II. Matériel et Méthodes

II.1. Présentation de la région d'étude

La wilaya de Tébessa se situe à l'Est de l'Algérie (35°20' N, 8°6' E, Altitude: 960 m). Sa superficie est de l'ordre de 13878 km^2. Elle est limitée au Nord par la wilaya de Souk Ahras, au Sud par la wilaya d'El Oued, à l'Ouest par la wilaya d'Oum El Bouaghi et Khenchla, et à l'Est par la frontière algéro-tunisienne. Elle est divisée en 28 communes ; appartenant à un même étage bioclimatique, le semi-aride (Figure1) (Bouabida et *al*., 2012).

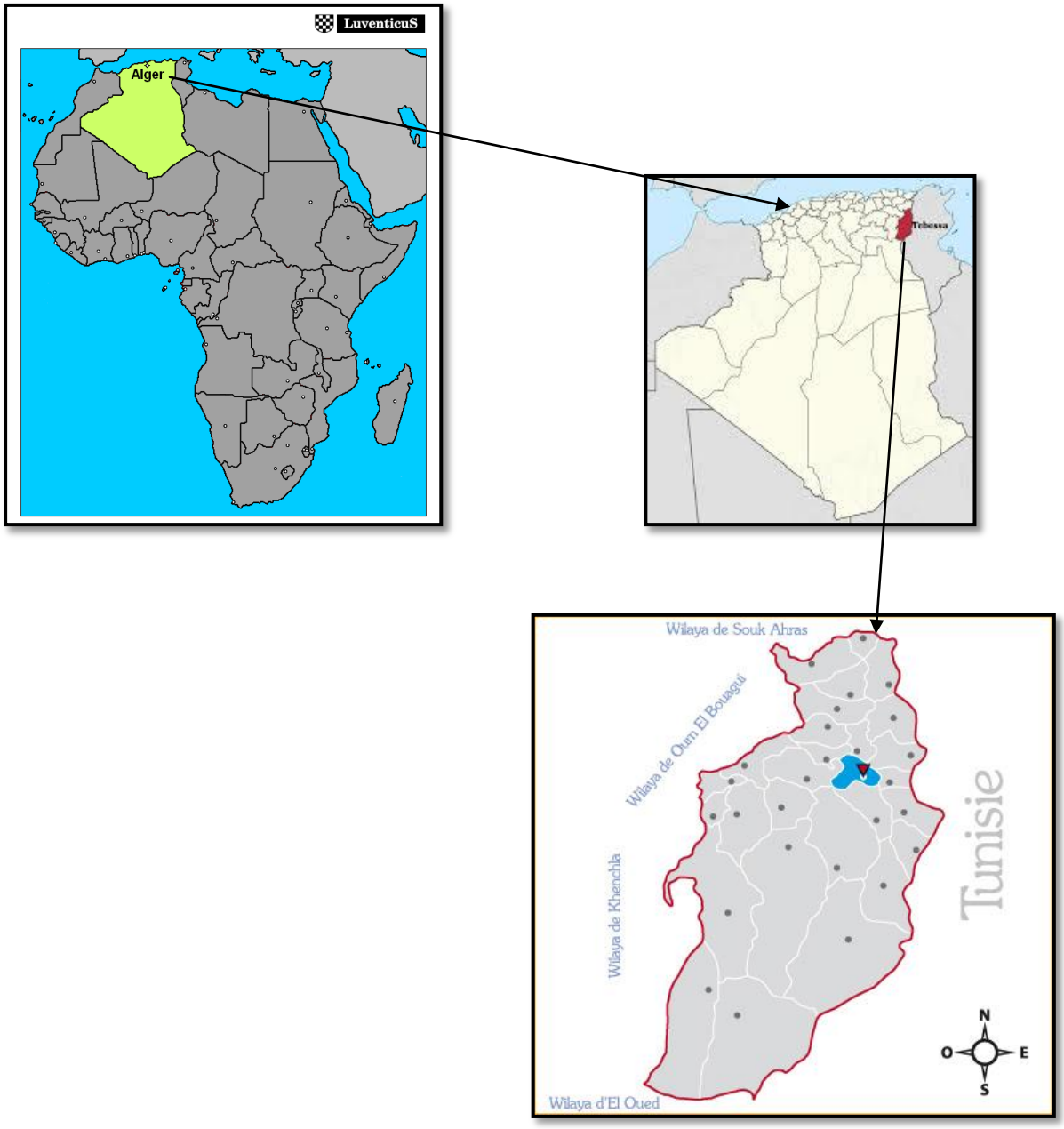


Figure 1 : Présentation de site d'étude (www.mondecarte.com)

II.2. Présentation de la famille des Culicidae

Les moustiques sont des Arthropodes appartenant au sous-embranchement des Antennates, à la classe des Insectes de l'ordre des Diptères et du sous-ordre des Nématocères.

Ils sont regroupés dans la famille des Culicidae qui est caractérisée par des individus aux antennes longues et fines à multiples articles et par des femelles possédant de longues pièces buccales en forme de trompe rigide de type piqueur suceur (Serradj, 2010).

II.2.1. Inventaire des Culicidae dans la région de Tébessa

Selon (Aïssaoui, 2014) les Culicidae ont été récoltés au niveau des différentes stations de la région de Tébessa. L'analyse de la composition en espèces de Culicidae dans les différents gîtes d'études montre en premier lieu que chaque milieu présente une particularité faunistique. En effet, d'après le Tableau1 Cx. *pipiens* et Cs. *longiareolata* se trouvent dans tous les types des gîtes.

Les résultats obtenus à l'aide des techniques utilisées (récoltes et élevage des stades pré-imaginaux) ont permis d'identifier 2 sous familles ; les Anophelinae et les Culicinae (Tableau3). Dans la sous-famille des Anophelinae une seule espèce a été identifié tel qu'*An. labranchiae*. Dans la sous-famille des Culicinae nous avons identifié quatre genres : *Aedes*, *Culex*, *Culiseta* et *Uranotaenia* (Aïssaoui, 2014).

Le genre *Culiseta* présenté par trois espèces, l'espèce *Cs. longiareolata* est l'espèce la plus abondante et la plus fréquemment (Aïssaoui, 2014).

Tableau 1 : Abondances relatives des espèces de Culicidae récoltées au niveau de la région de Tébessa (juin 2006 à mai 2007). **Nind:** nombre d'individus; **% nind:** abondance relative; **Occ:** le nombre de relevés contenant l'espèce étudiée; **% occ:** fréquence d'occurrence; **Caté:** catégorie; **Acces:** accessoires; **Accid:** accidentelles (Bouabida et *al*., 2012).

Espèces	**Tébessa**				
	Nind	**%nind**	**Occ**	**%occ**	**Caté**
Ochlerotatus caspius	193	0,60	3	1,76	Accid
Culex hortensis	123	0,38	8	4,70	Accid
Culex laticinctus	272	0,84	3	1,76	Accid
Culex pipiens	10442	32,57	66	38,82	Acces
Culex theileri	512	1,59	6	3,52	Accid
Culex perexiguus	518	1,61	6	3,52	Accid
Culiseta subochrea	20	0,06	3	1,76	Accid
Culiseta annulata	96	0,29	1	0,58	Accid
Culiseta longiareolata	19881	62,01	74	43,52	Acces
Total	**32057**	**100**	**170**	**100**	

II.2.2. Caractéristiques morphologiques d'identification du genre *Culiseta*

II.2.2.1. Clés d'identification du genre *Culiseta longiareolata*

La systématique des Culicidae de la à été étudiée principalement à l'aide de logiciels d'identification et une clé dichotomique (Himmi et *al*., 1995).

L'identification de la femelle repose sur la morphologie externe : répartition et couleur des écailles, structures de l'aile et celle de l'extrémité postérieur abdominale permettant la distinction des genres et des espèces. Chez les mâles, la structure et la chétotaxie de l'hypopygium sont nécessaires pour la détermination du genre et des espèces. Les larves du quatrième stade sont très utilisées dans ce domaine, vu la facilité de leur pêche et leur chétotaxie qui permet l'identification des espèces et des sous espèces (Ben malek, 2010).

II.2.2.2. Position systématique

La classification des espèces de la famille des Culicidae est représentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Position systématique de *Culiseta longiareolata* (Paul, 2009).

Règne	Animalia
Sous règne	Metazoa
Embranchement	Arthropoda
Sous Embranchement	Hexapoda
Super classe	Protostomia
Classe	Insecta
Sous-classe	Ptérygota
Super Ordre	Endopterygota
Ordre	Diptera
Sous-ordre	Nématocère
Famille	Culicidae
Genre	*Culiseta*
Espèce	*Culiseta longiareolata* (Aitken, 1954)

II.2.2.3. Caractères morphologiques de *Culiseta longiareolata*

Culiseta longiareolata est un insecte nuisible à métamorphose complète, c'est-à-dire que la larve ne ressemble pas à l'adulte, ce moustique à une taille qui varie entre 3 à 5 mm .Il possède un corps mince et des patte longues et fine avec des ailes membraneuse, longues et étroites (Figure 2).



Figure 2 : *Culiseta longiareolata* (www.nature- of-oz.com)

Les œufs de *Cs. Longiareolata* ont une forme cylindro-conique, groupés en nacelle porte environ 50 à 200 œufs, (Figure 3) les larves sont de types carnivores, caractérisées par un peigne siphonal dont ses dents implantées irrégulièrement (Figure 4).



Figure 3 : Nacelle d'Oeufs de *Cs. Longiareolata* (www.forumazur.com)

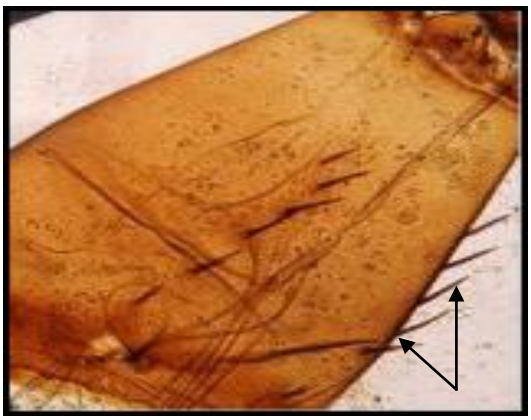


Figure 4 : Dents du peigne siphonal (flèche) de *Cs. Longiareolata* (Gr : X40) (Aïssaoui, 2014)

Chez l'adulte, on remarque la présence au moins d'une tache d'écailles sombres sur l'aile (Figure 5), le thorax avec trois bandes blanches longitudinales et l'absence des soies longues et forte au niveau du lobe basal du gonocoxite (Figure 6,7), les femelle sont sténogames et autogènes (Rageau et *al*., 1970. Bouabida et *al*., 2012).

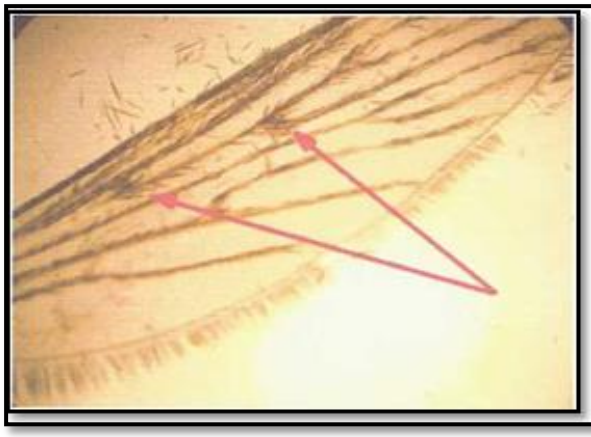


Figure 5 : Taches d'écaille sombres sur l'aile (flèche) de *Cs. longiareolata* (Gr : X 60) (Bouabida, 2014)

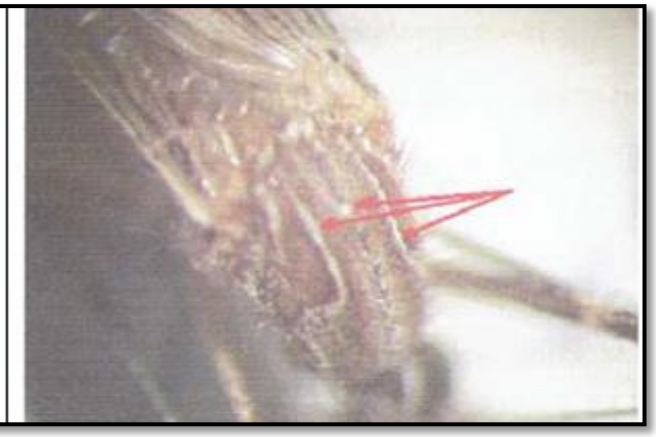


Figure 6 : Trois Bandes blanches longitudinales (flèche) de *Cs. Longiareolata* (Gr : X40) (Bouabida, 2014)

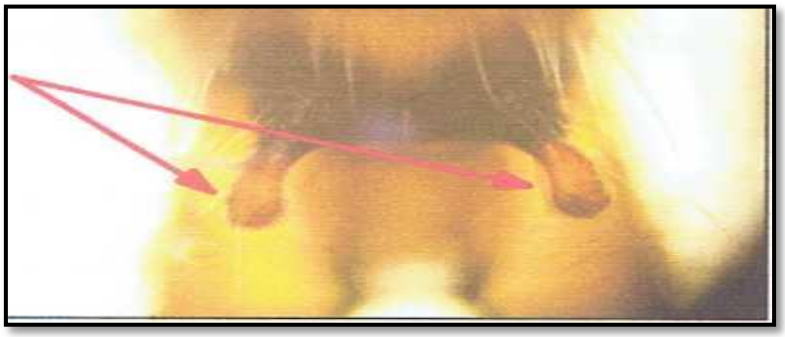


Figure 7 : Lobe basai du gonocoxite (flèche) de *Cs. longiareolata* (Gr : X 150) (Bouabida, 2014)

II.2.2.3.1. Larves

Le développement larvaire comporte quatre stades de morphologie comparable, hormis la taille (de 1 mm-1,5 mm). Les caractères morphologiques utiles en systématique concernent le quatrième stade (Ben malek, 2010) .

A. La tête

La tête de la larve des moustiques a formée par une plaque chitineuse médiane : le fronctoclypéus et deux latérales plaque antérieure (plaque épicrâniennes). Au fronctoclypéus est rattachée une plaque antérieure étroite (préclypéus) portant des brosses buccales. Les pièces buccales sont du type broyeur. Les plaques chitineuses (préclypéus et fronctoclypéus) portent des soies systématiques (soies préclypéales, clypéales, frontales, occipitales….).

Latéralement on distingue deux tâches oculaires ainsi que les deux antennes (Ben malek, 2010).

B. Le thorax

Le thorax est représenté par une masse indivise de forme légèrement globuleuse, large aplatie dorso-ventralement, le thorax est formé de trois segments soudés (prothorax, mésothorax et métathorax), dont la distinction se fait à l'aide de la chétotaxie. A l'angle antéro-dorsal, on distingue une paire de lobe transparent (notched organs) des Anglo-Saxons ou organes bilobés rétractiles, pas visibles sur tous les exemplaires. Entre les lobes de chaque paire, il y a une dépression en entonnoir. D'après , les (Notched Organs) rappellent des vestiges de stigmates antérieurs de nombreuses larves de Nématocères. Les stigmates des stades successifs ne sont pas formés en dedans des stigmates précédents mais à partir des branches indépendantes de l'atrium stigmatique persistant, il serait possible que les trompettes respiratoires se rapportent de cette manière aux (Notched Organs) (Snodgrass, 1959).

C. L'abdomen

L'abdomen de la larve de moustique possède 10 segments : huit segments bien apparents, le neuvième pas évident, soudé au huitième, et un dixième segment forme le segment anal. Le dixième segment serait le segment anal qui correspondrait au petit lobe anal et dorsal de la nymphe en arrière de l'anneau qui est le neuvième segment, et qui porte en plus, les nageoires. Le neuvième combiné au huitième formerait un anneau complet, c'est lui qui porte la paire de stigmates superficiels dorsaux, et sur sa partie latérale un peigne. La longueur et la largeur sont caractéristique de l'espèce (indice siphonique, c'est le rapport de la longueur/largeur à la base, qui varie de 1 à 15), ce dernier porte latéralement une rangée d'épines appelée peigne du siphon et une ou plusieurs touffes de soies. (Snodgrass, 1959).

Le dixième segment est le segment anal, il porte quatre longues papilles anales (lobes anaux), une brosse ventrale et des soies caudales internes et externes, sa partie tergale comporte un sclérite en selle (Ben malek, 2010).

II.2.2.3.2. Adulte ou imago

Présente une taille de 5 à 20 mm, un corps composé de trois parties distinctes : tête, thorax, et abdomen (Ben malek, 2010).

A. Tête

Généralement de forme globuleuse**,** porte de yeux composés de nombreuses ommatidies, s'étendant sur les faces latérales, mais aussi sur une grande partie de la face dorsale et une partie sur la face ventrale, ils sont presque jointifs, séparés par une bonde frontale étroite (Rhodain et Perez; 1985).

Le clypéus région où s'insère la trompe. Le front porte les antennes, dans les échancrures du champ oculaire s'insèrent les antennes formées de 16 articles chez les femelles et 15 articles chez les males. Les deux premiers articles appelés respectivement scape et torus. Les articles suivant forment le flagellum portant à leur axe des verticilles de soies déterminant le sexe. Elles sont longues et nombreuses chez le mâle, courtes et rares chez la femelle. Les appendices buccaux de type piqueur suceur formant la trompe.

L'hypopharynx contenant un canal de petit diamètre (canal salivaire) et labre en forme de gouttière constitue un canal de grand diamètre (canal alimentaire). Ces pièces buccales au repos sont protégées par une enveloppe souple, certaines de ces pièces buccales peuvent s'atrophier (Rhodain et Perez; 1985).

B. Thorax

Le thorax du moustique avec ses diverses sclérite a fait l'objet de nombreuses études. Le thorax des moustiques adultes comprend trois segments soudés; le prothorax, le mésothorax et le métathorax. Chaque segment donnant naissance à une paire de pattes. Le premier, très réduit, comporte un notum qui comprend les lobes antérieurs et postérieurs, sous le lobe antérieur se trouve le proépisternum. Le deuxième, très développé, porte une paire de stigmates, une paire d'ailes et un prolongement postérieur et dorsal : le scutellum. Le troisième, porte une paire de stigmates et une paire de balanciers (ou haltères). Chaque patte comprend, de sa base à l'extrémité distale, la hanche ou coxa, le trochanter indistinct, le fémur, le tibia, et un tarse de cinq articles (Rhodain et Perez, 1985).

C. Ailes

La nervation est simple, elle comprend deux bords, l'antérieur ou costal, le postérieur ou anal; une base thoracique et un apex. Les nervures sont très employées en systématique : les longitudinales, parfois bifurquées, relient la base à l'apex; les transversales unissent les longitudinales entre elles ; celles-ci sont numérotées de 1 à 6 d'avant en arrière. Les nervures divisent l'aile en cellules. La frange alaire comporte des écailles courtes (écailles de la bordure) ; des écailles loncéolées plus longues (écailles plumeuses) ; les écailles de la frange

sont claires ou sombrent elles peuvent être claviformes (squaine scales) ou fusiformes (plume scales). Les premières leur position est médiane et latérale, ont la tige inclinée, mais tout le reste de leur lamelle est parallèle à la surface, leur partie apicale est large, presque horizontale légèrement échancrée, tandis que les secondes sont étroites, lancéolées, à parti apicale effilée avec peu de nervures, et leur position est oblique par rapport à la surface alaire (Rhodain et Perez, 1985).

D. Pattes

Chaque patte comprend une hanche ou coxa, un trochanter ; un fémur, un tibia et les tarses comprenant cinq articles, dont le premier est aussi long que les quatre autres réunis, le cinquième porte parfois un empodium et deux pulvilles ainsi qu'une paire d'angles égaux, simples chez la femelle et inégaux à la première paire de pattes du mâle. Les écailles des pattes dessinent des mouchetures, tâches, anneaux basaux, apicaux ou occupant toute la longueur de l'article, très utilisés dans la systématique, le dernier article porte deux griffes et parfois un empodium et deux pulvilles (Bendali, 1989).

Dans les deux sexes, l'abdomen comporte dix segments**,** dont huit visibles extérieurement. Chacun d'eux présente une partie dorsale (tergite) et une partie ventrale (sternite), reliées par une membrane souple latérale; segment ornés de soies et d'écailles de couleur et de disposition variées (écailles absentes chez les Anophelinaes). Dernier segment abdominal constituant les appendices génitaux (génitalia), dont la morphologie très complexe, surtout chez les mâles, est très utilisé en systématique. L'appareil génital mâle (ou hypopygium), qui comprend les IXe et Xe segments, subit, comme c'est la règle chez beaucoup de Nématocères, un phénomène d'hémi rotation de 180°, amenant la face ventrale en position dorsale. Cette circumversion se produit 12 à 24 heures après l'émergence (Ben malek, 2010).

E. Abdomen

Dans les deux sexes, l'abdomen comporte dix (10) segments**,** dont huit visibles extérieurement. Chacun d'eux présente une partie dorsale (tergite) et une partie ventrale (sternite), reliées par une membrane souple latérale; segment ornés de soies et d'écailles de couleur et de disposition variées (écailles absentes chez les Anophelinaes). Dernier segment abdominal constituant les appendices génitaux (génitalia), dont la morphologie très complexe, surtout chez les mâles, est très utilisé en systématique. L'appareil génital mâle (ou hypopygium), qui comprend les IXe et Xe segments, subit, comme c'est la règle chez

beaucoup de Nématocères, un phénomène d'hémi rotation de 180°, amenant la face ventrale en position dorsale. Cette circumversion se produit 12 à 24 heures après l'émergence (Rhodain et Perez, 1985).

II.2.3. Présentation des gîtes du *Culiseta longiareolata*

Cs. longiareolata est multivoltine. Les femelles sont sténogames et autogènes. Les gîtes larvaires sont de types très variés (bassins, abreuvoirs, puits abandonnés, trous de rocher, mares, rizières, canaux.) mais l'eau y est toujours stagnante et généralement riche en matières organiques. Les femelles piquent surtout les oiseaux, très rarement l'humain ; elles pénètrent occasionnellement dans les maisons. L'espèce est considérée comme un vecteur de Plasmodiums d'oiseau ; elle peut transmettre expérimentalement le virus West Nile (Figure 8) (Aïssaoui, 2014).



Figure 8 : Présentation des gites larvaires dans la région de Tébessa.

II.2.4. Biologie et cycle de vie des moustiques

Les moustiques sont des insectes holométaboles. Leur développement passe par une phase larvaire aquatique avant le stade adulte aérien entrecoupé d'une courte phase nymphale. Les femelles moustiques gravides pondent leurs œufs de différentes manières. Dans la plupart des cas, une diminution de la teneur en oxygène de l'eau, liée en partie à la présence importante de matières organiques est l'élément déclencheur de l'éclosion (Poupardin, 2011).

Après l'éclosion, la phase larvaire se divise en quatre stades distincts séparés par trois mues successives. La durée de cette phase larvaire varie selon la température du milieu, la densité larvaire ainsi que la disponibilité en nourriture. Le développement des moustiques se caractérise par deux phases distinctes. Un cycle pré imaginal qui se déroule en milieu aquatique et regroupe l'œuf, les quatre stades larvaires et la nymphe (Figure 10) (Clements, 1992).

A. Les œufs

Après avoir absorbé du sang, la femelle exclusivement hématophage, se pose dans un endroit pour s'abriter et digérer son repas hématophagique, quelques jours plus tard, elle effectue la ponte. Les œufs sont fusiformes, mesurant environ 1 millimètre de longueur: blanchâtres au moment de la ponte, les œufs sont pondus sur l'eau ou sur sol humide, sont déposés à la surface de l'eau soit, isolément ou groupés en nacelles sur l'eau des gîtes artificielles (de 50 à 200 œufs). Les œufs peuvent éclore en moins de 2 à 3 jours après leur ponte (Oudainia, 2015).

B. Les Larves

Elles sont dépourvues de pattes et d'ailes. Les larves ont une croissance discontinue et subissent quatre mues, lui permettant de passer d'environ 2 à 12 mm De la dernière mue sort une nymphe. Les larves sont le plus souvent détritiphages 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. Le mode de respiration est par un siphon situé à l'extrémité de l'abdomen et sont donc obliques par rapport à la surface de l'eau. La durée du stade larvaire est de 4 à 7 jours (Raharimalala, 2011).

C. Les nymphes

Les nymphes ont la forme d'une virgule. Elles restent généralement à la surface de l'eau mais plongent lorsqu'elles sont dérangées, en déployant et reployant 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. 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. 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 (Raharimalala, 2011).

D. L'imago ou l'adulte

Le dimorphisme sexuel est largement clair, l'antenne du mâle est velue, chez la femelle est glabre. L'adulte qui vient d'émerger, est en générale plus mou. Avant de s'envoler, il reste à la surface jusqu'à ce que ses ailes et son corps sèchent et durcissent. Les mâles émergent souvent avant les femelles, car ils ont énormément besoin de temps pour développer leur glande sexuelle. En général, la durée du cycle biologique des moustiques adultes varie d'une semaine à plus d'une trentaine de jours, selon les conditions de température et d'humidité. Certains individus ont vécu deux mois en élevage, les femelle vivent plus longtemps que les mâles qui meurent peu après l'accouplement. L'adulte présente une taille de 5 à 20 mm, les trois parties fondamentales du corps du moustique sont bien distinctes: la tête, le thorax et l'abdomen (Oudainia, 2015).

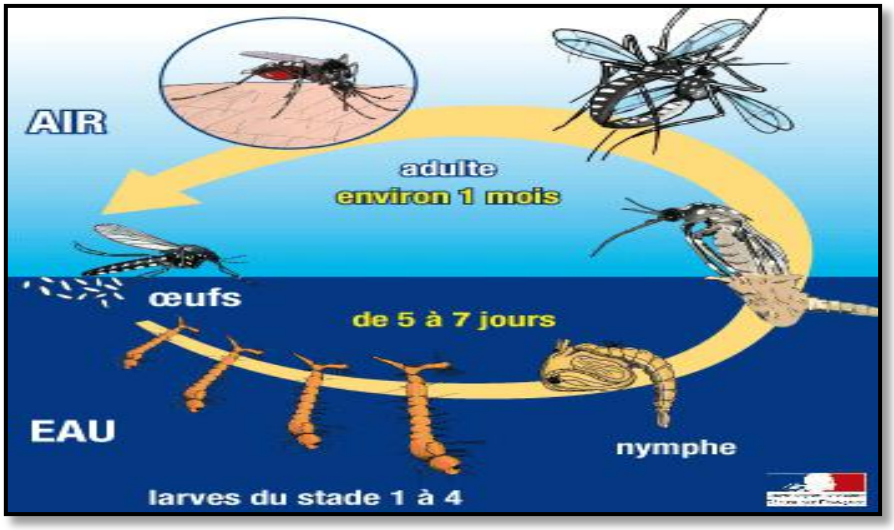


Figure 9 : Cycle de vie de moustique.

II.2.5. Techniques d'élevage

A l'état larvaire : les œufs ont été récoltés dans des fosses d'accumulation des eaux usées à Tébessa de février à mai 2016, soit sur une durée de 4 mois. Elle a porté sur un échantillon choisis selon différents critères: la présence des larves de Culicidés dans le lot de gîte, l'accessibilité, et le non traitement par les insecticides (Badani et Mallouk, 2014).

L'échantillonnage se fait en utilisant la méthode de coup de louche d'une capacité de 500 millilitres. Cette technique consiste à plonger la louche dans l'eau puis la déplacer avec un mouvement uniforme en évitant les remous (Badani et Mallouk, 2014).

Après Éclosion, les larves sont élevées dans des récipients contenant 150 ml d'eau et nourries avec 0,04g du mélange biscuit 75% et levure 25% (Rehemi et *al,* 1999). Le régime alimentaire joue un grand rôle dans la fécondité, car les protéines permettent à la femelle de pondre plus d'œufs par rapport aux femelles nourries de sucre seulement (wigglesworth ,1972). Le changement d'eau et l'ajout de la nourriture ont été effectués chaque 2 à 3 jour.

II.3. Monographie de l'espèce *Rosmarinus officinalis*

II.3.1. Origine et Position systématique

II.3.1.1. Origine

Le romarin est un arbrisseau originaire du bassin méditerranéen. *Rosmarinus officinalis* pousse à l'état sauvage dans les maquis et les garrigues calcaires du sud de la France.

Le romarin a laissé de nombreuses traces dans notre Histoire. Les Egyptiens pensaient que déposer des rameaux de romarin dans les sépultures des pharaons aidait à fortifier leur âme avant de passer dans l'autre monde. (http://lesbrindherbes.org)

II.3.1.2. Position systématique

Tableau 3 : Position systématique du romarin

Règne	Plantae
Sous règne	Cormophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Spermaphytes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiacée
Genre	*Rosmarinus*
Espèce	*Rosmarinus officinalis L* (Quezel et Santa, 1963)

II.3.2. Distribution géographique

Le romarin se trouve dans toutes les contrées mondiales de l'Europe, plus particulièrement sur le pourtour méditerranéen, de préférence dans les lieux secs et arides, exposés au soleil, à l'état sauvage il se trouve sur des sols calcaires (Zeghad, 2008).

En Algérie, le romarin est l'une des sept espèces végétales excédant 50.000 hectares sur le territoire national **(**Zoubeidi, 2004**).** L'aire géographique du romarin est spécifiquement méditerranéenne, il est répandu dans les pays européens, en France, en Espagne, au Portugal (Mathonnet, 2012).

De l'autre côté de Gibraltar on le retrouve au Maroc, en Tunisie et en Libye; mais qu'il est abondant, il devient rare et ne se manifeste que dans quelques stations isolées en Egypte, en Palestine, au Liban, à Chypre, il réapparait en Turquie, en Grèce et en Italie (Helal, 2010).

II.3.3. Morphologie de l'espèce

Le romarin est un arbrisseau qui se reconnait de loin à son odeur pénétrante, cette plante peut atteindre 2m de hauteur. Elle se plait dans les jardins d'ornement à condition d'être à l'abri du vent (Anonyme,1996).

II.3.3.1. Appareil végétatif

Le romarin est une plante odorante.

A. Racine : la racine du Rosmarinus officinalis est profonde et pivotante.

B. Tige : arbuste ou sous arbrisseau, rameau de 0.5 à 2 mètres cette tige est tortueuse, anguleuse et fragile. L'écorce est linéaire à cyme axillaire plus ou moins simulant des épis (Sanon, 1992).

C. Feuille : linéaire, gaufrée, feuilles coriaces, sessiles, opposées, rigides brillantes à bords repliés verdâtre en –dessus plus ou moins hispides blanchâtre en dessous de 18 à 50 x 1.5 à 3 mm (Figure 10). Les feuilles sèches dégagent une forte odeur et un gout amer (Janvola et Jinistodola, 1983).



Figure 10 : Feuille de *Rosmarinus officinalis L.*(Mostefai, 2011).

II.3.3.2. Appareil reproducteur

A. Fleurs : Très courtes grappes axillaires et terminales. Chaque fleur environ 1cm de long de couleur purpurin ; bleu pâle ou blanchâtre, en cloche bilabiée à lèvre supérieure ovale entière et à lèvre à 2 lobes lancéolés. Lèvre supérieure en casque légèrement bifide. Lèvre inférieure à 3 lobes dont le médian est large et concave. Les 2 étamines sont plus longues que la corolle. L'ovaire présente 2 carpelles surmontées d'un style long courbe et bifide (Figure 11) (Mostefai, 2011).



Figure 11 : Fleur de *Rosmarinus officinalis L*. (https fr. wiktionary).

B. Fruit : est tétakène de forme ovale située au fond du calice. Il est en baie, sèche et lisse (Mostefai, 2011).

II.3.4. Habitat et culture

II.3.4.1. Habitat

A l'état sauvage, le romarin se rencontre sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, de préférence sur sols calcaires et jusqu'à 2000 m d'altitude. Le milieu a une forte influence sur le développement de cette plante. Il existe des climatiques, édaphiques et biotiques. Le romarin est une plante hélophyte ; il demande une sécheresse estivale accusée et un ensoleillement important et nécessite un hiver doux, des conditions hivernales clémentes, avec des précipitations neigeuses rares et peu abondantes. Si les températures hivernales sont trop basses, les plants d'un an et plus résistent, mais les plantules périssent (surtout celles situées dans des endroits humides) (Fadi, 2011).

Les vents provoquant un brassage important de l'atmosphère, pouvant permettre d'égaliser les températures macro et microclimatiques, sont d'une action positive sur le romarin qui résiste fort bien à leur action mécanique. Par contre, la présence de sels dans ces courants empêche leur installation trop près du rivage. Le romarin ne se développe que sur des sols secs et bien drainés. Il est beaucoup plus rare dans des régions où le sol est asphyxié (par la présence d'eau) pendant presque toute l'année. Cette plante recherche les sols riches en ions calcium, d'un pH entre 6 et 8, 4 et ayant une texture argilo-limono-sableuse. Par contre, elle est peu abondante sur les sols saturés en ions magnésium. Le romarin a un besoin accru en luminosité. Si cette dernière est faible car la lumière est interceptée par des essences

concurrentes, alors les tiges s'allongent, deviennent plus frêles, les fleurs sont plus rares voire absentes et les parasites sont plus nombreux. Le piétinement par les ovins a un impact négatif car il diminue la quantité d'air dans le sol, ce qui gêne le développement des plantules (Fadi, 2011).

II.3.4.2. Culture

La multiplication s'effectue par semis des graines, division des pieds ou boutures. Cette dernière technique est rapide et sûre. Des tronçons de 15 cm sont enterrés à mi-hauteur en mars-avril. L'enracinement se produit dans les deux mois suivants.

La mise en place définitive a lieu à l'automne ou au printemps suivant, dès que les pieds ont suffisamment de racines. L'espacement varie de 0, 75 à 1, 5 m pour les interlignes, et il est de 0, 5 cm entre les pieds d'un même rang (Abdoulhoussen,1990).

La récolte, mécanique ou réalisée à l'aide d'une faucille, débute 18 mois après la plantation, à raison d'une coupe par an ; elle consiste à couper les brins à 30 cm du sol, les réunir en bouquets pour les suspendre ensuite. Elle se fait soit en mai avant floraison ou en septembre si l'on recherche le feuillage pour l'herboristerie ou l'industrie alimentaire, soit en pleine floraison (juillet) si le romarin est destiné à la distillation (Abdoulhoussen,1990).

II.3.5. Composition biochimique du romarin

L'huile essentielle du romarin (1 à 2% dans la plante) contient : de l'α-pinène (7 à 80%), de la verbénone (1 à 37%), du camphre (1 à 38%), de l'eucalyptol (1 à 35%), du bornéol (4 à 19%), de l'acétate de bornyle (jusqu'à 10%) et du camphène.

En plus de l'huile essentielle on trouve dans le romarin : 2 à 4% de dérivés tri terpéniques tels que : l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acétate de germanicol ; des lactones di terpéniques : picrosalvine, dérivés de l'acide carnosolique, rosmanol, rosmadial, des acides phénoliques , des acides gras hydroxylés surtout des dérivés de l'acide décanoïque ,des acides gras organiques : l'acide citrique, glycolique et glycérique , des stérols, de la choline, du mucilage et de la résine.(Athamena, 2009).

Les principaux constituants du romarin :

- ✓ Composés phénoliques
- **Les acides phénoliques** : acide vanillique, acide caféique, acide p coumarique (Ibañez et *al.*, 2003 ; Ramirez et *al.*, 2004 ; Cavero et *al.*, 2005 ; Herrero et *al.*, 2005 ; Muchuweti et *al.*, 2007 ; Pérez et *al.*, 2007).
- **Les flavonoïdes** : genkwanine, cirsimaritine ériocitrine, hesperédine,

diosmine, lutéoline, , apigénine (Yang et *al.*, 2008).

- ✓ Terpenoides
- **Huile essentielle :** 1,8 cinéole, alpha-pinène, camphre de romarin. La constitution de l'huile essentielle varie selon la phase de développement et l'origine des feuilles utilisées pour l'extraction (Akroum, 2006).
- **Diterpènes :** acide carnosolique, rosmadial (Akroum, 2006).
- **Triterpènes et steroïdes :** acide aléanolique, acide ursotique (Akroum, 2006).
- ✓ Alcaloïdes

II.3.6. Utilisations du romarin

Dans le Mexique et le Guatemala, il est employé principalement comme remède de post-partum et traite également les problèmes respiratoires et les infections de la peau. En Espagne, l'huile du romarin est très populaire pour beaucoup de genres de douleur, y compris les douleurs musculaires rhumatismales et traumatiques. (Athamena, 2008).

Au Maroc, l'infusion des feuilles est utilisée comme apéritif, cholagogue, stomachique et emménagogue. En usage externe, les cataplasmes faits avec les compresses de la décoction concentrée sont appliqués comme vulnéraires. La poudre des feuilles est saupoudrée comme cicatrisant et antiseptique. La fumigation du romarin est indiquée pour calmer les maux de dents. Depuis quelques décennies, l'huile essentielle du romarin est utilisée en massage sédatif dans les rhumatismes et la sciatique. Les feuilles séchées servent à conserver la laine de l'attaque des mites. En Turquie, la décoction de feuilles du romarin a été traditionnellement employée pour traiter les diabétiques. L'infusion des feuilles est tonique, antitussive, carminative, antiasthmatique, fébrifuge, et anti-paralytique**)**. On le recommande dans les asthénies, les troubles du foie, contre les dyspepsies atoniques ainsi que contre les céphalées et les migraines d'origine nerveuse, les vertiges et les troubles de mémoire. (Athamena, 2008).

II.4. Les polyphénols

Les polyphénols constituent un groupes largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante, ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales, la voie de shikimate et d'acétate (Hopkins, 2003). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un cycle aromatique (benzoïque) portant au moins un groupement hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther,

méthylique, ester, sucre...) (Bruneton, 1993). La structure de ces composés varie, des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules hautement polymérisées (tanins condensés). Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc…), certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Hopkins, 2003).

Les polyphénols sont répartit en plusieurs classes : les acides phénoliques, les flavonoïdes, Les tanins, Les stilbènes, Les lignanes et les coumarines (Hopkins, 2003).

II.4.1. Classification des polyphénols

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles…). Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances (Tableau 4), qui peuvent se classer selon leur structure en cinq groupes principaux :

Tableau 4 : Principales classes de composés phénoliques (Merghem , 2010).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine
C1	Phénols simples	Catéchol	
C6-C1	Acides hydroxbenzoïques	*p*- Hydroxbenzoïques	Epices, fraise
C6-C3	Acides hydroxycinnamiques	Acides caféique,férulique	Pomme de terre,
	Coumarines	Scopolétine, esculétine	Citrus
C6-C4	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C6-C2-C6	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C6-C3-C6	Flavonoïdes *Flavonols *Anthocycanes *Flavanol *Flavanones Isoflavonoïdes	Kaempférol,quercétine Cyanidine,Pélargonidine Catéchine, épicatéchine Naringénine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
$(C6-C3)_2$	Lignanaes	Pinorésinol	Pin
$(C6-C3)_n$	Lignines		Bois, noyau des fruits
$(C15)_n$	Tannins		Raisin rouge, kaki

II.4.1.1. Les acides phénols

Les acides phénols font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Boubekri , 2014).

II.4.1.2. Coumarines C6 - C3

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* . Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides *t*-cinnamique et *p*-coumarique pour la majorité d'entre eux (Lacy et O'Kennedy, 2004).

II.4.1.3. Stilbènes C6-C2-C6

Les stilbènes présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle B portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par une double liaison, formant un système conjugué (Belkheiri, 2010).

II.4.1.4. Lignines $(C6\text{-}C3)_n$

La lignine est un polymère fortement ramifié, formés par trois alcools phénoliques simples. Les alcools sont oxydés en radicaux libres par une enzyme ubiquiste chez les plantes ; la peroxydase. Les radicaux libres réagissent ensuite spontanément et au hasard pour former la lignine. La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées (Hopkins, 2003).

II.4.1.5. Lignanes $(C6\text{-}C3)_2$

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3) l'unité (C6 - C3) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (Peterson et *al*., 2010).

II.4.1.6. Xanthones

C'est une famille constituée des composés polyphénoliques généralement isolés dans les plantes supérieures et dans les microorganismes répondant à une structure de base (C6-C1-C6) (Muanda, 2010).

II.4.1.7. Flavonoïdes

Ils rassembles une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, leur fonction principale semble être la coloration des plantes. Ils sont surtout abondants chez les plantes supérieures particulièrement dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées, mais ils peuvent également se trouver dans le règne animal, les glandes à sécrétion odoriférante du castor, le propolis des abeilles (la Chrysine, la Quercétine, la Galangine) et dans les ailes des papillon (Mokhtari, 2011).

Les flavonoïdes sont présents dans les vacuoles sous forme d'hétérosides, dont la partie osidique est fréquemment le glucose ou le Rhamnose (Mokhtari, 2011).

Les flavonoïdes sont un groupe de composés polyphénoliques, avec des structures chimiques diversifiées et caractéristiques. Plus de 4000 flavonoïdes différents appartiennent à des classes flavonoïdes incluant les flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidines, isoflavones, dihydroflavonols, et chalcones. Les flavonoïdes font partie de l'alimentation humaine: nous les retrouvons dans les fruits (citron), les légumes et les boissons (thé, café, etc.) (Mokhtari, 2011).

II.4.1.8. Les quinones

Les quinones résultent de l'oxydation de dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diénique (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa-3,5-diénique (ortho-quinones). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphtalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone) (Krief, 2003).

II.4.1.9. Les tannins

Les tannins organisés principalement en deux classes suivant la nature chimique du polyphénol de base : les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Furlan, 2014).

II.4.2. biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont issus par deux grandes voies métaboliques : la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acétate/malonate (Figure 12) (Boubekri, 2014).

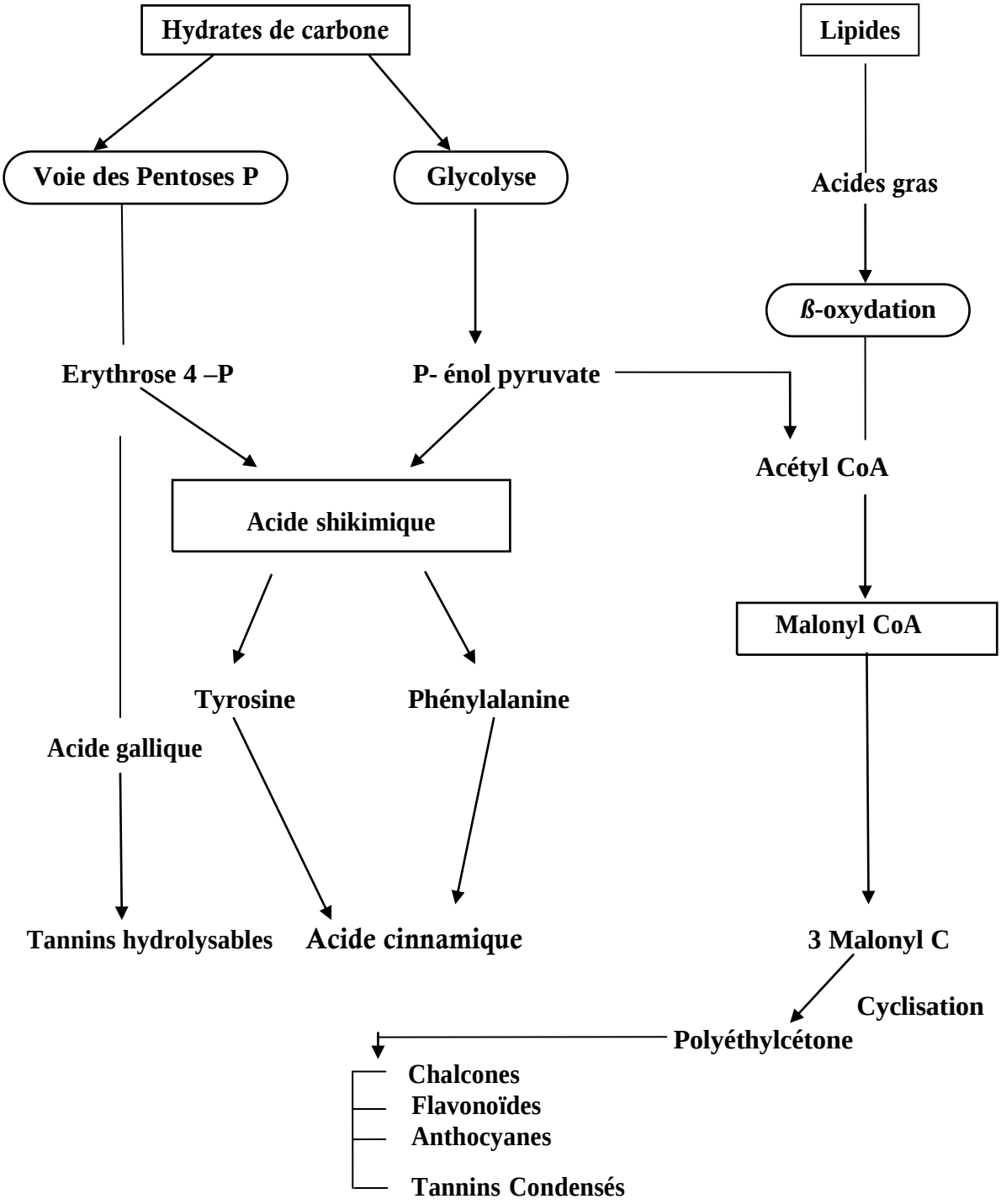


Figure 12 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols (Akroum, 2012).

4.3. Utilisation des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant (Gobbi et Khebbaz, 2013). Plusieurs études épidémiologiques dont la célèbre ZUTPHEN Study aux Pays-Bas indiquent qu'il existe une association inverse entre la consommation d'aliments riches en polyphénols et l'incidence de cancer et des maladies cardiovasculaires. La consommation d'aliments riches en polyphénols réduit le développement de nombreuses pathologies, telles que le cancer, l'ischémie cardiaque, l'athérosclérose et l'hypertension. Ceci peut-être expliqué par le fait que ces composés ont la capacité de modifier de nombreux facteurs impliqués dans la genèse de ces maladies (Abedin, 2015).

La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (Gobbi et Khebbaz, 2013).

II.5. Extraction des polyphénols

L'isolement des composés phénoliques des plantes par extraction est généralement un processus très difficile compte tenu de la variété de composés qu'il est possible de trouver dans les échantillons naturels. L'obtention de rendements élevés est parfois compliquée et par conséquent des soins doivent être pris pendant la manipulation afin d'éviter les modifications chimiques qui peuvent survenir lors du processus d'extraction en raison de l'activité enzymatique élevée des échantillons naturels. En effet, l'oxydation et l'isomérisation durant l'extraction sont un souci constant (Martha et Perez, 2008).

II.5.1. Macération

La plante fraîche et broyée (50 g) est soumise à une extraction par macérations successives en utilisant un mélange d'éthanol et eau distillée (70/30) . La plante est macérée pendant 40 minutes sous agitation magnétique, à la température ambiante laboratoire et à l'abri de la lumière. Après chaque macération, une filtration sur un papier filtre afin de séparer le marc du filtrat. Les filtrats sont évaporés grâce à un évaporateur rotatif pour obtenir des extraits secs (Figure 13) (Abedin, 2015).



Figure 13 : l'appareil de rotavapeur (addiction dirkh.blogspot.com).

Le résidu sec est repris dans 100 ml d'eau distillée (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation), après une décantation de toute une nuit on récupère la phase limpide qui va subir des affrontements par des solvants de polarité croissante (Madjour, 2014).

II.5.2. Affrontements

Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation ; en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire :

- Affrontement par l'éther du pétrole.
- Affrontement par l'éther diéthylique.
- Affrontement par l'acétate d'éthyle.
- Affrontement par le butanol

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant sont agités énergiquement puis laissés au repos pendant 30 minutes, la phase aqueuse (qui est au fond de l'ampoule) et les phases chargées de molécules sont récupérées. les différentes phases récupérées (acétate d'éthyle, éther diéthylique, Butanol) sont évaporées à sec puis reprises par 10 ml du méthanol, les extraits obtenus sont ensuite séchés et stockés à une température ambiante jusqu'à leur utilisation (Figure 14) (Zeghad, 2009).

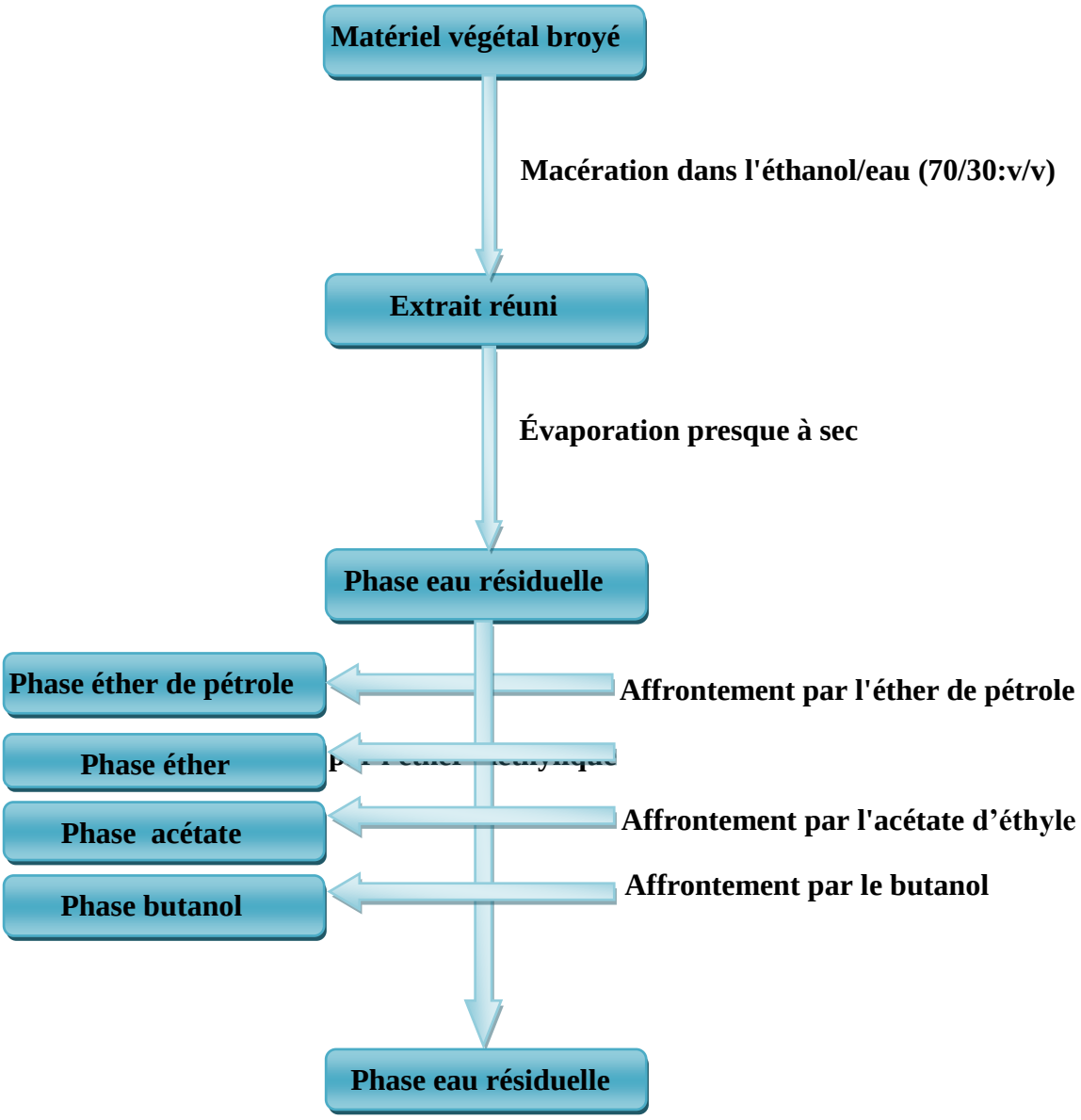


Figure 14 : Protocole d'extraction des polyphénols (Merghem *et al*., 1995).

II.6. Traitement

La méthodologie de nos tests est inspirée de la technique des tests de sensibilité normalisés par l'Organisation Mondiale de la Santé, adoptée pour tester la sensibilité des larves, vis-à-vis des insecticides utilisés en campagnes de lutte (OMS, 1963).

Les essais toxicologiques ont été réalisés à partir de l'extrait avec différentes concentrations : 12,5, 25, 50, 75 et 100 (mg/ml), à l'égard des larves de 2^{éme} stade L_2 de *Cs. Longiareolata* et de 1er stade avec différentes concentrations : 5, 10, 20, 30 (mg/ml) à l'égard des larves de 1er stade de *Culiseta longiareolata*. Le traitement, pour les séries traitées et témoins de chaque stade, sont réalisés en trois répétitions pour chaque concentrations dans des gobelets comportant chacun 25 larves nouvellement exuviées avec deux gobelets témoins négatif et positif pour chaque répétition. Chaque gobelets contient 150 ml d'eau d'élevage additionnée aux concentrations choisies du produit testé avec l'ajout de la nourriture, Après une exposition de 24h aux différentes concentrations, selon les recommandations de l'O.M.S (Djeghader, 2014).

II.7. Test de toxicité

Afin de caractériser l'effet toxicologique des polyphénols à l'égard des larves de 1er stade L_1 et larves de 2^{éme} stade L_2 de *Culiseta longiareolata*, il est nécessaire d'estimer les concentrations (CL50 et CL90). Les pourcentages de mortalités observées sont corrigés par (Abbott, 1925) lorsque le taux de mortalité des témoins est compris entre 5 et 20%.

- **Mortalité Corrigé (M.C)**

Le pourcentage de la mortalité observée chez les larves témoins et traitées de *Culiseta longiareolata* a été déterminé par la formule suivante :

$$\mathbf{M.C\%} = \frac{\mathbf{\%\ mortalité\ des\ larves\ traitées\ -\ \%mortalité\ des\ larves\ témoins}}{\mathbf{100\ -\ \%mortalité\ des\ larves\ témoins}}\ \mathbf{X\ 1OO}$$

Lorsque ce même taux dépasse 20%, le test doit être renouvelé. La formule permet d'éliminer la mortalité et de connaitre la toxicité réelle et de pesticide par l'analyse des probits (Fannay, 2008).

La méthode de (Swaroop et *al.*, 1966) précise l'intervalle de confiances avec une probabilité de 95% deux paramètres sont nécessaire :

- Le 1er paramètre est slope, noté par la forme suivante :

$$\mathbf{S = \frac{CL84/CL50 + CL50/CL16}{2}}$$

- Le 2^{éme} paramètre est FCL50 est donnée par la formule suivante :

$$\mathbf{FCL50 = S^{2.77}/\sqrt{N}.}$$

$LogFCL50 = LogS^{2.77}/\sqrt{N} = (2.77\sqrt{N}) \times S.$

FCL50 = anti log A.

N : effectif total pour les mortalités entre 16 et 84%.

Limite supérieure est égale CL50 x FCL50.

Limite inférieure CL50/FCL50.

II.8. Analyse statistique

Les résultats obtenus sont exprimés par la moyenne plus ou moins l'écart-moyen (m ± sem). L'analyse statistique des données est réalisée à l'aide du logiciel GRAPH PAD PRISM 6, et le Minitab (ANOVA1).