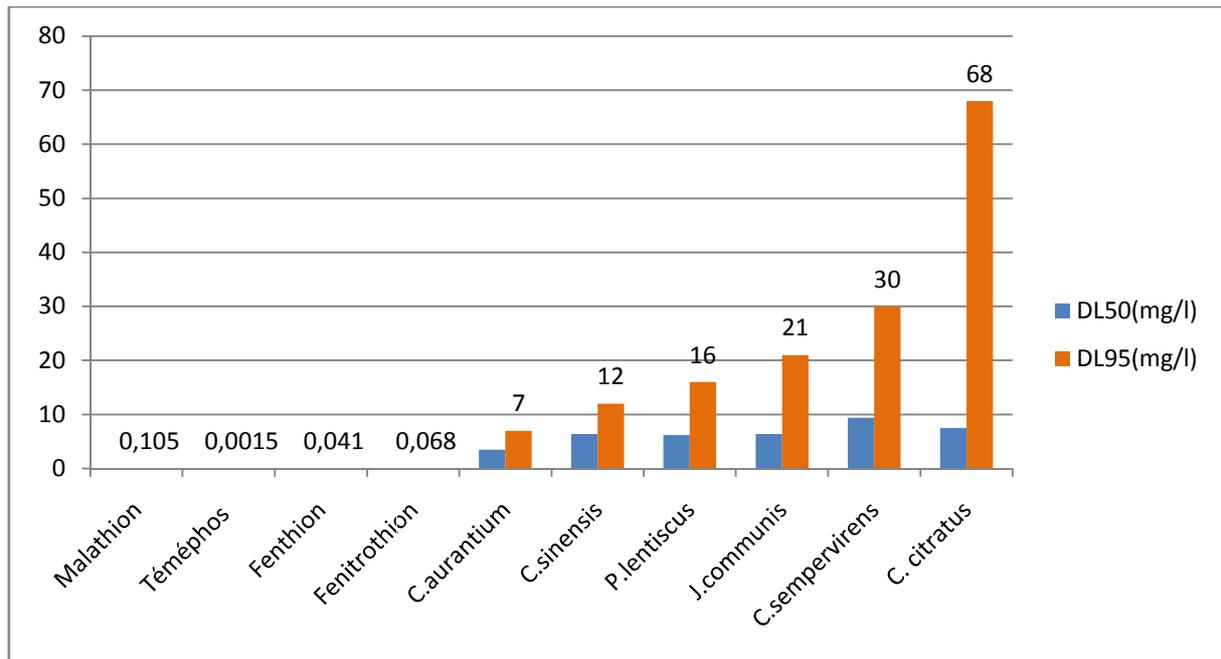


Figure 33 : Doses létales 50 et 90 des insecticides et des huiles essentielles utilisées.

D'après la figure précédente, il apparaît clairement que les insecticides possèdent de très faibles valeurs de doses létales 50 et 90 par rapport à celles des huiles essentielles. Ceci montre leur grande efficacité comme insecticide. Nous constatons aussi que, l'huile essentielle *C.aurantium* présente une valeur de DL90 de l'ordre de 7mg/l.

Malgré les différences des DL50 et DL90 entre les huiles essentielles et les insecticides chimiques vis-à-vis des larves du *Culex pipiens*, l'activité larvicide des huiles essentielles pourrait présenter un grand intérêt dans le domaine de la lutte antivectorielle. Ceci en raison des problèmes engendrés par l'utilisation des insecticides chimiques (pollution de l'environnement, résistance, dangers pour la santé humaine).

Plusieurs facteurs influent sur les résultats des tests de sensibilité obtenus en utilisant les huiles essentielles. Ces facteurs peuvent être liés au protocole des tests de sensibilité, ou liés aux conditions de leur réalisation.

Concernant les facteurs issus de la méthodologie des tests, deux agents peuvent influencer le résultat final :

- Le milieu utilisé (eau distillée, eau de gîte) ;
- L'agent assurant la dispersion et l'émulsion de l'huile essentielle dans le milieu aqueux.

Nous avons utilisé l'eau distillée dans nos tests de sensibilité. L'avantage perçu dans le choix de l'eau distillée comme milieu est sa caractéristique d'être exempte de toutes matières organiques ou minérales, pouvant interagir avec les huiles essentielles.

L'agent assurant la dispersion et l'émulsion de l'huile essentielle dans le milieu aqueux est l'éthanol, ce choix s'est basé sur plusieurs critères :

- Sa capacité à émulsifier l'huile dans l'eau ;
- Effet larvicide très faible, ce qui permet de ne pas biaiser les résultats obtenus avec les huiles essentielles ;
- Il est le solvant où les insecticides sont synthétisés.

Nous avons testé le twin20 et l'agar comme émulsifiant. Le twin20 a permis une émulsion parfaite, mais sa viscosité influençait celle de l'eau distillée, ce qui rendait difficile le déplacement des larves. Tandis que l'agar gélatinisait le milieu à certaines concentrations, et ne permettait pas une émulsion parfaite à des concentrations faibles.

Les conditions ambiantes de la réalisation des tests de sensibilité peuvent influencer le résultat final, c'est le cas pour la température et l'humidité qui peuvent avoir des effets sur le développement des larves du stade 4 en nymphes.

Les tests de sensibilité réalisés pour les extraits aqueux révèlent une faible activité larvicide. Les extraits aqueux du *Citrus aurantiim* et du *Citrus sinensis* montrent les plus grands pourcentages de mortalité avec respectivement 16,98% et 15,79%. La présence d'une faible activité larvicide pour des extraits aqueux vis-à-vis des *Culex pipiens*, encourage à continuer les recherches en vue de leur utilisation comme bio-insecticide.

V- Conclusion et perspectives

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

Dans notre étude, nous avons évalué et comparé par rapport aux insecticides chimiques, l'activité larvicide sur les larves de *Culex pipiens* de six extraits aqueux et six huiles essentielles.

Les résultats obtenus pour les extraits aqueux, montrent la présence d'un effet larvicide. Cette activité reste très faible pour qualifier les extraits aqueux comme étant des bio-insecticides, de fait que le pourcentage de mortalité à leur concentration maximale n'excède pas les 17%.

Les huiles essentielles évaluées ont montré dans leur majorité une intéressante activité larvicide envers les *Culex pipiens*, particulièrement les huiles essentielles *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis* et *Pistacia lentiscus*. Ces dernières présentent respectivement des DL50 et des DL90 de 0,035% et 0,07%, 0,064% et 0,12% et de 0,062% et 0,16%.

Les résultats des tests de sensibilité employant les insecticides ont montré une importante activité larvicide, notamment le Téméphos avec une DL90 de 0,0015mg/l.

Les insecticides chimiques ont présenté une grande efficacité en terme de toxicité vis-à-vis de l'espèce *Culex pipiens* par rapport aux extraits naturels des plantes aromatiques (extraits aqueux et huiles essentielles).

Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour l'application des huiles essentielles et des extraits aqueux des poudres végétales dans la production des bio-insecticides.

Nous envisagerons de poursuivre cette étude afin de préciser la nature des composés chimiques des huiles essentielles responsables de l'activité larvicide par un fractionnement mené en parallèle avec les tests de sensibilité. Aussi nous proposons de travailler avec des concentrations d'extraits aqueux plus importantes et d'évaluer l'activité larvicide d'autres espèces végétales non testées.

Références

- AFNOR 2000.** *Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 1. Echantillonnage et méthodes d'analyse.* AFNOR, Paris, 440 p.
- B. Yopez, M. Espinosa, S. López and G. Bolaños,**2002: *Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction, Fluid Phase Equilibria***194–197, 879–884**
- Belaïche P.**1979 *Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome I. l'Aromathérapie.*Ed. Maloine S.A. Paris.
- BRAHIM AOUINTY , SAADIA OUFARA, FOUAD MELLOUKI, SAADIA MAHARI** 2006 : *ÉVALUATION PRELIMINAIRE DE L'ACTIVITE 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 CULICIDES : BIOTECHNOL. AGRON. SOC. ENVIRON. 2006 10 (2), 67 – 71*
- BRIAN M.L.,**1995,*The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem(USA),p.57-148*
- Bruce-Chwatt LJ.** Essential malariology , 2 e ed., W. Heinemann Med. Books, 1985, London, 452p.
- BRUNETON (1999)** « Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales ». Editions Tec & Doc, Paris 1999, éditions médicales internationales, pp: 483-560.)
- Bruneton J.** (1993) *Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier.278-279.*
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A. et Heckelman, P. E., Eds.** 1989. *The Merck Index. 11th edition. Rahway, New-Jersey, USA, Merck & Co., Inc.*
- C. FARAJ, E. ADLAOUI, C. BRENGUES, D. FONTENILLE ET M. LYAGOUBI** RESISTANCE D'ANOPHELES LABRANCHIAE AU DDT AU MAROC : IDENTIFICATION DES MECANISMES ET CHOIX D'UN INSECTICIDE DE REMPLACEMENT LA REVUE DE SANTE DE LA MEDITERRANEE ORIENTALE, VOL. 14, NO 4.
- C. FARAJ, M. ELKOHLI & M. LYAGOUBI 2006 :** CYCLE GONOTROPHIQUE DE CULEX PIPIENS (DIPTERA : CULICIDAE), VECTEUR POTENTIEL DU VIRUS WEST NILE, AU MAROC : ESTIMATION DE LA DUREE EN LABORATOIRE. ENTOMOLOGIE MÉDICALE.
- Carnevale P.,**1998 : *La protection du voyageur contre les piqûres d'arthropodes vecteurs, Bull. Soc. Pathol. Ex. 91 (5-5bis), 474-485.*
- Comité régional de la Méditerranée orientale EM/RC52/3** Août 2005
- delaunay p., FAURAN P., MARTY P.,** 2001, *Revue française des laboratoires, n°338, pp. 27-36.*
- Desjeux .P,** 1999 Aspects de santé publique et lutte. In : Dedet JP éd. Les leishmanioses. Paris : Ellipses, 1999 : 227-236)
- Dimi Théodore Doudoua, Julien Marie Christian Doanniob, Lucien Yao**
- Konanc, Rousseau Djouakad, Léa Paré Toée, Martin Akogbétod.,** 2006 : La moustiquaire imprégnée d'insecticide comme moyen de lutte contre le paludisme : les raisons d'une adoption limitée en Côte d'Ivoire. *Natures Sciences Sociétés* 14, **431-433.**
- Direction de l'Epidémiologie et de Lutte contre les Maladies** 2009 : *santé en chiffres 2009, Direction de la Planification et des Ressources Financières, Division de la Planification et des Etudes Service des Etudes et de l'Information Sanitaire.*
- DWECK A. C.** (2002) *HERBAL MEDICINE FOR THE SKIN. THEIR CHEMISTRY AND EFFECTS ON SKIN AND MUCOUS MEMBRANES. PERSONAL CARE MAGAZINE. 3(2), 19-21.*
- El Ouali Lalami A., Cherigui M., Ibsouda Koraichi S., Maniar S., EL Maimouni N. & Rhajaoui M.,** 2009a *Le paludisme importé dans le Centre Nord du Maroc entre 1997 à 2007. Cahiers Santé vol. 19, n° 1, janvier-février-mars.*

- Abdelhakim El OualiLalami, Taoufik Hindi, Amal Azzouzi, Lahsen, Elghadraoui, Saad Maniar, ChafikaFaraj, El Bachir Adlaoui, IbtissamAmeur, SaâdIbnsouda Koraichi., 2009b Inventaire et répartition saisonnière des Culicidaedans le centre du MarocEntomologie faunistique – FaunisticEntomology 2010 (2009) 62 (4), 131-138**
- Enan E. 2000 :Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology&Pharmacology**
- Eveline Solon BarreiraCavalcanti, Selene Maia de Morais, Michele Ashley A Lima, Eddie William Pinho Santana2004 : LarvicidalActivity of Essential OilsfromBrazilian Plants againstAedesegypti L. MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(5):541-544,**
- Faraj C., Adlaoui E., Rhajaoui M. &Lyagoubi M. 2003.Estimation of malaria transmission in high-risk provinces of Morocco. East. Mediterr. Health J., 9, 21-26.**
- Fouché J. G., Marquet A. et Hambuckers A. (2000) Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman.**
- Glitho A.I., 2002, Post-récolte et biopesticides en Afrique, Annexe. In: Biopesticides d'origine végétale. Regnault Roger C., Philogène B.J.R. & Vincent C. Eds. Paris, 313-321.**
- GMF aéroportHistorique 2011 pour Fes-Sais, Maroc.**
- Guillet P., Nathan M., 1999 : Ae. albopictus, une menace pour la France ? M6d. Trop. 59 (1999) 49-52.**
- H. Wajcman, F. Galactéros/ C. R. Biologies 327 (2004)711–720**
- HARRACK M E, LE GUENNO B & LE, GOUNON P2001– Isolement du virus West Nile au Maroc. Virologie, 1997, 1, 248-249., MURGUE B, MURRI S, TRIKI H, DEUBEL V & ZELLER HG – West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. Ann N Y AcadSci, 2001, 951, 117-126.**
- HMAMOUCHE M., (1999), Les plantes médicinales et aromatiques marocaines, Édition Ibis press, Paris, France, p. 110.**
- I.Arnault, I. André, S. Diwo-allain, J.Auger et I. Vey : Propriétés pesticides des alliées : PHYTOMA. La defense des vegetaux – N°578 janvier 2005**
- IGA, IGAS, IGE, 2006, Rapport de la mission interministérielle relative à la réorganisation des services de lutte anti-vectorielle, 39p.**
- Institut national de la recherche agronomique (INRA), station de botanique et de pathologie végétale : boulevard du Cap, BP 2078, 06606 Antibes cedex, France.**
- Institut National de Santé Publique du Québec, 2007. MALADIES ZOONOTIQUES ET À TRANSMISSION VECTORIELLE examen des initiatives actuelles d'adaptation aux changements climatiques au Québec 2007**
- IRD, 2009 .INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DÉVELOPPEMENT, MARSEILLE, 2009**
- ISHAAYA, I., ED. 2001. BIOCHEMICAL SITES OF INSECTICIDE ACTION AND RESISTANCE.BERLIN HEIDELBERG NEW YORK, SPRINGER-VERLAG.**
- Isman, 2000 :Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19(2000) 603-608), (Bekele et al 2001) [47][47]: Bekele J. and Hassanali A. ,2001 : Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of Ocimumkilimandscharicum and Ocimumkenyense (Labiatae) on two post-harvest insect pests. Phytochemistry, 57 :385 – 391**
- Isman,2000 :Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19(2000) 603-608.**
- J Dupouy – CametEncyclopédie Médico-Chirurgicale ,2010 8-000-D-10.**
- Julve, Ph.,Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France 1998 ff.**
- Keane S., et Ryan MF. 1999 : Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, Galleniamellonella (L.). Insectbiochemistryandmolecularbilogy Vol29(12)1097-1104.**

LABORATOIRE D'ENTOMOLOGIE MÉDICALE – ENQUÊTE

ENTOMOLOGIQUE DANS LES FOYERS DU WEST NILE AU MAROC. RAPPORT DE MISSION, 2002, INSTITUT NATIONAL D'HYGIÈNE, RABAT, 3P.

LUCIA Alejandro, GONZALEZ AUDINO Paola, LICASTRO Susana MASUH Hector, 2007: *arvicidal effect of Eucalyptus Grandis essential oil and turpentine and their major components on Aedes Aegypti larvae. Journal of the American Mosquito Control Association. 2007, vol. 23, no3, pp. 299-303*

M. Markouk, K. Bekkouche, M. Larhsini, M. Bousaid, H. B. Lazrek, 2000 : *Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. Journal of Ethnopharmacology 73293–29.*

MA Oshaghi, MA Oshaghi, R Ghalandari, H Vatandoost, M Shayeghi, M Kamali-nejad , H Tourabi-Khaledi, M Abolhassani, M Hashemzadeh, 2003 : *Repellent Effect of Extracts and Essential Oils of Citrus limon (Rutaceae) and Melissa officinalis (Labiatae) Against Main Malaria Vector, Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). Iranian J Publ Health, Vol. 32, No. 4, pp.47-52.*

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses 2004: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 2004;10(Suppl12):S98-109.

Martin Kiendrebeogo, Albert Patoin Ouedraogo, Odile Germaine Nacoulma, 2006 : *Activités insecticides de Strigahermonthica (Del.) Benth (Scrophulariaceae) sur Callosobruchus maculatus (Fab.) (Coleoptera :Bruchidae). Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10 (1), 17–23*

Ministère de la santé, 1997. Séminaire de formation sur l'utilisation sécuritaire des substances chimiques.

MOMPON B. (1994); *Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^{ième} rencontre internationale de Nyons, p. 149-166.*

OMS, 2007 "Malaria in Morocco: Relentless efforts towards the goal of elimination," WHO-EM/MAL/345/E.

OMS, 2003. Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs: Guide du stagiaire. Provisoire, OMS, Genève. 102 p.

OMS, 2008 La Revue de Santé de la Méditerranée orientale, Vol. 14, NO 4.

PALMISANO CT, TAYLOR V, CAILLOUET K, BYRD B & WESSON DM – *Impact of West Nile virus outbreak upon St. Tammany Parish Mosquito Abatement District. J Am Mosq Control Assoc, 2005, 21, 33-38.*

Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2002. *Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on Acanthoscelides obtectus (Say) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research 38, 117e128.*

Pascal Delaunay a, Pierre Fauran b, Pierre Marty a, *Ectoparasite et vecteur d'intérêt médical* Revue Française des Laboratoires Volume 2001, Issue 338, December 2001, Pages 27-36

Pascale Gueirard, Joana Tavares, Sabine Thiberge, Florence Bernex, Tomoko Ishino, Genevieve Milon, Blandine Franke-Fayard, Chris J. Janse, Robert Ménard & Rogerio Amino ; *Development of the malaria parasite in the skin of the mammalian host, PNAS, 4 octobre 2010*

Porter N. (2001) *Essential oils and their production. Crop & Food Research. Number 39.*

PROJET Gold Maghreb, Région Fès- Boulemane , 2006.

RAI M. K., ACHARYA D. ET WADEGAONKAR P. (2003) *PLANT DERIVED-ANTIMYCOTICS: POTENTIAL OF ASTERACEOUS PLANTS, IN: PLANT-DERIVED ANTIMYCOTICS: CURRENT TRENDS AND FUTURE PROSPECTS, HAWORTH PRESS, N-YORK, LONDIN, OXFORD. 165-185*

- REGNAULT-ROGER, C.** 2005. *ENJEUX PHYTOSANITAIRES POUR L'AGRICULTURE ET L'ENVIRONNEMENT.* LONDRES-PARIS-NEW YORK, LAVOISIER.
- Roulier G.** *Les huiles essentielles pour votre santé : traité pratique d'aromathérapie. Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes.* Éditions Dangles, 1990.
- S.S.RANAWEERA and K.R.DAYANANDA:** *MOUSQUITO-LARVICIDAL ACTIVITY OF CEYLON CITRONELLA CYMBOPOGON NARDUS(L) RENDLE OIL FRACTION.* *J.nant.Sci. Coun. Sri Lanka* 1996 24(4) :**247-252**
- SCHUFFENECKER I, PEYREFITTE CN, EL HARRAK M, MURRI S,LEBLOND A & ZELLER HG** – *West Nile virus in Morocco, 2003. Emerg Infect Dis, 2005, 11, 306-309.*
- Smallfield B.**(2001) *introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. Crop & Food Research.*Number**45, 4p.**
- Svoboda K.P. etHampson J.B. (1999)***Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, antiinflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.*
- VERLET N. 1997,***Les huiles essentielles, marchés tropicaux et méditerranéens, N°2690, p.1205-1210.*
- WASEEM AKRAM1, HAFIZ AZHAR ALI KHAN, FAISAL HAFEEZ,HAZRAT BILAL, YEON KOOK KIM and JONG-JIN LEE, 2010:** *POTENTIAL OF CITRUS SEED EXTRACTS AGAINST DENGUE FEVER MOSQUITO, AEDES ALBOPIC TUS (SKUSE) (CULICIDAE: DIPTERA).* *Pak. J. Bot., 42(4):3343-3348.*
- Werner M. 2002***Les huiles essentielles : réveil du corps et de l'esprit. Éditions Vigot, collection Santé Bien-être, pages95.*
- Wilder-Smith A,2009. Schartz E. Dengue in travelers.N Engl J Med.2005;353 (9):924 -32.)** *Entomologie faunistique – FaunisticEntomology2010 (2009) 62 (4),131-138*