

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Ibn Khaldoun, Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master académique

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Toxicologie et sécurité alimentaire**

Présenté par :

✍ **Bensaid Chaimaa**

✍ **Benyamna Aicha**

✍ **Benzerfa Chahira**

Thème

**Evaluation de l'Activité Insecticide Des Composés
Bioactifs Obtenus De l'*Azolla pinnata***

Soutenu le **04/07/2023**, devant le jury composé de :

Présidente	: Dr. Mokhfi Fatima Zohra	M.C.B	Université de Tiaret
Examinatrice	: Pr. Labdelli Fatima	Prof	Université de Tiaret
Encadrant	: Dr. Ali-Nehari Abdelkader	M.C.A	Université de Tiaret
Co-encadrant	: Dr. Djamai Wissam	M.C.B	Université de Tlemcen

Année Universitaire 2022-2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
السَّلَامُ عَلَيْكُمْ وَرَحْمَةُ اللَّهِ وَبَرَكَاتُهُ

Remerciements

Elhamdoulilah, qui nous a accordé la patience et la force de choisir le chemin de la connaissance, le chemin par lequel Son message à la création a commencé, et ce fut l'un des premiers mots commandés par Son Noble Messenger.

*Nos remerciements vont tout particulièrement à Monsieur **Ali Nehari Abdelkader**, maître de conférences en Biotechnologie qui a bien voulu assurer notre encadrement, c'est un très grand honneur pour nous qu'il ait accepté d'être notre promoteur. Nous lui devons une immense reconnaissance et un très grand respect.*

*Nos remerciements les plus sincères vont également à notre Co-Promotrice : **Dr Djamai Wissam**. Veuillez trouver ici l'expression de nos profonds sentiments de respect pour votre aimable contribution.*

*Nos remerciements vont au présidente **Dr. Mokhfi Fatima**, merci de nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider notre jury.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi au **Pr. Labdelli Fatima** qui a non seulement accepté d'examiner notre travail avec bienveillance mais aussi elle nous a aidé à identifier l'espèce de l'insecte et nous en sommes très honoré.*

Nous tenons à remercier toute l'équipe de laboratoire pour leur aide pratique, leur soutien moral et leurs encouragements.

Nos vifs remerciements vont aux travailleurs de la CCLS de wilaya de Tiaret pour leurs accueils et leurs aides.

Nos derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement pour l'aboutissement de ce travail.

Merci à tous

Dédicaces

*C'est avec profonde gratitude et sincère mots, que je dédie ce modeste
travail de fin d'étude à tous ceux que j'aime de près et de loin.*

*À mes premier personnes qui mérite le plus gros morceau de mon cœur,
mes parents qui ont sacrifié leur vie pour mon réussite et m'ont éclairé le
chemin par leurs conseils judicieux.*

*À mes chères sœurs Raihana, Meriem, khaoula et Khadidja. Pour leurs
encouragements et pour leur soutien moral et physique, que dieu leur
prête tout le bonheur.*

*Au mari de ma sœur Ishak pour son aide très précieuse dans les moments
les plus délicats.*

Aux enfants de mes sœurs Djihane, Narjes, Adam, Abd El hak, Nada.

A mon trinômes Aicha et Chahira et tous mes amis.



Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère

Aux personnes de valeur, mon père Wadah et ma mère Mokhtaria, pour fontaine d'amour, encouragements et sacrifices, que Dieu leurs inspire la santé et longue vie plein de bonheur.

A mes chères sœurs Zahra, Hadjer et Ahlem pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.

A mes chères frères Said, Mohamed et khaled pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

*A mes chères amies qui m'ont toujours ouvert les portes de l'espoir
Chaimaa et Chahira.*

A toutes mes amies et tous mes collègues de la promotion de Toxicologie et Sécurité Alimentaire (2022/2023).



Aicha



Dédicaces

*Avec l'aide de dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie
A Mon père qui m'a soutenu moralement tout au long de mes études.
Ma très chère mère en reconnaissance de son sacrifice, de ses précieux
conseils et de ses encouragements.*

A ma chère petite sœur nounou et toutes mes sœurs.

Aux enfants de ma sœur Maria, Alaâ et Abdessamad.

A ma grande mère.

A mon chère frère Lhadj.

A mes cousines.

A mes chères amies Chaimaa et Aicha pour les plus beaux moments.



Chahira



ملخص

تمثل المواد ذات الأصل الطبيعي، وخاصة المستخلصات النباتية، حالياً حلاً بديلاً لحماية المواد الغذائية المخزنة. يهدف هذا العمل إلى تقييم فعالية مستخلصات أزولا كمبيدات حشرية ضد الآفات الحشرية للمواد الغذائية المخزنة. أثناء تحضير المادة الجافة، تم إجراء عمليتي تجفيف لمقارنة إنتاجية المركبات النشطة بيولوجياً (التجفيف بالتجميد، وبالفرن). كما قد تم اختيار طريقتين لاستخراج المركبات النشطة الموجودة في العينات (النقع والتغلي)، باستخدام خمسة مذيبات مختلفة الأقطاب: ماء، ميثانول، ماء / ميثانول (20:80؛ حجم / حجم)، ماء / أسيتون (10:90؛ حجم / حجم) والكلوروفورم. تمت دراسة فعالية المستخلصات المتحصل عليها كمبيدات حشرية بطريقة الرش على اليرقات والبالغين لحشرة تريبوليوم كاستانيوم. أظهرت النتائج أن أفضل محصول تم تسجيله للعينات المجففة بالتجميد، وسجلت أعلى قيمة للمستخلص الميثانولي (14.01٪)، وأقل قيم لمستخلص الكلوروفورم كانت (5.4٪). كما أظهرت المستخلصات المختلفة سمية عالية ضد الحشرات خاصة المستخلص المائي 96٪.

كلمات دالة : أزولا ؛ المركبات النشطة بيولوجيا ، التجفيف بالتجميد، نشاط المبيدات الحشرية، تريبوليوم كاستانيوم.

RESUME

Les substances d'origine naturelle plus particulièrement les extraits des plantes représentent actuellement une solution alternative de lutte pour la protection des denrées stockés. Notre travail a pour objectif d'évaluer l'activité insecticide des extraits de l'Azolla, contre l'insecte ravageur de denrées stockées. Durant la préparation de la matière sèche, deux procédés de séchage ont été effectués pour comparer le rendement des composés bioactifs (lyophilisation, étuve). Deux méthodes ont été optées pour extraire les composés actifs présents dans les échantillons (macération et décoction), en utilisant cinq solvants de polarités différentes : eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ; v/v) et le chloroforme. L'activité insecticide des extraits obtenus a été étudiée par la méthode de pulvérisation sur les larves et les adultes de *Tribolium castaneum*. Les résultats ont révélé que le meilleur rendement a été noté pour les échantillons lyophilisés, la valeur la plus élevée a été enregistré pour l'extrait méthanolique (14.01 %), les plus faibles valeurs ont été noté pour l'extrait chloroformique de l'ordre de (5.4 %). Ainsi, les différents extraits ont montré une toxicité élevée particulièrement l'extrait aqueux avec 96%.

Mots clés : Azolla ; Composés bioactifs ; lyophilisation, Activité insecticide, *Tribolium castaneum*,

Abstract

Substances of natural origin, particularly plant extracts, currently represent an alternative solution for the protection of stored foodstuffs. Our work aims to evaluate the insecticidal activity of Azolla extracts, against the insect pest of stored foods. During the preparation of the dry matter, two drying processes were carried out to compare the yield of the bioactive compounds (freeze-drying, oven). Two methods were chosen to extract the active compounds present in the samples (maceration and decoction), using five solvents of different polarities: water, methanol, water/methanol (20:80; v/v), water/acetone (10:90; v/v) and chloroform. The insecticidal activity of the extracts obtained was studied by the spraying method on larvae and adults of *Tribolium castaneum*. The results revealed that the best yield was noted for the freeze-dried samples, the highest value was recorded for the methanolic extract (14.01%), the lowest values were noted for the chloroform extract of the order of (5.4%). Thus, the different extracts showed a high toxicity particularly the aqueous extract is 96%.

Keywords: Azolla; Bioactive compounds; freeze-drying; Insecticidal activity; *Tribolium castaneum*

Tables des Matières

Résumés	vii
Tables des matières	x
Liste des Abréviations	xii
Liste des Tableaux	xii
Liste des Figures	xiii

1^{ère} partie : Introduction Générale

Introduction	1
---------------------------	---

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes	7
I. 1. Objectif du travail... ..	7
I. 2. Lieu et durée du travail.....	7
I. 3. Matériels et produits	7
I. 3. 1. Matériel biologique	9
I. 3. 1. 1. Matériel végétal.....	9
I. 3. 1.2. Matériel animal.....	10
I. 4. Méthodes expérimentales	12
I. 4. 1. Préparation des échantillons.....	12
I. 4. 2. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'Azolla.....	14
I. 4. 2. 1. Extraction par macération.....	15
I. 4. 2. 2. Extraction par décoction.....	16
I. 4. 2. 3. Détermination du rendement d'extraction	17
I.4. 3. Valorisation des composés bioactifs obtenus	18
I. 4. 3. 1. Evaluation de l'activité insecticide	18
I.5. Analyses statistiques.....	20

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II. Résultats et Discussions	22
II. 1. Extraction des composés bioactifs	22
II. 1.1. Rendements des extractions	22
II. 1.1.1. Rendement d'extraction par décoction	23
II. 1.1.2. Rendement d'extraction par macération	23
II. 2. Evaluation de l'effet insecticide des extraits obtenus.....	25
II. 2.1. Impact de la méthode d'extraction sur l'activité insecticide des extraits	25
II. 2.1. 1. Par macération.....	25
II. 2.1. 2. Par décoction.....	27
II. 2.2. Impact du temps d'exposition sur l'activité insecticide des extraits	28
Conclusion	34
Références bibliographiques	37
Annexes	43

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
V/V	: Volume/volume
M ₁	: Masse de l'extrait sec obtenu exprimée en g
M ₀	: Masse initial de la matière sèche exprimée en g
R	: Rendement
MC (%)	: pourcentage de mortalité corrigée
M	: pourcentage de mortalité observée dans la population traitée
Mt	: pourcentage de mortalité observée dans la population témoin

Liste des tableaux

Tableau I.1 :	Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses	P.07
Tableau II.1 :	Rendement d'extraction de l'échantillon lyophilisé par les différents solvants utilisés.	P.22
Tableau II.2 :	Rendement d'extraction de l'échantillon séché par l'étuve avec les différents solvants utilisés.	P.23
Tableau II.3 :	Taux de mortalité des larves et adultes de <i>T. Castaneum</i> traité par les extraits de macération après 24heures.	P.25
Tableau II.4 :	Taux de mortalité des larves et adultes de <i>T. Castaneum</i> traité par les extraits de décoction après 24 heures	P.27

Liste des figures

Figure I.1 :	Protocol expérimental	P.08
Figure I.2 :	<i>Azolla pinnata</i>	P.09
Figure I.3 :	Site de l'échantillonnage de l'Azolla dans la région de Honaine, Wilaya de Tlemcen	P.09
Figure I.4 :	<i>Tribolium castaneum</i>	P.10
Figure I. 5 :	Dégâts causés par <i>Tribolium castaneum</i>	P.11
Figure I. 6 :	Elevage de masse de <i>Tribolium castaneum</i>	P.12
Figure I.7 :	Lyophilisateur ALPHA 1-2 LD plus	P.13
Figure I.8 :	Echantillons congelés	P.13
Figure I.9 :	Echantillons Lyophilisés broyés	P.13
Figure I.10 :	Broyage de la matière sèche	P.15
Figure I.11 :	Etapas d'extraction des composés bioactifs.	P.17
Figure I.12 :	Préparation des extraits.	P.18
Figure I.13 :	Application du traitement biologique par la pulvérisation.	P.19
Figure II.1 :	Taux de mortalité des larves et des adultes de <i>T.Castaneum</i> en fonction du traitement des différents extraits de la macération après 24 heures d'exposition	P.26
Figure II.2 :	Taux de mortalité des larves et des adultes de <i>T. Castaneum</i> en fonction du traitement des différents extraits de la décoction après 24 heures d'exposition	P.28
Figure II.3 :	Taux de mortalité des larves de <i>T. castaneum</i> traité par les extraits d' <i>Azolla pinnata</i> obtenus par macération en fonction du temps d'exposition	P.29
Figure II.4 :	Taux de mortalité des Adultes de <i>T. castaneum</i> traité par les extraits d' <i>Azolla pinnata</i> obtenus par macération en fonction du temps d'exposition	P.30

- Figure II.5 :** Taux de mortalité des larves de *T.castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par Décoction en fonction du temps d'exposition P.30
- Figure II.6 :** Taux de mortalité des larves de *T.castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par Décoction en fonction du temps d'exposition P.31

***Introduction
Générale***



Introduction générale

Les céréales occupent une place importante dans l'alimentation tant humaine qu'animale.

Elles constituent une source essentielle de nourriture de base pour une grande partie de la population mondiale et sont également largement utilisées dans l'alimentation animale (Ngamo et Hance., 2007). Les céréales telles que le blé, le riz, le maïs, l'avoine et l'orge sont riches en glucides, qui sont une source d'énergie essentielle pour le corps humain. Ils sont une bonne source de fibres alimentaires, qui favorisent la digestion, régulent la glycémie et contribuent à un système digestif sain. Ils peuvent fournir aussi différentes vitamines et minéraux, notamment les vitamines B, le fer, le zinc et le magnésium, en fonction du type de céréale consommée. Certaines céréales, comme le blé et le riz, contiennent une quantité modérée de protéines, ce qui en fait une source importante de protéines, en particulier dans les régimes végétariens (Southgate, 2007). Les industries de transformation des céréales produisent des sous-produits tels que le son et les remoulages de blé, qui sont utilisés comme ingrédients dans l'alimentation animale, contribuant ainsi à la valeur nutritionnelle globale de l'alimentation animale (Ratnadass, 2013).

Le stockage des céréales revêt une grande importance pour assurer la disponibilité alimentaire, tant au niveau humain qu'animal. Le stockage permet de conserver les excédents de récoltes pour les périodes où la production est réduite ou lorsqu'il y a une demande accrue et aussi pour les semences des campagnes agricoles à venir. Cela contribue à stabiliser l'offre alimentaire tout au long de l'année et à prévenir les pénuries alimentaires (Ngamo et Hance., 2007). Un stockage approprié, notamment en utilisant des entrepôts sécurisés, des conditions de température et d'humidité contrôlées, ainsi que des mesures de protection contre les ravageurs, peut réduire les pertes et maintenir la qualité des céréales sur le long terme. En revanche, les céréales sont généralement attaquées par des insectes, des champignons et des rongeurs (Zouxine, 2006). Les insectes du blé stocké représentent une partie très importante des ravageurs des céréales stockées, tels que *Sitophilus granarius*, *Rhyzoperta dominica* et *Tribolium castaneum*. (Kučerová *et al.*, 2003 ; Rahman *et al.*, 2007 ; Lorini, 2008). Les dégâts causés par ces insectes sont les plus importants (Inge de Groot, 2004 ; Ndomo *et al.* 2009). Ils peuvent



causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits stockés. Ces pertes sont de l'ordre de 10% à 40% dans des pays où les technologies modernes de stockage n'ont pas été introduites (Hignar, 1985).

Il existe plusieurs méthodes et techniques utilisées pour limiter les pertes dans les stocks de céréales. Des pratiques couramment appliquées comme le séchage approprié où les céréales doivent être séchées à un niveau d'humidité approprié avant d'être stockées, car une teneur en humidité élevée favorise la croissance de moisissures et de bactéries, ce qui peut entraîner une détérioration des grains. Autant, le nettoyage et triage des grains doivent pour éliminer les impuretés telles que les débris végétaux, les insectes et les grains endommagés. Le triage permet de séparer les grains de qualité de ceux qui sont endommagés, insectés ou pourris (Ngamo et Hance., 2007). Aussi, des méthodes de protection des grains peuvent être utilisées pour prévenir les attaques d'insectes et de ravageurs. Cela peut inclure l'utilisation d'insecticides, de fumigation ou de traitements chimiques appropriés (Hignar, 1985). Toutefois, ces insecticides chimiques peuvent induire une intoxication chronique des consommateurs, une résistance chez les ravageurs et avoir un impact négatif sur l'environnement. Pour réussir une protection efficace des denrées au cours du stockage, il faut trouver une alternative qui n'engendre pas des problèmes de santé ou toute nuisance aux consommateurs et à l'environnement. (Ngamo et Hance., 2007).

La lutte biologique est la méthode la plus favorisée comme alternative dans les programmes de recherche vis ses intérêts économiques et agro-environnementaux qui permettent le maintien d'un équilibre bioécologique (Amari *et al.*, 2014). Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie, comme bactéricides, fongicides, acaricides, etc., peuvent aussi être utilisées comme insecticides de remplacement. Ainsi, il a été prouvé que le règne végétal offre beaucoup de possibilités. Pour cela, de nombreux chercheurs s'orientent vers les moyens naturels et l'utilisation des insecticides d'origine végétale moins toxiques (Camara, 2009). En effet, l'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en l'occurrence le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (Crosby *et al.*, 1966).



De ce fait, le règne végétal, représentant une source d'une grande variété de molécules bioactives qui ont été mises à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie (Bahorun *et al.*, 1996). Ces molécules biologiquement actives sont des constituants extra nutritionnels participant dans les activités physiologiques ou cellulaires chez les humains et les animaux en fournissant des activités biologiques ; antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes protègent contre les troubles métaboliques (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Ils représentent une gamme diversifiée de molécules non nécessaires pour la vie des cellules mais jouant un rôle majeur dans l'interaction entre les cellules et l'environnement (Verpoorte et Alfermann, 2013).

Les plantes produisent des substances actives qui ont des propriétés insecticides, fongicides et même régulatrices de croissance sur les plantes et les insectes. D'après Jacobson (1989), plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées. Dans la plupart des cas, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui protègent initialement les plantes des herbivores. Le biopesticide d'origine végétale le plus couramment utilisé est l'huile de neem, un insecticide extrait des graines d'*Azadirachta indica* (Schmutterer, 1990).

Parmi les sources naturelles disponibles, nous avons une fougère aquatique appelée l'*Azolla*. L'*Azolla pinnta* est une fougère aquatique qui flotte à la surface des eaux calmes, tempérées ou tropicales, dans les champs de cresson, les rizières, les étangs et les canaux d'irrigation. Il possède des cyanobactéries du genre *Anabaena*, qui ont des propriétés fixatrices d'azote, c'est-à-dire la transformation de l'azote moléculaire atmosphérique en azote fixé assimilable par les plantes (Reynaud et Franche, 1985 ; Raoelina, 1995). C'est un bio-engrais courant dans la culture du riz (Chander et Kumar, 2017).

La valeur nutritive de l'*azolla* est bien documentée et elle est considérée comme une bonne source de protéines puisqu'elle contient environ 21-23 % de protéines brutes. Elle contient également des minéraux essentiels comme le fer, le calcium, le magnésium, le potassium, etc. et



des quantités appréciables de vitamines A et B-12 (Mathur G. 2013). Elle est considérée comme la plus prometteuse en raison de sa facilité de culture, du peu d'eau nécessaire à sa propagation, de sa forte productivité et de sa bonne valeur nutritive (Chander et Kumar, 2017).

Il existe au moins huit espèces d'azolla dans le monde ; *Azolla caroliniana*, *Azolla circinata*, *Azolla japonica*, *Azolla mexicana*, *Azolla microphylla*, *Azolla nilotica*, *Azolla pinnata* et *Azolla rubra* (Malek et al, 2008). *Azolla pinnata* est une petite fougère aquatique utilisée en médecine traditionnelle ; une tisane à base de l'Azolla permet de trouver rapidement le sommeil (Mada Flora, 2008). Elle est utilisée aussi en alimentation animale depuis de nombreuses années dans toute l'Asie et dans certaines régions d'Afrique pour nourrir les porcs, les canards, les poulets, les bovins, les poissons, les moutons, les chèvres et les lapins (Rajesh, 2020).

La dépollution des milieux aqueux avec la biomasse de l'Azolla est avérée efficace pour boisrober les métaux lourds tels que le Pb, Cd, Cu, et Zn. Cette productivité très élevée de la biomasse fait de l'Azolla une plante puissante pour la production de biodiesel (bioénergie) (Sebastian et al., 2021).

Dans des études précédentes, ils ont conclu que les extraits biologiques obtenus à partir d'Azolla ont plusieurs effets tels que ; Activité antioxydant, antibactérien (Chander et Kumar, 2017). Il existe donc un besoin de produire de substances bioactives purifiées pour une utilisation dans un large champ d'application. Parmi les différentes étapes qui constituent l'analyse et l'identification des molécules bioactives, l'étape d'extraction; c'est une étape primordiale puisqu'elle déterminera la qualité et la quantité des molécules extraites, et assurera par conséquent, le succès des étapes suivantes.

Les procédés d'extraction étaient jusque-là utilisées et considérées comme technique de choix pour extraire les composés naturels tel que la macération, la décoction, la congélation /décongélation, et l'extraction par l'utilisation des solvants (Moraes *et al.*, 2011).



De ce fait, la valorisation des molécules obtenues de cette fougère aquatique autant qu'agents thérapeutiques est un potentiel économique important et un alternatif à l'utilisation des produits synthétiques et des agents classiques. En fait, ce travail de recherche s'inscrit dans ce contexte avec l'objectif d'évaluer l'activité insecticide des extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par différents solvants organique et différentes méthodes d'extraction.

Notre travail comporte donc trois parties :

1. Récolte de l'*Azolla pinnata* et préparation de la matière sèche
 - *Séchage par lyophilisation et par le four avant le broyage.*
2. Extraction des composés bioactifs
 - *Macération et Décoction.*
 - *Comparaison des rendements d'extraction de différentes méthodes et solvants*
3. Valorisation des extraits bioactifs de l'*Azolla*
 - *Evaluation de l'activité insecticide.*

***Partie
expérimentale***

Chapitre 1

Matériel & Méthodes

**I. Matériel et Méthodes :****I.1. Objectif du travail :**

L'objectif de ce travail consiste à l'évaluation de l'effet insecticide des composés bioactifs obtenus de l'*Azolla pinnata*. Ainsi que l'optimisation de l'extraction de ces composés, application et usage en lutte biologique.

I.2. Lieu et durée de travail :

Ce travail de recherche a été réalisé au laboratoire pédagogique de science alimentaire de la Faculté de science de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun-Tiaret durant la période entre le 05 Février jusqu'à le 05 Avril. La lyophilisation a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie à l'Université de Tlemcen.

I.3. Matériels et produits :

Le matériel du laboratoire utilisé est représenté en différentes verreries et outils. Aussi une série de produits et réactifs chimiques ont été utilisés pour la réalisation de ce travail de recherche. Ils sont représentés dans le Tableau I.1.

Tableau I. 1 : Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses.

Verrières	Appareils	Produits et réactifs
▪ Ballon en verre.	▪ Etuve.	▪ Eau distillée.
▪ Béchers.	▪ Agitateur.	▪ Méthanol.
▪ Entonnoirs.	▪ Balance électrique.	▪ Acétone.
▪ Eprouvettes.	▪ Réfrigérateur.	▪ Chloroforme.
▪ Erlenmeyer.	▪ Montage à reflux	▪ DMSO 1%
▪ Fioles jaugées.	▪ Thermomètre	
▪ Micropipettes.	▪ Une loupe binoculaire	
▪ Boîtes en verre.		
▪ Boîtes pétri.		
▪ Verre à montre.		
▪ Bouteilles d'évaporation en verre.		
▪ Papiers filtre whatman.		
▪ Papier aluminium.		
▪ Etiquettes.		
▪ Pince		

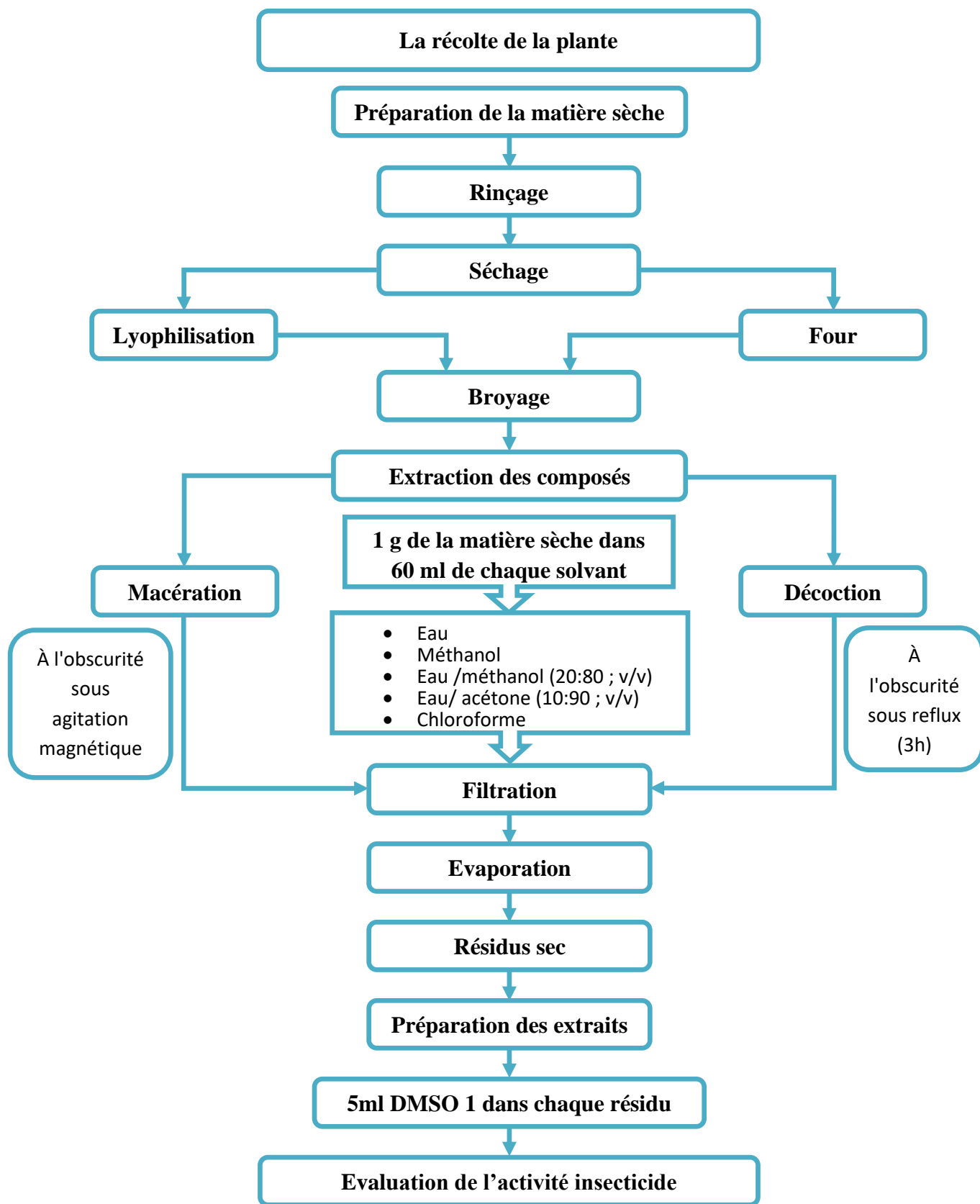


Figure I. 1: Protocole expérimental.

I.3.1. Matériel biologiques :

I.3.1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé pour la réalisation de ce travail est une petite fougère aquatique; l'*Azolla pinnata* (Figure I.2); flottant librement à la surface des écosystèmes d'eaux douces.



Figure I. 2: *Azolla pinnata* (originale).

▣ La récolte des échantillons de l'Azolla :

La récolte des échantillons de l'Azolla a été faite le *04 Février 2023* au niveau de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Le prélèvement des échantillons se fait manuellement à partir des bassins de culture (Figure 3). Les échantillons doivent être transportés dans une glacière. Leur conservation doit se faire à 4°C et à l'obscurité au laboratoire jusqu'à la préparation pour l'analyse.



Figure I. 3: Site de l'échantillonnage de l'Azolla dans la région de Honaine- Tlemcen (originale).

1.3.1.2. *Matériel animal* :

Le matériel animal utilisé pour notre étude est les larves et les insectes de blé. La collecte des insectes (larves, adulte) a été faite au niveau de la CCLS (coopérative de céréales et de légumes secs) wilaya de Tiaret où le stockage de blé. Il existe plusieurs espèces d'insectes ravageurs, on trouve en particulier les espèces de *Tribolium castaneum*, *Sitophilus granarius* et le *Trogoderma granarium*. Nous nous sommes intéressées de travailler avec le *Tribolium castaneum* car il est le plus abondant dans les silos de blé.

▣ *Généralité sur Tribolium castaneum* :

T. castaneum appelé communément le Tribolium rouge de la farine ou petit ver de la farine. (Lepesme, 1944 et Myers *et al.*, 2014). C'est un ravageur des denrées alimentaires stockées, surtout connu dans les régions tropicales et subtropicales. L'adulte mesure de 3 à 4 mm, de couleur uniformément brun rougeâtre (Christine, 2001). Dans les pays du sahel africain, cet insecte cause des dégâts importants au niveau des stocks des céréales (Roorda *et al.*, 1982). Les adultes et les larves ne s'implantent généralement dans les grains qu'après les attaques de ravageurs primaires qui leur ouvrent la porte, ou lorsque les grains sont brisés (Seck, 1992), son élevage est peu couteux, sans danger, et sans odeur.



(a) Larves de *T. castaneum*.



(b) Adulte de *T. castaneum*.

Figure I. 4 : *T. castaneum* (Originale).



▣ *Classification :*

D'après (Perrier, 1961) ; et (Weidner et Rack, 1984), *Tribolium castaneum* occupe la position systématique suivante :

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Sous Embranchement	<i>Antennates</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Sous Classe	<i>Ptérygotes</i>
Ordre	<i>Coléoptère</i>
Sous ordre	<i>Polyphaga</i>
Famille	<i>Tenebrionidae</i>
Genre	<i>Tribolium</i>
Espèce	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst, 1797)



Figure I. 5 : *Dégâts causés par Tribolium castaneum.*

▣ *Elevage :*

Le traitement insecticide vis avis des insectes demandent de nombreux individus issus des élevages en masse.

L'élevage de masse des insectes, a été réalisé au niveau de laboratoire des sciences alimentaire de l'Université Ibn khaldoun-Tiaret, dans un bocal en verre contient des grains de blé



endommagées, et placé dans une étuve réglée à une température de 37°C et une humidité relative à 70%.

Pour séparer les insectes (larves et adultes) des grains de blé, nous avons utilisé un tamis de diamètre 0,5mm.



Figure I. 6 : *Elevage de masse de Tribolium castaneum (Originale).*

I.4. Méthodes expérimentales :

I.4.1. Préparation des échantillons :

Les échantillons d'Azolla ont été soigneusement lavés avec de l'eau du robinet suivie d'un rinçage à l'eau distillée et d'un séchage. Afin d'évaluer l'effet de la méthode de préparation des échantillons sur le rendement d'extraction ; deux méthodes de séchages ont été utilisées, séchage par lyophilisation et par le four.

La lyophilisation a été réalisée par un lyophilisateur de type *Christ Martin ALPHA 1-2 LD plus* (Figure I.7) au niveau du laboratoire de recherche en chimie – Université de Tlemcen. L'échantillon congelé d'Azolla environ 100 g (Figure I.8) a été introduit directement dans le lyophilisateur sous vide pendant 48h où la température a été réduite à -51 °C et la pression a 0.011 mbar.



La poudre fine a été obtenue à partir de la matière séchée en utilisant un broyeur mélangeur de cuisine pour la matière séchée par le four et par un mortier pour la matière lyophilisée (Figure I.9). La poudre végétale a été stockée sous dessiccateur afin de l'utiliser pour l'obtention des extraits.



Figure I. 7 : Lyophilisateur ALPHA 1-2 LD plus (*Originale*).



Figure I. 8 : Echantillons congelés (*Originale*).



Figure I. 9 : Echantillons Lyophilisés broyés (*Originale*).



I.4.2. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'Azolla :

Les composés bioactifs constituent un groupe de produits naturels qu'il convient d'explorer pour leurs propriétés antioxydants, anti microbiennes, anti-inflammatoires et anti carcinogènes ou mutagènes (Epifano et al., 2007).

Selon Alalade et al. (2006), la farine d'*Azolla pinnata* contient 21,4% de protéines brutes, 12,7% de fibres brutes, 2,7% d'extrait à l'éther, 16,2% de cendres et 47,0% de glucides. L'analyse chimique de *A. pinnata* séché au soleil pendant 3 jours a montré qu'il contient 88,80% de matière sèche, 25,46% de protéines brutes, 2,66% d'extrait à l'éther, 14,80% de fibres brutes, 41,58% d'azote libre, et 15,5% de cendres totales.

Dans cette étude, nous avons essayé d'étudier la possibilité d'utiliser des extraits bioactifs de la matière sèche de l'*Azolla pinnata* comme un insecticide. Les molécules bioactives des plantes tel que les lipides, sont stockés au sein des cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi. Leur extraction nécessite donc souvent une étape visant à rompre les parois cellulaires afin de les rendre accessibles aux solvants (Dejoye Tanzi, 2013).

Holm-Hansen & Riemann (1978), Riemann (1980), Herbland et al. (1985) et Wright et al. (1997) ont montré que le méthanol pouvait être avantageusement utilisé comme solvant, car il permet une extraction encore plus rapide sans broyage. Bien que le méthanol ait été recommandé comme un solvant plus efficace et plus rapide pour l'extraction des pigments de différents groupes d'algues (Rai, 1973 ; Sand-Jansen, 1976), il n'a pas encore réellement remplacé l'acétone dans les études océanographiques (Christophe Migon, 2004).

Dans notre étude nous avons commencé par l'extraction des composés actifs présents dans l'*Azolla* séché par deux méthodes (lyophilisation et four). Pour cela, on a utilisée deux procédés d'extraction, extraction par Macération et par Décoction en utilisant cinq solvants de polarités différentes : eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ; v/v) et le chloroforme.



(a) Matière sèche avant le broyage.



(b) Matière sèche après le broyage.

Figure I. 10 : Broyage de la matière sèche (*Originale*).

1.4.2.1. Extraction par macération :

Principe :

La macération consiste à exposer la matière végétale en poudre à un solvant pendant des périodes prolongées pour extraire les ingrédients actifs. Il est extrait à température ambiante, ce qui a l'avantage de préserver les substances thermosensibles (Bouchouka, 2016).

Mode opératoire :

1g de chaque échantillon de poudre végétale (lyophilisé, four) sont mises à macérer dans des différents mélanges de 60ml de chaque solvants (eau ; méthanol ; eau/méthanol 80/20 : v/v; eau /acétone 90/10 : v/v ; chloroforme), l'ensemble étant couvert avec une couche du papier aluminium à l'obscurité sous agitation magnétique (25°C pendant 24 heures).

Les mélanges sont filtrés sur un papier filtre Wathman (n° :1), puis évaporés dans une étuve à 44°C pour l'obtention d'un résidu sec.



1.4.2.2. *Extraction par décoction :*

Principe :

La décoction est une méthode d'extraction des composés actifs de préparations végétales générales en les dissolvant dans un solvant approprié (généralement de l'eau), en supposant que les substances ne résistent pas à la chaleur. Il est généralement appliqué sur les parties les plus dures de la plante : racines, graines, écorce, bois (Sophie *et al.*, 2003).

Mode opératoire :

1g de matière sèche de la plante de chaque type (lyophilisé, four) a été mélangé avec 60 ml de chaque solvants (eau ; méthanol ; eau/méthanol 80/20 : v/v ; eau/acétone 90/10 : v/v ; chloroforme), l'ensemble étant couvrir avec une couche du papier aluminium et soumise sous reflux dans l'obscurité (à 25°C pendant 3h).

Les mélanges sont filtrés, puis évaporés dans l'étuve à 44 °C pour l'obtention d'un résidu sec.



(a) Poudre d'*Azolla pinnata* (1g).



(b) Ajout de 60ml de chaque solvant.



(c)- Macération- Agitation à l'obscurité (24h).



(d)- Décoction- Sous reflux à l'obscurité (3h)



(e) Filtration.



(f) Evaporation des solvants.



(g) Les résidus secs.

Figure I. 11 : Etapes d'extraction des composés bioactifs.

1.4.2.3. Détermination du rendement d'extraction :

Le rendement est exprimé en pourcentage massique par rapport à la quantité de matière sèche selon la formule :

$$R(\%) = \left[\frac{M_1}{M_0} \right] \times 100$$

D'où :

R (%): Rendement des extraits.

M₁: Masse de l'extrait sec obtenu exprimée en g.

M₀: Masse initial de la matière sèche exprimée en g.

1.4.3. Valorisation des composés bioactifs obtenus :

1.4.3.1. Evaluation de l'activité insecticide :

▣ Préparation des extraits :

Chacun des extraits secs obtenus par les deux méthodes d'extraction (macération, décoction), de l'échantillon lyophilisé seulement, sont dissoudre dans le DMSO de volume de 5ml, et versé dans des flacons vaporisateurs en verre, puis conserver au réfrigérateur à 4°C jusqu'à l'utilisation.



(a) Ajout de DMSO.



(b) Remplissage des extraits dans les flacons.

Figure I. 12 : Préparation des extraits (Originale).



❑ **Tests insecticides :**

Ce test consiste à étudier l'effet des composés bioactifs de *l'Azolla pinnata* sur la mortalité des adultes et des larves de *T. castaneum*.

Les techniques de mesure de l'activité insecticide des extraits naturels ont de grands impacts sur le résultat. La technique d'application consiste à pulvériser les insectes par la solution des 05 extraits de différents solvants (Figure I. 12).

Les larves et les adultes sont repartis séparément dans des boites de pétri. Chaque boite contient 10 individus avec quelque grain de blé infesté pour leur aliment, trois répétitions ont été effectuées pour chaque solvant plus un témoin. Le taux de mortalité a été calculé après 8, 16 et 24 heures respectivement.

❑ **Calcul du pourcentage de mortalité :**

Le pourcentage de mortalité chez les larves et les adultes de *T. castaneum* est traité et calculé par la formule suivante :

$$\text{Mortalité observée} = \left[\frac{\text{Nombre d'individus morts}}{\text{Nombre total des individus}} \right] \times 100$$



Figure I. 13 : Application du traitement biologique par la pulvérisation (Originale).



▣ *Correction de mortalité :*

Le nombre d'individus mort dans une population traitée par un produit toxique ne représente pas le nombre réel d'individus influencés par ce produit toxique.

La formule D'ABBOT, (1925) permet de corriger la mortalité :

$$MC(\%) = \frac{M - M_t}{100 - M_t} \times 100$$

MC (%) : pourcentage de mortalité corrigée

M : pourcentage de mortalité observée dans la population traitée

Mt : pourcentage de mortalité observée dans la population témoin

I.5. **Analyses statistiques :**

Les manipulations ont été réalisées en triplet et l'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel statistique informatisé ANOVA. Les valeurs ont été exprimées en tant que moyennes \pm écart-type.

Chapitre 2
Résultats &
Discussions



II. Résultats et discussions

Le présent chapitre comprend les résultats et leur interprétation obtenus des différentes analyses qui ont été effectuées afin d'évaluer le rendement d'extraction des deux méthodes et les cinq solvants utilisés pour l'obtention des composés bioactifs, ainsi que l'évaluation de leur activité insecticide.

II.1. Extraction des composés bioactifs :

L'extraction des composés bioactifs est nécessairement une opération complexe et délicate. Elle a pour but, en effet, de décomposer les parois cellulaires pour extraire les composés bioactifs enfermés dans les cellules. Pour cette raison on a utilisés des différents solvants pour faciliter leur extraction et comparer leurs rendements respectifs.

II.1.1. Rendements des extractions :

Les rendements d'extraction varient considérablement en fonction de la méthode de séchage utilisée et la méthode d'extraction adoptée.

Les résultats de l'extraction des deux échantillons de la poudre de l'*Azolla pinnata* par les deux méthodes et dans les différents solvants utilisés sont représentés dans les *Tableau II.1 et II.2*.

Tableau II. 1 : Rendement d'extraction de l'échantillon lyophilisé par les différents solvants utilisés.

Solvant Utilisé	Rendement d'extraction (%)	
	Macération	Décoction
Méthanol	13.9	14.01
Eau / méthanol	10.02	11.16
Eau / acétone	8.2	8.8
Chloroforme	4.3	5.4
Eau	13.03	13.18
M ± SD	9.89 ± 3.8	10.51 ± 3.4



Tableau II. 2 : Rendement d'extraction de l'échantillon séché par l'étuve avec les différents solvants utilisés.

Solvant Utilisé	Rendement d'extraction (%)	
	Macération	Décoction
Méthanol	8	9
Eau / méthanol	6.66	7.01
Eau / acétone	4.66	5.3
Chloroforme	2.6	3.6
Eau	8.3	10.6
M ± SD	6.04 ± 2.4	7.10 ± 2.8

II.1.1.1. Rendement d'extraction par décoction :

Nous avons constaté que pour la méthode de décoction, le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction pour les deux échantillons lyophilisé et séchés par l'étuve soit respectivement (14.01% et 9%), suivi par l'eau (13.18% et 10.6%), Alors que le chloroforme a donné le plus faible rendement avec (5.4% et 3.6%). L'extraits obtenus par les deux solvants eau / acétone et eau / méthanol, leur rendement varient entre 11.16% et 5.3 % pour les deux échantillons.

II.1.1.2. Rendement d'extraction par macération :

Le rendement le plus élevée obtenu par macération a été enregistré pour l'extrait méthanolique de (13.9% et 8%), suivi par l'extrait aqueux de (13.03% et 8.2%) lyophilisé et séchés par l'étuve, respectivement.

Tandis que les rendements d'extraction enregistrés pour les solvants; eau/méthanol, eau/acétone, chloroforme varient entre 2% et 10%.

Il est évident que le rendement d'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, l'organe utilisé pour l'extraction, le stade de la plante, les conditions de séchage et à la nature du solvant utilisé au cours de l'extraction ou du fractionnement. Les rendements d'extraction correspondent au pourcentage du principe actif dissout dans le solvant organique utilisé pour l'extraction par rapport au poids du végétal utilisée pour l'extraction (Kemassi, 2014).



D'après les résultats d'extraction ci-dessus, on a pu constater que la matière sèche de l'Azolla qui a été séché par lyophilisation a fait augmenter significativement le rendement d'extraction. Mphahlele *et al.*, (2016), ont démontrées que la meilleure méthode de séchage pour conserver les phénols totaux de grenade est la lyophilisation par rapport au séchage au four. D'après Galaz *et al.*, (2017), les températures élevées de séchage diminuent la teneur en polyphénols. La bonne méthode est nécessaire pour extraire les composants chimiques souhaités de la plante pour son application ultérieure. Donc, la lyophilisation est souvent considérée comme la technique la plus efficace pour préserver le composé sensible à la température (Al-Rawahiet *et al.*, 2013).

Les échantillons qui sont décocté enregistrent des valeurs élevées par rapport à ceux qui sont macérés. Ces résultats sont très proche à ceux obtenus par Mahmoudi *et al.*, (2013), qui ont trouver que les meilleurs rendements d'extraction de polyphénols totaux, de flavonoïdes et de tanins condensés d'artichaut par quatre solvants (eau, méthanol, éthanol et acétone), sont enregistrés par la décoction soit une moyenne de 17.34 % versus 15.64 % pour la macération.

Ainsi, le temps d'extraction qui est généralement très long dans la macération (24h) par rapport à la décoction (3h) peut avoir un impact sur le rendement d'extraction. Selon Rhazi *et al.*, (2015), la progression de temps d'extraction peut diminuent le rendement de l'extrait, et cela peut être due à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols.

Quant à l'effet du solvant utilisé, il a été remarqué que les meilleurs rendements d'extraction sont enregistrés pour l'extrait méthanolique et l'extrait aqueux, ce qui montre que le méthanol est un solvant très efficace pour l'extraction, car il apporte une forte polarité de fixation des composés bioactifs, et il est facile à évaporé, ainsi il est largement utilisé pour extraire les composés de la plante. Nos résultats sont en concordance avec lceux d'Aroussi *et al.*, (2021), qui ont rapporté que le rendement le plus élevé de l'extraction de la matière sèche de l'Azolla, a été enregistrées pour l'extrait méthanolique avec (26.5%).

Selon Quy Diem Do *et al.*, (2014), les rendements d'extraction ont augmenté avec l'augmentation de la teneur en eau dans les systèmes d'éthanol, d'acétone et de méthanol. Cela peut être dû au fait que la combinaison du solvant organique et de l'eau a facilité l'extraction de tous les composés solubles dans l'eau et les solvants organiques.



II.2. Evaluation de l'effet insecticide des extraits obtenus:

Afin de tester l'effet insecticide des composés bioactifs de l'*Azolla*, nous n'avons utilisé que les extraits obtenus de la matière sèche lyophilisée. Ce qui fait, nous nous sommes intéressés par l'étude de l'effet des deux méthodes d'extraction (macération et décoction) et la polarité des cinq solvants utilisés.

Les résultats obtenus ont permis de déterminer l'effet insecticide des molécules bioactives présentes dans l'*Azolla pinnata* évalué à travers la mortalité enregistrée chez les adultes et les larves de *Tribolium castaneum* par un test de contact à différentes périodes après traitement. Les résultats sont présentés dans l'ensemble des figures et tableaux ci-après.

II.2.1. Impact de la méthode d'extraction sur l'activité insecticide des extraits :

Nous avons mené deux techniques d'extraction dans notre étude pour déterminer l'efficacité des composés extraits d'*A. pinnata* comme insecticides.

Il est à noter qu'une mortalité a été observée dans les lots des atteints 3/10 individus. Donc, la toxicité des phyto préparations brutes a été estimée par évaluation de la mortalité corrigée.

II.2.1.1. Par macération :

Les taux de mortalité trouvés chez les individus traités par des extraits obtenus par macération après 24 heures sont présentés dans le tableau II.3.

Tableau II. 3 : Taux de mortalité des larves et adultes de *T. Castaneum* traité par les extraits de macération après 24 heures.

Individus	Extraits				
	Méthanol	Eau/méthanol	Eau/acétone	Eau	Chloroforme
Larves	84,44 %	50 %	76 %	40 %	40 %
Adultes	55,55 %	90 %	22,22 %	60 %	43 %



❖ *Sur les larves :*

L'observation des boîtes de pétri des larves traitées par les différents extraits a révélé que l'extrait méthanolique a donné une mortalité très élevée soit 84.44%, suivi par l'extrait d'eau/acétone qui a enregistré une mortalité forte de 76%.

Le pourcentage de mortalité par l'extrait méthanolique aqueux a été moyen de 50%. Alors que le taux de mortalité le plus faible a été enregistré avec le chloroforme et l'extrait aqueux avec 40% de mortalité.

❖ *Sur les adultes :*

Pour les boîtes de pétri des individus adultes traités par les différents extraits, la mortalité causée par l'extrait méthanolique aqueux a été très forte, atteinte 90%, suivi par l'extrait aqueux qui a donnée 60% de mortalité. Tandis que, l'extrait de méthanol avait un pourcentage de mortalité moyen soit 55.55%. Et le chloroforme enregistrait 43% de mortalité.

Alors que l'extrait acétonique aqueux n'exerçait qu'une faible activité insecticide sur la forme adulte avec 22.22% seulement.

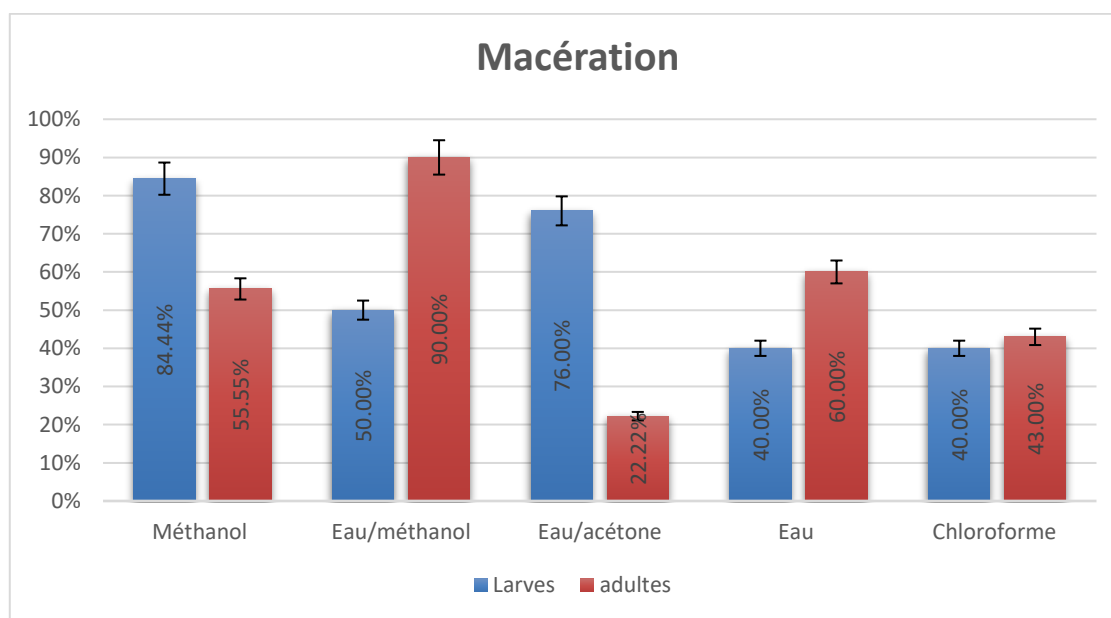


Figure II. 1 : Taux de mortalité des larves et des adultes de *T.Castaneum* en fonction du traitement des différents extraits de la macération après 24 heures d'exposition.



Ces résultats ont montré que pour les adultes de *T. castaneum* c'est l'extrait méthanolique aqueux qui est le plus efficace, par contre sur les larves c'est plutôt l'extrait méthanolique pure qui s'est avéré le plus toxique.

Plusieurs études ont été faites sur l'effet insecticide des plantes sur le *Tribolium castaneum*. Bounechada et Arab, (2011) ont examiné le pouvoir toxique de deux plantes, *Melia azedarach* et *Peganum harmala* sur les larves et les adultes de ce ravageur, le mélange de poudre des fruits de ces plantes avec la semoule donne des mortalités de 100 % pour *Peganum harmala* et une mortalité très significatif pour *Melia azedarach*, et pour les deux stades de développement (larve et adulte). Mouaz et Mokhtaria, (2017) ont trouvées que l'extrait méthanolique de la plante *Rhamnus alaternus* a révélé une toxicité remarquable avec une mortalité de 80 %. Selon les résultats de Norshaida et al., (2018), l'extrait méthanolique d'*Azolla pinnata* a entraîné une activité larvicide plus élevée contre les larves de *Aedes albopictus* par rapport à l'extrait d'acétone.

II.2.1.2. Par décoction :

Les taux de mortalité trouvés chez les individus traités par les extraits obtenus par décoction après 24 heures sont présentés dans le tableau II.4.

Tableau II. 4 : Taux de mortalité des larves et adultes de *T. Castaneum* traité par les extraits de décoction après 24 heures.

Individus	Extraits				
	Méthanol	Eau/méthanol	Eau/acétone	Eau	Chloroforme
Larves	43 %	76 %	56 %	96 %	46 %
Adultes	30 %	80 %	62,22 %	96 %	50 %

❖ Sur les larves :

A travers l'observation des boîtes de pétri des larves traitées par les différents extraits obtenus par décoction, nous avons pu constater que l'extrait de l'eau a occasionné une mortalité



nettement supérieure atteinte 96 %. Et l'extrait méthanolique aqueux a présenté une mortalité élevée de 76 % par rapport à celle qui a obtenus par l'extrait d'eau/acétone qui a donné 56%.

Alors que, les extraits de chloroforme et du méthanol agissent moyennement sur les larves avec des taux de (46% et 43%), respectivement.

❖ *Sur les adultes :*

Sur les individus adultes, l'extrait aqueux s'est montré plus toxique avec un taux de mortalité de 96%, ainsi l'extrait méthanolique aqueux provoque une mortalité élevée de 80%, alors que l'extrait acétonique aqueux agit moyennement avec un pourcentage de 62.22%, suivi par l'extrait de chloroforme avec un taux de mortalité de 50%. Alors que, l'extrait du méthanol agit faiblement avec un taux de 30% de mortalité.

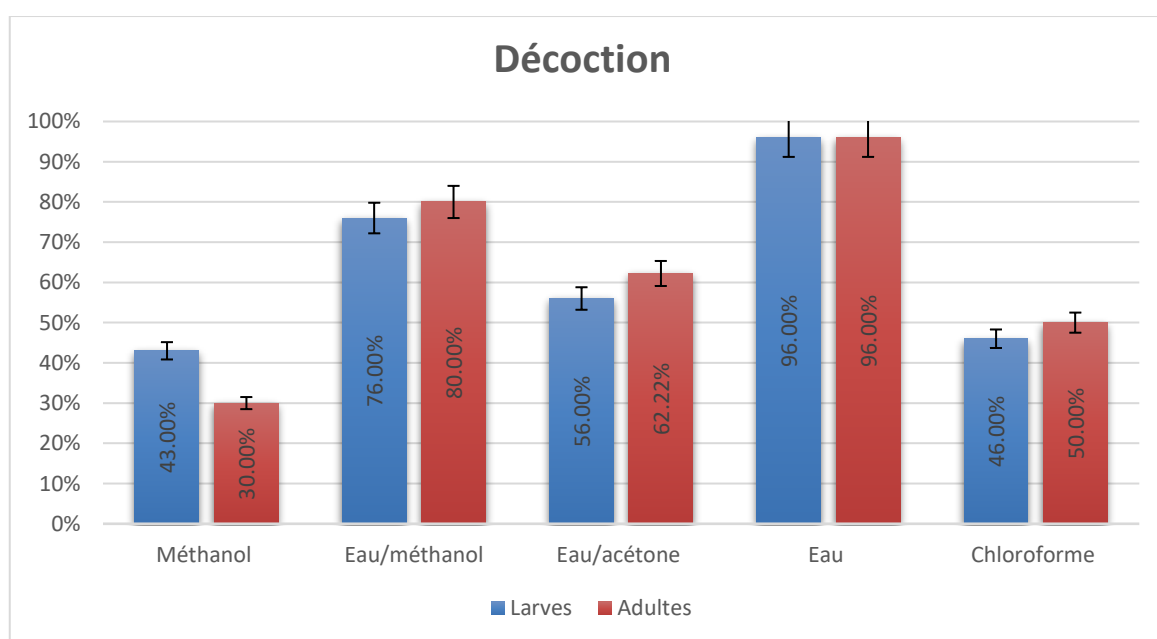


Figure II. 2 : Taux de mortalité des larves et des adultes de *T. Castaneum* en fonction du traitement des différents extraits de la décoction après 24 heures d'exposition.

À la lumière de ces résultats, l'extrait aqueux s'avère le plus toxique à l'égard des larves et adultes. Nos résultats sont en concordance avec ceux rapporté par Karahacane, (2015), qui a révélés que l'activité insecticide des extraits aqueux sur les adultes de *T.castaneum*, sont les plus toxiques parmi les autres extraits testés.



II. 2.2. Impact du temps d'exposition sur l'activité insecticide des extraits :

Nous avons essayé d'étudier l'effet du temps de contact des extraits aux individus larves et adultes durant ce travail. De ce fait, la lecture de la mortalité a été faite après chaque 8h jusqu'à 24h. Les résultats sont présentés dans les figures II.3-II.6.

Il a été constaté que la mortalité moyenne des adultes et des larves de *T. Castaneum* augmente en fonction de la durée d'exposition aux extraits utilisés par contact, puisqu'il a été enregistré une augmentation de la mortalité au fur et à mesure qu'on avance dans le temps d'exposition.

L'efficacité des extraits a commencé dès la première lecture (après 8h) pour tous les extraits à l'exception de l'extrait méthanolique qui n'a donné effet qu'après 10h. Par contre, l'extrait aqueux était très efficace avec un taux de 60% de mortalité dès la première lecture. En effet, la mortalité des individus a augmenté majoritairement après 16 heures d'exposition.

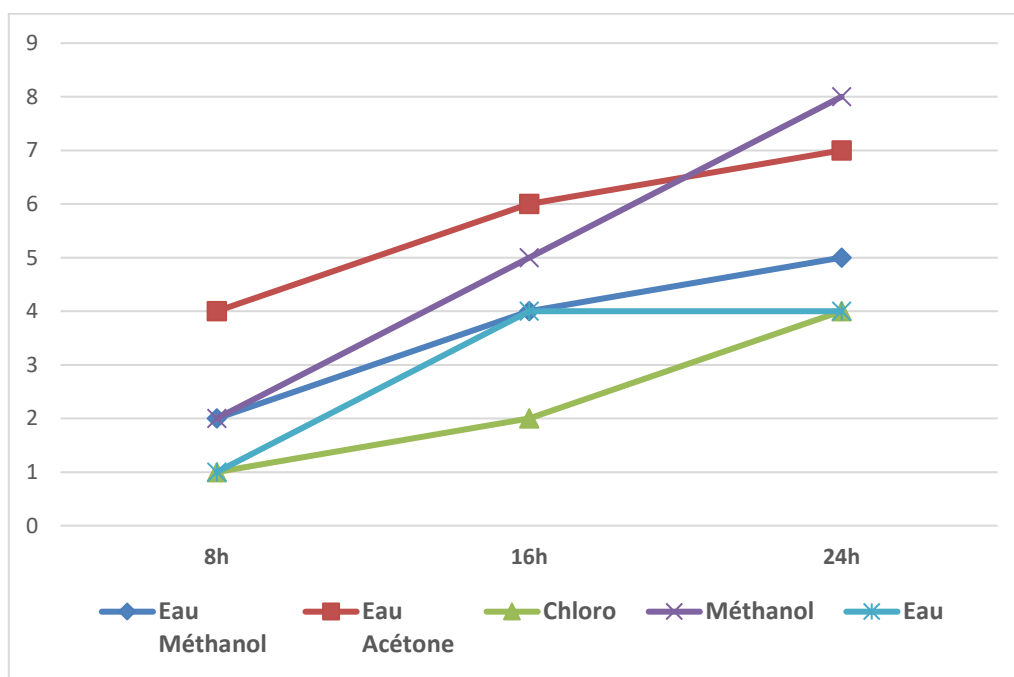


Figure II. 3 : Taux de mortalité des larves de *T. castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par macération en fonction du temps d'exposition.

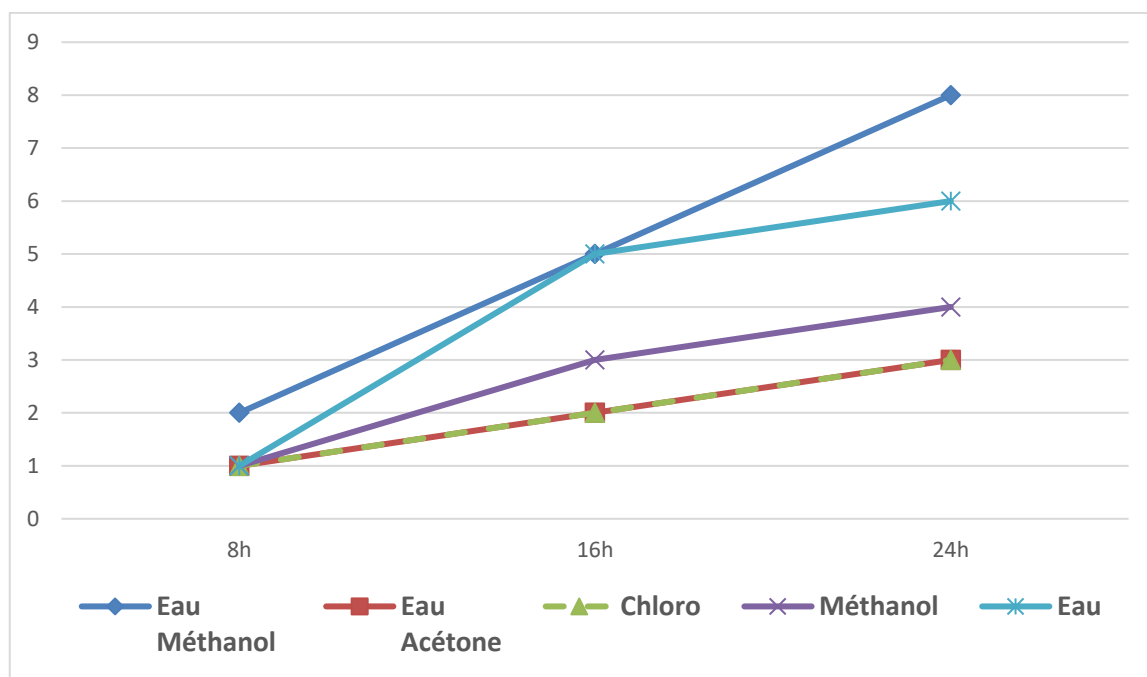


Figure II. 4 : Taux de mortalité des Adultes de *T. castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par macération en fonction du temps d'exposition.

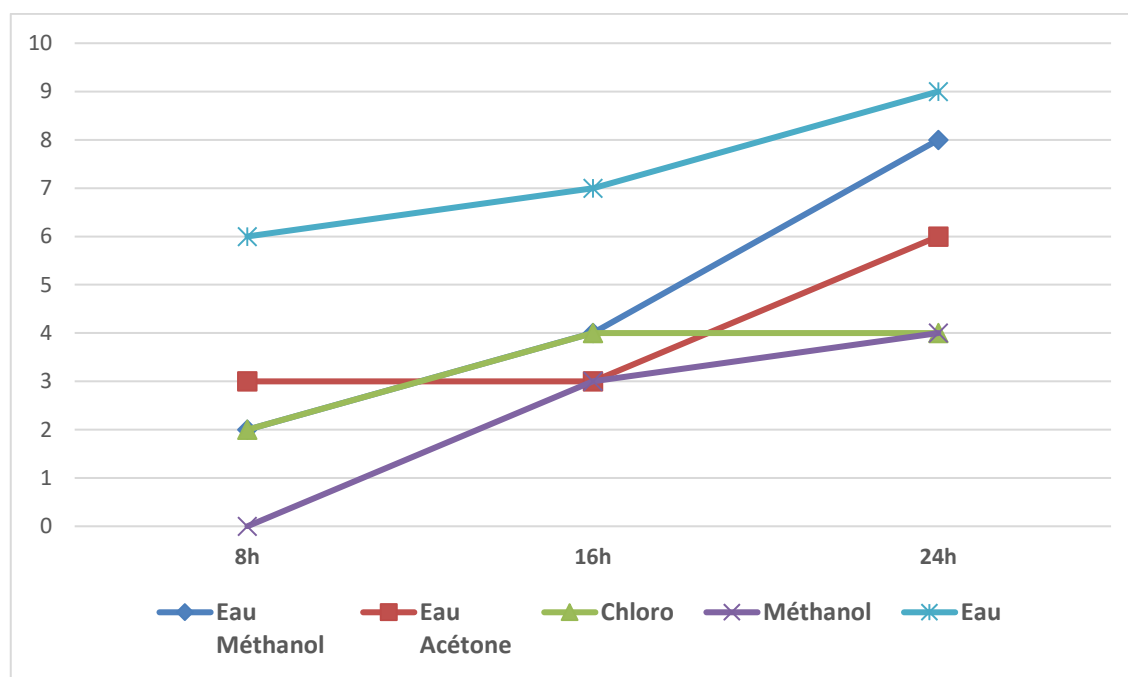


Figure II. 5 : Taux de mortalité des larves de *T. castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par Décoction en fonction du temps d'exposition.

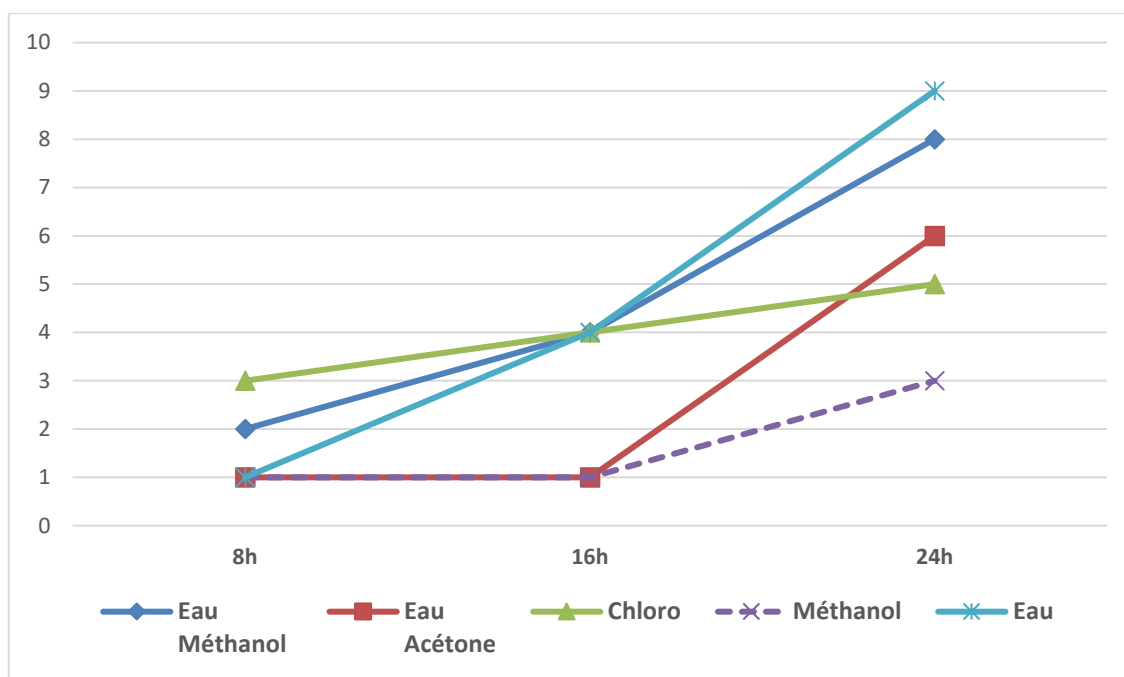


Figure II. 6 : Taux de mortalité des Adultes de *T.castaneum* traité par les extraits d'*Azolla pinnata* obtenus par Décoction en fonction du temps d'exposition.

D'après les résultats trouvés pour l'évaluation de l'activité insecticide, nous avons constaté ce que suit :

La matière sèche d'*A. pinnata* a donné un bon résultat pour sa toxicité sur les individus de *Tribolium castaneum*. Cette efficacité est confirmée par la mort des larves et des adultes de ce ravageur. Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de molécules biologiquement actives. La plante *Azolla pinnata* a un potentiel en tant que bio-insecticide pour résoudre les problèmes de résistance d'un seul composé chimique (Rajiv Ravi, 2018).

Le pouvoir insecticide de cette fougère serait dû à la présence des composés phénoliques, des tanins et des saponines (Ekanayake *et al*, 2007). L'effet insecticide de ces constituants a été mentionné par plusieurs auteurs. Les composés phénoliques ont des propriétés à la fois pesticides et fongicides. Les tanins possèdent des propriétés insecticides, larvicides et répulsives (Wardell, 1987).



Des études antérieures ont montré que ces composés naturels pouvaient provoquer des symptômes indiquant une activité neurotoxique, tels que l'hyperactivité, des convulsions et des tremblements suivis de paralysie et de mort de l'insecte qui sont très similaires aux effets produits par les insecticides pyréthrinoïdes (Bentouati *K et al*, 2021).

L'analyse comparative de ces résultats montre alors qu'il existe une corrélation positive entre polarité de l'extrait testé et le stade de développement de l'insecte tué. D'après Basséne, (2001), qui affirme qu'un solvant polaire dissout mieux un soluté polaire qu'un solvant apolaire. On pourrait penser que cette différence d'activité biologique liée à la polarité de nos divers produits biocides ne pourrait être due qu'à un écart quantitatif et/ou qualitatif des composés actifs qui s'y présentent.

Conclusion



Conclusion

L'utilisation des insecticides de synthèse de plus en plus réglementé pour la protection de l'environnement, est à l'origine de la plupart de pollution des biotopes, ainsi que l'apparition de nombreux insectes résistants. Le recour à l'utilisation de bio insecticide d'origines végétales se révèle être une démarche alternative pour préserver les denrées stockées et d'éviter l'effet le plus toxique des insecticides de synthèse.

L'objectif de la présente étude était d'évaluer l'effet insecticide des extraits obtenus de l'*Azolla pinnata* qui est une fougère aquatique de la famille des salvinaceae, récolté de la wilaya de Tlemcen sur les larves et les adultes de *Tribolium castaneum*.

Dans le but d'optimiser les conditions d'extraction, deux procédures de séchage (lyophilisation et étuve), ainsi que deux méthodes d'extraction (macération et décoction) ont été optées avec l'utilisation de cinq solvants différents. Les résultats de l'étude comparative montrent que la lyophilisation est la meilleure méthode de préparation d'échantillon et la décoction est la meilleure méthode d'extraction. Le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique (14.01 %), cependant, la plus faible valeur a été notée pour l'extrait chloroformique (5.4%).

Aussi, les résultats obtenus révèlent que tous les extraits présentent une action insecticide par effet contact. Cette toxicité varie en fonction des extraits expérimentés. L'activité insecticide de l'extrait aqueux de l'*azolla pinnata* a donné une mortalité très élevée sur les larves et les adultes avec 96 % de taux de mortalité.

La toxicité évolue également avec la durée de traitement puisqu'il a été enregistré une augmentation de la mortalité au fur et à mesure qu'on avance dans le temps d'exposition. Les adultes de *T. castaneum* sont plus sensibles que les larves à l'effet insecticide de cette fougère.

Le test effectué peut confirmer que le traitement des denrées stockées par les extraits obtenus des Azollas peut être très efficace pour lutter contre les ravageurs de ces denrées.



*I*l serait intéressant de compléter cette recherche, par l'investigation des concentrations des extraits qui peuvent donner le meilleur effet et aussi tester d'autres espèces d'insectes.

*D*onc il est nécessaire d'orienter la recherche vers la possibilité de la valorisation de cette fougère aquatique pour des intérêts économiques. Ainsi que l'optimisation des méthodes d'extraction et d'identification pour mieux cibler les molécules bioactives de diverses utilisations.

***Références
Bibliographiques***



Références bibliographiques:

1. **Al-Rawahi A.S., Rahman M.S., Guizani N., et Essa M.M. (2013).** Chemical composition, water sorption isotherm, and phenolic contents in fresh and dried pomegranate peels. *Drying technology*. Vol : 31, P 257-263.
2. **Amroune N. (2020).** Alimentation du lapin : valorisation de l'Azolla dans l'alimentation des lapins étude bibliographique. Mémoire de master. Université Akli Mohand Oulhadj. BOUIRA.
3. **Aouin A., Khelifi N. (2018).** Evaluation de l'effet répulsif de *Cuminum cyminum* L. et *Foeniculum vulgare* Mill. sur l'insecte des céréales stockées *Tribolium castaneum* (Herbst). Mémoire de master. Université Mohamed Boudiaf - M'SILA. Algérie.
4. **Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., Mahari S. (2006).** Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol : 10, P 67 – 71.
5. **Aroussi M., Benattou F., Bendjilali Z. (2021).** Etude de pouvoir antibactérien des composés bioactifs issus de l'azolla et optimisation des conditions de leur extraction. Mémoire de master. Université Ibn Khaldoun – Tiaret.
6. **Becking J.H. (1985).** Nitrogen fixation by the Azolla-Anabaena azolla symbiosis. International Atomic Energy Agency (IAEA). Vol : 14, P 10.
7. **Belouaer R., Selahdja A. (2020).** Synthèse bibliographique sur les méthodes de lutte contre les ravageurs des denrées stockées. Mémoire de master. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy. Bordj Bou Arréridj. P 1.
8. **Bentouati K., Djaiz A. (2021).** Evaluation de l'effet larvicide et adulticide des huiles essentielles de *Thymus palleescens* (de Noé.) et *Cymbopogon citratus* (Stapf.) contre *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797). Mémoire de master. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy B.B.A. P 25.
9. **Bentoumi I., Boukhalfa S. (2019).** Dosage des composés phénoliques et détermination de l'activité antioxydante de *Linum usitatissimum* L. Mémoire de master. Université Mohamed El Bachir El Ibrahimy - B.B.A. P 16.



10. **Berbache A., Radaoui N., Triche F. (2022).** Effet de stress salin sur la culture et les principes actifs d'*Azollapinnata*. Mémoire de master. Université Mohamed Boudiaf - M'Sila. P 9.
11. **Bouthaina Ben A. (2008).** Maîtrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs : texturation par détente instantanée contrôlée (DIC). Thèse de docteur. Université de La Rochelle. Français.
12. **Camara A., 2009.** Lutte contre *Sitophilus oryzae* L. (coleoptera:curculionidae) et *Tribolium castaneum* herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales. Thèse de Doctorat. Université du Québec à Montréal. 154 p
13. **Chander H., Kumar G. (2017).** A Study on the Potential of *Azollapinnata* as Livestock Feed Supplement for Climate Change Adaptation and Mitigation. *Asian J. Adv. Basic Sci.* Vol : 5, P 65-68.
14. **Damerdji A., Bouklikha A. (2009).** Effet de quatre variétés d'haricots sur la durée du cycle de développement de la bruche *Acanthoscelides obtectus* (coleoptera, bruchidae). *Journal of Science & Technology.* Vol : 14, P 161– 173.
15. **Dejoye Tanzi, C. (2013).** Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France.
16. **Deravel J., Krier F., Jacques Ph. (2014).** Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol : 18, P 220-232.
17. **Ekanayake, D. H., Weeraratne, T. C., De Silva, W. A. P. P., & Karunaratne, S. H. P. P. (2007).** Potential of some selected larvivorous fish species in *Aedes* mosquito control. *Proceedings of the Peradeniya University Research Sessions, Sri Lanka.* Vol : 12, P 98-100.
18. **Epifano F., Genovese S., Menghini L. and Curini M., 2007.** Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry.* Vol : 68, P 939-953.



19. Galaz P., Valdenegro M., Ramírez C., Nuñez H., Almonacid S., et Simpson R. (2017). Effect of drum drying temperature on drying kinetic and polyphenol contents in pomegranate peel. *Journal of food engineering*. Vol : 208, P 19-27.
20. Hédji C., Diane N.S., Kpoguè G., Marcel R., Emile D. (2014). Valorisation de Azolla spp, Moringa oleifera, son de riz, et de co-produits de volaille et de poisson en alimentation animale : synthèse bibliographique. *Journal of Applied Biosciences*. Vol : 81, P 7277 – 7289.
21. Herbland A., Le Bouteiller A., Raimbault P. (1985). Size structure of phytoplankton biomass in the Equatorial Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* Vol : 32, P 819-836.
22. Holm-Hansen O., Riemann B. (1978). Chlorophyll a determination : improvements in methodology. *Oikos*, Vol : 30, P 438-447.
23. Huignard J. (1985). Importance des pertes dues aux insectes ravageurs des graines : problèmes posés par la conservation des légumineuses alimentaires sources de protéines végétales. CNRS UA. Vol : 20, P 193-204.
24. Jacobson M. (1989). Botanical pesticides, past present and future. *Insecticides of plant origin*. American Chemical Society Symposium. Series 387, p. 1-10.
25. Karahacane Tahar., (2015). Activité insecticide des extraits de quelques plantes cultivées et spontanées sur les insectes du blé en post récolte. Thèse de doctorat. École nationale supérieure agronomique d'Alger.
26. Kemassi A., Herouini A., Hadj A. S., Cherif R., OuldElhadj M. D. (2019). Effet insecticide des extraits aqueux d'euphorbia guyoniana (euphorbiaceae) récoltée dans oued sebseb (sahara algérien) sur le tribolium castaneum. *Lebanese Science Journal*, Vol : 20 P 55-70.
27. Lehout R., Laib M. (2015). Comparaison de trois méthodes d'extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes à partir de la plante médicinale : Artemisia herba alba Asso. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri Constantine. P 42.
28. MadaFlora. (2008). <https://www.madaflora.com/vertu-des-plantes.php>. Consulté le 13 mai 2023.



29. **Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013).** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus L.*). *Nature & Technology*. (9), P 35..
30. **Malika, A., Zohra, B. F., & Zohra, B. (2021).** Etude Du Pouvoir Antibactérien Des Composés Bioactifs Issus De l'Azolla Et Optimisation Des Conditions De Leur Extraction. Mémoire de master. Université Ibn Khaldoun – Tiaret.
31. **Michael B., Wenzel U., Schuierer K., Gurmai M., Grünwald S. (2014).** The red flour beetle *Tribolium castaneum* allows for the convenient determination of fitness and survival as a measure of toxic effects of the food contaminant acrylamide. *Food Additives & Contaminants*. Vol : 31, P 1826–1833.
32. **Moraes C., Luisa S., Cerveira G., Kalil S. (2011).** C-phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* wet biomass. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. Vol : 28, P 45-49.
33. **Mphahlele R.R., Fawole O.A., Makunga N.P., et Opara U.L. (2016).** Effect of drying on the bioactive compounds, antioxidant, antibacterial and antityrosinase activities of pomegranate peel. *BMC complementary and alternative medicine*. Vol : 16, P 1-12.
34. **Ndomo A., Tapondjou A., Tendonkeng F., Tchouanguep M., (2009).** Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera ; Bruchidae). *TROPICULTURA*. Vol : 27, P 137-143.
35. **Ngamo L., Th Hance. (2007).** Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. *TROPICULTURA*. Vol : 25, P 215-220.
36. **Quy Diem Do., Angkawijaya A.E., Tran-Nguyen P.L., Huong Huynh L., Soetaredjo E.F., Ismadji S., Yi-Hsu J. (2014).** Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. [Journal of Food and Drug Analysis](#). Vol : 22, P 296-302.
37. **Radhia A. (2018).** Effet insecticide des plantes *Melia azedarach L.* et *Peganum harmala L.* sur l'insecte des céréales stockées *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera, Tenebrionidae). Mémoire de magister. Université Ferhat Abbas-SETIF. P 38.
38. **Rahman S., Rahman M., Khan M., Begum S., Roy B., Shahed S. (2007).** Ethanolic extract of melgota (*Macaranga postulata*) for repellency,



- insecticidal activity against rice weevil (*Sitophilus oryzae*). *African Journal of Biotechnology*. Vol : 6, P 379- 383.
- 39. Raimbault P., Lantoine F., Neveux J. (2004).** Dosage rapide de la chlorophylle-a et des phéopigments-a par fluorimétrie après extraction au méthanol. Comparaison avec la méthode classique d'extraction à l'acétone. *Océanis*. Vol : 30, P 189-205.
- 40. Rajiv Ravi., Nor S., Husna Z., Nurul N., N Raihan ., Yusoff, Mohd S. Mat Rasat, 2018.** Chemical composition and larvicidal activities of *Azolla pinnata* extracts against *Aedes* (Diptera: Culicidae). *Plos One*. Vol : 13. e0206982.
- 41. Rechededdine M., Messali M. (2022).** Etude théorique des méthodes de stockage des denrées cas de l'OAIC TEBESSA. Mémoire de master. Université de Larbi Tébessi-Tébessa. Algérie.
- 42. Sebastian A., Deepa P., Narasimha Vara M. (2021).** Azolla Farming for Sustainable Environmental Remediation. *Handbook of Assisted and Amendment-Enhanced Sustainable Remediation Technology*. First Edition. 517-532pp
- 43. Seck D. (1992).** Importance économique et développement d'une approche de lutte intégrée contre les insectes ravageurs des stocks de maïs, de mil et de niébé en milieu paysan. *La post-récolte en Afrique*. P 155-160.
- 44. Wardell, D. A. (1987).** Control of termites in nurseries and young plantations in Africa: established practices and alternative courses of action. *The Commonwealth Forestry Review*. Vol : 66 P 77-89.

Annexes



Annexe 1

Fiche Technique de l'Azolla

Azolla, ou mousse des fées, est une vraie fougère aquatique, une plante flottant en surface de plans d'eau calme, décorative et raffinée. Elle a sa place dans une potée aquatique ou un mini-jardin placé sur une terrasse.

Espèces d'Azolla

Azolla caroliniana



aquatique de Caroline
10 mm de long.

- **Nom commun** : Mousse des fées, fougère
- **Végétation** : Les frondes vertes mesurent de 5 à 10 mm de long.
- **Qualités** : Formant un épais tapis jusque 4 cm d'épaisseur, la mousse des fées est facilement récoltée

La fougère de Caroline, *Azolla caroliniana*, est une petite fougère annuelle qui croît dans des eaux chaudes et bien ensoleillées. Initialement originaire de la région de Brasilia au Brésil, on la trouve jusqu'aux États-Unis, dans l'état de Caroline, et aussi au Mexique et aux Antilles. Parfois qualifiée de plante envahissante, voire de peste d'eau, elle a colonisé les eaux stagnantes en Europe et en Asie

Azolla filiculoides



- **Nom commun** : Fausse fougère.
- **Végétation** : Les frondes mesurent de 10 à 20 mm.
- **Qualités** : Excellente fixatrice d'azote de l'air avec une activité intense de la cyanobactérie symbiotique.

La fausse fougère, *Azolla filiculoides*, forme un adorable tapis mousseux, vert à l'ombre, brun-rouge si l'exposition est ensoleillée. Comme la lentille d'eau, elle recouvre totalement la surface à condition d'être placée dans une eau chaude, non calcaire, contenant quelques matières organiques en suspension. Elle est originaire du continent américain, du sud des États-Unis (Californie) jusqu'en Argentine, en passant par le Brésil, le Chili, etc. C'est l'espèce la plus résistante, poussant même jusqu'à 5 000 mètres d'altitude dans les Andes.

Azolla pinnata



- **Nom commun** : Fougère flottante.
- **Végétation** : Les frondes, jusque 25 mm de long, brunissent ou rougissent avec une forte lumière.
- **Qualités** : Système racinaire très fourni. Ramifications plus abondantes.

L'Azolla pennée ou fougère flottante, *Azolla pinnata*, se rencontre rarement dans le commerce en Europe, elle ne diffère des autres espèces que par quelques données méristiques et son origine géographique : Afrique de l'Est, Asie et Australie.

Azollaen résumé

Dénomination

Nom(s) commun(s) Fougère aquatique, Mousse des fées

Nom(s) latin(s) *Azolla*

Famille Azollacées

Esthétique

Couleur des feuilles  

Végétation Annuelle

Feuillage Semi-persistant



Type(s) de plante Plante ornementale ▶ Plante à feuillage décoratif ▶ Plante de bassin ▶ Flottantes

Hauteur à maturité < 0,15 m

Jardinage

Entretien	Facile 🖐️
Besoin en eau	Important 💧💧
Croissance	Rapide
Multiplication	Division
Résistance au froid	Fragile ❄️
PH du sol	Sol nature / Sol acide

Emplacement

Exposition	☀️ Soleil ☀️ Mi-ombre
Utilisation intérieure	Véranda / serre chaude
Utilisation extérieure	Balcon ou terrasse / bassin
Plantation	Plante aquatique

Plantation de l'Azolla



Une eau acide et douce est appréciée, mais l'Azolla tolère aussi d'autres conditions de culture. L'ensoleillement peut être très intense mais elle accepte de croître dans l'ombre, en dessous d'un couvert végétal aérien, par exemple.

Quand planter l'Azolla ?

L'Azolla hivernant, l'implantation commence en eau relativement chaude, lorsque la température nocturne de l'eau ne descend plus en dessous de 12-15 °C, mais mieux vaut viser 15 à 18 °C de température minimale. Cette fougère est un végétal tropical qui apprécie la chaleur.

Comment la planter ?

Déposer librement quelques fougères à la surface d'un plan d'eau douce chaude, cela suffit.

Où la planter ?

La fougère aquatique flottante demande quelques dizaines de centimètres d'eau douce chaude : un bassin de jardin assez chaud ou un aquarium tropical conviennent bien.

Attention : les eaux avec du courant ou des vagues rapides brisent la plante !

Culture et entretien de l'Azolla

Un plan d'eau peut être intégralement revêtu d'une couche dense d'Azolla, laquelle forme un tapis de « velours » qui évince les autres plantes.

La mousse des fées peut survivre à des températures d'eau de 5 °C l'hiver, avec une croissance d'été optimale entre 25-30 °C. Toutefois, il s'agit d'une **plante gélive à considérer comme une annuelle** sous nos latitudes. Il est également possible de la conserver en intérieur dans un simple bac d'eau douce pour la réimplanter au printemps suivant.





Taille de l'Azolla

Il n'y a pas de taille à proprement parler à faire avec l'Azolla. Sa multiplication pouvant la conduire à devenir envahissante, au point de totalement recouvrir le plan d'eau, il faut ôter quelques sujets afin d'éclaircir.

Récolte

Quand et comment récolter ?

L'Azolla est parfois considérée comme une peste des cours d'eau parce que ses tapis denses réduisent l'oxygène dans l'eau.

Récoltez-la de mai à octobre

L'espèce *Azolla caroliniana* forme des tapis denses (3 à 4 cm de frondes superposées) très faciles à récolter, en particulier en Asie où la fougère est utilisée tant comme engrais que comme nourriture pour la volaille.

Multiplication de l'Azolla

La plante se reproduit par voie végétative quand les « branches » se détachent de l'axe principal, ou sexuellement quand les sporocarpes disposés sur les feuilles libèrent des spores. Il n'y a donc rien à faire pour observer l'Azolla se multiplier.



Maladies, nuisibles et parasites

La fougère aquatique ne craint pas grand-chose des autres végétaux, surtout avec la cyanobactérie symbiotique abritée, mais le charançon *Stenopelmus rufinus* est utilisé comme agent de lutte biologique pour gérer *Azolla filiculoides* ; il attaque également *A. pinnata*.

Un peu d'histoire

Les Azolla, ou mousses des fées, sont exploitées en Asie depuis des centaines d'années dans les rizières pour leur capacité à dégager de l'azote une fois mélangées à la terre, mais aussi pour leur capacité d'épuration de divers polluants (incluant certains métaux lourds) de l'eau.

On a découvert des enregistrements fossiles de mousses des fées datant des dernières périodes interglaciaires en plusieurs lieux d'Europe.

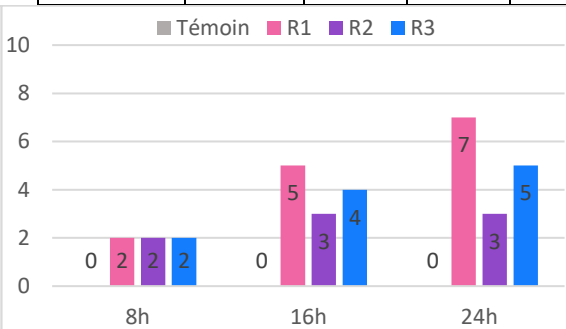
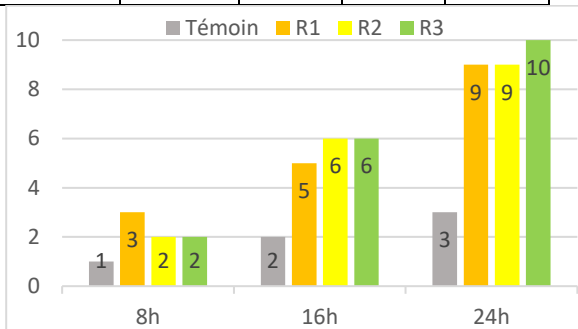


Annexe 2 Tableaux et Graphes

Macération Eau + Méthanol

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	1	3	2	2
16h	2	5	6	6
24h	3	9	9	10

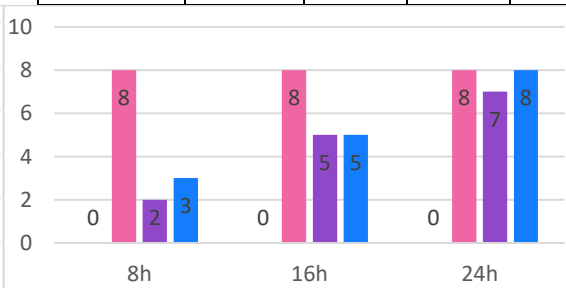
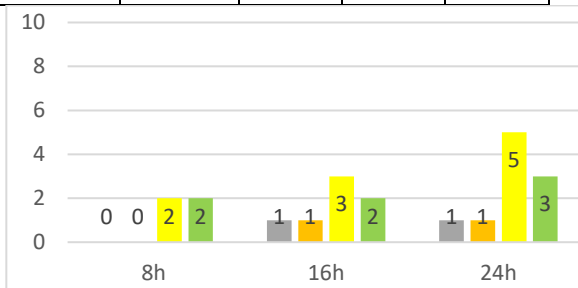
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	2	2
16h	0	5	3	4
24h	0	7	3	5



Eau + Acétone

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	0	2	2
16h	1	1	3	2
24h	1	1	5	3

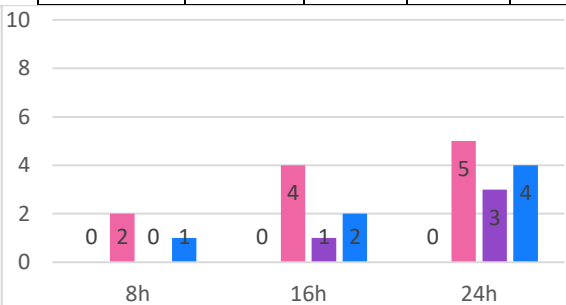
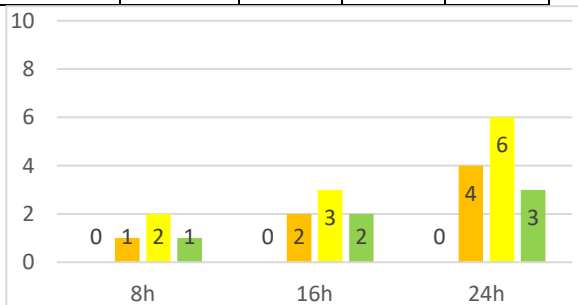
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	8	2	3
16h	0	8	5	5
24h	0	8	7	8



Chlorofome

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	1	2	1
16h	0	2	3	2
24h	0	4	6	3

Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	0	1
16h	0	4	1	2
24h	0	5	3	4

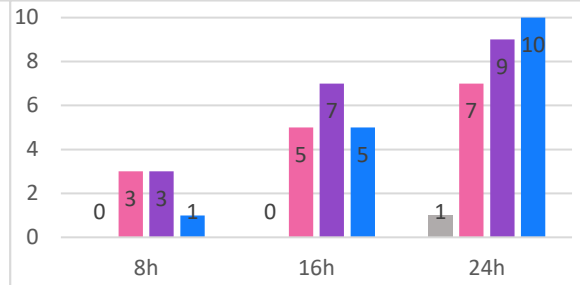
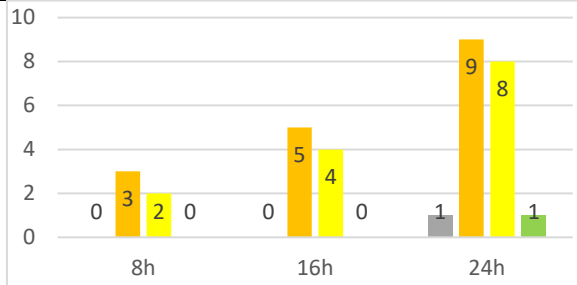




Méthanol

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	3	2	0
16h	0	5	4	0
24h	1	9	8	1

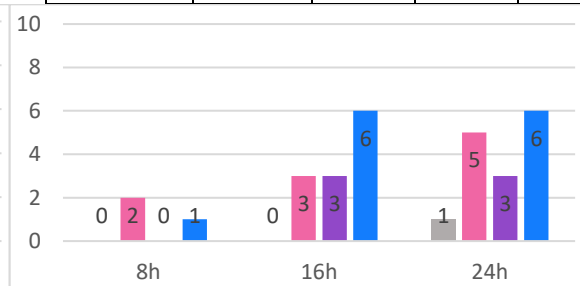
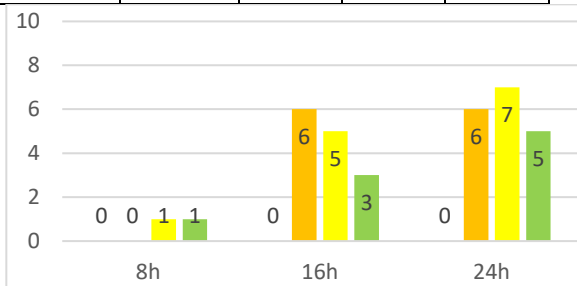
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	3	3	1
16h	0	5	7	5
24h	1	7	9	10



Eau

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	0	1	1
16h	0	6	5	3
24h	0	6	7	5

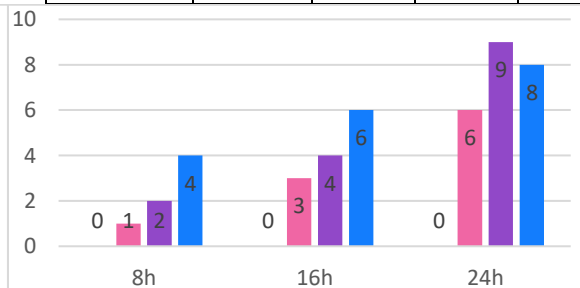
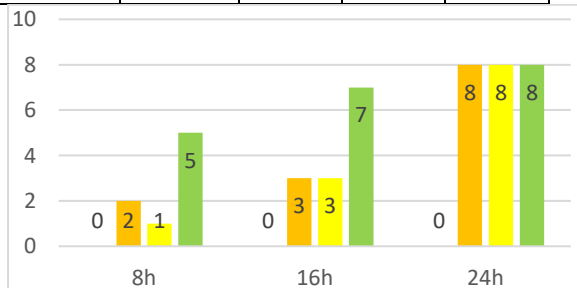
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	0	1
16h	0	3	3	6
24h	1	5	3	6



Décoction Eau + Méthanol

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	1	5
16h	0	3	3	7
24h	0	8	8	8

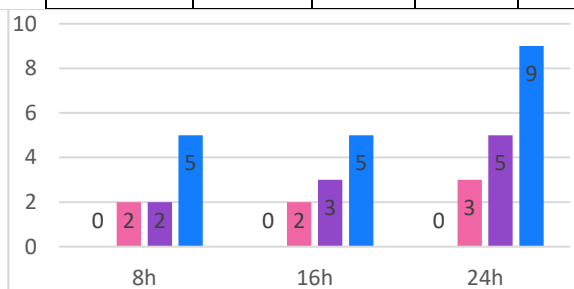
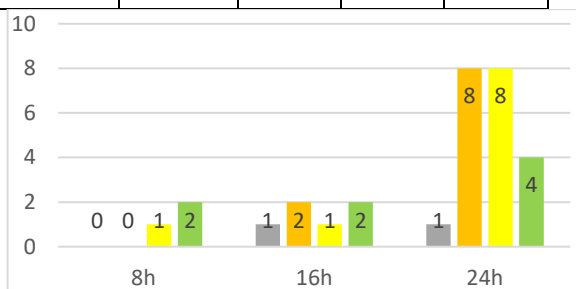
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	1	2	4
16h	0	3	4	6
24h	0	6	9	8



Eau + Acétone

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	0	1	2
16h	1	2	1	2
24h	1	8	8	4

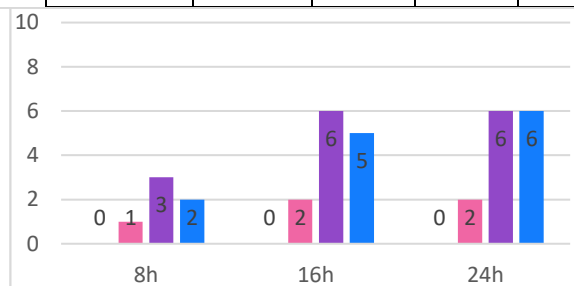
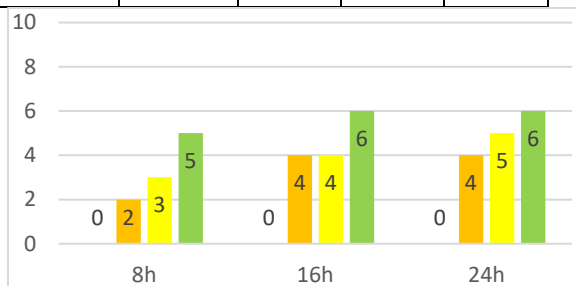
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	2	5
16h	0	2	3	5
24h	0	3	5	9



Chlorofome

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	3	5
16h	0	4	4	6
24h	0	4	5	6

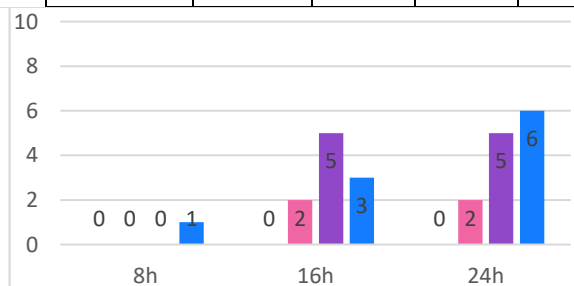
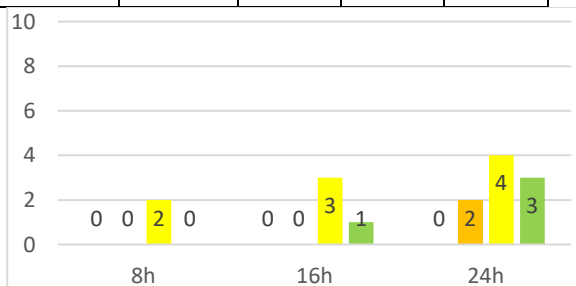
Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	1	3	2
16h	0	2	6	5
24h	0	2	6	6



Méthanol

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	0	2	0
16h	0	0	3	1
24h	0	2	4	3

Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	0	0	1
16h	0	2	5	3
24h	0	2	5	6





Eau

Temps	Adulte			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	2	0	2
16h	0	5	2	5
24h	0	9	10	10

Temps	Larve			
	Témoin	R1	R2	R3
8h	0	3	9	5
16h	0	5	10	6
24h	0	9	10	10

