

ACTIVITÉ LARVICIDE DE L'HUILE ESSENTIELLE FORMULÉE DE *THYMUS VULGARIS* L. (1753) SUR *CULEX PIPIENS* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA : CULICIDAE)

BABA-AISSA Karima^{1*}, REMINI Louiza¹, MOUSSAOUI Kamel¹, HAMMAD Mohamed Wail¹, VERDEGUER Mercedes² et DJAZOULI Zahr-Eddine¹

1. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahleb de Blida 1, B.P. 270, route de Soumaa, Blida, Algérie.

2. Université Polytechnique de Valence, Institut Agro-Forestier Méditerranéen, Camino de Vera s/n Batiment 8E, 46022, Valence, Espagne.

Reçu le 19/10/2021, Révisé le 06/11/2021, Accepté le 08/11/2021

Résumé

Description du sujet : Face à la menace croissante d'espèces invasives de moustiques causée notamment par leurs résistances aux insecticides, le recours à de nouvelles approches telles que les bioinsecticides et les formulations d'huiles essentielles ont progressivement été intégrées dans les programmes de lutte anti vectorielle.

Objectif : L'étude consiste à estimer dans le temps le potentiel biocide d'une bioformulation à base d'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris* L.), sur différents stades larvaires L2, L3 et L4 de *Culex pipiens* L.

Méthodes : L'huile essentielle de thym est extraite par hydrodistillation à partir de feuilles sèches de *Thymus vulgaris* de la région de Chréa. Après sa caractérisation par CG/SM et sa formulation à 10% de matière active, trois dilutions aux concentrations respectives (D1=0,058ml/l ; D2=0,037 ml/l ; D3=0,018 ml/l) ont été testées. La période de suivi étant de 72h avec des lectures du taux de mortalité à 24, 48 et 72h.

Résultats : Les résultats ont montré que la bioformulation de l'H.E du thym est efficace contre les larves de *Culex pipiens* exprimant une toxicité dépendante de la concentration des doses, du stade larvaire et du temps d'exposition. Un taux de mortalité de 100% est atteint à 48h avec la dose D1 sur les larves L₂. Les DL₅₀ sont de l'ordre de 0,02ml/l pour les L2 et L3 et de 0,03ml/l pour les L4. Les TL₅₀ sont respectivement de 9h 28min à la dose D1 et plus longue (80h 23min) avec la dose D3.

Conclusion : Le bioproduit formulé à 10% d'huile essentielle de thym a confirmé son efficacité à l'égard des larves de *Culex pipiens* et a montré que la durée de sa toxicité est corrélée à la concentration des doses en matière active et à la maturité des stades larvaires.

Mots clés : Bioformulation, *Culex pipiens* L., Huile essentielle, Effet larvicide, *Thymus vulgaris* L.

LARVICIDAL ACTIVITY OF THE FORMULATED ESSENTIAL OIL OF *THYMUS VULGARIS* L. (1753) ON *CULEX PIPIENS* (LINNAEUS, 1758) (DIPTERA: CULICIDAE)

Abstract

Description of the subject: Faced with the growing threat of invasive mosquito species caused in particular by their resistance to insecticides, the use of new approaches such as bioinsecticides and essential oil formulations have gradually been integrated into vector control programs.

Objective: The study consists of estimating over time the biocidal potential of a bioformulation based on essential oil of thyme (*Thymus vulgaris* L.), on different larval stages L2, L3 and L4 of *Culex pipiens* L.

Methods: The essential oil of thyme is extracted by hydrodistillation from dry leaves of *Thymus vulgaris* from the Chréa region. After its characterization by GC/MS and its formulation at 10% of active matter, three dilutions at respective concentrations (D1=0.058ml/l; D2=0.037 ml/l; D3=0.018 ml/l) were tested. The follow-up period was 72h with mortality readings at 24, 48 and 72h.

Results: The results showed that the bioformulation of thyme Eo. is effective against *Culex pipiens* larvae expressing a toxicity dependent on the dose concentration, the larval stage and the exposure time. A mortality rate of 100% is reached at 48h with the dose D1 on L2 larvae. The DL₅₀ are of the order of 0.02ml/l for L2 and L3 and 0.03ml/l for L4. The TL₅₀ are respectively 9h28min with dose D1 and longer (80h23min) with dose D3.

Conclusion: The bioproduct formulated with 10% essential oil of thyme confirmed its effectiveness against *Culex pipiens* larvae and showed that the duration of its toxicity is correlated with the concentration of the doses of active ingredient and the maturity of the larval stages.

Keywords: Bioformulation, *Culex pipiens* L., Essential oil, Larvicidal effect, *Thymus vulgaris* L.

* Auteur correspondant: BABA-AISSA Karima, E-mail: krimouss05@gmail.com

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, le changement climatique et la mondialisation ont amplifié le risque de maladies véhiculées par les moustiques et sont devenues de plus en plus fréquentes en de nombreux endroits [1]. En effet, les maladies transmises par les moustiques sont répandues dans plus de 100 pays à travers le monde et infectent plus de 700 millions de personnes chaque année dans le monde [2]. Cette expansion a fait que la faune Culicidienne occupe le centre de l'actualité entomologique mondiale [3]. Parmi ces espèces susceptibles de causer des nuisances et d'affecter les êtres humains, *Culex pipiens* est celle la plus fréquemment rencontrée dans notre pays [4]. Elle peut être vectrice de filariose lymphatique, encéphalite japonaise et autres viroses : dengue et fièvre jaune notamment [5]. Actuellement, la lutte contre ces insectes hématophages revêt donc une grande importance. Parmi les différentes méthodes de lutte antivectorielle, l'utilisation de biocides conserve une place importante, voire prépondérante. Cependant, la réduction du nombre de substances actives disponibles, l'émergence de résistance aux principales familles d'insecticides et la nécessité de respecter au mieux l'environnement, justifient la mise en œuvre d'une réflexion approfondie sur l'utilisation de ces substances et la gestion des phénomènes de résistance chez les vecteurs [6]. Cette situation alarmante a incité la communauté scientifique et les autorités compétentes dans le domaine à chercher des alternatives durables qui respectent l'environnement et évitent toute sorte de préjudice potentiel à la santé publique [5]. Cependant l'appel à l'utilisation de nouvelles molécules naturelles dont l'efficacité est avérée s'impose [7]. Les huiles essentielles représentent une piste d'avenir et les recherches sur ce sujet sont nombreuses. 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 [8]. En effet, Il est connu que certains constituants chimiques végétaux des huiles essentielles ont des propriétés insecticides [9]. Afin d'améliorer l'action des principes actifs et garantir la stabilité et l'efficacité de ces produits naturels, il est nécessaire de recourir à la formulation de ces huiles essentielles qui s'avère une étape indispensable dans le domaine phytopharmaceutique [10]. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail.

Celui-ci vise d'une part à caractériser et formuler une huile essentielle de thym et d'autre part évaluer l'efficacité temporelle et les potentialités biocides de cette bioformulation sur différents stades larvaires de *Culex pipiens* L. ainsi que l'estimation de la DL₅₀ et le TL₅₀ de ce bioproduit.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été mené de novembre à mai 2015, soit une durée de 7 mois durant lesquels nous avons réalisé une partie sur terrain qui consistait à collecter le matériel végétal au niveau du Parc National de Chréa et les larves au niveau du marais de Réghaïa et une autre au niveau de l'Unité d'Entomologie du Paludisme du Laboratoire de Parasitologie de l'Institut National de Santé Publique (INSP).

1. Présentation de la région d'étude

1.1. Parc National de Chréa

Le Parc National de Chréa s'étend sur une superficie de 26587 ha, situé à 50 km au sud-ouest d'Alger. Le long des parties centrales de la chaîne de l'Atlas Tellien, comprises entre les latitudes Nord 36°19' / 36°30', et les longitudes Est 2°38' / 3°02', et se situe dans un étage bioclimatique sub humide à hiver frais avec une pluviométrie moyenne annuelle d'environ 824 mm [11].

1.2. Lac de Réghaïa

Le marais de Réghaïa, situé à 30km à l'est d'Alger, correspond l'estuaire de l'oued du même nom dont l'embouchure est barrée par un cordon littoral et dunaire [12]. Cette réserve naturelle est une zone humide d'une superficie d'environ 100ha. Ses coordonnées sont 3°10' de longitude Est et 36°25 de Latitude Nord. Ce site est classé comme zone humide d'importance internationale depuis juin 2003.

2. Techniques d'échantillonnage

2.1. Matériel végétal

Le thym (*Thymus vulgaris* L.) appartenant à la famille des Lamiaceae a été récolté du parc national de Chréa de novembre 2014 à mai 2015 à raison d'un prélèvement par mois. Son identification a été faite par référence au spécimen disponible dans l'herbier du Département de Botanique, de l'École Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A.), Alger. La plante collectée est séchée à l'ombre, dans un endroit sec et aéré. La partie aérienne est récupérée et mise dans des sacs en papier et stockée jusqu'à son utilisation.

2.2. Extraction

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par la technique d'hydrodistillation sur un appareil de type Clevenger selon la méthode recommandée dans la Pharmacopée européenne [13]. Au cours de chaque essai, 200g de feuilles séchées ont été traités pendant une durée de 3h. Après sa récupération par décantation, l'huile essentielle a été stockée à 4°C dans l'obscurité en présence de sulfate de sodium anhydre jusqu'à son analyse

2.3. Caractérisation

La caractérisation a été réalisée au niveau du laboratoire d'analyses de l'Université Polytechnique de Valence en Espagne. La quantification des échantillons et l'identification des composés ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-SM) à l'aide d'un appareil Perkin – Elmer Clarus 500GC équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire ZB-5 (30 m×0,25 mm×0,25 µm d'épaisseur). La composition en pourcentage de l'huile essentielle a été calculée à partir des zones de pic GC. Les spectres MS ont été obtenus au moyen du mode de balayage ionique total (TIC) (gamme de masse m/z 45-500 µm). Les chromatogrammes d'ions totaux et les spectres de masse ont été traités avec le logiciel Turbomass 5.4 (Perkin-Elmer Inc.). Les indices de rétention ont été déterminés par injection de standard n-alcanes en C8 à C25 (Supelco) dans les mêmes conditions. Les composants de l'huile essentielle ont été identifiés par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux de la bibliothèque informatique NIST MS Search 2.0 et des données disponibles dans la littérature. L'identification des composés suivants a été confirmée par comparaison de leurs RI expérimentaux avec ceux d'étalons authentiques (Sigma-Aldrich)

2.4. Formulation

Afin d'optimiser l'activité biologique des huiles essentielles, nous avons opté pour une formulation liquide qui consiste à mélanger un tensioactif et un co-tensioactif d'origine végétale avec l'huile essentielle du thym comme principe actif [14]. Barr [15] stipule que beaucoup d'attention a été axée sur les mouillants en raison de leur stabilité de stockage, une bonne miscibilité avec de l'eau et de l'application pratique.

2.5. Matériel animal

Les larves de *Culex pipiens* (Culicidae) sont prélevées sur quatre différents gîtes larvaires du lac de Réghaïa durant une période printanière (avril - mai 2015) par la méthode de coup de louche «Dipping» [16]. La méthode consiste à plonger la louche doucement dans l'eau suivant un angle de 45° et la retirer d'un mouvement uniforme en évitant les remous puis verser le contenu de la louche dans un contenant (bouteille en plastique de capacité d'un litre) en prenant soin de bien l'étiqueter et de ne pas fermer les bouteilles hermétiquement pour permettre aux larves de respirer et enfin de les rapporter au laboratoire pour les bio essais. L'identification des larves a été faite grâce au programme logiciel «Les Moustiques de l'Afrique méditerranéenne», réalisé par l'IRD de Montpellier en collaboration avec l'institut Pasteur de Tunis [17].

3. Méthodes d'étude

3.1. Bio essais larvicides

Les tests sont réalisés au laboratoire dans des gobelets de 5cm de diamètre à une température moyenne de 24±1°C et une humidité relative de 85±5%. Cependant, Pour 60ml d'eau formulée, l'huile essentielle de thym est diluée à 3 concentrations à savoir D1=0,058ml/l ; D2=0,037ml/l et D3=0,018ml/l. La mortalité des larves de *Culex pipiens* est estimée selon le protocole de l'OMS [18]. Dans chaque gobelet contenant 10 larves de moustiques est mis 1ml de solution diluée + 99ml d'eau distillée pour avoir un volume de 100ml, à l'exception du gobelet témoin qui contient 100ml d'eau distillée. Cinq répétitions sont réalisées pour tous les tests. La période de suivi est de 72h après traitement avec une lecture à 24, 48 et 72h. L'efficacité de chaque dose a été estimée par le biais du taux de mortalité.

3.2. Calcul des taux de la mortalité

Le pourcentage de mortalité observée des larves de *Culex pipiens* est calculé par la formule suivante :
$$MO(\%) = \frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total des individus}} \times 100$$
 [19]. La mortalité observée a été exprimée suivant la formule d'Abbott [20] en mortalité corrigée, tenant compte de la mortalité naturelle observée dans les lots témoins. Mortalité corrigée
$$MC(\%) = \frac{M2 - M1}{100 - M1} \times 100$$
, avec : M1 : Pourcentage de mortalité dans le témoin, M2 : Pourcentage de mortalité dans le lot traité, MC : Pourcentage de mortalité corrigé.

3.3. Calcul de DL50 et TL50

Afin de calculer la dose létale 50 (DL₅₀), la formule de Finney [21] et la table des Probits sont utilisées. Les doses sont transformées en logarithme décimaux et les valeurs de mortalité corrigée en Probits en se servant de la table des Probits [22]. Le Temps létal 50 (TL₅₀) est calculé à partir de la droite de régression des Probits correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des temps de traitement [23 ; 24].

4. Analyses statistiques

Les analyses de la variance sont faites sur des moyennes homogènes adoptées sur la base d'un coefficient de variance (C.V. <15%). La signification des comparaisons des moyennes a été confirmée par un test de comparaison par paire (Test GLM et Test Tukey). Les contributions significatives retenues sont au seuil d'une probabilité de 5%, les calculs ont été déroulés par le logiciel XLSTAT vers. 16 [25].

RÉSULTATS

1. Composition chimique de l'huile essentielle formulée de *Thymus vulgaris*

L'analyse détaillée de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Thymus vulgaris* réalisée par la combinaison de CG/SM a identifié cent quinze composés qui représentent 94,59%. Cependant, Trente-deux composés demeurent minoritaires (0,02-0,09%) (Fig. 1 et tableau 1).

Les principaux constituants qui caractérisent l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont au nombre de huit. Il s'agit de composés : Thymol (15,59%), Carvacrol (11,41) appartenant aux phénols, les monoterpènes sont représentés par : l'Acétate de bornyle (9,79), Alpha-pinène + Alpha-thuyène (6,63%), Camphène (3,77%), Acétate de terpenyle (3,02%) et p-cymène (1,2%), les alcools terpéniques représentés principalement par le Borneol (8,44%), Viennent ensuite des composés quantitativement moins importants notamment ceux qui sont disponibles avec des taux 0,12-2,22% (tableau 1).

2. Évaluation du potentiel biocide de l'huile essentielle formulée de *Thymus vulgaris* sur les larves de *Culex pipiens*

Selon la figure 2, l'évolution temporelle de la mortalité observée chez les stades larvaire (L2, L3 et L4) de *Culex pipiens* sous l'effet du bioproduit formulé à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* montre un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, obéissant à un gradient positif D3<D2<D1. La mortalité signalée sous l'effet des différents traitements se détache nettement de la mortalité signalée chez le témoin. L'efficacité du bioproduit apparaît dès 48h d'exposition des trois stades larvaires pour l'ensemble des concentrations (Fig. 2a, b et c). La fluctuation temporelle des mortalités corrigées suit la même tendance que celle signalée chez l'évolution temporelle de la mortalité observée (Fig. 2c, d et f).

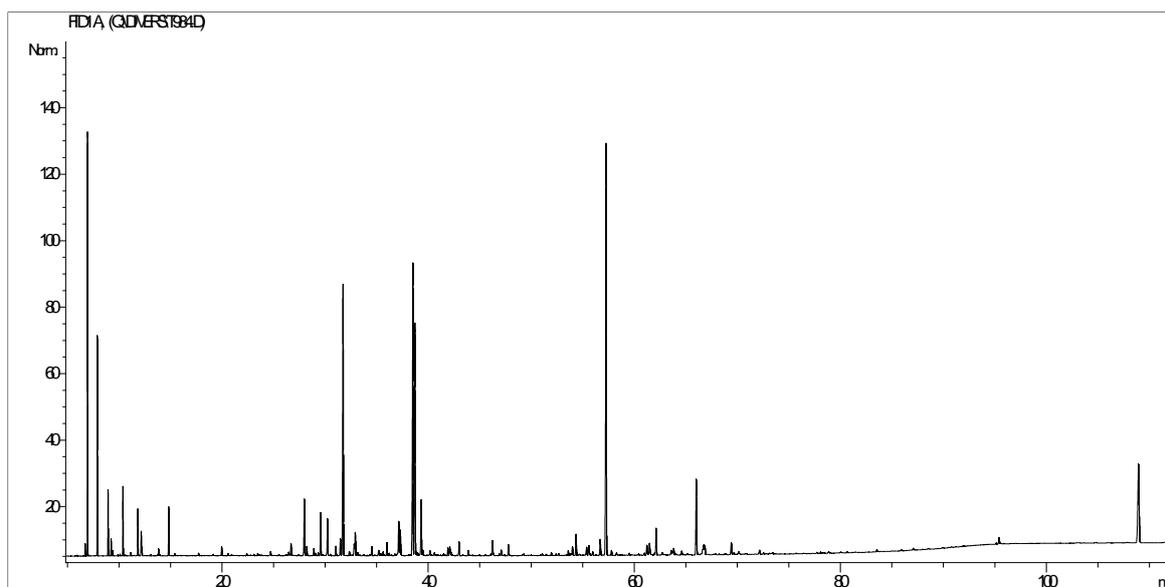
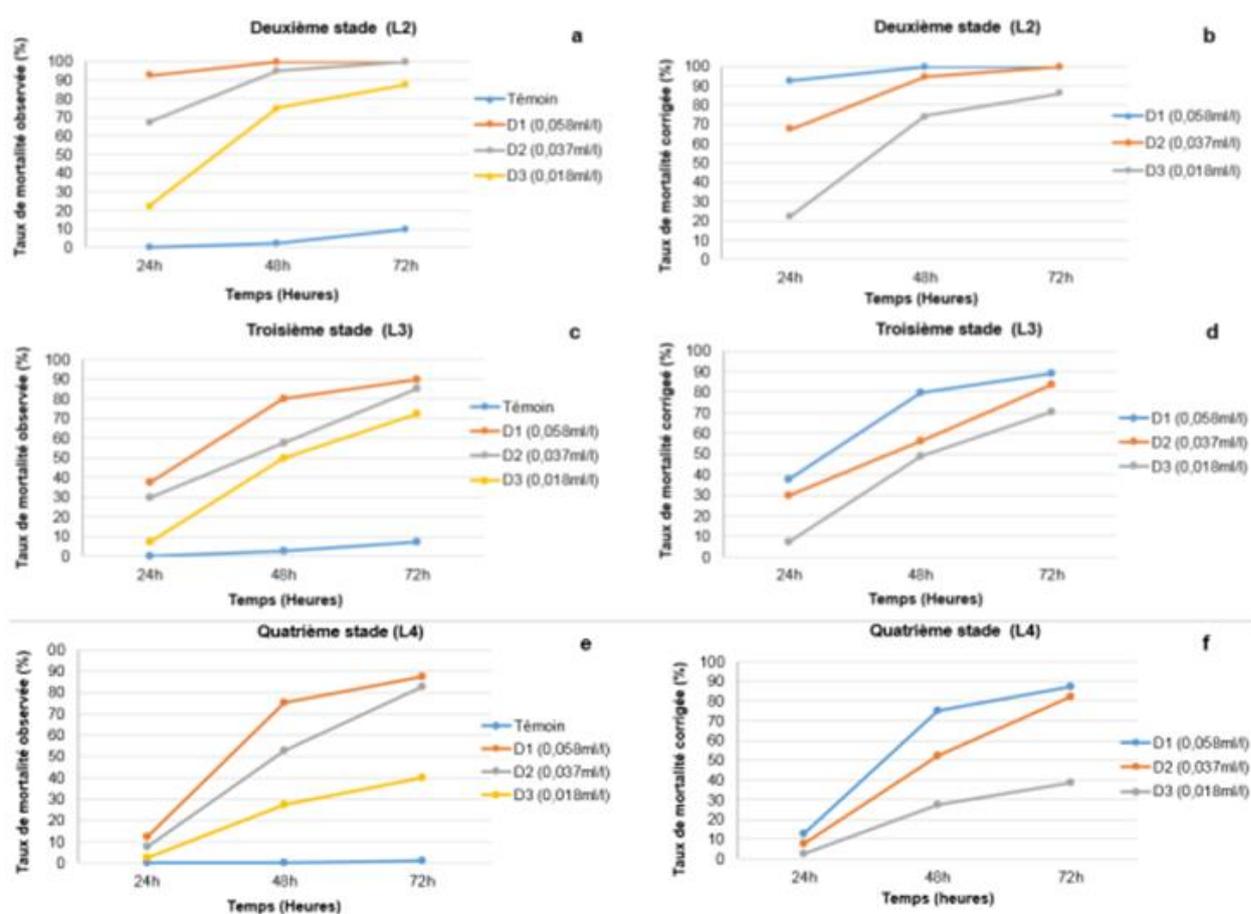


Figure 1 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* analysée par CG/SM

Tableau 1 : Principaux composés chimiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Pics	TR (min)	Constituants	%	Composition totale
2	6,9	Alpha-pinene + Alpha-thuyene	6,63	/
3	7,8	Camphene	3,77	/
19	14,8	p-cymene	1,2	/
33	27,9	Camphre	1,99	/
38	29,5	Linalol	1,4	/
40	30,2	Acetate de linalyle	1,29	/
44	31,7	Acetate de bornyle	9,79	/
58	66	Carvacrol	11,41	/
59	38,7	Borneol	8,44	/
94	108,9	Thymol	15,59	/
108	38,5	Acetate de terpenyle	3,02	/
Groupe de Composés (%)				
Alcool aliphatique				1,56
Alcool terpénique				11,45
Monoterpènes				32,07
Sesquiterpènes				9,36
Sesquiterpénol				5,53
Cyclique				27
Phénols				2,55
Cétone terpéniques				2,28
Oxydes				2,79
Autres				2,79
Total				94,59%

Figure 2 : Variation de la mortalité observée et de la mortalité corrigée des stades larvaires de *Culex pipiens* sous l'effet des concentrations de la bioformulation d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Une analyse type G.L.M a été utilisée pour chaque facteur étudié. Les résultats graphiques sont consignés dans la figure 3. À partir des résultats obtenus, nous remarquons que le temps d'exposition enregistre un effet très significatif sur le taux de mortalité corrigée des trois stades larvaires de *Culex pipiens* pour l'ensemble des traitements (Fig. 3a). Le test de comparaison multiple Post-Hoc de Tukey, désigne pour le bioproduit formulé à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, la présence de 3 groupes homogènes relatifs aux paliers temporels d'activité larvicide. Le premier palier est signalé à 24h d'exposition montrant le taux de mortalité le plus faible, affilié au groupe homogène (c). Le deuxième palier est remarquable après 48h d'exposition montrant une mortalité corrigée modérée, affilié au groupe homogène (b). Enfin, le troisième palier est visible dès 72h d'exposition exprimant le taux de mortalité

corrigée le plus important, affiliée au groupe homogène (a) (Fig.3a). Concernant, le facteur doses, l'analyse de la variance montre que la mortalité corrigée est significativement tributaire des doses bioproduit formulé à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Les résultats du test de Tukey reportés dans la figure (3b), montrent la présence de 3 groupes homogènes d'efficacité (a, b et c), dont la mortalité corrigée la plus marquée est allouée aux fortes doses D1 formant ainsi le groupe homogène (a), par conséquent les groupes homogène (b) et (c) renferment simultanément les doses D2 et D1 dont la mortalité corrigée est moins importante. L'analyse de variance à 2 facteurs (temps et concentrations) montre que la dose D1 qui agit le plus rapidement. Elle est secondée par la dose D2. Par ailleurs, dose D3 à moins d'effet et induit une toxicité tardive (Fig. 3).

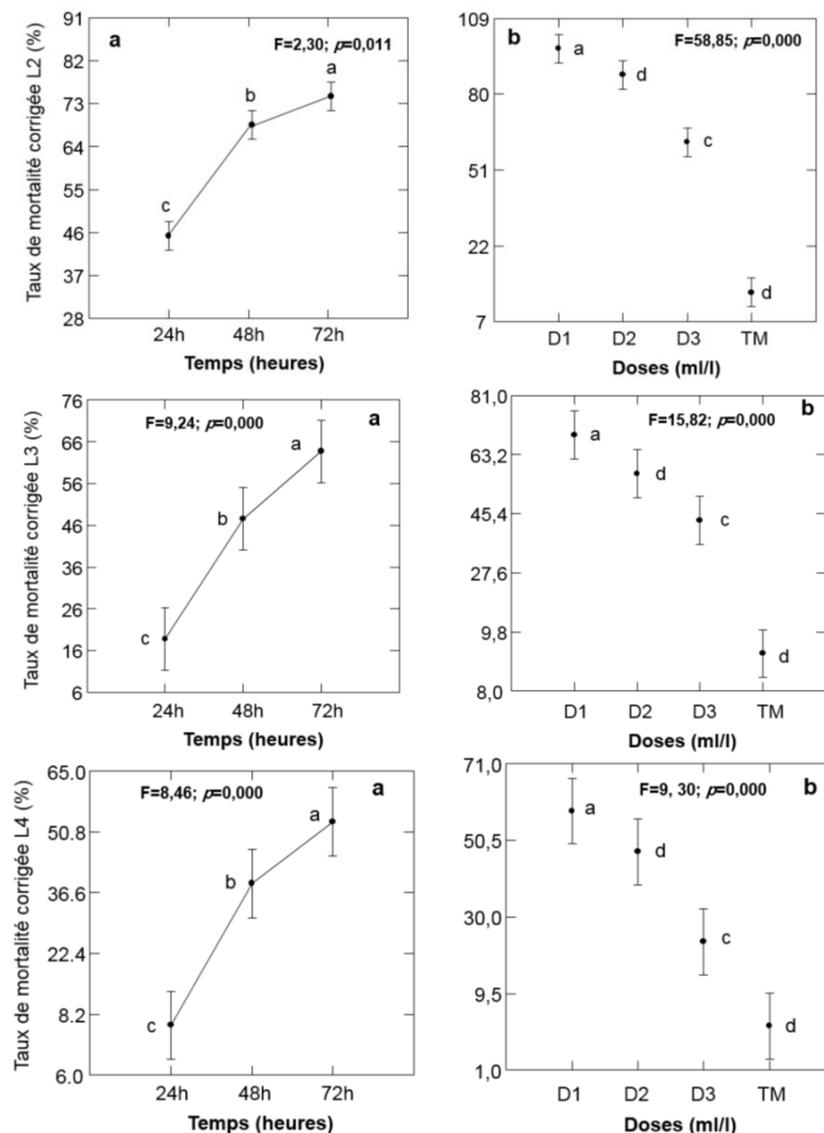


Figure 3 : Variations de la mortalité corrigée des stades larvaires de *Culex pipiens* traités aux bioproduits à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Le bioproduit formulé à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été administré en milieu aquatique d'évolution des larves de *Culex pipiens*. Le tableau (2), montre clairement que le deuxième et le troisième stade larvaire sont très sensibles à une dose très faible ($DL_{50}=0,02\text{ml/l}$). Cependant, le stade larvaire L4 est très sensible à une dose plus forte ($DL_{50}=0,032\text{ml/l}$).

Tableau 2 : Variations des DL_{50} des stades larvaires de *Culex pipiens*

Stade larvaire	Doses testées			DL_{50} (ml/l)
	D1	D2	D3	
L2	97,5±3,81	87,45±2,37	60,98±1,75	0,02ml/l
L3	68,72±1,93	56,73±1,06	42,16±0,93	0,02ml/l
L4	58,22±1,18	47,35±1,02	22,82±0,78	0,032ml/l

D1=0,058ml/l ; D2=0,037 ml/l ; D3=0,018 ml/l

Le produit a une action plus rapide sur le stade L2 par rapport aux stades L3 et L4. Dans la totalité des cas, la durée de l'effet toxique est corrélée à la concentration de la matière active dans la formulation et à la maturité des stades larvaires (Tableau 3).

Tableau 3 : Variations des TL_{50} des stades larvaires de *Culex pipiens* et des doses du bioproduit formulé à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Doses testées	TL_{50} (h)		
	L2	L3	L4
D1	9h 28mn	29h 18mn	39h 34mn
D2	21h 33mn	37h 42mn	47h 12mn
D3	36h 30mn	52h 35mn	80h 23mn

D1=0,058ml/l ; D2=0,037 ml/l ; D3=0,018 ml/l

DISCUSSION

Une grande partie des maladies infectieuses est transmise à l'homme via des insectes ou des acariens. Parmi ces pathologies, celles impliquant les moustiques comme espèces vectrices font partie des plus importantes, que ce soit en terme de gravité ou d'aire de répartition [26]. À cet effet, des travaux scientifiques ont montré que les produits naturels issus des plantes et les métabolites secondaires représentent une importante source de molécules pouvant être exploitées dans différents domaines entre autres l'entomologie médicale.

Deux points importants ont été menés tout au long de cette étude. Le premier concerne l'étude de la sensibilité des différents stades larvaires de *Culex pipiens* vis-à-vis d'une bioformulation à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Le second, est de tenter de trouver éventuellement la dose la plus toxique occasionnant le taux le plus élevé de mortalité des larves et le calcul de la DL_{50} et du TL_{50} de ce bioproduit.

Il ressort de nos résultats, qu'après avoir exposé les larves de stade L2, L3 et L4 de *Culex pipiens* aux différentes doses de l'huile essentielle formulée de thym et cela pendant 24, 48 et 72h, un effet larvicide plus important selon le degré de concentration des dilutions utilisées, suivant un gradient positif $D3 < D2 < D1$. La mortalité signalée sous l'effet des différents traitements se détache nettement de la mortalité signalée chez le témoin. L'efficacité du bioproduit apparaît dès 48h d'exposition des trois stades larvaires pour l'ensemble des concentrations. La fluctuation temporelle des mortalités corrigées suit la même tendance que celle signalée au niveau de la mortalité observée. Les mêmes aboutissements nous ont permis de signaler une progression de toxicité allant de la faible dose (D3) avec un taux de (86,11%) à 72h après traitement suivi de la moyenne dose (D2) qui affiche au même moment (100%) de mortalité et enfin de la forte dose (D1) occasionnant à 48h déjà un taux de mortalité de 100% pour les larves (L2). Il est semblable pour les larves (L3), on enregistre (89,18%) de taux de mortalité pour la D1 ; (83,78%) pour la D2 et enfin (70,27%) pour la D3. Quant aux larves (L4), celles-ci affichent (87,17%), (82,05%) et (38,46%) de taux de mortalité respectivement pour les doses D1, D2 et D3 et les doses minimales indispensables pour obtenir 100% de mortalité ont été appréciées à 0,058 ml/l après 48h de traitement et 0,037 ml/l après 72h de traitement. De même, Aouinty et al. [27], ont déduit que le taux de mortalité varie selon les concentrations. Après avoir exposé des larves du stade 4 de l'espèce *C. pipiens* aux différentes concentrations des extraits aqueux (feuilles du ricin et du bois de thuya) pendant 24h, la mortalité des larves atteint un taux de 100% à partir d'une concentration de 4%. Cependant, dans l'extrait du *Ricinus communis*, la mortalité est plafonnée à 100% dès la concentration de 1%.

L'effet larvicide de l'huile essentielle formulée du thym testé est mis en évidence avec les valeurs des DL_{50} calculées.

L'huile essentielle formulée de *Thymus vulgaris* a révélé une DL₅₀ de 0,02 ml/l et cela pour les deux stades larvaires L2 et L3, alors qu'une DL₅₀ de 0,03 ml/l est obtenue pour le quatrième stade larvaire L4. En effet, Dris et al. [28], ont montré par leur résultats de l'effet larvicide à base d'huile essentielle de *Lavandula dentata* L. (Lamiaceae), de la région de Tebessa, des valeurs de DL₅₀ de 77,09 ppm et de 150,38 ppm pour les L₄ de deux espèces de Culicidae, à savoir *C. longiareolata* et *C. pipiens* respectivement. Les résultats d'Alouani et al. [29], ont révélé un effet larvicide des huiles essentielles de deux plantes *Ruta chalepensis* et *Eucalyptus camaldulensis* en enregistrant des valeurs respectives de DL₅₀ de 95 et 185 ppm pour les L3 et de 245 et 280 ppm pour les Larves du quatrième stade. Aussi, Pitarokili et al. [30], ont affiché des DL₅₀ de 0,034 ml/l et 0,023 ml/l respectives à deux espèces de *Thymus* via le Maringouin domestique, ces valeurs sont similaires à celles enregistrées dans notre étude. Par ailleurs, l'effet larvicide de trois huiles essentielles (*Citrus aurantium*, *Citrus siensis* et *Pistacia lentiscus*) sur les larves de *Culex pipiens* ont annoncé des chiffres de DL₅₀ allant de 35 ppm, 64 ppm et 62 respectivement aux trois plantes testées [31]. Cette activité pourrait être due à la composition chimique de *Thymus vulgaris*. Cette espèce est connue par son activité insecticide contre d'autres groupes zoologiques comme les moustiques culicidés ce qui explique la toxicité de cette plante en raison de leurs richesse en molécules de terpènes [32]; ceci corrobore avec nos résultats relatifs à la composition chimique de notre huile essentielle qui se distingue par sa richesse en monoterpènes avec une teneur de 32,07 et son profil chromatographique qui révèle la prédominance du Thymol (15,59%) comme molécule majoritaire. Par ailleurs, Bastien [8], note que les produits à effet larvicide sont efficaces selon diverses méthodes : Ils peuvent inonder le système trachéal de la larve, ou perturber sa flottabilité et donc empêcher la larve de rester en surface et de respirer. Ils peuvent également agir par toxicité. Quant aux temps létaux calculés varient d'une dose à une autre et d'un stade larvaire à un autre. Le temps le plus court est obtenu au deuxième stade larvaire qui est de 9h 28min à la dose D1 (0,058ml/l) alors que le stade larvaire L₄ enregistre une durée plus longue (80h23min) avec la dose D3 (0,018ml/l). Des aboutissements semblables ont été révélés par Bakalem [33] où des valeurs de TL₅₀ sont signalées entre 16h 14min et 35h 28min sur les larves de Maragouin domestique.

CONCLUSION

Le besoin vital pour l'homme est de trouver des méthodes de lutte plus efficaces contre ces moustiques vecteurs de maladies. Le recours à déceler une nouvelle stratégie de lutte adaptée aux conditions actuelles de sauvegarder une efficacité maximale tout en diminuant les doses de produits toxiques via la formulation des huiles essentielles s'avère nécessaire. Cependant, L'étude du pouvoir biocide de l'huile essentielle formulée de *Thymus vulgaris* sur les larves de *Culex pipiens* en vue de contribuer dans la lutte antivectorielle a montré clairement que dans la totalité des cas, la durée de l'effet toxique est corrélée à la concentration de la matière active dans la formulation et à la maturité des stades larvaires. Le deuxième et le troisième stade larvaire sont très sensibles à une dose très faible (DL₅₀=0,02 ml/l.) alors que le stade larvaire L4 est très sensible à une dose plus forte (DL₅₀=0,032 ml/l.). Aussi, le bioproduit a une action plus rapide sur le stade L2 par rapport aux stades L3 et L4. A cet effet, l'huile essentielle formulée de thym présente une toxicité contre les larves de *Culex pipiens* et pourrait constituer une alternative potentielle aux insecticides conventionnels pour la lutte contre les moustiques.

RÉFÉRENCES

- [1]. Strickman D. (2018). Epidémiologie-De nouvelles armes contre les moustiques. *Pour la Science*, N°490,
- [2]. Ghosh A., Chowdhury N. & Chandra G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research* 135: 581–598.
- [3]. Becker N., Petric D., Zgomba M., Boase C., Madon M., Dahl C. & Kaiser A. (2003). *Mosquitoes and their control*. London New York : Springer Heidelberg Dordrecht. 577p.
- [4]. Aissaoui L. & Boudjelida H. (2017). Diversity and distribution of Culicinae fauna in Tebessa district (North-East of Algeria). *International Journal of Mosquito Research.*; 4(1):07-12.
- [5]. Rozendaal J.A. (1999). *La lutte antivectorielle - Méthodes à usage individuel et communautaire*. OMS, Genève, 540p.
- [6]. CNEV, (2014). Utilisation des insecticides et gestion de la résistance, 71p.
- [7]. Jang Y.S., Kim M.K. & Ahn Y.J. (2002). Larvicidal activity of Brazilian plants against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 45(3):131-134.
- [8]. Bastien F. (2008). Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion. Thèse Docteur vétérinaire. Univ. Paul- Sabatier de Toulouse.78p.
- [9]. Amer A & Mehlhorn H. (2006). Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes anopheles*, and *Culex pipiens* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research.*; 99:466-472.

- [10]. Holloway. P.J. (1993). Adjuvants for agrochemicals: why do we need them? Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent, 58/2a, 125-140.
- [11]. Halimi A. (1980). *L'Atlas blidéen : climats et étages végétaux*. Ed. OPU (Office des Publications Universitaires), N°648, Alger, 523 p.
- [12]. Hadj Kaddour B., Remini B., Messaoud Nacer N. Habi M. & Pauc H. (2010). Plan de gestion intégrée d'une zone humide à partir du bilan des flux hydriques. Le cas du marais de Réghaia (Algérie). TSM, N°5, 9p.
- [13]. European Pharmacopoeia, (2004): (5th ed.), 217–218. Council of Europe: Strasbourg Cedex, France.
- [14]. Moussaoui K., Ahmed Hadjlal O., Zitouni G. & Djazouli Z.E. (2014). Estimation de la toxicité des huiles essentielles formulées de thym et d'eucalyptus et d'un produit de synthèse sur le parasite de l'abeille tellienne *Varroa destructor* (Arachnida, Varroidae). *Agrobiologia*, 4(1) : 17-26.
- [15]. Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D. & Valéro J.R. (2006). Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry*. 41(2):323-342.
- [16]. Rioux J.A., Golvan Y.J., Croset H., Tour S., Houin R., Abonnec E., Petitdidier.M., Volhardt Y., Dedet J.P., Albert J.L., Lanotte G. & Quilici M. (1965). *Epidémiologie des leishmanioses dans le Sud de la France : Paris*. Ed. INSERM, Montpellier, (37), 223 p.
- [17]. Brunhes J., Rham A., Geoffroy B., Angel G. & Hervy J.P. (1999). Les Culicidae d'Afrique méditerranéenne. *Logiciel de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.)*, Montpellier, ISBN 2,7099, pp.8-1446.
- [18]. Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2017). Procédures pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques vecteurs du paludisme. Seconde édition du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, ISBN 978-92-4-251157-4, 48p.
- [19]. Marmonnier P., Lagadeuc Y. & Aquilina L. (2006). *Introduction à l'écologie*, Ed. ENVAM. 36p.
- [20]. Abbott W.S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18:265-267.
- [21]. Finney D.-J. (1971). *Statistical method in biological assay*. 2nd Ed., London : Griffin, 668p.
- [22]. Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Tendoukeng F. & Tchouanguép F.M. (2009). Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropicicultura*, 27 (3):137-143.
- [23]. Ould El Hadj M.D., Tankari Dan-Badjo A. & Halouane F. (2003). Étude comparative de la toxicité de trois substances acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* forskål, 1775 (Orthoptera, cyrtacanthacridinae). *Courrier du savoir.*, 3:81-86.
- [24]. Kemassi A., Boual Z., Ould El Hadj- Khelil A., Dadi Bouhoun M. & Ould El Hadj M.D. (2010). Activité biologique de l'extrait d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae) sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Acrididae). *Annales des Sciences et Technologie*, 2: 61-70.
- [25]. SPSS, Inc. (2016). SYSTAT 4.00 for windows, statistics and graphics.
- [26]. Goulu M. (2015). Développement d'une nouvelle stratégie de protection chimique contre les moustiques vecteurs de maladies : utilisation d'une association répulsif/insecticide afin d'optimiser l'efficacité du traitement tout en réduisant les doses utilisées. Thèse Doctorat, Biol. Envir., Univ. Angers, Nantes, 224p.
- [27]. Aouinty B., Oufara S., Mellouki F & Mahari S. (2006). Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 10 (2) : 67–71.
- [28]. Dris, R., Gasperi, J., Saad, M., Mirande, C. & Tassin, B. (2016). Synthetic fibers in atmospheric fallout: a source of microplastics in the environment? *Mar. Pollut. Bull.* 104, 290e293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.006>.
- [29]. EL Alouani M., Alehyen S., EL Achouri M. & Taibi M. (2017). Potential use of Moroccan fly ash as low cost adsorbent for the removal of two anionic dyes (indigo carmine and acid orange). *JMES*, 8 (9): 3397-3409.
- [30]. Pitarokili D., Couladis M., Petsikos-Panayotarou N. & Tzakou O. (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 6688-6691.
- [31]. Sayah M., El Ouali Lalami A., Greech A., Errachidi F., Rodi El Kandri Y. & Ouazzani Chahdi F. (2014). Activité Larvicide des Extraits de Plantes Aromatiques sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaire. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 7 : 832-842.
- [32]. Tchoumboungang F., Dongmo P.M.J., Sameza M.L., Mbanjo E.G.N., Fotso G.B.T., Zollo P.H.A. & Menut C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 13(1): 77-84.
- [33]. Bakalem A., Dauvin J.C. & Grimes S. (2014). New marine amphipod records on the Algerian coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94:753-762.