

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I
ECOLE NORMALE SUPERIEURE
DEPARTEMENT DE DEPARTEMENT DE
BIOLOGIE ANIMALE



REPUBLIC OF CAMEROUN

Peace – Work – Fatherland

UNIVERSITY OF YAOUNDE I
HIGHER TEACHER TRAINING COLLEGE
DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY

**EVALUATION DE L'EFFET INSECTICIDE DE L'HUILE
ESSENTIELLE DE *Clausena anisata*
SUR LES STADES DE DEVELOPPEMENT
D'*Anopheles gambiae* GILES 1902
(DIPTERA: CULICIDAE), VECTEUR DU PALUDISME**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme des professeurs de
l'enseignement secondaire deuxième grade (Di.P.E.S II)

Par :

BOBO NGOWE MANUELA PIERRE
Licencié en biologie des organismes animaux

Sous la direction
Dr. FOKO DADJI GISELE AURELIE
Chargé de cours



Année Académique
2015-2016



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire de Yaoundé I. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : biblio.centrale.uyi@gmail.com

WARNING

This document is the fruit of an intense hard work defended and accepted before a jury and made available to the entire University of Yaounde I community. All intellectual property rights are reserved to the author. This implies proper citation and referencing when using this document.

On the other hand, any unlawful act, plagiarism, unauthorized duplication will lead to Penal pursuits.

Contact: biblio.centrale.uyi@gmail.com

DEDICACE

A

Mes parents

BOBO Jean et BOBO Marie née Némoe Marie

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'édification de cette œuvre je pense :

- A l'Eternel Dieu tout puissant sans qui je n'aurai jamais pu achever ce travail ;
- Au Pr. Nicolas Gabriel ANDJIGA, Directeur de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I qui veille au bon déroulement des activités au sein de l'école ;
- Au Dr. Aurélie Gisèle FOKO DADJI épouse OKOMOLO qui ne s'est jamais ménagée pour nous pousser à tendre vers l'excellence ;
- Au Pr. Joseph Lebel TAMESSE, pour tous ses conseils et orientations pour ce travail ;
- Au Pr. Bonaventure SONKE, Chef du Département des Sciences Biologiques de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I, ainsi qu'à tous les enseignants de ce département pour la qualité de leurs enseignements ;
- Au Dr. Maximillienne NYEGUE qui nous a ouvert les portes du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour l'extraction des huiles essentielles ;
- A Mrs Henri ABE pour son soutien et ses encouragements permanents ;
- Au Dr. Victor ZOKOU pour la récolte de la plante ;
- A Audrey Lylle TCHAMGA pour son soutien et ses encouragements permanents ;
- A Anaïse MFALEU pour son aide précieuse et ses encouragements ;
- A Esther Del Florence NDEDI pour son aide et ses précieux conseils ;
- A Arnaud LONGMENE TAZO pour son aide précieuse ;
- A Joel ZEBAZE MENGUIE pour son aide pendant l'analyse statistique des résultats;
- A Fabrice Sidney Nseth pour son aide et son soutien et ses multiples encouragements ;
- A mes collaborateurs NGUIATCHUENG, AFANDA, NKENG ;
- A tous mes camarades de la 56^{ème} promotion de Biologie ;

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIERES	iii
ABSTRACT	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1. GENERALITES SUR LES ANOPHELES	5
I.1.1. Position systématique de d' <i>Anopheles gambiae</i> Giles 1902 (Diptera : Culicidae)	5
I.1.2. Différentes espèces du complexe d' <i>Anopheles gambiae</i> Giles 1902 et leur répartition géographique	6
I.1.3. Cycle biologique des anophèles.....	8
I.1.3.1. Phase aquatique ou pré-imaginale	8
I.1.3.1.1. Stade œuf ou embryonnaire	9
I.1.3.1.2. Stade larvaire et nymphal.....	9
I.1.3.2. Phase aérienne ou imaginale	10
I.1.4. Facteurs du milieu influençant le développement des anophèles	12
I.1.5. Méthodes de lutte anti-larvaire	13
I.1.6. Méthodes de lutte anti-adultes	15
I.2. GENERALITES SUR LE PALUDISME.....	15
I.2.1. Définition	15
I.2.2. Agents pathogènes du paludisme.....	16
I.2.3. Cycle biologique du parasite.....	16
I.2.4. Maladie palustre.....	19
I.2.4.1. Etude clinique du paludisme.....	19
I.2.4.2. Différents types de paludisme.....	19
I.2.5. Les différents faciès épidémiologiques du paludisme au Cameroun.....	20
I.2.6. Méthodes de lutte contre le parasite.....	20
I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES A EFFET INSECTICIDE	22
I.3.1. Définition et historique de leur utilisation	22
I.3.2. Localisation des huiles essentielles.....	22
I.3.3. Rôle des huiles essentielles.....	23
I.3.3.1. Dans les plantes qui en produisent.....	23

I.3.3.2. Sur les insectes : activité insecticide	23
I.3.4. Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles	23
I.4. GÉNÉRALITÉS SUR <i>Clausena anisata</i> (Rutaceae)	24
I.4.1. Position systématique de <i>Clausena anisata</i>	24
I.4.2. Présentation et description botanique	25
I.4.3. Activité pharmacologique et autres usages	26
I.4.4. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Clausena anisata</i>	27
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	28
II.1. MATERIEL	29
II.1.1. Cadre d'étude	29
II.1.2. Matériel biologique	29
II.1.3. Matériel technique	29
II.2. METHODES	30
II.2.2. Extraction de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	32
II.2.3. Bio-efficacité de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> vis-à-vis des œufs, larves et adultes d' <i>Anopheles gambiae</i>	33
II.2.3.1. Cas des stades pré-imaginaux	33
II.2.3.1.1. Préparation des solutions expérimentales pour les œufs, les larves de stade 3 et 4	33
II.2.3.1.2. Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les œufs	34
II.2.3.1.3. Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les larves de stade 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	35
II.2.3.2. cas des adultes	36
II.2.3.2.1. Préparation des différentes solutions pour les tests sur les adultes	36
II.2.3.2.2. Protocole de test pour les adultes femelles d' <i>Anopheles gambiae</i>	37
II.2.3.2.3. Interprétation des taux de mortalité selon l'OMS	38
II.2.4. Analyses statistiques	39
III.1. RESULTATS	41
III.1.1. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	41
III.1.2. Effet insecticide de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur les stades pré-imaginaux d' <i>Anopheles gambiae</i>	41
III.1.2.1. Effet ovicide de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur <i>Anopheles gambiae</i>	41
III.1.2.2. Effet larvicide de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur les larves de stade 3 d' <i>Anopheles gambiae</i>	43
III.1.2.3. Effet larvicide de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur les larves de stade 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	45
III.1.2.4. CL ₁₀ , CL ₅₀ et CL ₉₀ des stades 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	46
III.1.3. Effet adulticide de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	48
III.1.3.1. Effet knockdown et mortalité des femelles adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> après exposition à l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	48

III.1.3.2. Temps de knockdown (tkd ₅₀ et tkd ₉₀)	50
III.1.3.3. Interprétation de la mortalité des femelles adultes d' <i>Anopheles gambiae</i> sous l'effet de huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> au bout de 24h d'observation	50
III.2. DISCUSSION	51
CHAPITRE IV : INTERET DIDACTIQUE.....	54
IV.1. DEFINITION DES CONCEPTS	55
IV.2. INTERET PEDAGOGIQUE ET DIDACTIQUE.....	55
IV.2.2. Intérêt pédagogique et didactique	55
IV.2.3. Fiche pédagogique de préparation d'une leçon de S.V.T.	55
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	63

ABSTRACT

Malaria is a serious health problem in many African countries. The *Anopheles gambiae* mosquito which is the major vector of this disease has developed resistance against synthetic insecticides such as pyrethrinoids. Essential oil may be an alternative to synthetic insecticides because of their efficacy and safety. In this work ovicidal, larvicidal and adulticidal activities of leaf essential oil from *Clausena anisata* were evaluated against *Anopheles gambiae*. The essential oil were extracted by hydrodistillation using clevenger apparatus. Adults mosquitoes were collected from OCEAC and were reared in the insectarium of the Laboratory of Zoology of Higher Teacher Training School of Yaounde.

Eggs, third and fourth instars larvae and adults of *Anopheles gambiae* were exposed to the essential oil and were assayed in the laboratory by using the protocol of WHO (2005). The essential oil was tested at 0.833 %, 0.579 %, 0.694 %, 0.482 %, 0.401 %, 0.333 %, 0.278 %, 0.232 % and 0.194% for egg and larvae while tested at 2 %, 1.5 %, 1 % and 0.5 % for adults mosquitoes. The 72 h LC₅₀ and LC₉₀ values of *Clausena anisata* were determined for third and fourth instars larvae following probit analysis. The tkd₅₀ and tkd₉₀ were also determined. The essential oil yield was 0.242 %. This oil extracted from the leaves of *Clausena anisata* exhibited significant ovicidal, larvicidal and adulticidal activities. *Clausena anisata* essential oil has a significant effect on the egg of *Anopheles gambiae* with 1 % of eclosion at 0.833 % concentration. 72 h CL₅₀ and CL₉₀ values were 0.444% and 0.608 %; 0.427 % and 0.668 % respectively for third and the fourth instar larvae with 100% mortality at 0.833 %. The tkd₅₀ and tkd₉₀ values were 1.932; 18.589; 51.02; > 60 and 14.603; > 60 ; > 60 ; > 60 respectively at 2 %, 1.5 %, 1 % and 0.5 % with 100 % mortality after 24 h at 2 % for the adults of *Anopheles gambiae*.

The essential oil of *Clausena anisata* has remarkable ovicidal, larvicidal and adulticidal activities which may be considered as sources for the production of natural biocides.

Keywords: *Anopheles gambiae*, *Clausena anisata*, ovicidal, larvicidal, adulticidal.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT :	Artemisinin-base Combination Therapy
E :	Est
FCFA :	Franc des Colonies Françaises en Afrique
HE:	huile essentielle
kd:	knockdown
Log :	Logarithme
Minsanté :	Ministère de la Santé Publique
N :	Nord
OCEAC :	Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PNLP :	Programme National de Lutte contre le Paludisme
ppm :	parti par million
R :	Rendement
SP :	Sulfadoxine-Pyriméthane
SVT:	Science de la Vie et de la Terre
TDR :	Test de Dépistage Rapide
tkd :	temps de knockdown
TPI :	Traitement Préventif Intermitant
WHO:	World Health Organisation

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution des espèces du complexe <i>Anopheles gambiae</i> en Afrique (Ayala & Coluzzi 2005).....	7
Figure 2. Répartition des vecteurs au Cameroun (Reffet 2002).....	8
Figure 3. Œuf d'Anophèles A, grappe d'œuf d'Anophèles ; B, œuf d'Anophèles (Mouchet & Carnevale 1991).....	9
Figure 4. A, Larve d'anophèle ; B, Nymphe d'anophèle (Carnevale <i>et al.</i> 2009)	10
Figure 5. Anophèle femelle (à gauche) et mâle (à droite) en position de repos (Carnevale <i>et al.</i> 2009)	11
Figure 6. Cycle de développement des Anophèles (Mouchet <i>et al.</i> 2004).....	12
Figure 7. Cycles évolutifs des <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium malariae</i> , <i>Plasmodium ovale</i> et <i>Plasmodium vivax</i> (OMS 2009).....	18
Figure 8. Carte de la lutte contre le paludisme en 2012 (OMS 2012).....	21
Figure 9. <i>Clausena anisata</i> (Kémeuzé <i>et al.</i> 2008).....	26
Figure 10. Etapes de l'élevage d' <i>Anopheles gambiae</i> au laboratoire A, cage contenant les adultes ; B, gorgement des moustiques à l'aide du sang de lapin ; C, pondoir contenant les œufs ; D, dispositif d'élevage des larves ; E, nymphe.	31
Figure 11. Dispositif et quelques étapes de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de <i>Clausena anisata</i> A, feuilles séchés de <i>Clausena anisata</i> ; B, extraction de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> par hydrodistillation ; C, pesage de l'huile.	33
Figure 12. Dispositif des tests pour le stade œuf A, papier filtre contenant les œufs matures ; B, dénombrement des œufs d' <i>Anopheles gambiae</i> ; C, introduction de 1mL de chaque solution ; D, dispositif d'observation.	35
Figure 13. Dispositif de test pour les stades 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i> A, dénombrement des larves ; B, préparation des solutions expérimentales ; C, dispositif d'observation.	36
Figure 14. Dispositif expérimental de test pour le stade adulte A, imprégnation des tulle moustiquaires ; B, séchage des tulle ; C, dispositif de test en cône de l'OMS ; D, prélèvement des moustiquaires (femelles) ; E, transfert dans les cônes OMS ; F, dénombrement des morts après 24heures d'observation.....	38
Figure 15. Variation du taux d'éclosion des œufs d' <i>Anopheles gambiae</i> après exposition à l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	43
Figure 16. Variation du taux de mortalité des larves de stade 3 après exposition à l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	44

Figure 17. Variation du taux de mortalité des larves de stade 4 après exposition à l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	46
Figure 18. Courbe des CL 10, 50 et 90 de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur les larves de stades 3 d' <i>Anopheles gambiae</i>	46
Figure 19. Courbe des CL 10, 50 et 90 de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> sur les larves de stades 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	47
Figure 20. Variation des taux de knockdown d' <i>Anopheles gambiae</i> suite à l'exposition de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de <i>Clausena anisata</i> (Marimuthu 2014)	27
Tableau 2 . Données de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de <i>Clausena anisata</i> .	41
Tableau 3. Taux d'éclosion des œufs matures d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).	42
Tableau 4. Taux de mortalité des larves de stade 3 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$)	44
Tableau 5. Taux de mortalité des larves de stade 4 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$)	45
Tableau 6. CL ₁₀ , CL ₅₀ et CL ₉₀ de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i> au bout de 72h d'exposition des larves de stade 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	47
Tableau 7. Taux de knockdown et de mortalité des adultes femelles d' <i>Anopheles gambiae</i> sous l'effet de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	49
Tableau 8. tkd ₅₀ et tkd ₉₀ des larves de stade 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i> vis-à-vis des différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Clausena anisata</i>	50
Tableau 9. Mortalité des femelles d' <i>Anopheles gambiae</i> obtenue après 24h d'exposition ..	51

INTRODUCTION

Plusieurs maladies transmises par les moustiques gangrènent la vie des hommes à travers le monde et particulièrement en Afrique où elles créent de multiples décès. Parmi ces maladies, le paludisme est causé par des parasites du genre *Plasmodium* et transmis par des moustiques femelles du genre *Anopheles* (OMS 2015). *Anopheles gambiae* est l'un des vecteurs majeurs responsables de la transmission du paludisme au Cameroun (Foko *et al.* 2007, Ombito *et al.* 2014). Le paludisme demeure donc de ce fait un problème majeur de santé publique causant 90% de décès en Afrique (OMS 2015).

Au Cameroun, le paludisme représente 31 % des consultations toutes causes confondues et 44% de toutes les hospitalisations. Il est la cause de 18 % de décès survenant dans les formations sanitaires du pays. Les femmes enceintes et les enfants de moins de 05ans sont les plus vulnérables où 41 % des décès des enfants de moins de 05 ans sont liés au paludisme (PNLP 2012). Sur le plan économique, les pouvoirs publics camerounais dépensent deux à trois milliards de francs CFA par an pour lutter contre cette maladie (Minsanté 2011). Le paludisme apparaît de ce fait comme l'un des principaux freins à l'émergence dont le Cameroun a pour objectif d'atteindre à l'horizon 2035.

Le gouvernement camerounais renforcé par de nombreuses organisations a mis sur pieds plusieurs méthodes pour diminuer l'incidence de cette maladie parmi lesquelles la distribution des Moustiquaires Imprégnées à Longues Durée d'Action (MILDA) en 2011, la sensibilisation des populations pour l'éradication des gîtes larvaires, l'utilisation des insecticides intradomiciliaires et la mise en place de nouveaux traitements contre les Plasmodiums. Cependant, bien que cet arsenal de mesures ait permis d'enregistrer des résultats encourageant sur le terrain, de nombreux obstacles s'opposent aux efforts de la communauté scientifique à contrôler la malaria, à savoir : la recrudescence de la résistance du *Plasmodium* aux antipaludéens traditionnellement utilisés pour l'action curative des malades (Ombito *et al.* 2014); la résistance des moustiques aux insecticides (Marimuthu 2010); les conditions d'hygiène dans nos grandes villes qui favorisent le contact homme/moustique et les problèmes économiques (Tchoumboungang *et al.* 2008).

En effet, les principes actifs des insecticides synthétiques utilisés pour la lutte anti-vectorielle appartiennent aux organophosphorés, pyréthrinoïdes et aux carbamates de synthèse. Ces substances, bien qu'elles se soient très efficaces sur les moustiques Culicidés, présentent plusieurs inconvénients parmi lesquels la résistance des moustiques. En plus de leur coût élevé, elles sont à l'origine de divers problèmes environnementaux (Ombito *et*

al. 2014), et il en résulte la contamination de l'eau de l'air et du sol (Marimuthu 2010). Ainsi, il y a un intérêt renouvelé à l'exploration et l'utilisation des produits des plantes avec des propriétés insecticides pour le contrôle des moustiques afin de palier à ces problèmes de résistance et de pollution (Ombito *et al.* 2014). Ces biopesticides en étant actifs sont biodégradables (Tchoumboungang *et al.* 2008). A ce jour, de nombreux travaux mettant en exergue l'activité insecticide de certaines espèces de plantes issues de la pharmacopée camerounaise ont été réalisés (Foko *et al.* 2007, Tchoumbougang *et al.* 2008, Foko *et al.* 2011, Akono *et al.* 2012). Pourtant, selon plusieurs auteurs, les propriétés insecticides d'une plante sont mieux exprimées sous forme d'Huile Essentielle (Ndomo *et al.* 2009). C'est ainsi qu'au Cameroun, Teugwa *et al.* (2002 : 4) ont démontré l'effet insecticide de l'extrait de *Clausena anisata* sur le parasite du Nyébé (*Vigna unguiculata*). *Clausena anisata* est la seule représentante de la tribu des *Clauseneae* retrouvée en Afrique. En effet son Huile Essentielle étant riche en des molécules telles que l'Anéthole, l'Estragole, le Limolème, le Linalool, dont les propriétés insecticides sont reconnues (Usman *et al.* 2010) fait de cette plante un nouvel espoir dans la lutte biologique contre les moustiques. Au Cameroun, aucun travail relatif à l'utilisation de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur *Anopheles gambiae* n'a été mené.

La présente étude a pour objectif général l'évaluation de l'effet insecticide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les stades de développement d'*Anopheles gambiae*.

Plus spécifiquement, il s'agit dans un premier temps d'évaluer la sensibilité des œufs, des larves de stade 3 et de stade 4 d'*Anopheles gambiae* à l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*, dans un second temps d'évaluer la sensibilité des adultes femelles d'*Anopheles gambiae* vis-à-vis de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*.

Ce mémoire s'articule autour de 4 chapitres dont le chapitre I est consacré à la revue de la littérature, le chapitre II aux matériel et méthodes, le chapitre III à la présentation des résultats et à la discussion, et le chapitre IV à l'intérêt didactique et pédagogique. L'ensemble des chapitres ont été précédés par une introduction et se terminent par une conclusion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. GENERALITES SUR LES ANOPHELES

Les moustiques (Diptères : Culicidés) du genre *Anopheles* sont les principaux agents responsables de la transmission du paludisme (Vinayagam *et al.* 2008). Sur plus de 400 espèces étudiées, seules une trentaine transmettent de manière significative les espèces de *plasmodiums* pathogènes à l'Homme (Vinayagam *et al.* 2008). Parmi les *Anopheles*, *Anopheles gambiae* est l'un des vecteurs majeurs responsable de la transmission de la maladie en Afrique tropicale (Foko *et al.* 2007).

I.1.1. Position systématique d'*Anopheles gambiae* Giles 1902 (Diptera : Culicidae)

La position systématique des anophèles, d'après Gillot (2005) et Harbach (2004), est la suivante:

Règne Animal

Embranchement des Arthropoda Siebold et Stannius 1845 :

- Corps recouvert d'une cuticule chitineuse ;
- présence d'une symétrie bilatérale ;
- présence d'appendices articulés.

Sous-embranchement des Antennata :

- Capsule céphalique bien individualisée ;
- tête portant une paire d'antennes et une paire de mandibules.

Super classe des Hexapoda :

- Corps divisé en 3 tagmes : tête-thorax-abdomen ;
- pièces buccales visibles à l'extérieur ;
- présence de l'organe de Johnston sur le scape antennaire.

Classe des Ectognatha :

- Tarses plurisegmenté ;
- pièces buccales visibles à l'extérieur.

Sous-classe des Ptérygota :

- Présence d'ailes au moins à un stade de leur développement post-embryonnaire.

Section des Oligonéoptères :

- Champ jugal avec une seule nervure longitudinale simple.

Ordre des Diptères Linné 1758 :

- Présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers ;
- pièces buccales de type piqueur-suceur.

-

Sous-ordre des Nématocères Latreille 1825 :

- Antennes longues et multiarticulées ;
- pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse.

Famille des Culicidae Latreille 1825 :

- Corps recouvert d'écailles filiformes ;
- bord postérieur des ailes frangé d'écailles.

Sous-famille des Anophelinae Theobald 1905 :

- Trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête ;
- scutellum régulièrement courbé au bord postérieur.

Tribu des Anophelini Belkin 1962.

Genre *Anopheles* Meigen 1918 :

- Taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa ;
- présence ou non de touffes latérales de poils sur l'abdomen.

Espèce *Anopheles gambiae* Giles 1902 :

- Costa avec 5 taches pâles dont 2 basales ;
- fémurs et tibias antérieurs largement tachetés.

I.1.2. Différentes espèces du complexe d'*Anopheles gambiae* Giles 1902 et leur répartition géographique

Le complexe *Anopheles gambiae* est constitué de 08 espèces morphologiquement très semblables et ayant des caractéristiques écologiques et génétiques différentes. On distingue ainsi : *Anopheles arabiensis* Patton 1904 ; *Anopheles bwambae* White 1985 ; *Anopheles gambiae* Giles 1902 ; *Anopheles melas* Theobald 1903 ; *Anopheles merus* Dönitz 1902 ; *Anopheles quadriannulatus* Theobald 1911 ; *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 et *Anopheles amharicus* Hunt & Wilkerson 2013.

Les différents membres de ce complexe peuvent être caractérisés grâce à l'étude du polymorphisme des chromosomes polythènes par la technique cytogénétique (Fontenille *et al.* 2003). *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* ont une aire de répartition extrêmement vaste sur tout le continent Africain, *Anopheles gambiae* étant plutôt adapté aux zones de forêt et de savane humide alors que *Anopheles arabiensis* peuple les environnements secs jusqu'en bordure du sahara (Coetzee *et al.* 2000). *Anopheles arabiensis* est l'une des espèces du complexe la plus largement répandue en Afrique sub-saharienne ainsi qu'à Madagascar (Coetzee *et al.* 2000) (figure 1).

Anopheles melas et *Anopheles Merus* sont toutes deux des espèces ayant développé une tolérance aux eaux salées ou saumâtres. *Anopheles melas* est ainsi retrouvé le long du golf de Guinée, sur la côte ouest de l'Afrique du nord, du Sénégal à l'Angola. *Anopheles merus* est uniquement présent vers la côte-est du sud somalien au nord-est de l'Afrique du Sud. *Anopheles quadriannulatus* est retrouvé en Afrique orientale, tandis qu'*Anopheles bwambiae* présente une distribution très réduite, vers la frontière ouest de l'Ouganda (figure 1).

Au Cameroun, le complexe *Anopheles gambiae* joue un rôle clé dans la transmission du paludisme et est constitué de 4 espèces jumelles : *Anopheles gambiae*, *Anopheles coluzzii*, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles melas* (Hervy et al. 1998, Fontenille et al. 2000). *Anopheles melas* présente uniquement dans la côte, n'a cependant pas été retrouvée infectée au Cameroun bien qu'elle assure ailleurs en Afrique, la transmission du paludisme (Reffet 2002).

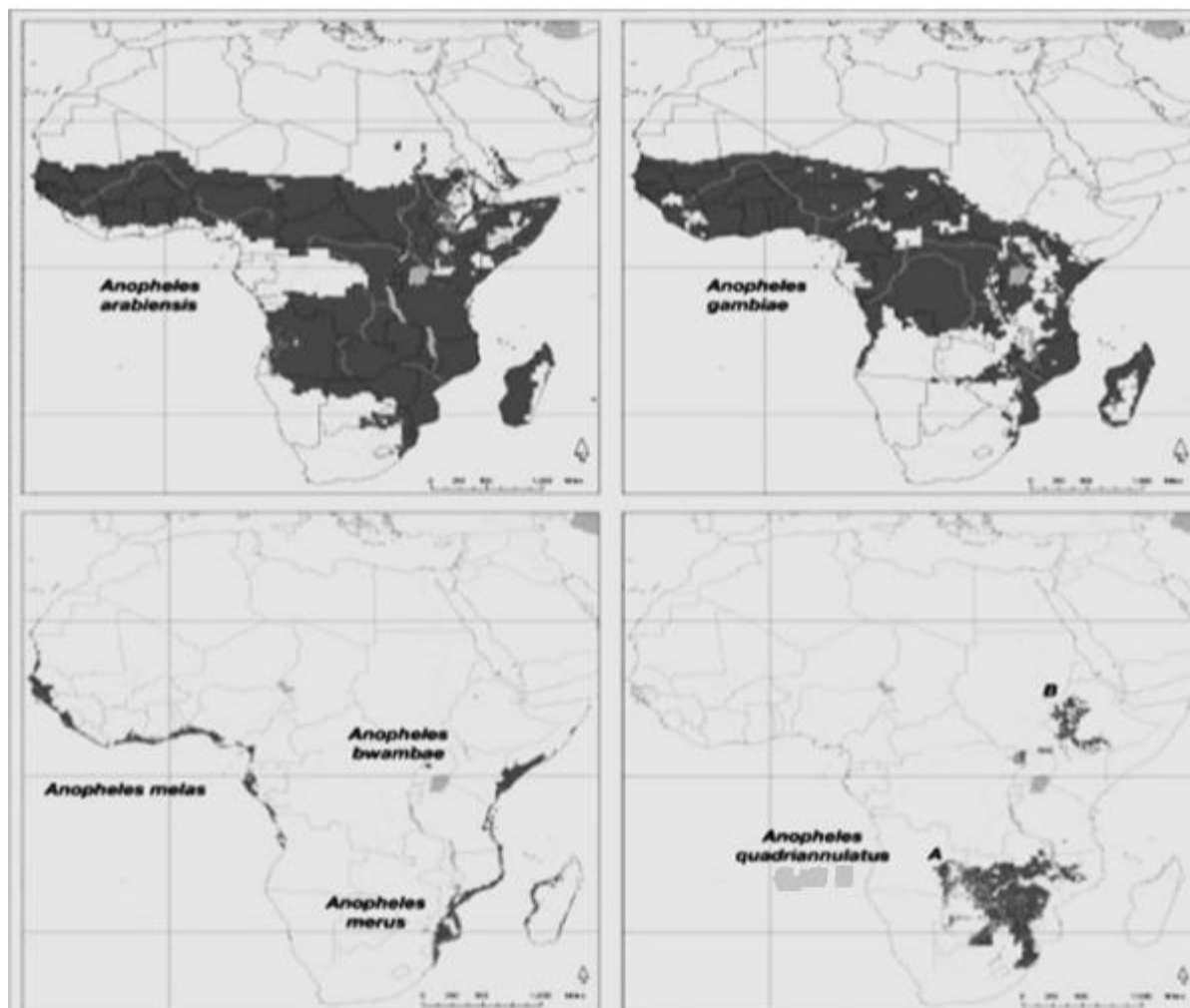


Figure 1. Distribution des espèces du complexe *Anopheles gambiae* en Afrique (Ayala & Coluzzi 2005)

La répartition des anophèles au Cameroun faite par Antonio-Nkondjio *et al.* (2006) est représentée sur la figure2.

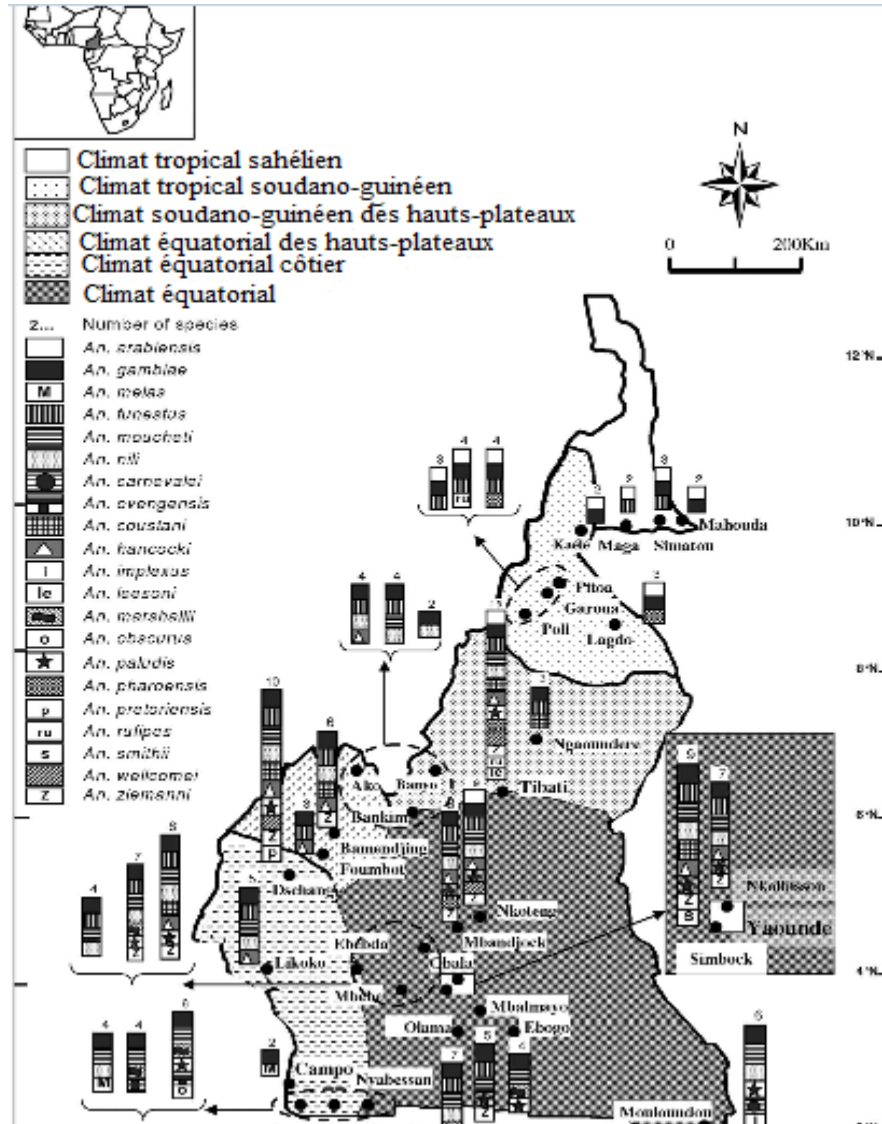


Figure 2. Répartition des anophèles au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.* 2006)

I.1.3. Cycle biologique des anophèles

Le cycle biologique des anophèles comprend deux phases : la phase aquatique ou pré-imaginale et la phase aérienne ou imaginale (Mouchet *et al.* 2004).

I.1.3.1. Phase aquatique ou pré-imaginale

L'œuf, la larve et la nymphe constituent les stades successifs du développement aquatique ou pré-imaginal des anophèles (OMS 2009). La durée du cycle pré-imaginal est d'une à deux semaines selon les espèces et les conditions écologiques, ceci après l'oviposition ou ponte des œufs isolés par les femelles pendant le vol ou à la surface de l'eau (Carnevale *et al.* 2009). La durée du cycle aquatique est fonction des caractéristiques du

Evaluation de l'Effet Insecticide de l'Huile Essentielle de *Clausena anisata* sur les Stades de Développement d'*Anopheles gambiae*, Giles 1902 (Diptera : Culicidae), Vecteur du Paludisme

milieu ambiant telles que : la température, l'alimentation, la composition physicochimique du milieu (Foko *et al.* 2007).

I.1.3.1.1. Stade œuf ou embryonnaire

L'œuf est de forme allongée et mesure environ 0,5 mm de longueur. Il est de couleur blanche lorsqu'il est pondu, puis brunit par la suite. Cet œuf possède généralement deux flotteurs latéraux (lui permettant de rester à la surface de l'eau) (figure 3B) et trois membranes dont la première, interne entoure le vitellus et l'embryon; la deuxième, intermédiaire appelée endochorion durcit peu après la ponte et se colore en brun foncé et la troisième, la plus externe est l'exochorion qui présente différentes ornements (Carnevale *et al.* 2009). Les moustiques femelles pondent entre 30 et 300 œufs à chaque ponte selon l'espèce (OMS 1999) (figure 2A). Les œufs sont pondus un à un et flottent à la surface de l'eau. Sous les tropiques, les œufs éclosent en 2 ou 3 jours (Fouet 2010). Les œufs ne peuvent pas résister à la dessiccation complète, mais peuvent survivre quelques jours dans la boue humide. L'éclosion survient 36 à 48 heures après la ponte (Mouchet & Carnevale 1991).

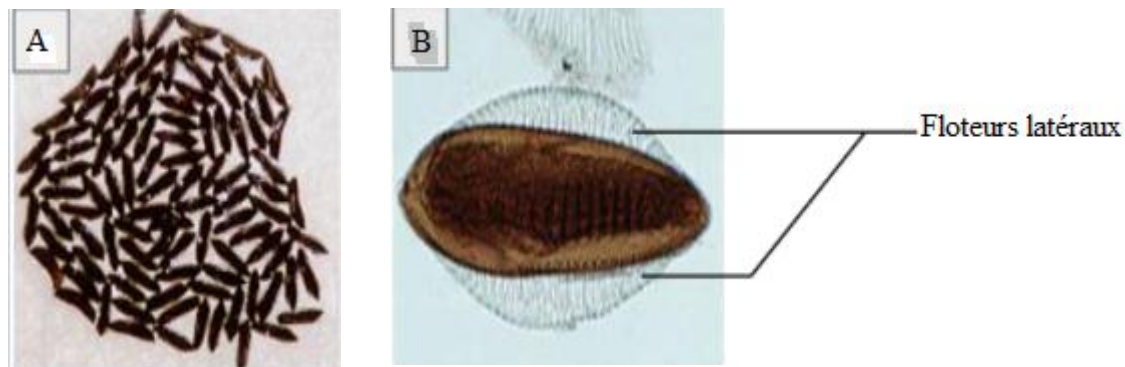


Figure 3. Œuf d'Anophèles A, grappe d'œuf d'Anophèles ; B, œuf d'Anophèles (Mouchet & Carnevale 1991)

I.1.3.1.2. Stade larvaire et nymphal

A l'éclosion des œufs, les larves apodes d'anophèles se différencient des autres larves d'insectes du fait de la présence d'un thorax relativement renflé latéralement et plus large que la tête et l'abdomen (OMS 2003) (figure 4A). Elles se nourrissent le plus souvent en surface, essentiellement de matières organiques, de microorganismes et parfois des proies vivantes (Carnevale *et al.* 2009). Au cours de son développement, la larve subit trois mues et passe ainsi par 4 stades larvaires morphologiquement comparables mais de taille différentes dénommés successivement L1, L2, L3 et L4 (Fouet 2010, OMS 2003). La mue qui survient entre chaque stade permet l'accroissement en taille de la larve. Ainsi la larve d'anophèle, au

stade L1 mesure environ 1 à 2 mm tandis qu'au stade L4, elle mesure entre 12 et 15 mm de longueur (Carnevale *et al.* 2009).

A la fin du stade larvaire survient une mue particulière appelée nymphose. Ce stade présente 04 caractéristiques : elle est remarquable par la coalescence de la tête et du thorax qui forment un céphalothorax (volumineux auquel fait suite un abdomen de 10 segments (Chabasse *et al.* 2007, Fouet 2010); elle est mobile grâce à des contractions brusques de son abdomen ; elle a une respiration aérienne et elle ne s'alimente pas (Carnevale *et al.* 2009). La nymphe ou pupa a une forme de virgule (figure 4B). C'est pendant cette phase qu'a lieu des transformations profondes d'organes internes où l'insecte perd les organes larvaires caractéristiques et où se développe les organes adultes tels que les pattes, les antennes, les ailes, les organes piqueurs. L'émergence qui s'effectue par fracture de son exuvie nymphale représente une phase délicate de la vie de l'insecte car beaucoup meurent par noyade (Chabasse *et al.* 2007).

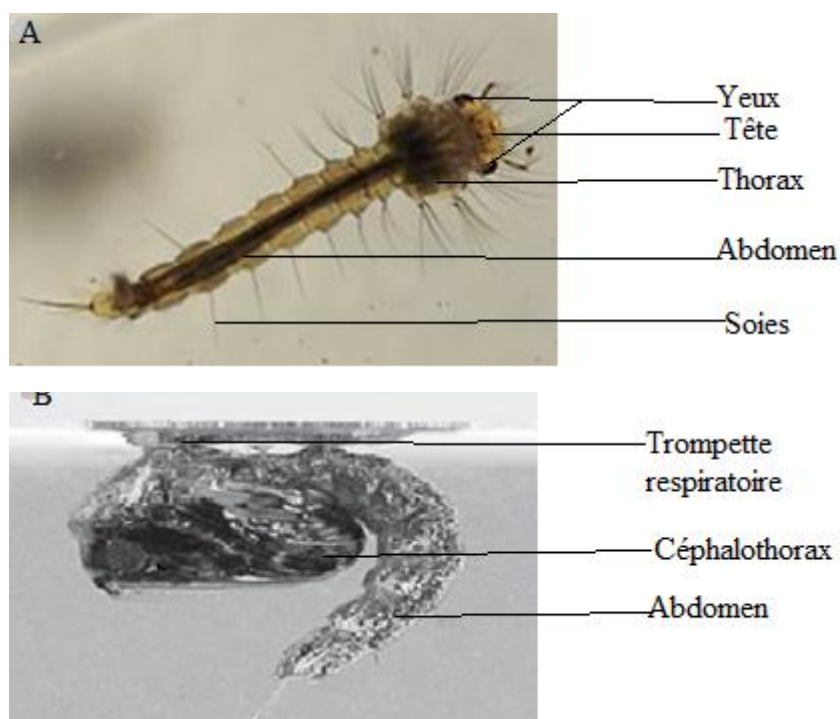


Figure 4. A, Larve d'anophèle ; B, Nymphe d'anophèle (Carnevale *et al.* 2009)

I.1.3.2. Phase aérienne ou imaginale

Contrairement aux stades pré imaginaux qui vivent en milieu aquatique, l'imago issu de la nymphe évolue en milieu aérien (Mouchet *et al.* 2004). Au cours de l'émergence de l'adulte, la nymphe mûre se positionne juste sous la surface de l'eau, ensuite une suture ecdysiale située sur la face dorsale du thorax se fend longitudinalement et laisse sortir

l'adulte hors de l'exuvie nymphale et donc hors de l'eau, ceci en quelques minutes (Chabasse *et al.* 2007). Les adultes femelles s'alimentent de jus sucré et de sang contrairement aux mâles qui ne s'alimentent que de jus sucré (Carnevale *et al.* 2009, Fouet 2010). En effet, c'est lors du repas sanguin que la femelle peut ingérer et ou transmettre le parasite (Fouet 2010). Le corps du moustique est constitué de 3 tagmes distincts : tête, thorax et abdomen (Mouchet *et al.* 2004).

La tête : est spécialisée pour acquérir l'information sensorielle et pour l'alimentation contient des yeux composés et une paire d'antenne qui permet la distinction entre le mâle et la femelle. Les antennes des mâles sont pulpeuses, perçoivent des sons et font vibrer les poils très fins qui les garnissent et qui détectent la fréquence des battements d'ailes des femelles (antennes plumeuses). Les soies des antennes des femelles sont courtes et peu nombreuses (antennes glabres), elles servent à détecter l'odeur ce qui permet aux moustiques de détecter leurs prochaines victimes (Carnevale *et al.* 2009) (figure 5).

Le thorax : est spécialisé dans la locomotion comprend trois paires de pattes uniramées, une paire d'ailes nervurée rattachées au mésothorax et servent au vol et une paire d'haltères ou balanciers attachées au métathorax qui aide l'animal à s'équilibrer pendant le vol (Carnevale *et al.* 2009 ; Chabasse *et al.* 2007).

L'abdomen : qui contient le cœur et l'autre partie des stigmates est spécialisé dans la reproduction et la digestion (Chabasse *et al.* 2007).



Figure 5. Anophèle femelle (à gauche) et mâle (à droite) en position de repos (Carnevale *et al.* 2009)

Le cycle de développement des anophèles est représenté sur la figure 6.

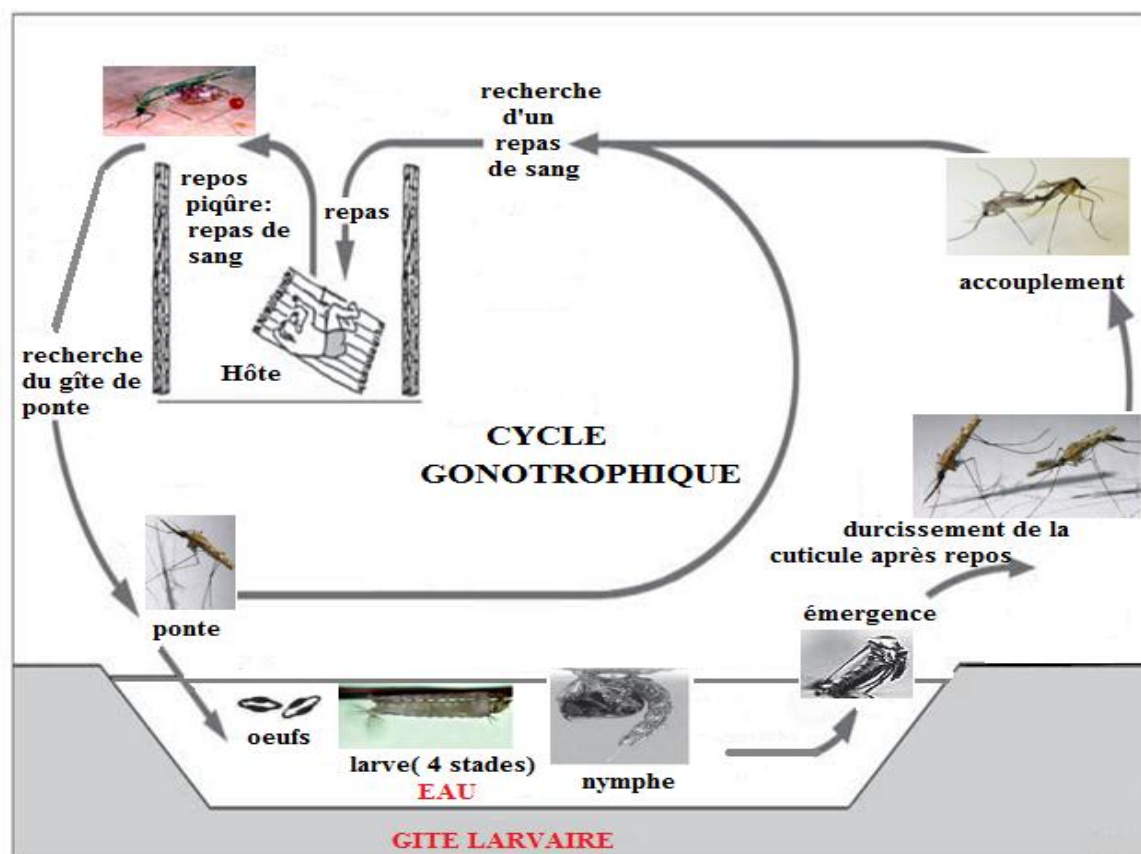


Figure 6. Cycle de développement des Anophèles (Mouchet *et al.* 2004)

I.1.4. Facteurs du milieu influençant le développement des anophèles

Chaque espèce a sa propre écologie : les espèces du genre *Anopheles* préfèrent une eau bien limpide, peu profonde et ensoleillée, tant dis que le genre *Culex* et le genre *Aedes* préfèrent les eaux à l'ombre, plus ou moins troubles et chargées en matières organiques (Carnevale *et al.* 2009). Plusieurs facteurs favorisent le développement des Anophèles parmi lesquels :

- **L'environnement** : qui a un effet sur la survie et le comportement des anophèles, mais certaines espèces sont mieux adaptées que d'autres aux conditions extrêmes. Parmi les conditions de l'environnement, nous pouvons citer :

La diapause : dans les zones de climat tempéré, les femelles d'anophèles sont en général en mesure de faire des réserves de graisse et d'entrer dans un état de vie suspendue (diapause ou hibernation) immédiatement après l'accouplement au cours de l'hiver. Elles hibernent dans une variété d'abris, souvent dans des granges ou des étables prenant de temps en temps un repas sanguin (Carnevale *et al.* 2009) ;

l'estivation : les femelles de certaines espèces d'anophèles peuvent survivre pendant les périodes de chaleur ou de sècheresse intense au Soudan, ceci explique la rapide répartition des moustiques au début de la saison de pluie suivante (Impact malaria 2008) ;

la température : c'est le facteur le plus important de la transmission du paludisme dans les pays tropicaux (OMS 2015). La température externe affecte la durée du cycle trophogonique et du cycle sporogonique du parasite (Impact malaria 2008). En d'autres termes, plus la température est basse, plus le parasite met du temps à compléter sa maturation, moins il y'a de chance pour que le moustique transmette l'infection ;

l'altitude : c'est également un facteur important car liée à la température. Par ailleurs, plus l'altitude est élevée, plus la température est basse (Impact malaria 2008) ;

l'humidité : les conditions microclimatiques, particulièrement l'humidité, affectent l'entrée des moustiques dans les maisons. Les moustiques sont les plus susceptibles de piquer dehors pendant la saison sèche que pendant la saison de pluie. Il existe de nombreux exemples de l'effet que des changements de microclimat peuvent avoir sur le comportement piqueur ou le comportement de repos des femelles (OMS 2015).

- **comportements humains** : les facteurs environnementaux les plus importants dans la définition de la niche écologique des moustiques du complexe *Anopheles gambiae* sont des variables caractérisant le niveau d'anthropisation du milieu : c'est l'Homme qui par son action anthropique sur le milieu (déforestation en zone équatoriale, irrigation en zone sahéenne) aménage une niche écologique favorable pour le développement des Anophèles. Au stade aquatique les moustiques du complexe *Anopheles gambiae* affectionnent les collections d'eau claires et ensoleillées (Lekel *et al.* 2010, Carnevale *et al.* 2009). En défrichant la zone équatoriale et en irrigant la zone aride, l'Homme crée des gîtes de prédilection de ces vecteurs. Les femelles adultes qui émergent de ces gîtes larvaires trouvent alors, à proximité immédiate de leur lieu de naissance et à profusion, la nourriture qu'ils préfèrent : le sang humain, nécessaire à la maturation des œufs ;

- **densité des populations** : influence la transmission du paludisme car plus la population est grande, plus la densité des moustiques sera grande (Lekel *et al.* 2010).

I.1.5. Méthodes de lutte anti-larvaire

La lutte anti-vectorielle contre le paludisme visant à faire reculer cette maladie à travers le monde, est orientée contre les stades de développement des moustiques (OMS, 2012).

Ainsi il existe les méthodes physiques ou écologiques, les méthodes chimiques, les méthodes biologiques :

- **Les méthodes physiques ou écologiques** : visent à aménager l'environnement de manière à le rendre défavorable au développement ou à la survie des vecteurs. Le principal moyen de lutte écologique contre les anophèles vecteurs consiste à supprimer les gîtes larvaires potentiels par drainage, comblement ou amélioration de l'évacuation des eaux de pluie (Rodhain & Perez 1985, Keiser & Utzinger 2005). Ces actions permettent de réduire la transmission palustre locale (Gu 2009). Cette réduction résulte de la moindre disponibilité de sites de ponte entraînant probablement une augmentation de la durée du cycle trophogonique, accompagnée d'une baisse du taux de survie des vecteurs (Killeen *et al.* 2001, Gu *et al.* 2006). Les méthodes de cultures irriguées peuvent également être définies de manière à limiter les possibilités de développement des vecteurs, principalement par l'aménagement, l'entretien, le nettoyage des canaux, et l'assèchement périodique des parcelles (Mutero *et al.* 2000, Keiser *et al.* 2005) ;

- **les méthodes chimiques** : utilisent les propriétés de nombreuses substances synthétiques permettant d'affecter, de repousser ou de tuer les vecteurs. Il existe un grand nombre de produits et de modes d'utilisation. Cependant le but recherché est toujours l'action efficace, rapide et persistante sur les vecteurs visés, tout en présentant le moins d'effets possibles sur l'Homme et les organismes non-cibles (Rodhain & Perez 1985). Les principaux composés synthétiques utilisés appartiennent aux groupes des organochlorés (DDT, dieldrine), des organophosphorés (malathion, fenitrothion, téméphos, chlorpyrifos), des carbamates (propoxur) et des pyréthrinoïdes (perméthrine, deltaméthrine, lambda-cyhalothrine, alpha-cyperméthrine, bifenthrine). Ces produits peuvent être utilisés directement dans l'environnement (naturel comme domestique) sous différentes formulations (suspension, poudre mouillable, émulsion, tablette, microcapsule, etc...). En revanche, seuls les pyréthrinoïdes sont autorisés en imprégnation de moustiquaires (WHO 2007) ;

- **les méthodes biologiques** : utilisent des organismes vivants et des virus capables d'affecter les populations d'arthropodes visés. Ce type de lutte a été envisagé dès la fin du 19^{ème} siècle, puis délaissé avec l'apparition des insecticides synthétiques dans les années 1940 (Legner 1995). Un grand nombre d'organismes prédateurs ou pathogènes d'arthropodes sont connus, mais leur utilisation dans la lutte contre les vecteurs d'importance médicale est relativement réduite. Certaines espèces de poissons culiciphages présentent un intérêt potentiel dans la lutte contre les larves d'anophèles (Rodhain & Perez 1985, Legner 1995). C'est ainsi que les poissons larvivores comme *Gambusia affinis* ont été largement utilisés en Inde, notamment en zone rizicole, contre *Anopheles culicifacies s.l.*, *Anopheles annularis*, *Anopheles subpictus*, *Anopheles nigerrimus*, procurant une réduction de 88 % de la

population larvaire. Des organismes pathogènes peuvent également permettre de lutter contre les populations de moustiques adultes ;

- **les méthodes génétiques** préconisent l'utilisation de mâles stériles entrant en compétition avec les mâles sauvages fertiles. Ceci permet de réduire la fécondité des femelles sauvages. La lutte génétique repose aussi sur la manipulation génétique de vecteurs dans le but de créer des souches réfractaires à l'infection (Boëte & Koella 2003) ou principalement zoophiles (Lyimo & Ferguson 2009). Le succès de l'emploi de moustiques génétiquement modifiés n'est qu'hypothétique. De nombreuses recherches sont nécessaires afin d'évaluer sa faisabilité. Bien que n'impliquant pas forcément l'introduction de transgènes dans les populations, l'utilisation de mâles stérilisés par irradiation a permis de lutter efficacement contre différents insectes, dont la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) et des ravageurs de cultures. Des recherches ont été menées à partir des années 1950 afin d'envisager le contrôle de culicidés d'importance médicale par cette technique, mais elles n'ont jamais abouti à leur mise en œuvre opérationnelle (Dame *et al.* 2009). Elles pourraient cependant être applicables au contrôle de vecteurs de *Plasmodium* dans certaines situations, notamment des zones où la transmission est très localisée, telles que le long du Nil au Soudan dans le cadre de stratégies intégrées (Ageep *et al.* 2009).

I.1.6. Méthodes de lutte anti-adultes

Elle est basée sur :

- L'utilisation des insecticides synthétiques (dichloro-diphényl-trichloroéthane) DDT ou naturel (nicotine), sur l'utilisation des répulsifs '(diéthyltoluamide) également sur les pyrétrinoïdes synthétiques (Alpha-cyperméthrine cyfluthrine) ;
- l'utilisation des grillages dans les maisons d'habitations (Impact malaria 2008);
- l'utilisation des MILDA (Moustiquaires Imprégnés à Longue Durée d'Action) à petites mailles (Minsanté 2011) ;
- la construction des maisons loin des marécages et des lacs ;
- la pulvérisation des insecticides sur les murs des maisons pour repousser ou détruire les espèces endophiles.

I.2. GENERALITES SUR LE PALUDISME

I.2.1. Définition

Le paludisme, encore appelé « malaria » signifiant « mauvais air » en italien, est une parasitose transmise à l'homme par la piqure d'un anophèle femelle (OMS 2009). Il infecte

les hommes ainsi que certains animaux tels que les chimpanzés, les gorilles (Weimin *et al.* 2010). Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2010 (WHO 2011), il y'a eu 216 millions de cas de paludisme dans les 106 pays et territoires d'endémie. On estime que, sur 81 % de ces cas, 91 % des décès sont survenus dans la Région africaine de l'OMS ; à l'échelle mondiale, 86 % des victimes étaient des enfants de moins de cinq ans.

I.2.2. Agents pathogènes du paludisme

Le parasite responsable du paludisme chez l'homme et les animaux est un protozoaire hématophage appartenant au phylum des Apicomplexa, à la classe des Haemosporidea, à l'ordre des Haemosporida, à la Famille des Plasmodiidae et au genre *Plasmodium* Laveran, 1881. Cinq espèces de *Plasmodium* sur quatre-vingt espèces décrites sont pathogènes à l'homme (Mouchet *et al.* 2004). Il s'agit de :

- ***Plasmodium falciparum* Welch, 1897** est l'espèce la plus répandue en zones tropicales ; elle est la plus redoutable et la plus mortelle car elle est responsable d'environ 90 % des cas de morbidité et de mortalité palustres ; Il est responsable de la majorité des infections palustres graves et mortelles (Mouchet *et al.* 2004). Sa période d'incubation est de 7 à 12 jours et sa longévité inférieure à un an ;
- ***Plasmodium malariae* Laveran, 1881** est une espèce rare responsable de la fièvre quarte ;
- ***Plasmodium ovale* Stephens, 1922** est l'agent de la fièvre bénigne en Afrique Centrale, c'est un parasite des hématies âgées (William *et al.* 2007) ;
- ***Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890** est responsable de la fièvre tierce bénigne en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud ;
- ***Plasmodium knowlesi* Knowles, 1932** affectant originellement les singes, est responsable de la fièvre quartane chez l'Homme avec des manifestations relativement graves du fait de son cycle de développement court. Sa ressemblance avec *Plasmodium malariae* justifie le fait qu'il ait été longtemps confondu avec ce dernier. Il a également été découvert en Asie du Sud-est (Malaisie, Thaïlande, Philippines, etc.) (Cox Singh 2008).

I.2.3. Cycle biologique du parasite

Le parasite, pour effectuer totalement son cycle doit passer successivement une partie de son cycle chez l'homme (hôte intermédiaire) où se déroule la reproduction asexuée et chez l'anophèle (hôte définitif) chez où se déroule la reproduction sexuée (Fouet 2010).

I.2.3.1. Cycle du plasmodium chez l'Homme

Le cycle du plasmodium chez l'Homme commence lors d'une piqûre d'un anophèle femelle infecté. L'anophèle inocule à l'Homme les germes infectieux en forme de croissants appelés sporozoïtes (Vogel & Angermann 1994). Chez l'Homme, le cycle se déroule en deux phases asexuées :

- **La phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire :**

Les sporozoïtes mêlés à la salive du moustique pénètrent dans le sang et ne sont présents dans la circulation sanguine que dans un délai de 30 minutes. Ils envahissent rapidement les cellules du foie (hépatocytes) et se différencient en éléments uninucléés appelés trophozoïtes (Lekel *et al.* 2010). Une fois dans le foie, les parasites subissent la multiplication asexuée (schizogonie) aboutissant à un énorme schizonte. Les schizontes (ou corps bleus) produisent des dizaines de milliers de mérozoïtes dont la libération entraîne l'éclatement des hépatocytes. Les mérozoïtes ainsi libérés regagnent la circulation sanguine pour parasiter les globules rouges (Lekel *et al.* 2010) ;

- **la phase sanguine ou schizogonie endo-érythrocytaire :**

Chaque mérozoïte se retrouvant dans le sang envahit un globule rouge et s'y développe en trophozoïte. Ce dernier se nourrit du contenu des hématies et en particulier de l'hémoglobine. Les résidus de ces métabolites forment un pigment noir dans le cytoplasme du parasite : c'est l'hémozoïne qui est une substance pyrétogène. Le trophozoïte grandit et donne un schizonte. Celui-ci subit une autre multiplication asexuée produisant 8 à 20 mérozoïtes (Vogel & Angermann 1994). La multiplication des schizontes entraîne des éclatements brutaux et synchrones des globules rouges par hémolyse : c'est ce qui provoque les accès de fièvre paludéenne. L'éclatement des schizontes mûrs ou «corps en rosaces » termine le premier cycle érythrocytaire suivi de la libération d'une nouvelle génération de mérozoïtes «érythrocytaires» capables de réinfecter d'autres globules rouges. Au bout de plusieurs cycles successifs, les trophozoïtes arrêtent de se diviser, modifient leur rapport nucléo-plasmique et se transforment en éléments sexués qui sont les microgamétocytes (mâles) et les macrogamétocytes (femelles) (précurseurs des cellules sexuelles pourvues d'un noyau volumineux et un cytoplasme densifié) qui vont demeurer en attente dans le sang (Vogel & Angermann 1994, Lekel *et al.* 2010).

I.2.3.2. Cycle du plasmodium chez l'anophèle

Au cours d'un repas de sang chez une personne infectée, l'anophèle femelle prélève les trophozoïtes, les schizontes et les gamétocytes. Les trophozoïtes et les schizontes sont

rapidement détruits tandis que les gamétocytes qui constituent la forme infectante du plasmodium pour l'anophèle, poursuivent leur développement (Lekel *et al.* 2010). Dans le tube digestif de l'insecte, le gamétocyte mâle subit une division nucléaire rapide, produisant 8 microgamètes flagellés tandis que le gamétocyte femelle se différencie et donne le macrogamète femelle.

La fécondation d'un macrogamète femelle par un microgamète mâle produit un zygote (cellule-œuf) appelé ookinète qui traverse la paroi de l'estomac du moustique. A l'extérieur de la paroi stomacale l'ookinète s'encyste et devient un oocyste (Vogel & Angermann 1994, Lekel *et al.* 2010). La rupture de ce dernier sera suivie d'une libération massive de sporozoïtes dans la cavité du corps. Les sporozoïtes migrent ensuite dans les glandes salivaires du moustique, d'où ils pourront contaminer un nouvel individu dès la prochaine piqûre (Figure 7) (Vogel & Angermann 1994, Lekel *et al.* 2010).

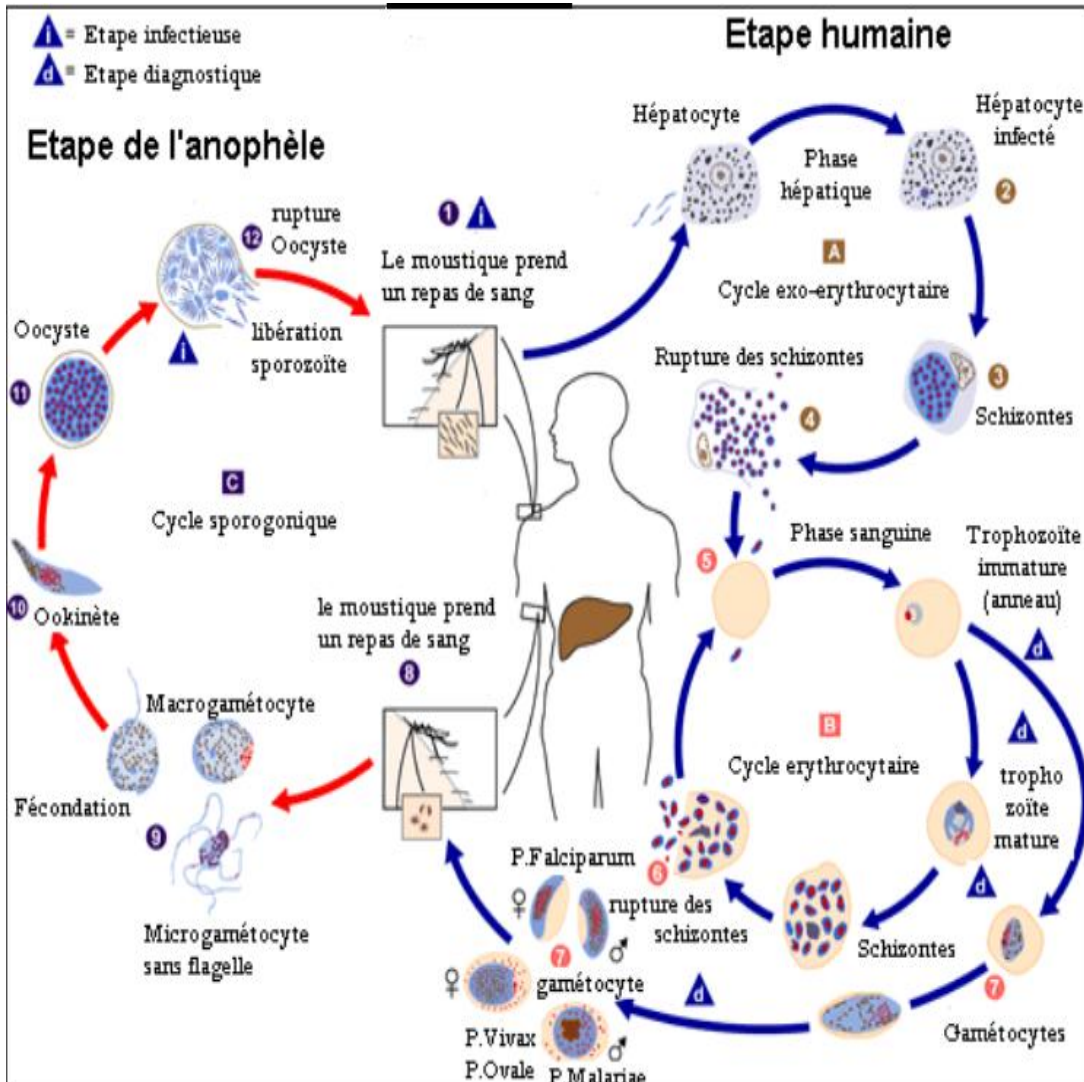


Figure 7. Cycles évolutifs des *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium vivax* (OMS 2009)

I.2.4. Maladie palustre

I.2.4.1. Etude clinique du paludisme

Pour les espèces plasmodiales pathogènes, on distingue deux manifestations principales déclenchées par l'éclatement des rosaces (Brenier-Pinchart & Peroux 2005) :

- **La primo-invasion** : les symptômes apparaissent après l'incubation silencieuse de 8 à 20 jours, parfois plus. Il peut s'agir du syndrome gripal, les céphalées, les asthénies, les fièvres irrégulières et les urines qui deviennent foncées ;
- **accès palustre simple** : ce sont des périodes d'accès fébriles qui surviennent après un intervalle de temps selon l'espèce plasmodiale du patient impliqué mais aussi selon l'âge du patient, ses caractères génétiques, son immunité, son état de nutrition. Elle se caractérise selon plusieurs phases dont la première est la primo invasion correspondant à l'invasion des globules rouges par les *plasmodies*. Elle est caractérisée par un embarras gastrique fébrile associé à des céphalées et des myalgies et un malaise général. Sans traitement, cette forme peut évoluer d'un seul trait vers l'accès pernicieux (Ambroise-Thomas & Carnevale 1984).

La seconde phase est la phase d'état marquée par des accès palustres proprement dits, caractérisés par une succession de trois étapes différentes à rythme régulier : frissons, chaleurs, sueurs. La splénomégalie est souvent le seul signe fiable à ce stade. Les signes d'anémie (paleur au niveau palmaire ou des ongles) ou la présence d'une urine de couleur sombre, peuvent être des signes suggestifs.

I.2.4.2. Différents types de paludisme

Il existe plusieurs types de paludisme :

- **Le Neuropaludisme**: est observé chez les enfants et les femmes enceintes majoritairement. Il est causé exclusivement par *Plasmodium falciparum* et est dû à l'anoxie des vaisseaux sanguins présents dans le cerveau ;
- **le paludisme viscéral évolutif** : survient chez les sujets insuffisamment prémunis et exposés à des infestations répétées. C'est une forme subaiguë et chronique associée à une anémie, une myalgie, une fièvre modérée et un retard staturo-pondéral chez l'enfant (Brenier-Pinchart & Pelloux 2005) ;
- **le paludisme transfusionnel** : est transmis par l'intermédiaire d'une transfusion sanguine ou échanges d'aiguilles lors d'une piqûre ou entre les individus drogués. Dans ce cas, la période d'incubation est courte car il n'existe pas de cycle pré-érythrocytaire (Brenier-Pinchart & Pelloux 2005).

I.2.5. Les différents faciès épidémiologiques du paludisme au Cameroun

Les variations éco-climatiques permettent de diviser le Cameroun en trois principaux faciès épidémiologiques de paludisme (PNLP 2012):

- **La zone de climat tropical sahélien à l'Extrême-nord Cameroun.** Elle se trouve dans la région de l'Extrême-nord et une grande partie de la région du Nord. La transmission dure 1 à 3 mois et est perceptible pendant la période pluvieuse (Septembre, Octobre, Novembre) ;
- **la zone de climat tropical soudanien dans l'Adamaoua et au Nord-Cameroun.** Elle se trouve dans les régions de l'Adamaoua et une petite partie du Nord et correspond à la zone de savane boisée de l'Adamaoua et de la Bénoué. Elle est caractérisée par une saison de pluies et une saison sèche. La transmission dure 4 à 6 mois et est intense pendant la période pluvieuse ;
- **la zone équatoriale dans la région forestière du Sud –Cameroun.** Elle se trouve dans toute la grande partie du Sud- Cameroun. La transmission du paludisme dure 7 à 12 mois. La pluviométrie y est abondante (jusqu'à 5 000 mm). On y distingue quatre saisons : deux saisons de pluies et deux saisons sèches. Le réseau hydrographique est dense et les principaux fleuves sont : le Wouri, la Sanaga, le Nyong, le Ntem, la Ngoko et le Kadeï. Il existe également des biotopes particuliers donnant lieu à des faciès épidémiologiques spécifiques: les hauts plateaux de l'ouest, la zone de transition savane-forêt, la zone littorale, les zones urbaines, les abords des barrages et les zones de rizière.

I.2.6. Méthodes de lutte contre le parasite

Les méthodes de lutte anti-vectorielle s'appuient sur la chimio-prophylaxie de masse à base des dérivés d'artémisinine (ACT) et de diagnostics tels que le TDR (Test de Diagnostic Rapide) (OMS 2011). L'artémisinine est un médicament issu de la pharmacopée chinoise apportant un regain d'espoir dans le cadre de la chimiothérapie antipaludique. Cependant, il est utilisé en association car il existe une pression de sélection qui tend à l'apparition de chimiorésistance (OMS 2015). Au Cameroun c'est l'association Arthementer-Luméfántrine qui est le traitement recommandé. En plus de ce traitement, la combinaison Artésunate-Amodiaquine est aussi très efficace dans le traitement antipaludique (Minsante 2011). Dans le cas des femmes enceintes, c'est la SP (Sulfadoxine-Pyriméthane) qui est utilisée pour la protection de la mère et de son bébé c'est le TPI (Traitement préventif Intermitant) (Minsante 2011).

Cette recrudescence du paludisme et la recherche de nouveaux moyens de traitement sont dû au fait que jusqu'aujourd'hui, il n'existe pas vraiment de vaccin antipaludique malgré des essais RTS,S/AS01 convainquants (OMS 2015). Cette absence de vaccin, associé au réchauffement climatique et à l'inefficacité des TDR chez certaines personnes augmente significativement le taux de la transmission du paludisme dans les régions tropicales (OMS 2015). La figure 8 représente la carte de la lutte contre le paludisme en 2012.

Cependant, la lutte antivectorielle reste en général le moyen de lutte le plus efficace pour prévenir la transmission du paludisme (OMS 2006). C'est ainsi que l'utilisation des insecticides synthétiques bien qu'étant efficace sur les moustiques, pose un problème de santé publique car non seulement très toxiques pour les êtres vivants et l'environnement et en plus, les moustiques deviennent résistants à ceux-ci (OMS 2012). L'utilisation des produits issus des plantes à l'instar des Huiles Essentielles devient une urgence pour réduire les effets nocifs des insecticides synthétiques sur la nature.

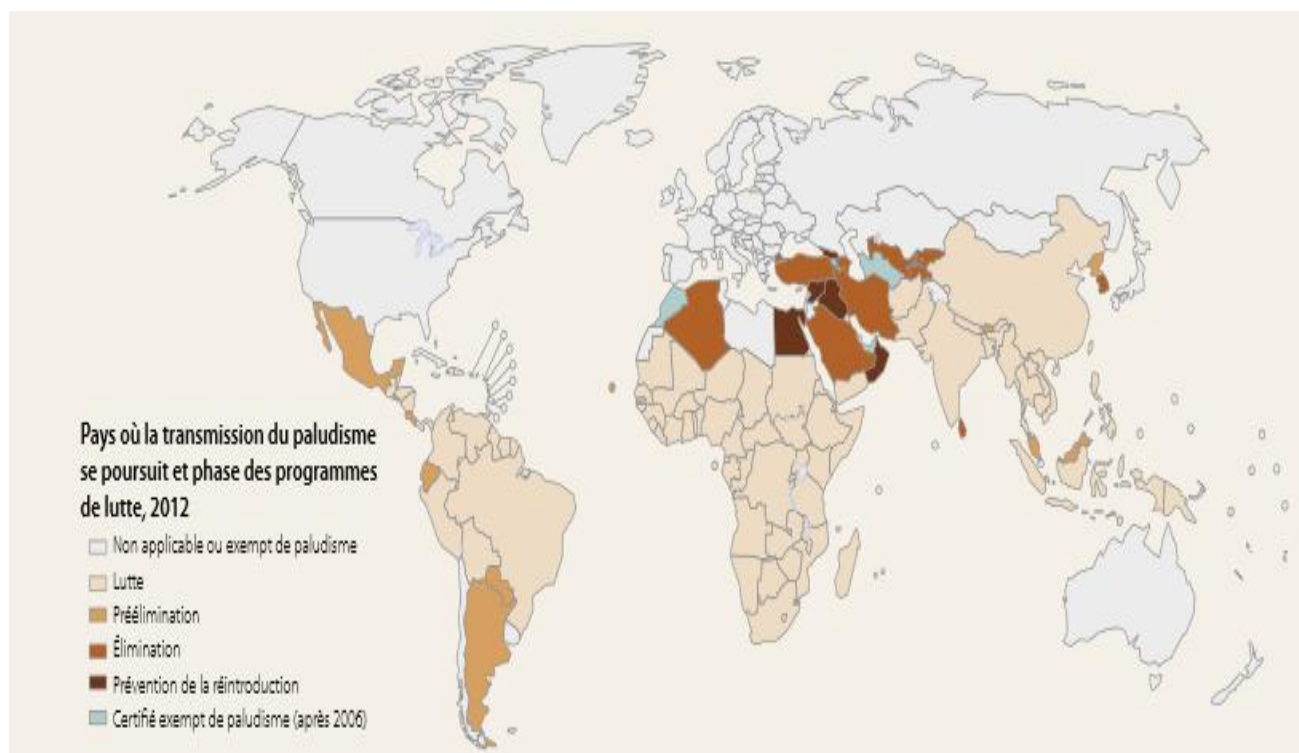


Figure 8. Carte de la lutte contre le paludisme en 2012 (OMS 2012)

I.3. GÉNÉRALITÉS SUR LES HUILES ESSENTIELLES A EFFET INSECTICIDE

I.3.1. Définition et historique de leur utilisation

L'huile essentielle (essence végétale) est le liquide concentré des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante. La présence des molécules volatiles dans les cellules des plantes est à l'origine des parfums qu'exhalent ces dernières. Ces substances volatiles, désignées par le terme « essence végétale » sont des sécrétions naturelles élaborées par les plantes (Nguemtchouin 2012).

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. Dans certaines régions d'Afrique noire, les feuilles de tabac malaxées dans l'eau étaient utilisées pour lutter contre les moustiques. Au Maroc, l'utilisation de plantes contre les invasions de moustiques est une pratique très courante, surtout dans les régions rurales. C'est dans cette mouvance qu'au Cameroun, plus de 415 plantes à effets insecticides ou insectifuges ont été inventoriées par Ngameni (2002). En outre les travaux de Foko et al. (2007), Tchoumboungang *et al.* (2008), Foko *et al.* (2011), Akono *et al.* (2012), et Akono *et al.* (2014) ont montré une activité insecticide intéressante des huiles essentielles de certaines espèces de plantes sur *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus*. Au regard de ces quelques travaux, force est de constater que l'usage des plantes dans la lutte anti-vectorielle reste à l'état embryonnaire au Cameroun.

I.3.2. Localisation des huiles essentielles

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle dans les végétaux sont généralement liées à l'existence des structures histologiques spécialisées localisées en certain point du tissu, le plus souvent situés sur ou en dessous des structures des plantes (Meryem 2009). En effet, il peut s'agir soit des cellules sécrétrices isolées ; des poils sécréteurs externes ; des canaux sécréteurs pouvant se situer soit sur une feuille (le citron), sur une fleur (ylang ylang), du bois (le bois de cèdre) sur l'écorce (cèdre) sur les racines (ail, angélique, vétiver) (Khadija 2002, Bakkali *et al.* 2008). Elles jouent un rôle important dans la détermination des conditions d'extraction des huiles essentielles (Isman 2000).

I.3.3. Rôle des huiles essentielles

I.3.3.1. Dans les plantes qui en produisent

Le rôle des huiles essentielles dans la plante est mal connu. Il pourrait s'agir de produits de déchets du métabolisme. Elles auraient un rôle attractif, vis-à-vis des insectes afin de favoriser la pollinisation, de barrière contre l'évaporation, protecteur par action antiseptique vis-à-vis de certains microorganismes comme les champignons, les bactéries et les virus (Mainebau 1994). Elles serviraient également comme antibactérien, antifongique, antiviraux, et insecticide chez les plantes qui en produisent pour lutter contre les prédateurs (Bruneton 1999, Bakkali *et al.* 2008).

I.3.3.2. Sur les insectes : activité insecticide

Les huiles essentielles agissent directement sur la cuticule des arthropodes. En effet, leur action semble être plus efficace sur les arthropodes à corps mou (Isman 2000). Grâce à leur composition riche en Monoterpènes et en Sesquiterpènes elles ont des effets anti-appétents, affectant ainsi la croissance, la mue, la fécondité et le développement des insectes et acariens. En effet, les Monoterpènes inhibent la cholinestérase (Keane *et al.* 1999). Par ailleurs, les huiles essentielles ont un effet sur l'octopamine. L'octopamine est un neuro-modulateur 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. En général, les huiles essentielles sont connues comme des neurotoxiques à effets aigus interférant avec les transmetteurs octopaminergiques des Arthropodes. Ces huiles sont donc peu toxiques pour les animaux à sang chaud (Bastien 2008).

I.3.4. Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles parmi lesquelles :

- **Extraction par entraînement à la vapeur d'eau** : cette technique compte trois variantes que sont: l'hydrodiffusion, la distillation à la vapeur saturée et l'hydrodistillation qui est la technique la plus courante pour l'obtention des huiles essentielles (Bakkali *et al.* 2008) ;
- **distillation sèche**: distillation des bois, d'écorces ou de racines ;
- **extraction par pression à froid**: ne s'applique qu'aux fruits d'agrumes (*Citrus sp.*) ;
- **extraction par solvants** (Degryse *et al.* 2008, Meryem 2009).

I.4. GÉNÉRALITÉS SUR *Clausena anisata* (Rutaceae)

I.4.1. Position systématique de *Clausena anisata*

Domaine des Eucaryotes

Règne Végétal :

- Présence de la double membrane et de pigments assimilateurs.

Sous-Règne des Tracheobionta :

- Plantes à racines et à vaisseaux assurant la circulation de la sève.

Embranchement des Spermaphytes :

- Plantes à fleurs et à graines, présentant un appareil végétatif appelé Cormus et de véritables racines.

Sous-Embranchement des Magnolophytas :

- Ovules enfermées dans la boîte ovarienne ;
- effectuent la double fécondation ;
- grain de pollen renfermant un prothalle mâle réduit à une seule cellule végétative et un noyau génératif entouré d'un cytoplasme dense.

Classe des Magnolopsidas :

- Présence des structures secondaires typiques, tissu de soutien sous épidermique : le collenchyme ;
- plantes ligneuses ou herbacées, feuilles à nervation réticulées ;
- présence d'un embryon à 02 cotylédons.

Ordre des sapindales :

- Placenta axile ;
- fleurs dialypétales superovariés.

Famille des Rutaceae :

- Fleurs hermaphrodites ;
- feuilles présentant des points translucides.

Sous-famille des Aurantioideae

Tribu des Clausenae Tanaka, 1936 :

Sous-Tribu des Clausenini Swingle, 1944 :

- Gymnophore bien différencié.

Genre : *Clausena*

- Les loges de l'ovaire contiennent deux ovules ;

- style court et épais ;
- inflorescences terminale avec panicules allongés et coniques.

Espèce : *Clausena anisata*

- Le style est nettement plus long que l'ovaire ;
- les feuilles persistantes ou rarement caduques.

I.4.2. Présentation et description botanique

Clausena anisata est une plante originaire d'Asie et ayant récemment envahi le continent Africain. Ce nom aurait été choisi en hommage à P. Clauson, botaniste Dannois du 17^e siècle (Huang 1959). En Asie, le genre est naturellement présent depuis le Sud de Taiwan de la Chine Subtropicale et Tropicale, en la Malaisie jusqu'à la Nouvelle-Guinée et Bougainville. En Afrique *Clausena anisata* est retrouvé au Ghana (Essilfie & Oteng 2013), au Nigéria (Usman *et al.* 2010), dans la région de l'Adamaoua, au Nord-Ouest et dans la région de l'Ouest au Cameroun (Kémeuzé *et al.* 2008). *Clausena anisata* est généralement appelé Agbasa par les yoruba (Usman *et al.* 2010), Nampi par les philippiens, Ol matassia par les kenyans et Nunumba par les peuples Camerounais.

Clausena anisata de la famille des rutacées est un arbuste mesurant en moyenne 2 m de hauteur mais pouvant atteindre 10 m, et 25 cm de diamètre. Ses feuilles sont rassemblées à l'extrémité des rameaux et le plus souvent dressées obliquement, longues de 10-30 cm, avec un pétiole de 2 cm en moyenne, imparipennées, composées d'environ 10-20 folioles alternes ou subopposées de forme elliptique, obliquement ovale ou ovale lancéolée, les supérieures plus grandes que les inférieures (figure 9). Ces feuilles froissées exhalent une forte odeur désagréable et caractéristique (Kémeuzé *et al.* 2009). Son inflorescence est en panicule terminale ou axillaire subterminale, lâche et étroite. Son fruit est une baie monosperme (fruit ayant une seule graine) ellipsoïde de 9 x 7 mm, blanchâtre, puis rougeâtre, puis bleuâtre-noirâtre (Letouzey 1985, 1986, Check *et al.* 2000).

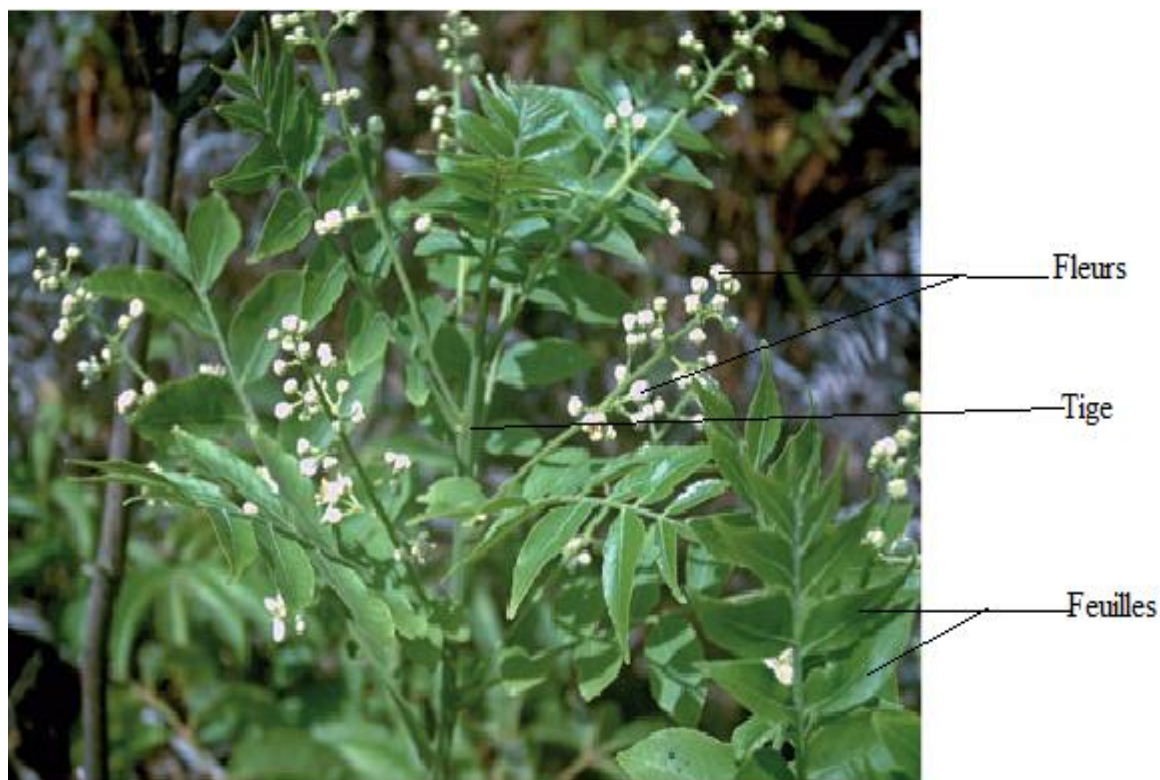


Figure 9. *Clausena anisata* (Kémeuzé *et al.* 2008)

I.4.3. Activité pharmacologique et autres usages

Toutes les parties de *Clausena anisata* sont utilisées à travers le monde pour les usages traditionnels (Arsia *et al.* 2014). L'écorce, les racines et les feuilles de *Clausena anisata* sont généralement utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de plusieurs maladies (Jules Lobe *et al.* 2012). *Clausena anisata* est utilisé par les phytothérapeutes en Tanzanie pour soigner la candidose et les infections de la peau due aux champignons (Hamza *et al.* 2006). Les extraits de ses feuilles ont été traditionnellement utilisés comme médicament pour les infections dues aux vers, les problèmes respiratoires, l'hypertension, malaria, fièvre, rhumatisme, arthrite (Kémeuzé *et al.* 2009). *Clausena anisata* a une action antidiabétique (Ojewole 2002), anti-nociceptive et anti-inflammatoire (Adenisa & Ette 1982, Hutchings *et al.* 1999, Ojewole 2002). En Afrique du Sud, *C. anisata* est utilisé en médecine traditionnelle pour le traitement du diabète (Van Why *et al.* 2002). Arsia *et al.* (2014 : 113) ont mis en exergue les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits aqueux des racines de *Clausena anisata*.

Les feuilles froissées de *Clausena anisata* exhalent une forte odeur désagréable et caractéristique (Kémeuzé *et al.* 2009), justifiant son utilisation comme insecticide.

En plus d'être utilisé dans la médecine traditionnelle, *Clausena anisata* est utile dans des multiples activités anthropiques telles que : le pâturage, l'artisanat sur bois, l'agriculture itinérante sur brûlis, la chasse et la coupe du bois de chauffe (Kémeuzé *et al.* 2009).

I.4.4. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*

La composition chimique de *Clausena anisata* montre qu'elle est constituée d'une trentaine de composés dont 18 sont majoritaires (Marimuthu 2010). Sa composition chimique montre une abondance en monoterpènes représentés majoritairement par le β -pinène. Néanmoins, cette composition varie par rapport à celle retrouvée au Nigéria analysée par Usman *et al.* (2010). L'analyse chimique de l'huile essentielle *Clausena anisata* du Nigéria montre qu'elle est constituée des Terpénoïdes (β – Elemene , l' α et β –Pinène), les Monoterpènes phénylpropanoïdes (trans- β –ocimène) et oxygénés (Linalool), les Sesquiterpènes hydrocarbonés et oxygénés (Carophyllène et la Cadinene) (Usman *et al.* 2010). Une étude faite sur *Clausena anisata* en Inde montre un rendement d'hydrodistillation de 4,8 mL/ Kg et une composition chimique représentée dans le tableau 1.

Tableau 1. Composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Marimuthu 2014)

Composés	Pourcentage (%)	Composés	Pourcentage (%)
β -pinène	32,8	β - Carophyllène	1,3
Sabinène	28,3	Limolène	1,2
Germacrène-D	12,7	α –Pinène	1,2
Estragole	6,4	Germacrène-A	0,9
Linalool	5,9	1,8- cineole	0,8
α - Humulène	1,8	Carophyllène oxyde	0,7
Myrcène	1,6	β – Elemene	0,4
α - Carophyllène	1,5	Phellandrène	0,2

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

II.1.1. Cadre d'étude

L'étude a été menée au mois de janvier 2016 dans la ville de Yaoundé (3°524'N, 11°31'E) en partie dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et dans le laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé.

II.1.2. Matériel biologique

Il est constitué :

- Des œufs, des larves et des adultes d'*Anopheles gambiae* obtenus au Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé après l'élevage des adultes fournis par l'OCEAC ;
- d'un lapin (*Oryctolagus cuniculus*) âgé d'environ 6 mois et en bonne santé qui nous permet de gorger les femelles. Il est nourri chaque matin à l'aide des feuilles de patate (*hipomoea patatas*), des feuilles de sissongo (*Pennisetum purpureum*) et de la provende.
- des feuilles de *Clausena anisata* récoltées dans la région de l'Ouest dans l'arrondissement des hauts plateaux, dans le groupement Bamougoum (5°30'0''N, 10°19'60''E), le 05 Décembre 2015 dans la matinée puis identifiées à l'Herbier National de Yaoundé en comparaison de l'échantillon au numéro N°7599 SRFCAM/ HNC.

II.1.3. Matériel technique

Le matériel de laboratoire technique est constitué de :

- Aliments pour larves (TetraMin®baby) ;
- aspirateur à bouche (02) ;
- balance de précision de marque SCOUT pro ;
- bassines en plastique (08) ayant une capacité de 5L ;
- bidons (04) ayant une capacité de 20L ;
- boîtes de pétri de 10 cm de diamètre (05) en plastique et en verre ;
- burette graduée de 25 mL ;
- cages métalliques de 30 cm d'arête recouvertes de tissu moustiquaire non imprégné ;
- coton hydrophile ;
- dispositif de gorgement ;
- eau distillée ;
- étagères en bois (02) de 2 m de longueur et 1,7 m de hauteur constituées de tablettes superposées ;
- étiquettes ;

- gobelets en carton (20) ;
- gobelets en plastique (150) d'une capacité de 150 mL;
- marqueurs (02) ;
- micropipettes de 3 mL ;
- micropipette à embou de 1 mL
- paires de ciseaux (02);
- papier filtre ;
- radiateur ;
- ruban adhésif ;
- saccharose à 10 %;
- tamis à mailles serrées ;
- thermo-hygromètre ;
- tulle moustiquaire non imprégnées ;
- eau d'élevage des moustiques (de la source de Simbock (3°50'52''N, 11°30'7''E) situé à Yaoundé à 10 Kilomètres environ du Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé I, comme recommandé par Foko *et al.* (2007 : 302)).

II.2. METHODES

Elle consiste premièrement à l'élevage de routine d'*Anopheles gambiae* afin d'obtenir une masse suffisante pour les tests au laboratoire, deuxièmement à l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* et troisièmement à l'étude de l'effet insecticide de *Clausena anisata* sur les œufs, les larves de stade 3, 4 et les adultes d'*Anopheles gambiae*.

II.2.1. Elevage d'*Anopheles gambiae*

L'élevage des différents stades de développement d'*Anopheles gambiae* s'est effectué au sein du Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé. Les œufs d'*Anopheles gambiae* ont été obtenus après fécondation des moustiques fournis par l'OCEAC. Ces œufs (figure 10A) ont été conservés pendant 24 à 36 heures à température ambiante variant entre 27⁰C et 30⁰C pour permettre la maturation des œufs. Après maturation, ces œufs ont été introduits dans des bassines contenant 100mL d'eau de source (figure 10B). Les larves ont été nourries avec la TetraMin®Baby (0,03 g de nourriture pour 100 larves/ jour). L'eau de source a été ajoutée tous les jours afin de compenser les pertes d'eau par évapotranspiration et changée tous les trois jours afin d'éviter la mort des larves par asphyxie due à la pollution par décomposition des

aliments dans l'eau. Toutes ces bassines ont été disposées sur une étagère en bois (figure 10B). Les nymphes (figure 10C) obtenues entre 4 à 5 jours après éclosion des œufs ont été transférées à l'aide d'une micropipette de 3 mL dans un gobelet en plastique contenant de l'eau et ont été introduit dans les cages. A l'émergence, tous les adultes sont nourris avec du jus sucré (saccharose 10 %) imbibé sur du papier filtre introduit dans des petits pots à l'intérieur de la cage (figure 10D). Trois jours après l'émergence, les femelles sont gorgées à l'aide du sang d'un lapin. Pour réaliser le gorgement, le lapin préalablement rasé à l'aide des ciseaux est maintenu en décubitus ventral sur un support en bois percé en son centre au-dessus de la cage contenant les imagos (figure 10E). Attirées par la chaleur, les anophèles femelles se sont gorgés de sang sur le ventre du lapin à travers la moustiquaire. Cette opération dure entre 15 à 20 minutes et est répétée à deux jours d'intervalles. Deux jours plus tard, un pondoir a été déposé dans la cage pour les femelles déjà gravides. Les femelles ont pondu des œufs et le pondoir a été recueilli le lendemain et conservé pendant 24 heures pour la maturation des œufs.

La température et l'hygrométrie ont été maintenues quasi constantes respectivement entre 26⁰C et 28⁰C et 70 et 80 % grâce à un radiateur et un thermo-hygromètre indiquant l'humidité relative. La photopériode était de 12 :12.

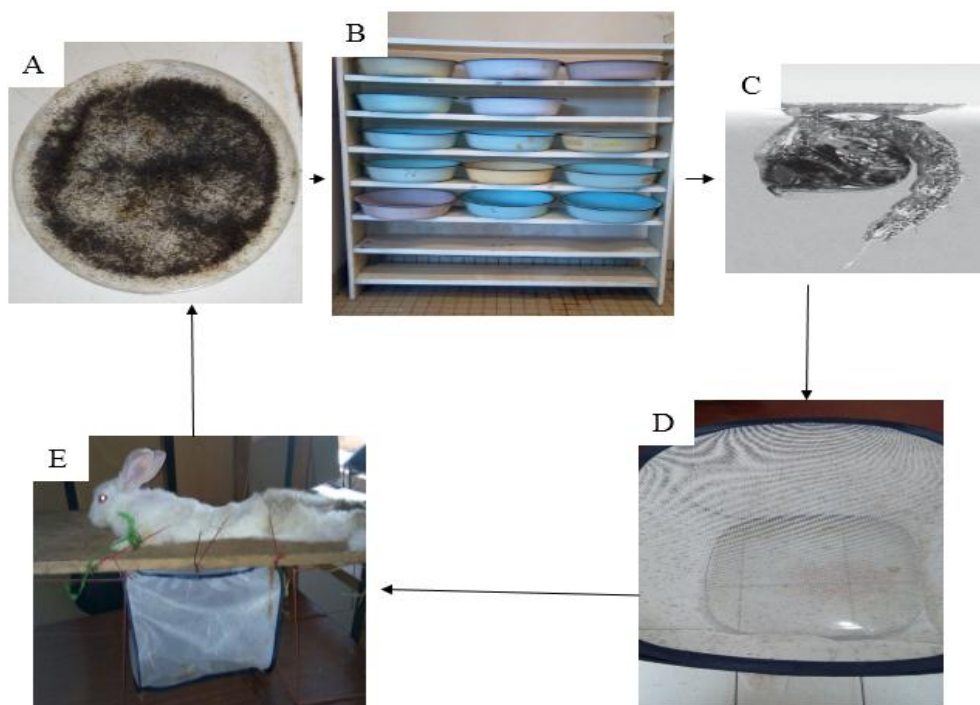


Figure 10. Etapes de l'élevage d'*Anopheles gambiae* au laboratoire A, cage contenant les adultes ; B, gorgement des moustiques à l'aide du sang de lapin ; C, pondoir contenant les œufs ; D, dispositif d'élevage des larves ; E, nymphe.

II.2.2. Extraction de l'huile essentielle de *Clausena anisata*

L'extraction de l'huile essentielle de *Clausena anisata* s'est effectuée par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Cette méthode est basée sur l'entraînement des composés volatils contenus dans les végétaux par la vapeur d'eau; le chauffage du matériel biologique libère les composés volatils qui sont entraînés avec les vapeurs d'eau vers un système de réfrigération. L'eau et l'huile essentielle se condensent et se séparent en deux phases au niveau de la colonne à décanter.

L'appareil de type clevenger est constitué de trois principales parties : le système Clevenger, le système de réfrigération et la plaque chauffante. Toutes ces parties ont été bien lavées à l'acide sulfurique et rincées à l'eau pour éviter toute contamination de l'huile essentielle avec d'autres molécules issues des précédentes extractions.

Les feuilles récoltées ont été séchées à température ambiante au laboratoire pendant quatre jours (figure 11A) puis pesées à l'aide d'une balance de précision semi-automatique de marque SCOUT pro. Ces feuilles ont été introduites dans la marmite chauffante en Inox et 20L d'eau du robinet a été ajoutée et l'ensemble a été porté à l'ébullition sur une plaque chauffante pendant 4 heures (figure 11B). A la fin de l'extraction, l'huile essentielle obtenue a été recueillie à l'aide d'une micropipette et filtrée sur une colonne de sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toutes les traces d'eau résiduelles puis, introduite dans les flacons en verre sombre hermétiquement fermés. Cette huile essentielle a été pesée (figure 11C) puis conservée dans un réfrigérateur à une température de 4°C. Le rendement de l'huile essentielle de *Clausena anisata* a été déterminé par la formule :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{masse de HE (g)} / \text{masse du matériel végétal (g)}) \times 100$$

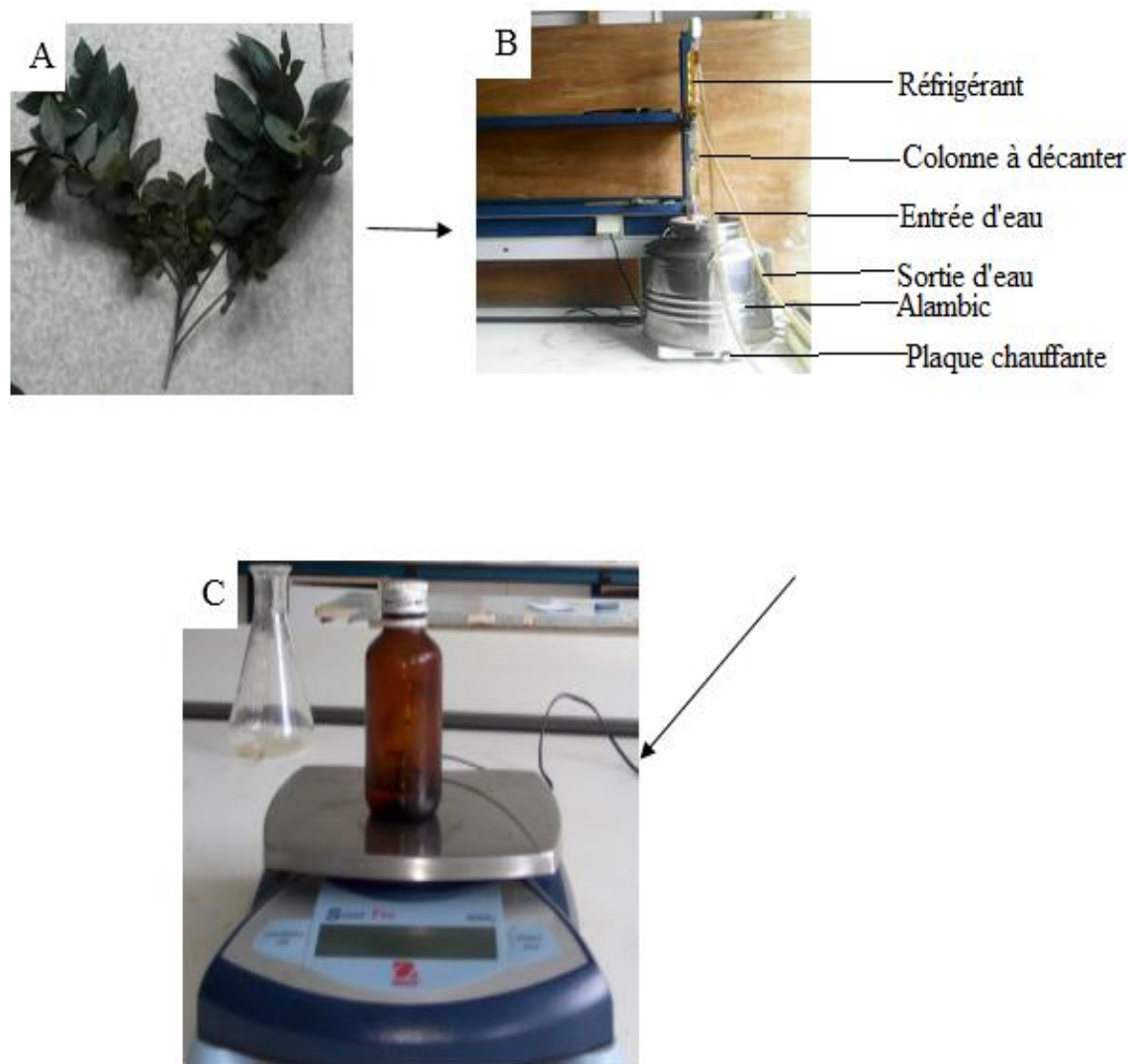


Figure 11. Dispositif et quelques étapes de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* A, feuilles séchées de *Clausena anisata* ; B, extraction de l'huile essentielle de *Clausena anisata* par hydrodistillation ; C, pesage de l'huile.

II.2.3. Bio-efficacité de l'huile essentielle de *Clausena anisata* vis-à-vis des œufs, larves et adultes d'*Anopheles gambiae*

II.2.3.1. Cas des stades pré-imaginaux

II.2.3.1.1. Préparation des solutions expérimentales pour les œufs, les larves de stade 3 et 4

Une solution mère à 1 % a été préalablement préparée dans un tube à essai en verre en diluant 250 mg d'huile essentielle dans 25 mL d'éthanol à 95° (solvant organique). Sur la base de cette solution mère ainsi préparée, d'autres dilutions en séries ont été effectuées avec des quantités bien précises d'éthanol dans de nouveaux tubes à essai en verre, protégés à leur

extrémité par un coton hydrophile et par le papier aluminium (pour éviter l'évaporation de l'alcool et de l'essence diluée). Ainsi, 09 concentrations ont été utilisées pour nos tests : 0,833 %, 0,579 %, 0,694 %, 0,482 %, 0,401 %, 0,333 %, 0,278 %, 0,232 %, 0,194 %.

II.2.3.1.2. Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les œufs

Pour le stade œuf, dix gobelets étiquetés (représentant les différentes concentrations à tester soient de 0 % à 0,833 %) ont été disposés sur une pailleasse. Nous y avons introduit 99 mL d'eau de source pour une capacité de 25 œufs. Les œufs pondus par les femelles d'*Anopheles gambiae* ont été conservés sur du papier filtre pour leur maturation pendant 24 heures (figure 12A). Ces œufs ont été comptés grâce à une loupe binoculaire (figure 12B) à l'aide de deux pinceaux fins et d'une pince propre. Les œufs ainsi comptés ont été disposés dans les différents gobelets. Quatre répliques ont été réalisés pour chaque concentration dans le but de minimiser les erreurs et augmenter la fiabilité des résultats. Chaque gobelet témoin négatif a reçu 1 mL d'éthanol, alors que les gobelets tests ont reçu 1 mL de chaque solution d'huile essentielle (0,833 %, 0,579 %, 0,694 %, 0,482 %, 0,401 %, 0,333 %, 0,278 %, 0,232 %, 0,194 %) à l'aide d'une micropipette munie d'un embou de 1000 µL (figure 12C). Les papiers filtres contenant les œufs matures ont été introduits dans les gobelets ainsi préparé. Les gobelets ont été fermés à l'aide de tulles moustiquaires non imprégnées (dans le but de limiter la contamination avec le milieu extérieur). Les jeunes larves ont été nourries au TetraMin®Baby à raison de 3mg pour 100 larves par jour. Le dénombrement des œufs ayant éclot a été effectué après 24 h, 48h et 72h d'exposition à l'huile essentielle (figure 12D). Pendant les tests, la température au laboratoire oscillait entre 26°C et 28°C et l'humidité relative entre 70 % et 80 %. Ces paramètres ont été contrôlés grâce à un thermo-hygromètre et un radiateur. La photopériode était 12 :12.

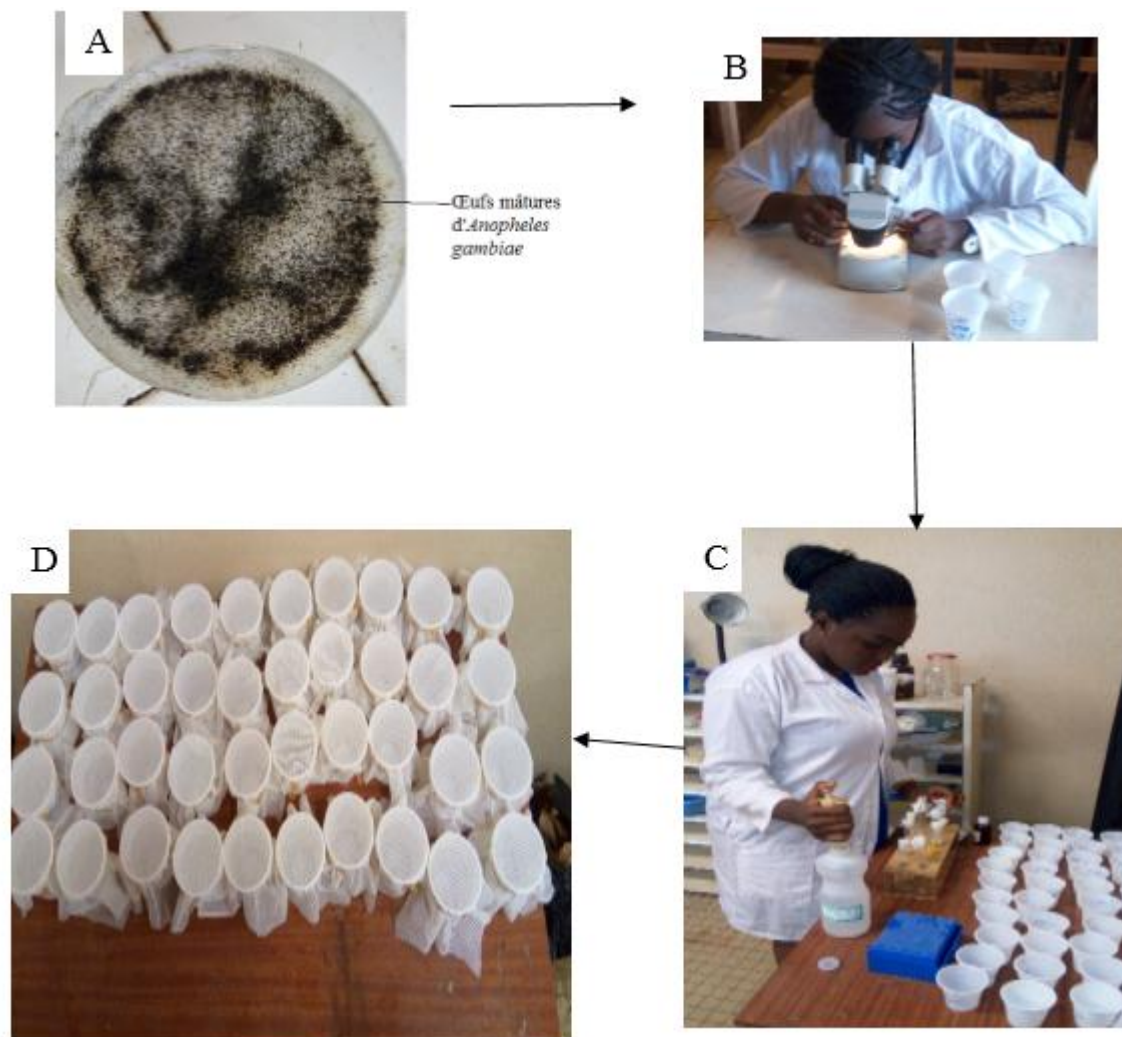


Figure 12. Dispositif des tests pour le stade œuf A, papier filtre contenant les œufs matures ; B, dénombrement des œufs d'*Anopheles gambiae* ; C, introduction de 1mL de chaque solution ; D, dispositif d'observation.

II.2.3.1.3. préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les larves de stade 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*

Ce travail a consisté à évaluer la mortalité des larves de stade 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* exposées à des solutions d'huiles essentielles diluées de *Clausena anisata* suivant le protocole réaménagé de l'OMS (2005).

Pour les larves de stade 3 et 4, dix gobelets étiquetés (représentant les différentes concentrations à tester soient de 0% à 0,833% ont été disposés sur la paillasse au laboratoire. Nous y avons introduit 99 ml d'eau de source pour une capacité de 25 larves (figure 13B). Les larves à tester ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur dans leur milieu de croissance et introduites dans les bocal tests et ensuite laissées au repos pendant 1 h pour supprimer l'effet de stress dû à leur transfert dans les bocal. Les différentes concentrations

De l'huile essentielle ont été préparées dans des tubes à essai en verre et fermés grâce au coton hydrophile et au papier aluminium pour éviter l'évaporation de l'essence diluée.

Le bocal témoin négatif a reçu 1 mL d'éthanol alors que les gobelets tests ont reçu 1 mL de la concentration d'huile essentielle correspondante pour les larves de stade 3 et 4. Pour chaque stade larvaire et pour chaque concentration d'huile essentielle, quatre réplicas ont été réalisés pour minimiser les erreurs et augmenter la fiabilité des résultats. Les gobelets sont ensuite couverts de tissus moustiquaires non imprégné (figure 13C). Les larves ont été nourries au TetraMin®Baby à raison de 0,03 g/100 larves et par jour. Le dénombrement des larves mortes a été effectué après 24, 48 et 72 heures après exposition aux différentes concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata*. Pendant les tests, la température au laboratoire oscillait entre 26°C et 28°C et l'humidité relative entre 70 % et 80 %. Ces paramètres ont été contrôlés grâce à un thermo-hygromètre et un radiateur. La photopériode était 12 :12.

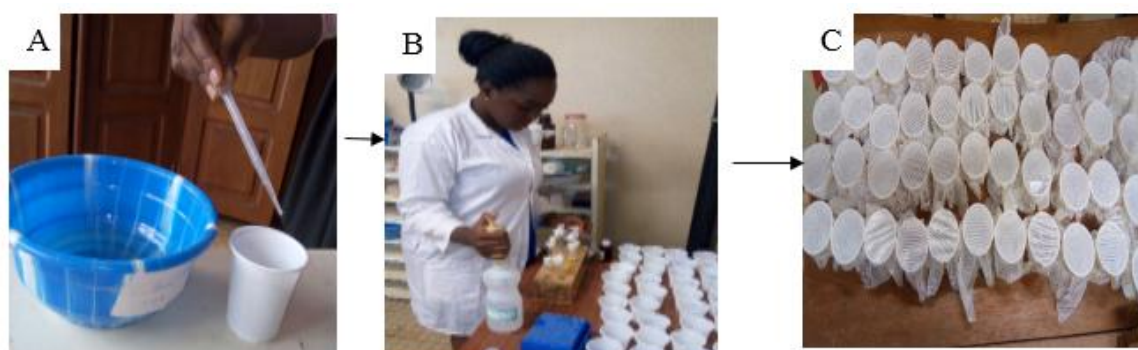


Figure 13. Dispositif de test pour les stades 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* A, dénombrement des larves ; B, préparation des solutions expérimentales ; C, dispositif d'observation.

II.2.3.2. cas des adultes

II.2.3.2.1. Préparation des différentes solutions pour les tests sur les adultes

Une solution mère à 2 % a été préparée par l'addition de 400 mg d'huile essentielle pesée à l'aide d'une balance de précision de marque SCOUT pro à 20 mL d'acétone. Dès lors, à partir de la solution mère 03 autres dilutions en série ont été effectuées par ajout de 5mL d'acétone à 15 mL de la solution précédente. Ainsi les concentrations suivantes ont été obtenues: 1,5 %, 1 %, et 0,5 %.

II.2.3.2.2. Protocole de test pour les adultes femelles d'*Anopheles gambiae*

La méthodologie utilisée pour les tests adulticides est inspirée du protocole réaménagé de l'OMS (2005). Elle consiste d'abord à exposer les moustiques aux doses discriminatoires d'insecticides sur moustiquaire imprégnée, ensuite à évaluer les temps nécessaires pour assommer 50 % et 90 % de moustiques knockdown (tkd₅₀ et tkd₉₅), enfin à déterminer la mortalité des moustiques au bout de 24 heures. Le test sur les adultes s'est déroulé en 02 principales étapes :

Imprégnation des tulles moustiquaires : 20 tulles moustiquaires (04 répliques ×5 concentrations) de 10 cm× 10 cm ont été imprégnés pour le test. Chaque tulle moustiquaire a été imprégné par ajout de 1, 11 mL de chaque concentration de l'huile essentielle de *Clausena anisata* pour les tests et de l'acétone pour les témoins (figure 14A). Cette imprégnation s'est déroulée dans des boîtes de pétrie en verre étiquetées dont la taille est inférieure à celle du tulle moustiquaire pour éviter les pertes de l'essence diluée. Chaque boîte de pétrie a été fermée avec son couvercle jusqu'au moment où l'acétone s'est complètement évaporé laissant ainsi le tulle imprégné de l'essence diluée (figure 14B);

protocole de test : chaque tulle imprégné a été fixé à la base d'un cône OMS sur un support en bois incliné à 45° à l'aide d'un ruban adhésif en papier (figure 14C). Ainsi, à l'aide d'un aspirateur à bouche, 20 moustiques femelles préalablement identifiées ont été introduits dans chaque cône OMS précédemment préparé dont la partie supérieure a été fermée grâce au coton hydrophile (tests et témoins) (figure 14E). Les moustiques ont été introduits dans chaque cône OMS précédemment préparé dont la partie supérieure a été fermée grâce au coton hydrophile (tests et témoins) (figure 14E). Les moustiques ont été introduits dans chaque cône OMS précédemment préparé dont la partie supérieure a été fermée grâce au coton hydrophile (tests et témoins) (figure 14E). Pendant l'exposition aux solutions diluées qui dure une heure, les moustiques assommés (knockdown) sont dénombrés après 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 minutes. Les moustiques ont ensuite été transférés dans des gobelets en carton à l'aide d'un aspirateur à bouche et mis en lieu sûr à l'abri des fourmis carnivores. Un coton hydrophile imbibé du jus sucré (saccharose à 10 %) a été placé au-dessus du tulle moustiquaire non imprégné recouvrant les gobelets afin d'éviter que la mort des moustiques soit due à la famine (figure 14F). Les mortalités finales ont été notées après 24 h, les knockdown et les mortalités ont été exprimés en pourcentages.

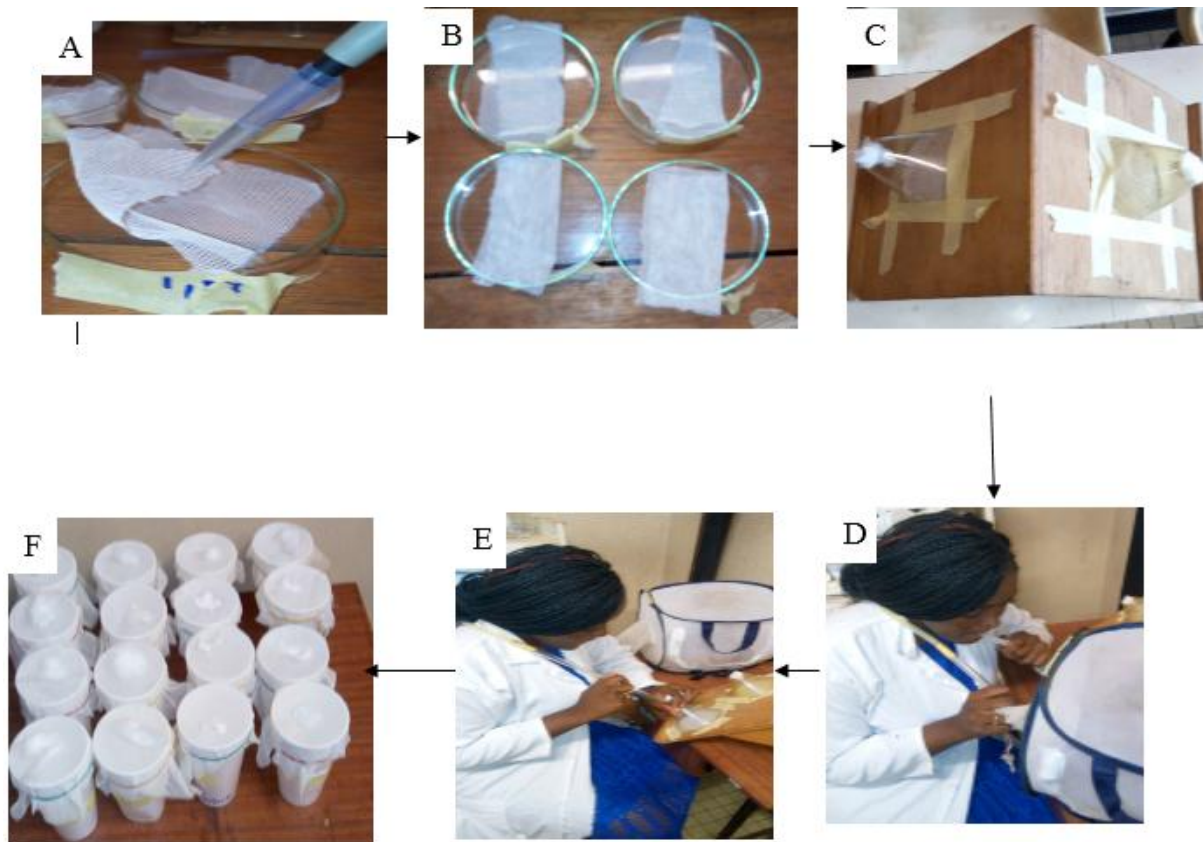


Figure 14. Dispositif expérimental de test pour le stade adulte A, imprégnation des tulle moustiquaires ; B, séchage des tulle ; C, dispositif de test en cône de l'OMS ; D, prélèvement des moustiquaires (femelles) ; E, transfert dans les cônes OMS ; F, dénombrement des morts après 24 heures d'observation.

II.2.3.2.3. Interprétation des taux de mortalité selon l'OMS

Les taux de mortalité ont été interprétés selon les critères proposés par l'OMS (2013) définis de la manière suivante:

- Taux de mortalité inférieure à 90 % = population résistante ;
- taux de mortalité comprise entre 90 % et 98 % = résistance probable ;
- taux de mortalité supérieure ou égale à 98 % = population sensible.

II.2.4. Analyses statistiques

Les données ont été introduites sur une feuille Microsoft office EXCEL 2013. Les données ont été présentées en pourcentages \pm DS (Déviation Standard). Les analyses ont été faites à l'aide des logiciels SPSS 12.0 (Statistical Package of Social Sciences) et PAST 1. 77 (PALaeontological STATistic). Le test H de Kruskal Wallis (ANOVA à un facteur non paramétrique) a été utilisé pour évaluer d'une part l'effet du temps et de la concentration de huile essentielle sur le taux d'éclosion et de mortalité des larves de stades 3 et 4 et d'autre part d'évaluer l'effet des différentes concentrations sur les knockdown et la mortalité des adultes femelles d'*Anopheles gambiae*. Le logiciel WINDEL CIRAD-CA –VERSION 2 a été utilisé pour tracer d'une part la courbe Log probit pour la détermination des DL₁₀, DL₅₀ et DL₉₀ pour les larves de stades 3 et 4 et d'autre part pour la détermination des t_{kd50}, t_{kd90}. Le degré de signification a été fixé à une valeur de probabilité inférieure à 0,05.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail sont présentés sous forme de tableaux numériques, de courbes évolutives (pour les tests avec les différents stades) et de droites de régression (pour les larves de stades 3 et 4).

III.1.1. Rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Clausena anisata*

L'hydrodistillation de *Clausena anisata* a donné un rendement de 0,242 %. En effet, 2603,5 g de matière végétale a donné 6,3g d'huile essentielle de couleur jaune pâle (tableau 2).

Tableau 2. Données de l'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*.

Espèce	Famille	Organe	Masse de départ (g)	Masse de l'huile essentielle (g)	Rendement (%)	Couleur
<i>Clausena anisata</i>	Rutacées	Feuilles	2603,5	6,3	0,242	Jaune pâle

III.1.2. Effet insecticide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les stades pré-imaginaux d'*Anopheles gambiae*

III.1.2.1. Effet ovicide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur *Anopheles gambiae*

Il ressort de ces travaux que le taux d'éclosion des œufs d'*Anopheles gambiae* est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de *Clausena anisata*. Ainsi les taux d'éclosion à 24 h de 1 %, 2 %, 6 %, 5 %, 5 %, 12 %, 20 %, 32 %, 40 %, ont été observés respectivement pour les concentrations 0,833 %, 0,579 %, 0,694 %, 0,482 %, 0,401 %, 0,333 %, 0,278 %, 0,232 %, 0,194 % tant dis que le taux d'éclosion chez le témoin est de 80 % . Ceci nous montre que pour des concentrations très élevées, l'éclosion est quasi inexistante et celle-ci augmente au fur et à mesure que la concentration diminue. De plus, les taux éclosions augmentent significativement après 24 h ($p = 0,0037$), 48h ($p = 0,0047$) et 72 h ($p = 0,00094$) donc quel que soit la concentration, il existe une différence significative entre les temps d'exposition aux différentes essences diluées. Les valeurs des différentes probabilités sont consignées dans le tableau 3.

Tableau 3. Taux d'éclosion des œufs matures d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

Concentration de l'HE(%)	Temps (heures)			H	P
	24	48	72		
0,833	1±0,25	1±0,25	1±0,92	0,03	0,98
0,694	2± 0,5	2±0,5	2±0,25	4,88	0,051
0,579	6±0,5	9±0,64	9±0,75	0,702	0,69
0,482	5±0,94	10±0,1	10±1,1	0,462	0,004*
0,401	5±0,94	8±0,91	9±0,91	0,115	0,0023*
0,334	12±0,86	12±1,79	13±1,65	0,240	0,884
0,278	20±0,75	21±0,75	28±0,5	0,721	0,0041
0,232	32± 0,5	38±0,5	40±0,70	2,337	0,0032*
0,197	40±0,5	44±1,22	50±3,77	7,538	0,0024*
0 (témoin)	80±0,48	95±1,49	95±1,49	7,603	0,002*
H	0,71	6,92	10,93		
P	0,0039*	0,0047*	0,00094*		

Moyenne de 4 répétitions portant chacune sur 25 œufs en % *: Significatif

La figure 15 nous montre que le taux d'éclosion est fonction de la concentration et de la durée d'exposition à l'huile essentielle. En effet, après 24 heures, le nombre d'éclosion est bas et augmente significativement après 72 heures. Par ailleurs nous observons que le nombre d'éclosion diminue au fur et à mesure que la concentration augmente

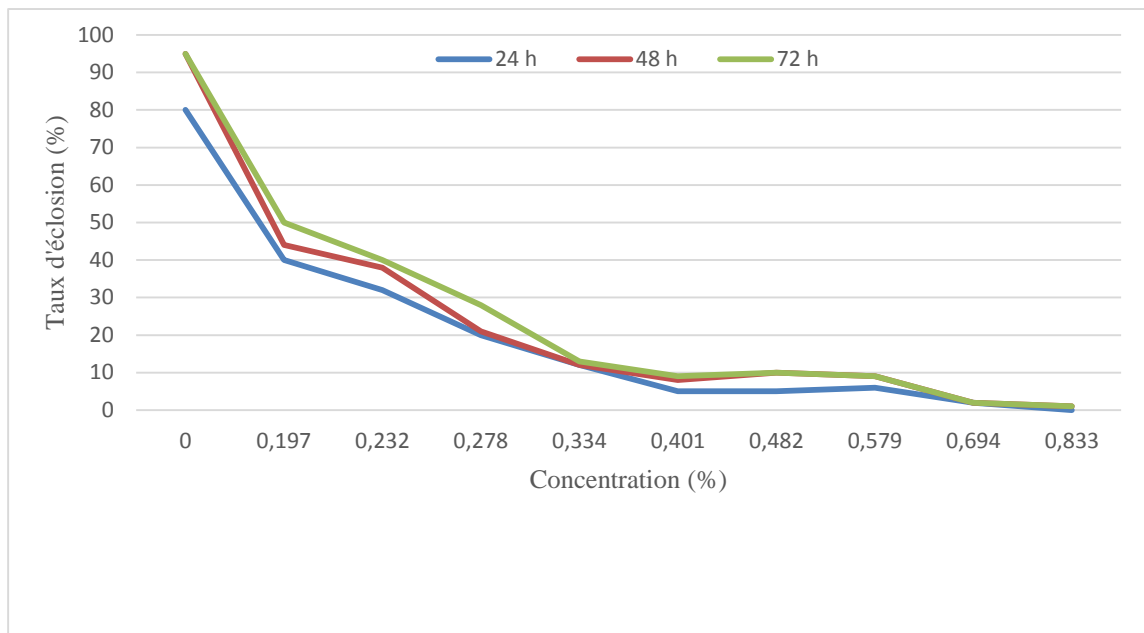


Figure 15. Variation du taux d'éclosion des œufs d'*Anopheles gambiae* après exposition à l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

III.1.2.2. Effet larvicide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les larves de stade 3 d'*Anopheles gambiae*

Après l'exposition des larves de stade 3 d'*Anopheles gambiae* aux différentes concentrations de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*, les taux de mortalité larvaire enregistrés en fonction de la durée d'exposition sont consignés dans le tableau 4. De ce tableau il ressort que la mortalité induite par *Clausena anisata* varie en fonction de la concentration. En effet, après 72 heures d'exposition, on observe un taux de mortalité de 100 % aux concentrations 0,833 et 0,694, 89 % de mortalité à la concentration 0,579 % et ce taux redescend jusqu'à 8% à la concentration 0,197 %, ce qui nous indique que l'effet de l'huile essentielle de *Clausena anisata* est d'autant plus prononcé que la concentration est élevée. Par ailleurs, nous observons que l'activité de l'huile essentielle de *Clausena anisata* varie en fonction de la durée d'exposition car aux concentrations 0,694 %, 0,579 %, 0,401 %, 0,334 %, 0,278 %, 0,232 % $p < 0,05$ ce qui nous montre une différence significative entre 24, 48 et 72 heures d'exposition à l'huile essentielle. De plus, les probabilités à 48 et à 72 heures respectivement de 0,0084 et 0,0094, nous montrent que l'huile essentielle agit en fonction du temps d'exposition sur les larves de stade 3 d'*Anopheles gambiae* à l'huile essentielle de *Clausena anisata* ; l'effet de l'huile est plus prononcé à 72 heures.

Tableau 4. Taux de mortalité des larves de stade 3 d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

Concentration de l'HE(%)	Temps (heures)			H	P
	24	48	72		
0,833	65,6±4,19	100±0,25	100±0,25	4,875	0,087
0,694	45±0,946	94±2,217	100±0,816	7,394	0,024*
0,579	48±1,471	88±1,914	89±1,6	7,39	0,024*
0,482	45±0,478	61±1,796	61±1,376	4,5	0,1
0,401	8±0,8164	12±0,577	34±0,866	7,731	0,020*
0,334	8±0,577	9±0,75	26±0,645	7,4	0,024*
0,278	6±0,645	13±0,478	25±1,314	7,12	0,028*
0,232	4±0,408	5±0,25	17±0,478	7,47	0,023*
0,197	3±0,25	3±0,25	8±0,408	4,87	0,087
0 (témoin)	1±0,25	1±0,25	2±0,288	0,461	0,79
H	0,717	6,926	10,93		
P	0,39	0,0084*	0,00094*		

Moyenne de 4 répétitions portant chacune sur 25 larves en % *: significatif

La figure 16 montre que le taux de mortalité des larves de stade 3 suite à l'exposition de l'huile essentielle de *Clausena anisata* est fonction de la concentration et du temps d'exposition à l'huile essentielle. Nous observons un taux de mortalité presque nul à 0 % (témoin) et il augmente jusqu'à 100 % après 72 heures d'exposition à 0,833 et 0,694 %, donc l'efficacité de l'huile essentielle est maximale après une exposition à 72heures d'exposition à l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*.

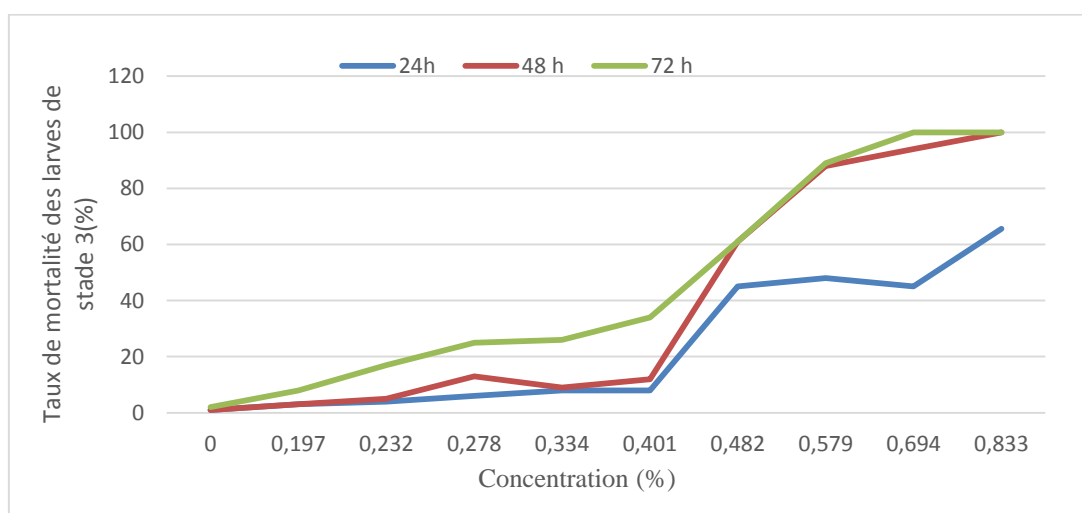


Figure 16. Variation du taux de mortalité des larves de stade 3 après exposition à l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

III.1.2.3. Effet larvicide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les larves de stade 4 d'*Anopheles gambiae*

Après l'exposition des larves de stade 4 d'*Anopheles gambiae* aux différentes concentrations de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*, les taux de mortalité larvaire enregistrés en fonction de la durée d'exposition sont consignés dans le tableau 5. De ce tableau, il ressort que l'activité larvicide de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* augmente significativement d'une part en fonction de la concentration et d'autre part en fonction de la durée d'exposition. Il est important de noter que l'action de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* à ces concentrations n'est pas immédiate. Elle est progressive et ce n'est qu'au bout de 72 heures que le potentiel larvicide est le plus prononcé en effet à 72 heures, $p = 0,034$ (tableau 5). Ceci est vérifié par le fait que la plus petite concentration tuant 10 % de larves de stade 4 à 24 heures est 0,334 % tandis qu'à 72 heures elle est de 0,197 % ; dans le même ordre d'idée, la plus grande concentration tuant 100 % de larves de stade 4 à 72 heures est 0,833 %.

Tableau 5. Taux de mortalité des larves de stade 4 d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

Concentration de l'HE(%)	Temps (heures)			H	P
	24	48	72		
0,833	90±0,645	97±0,478	100±0,25	5,663	0,044*
0,694	78±2,25	89±1,493	92±1,683	1,163	0,544
0,579	51±0,25	67±1,181	75±0,75	8,163	0,014*
0,482	48±0,912	71±1,547	75±0,75	7,538	0,022*
0,401	42±1,554	49±1,436	51±1,376	2,202	0,318
0,334	21±0,629	28±0,1224	28±0,1224	2,798	0,219
0,278	6±0,5	11±0,853	17±0,853	4,654	0,087
0,232	4±0,707	10±1,848	17±1,6	3,731	0,142
0,197	1±0,25	4±0,707	11±0,853	5,048	0,068
0 (témoin)	1±0,25	7±0,75	10±0,645	5,048	0,067
H	1,81	0,844	4,481		
P	0,17	0,35	0,034*		

Moyenne de 4 répétitions portant chacune sur 25 larves en % * : significatif

La figure 17 nous montre que le taux de mortalité est fonction de la concentration, plus la concentration est élevée, plus le taux de mortalité est élevé. Ceci est vérifié par l'allure de la courbe qui augmente au fur et à mesure que la concentration augmente.

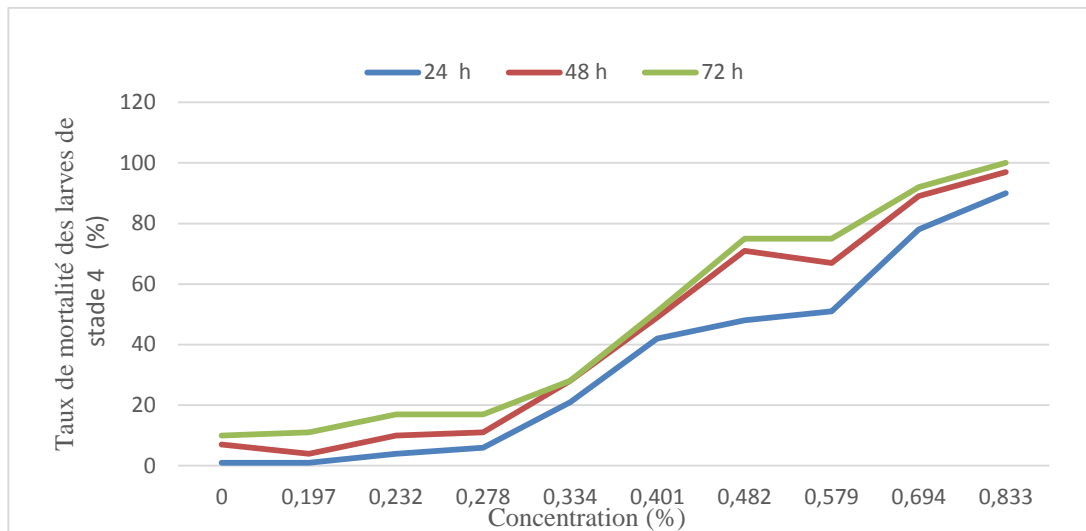


Figure 17. Variation du taux de mortalité des larves de stade 4 après exposition à l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

II.1.2.4. CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ des stades 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*

Les CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ sont des concentrations de huile essentielle capables de provoquer respectivement 10, 50 et 90 % de mortalité de larves de stade 3 ou de stade 4 d'*Anopheles gambiae*. Elles sont déterminées à partir des équations de régression des figures 18 et 19.

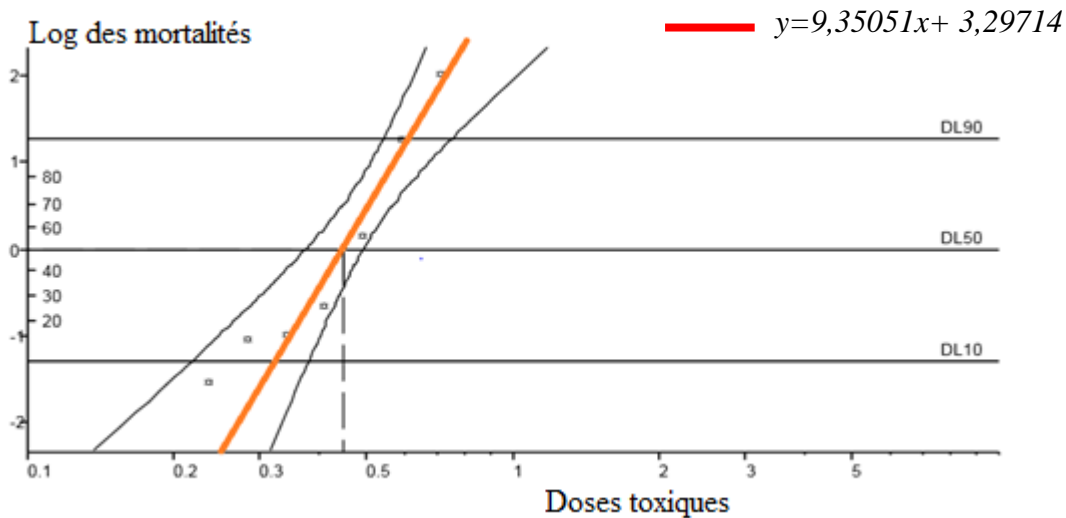


Figure 18. Courbe des DL 10, 50 et 90 de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les larves de stades 3 d'*Anopheles gambiae*.

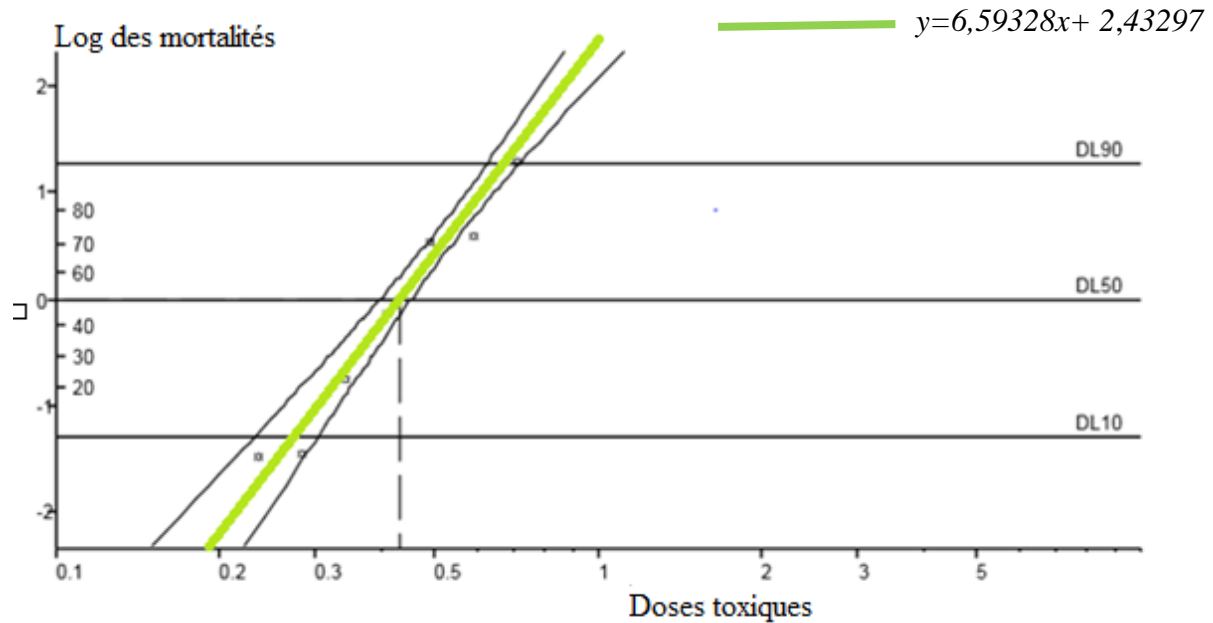


Figure 19. Courbe des CL 10, 50 et 90 de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les larves de stades 4 d'*Anopheles gambiae*.

Les CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ sont obtenues à partir de la table simplifiée de la transformation en probit des fréquences cumulées d'Henry. Les valeurs de CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ des stades 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* suite à l'exposition de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* sont consignées dans le tableau 6. De ce tableau, il ressort que les CL₅₀ et CL₉₀ des larves de stade 3 et stade 4 sont quasiment égales soient respectivement de 0,444 et 0,427, 0,608 et 0,668. La différence entre ces CL se situe au niveau des CL₁₀ où celle du stade 3 est supérieure à celle du stade 4 (0,323 > 0,233). La sensibilité des larves de stade 3 et 4 vis-à-vis de l'huile essentielle de *Clausena anisata* ne varie pas d'une manière significative.

Tableau 6. CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ de l'huile essentielle de *Clausena anisata* au bout de 72 h d'exposition des larves de stade 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*.

Stade larvaire d' <i>Anopheles gambiae</i>	Concentration létales (%)		
	CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Stade 3	0,323	0,444	0,608
Stade 4	0,233	0,427	0,668

III.1.3. Effet adulticide de l'huile essentielle de *Clausena anisata*

III.1.3.1. Effet knockdown et mortalité des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* après exposition à l'huile essentielle de *Clausena anisata*

Les taux moyens des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* knockdown et la mortalité en fonction de la concentration et de la durée d'exposition aux tulles moustiquaires imprégnées d'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* sont consignés dans le tableau 7. Il ressort de ce tableau qu'après 5 minutes d'exposition, le pourcentage des moustiques knockdown varie de 0 % à 81,25 % lorsqu'on passe de la concentration 0 % à 2 %. Après 1 h, ces pourcentages varient de 100 %, 90 %, 47,5 %, 27,5 % respectivement pour les concentrations 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,5 %.

L'analyse des kd par le test de kruskal wallis montre une différence significative pour l'exposition des moustiques pendant chacun des intervalles de temps à chacune des concentrations ($p < 0,05$). Par ailleurs, l'effet knockdown de l'huile essentielle de *Clausena anisata* ne varie pas dès les cinq premières minutes pour les concentrations 1,5 %, 1 %, 0,5 % (figure 20). Cependant, nous notons que la concentration 2 % assomme la totalité des moustiques au bout de 30 minutes tandis que la concentration 1,5 % n'assomme pas totalement les moustiques même après une heure d'exposition. Le tableau 7 montre par contre une action partielle de cette huile à 1 %, une moyenne de 10 moustiques sur 20 ont été assommés au bout de 60 min d'exposition (figure 20 et tableau 7).

Les taux de mortalité des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* varient significativement en fonction de la concentration de l'huile essentielle. Le test H de Kruskal Wallis donne une $p = 0,007$, donc il existe une différence significative entre les taux de mortalité des différentes concentrations (tableau 7). L'huile essentielle tue 100 % de moustiques à la concentration 2% tandis qu'elle tue 1,37 % de moustiques à la concentration 0,5 %.

Tableau 7. Taux de knockdown et de mortalité des adultes femelles d'*Anopheles gambiae* sous l'effet de l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

Temps d'exposition (minutes)	Concentration de l'HE(%)					H	P
	2	1,5	1	0,5	0		
5	81,25±0,63	5±0,4	1,25±0,25	0± 0	0 ± 0	10,46	0,015*
10	90±0	22,5±2,02	8,75±0,477	2,5±0,577	0 ± 0	10,97	0,011*
15	92,5±0,28	48,75±1,88	11,25±0,946	6,25±0,25	0 ± 0	12,87	0,0049*
20	95±0,4	56,25±1,65	16,25±1,314	15±0	0 ± 0	13,06	0,0045*
30	100±0	67,5±1,19	25±1,779	20±0707	0 ± 0	12,45	0,006*
40	100±0	78,75±1,31	30±1,683	22,5±0,645	0 ± 0	12,76	0,0051*
50	100±0	85±1,73	36,25±1,25	23,7±0,478	0 ± 0	13,02	0,0045*
60	100±0	90±1,08	47,5±01,322	27,5 ±0,28	0 ± 0	13,5	0,0036*
Taux de mortalité (%)	100±0	68,75±3,75	25±2,4	1,37±0,47	0,25±0,25	14,12	0,0027*

Taux moyen de 4 répétitions sur 20 adultes femelles (%) * : Significatif

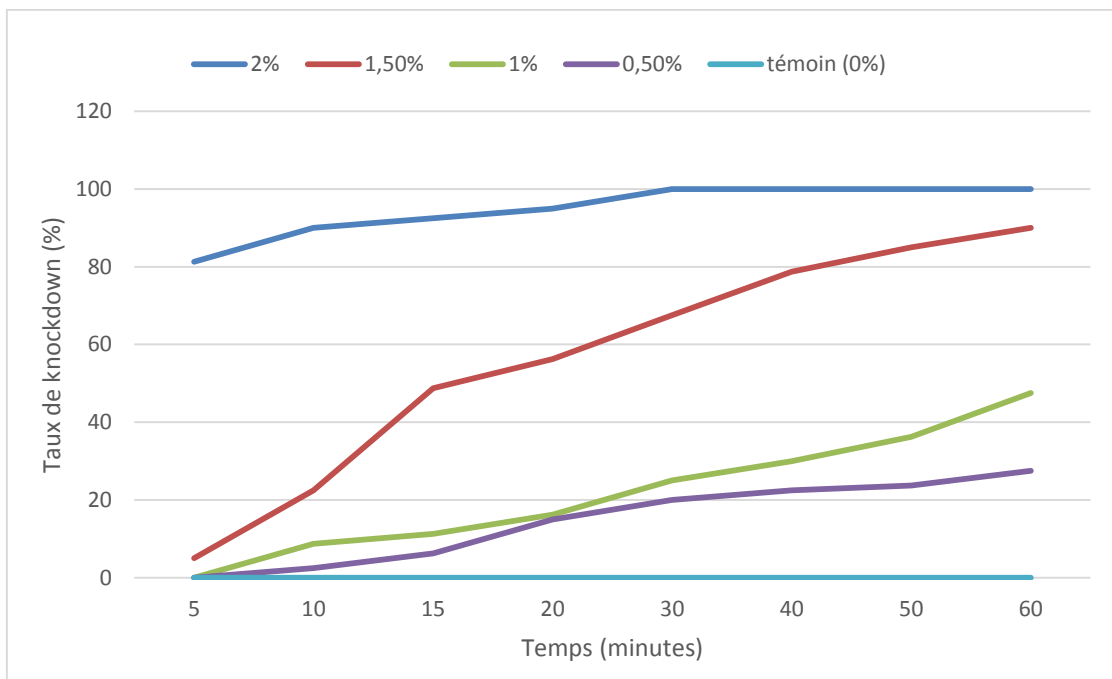


Figure 20. Variation des taux de knockdown d'*Anopheles gambiae* suite à l'exposition de l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

III.1.3.2. Temps de knockdown (tkd₅₀ et tkd₉₀)

Les tkd₅₀ et tkd₉₀ correspondent au temps au bout duquel, on observe respectivement 50 % et 90 % de moustiques knockdown au bout de 60 minutes d'exposition aux différentes concentrations des huiles essentielles. La détermination des temps de knockdown (tkd) permet de faire un classement plus objectif des huiles essentielles utilisées en fonction de leur potentialité knockdown vis-à-vis des femelles adultes d'*Anopheles gambiae*. Plus le temps de knockdown est faible, plus l'huile essentielle mis en cause a une potentialité knockdown élevée. La présente étude montre que les tkd₅₀ et tkd₉₀ varient d'une concentration à une autre. Ainsi au regard des valeurs de tkd₅₀ et tkd₉₀ enregistrées dans le tableau 10, il ressort que le potentiel knockdown est plus élevé pour la concentration la plus élevée (2 %) et est de 1 min 9 sec et 14 min 6 sec respectivement pour la tkd₉₀ et la tkd₅₀ tandis que pour la concentration à 1 % la tkd₉₀ et la tkd₅₀ sont respectivement de > 60 et 18,589. Par ailleurs, les tkd pour les concentrations 0,5 % et 1 % sont très élevés signifiant que le potentiel knockdown est fonction de la concentration de l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

Tableau 8. tkd₅₀ et tkd₉₀ des larves de stade 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* vis-à-vis des différentes concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata*.

Concentration de l'HE (%)	Nombre de moustiques	tkd (temps de knockdown en minutes)	
		tkd ₅₀	tkd ₉₀
2	80	1,932 (0,883-3,06)	14,603 (11,62-19,6)
1,5	80	18,589 (13,43-22,9)	>60
1	80	51,02 (25,67-100,341)	>60
0,5	80	>60	>60

III.1.3.3. Interprétation de la mortalité des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* sous l'effet de huile essentielle de *Clausena anisata* au bout de 24h d'observation

Les taux de mortalité des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* 24 h après leur exposition aux différentes concentrations d'huiles essentielles sont consignés dans le tableau 9. De ce tableau il ressort que les femelles adultes d'*Anopheles gambiae* sont résistantes aux concentrations 1,5 %, 1 % et 0,5 %, tant dis qu'elles sont sensibles à la concentration 2 % car ayant induit une mortalité totale au bout de 24h d'observation.

Tableau 9. Interprétation de la mortalité des femelles d'*Anopheles gambiae* obtenue après 24h d'exposition.

Concentration de l'HE (%)	Mortalité des moustiques(%)	Mortalité des moustiques dans le témoin (%)	Statut
2	100	1	Sensible
1,5	68,75	0	Résistant
1	25	0	Résistant
0,5	1,375	0	Résistant

III.2. DISCUSSION

Nos résultats montrent que l'huile essentielle de *Clausena anisata* a un rendement de 0,242 %. Ce rendement est très faible par rapport à celui obtenu au Nigeria (0,55 %) par Usman *et al.* (2010 : 892). Cette différence serait due au fait que le rendement d'une plante varie d'une méthode d'extraction à une autre car Usman *et al.* (2010 : 892) ont utilisé des feuilles séchées et émietées tandis que nous avons utilisés des feuilles séchées. Il est également important de noter que cette variabilité de rendement pourrait aussi être liée à la période de récolte, aux facteurs édaphiques et climatiques, à l'état physiopathologique de la plante et au temps de distillation (Jazet *et al.* 2002, Tchoumboungang *et al.* 2008).

Les différents tests biologiques montrent que *Clausena anisata* a des effets ovicides très puissants. Il a été prouvé au cours de cette étude que le taux d'éclosion des œufs est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata*. Dans le témoin (éthanol à 95°), nous observons un taux d'éclosion de 80 % après 24 h contrairement aux milieux expérimentaux pour lesquels les taux d'éclosion sont très bas même après 72 heures d'exposition à l'essence diluée (1 % de mortalité à 0,833 %). Ceci pourrait s'expliquer par l'abondance de l'huile essentielle de *Clausena anisata* en Monoterpènes oxygénés représentant près de 33,3 % de l'huile dont les propriétés insecticides ont déjà été démontrées (Marimuthu, 2010).

Par ailleurs les tests avec les larves de stade 3 et 4 nous montrent que *Clausena anisata* est un larvicide très puissant. En effet, la composition chimique de *Clausena anisata* extraite au Nigéria nous montre une prépondérance en Monoterpènes oxygénés représentant près de 33,3 % de l'huile. Ces monoterpènes sont représentés majoritairement par la Trans- β -ocimène, α -Pinène et le Limolène représentant respectivement 20 %, 6,7 %, 3,7 %.

Les Phenylpropanoïdes et les Monoterpènes hydrocarbonés ont été aussi retrouvés en des proportions plus faibles. Par ailleurs, les sesquiterpènes tels que la carophyllène à 10,5 % et la γ -cadinène à 5,4 % et les sesquiterpènes oxygénés tels que la carophyllène oxyde ont été retrouvés à 2,7 %. Ces résultats corroborent avec ceux de Marimuthu (2010) en Indes où les monoterpènes sont aussi représentés majoritairement mais c'est la β -Pinène qui est le composé majoritaire à 32,8 % suivi par Sabinène à 28,3 %. L' α - Pinène et β -Pinène ont été retrouvés respectivement aux proportions 1,2 et 32,8 %. Ces deux compositions ne diffèrent pas d'une manière significative l'une de l'autre. Cette potentialité larvicide relèverait du fait que cette huile essentielle est composée de molécules dotées de propriétés insecticides avérées telle que l'Estragole (CL₅₀ de 11,01 ppm et CL₉₀ de 19,39 ppm) et Sabinène (CL₅₀ de 19,67ppm et CL₉₀ de 36,46 ppm) (Marimuthu, 2010). En effet, Marimuthu (2010) en évaluant les propriétés insecticides de l'huile essentielle de *Clausena anisata* a prouvé que *Clausena anisata* possède des propriétés larvicides vis-à-vis d'*Anopheles stephensis* avec une CL₅₀ de 119 ppm et une CL₉₀ de 209ppm au bout de 24 heures pour le stade 3 tandis que nos résultats ont donné une CL₅₀ de 44,4ppm et CL₉₀ de 60,8ppm pour le même stade. Notre extrait serait bien plus efficace que celui de Marimuthu en Inde.

L'huile essentielle de *Clausena anisata* montre d'énormes propriétés adulticides vis-à-vis des femelles adultes d'*Anopheles gambiae*. Ceci est dû à la prépondérance de certaines molécules dans la composition chimique de *Clausena anisata* telles que les Monoterpènes oxygénés. De plus, plusieurs études ont montré que la mortalité des insectes serait causée par l'effet inhibiteur des Monoterpènes sur l'acétylcholinestérase (Houghton *et al.* 2006). Par ailleurs, certaines molécules telles que la Caryophyllène, sont aussi dotées de propriétés insecticides telles que relevés par Opende *et al.* (2008).

La toxicité de *Clausena anisata* vis-à-vis des femelles adultes d'*Anopheles gambiae* serait aussi due à la présence de 1,8-cineole dans son huile essentielle. Les activités antifongiques, antioxydantes, et répulsives de cette molécule ont déjà été démontrées par plusieurs auteurs (Byug-HO *et al.* 2004, Jazet *et al.* 2009, Huignard 2013). Selon Huignard (2013), cette molécule est un pesticide naturel à action neurotoxique qui agirait en inhibant l'activité de l'acétylcholinestérase, substance qui détruit l'acétylcholine après la transmission de l'influx nerveux. Dans le même ordre d'idées Obeng-Ofori *et al.* (1997) ont démontré que cette molécule a un effet répulsif contre les charançons des denrées alimentaires.

De plus, il ressort de ce travail que la résistance des Anophèles est fonction du stade de développement. En effet, Il faut une concentration de 2 % pour tuer 100 % des adultes femelles alors qu'il ne suffit que de 0,833 % pour obtenir une mortalité totale des larves. Des

résultats similaires ont été obtenus par Foko *et al.* (2007) au Cameroun. En effet, ces derniers ont montré que les huiles essentielles de *Capsicum annuum*, *Zingiber officinale*, et *Peper nigrum* contenaient des constituants qui inhiberaient le développement d'*Anopheles gambiae* *sl*; et par conséquent seraient impliqués dans certaines réaction d'oxydation. Ceci s'expliquerait par le fait que, la cuticule qui forme leur exosquelette devient de plus en plus résistante aux attaques extérieures au fur et à mesure qu'on passe d'un stade à un autre.

CHAPITRE IV : INTERET DIDACTIQUE

IV.1. DEFINITION DES CONCEPTS

La pédagogie et la didactique sont deux principales disciplines de l'éducation.

La pédagogie vient des mots grecs : « pedos » (enfant) et « agogè » (conduire). C'est une théorie des sciences de l'éducation qui désigne toutes les méthodes d'enseignement et toutes les qualités requises pour transmettre un savoir quelconque afin de conduire l'enfant vers la connaissance. Elle régit les relations enseignant-élèves et impose des démarches et des processus dans les situations d'enseignement-apprentissage.

La didactique quant à elle est l'ensemble des méthodes, techniques et procédés qui servent à configurer le processus enseignement-apprentissage. Il s'agit du comment enseigner pour faire apprendre efficacement.

IV.2. INTERET PEDAGOGIQUE ET DIDACTIQUE

IV.2.1. Objectif d'enseignement

L'objectif de cet enseignement est de doter l'élève des connaissances, capacités et aptitudes lui permettant de maîtriser le paludisme, ses caractéristiques et quelques méthodes de lutte contre le paludisme.

IV.2.2. Intérêt pédagogique et didactique

Les objectifs de ce travail sont les suivants :

- L'acquisition des connaissances et des savoirs sur les caractéristiques du paludisme à savoir son mode de transmission, son agent pathogène, son agent vecteur ainsi que leur cycle de développement ;
- l'acquisition des savoir-faire : il s'agit des aptitudes, des actes permettant de reconnaître une personne infectée par le paludisme et les moyens de lutte contre les stades aquatiques et adultes des moustiques afin d'éviter la transmission de cette maladie ;
- l'acquisition des savoir-être : il s'agit ici de sensibiliser l'entourage sur les méthodes de lutte contre les moustiques et de ce fait contre le paludisme.

IV.2.3. Fiche pédagogique de préparation d'une leçon de S.V.T.

FICHE PEDAGOGIQUE DE PREPARATION D'UNE LEÇON DE SVT (APO)

ETABLISSEMENT :	Nom de l'enseignante : BOBO NGOWE Manuela Pierre	
	Nom de l'encadreur : Mme FOKO DADJI Aurélie Gisèle	
DOMAINE : Science de la vie	Contact : 651496533	Classe : 3 ^{ème}
PARTIE III : MONDE MICROBIEN	Date : 22 juin 2016	
CHAPITRE 1 : Agression microbienne et parasitaire	Effectif :	Garçons :
THEME : Maladies parasitaires à protozoaires		Filles :
TITRE DE LA LEÇON : Lutte contre le Paludisme	Durée : 50 minutes	
OBJECTIF PEDAGOGIQUE OPERATIONNEL : A la fin de la leçon, l'élève sera capable de : - Dégager les caractéristiques du paludisme. -D'énumérer les différents moyens de lutte contre le paludisme.	Période :	

Etapas	OPOI	Contenus spécifiques	Matériel ou support didactique	Activités d'apprentissage		Evaluations	Durée
				enseignant	élèves		
Introduction	1-établir le contrat professeur-élève	<p><u>OPOI</u></p> <p>-Dégager les caractéristiques du paludisme</p> <p>-D'énumérer les différents moyens de lutte</p>	Livre programme et projet pédagogique Tableau et craie	-communique et écrit le titre de la leçon au tableau -écrit le titre de la leçon dans le cahier de texte -dicte les OPOI	-écoutent attentivement et recopient le titre de la leçon dans leur cahier.		10 minutes
	2-vérifier les prérequis	<p><u>Prérequis</u></p> <p>Notion d'agent vecteur. Nom de l'agent vecteur du paludisme.</p>		Fait lire la situation problème et pose les questions	-Lisent le texte, écoutent et répondent aux questions de l'enseignant	Définir l'agent vecteur. Nommer l'agent vecteur du paludisme	
	3-déterminer l'intérêt de la leçon	<p><u>Intérêt de la leçon :</u></p> <p>Reconnaitre dans la vie courante les cas de paludisme. Connaitre dans la vie courante les moyens de lutte contre les moustiques et le germe.</p>	Vécu quotidien Cours de 3 ^{ème}	Brainstorming	brainstorming		

	4- problème scientifique et hypothèse	<p>Problème scientifique : Comment reconnaître le paludisme dans la vie courante ? Quels sont les moyens de lutte contre le paludisme ?</p>	<p>Texte de la situation problème : Amina vit dans un quartier où il y'a les flaques d'eau stagnantes un peu partout, et elle ne dort pas sous la moustiquaire. Depuis hier, elle ne se sent pas en forme. Elle grelotte énormément, elle vomie, elle a de la fièvre et elle a très mal à la tête.</p>	-pose les questions pour amener les élèves à émettre les hypothèses et à formuler le problème scientifique	-les apprenants pose le problème scientifique émettent les hypothèses.	Donner le nom de la maladie qui fait apparaître ces symptômes chez Amina. Donner le rôle des moustiquaires et l'épandage des flaques d'eau aux alentours des maisons. Citer les moyens de lutte contre le paludisme.	
Développement	OPOII : Dégager les caractéristiques du paludisme.	<p>I. CARACTERISTIQUES DU PALUDISME</p> <p>a. Agent pathogène Le germe responsable du paludisme est un protozoaire du genre <i>Plasmodium</i> transmis par le moustique femelle qui parasite le sang d'où le nom d'hémoprotzoaire. Il fut découvert en 1880 par Laveran et il en existe 4 formes de plasmodiums qui parasitent aussi bien les hommes que les animaux : -<i>Plasmodium falciparum</i> ; -<i>Plasmodium ovale</i> ; -<i>Plasmodium malariae</i> ; -<i>Plasmodium vivax</i>.</p> <p>b. Agent vecteur et transmission L'agent vecteur est un moustique femelle ou anophèle femelle. En effet, les moustiques au cours de leur cycle de développement passent par des stades aquatiques : œuf, 04 stades larvaires, puis un stade nymphal ; puis par une phase adulte qui est aérienne. La transmission de la maladie se fait par la piqûre de l'anophèle d'une personne contaminée à une personne saine, par transfusion sanguine ou de la</p>		- amène les élèves à lire attentivement le texte et pose les questions aux élèves afin de les amener à répondre aux questions : Donne le nom de l'agent pathogène responsable du paludisme. Donner le nom de l'agent vecteur du paludisme. Donner la	-Réfléchissent et répondent aux questions	Donner les différentes phases de développement des moustiques.	30 minutes

	<p>mère à l'enfant.</p> <p>c. Symptômes et évolution de la maladie Après une période d'incubation du parasite pendant 10 à 15 jours, les symptômes sont les suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> -La phase de primo-invasion caractérisée par les nausées, diarrées, les vomissements, les courbatures, augmentation du volume de la rate ; -la phase secondaire ou paludisme d'état caractérisé par des accès fébriles successifs à trois phases : frisson, chaleur et sudation et des accès graves (convulsion et anémie sévère). 		<p>méthode par laquelle il y'a transmission de la maladie.</p> <p>Citer quelques symptômes du paludisme.</p>		
<p>OPOI2 : Enumérer les différents moyens de lutte contre le paludisme.</p>	<p>II. Moyens de lutte</p> <p>1. Lutte anti-vecteur Activité : Exploitation des informations sur le vécu quotidien</p> <p>a. Lutte anti-larvaire Elle se fait par plusieurs méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Systématiser le débroussaillage des mauvaises herbes autour des maisons ; -éliminer les flaques d'eau stagnantes autour des maisons ; -élever les poissons larvivores dans les zones où il y'a des eaux permanentes ; -l'épandage de pétrole à la surface des eaux stagnantes afin de détruire les larves ; -l'utilisation des huiles essentielles ainsi que la poudre des feuilles des plantes ayant des propriétés insecticides. <p>b. Lutte anti-adulte Elle se fait par plusieurs méthodes :</p> <ul style="list-style-type: none"> -Dormir sous des moustiquaires imprégnées ; -l'utilisation des grillage aux ouvertures des habitations ; -l'utilisuation des insecticides (spray, spirales) ; -planter les plantes qui chassent ou qui tuent les moustiques autour des habitations. 	Vécu quotidien	<p>Amène les élèves à exploiter certains faits de la vie quotidienne : Citer les moyens mis en place dans votre maison pour éradiquer les moustiques.</p>	- Réfléchissent et répondent aux questions	Citer les moyens de lutte contre le paludisme appliquée dans votre maison.

		<p>2. Lutte curative Pour soigner le paludisme, il est conseillé d'utiliser des médicaments pour détruire le germe à l'instar de la quinine ou des dérivés de l'artémisinine tel que la combinaison Arthémether-Luméfantrine.</p>					
Conclusion	<p>EVALUATION SOMMATIVE : Citer les différents stades de développement des moustiques. Donner la raison pour laquelle on doit éliminer les flaques d'eau stagnantes autour des habitations. Citer quelques moyens de lutte contre le paludisme.</p>						5minutes

BIBLIOGRAPHIE :

Djakou R. BIOLOGIE/ GEOLOGIE 3^{ème}, Edition BORDAS. 226p.

[www.Info](http://www.info) sur le paludisme. Lutte contre le paludisme. Com. Date de consultation : 05 mai 2016.

BOBO NGOWE Manuela Pierre. (2016) Evaluation de l'effet insecticide de l'huile essentielle de *Clausena anisata* sur les stades de développement d'*Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidea) vecteur du paludisme. Mémoire DIPES II. Ecole Normale Supérieure de Yaoundé, Cameroun 72p.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En somme, il ressort de ce travail que l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* est dotée des propriétés ovicides, larvicides et adulticides très importantes qui pourraient être dues à la présence des molécules telles que le Sabinène, β -Pinène, le Linalool, et l'Estragole. Ces composés possèderaient des propriétés insecticides (ovicides, larvicides et adulticides) vis-à-vis respectivement des œufs, des larves et des adultes d'*Anopheles gambiae*. Les bio-insecticides issus de ces molécules se révèlent par conséquent être une démarche alternative à l'emploi des insecticides de synthèse dont le coût, le phénomène de résistance chez les moustiques traités, l'action avérée sur les organismes non cibles et la pollution environnementale sont loin de résoudre le problème de paludisme en Afrique en général et au Cameroun en particulier.

Comme perspectives, nous envisageons d'analyser l'huile essentielle de *Clausena anisata* et de préciser la nature du (ou des) composé(s) responsable(s) de cette activité par un fractionnement mené en parallèle avec les tests biologiques afin d'évaluer l'activité pour les œufs, tous les stades larvaires, sur les nymphes et les adultes de cette huile sur *Anopheles gambiae*.

Nous recommandons aux décideurs africains d'intégrer l'usage de *Clausena anisata* sous forme de bio-insecticide naturel dans la mise en œuvre de leur politique nationale de contrôle efficace des vecteurs du paludisme. Les populations sont également invitées à cultiver cette plante dans leurs concessions, son odeur pourrait avoir un effet dissuasif contre les vecteurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adenisan S. K., Ette E. I. (1982) The isolation and identification of anticonvulsant agents from *Clausena anisata* and *Afraegle paniculata*. *Filoterapia* 53: 63-66.
- Ageep T., Cox J., Hassan M., Knols B., Benedict M. (2009) Spatial and temporal distribution of the malaria mosquito *Anopheles arabiensis* in northern Sudan: influence of environmental factors and implications for vector control. *Malaria Journal* 8: 123.
- Akono N., Belong P., Tchoumboungang F., Bakwo F., Fankem H. (2012) Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* et d'*Ocimum basilicum* sur les adultes d'*Anopheles funestus s.s.*, vecteur du paludisme au Cameroun. *Journal of Applied Biosciences* 59: 4340–4348.
- Akono N., Nicolas B., Mouray E., Lengo M., Belong P., Grellier P. (2014) Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus s.s.* *Parasite* (21) 33.
- Ambroise-Thomas, Carnevalle P. (1984) *Maladie infectieuse*. Encyclopédie de médecine et chirurgie, Paris France 10-26.
- Antonio-Nkondjio C., Kera H.C., Simard D., Awono-Ambene P., Tchuinkam T., Fontenille D. (2006) Complexity of the Malaria Vectorial System in Cameroon: Contribution of Secondary Vectors to Malaria Transmission. *Journal of Medical Entomology* (43)6 : 1-7.
- Arsia T. Y., Nargis Begum T., Deepa N.S. (2014) Study of invitro antioxidant, antidiabetic and antibacterial activity of *Clausena anisata* (Willd). Hook (Rutaceae) leaf extracts. *Journal of Research in Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 3(2) 112-125.
- Ayala F., Coluzzi M. (2005) Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *National Academic science USA* 1: 6535-6542.

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils. Food and chemical toxicology 46: 446-475.

Bastien F. (2008) Effet larvicide des huiles essentielles sur *Stomoxys calcitrans* à la Réunion. Thèse Doctorat, Université Paul-Sabatier de Toulouse, 78p.

Boëte C., Koella J. (2003) Evolutionary ideas about genetically manipulated mosquitoes and malaria control. Trends Parasitology 19: 32-38.

Brenier-Pinchart M. P., Pelloux H. (2005) Clinique du paludisme. Paludisme. 99p.

Bruneton J. (1999) Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales, 3ème Edition Technique et documentattion. Lavoisier Paris 197-383.

Byug-Ho L., Peter C., Fa'ale T., Won-sik C. (2004) Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. Journal of Stored Products Research 40: 553–564.

Carnevale P., Vincent R., Garros C., Manguin S., Vincent C., Fontenille D., Christophe R. (2009) Les anophèles Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. Éditions Marseille 402p.

Chabasse D., Danis M., Guigen C., Richard - Lenoble D., Botterel F., Miégeville M. (2007) Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales « Connaissances et pratiques» (ANOFEL). Réussir les Epreuves Classiques Nationales, Elsevier Masson 331p.

Cheek M., Onana J. & Pollarb B.J. (2000) The plants of Mount Oku and the Ijim ridge, Cameroon. A conservation checklist Kew, Royaume-Uni, Royal Botanic Gardens 211p.

Coetzee M., Craig M., Le Sueur D. (2000) Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. Parasitol 16: 74-77.

Cookia J. F., Gmelins, (1971) *Pimelea banks&Sol.* Ex Gaertner. Fruct. Yst Nat 2: 19-24.

Cox-Singh (2008) Le paludisme à *Plasmodium knowlesi* est largement répandu et potentiellement mortel CID. Malaisie/Australie/London School 46:165-171.

Dame D, Curtis C, Benedict M, Robinson A., Knols B. (2009) Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. Malaria Journal 22 :45-58.

Degryse A. C., Delpla I., Voinier M. A. (2008) Atelier santé et environnement; risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. (AFSSAPS) Ingénierie du Génie Sanitaire - École des Hautes Études de Sante Publique (IGS-EHESP), 94 p.

Essilfie M.K., Oteng A.A. (2013) Morphometric studies of *Clausena anisata* in Ghana. West African journal of Applied Ecology, 21(1):40-53.

Foko D. G. A., Tamesse J. L., Feukam B. F. (2011) Adulticidal Effects of essential oils Extracts from *Capsicum annuum* (Solanaceae) *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) on *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae), vector of malaria. Journal of Medical Entomology 8(2): 152-163.

Foko D. G. A., Tamesse J. L., Messi J. (2007) Insecticidal effects of *Capsicum annuum* on *Anopheles gambiae* Gilles under laboratory conditions. Journal of Entomology 4: 299-307.

Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C., Dia I. Boccolini D., Duchemin J., Rajaonarivelo V., Dabire R., Adja-Akre, Ceainu C., Le Goff G., Simard F. (2003) Systématique et biologie des anophèles vecteurs du paludisme en Afrique : données récentes. Médecine Tropicale 63 : 247-253.

Fontenille, D., Wandji S., Djouaka R., Awono-Ambene P. (2000) *Anopheles hancocki*, vecteur secondaire du paludisme au Cameroun. Bulletin Liais Document OCEAC 33 : 23-26.

Fouet C. (2010) Polymorphisme chromosomique et adaptation à l'aridité chez *Anopheles gambiae sensu stricto*. Thèse Doctorat/PHD, vétérinaire. École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Faculté de Médecine de Créteil 66p.

- Gillot C. (2005) Plan Stratégique de Lutte Contre le Paludisme. Entomology_Springe 82p.
- Gu W. (2009) Agent-based modelling of mosquito foraging behaviour for malaria control. *Malaria* 103: 1105-1112.
- Gu W., Regens J., Beier J., Novak R. (2006) Source reduction of mosquito larval habitats has unexpected consequences on malaria transmission. *Academic Science* 103: 17560-17563.
- Hamza, O.J.M., van D. C. J.P., Matee M.I.N., Moshi M.J., Mikx F.H.M., Selemani H.O., Mbwambo Z.H., Van der Ven A.J.A.M., Verweij P.E. (2006) Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 124–132.
- Harsbach R. E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetics relationships. *Bulletin of Entomological Research* 94: 537-553.
- Hervy J. P., Le Goff G., Geoffroy B., Hervé J. P., Manga L. & Brunhes J. (1998) Les anophèles de la région afro-tropicale. Orstom éditions, Collection Didactiques 1234-1245.
- Houghton P. J., Ren Y., Howes M. J. (2006) Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungal. *National Production* 23 (2): 181–199.
- Huang C.C. (1959) Preliminary study of Chinese Rutaceae. *Acta phytotax. Siri* 8(1): 69- 124.
- Huignard (2013)._Les plantes et les insectes : une lutte permanente. Les défenses des plantes. *Insectes* 8 :168.
- Hunt R. H., Coetzee M. (1998) The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Malaria* 92: 231-235.
- Hutchings, B. A., Okwute, S. K., and Kela,S. L.(1999). Molluscicidal activity of crude leaf water extracts of *Alternanthera sessilis* and *Clausena anisata* on *Bulinus (Phy) globosus*. *African Journal of Biotechnology* 6(4):441-444.

Impact malaria (2008) World Malaria Report. Genève, Suisse 27-48.

Isman, (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 603-608.

Jazet D. P., Kuate J., Fekam B. F., Duchelier D., Damesse F., Amvam Z. P., Menut C. Bessiere J. (2002) Composition chimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de *Citrus sp* sur la croissance mycélienne de *Phaeoramularia angoensis*. Fruits 57: 98-99.

Jazet D. P., Tatsadjieu N., Ndongso D., Kuate J., Amvam Z., Menut C. (2009) Correlation between chemical composition and antifungal properties of essential oils of *Callistemon rigidus* and *Callistemon citrinus* of Cameroon against *Phaeoramularia angolensis*. Journal of Medicinal Plants Research 3(1): 009-015.

Jules Lobe S., Kouam, Etienne D., Theophile N. M., Robert L. W. (2012) Chemical Constituents from Stem Bark and Roots of *Clausena anisata*. Molecules 17:13673-13686.

Keane S., Ryan M.F. (1999) Purification, characterisation, and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, *Galleria mellonella* (L.). Insect biochemistry and molecular biology 29(12): 1097-1104.

Keiser J., Utzinger J., Funke V. (2005) Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. Lancet Infect Distribution 5: 695-708.

Kémeuzé V. A., Momo Solefack M. C., Nkongmeneck B., Decocq G., Jiofack T. & Johnson M. (2008) Variation altitudinale de la distribution des plantes à activité insecticide dans la forêt communautaire de Kilum-Ijim : cas de *Clausena anisata* (Willd.) Hook. f. ex-Benth. Bois et forêts des tropiques, 299 (1) :7.

Khadija R. (2002) Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. Thèse de Doctorat National. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, 155p.

Killeen, Mckenzie F., Foy B., Bogh C., Beier C. (2001) The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. *Malaria* 95: 469-476.

Legner E. (1995) Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. *Journal of Vector Ecology* 20: 59-120.

Lekel F., Wilfried, Mbacham F., Esther T., Talla N. (2010) Guide pratique de lutte contre le paludisme. *Etudes Africaines, Harmattan* 24:27.

Letouzey R. (1986) *Manual of forest botany, tropical Africa*. Nogent-sur-Marne, France, Centre technique forestier tropical, 2A et 2B, 461 p.

Letouzey R., (1985) Notice de la carte phytogéographique du Cameroun au 1/500 000. M-SM : Région afro-montagnarde et étage submontagnard. Institut de la carte internationale de la végétation 27-62.

Lyimo I., Ferguson H. (2009) Ecological and evolutionary determinants of host species choice in mosquito vectors. *Trends Parasitology* 25: 189-196.

Mainebau P. (1994) *La nouvelle Aromathérapie*. Edition Jakin Paris, 28-9.

Marimuthu G. (2010) Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *clausena anisata* (Willd.) Hook. *Journal Asian-Pacific Entomology*, 874-877.

Meryem A. B. (2009) Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires. Master Sciences et Techniques de l'Université de Fès, 64p.

Minsante (2011) Plan stratégique national de lutte contre le paludisme. Yaoundé : Ministère de la Santé publique du Cameroun, 2011-2015. 82p.

Molino J. (1994) Revision du genre *Clausena* Burm F. (Rutaceae). *History national*, 1 :105-153.

Mouchet J., Carnevale P. (1991) Les Vecteurs et la Transmission. Paludisme. Médecine tropicale ,Ellipses 35-53.

Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Lenoble R. D., Sircoulou J. (2004) Biodiversité du paludisme dans le monde. Editions John Libbey Euronext. Paris, 428p.

Mutero C., Blank H., Konradsen F., Van Der Hoek W. (2000) Water management for controlling the breeding of Anopheles mosquitoes in rice irrigation schemes in Kenya. Acta Tropical 76: 253-263.

Ndomo A., Tapondjou L., Tendonkeng F., Mbiopo T. (2009) Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). Tropicultura. 27: (3) 137-143.

Ngameni (2002) Utilisation des plantes à effets pesticides au Cameroun. Exposé atelier MINAGRI/ CPI-OUA.8p.

Nguemtchouin M. G. (2012) Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de *Xylopiya aethiopica* et d'*Ocimum gratissimum* sur des argiles camerounaises modifiée. Thèse Doctorat /Ph.D. Université de Ngaoundéré Cameroun, 293p.

Obeng-Ofori D., Reichmuth C., Bekele J., Hassanali A. (1997) Biological activity of 1,8-cineole, a major component of essential oil of *Ocimum kenyense* (Ayobangira) against stored product beetles. Journal of Applied Entomology 121: 237-243.

Ojewole J. A., (2002) Hypoglycaemic effect of *Clausena anisata* (Willd.) Hook. methanolic root extract in rats. Journal of Ethnopharmacology 81 (2): 231-237.

Ombito O., Japheth, Matasyoh C., Josphat & Vuvule M. (2014) Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum gillettii* essential oil against *Anopheles gambiae*. African Journal of Biotechnology 13: 2175-2180.

OMS. (1999) La lutte antivectorielle : Méthodes à usage individuel et communautaire. Chapitre 1 : Moustique et autres diptères piqueurs. OMS, Genève, Suisse 9-194.

OMS. (2003) Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs, Transmission du paludisme 7-8.

OMS. (2006) Paludisme: lutte antivectorielle et protection individuelle. Genève, 71p.

OMS. (2009) Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2010. Rapport mondial sur le paludisme 15p.

OMS. (2012) Répartition géographique du paludisme, santé et prévention. ICAR, France 45.

OMS. (2015) Stratégie Technique de lutte contre le Paludisme 2016-2030. Genève, Suisse, 33p.

Opende K., Suresh W., Dhaliwal G. (2008) Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopesticide Intern* 4(1): 63–84.

Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) (2012). Rapport d'activité 2011, Yaoundé-Cameroun 82p.

Rhodain F., Perez C. (1985) Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. Maloine, Paris 458 p.

Tchoumboungang F., Dongmo P. M. J., Sameza M. L., Nkouaya M. E. G., Tiako F. G. B., Amvam Zollo P. H., Menut C. (2008) Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement* 13 (1) : 77-84.

Teugwa M. C., Piam G., Tane O., Amvam Z. P. H. (2002) Activité insecticide des extraits d'*Ageratum houstonianum*, de *Clausena anisata* et de *Croton macrostachyus* sur la bruche du niébé (*Vigna unguiculata* Walp). *Food Africa* 1-4.

Usman L.A., Hamid A.A., Olowore N.O., Fakunle C.O., Oladosu I.A., Zubair M.F. (2010) Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Clausena anisata* Growing in north—Central Nigeria. Journal Applied Science Research 6 (6) :891-894.

Van why V., Mackinnon S., Van B. (2002).Antimicrobial Activity of leaf extract of *Clausena anisata* (Rutaceae). Journal of Natural Products, 60 (4), 336-341.

Vinayagam A., Senthikumar N., Ummaheswari A. (2008) Larvicidal activity of some Medicinal Plant Extracts Against Malaria Vector *Anopheles stephensis*. Research Journal Parasitology. 3 (2) : 50-58.

Vogel G., Angermann H. (1994) Atlas de la biologie. Librairie générale française. 1984-1994.

Weimin L., Wingying Li, Learn G., Also M. (2010) Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorilla. Nature. 467: 420-425.

William E., Geoffrey M. (2007) *Plasmodium malariae*: parasite and disease. Clinical Microbiology Reviews 20(4): 579-592.

World Health Organisation (WHO). (2000) Severe falciparum malaria. Malaria : 1-90.

World Health Organisation (WHO). (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. W.H.O., Geneva, 36p.

World Health Organisation (WHO). (2011) Rapport 2011 sur le paludisme dans le monde : résumé et points essentiels, 11p.

World Health Organisation (WHO). (2013) Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes. WHO Library Cataloguing in publication Data ISBN 978924 1505515.

Evaluation de l'Effet Insecticide de l'Huile Essentielle de *Clausena anisata* sur les Stades de Développement D'*Anopheles gambiae*, Giles 1902 Vecteur du Paludisme

World Health Organisation (WHO). (2014) Malaria prevention and control. W.H.O. Geneva. 167p.