

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

*Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou*

*Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques*

*Département de Biologie*



# *Mémoire de fin d'étude*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques*

**Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Biologie des Populations et des Organismes

**Thème :**

*Evaluation d'Aspergillus flavus à titre d'agents de  
lutte biologique contre les Larves  
d'Aedes (Stegomyia) albopictus*

**Présenté par :**

Mlle *DERROUCHE Kenza*

Mlle *CHABANE Dihya*

**Devant le jury composé de :**

**Présidente :** Mme CHAOUCHI. N

**MCA UMMTO**

**Promotrice :** Mme BENCHERIFA. S

**Attaché de Recherche à IPA**

**Co-promotrice :** Mme BRAHMI. K

**Professeur à UMMTO**

**Examinatrice :** Mme CHAHED. S

**MAB UMMTO**

**Promotion : 2023/2024**

## REMERCIEMENTS

*Nous exprimons notre gratitude à dieu, source de toute connaissance et de tout puissance, pour nous avoir guidés jusqu'à ce point et pour le bonheur que nous ressentons à chaque étape de notre parcours, y compris dans la réalisation de ce modeste travail.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude envers **Mme EDDAIKRA Naouel** chef de service du laboratoire d'Eco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude également à notre promotrice, **Mme BENCHERIFA Souad** , pour son intérêt manifesté dans l'élaboration de ce travail, ainsi que pour son aide précieuse et sa contribution inestimable.*

*Nous souhaitons également adresser nos remerciements à notre Co-promotrice, **Mme BRAHMI Karima**, pour son engagement inébranlable à raviver notre esprit critique et à nourrir notre soif de compréhension. Nous lui témoignons une grande admiration pour sa sagesse, son calme, son intelligence et surtout sa patience exemplaire.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à **Mme CHAOUCHI** présidente du jury et également **Mme CHAHED** examinatrice d'avoir accepté d'évaluer ce travail*

*Nous souhaitons exprimer notre gratitude à nos chers amis qui ont été à nos côtés tous le long du travail.*

*Egalement, nous tenons à adresser nos sincères remerciements à tous les enseignants qui nous ont transmis leur savoir et nous ont soutenus dans notre parcours académique grâce à leurs compétences et leur dévouement.*

# DÉDICACE

« La plus belle récompense de nos efforts est de pouvoir offrir avec joie le résultat de notre travail acharné ».

**Je dédie ce modeste travail :**

*A mes chers parents, **Nouara et Amar** qui ont sacrifié tant pour me permettre d'atteindre ce niveau d'étude et qui m'ont apporté leur soutien et amour sans faille ont été ma force pendant toutes ces années. Que ce travail soit pour vous une humble expression de ma reconnaissance et une source de fierté pour notre famille.*

*A mon chers petit frère **Massyl** pour son encouragement permanent, et son soutien moral. Je lui souhaite beaucoup de succès et de réussite dans sa vie.*

*A toute ma famille « **Chabane et Saim** », et mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines, ainsi que mes grands-parents maternelle « **Djeddi Mouh** » et « **Setti Fatma** », A la mémoire de mes grands-parents paternelle décédés, et à la mémoire de ma tante **kamilia**, dont l'amour et le soutien continuent de m'inspirer, et à mes tantes **Malika, Nadia, Bahia et Ouisa** pour leur inébranlable encouragement et affection.*

*A ma très chère binôme « **Kenza** » ainsi que sa famille.*

*A mes chers copines « **Mélissa, Soumaya, Kenza, Siham, Yasmine, Ouardia, Yasmina, Linna et Lisa**, et toutes mes copines du groupes les Perles Rares », merci pour tous les éclats de rire et les merveilleux moments partagés au fil des années. Votre présence à mes côtés est un cadeau précieux, je me sens tellement chanceuse de vous avoir dans ma vie, je vous aime profondément.*

*A toutes les personnes qui m'ont constamment soutenu, encouragé et accompagné tout au long de mon parcours universitaire.*

***Dihya***

# DÉDICACE

« le plus grand réconfort pour notre esprit est de pouvoir offrir avec une joie éclatante  
le résultat de nos efforts »

*Je consacre cette humble œuvre*

*A mes chers parents **Ammar** et **Nassima** pour leur amour infini, leur soutien indéfectible et leur foi inébranlable en mes rêves, ce qui ont consenti à tant de sacrifices pour m'accompagner jusqu'à ce niveau d'étude, qui ont été ma force tout au long de cette période. Que cette œuvre soit pour vous une modeste marque de ma gratitude et un motif de fierté pour ma famille.*

*A ma chère grand-mère **Fatma**, mon cher oncle **Saïd** et mes chères sœurs **Siham** et **Chahinaz** pour leurs conseils avisés, leur soutien inestimable et leur passion pour l'excellence qui ont façonné ma recherche et mon apprentissage.  
A tout ma famille « **Derrouiche** » en hommage à mes grands-parents décédés.*

*A ma chère alliée de travail « **Dihya** » ainsi que tout sa famille.*

*A mes copines « **Yasmine, Yasmina, Wardia, Linna, Lisa, Massila et ikram** » pour leur soutien inconditionnel et leurs encouragements qui ont illuminé les moments les plus sombre de ce voyage.*

*A mes professeurs, pour leur guidance inspirante et leur précieuse expertise tout au long de mon parcours académique.*

*A tous ceux qui ont cru en moi, m'ont inspiré et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire*

***Kenza***

## Liste des abréviations

*A.flavus* : *Aspergillus flavus*.

*Ae.albopictus* : *Aedes albopictus*

*Cx.quinquefasciatus* : *Culex quinquefasciatus*

*Cx.pipiens* : *Culex pipiens*

*Cx.tarsalis* : *Culex.tarsalis*

*Cx. triaeniorhynchus* : *Culex triaeniorhynchus*

DL 50 : Dose létale.

IPA : institut pasteur d'Alger.

L1 : Larve de premier stade.

L2 : Larve de deuxième stade.

L3 : Larve de troisième stade.

L4 : Larve de quatrième stade.

PVA : Alcool polyvinylique.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

Min : minute.

N : le nombre total des conidies dans la cellule de thoma.

D : facteur de dilution de la suspension initiale.

1 / 2 j : un jour sur deux

H : heure.

## Glossaire

**Conidies** : sont des spores fongiques qui assurent la reproduction asexuée chez certains champignons ascomycètes.

**Suspension de champignons entomopathogènes** : est une préparation liquide contenant des spores de champignons parasites d'insectes ou d'autres arthropodes, entraînant leur mort.

**Mycélium aérien** : est la partie végétative des champignons, constitué d'un ensemble de filaments blancs plus ou moins ramifiés, appelés hyphes.

**Phialides** : ce sont des structures cellulaires en forme de bouteille ou de flasque, présentes chez certains champignons microscopiques.

**Conidiophores** : est une structure fongique spécialisée, responsable de la production des conidies.

**Orifice respiratoire** : est une ouverture située sur la partie postérieure de l'abdomen, appelée siphon respiratoire ou stigmate.

**Vésicule aspergillaire** : est la partie terminale du conidiophores où se produisent les spores.

**Xylazine pro 2%** : est une solution injectable vétérinaire destinée à la relaxation musculaire utilisée pour préparer les animaux à une anesthésie générale.

**Suture hypostomale** : c'est un trait morphologique caractéristique chez les moustiques tigre, présente sous forme d'une ligne de suture visible sur la face inférieure de la tête.

**Zoletil 100** : est un anesthésique général dissociatif, il s'administre par voie intramusculaire ou intraveineuse.

**Purification** : est le processus de séparation visant à isoler un composant d'intérêt, comme un agent de lutte biologique, au sein d'un mélange complexe, pour une application efficace et sûre.

**Milieu Sabouraud chloramphénicol** : est un milieu de culture recommandé pour l'isolement et la croissance des champignons entomopathogènes.

**Ensemencer** : c'est le processus de transfert du champignon ou du milieu souhaité vers le milieu de culture pour favoriser sa croissance et son développement ultérieurs.

**Tête aspergillaire (Aspergille) :** c'est l'extrémité du conidiophores du champignon *Aspergillus flavus*, qui produit des spores en chaînes rayonnantes.

**Cellule de Thoma :** c'est un outil de laboratoire destiné à compter les cellules en suspension, en utilisant un quadrillage pour mesurer le nombre de cellules dans un volume défini.

**Agitateur Vortex :** est un équipement essentiel dans les laboratoires pour mélanger rapidement et efficacement de petits volumes de liquides dans divers types de récipients.

**Tween 80 :** c'est un composé chimique utilisé comme surfactant et émulsifiant dans les applications pharmaceutiques, alimentaires ou biochimiques, il est non ionique.

**Bio-test :** est un test de laboratoire qui permet d'évaluer la toxicité et l'écotoxicité potentielle d'un composé en exposant des organismes vivants modèles et en mesurant leur réponse.

**Deltaméthrine à 2,2 % :** est un insecticide utilisé pour lutter contre un large éventail d'insectes nuisibles, qui permet une application ciblée et efficace tout en limitant les risques pour l'environnement.

**Activité larvicide :** désigne la propriété d'une substance à être toxique ou inhibitrice envers les larves d'insectes.

**Isolats fongiques :** sont des cultures pures de champignons provenant d'échantillons environnementaux, utilisées en recherche pour étudier leur génétique, leur pathogénicité et leurs applications biotechnologiques.

**Logiciel GraphPadPrism :** est un logiciel spécialisé dans l'analyse et la représentation graphique de données scientifiques. Il est largement utilisé dans les domaines de la biologie, de la médecine et d'autres sciences naturelles pour l'analyse statistique et la présentation des résultats expérimentaux.

**Formule d'Abbott :** est une méthode standard en toxicologie pour corriger les résultats expérimentaux en éliminant l'effet de la mortalité naturelle des témoins, assurant ainsi une évaluation plus précise de la toxicité ou de l'efficacité d'un agent testé.

**Logiciel « Les moustiques d'Europe » :** est un outil informatique spécialisé visant à soutenir l'identification précise et l'enseignement des moustiques européens, contribuant ainsi à la gestion efficace des programmes de surveillance et de contrôle des vecteurs.

**Broméliacées** : sont une famille de plantes monocotylédones, principalement originaires des Amériques. Elles comprennent 3000 espèces réparties en plus de 50 genres.

**Dichlorodiphényltrichloroéthane :(DDT)** est un composé chimique de synthèse utilisé comme insecticide, efficace contre les moustiques porteurs du paludisme.

**Holométabole** : c'est les insectes qui subissent une métamorphose complète, passant par les quatre étapes (l'œuf, la larve, la nymphe et adulte).

**Ecdysis** : est le processus de mue chez les arthropodes, comme les insectes. Consiste en la perte de l'exosquelette ancien pour permettre la croissance.

**Les aflatoxines** : Les termes "aflatoxine B1", "aflatoxine B2", "aflatoxine G1" et "aflatoxine G2" et "M1" sont les noms complets des composés. Le "B" et le "G" dans leurs noms indiquent les types de fluorescence qu'ils émettent sous la lumière UV, et les chiffres "1" et "2" désignent des variantes spécifiques au sein de ces groupes. Le "M1" désigne un métabolite de l'aflatoxine B1, il est produit lorsque l'aflatoxine B1 est ingérée par des animaux et ensuite excrétée dans le lait et les produits laitiers.

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 1 .....	27
<b>Tableau 2</b> : Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 2 .....	29
<b>Tableau 3</b> : Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 3 .....	30
<b>Tableau 4</b> : Résultats statistiques de l'ANOVA à un facteur des 3 tests de traitement d' <i>A. flavus</i> sur les larves du stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> (Annexe IV).	
<b>Tableau 5</b> : Résultats statistiques du test 1 de traitement d' <i>A. flavus</i> sur les larves du stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> (Annexe V).	
<b>Tableau 6</b> : Résultats statistiques du test 2 de traitement d' <i>A. flavus</i> sur les larves du stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> (Annexe VI).	
<b>Tableau 7</b> : Résultats statistiques du test 3 de traitement d' <i>A. flavus</i> sur les larves du stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> (Annexe VII).	
<b>Tableau 8</b> : Résultats statistiques de DL 50% des 3 tests de traitement d' <i>A. flavus</i> sur les larves du stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> (Annexe VIII).	

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> - Œufs d' <i>Aedes(Stegomyia) albopictus</i> .....	4
<b>Figure 2</b> - Larve d' <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> .....	5
<b>Figure 3</b> - Nymphe d' <i>Aedes (Stegomyia) albopictus</i> .....	5
<b>Figure 4</b> - Moustique tigre adulte, long de quelques millimètres et rayé de blanc et de noir.....	6
<b>Figure 5</b> - Cycle de vie d' <i>Aedes albopictus</i> .....	7
<b>Figure 6</b> - Vue microscopique (a) et macroscopique (b) d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	11
<b>Figure 7</b> - Les différentes étapes de l'élevage d' <i>Aedes albopictus</i> .....	14
<b>Figure 8</b> - Les étapes du montage des larves d' <i>Aedes albopictus</i> au stade L4.....	15
<b>Figure 9</b> - Larve d' <i>Aedes albopictus</i> observé sous une loupe binoculaire au grossissement (×4).....	16
<b>Figure 10</b> - Les étapes de purification et ensemencement du champignon <i>Aspergillus flavus</i> .....	17
<b>Figure 11</b> - Les étapes de la préparation de la suspension des champignons entomopathogènes.....	19
<b>Figure 12</b> - les cinq concentrations des conidies de champignons <i>Aspergillus flavus</i> .....	20
<b>Figure 13</b> - Protocole expérimentale de l'activité larvicide d' <i>Aspergillus flavus</i> sur les larves d' <i>Aedes albopictus</i> .....	21
<b>Figure 14</b> - Identification de la larve d' <i>Aedes albopictus</i> .....	23
<b>Figure 15</b> - Aspect macroscopique (recto « A » et verso « B ») du champignon <i>Aspergillus flavus</i> .....	25
<b>Figure 16</b> - Identification microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> sous microscope optique au grossissement (×40).....	25

<b>Figure 17</b> - Larve d' <i>Aedes albopictus</i> au stade L4 morte vue sous microscope optique au grossissement (×40) et (×100).....	26
<b>Figure 18</b> - Mortalités des larves d' <i>Aedes albopictus</i> du stade L3-L4 traitées par les spores d' <i>A. flavus</i> (Test 1).....	27
<b>Figure 19</b> - Mortalités des larves d' <i>Aedes albopictus</i> du stade L3-L4 traitées par les spores d' <i>A. flavus</i> (Test 2) .....	28
<b>Figure 20</b> - Mortalités des larves d' <i>Aedes albopictus</i> du stade L3-L4 traitées par les spores d' <i>A. flavus</i> (Test 3).....	29
<b>Figure 21</b> - Les DL 50% du nombre de spores d' <i>A. flavus</i> sur les larves au stade L3-L4 d' <i>Aedes albopictus</i> pour le 1 <sup>er</sup> , 2 <sup>èm</sup> , et 3 <sup>èm</sup> e Tests.....	31

## Table des matières

<b>Remerciements</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Glossaire</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Sommaire</b>	
<b>Introduction</b>	<b>1</b>

### Chapitre I : Rappel bibliographique

<b>I.1. - Généralités sur l'<i>Aedes albopictus</i></b>	<b>3</b>
I.1.1. - Position systématique	4
I.1.2. - Caractères morphologiques	4
I.1.2.1. -Les œufs	4
I.1.2.2. - Les larves	4
I.1.2.3. -La nymphe	5
I.1.2.4. -L'adulte	5
I.1.3. -Cycle de vie	6
I.1.4. - Transmission des maladies	7
<b>I.2. - La résistance</b>	<b>8</b>
<b>I.3. - La lutte anti-vectorielle</b>	<b>8</b>
I.3.1-La lutte physique	9
I.3.2. -La lutte chimique	9
I.3.3. -La lutte intégrée	9
<b>I.4. -La lutte biologique par le champignon entomopathogènes</b>	<b>9</b>
I.4.1. - <i>Aspergillus flavus</i>	10
I.4.2 -Taxonomie	10
I.4.3. – Morphologie	10
I.4.4. -Mode d'infection	11
I.4.5. - Les Toxines	11

## Chapitre II : Matériel et méthodes

<b>II.1. - Matériel de travail</b>	<b>13</b>
II.1.1. – Matériel biologique .....	13
II.1.2. – Matériel du laboratoire .....	13
<b>II.2. - Méthodes de travail</b>	<b>13</b>
II.2.1. - <i>Aedes albopictus</i> .....	13
II.2.1.1. - L'élevage d' <i>Aedes albopictus</i> .....	13
II.2.1.2. - Montage et détermination des larves.....	15
II.2.1.3. - Identification des Larves.....	16
II.2.2. - <i>Aspergillus flavus</i> .....	16
II.2.2.1. - Isolement, purification du champignon entomopathogènes.....	16
II.2.2.2. - Identification macroscopique et microscopique.....	18
II.2.3. - Méthodes de lutte biologique.....	18
II.2.3.1. - Préparation des solutions entomopathogènes.....	18
II.2.3.2. - Préparation des concentrations.....	20
II.2.3.3. - Réalisation des bio-tests.....	20
II.2.3.4. -Test de confirmation.....	21
II.2.4. -Méthodes d'exploitation des résultats.....	21
II.2.4.1. - Pourcentage de mortalité.....	21
II.2.4.2. - Analyse statistique.....	22

## Chapitre III : Résultats

<b>III.1- Identifications des larves</b>	<b>23</b>
<b>III.2- Identifications des isolats</b>	<b>25</b>
<b>III.3- Test de confirmation</b>	<b>26</b>
<b>III.4- L'effet d'<i>Aspergillus flavus</i> sur les larves d'<i>Aedes albopictus</i></b>	<b>26</b>
III.4.1. - Résultats des Variations de taux de mortalité d' <i>Aedes albopictus</i> traitées par <i>Aspergillus flavus</i> .....	26
III.4.2 - Estimation des DL à 50% d' <i>Aspergillus flavus</i> .....	30
III.4.3. - Comparaison des DL 50% des trois tests.....	31

## **Chapitre IV : Discussion**

<b>Discussion</b>	<b>32</b>
<b>Conclusion</b>	<b>34</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>35</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

# *Introduction*

## Introduction

---

L'*Aedes albopictus*, connu sous le nom de "moustique tigre", originaire d'Asie du Sud-Est, découvert à Calcutta, il s'est répandu mondialement depuis les années 1970, atteignant l'Amérique, l'Afrique et l'Europe grâce à son adaptation aux climats tempérés (Bonizzon, 2013). Sa distribution géographique évolue chaque année avec de nouveaux territoires colonisés, nécessitant une surveillance entomologique continue (Duvallet et al., 2017).

Ce moustique a une importance économique et écologique significative. Économiquement, il engendre des coûts élevés pour les systèmes de santé publique en raison des maladies qu'il transmet, incluant les consultations médicales, les hospitalisations, les médicaments et la perte de productivité (Shepard, 2017). Les programmes de contrôle des moustiques, tels que la pulvérisation d'insecticides, l'élimination des sites de reproduction et les campagnes de sensibilisation, nécessitent également des investissements importants (Paupy, 2009).

Écologiquement, en tant qu'espèce invasive, *Aedes albopictus* a la capacité de s'adapter à divers environnements, ce qui perturbe les écosystèmes locaux et la biodiversité; sa présence peut entraîner des changements dans la dynamique des populations d'autres espèces de moustiques, ce qui peut déséquilibrer les relations écologiques établies; En outre, l'utilisation intensive d'insecticides pour contrôler l'*Aedes albopictus* peut avoir des effets néfastes sur les non-cibles, y compris les pollinisateurs et les prédateurs naturels des moustiques; Selon Medlock et al., (2012), l'introduction de ce moustique en Europe a modifié les interactions entre les espèces indigènes et invasives, posant des défis écologiques et sanitaires. De plus, l'étude de Juliano et Lounibos (2005) indique que les larves d'*Aedes albopictus* peuvent se nourrir de diverses matières organiques dans les habitats aquatiques, affectant ainsi les communautés microbiennes et les cycles nutritifs aquatiques.

La lutte chimique contre ce moustique a perdu son efficacité, car l'utilisation fréquente d'insecticides a entraîné l'apparition de résistances chez ces insectes, diminuant ainsi l'efficacité des traitements chimiques. Cette situation souligne l'importance accrue de développer de nouvelles méthodes de lutte contre les moustiques (Darriet, 2014).

Pour cela la lutte contre le moustique tigre, a fait l'objet de nombreuses études à travers le monde, plusieurs stratégies de gestion intégrée ont été mises en place par l'organisation mondiale de la santé (OMS), qui recommande des approches intégrées de surveillance et de contrôle des vecteurs, en mobilisant les communautés et en favorisant la collaboration intersectorielle (Roiz et al., 2018). Aux États-Unis, en raison de son rôle dans la transmission

## Introduction

---

de maladies, Bonizzoni et *al.*, (2013) ont examiné l'expansion géographique du moustique et les stratégies de gestion intégrée mises en œuvre pour le contrôler. En Europe, Scholte et Schaffner (2007) ont analysé les méthodes de contrôle, notamment la surveillance et l'utilisation d'insecticides. En Australie, Hoffmann et *al.*, (2011) ont démontré l'efficacité de la bactérie *Wolbachia pipientis* pour réduire les populations de moustiques. En Asie, Lacey (2007) a évalué l'efficacité de *Bacillus thuringiensis israelensis* contre les larves d'*Aedes albopictus*, obtenant des résultats prometteurs. Enfin, en Amérique latine, Gubler (2002) a mis en avant l'importance des programmes de contrôle communautaires et de l'éducation pour réduire les populations de moustiques. Ces travaux soulignent l'importance de la surveillance, des interventions environnementales, des insecticides biologiques et de l'engagement communautaire pour lutter efficacement contre *Aedes albopictus*.

En Algérie, les efforts de lutte contre *Aedes albopictus* ont été marqués par plusieurs initiatives et recherches. Benallal et *al.*, (2019) ont étudié l'expansion géographique et le rôle de ce moustique dans la transmission de maladies vectorielles, soulignant l'importance de la surveillance et des mesures de contrôle. Hamid et *al.*, (2021) ont discuté des stratégies de lutte intégrée, y compris l'utilisation d'insecticides et la gestion de l'environnement, tout en analysant les défis rencontrés. Mebarki et *al.*, (2020) ont présenté les résultats de la surveillance entomologique et des interventions de contrôle, montrant leur impact sur la réduction des populations de moustiques. Zermane et *al.*, (2022) ont examiné l'effet des campagnes de sensibilisation publique, notant une augmentation de l'engagement communautaire. Enfin, Khelifi et *al.*, (2021) ont évalué l'efficacité des insecticides biologiques, tels que *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), sur la mortalité des larves et les impacts environnementaux des traitements. Ces travaux soulignent l'importance de la recherche continue et de la collaboration entre les autorités sanitaires, les chercheurs et les communautés locales pour lutter efficacement contre ce vecteur de maladies.

Dans ce contexte, notre étude se concentre sur l'évaluation de l'impact d'un champignon entomopathogène « *Aspergillus flavus* » sur les larves de moustique tigre *Aedes albopictus*, soulignant ainsi 3 objectifs précis :

- L'élevage du moustique tigre jusqu'à obtention du nombre de larves nécessaire pour les bio tests.
- Isolement et purification du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus*.
- Etablissement des bio essaies afin de voir l'impact larvicide du champignon.

# *Chapitre I*

## *Rappel bibliographique*

Cette partie présente les généralités sur le moustique tigre «*Aedes albopictus*», et les différentes méthodes de lutte, ainsi que le champignon entomopathogène «*Aspergillus flavus*».

### **I.1. – Généralités sur l'*Aedes albopictus***

Ce moustique se trouve principalement dans les environnements urbains et périurbains ainsi que dans les forêts et jardins où il y a des eaux stagnantes; Il affectionne les endroits avec tas de déchets, et divers récipients d'eau de pluie; On le trouve également dans les lieux de transit tels que les ports, entrepôts, aires de repos sur les autoroutes et gares; Il se déplace sur de courtes distances, généralement entre 50 et 200 mètres, et son vol est lent, le rendant facile à écraser; Les adultes vivent brièvement, environ trois semaines; Tant les mâles que les femelles se nourrissent de nectar, mais seules les femelles sont hématophages, se nourrissant de sang humain et animal; Elles pondent de 50 à 200 œufs à chaque fois sur des surfaces sèches près de petites quantités d'eau, dans divers récipients naturels comme les creux d'arbres et les Broméliacées, ou artificiels comme les vases, pneus usagés, et récupérateurs d'eau pluviale ;Les œufs entrent en diapause pour survivre aux températures négatives, ce qui facilite la propagation d'*Aedes albopictus* dans les zones tempérées; Ils peuvent être transportés sur de longues distances par voie terrestre et maritime via des conteneurs, favorisant ainsi sa dissémination mondiale à partir de l'Asie (Chabasse, 2023).

#### **I.1.1. - Position systématique**

La classification d'*Aedes albopictus* d'après Harbach (2015) est la suivante :

Embranchement : Arthropoda  
Classe : Insecta  
Ordre : Diptera  
Sous ordre : Nematocera  
Famille : Culicidae  
Sous famille : Culicinae  
Genre : *Aedes (Stegomyia)*  
Espèce : *Aedes albopictus*

## I.1.2. - Caractères morphologiques

### I.1.2.1. - Les œufs

Les œufs d'*Aedes albopictus* adoptent une forme ovale allongée, mesurant environ 500 µm de long et affichant une teinte noir-brillant (Linley, 1989). Déposés individuellement à la surface de l'eau ou sur des surfaces sèches par les femelles, ces œufs éclosent généralement entre 5 et 6 jours après immersion. Une caractéristique notable de ces œufs et leur résistance aux stress biotiques et abiotiques (Juliano et Lounibos, 2005) (Figure 1).



**Figure 1** - Œufs d'*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Bousses, 2021).

### I.1.2.2. –Les larves

Les larves, brun-noir, ont une tête, un thorax et un abdomen. Au stade L1, elles mesurent environ 1mm avec un cône facilitant l'éclosion (Sivanathan, 2006). Au L2, elles atteignent 2-3mm, avec une tête assombrie et des organes respiratoire en développement. Au L3, elles s'élargissent et au L4, accumulent des graisses corporelles et des rudiments des palettes natatoires apparaissent ; Elles respirent via un siphon postérieur (Clements, 1992) (Figure 2).



**Figure 2** - Larve d'*Aedes (Stegomyia) albopictus* (Bousses, 2021).

### I.1.2.3 - La nymphe

La pupa est en forme de virgule, sans besoin nutritionnel, sa survie dépend des réserves accumulées à l'état larvaire ; Elle respire à travers des trompettes respiratoires situées sur son céphalothorax et est mobile grâce à des palettes natatoires en cas de danger (Clements, 1992) (Figure 3).



**Figure 3** - Nympe d'*Aedes (Stegomyia) albopictus*(Bousses, 2021).

### I.1.2.4 - L'adulte

À l'état adulte, la structure générale du moustique se compose de trois parties distinctes : La tête, le thorax et l'abdomen ; La tête est équipée d'une paire d'antennes, d'une paire de pédipalpes (utiliser comme organes sensoriels) et d'une trompe, qui lui sert à se nourrir; Le thorax porte trois paires de pattes (une paire antérieure, une paire médiane et une paire postérieure), ainsi qu'une paire d'ailes antérieures ; Les ailes postérieures sont adaptées pour former des organes de stabilisation du vol appelés "halters", assurent l'équilibre en vol (Clements, 1992) (Figure 4).



**Figure 4** - Moustique-tigre adulte (Lutz, 2014)

### I.1.3. -Cycle de vie

Le moustique tigre a un cycle de vie qui commence par un stade aquatique immature avec trois grandes étapes de développement : œufs, larves, nymphe, puis l'émergence aboutissant à la forme adulte qui marque la transition vers le stade aérien ; Les trois premiers stades sont réalisés en immersion dans l'eau durant 19 à 36 jours (Gomes et *al.*, 1995), tandis que le stade adulte marquera l'émergence du moustique hors de l'eau et pourra durer jusqu'à 60 jours selon les conditions environnementales (Clements., 1992 ; Brady et *al.*, 2013). Ce développement qui prend la forme d'une métamorphose complétée (insecte holométabole) permet d'interpréter le cycle biologique des moustiques comme un modèle à compartiments (Cailly et *al.*, 2012).

Les femelles déposent individuellement des œufs à la surface de l'eau ou sur les surfaces sèches, ces œufs éclosent généralement entre 5 et 6 jours après immersion ; Le stade larvaire d'*Aedes albopictus* dure de 5 à 10 jours, divisé en quatre stades : L1, L2, L3, L4 (Hawley, 1988 ; Lowenberg Neto et Navarro-Silva, 2004). Chaque stade est séparé par une mue appelée « ecdysis » (Clements, 1992).

Après le dernier stade larvaire, la larve devient une puppe, ou nymphe, en une période de 1 à 3 jours dans les conditions optimales, mais cela peut aller jusqu'à 13 jours ou plus en cas de conditions défavorables (Hawley, 1988 ; Gomes et *al.*, 1995 ; Lowenberg Neto et Navarro-Silva, 2004).

Au stade adulte, le moustique émerge sous sa forme adulte, par une fonte formée à la surface de la cuticule ; Les deux sexes se nourrissent principalement de nectar dont les sucres simples (en particulier le fructose) qui leur fournissent un apport énergétique essentiel à leur survie (Foster, 1995) (Figure 5).

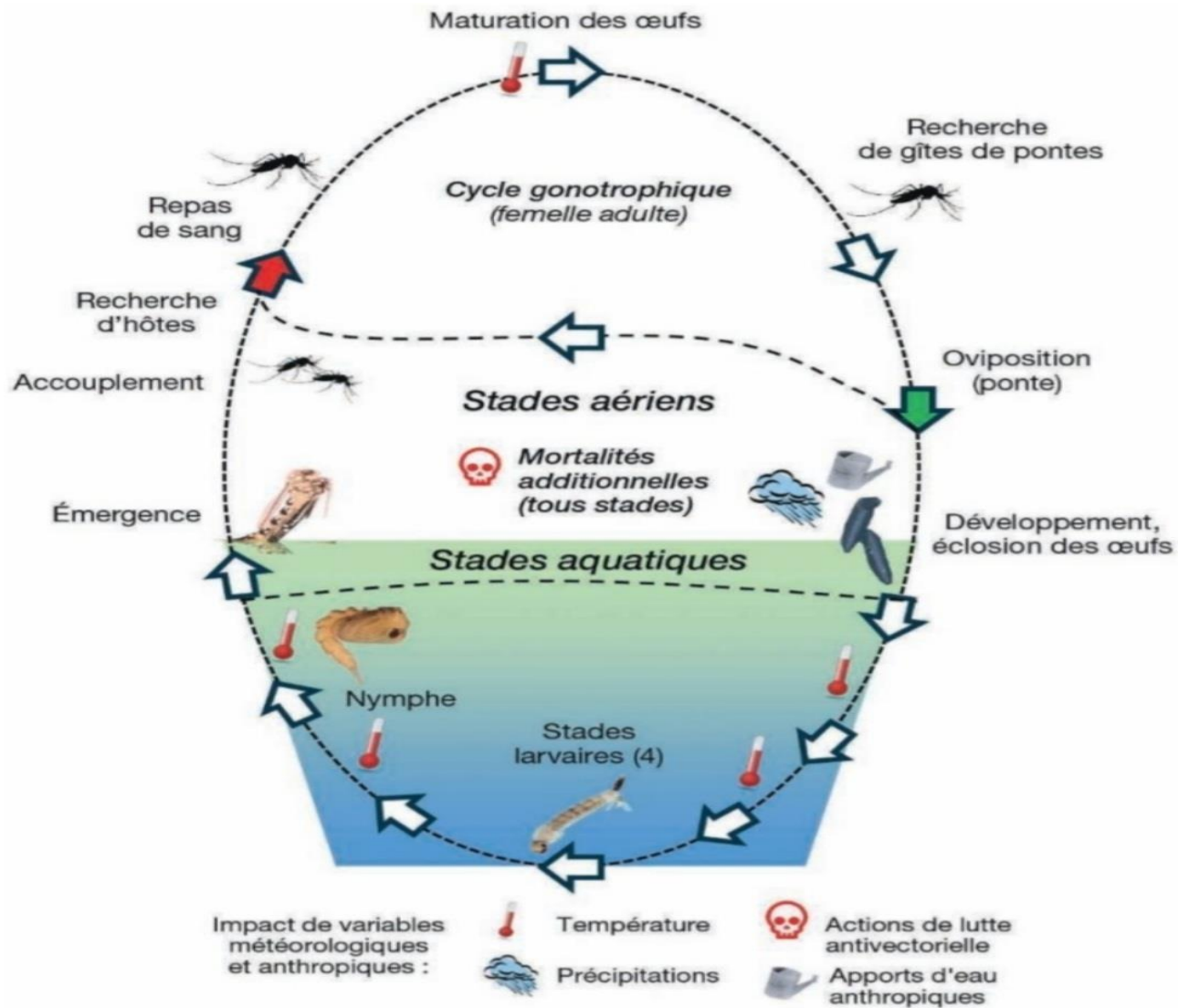


Figure 5 - Cycle de vie d'*Aedes albopictus* (Henon, 2022)

#### I.1.4. – Transmission des maladies

Les arboviroses transmises par le moustique tigre « *Aedes albopictus* » sont représentées par :

La dengue c'est l'arbovirose la plus fréquemment rencontrée sur le sol métropolitain (Santé Publique France), elle est dans la majorité des cas asymptomatique, provoque des complications graves, parfois mortelles, peuvent survenir ; Dans sa forme classique elle se manifeste par une forte fièvre, accompagnée de frissons, de céphalées, de nausées, de vomissements, de douleurs articulaires et musculaires ; Seulement 5 à 10 % des cas

symptomatiques peuvent conduire à des hémorragies pouvant mettre en jeu le pronostic viral (Chabasse, 2023).

Le chikungunya est plus rarement constaté, il se produit généralement 4 à 8 jours (de 2 à 12 jours) après la piqûre d'un moustique infecté. Elle se caractérise par une apparition brutale de fièvre, souvent accompagnée de douleurs articulaires sévères. Les douleurs articulaires sont souvent débilitantes et durent généralement quelques jours, mais peuvent se prolonger pendant des semaines, des mois, voire des années. Parmi les autres signes et symptômes courants figurent le gonflement des articulations, les douleurs musculaires, les maux de tête, les nausées, la fatigue et les éruptions cutanées (Auerswald, 2018)

Le virus de Zika, provoque dans la majorité des cas une « éruption cutanée », une fièvre modérée, mais également une conjonctive, une fatigue, douleurs musculaires et articulaires ainsi que céphalées ; Dans des rares cas, le virus peut être responsable de complications pour l'embryon ou le fœtus et des complications neurologiques sévères, si la personne infectée est enceinte (Musso, 2019).

## **I.2. – La résistance**

*Aedes albopictus* démontre une grande plasticité écologique et physiologique qui lui permet de s'adapter rapidement à de nouveaux environnements (Failloux, 2018). Ses œufs peuvent résister plusieurs mois à la dessiccation, ce qui facilite sa dispersion à longue distance via le transport de récipients, peuvent également entrer en dormance en climat tempéré, leur conférant une résistance aux températures hivernales et permettant le maintien des populations jusqu'au printemps (Fontenille et al., 2017). *Aedes albopictus* montre une résistance variable aux insecticides, notamment dans certaines régions du Sud du Bénin ; Les populations de *Aedes albopictus* ont montré une pleine sensibilité au Deltaméthrine et à la perméthrine, mais une résistance ou une sensibilité réduite à l'alphacyperméthrine a été observée dans certaines zones ; Des tests ont confirmé que l'implication des oxydases dans la résistance d'*Aedes albopictus* à l'alphacyperméthrine était totale (Vontas et al., 2012).

## **I.3. - La lutte anti-vectorielle**

Face à la propagation croissante d'*Aedes albopictus* et aux risques sanitaires associés, plusieurs approches de lutte anti-vectorielle sont disponibles pour contrôler efficacement sa propagation et réduire les risques pour la santé publique, tel que:

### I.3.1. La lutte physique

La lutte physique ou « environnementale » regroupe toutes les actions menées sur l'environnement pour le rendre hostile au développement des moustiques ; Elle consiste notamment à éliminer les gîtes larvaires de l'espèce cible par drainage, comblement ou recouvrement, ou par modification des conditions physico-chimiques ou microbiologiques de l'eau ; Ces méthodes sont applicables dès lors qu'une espèce cible est inféodée à des types précis de gîtes larvaires, et que ceux-ci peuvent être effectivement supprimés (Lecollinet et Pagès, 2022).

### I.3.2. – La lutte chimique

De façon générale, cette lutte contre *Aedes albopictus* repose essentiellement sur l'utilisation d'insecticides chimiques, ayant des effets larvicides ou adulticides. Les principaux adulticides chimiques ayant montré leur efficacité appartiennent à la famille des Pyrethrinoides (Deltaméthrine, Perméthrine) (Vontas et al., 2012). Cependant, plusieurs enjeux majeurs se heurtent à l'utilisation des insecticides leur impact sur les écosystèmes (notamment par élimination d'espèces non cibles) et l'apparition croissante de résistances (Karunaratne et al., 2013). De plus, les capacités de dispersion du moustique au sein de différents gîtes est un facteur supplémentaire accentuant les difficultés de traitement (Estrada-Franco and Craig., 1995).

### I.3.3. – La lutte intégrée

La lutte intégrée est une approche stratégique qui vise à gérer les populations de vecteurs en combinant diverses méthodes de contrôle ; Cela implique la coordination et l'utilisation simultanée de différentes techniques, telles que l'utilisation de prédateurs naturels, l'emploi de pesticides sélectifs, la mise en place de pratiques culturales adaptées, et d'autres méthodes ; L'objectif est d'optimiser l'efficacité de la lutte tout en minimisant les effets négatifs sur l'environnement et d'autres espèces non ciblées ; La prise en compte des interactions entre ces méthodes est cruciale pour élaborer une stratégie globale efficace (Suckling et al., 2014).

### I.4.– Lutte biologique par le champignon entomopathogène

La lutte biologique, selon Desfemme (2021), implique l'utilisation d'organismes vivants (prédateurs, parasites ou microorganismes) pour réguler les populations d'espèces nuisibles ; En particulier, la lutte biologique par l'utilisation des champignons entomopathogènes contre les moustiques exploite des agents pathogènes naturels ; Ces champignons sont

spécifiquement choisis pour infecter et éliminer les moustiques ciblés, offrant ainsi une méthode écologique et durable pour contrôler les populations de moustiques nuisibles dans l'environnement (Lacey, 2007).

#### **I.4.1. - *Aspergillus flavus***

Les champignons d'*Aspergillus flavus* sont des mycètes filamenteux imparfaits ubiquitaire ; *l'Aspergillus flavus* est cosmopolite et passe la majeure partie de sa vie comme saprophyte dans le sol (Hedayati, 2007). Il est aussi un microbe pathogène opportuniste engendrant des infections envahissantes et non envahissantes chez l'homme ainsi que chez certains animaux et insectes ; cet *Aspergillus* infecte également les récoltes et contamine les grains stockés : dans ces derniers substrats, il produit des métabolites cancérogènes les plus toxiques et les plus efficaces, telles que les aflatoxines et les autres mycotoxines (Yu et al., 2005).

#### **I.4.2. – Taxonomie**

Selon Samson et al., (2014) la classification d'*Aspergillus flavus* est la suivante :

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Eurotiomycetes

Ordre : Eurotiales

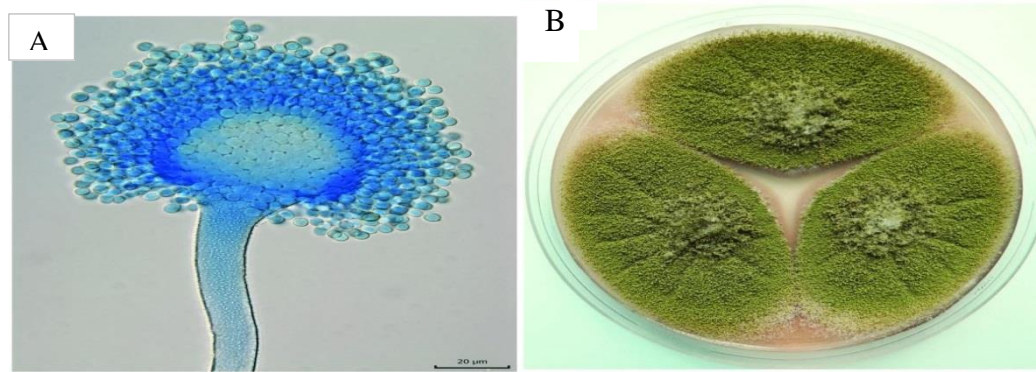
Famille : Aspergillaceae

Genre : *Aspergillus*

Espèce : *Aspergillus flavus*

#### **I.4.3. – Morphologie**

Les colonies sont vert-jaune, relativement planes avec une marge blanche de 1 à 2 mm. Les revers sont incolores à jaunâtres ; Les conidiophores sont longs et rugueux. Les têtes aspergillaires sont majoritairement radiées et bisériées (2 rangées de stérigmates) et splittent en vieillissant ; Quelques têtes en colonne peuvent être présentes dans le mycélium aérien. La vésicule est subglobose (10 à 65µm de diamètre) ; Les conidies sont oblongues et lisse ou légèrement rugueuses (3,5 à 4,5 µm) (Raper et Fennel, 1965; Pitt et Hocking, 1997; Samson et al., 2006) (figure 6).



**Figure 6** - Vue microscopique (a) et macroscopique (b) d'*Aspergillus flavus* (Ostry, 2021).

#### I.4.4. – Mode d'infection

Le processus d'infection peut être subdivisé en quatre étapes distinctes, chacune avec ses propres caractéristiques et mécanismes :

L'adhésion : C'est le stade où les conidies reconnaissent et se lient aux cellules tégumentaires de l'insecte, grâce à un processus de reconnaissance et de compatibilité (Vey et *al.*, 1982).

La germination : dépend à la fois des conditions environnementales et de la physiologie de l'hôte, qui peuvent soit favoriser soit inhiber ce processus (St-Leger et *al.*, 1989).

La différenciation se manifeste par la formation d'appressorium, des structures terminales qui ancrent le champignon, ramollissent la cuticule et facilitent la pénétration. La production d'appressorium est fortement influencée par la valeur nutritive de la cuticule de l'hôte, favorisant la croissance mycélienne ou la pénétration en fonction de sa composition (St-Leger et *al.*, 1989).

La pénétration de l'hôte est le résultat d'une combinaison de pression mécanique et d'activité enzymatique, notamment par des enzymes telles que les lipases, les protéases et les chitinases (Kucera et Samsinakova., 1968). Les protéases sont particulièrement importantes dans ce processus, agissant conjointement avec d'autres enzymes pour permettre la pénétration de l'hôte (Butt et *al.*, 1990).

#### I.4.5. – Les Toxines

L'*Aspergillus flavus* produit plusieurs métabolites toxiques comprenant les aflatoxines B1, B2, M1, G1 et G2, l'agroclavine, l'acide aspergillique, l'aspertoxine, la citrinine, l'acide cyclopiazonique, le diacetoxy-scirpenol (DAS) (un trichothécène), l'ergocryptine, l'ergoline, l'acide kojique, l'acide 3-nitropropionique, l'ochratoxine A, la patuline, la stérigmatocystine, la toxine T2, la versicolorine A et le zéaralénone ( Centre de recherche sur la conservation des

documents graphiques., 2007). L'*Aspergillus flavus* s'attaquant à des récoltes économiquement importantes, telles les récoltes de maïs et d'arachides (Horn, 2007). Il est particulièrement associé à l'aflatoxine B1 qui est hépatotoxique pour les humains et les animaux une fois ingérée ; cette toxine peut s'accumuler avec le temps chez les sujets qui y sont exposés à répétition (Guzman et Pena, 2007).

***Chapitre II***  
***Matériel et méthodes***

Dans ce second chapitre, nous avons exploré plusieurs aspects notamment l'élevage de moustique tigre « *Aedes albopictus* », la culture du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus*, la préparation des doses de celui-ci, ainsi que les bio-tests pour voir son impact sur les stades larvaires ; Le stage s'est déroulé dans deux structures scientifiques différentes :

- Le laboratoire d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations à l'Institut Pasteur de Dely Ibrahim, Alger.
- Insectarium l'annexe de l'Institut Pasteur de Sidi Fredj, Alger.

Cette expérience a duré de février à juin 2024, sur une période de 5 mois.

## **II.1. - Matériel de travail**

### **II.1.1 - Matériel biologiques**

#### ***Aedes albopictus***

Les larves utilisées proviennent de la région de Sidi Fredj, puis elles sont élevées au laboratoire d'entomologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA).

#### ***Aspergillus flavus***

En ce qui concerne le champignon entomopathogène, la souche *d'Aspergillus flavus* a été fournie par le service de mycologie médicale de l'IPA, après avoir été isolée à partir d'un échantillon prélevé d'un patient.

### **II.1.2 - Matériel du laboratoire (Annexes)**

## **II.2. - Méthodes de travail**

### **II.2.1. - *Aedes albopictus***

#### **II.2.1.1. - L'élevage *d'Aedes albopictus***

L'élevage *d'Aedes albopictus* se fait dans une salle où certaines conditions doivent être respectées tels que : l'humidité à 70%, une température entre 25°-27° et une photopériode de 12h/12h. Ce processus consiste à vérifier le développement des larves dans les boîtes et à nettoyer et changer l'eau si nécessaire (figure 7).

Préparation des boîtes avec 1,5 litre d'eau de robinet déchlorée et utilisation du papier buvard pour les pontes.

Utilisation des croquettes de chat comme source nutritive.

Utilisation d'une pincé de levure de bière pour accélérer l'éclosion des œufs.



Utilisation d'un aspirateur à bouche pour aspirer les adultes puis on les transfère dans la cage.



Injection de relaxant et d'anesthésiant aux souris.



Nourrir les moustiques avec un jus sucré à 10%.



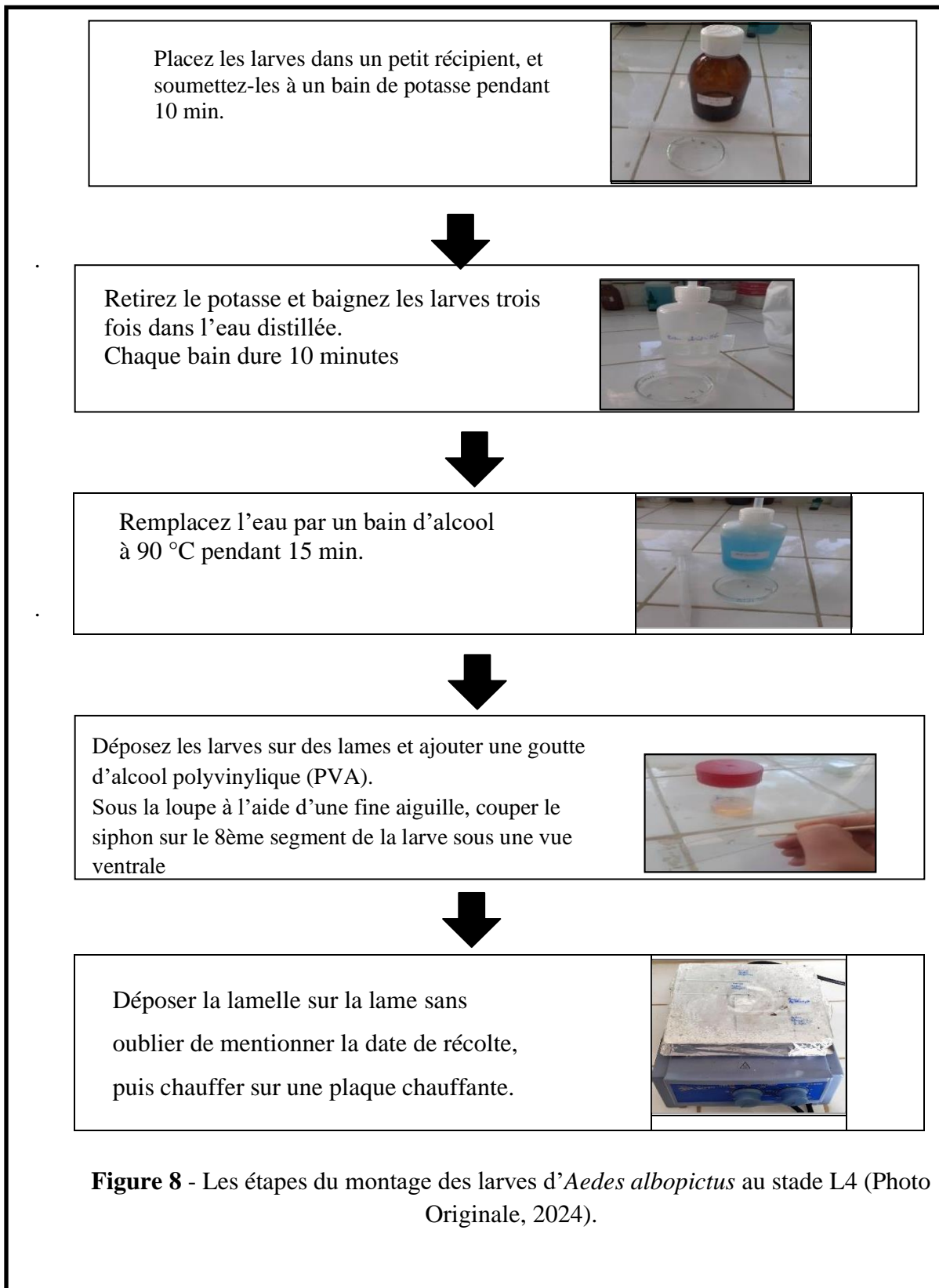
Placer les souris dans la cage à moustiques pendant 2 h pour servir de repas sanguin au femelles.



**Figure 7** - Les différentes étapes de l'élevage d'*Aedes albopictus* (Photo Originale, 2024).

## II.2.1.2. - Montage et détermination des larves

Le processus du montage consiste à faire plusieurs étapes (figure 8 et 9):



**Figure 8** - Les étapes du montage des larves d'*Aedes albopictus* au stade L4 (Photo Originale, 2024).



**Figure 9** - Larve d'*Aedes albopictus* observé sous une loupe binoculaire au grossissement (×4) (Photo Originale, 2024).

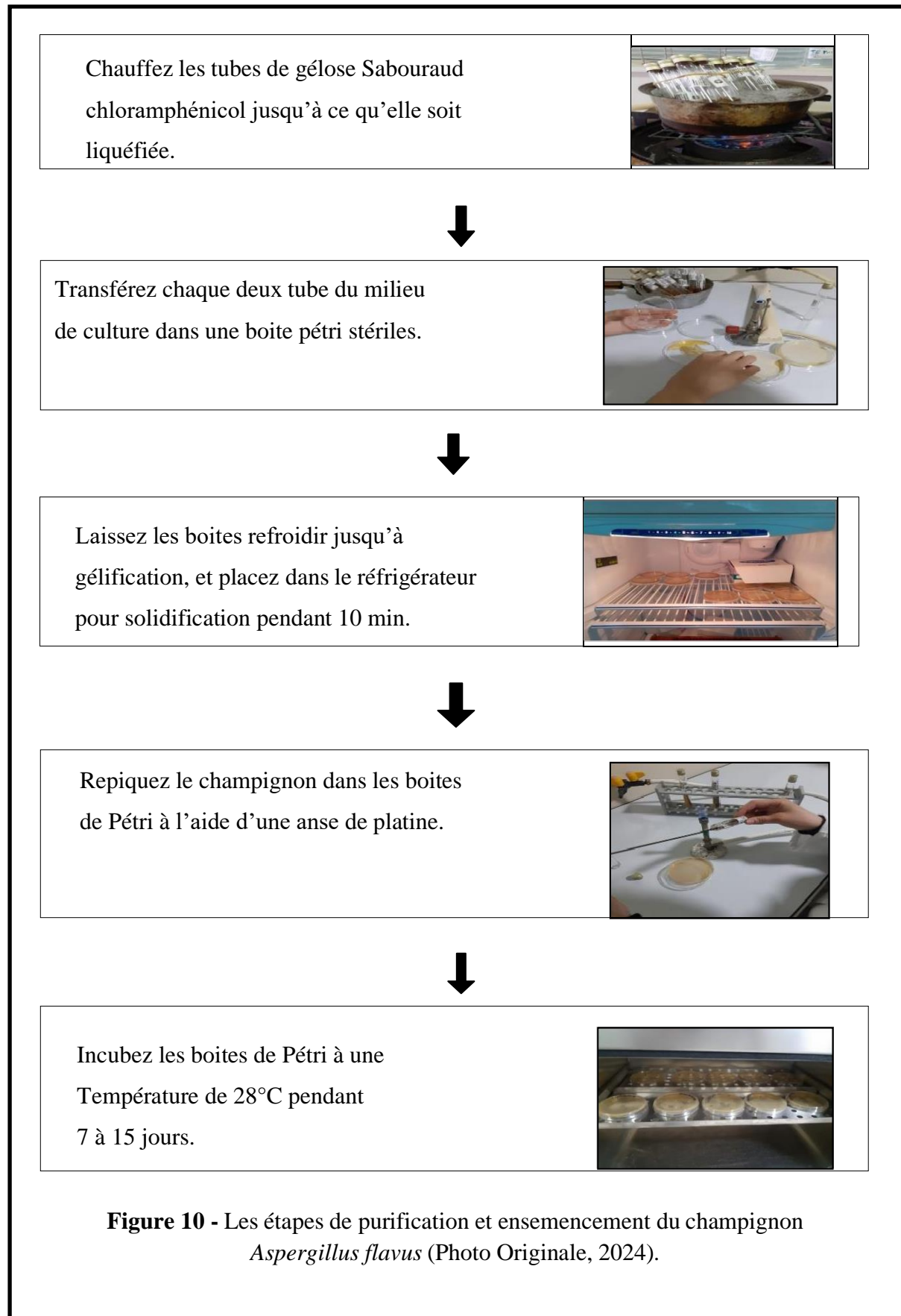
### II.2.1.3.- Identification des Larves

Les caractéristiques morphologiques des larves de moustique tigre ont été examinées à l'aide d'un microscope optique. Pour l'identification, nous avons essentiellement utilisé le logiciel d'identification des moustiques d'Europe réalisé par « L'OMS-Européen du ministère de l'Emploi et de la solidarité » (Schaffner et *al.*, 2009). Notre méthode d'identification a débuté par la détermination du genre puis l'espèce pour les larves au stade L4.

### II.2.2. - *Aspergillus flavus*

#### II.2.2.1. - Isolement, purification et identification des champignons entomopathogènes

La multiplication du champignon *Aspergillus flavus* a été réalisée sur un milieu de culture nutritif Sabouraud chloramphénicol selon les étapes suivantes (figure 10):



### II.2.2.2. – Identification macroscopique et microscopique

L'identification des champignons s'appuie sur l'observation des caractéristiques macroscopique et microscopique :

- L'identification macroscopique : l'observation de colonies développées, dans la boîte pétri se fait à l'œil nu pour voir la couleur de mycélium aérien ainsi que le revers.

- L'identification microscopique : l'observation des caractéristiques microscopiques des champignons fait appel à une préparation qui consiste à l'utilisation d'une flamme stérile, du bleu de coton et d'une boîte pétri contenant de la gélose, ensuite à l'aide d'une anse de platine stérilisée, on prélève un petit fragment de la culture puis le déposer sur la lame. Après avoir recouvert la lame avec une lamelle, on l'observe sous microscope pour étudier les caractéristiques microscopiques de ce champignon.

### II.2.3. -Méthodes de lutte biologique

#### II.2.3.1. -Préparation des solutions entomopathogènes

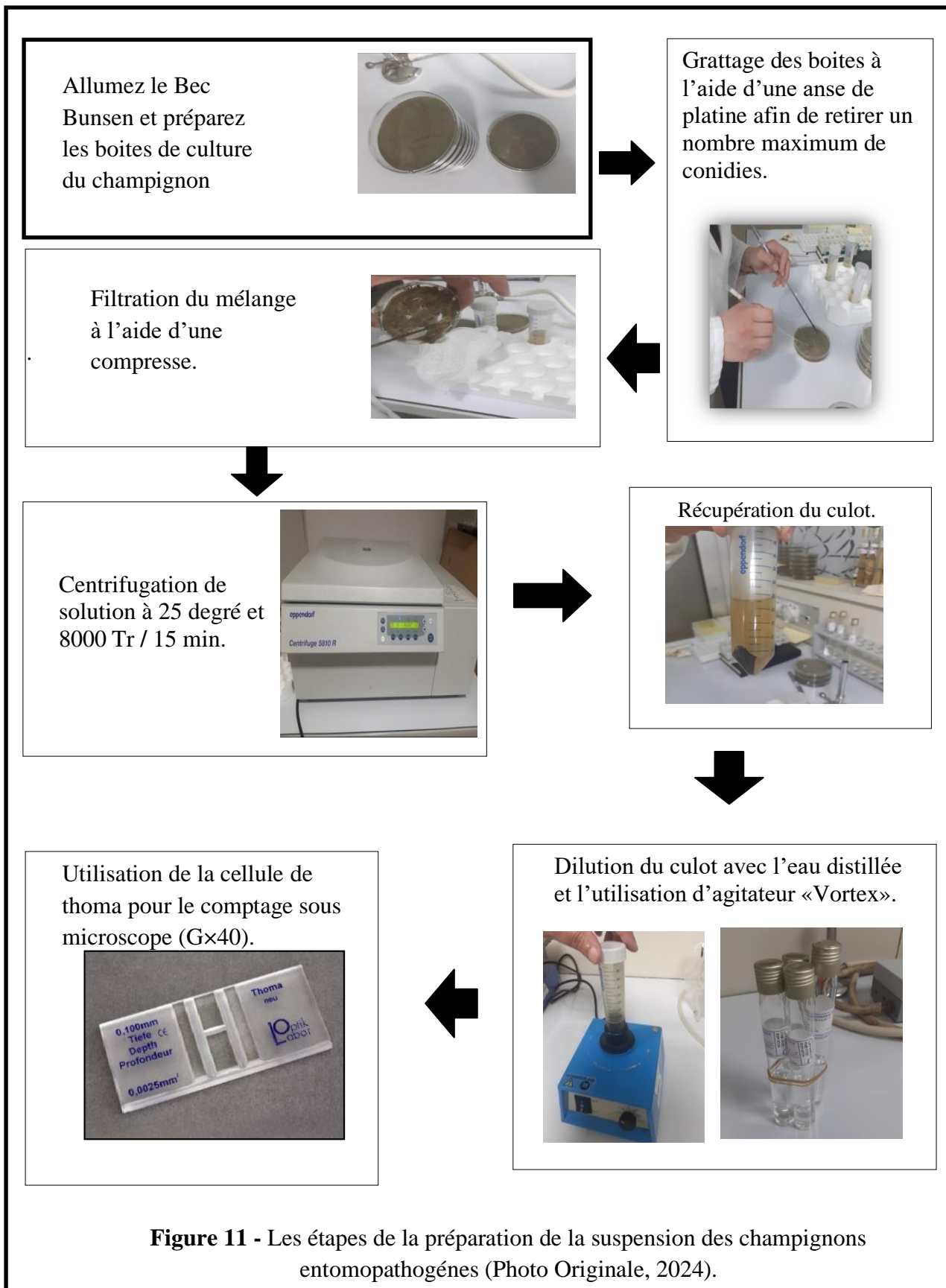
La méthode de préparation de la suspension mère consiste à réaliser les étapes annoncées dans la figure 11, pour ensuite observer aléatoirement jusqu'à six carreaux distincts sur la cellule de Thoma pour le comptage des conidies, ou on utilise un compteur manuel pour déterminer le nombre de conidies dans chaque carreau sélectionné, et enfin, on applique la formule de comptage :

$$N = \frac{\text{nombre de conidies}}{6} \times 16 \times \frac{1}{d} \times 10^3$$

N: le nombre total des conidies.

D : la dilution.

Cette méthode permet une estimation précise du nombre de conidies présentes dans l'échantillon.



### II.2.3.2. – Préparation des concentrations

Après avoir calculé la concentration de la solution mère, les autres concentrations désirées sont préparées en utilisant la loi d'équilibre (figure 12):

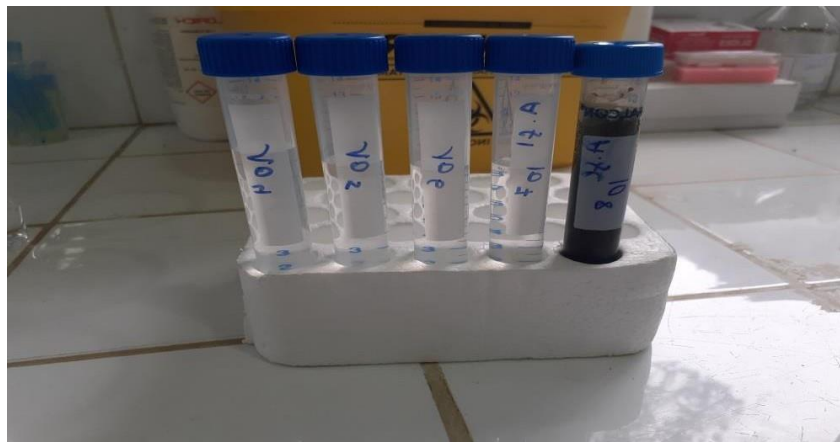
$$C_1.V_1=C_2.V_2$$

$C_1$ : La concentration en spore obtenue à partir du volume  $V_1$ .

$C_2$ : La concentration volue.

$V_1$ :Volume d'eau mis dans la solution mère.

$V_2$ :Volume d'eau correspondant à la concentration volue.



**Figure 12** - Les cinq concentrations des conidies de champignons *Aspergillus flavus* (Photo Originale, 2024).

### II.2.3.3. - Réalisation des bio-tests

Pour la réalisation des bio-tests (figure 13) nous avons utilisé les larves d'*Aedes albopictus* du stade L3-L4 et le champignon entomopathogène *Aspergillus flavus*.

Le protocole expérimental :

Pour réaliser des tests biologiques, commencez par préparer 21 gobelets et les remplir de 49 ml d'eau distillée et 10 larves du stade L3-L4. Pour chaque concentration de la solution entomopathogène on réalise trois gobelets, avec des valeurs variant de  $10^4$  jusqu'à  $10^8$ , On mélange les solutions de chaque concentration en utilisant l'agitateur « Vortex », et à l'aide d'une micropipette on prélève 1 ml de chaque suspension et le verser dans chaque gobelet. D'autre part, trois gobelets témoins négatifs contenant 50 ml d'eau distillée au quelle on ajoute 0,03 % de tween 80, et trois gobelets témoins positifs au quelle on ajoute de la Deltaméthrine à 2,5%. Les résultats sont observés sur 3 jours et le test est répété 3 fois.



**Figure 13** - Protocole expérimentale de l'activité larvicide *d'Aspergillus flavus* sur les larves *d'Aedes albopictus* (Photo Originale, 2024).

#### II.2.3.4. – Test de confirmation

Cette étape consiste à confirmer la mortalité des larves par les conidies du champignon en les observant au grossissement ( $\times 40$ ), ainsi on peut observer un grand nombre de conidies envahissant la larve.

#### II.2.4. – Méthodes d'exploitation des résultats

##### II.2.4.1. – Pourcentage de mortalité

Les comptages sont utilisés pour évaluer la sensibilité des larves, exprimée par le taux de mortalité (%) en fonction du temps d'exposition et de la dose du toxique. Selon les directives de l'OMS (1963), le pourcentage de mortalité est calculé avec la formule suivante (1) :

$$(1) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{Nombre de larves mortes}}{\text{Nombre de larves introduites}} \times 100$$

Cependant, si le taux de mortalité des témoins se situe entre 5% et 20%, une correction est appliquée selon la formule (2) d'Abbott (1925). Cette correction vise à éliminer la mortalité naturelle afin de déterminer la toxicité réelle du larvicide. Si la mortalité des témoins dépasse 20%, le test est invalidé et doit être répété.

La formule (2) pour corriger le pourcentage de mortalité est la suivante :

$$(2) \text{ Pourcentage de mortalité} = \frac{\text{mortalité des larves traitées} - \text{mortalité des témoins}}{100 - \text{mortalité des témoins}}$$

Cela permet d'obtenir une évaluation précise de l'efficacité du larvicide sans l'influence de la mortalité naturelle des larves.

La formule de la dose létale 50 est la suivante :

$$DL50 = DE50/3 \times Pm \times 10^{-4}$$

DE50 : dose efficace 50

Pm : poids moyen des sujets testés

#### **II.2.4.2. -Analyse statistique**

Les données recueillies sont entrées dans une maquette utilisant le tableur Excel, puis elles sont présentées sous forme de tableaux ou de graphiques. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel « Graph Pad Prism version 5.03.» Les données brutes sont soumises à une analyse de la variance (ANOVA), suivie de comparaisons des moyennes (écart type) à l'aide des tests de comparaisons multiples de Dunnett, où toutes les colonnes sont comparées aux colonnes témoins. Les valeurs de P inférieures à 0.05 sont considérées comme statistiquement significatives.

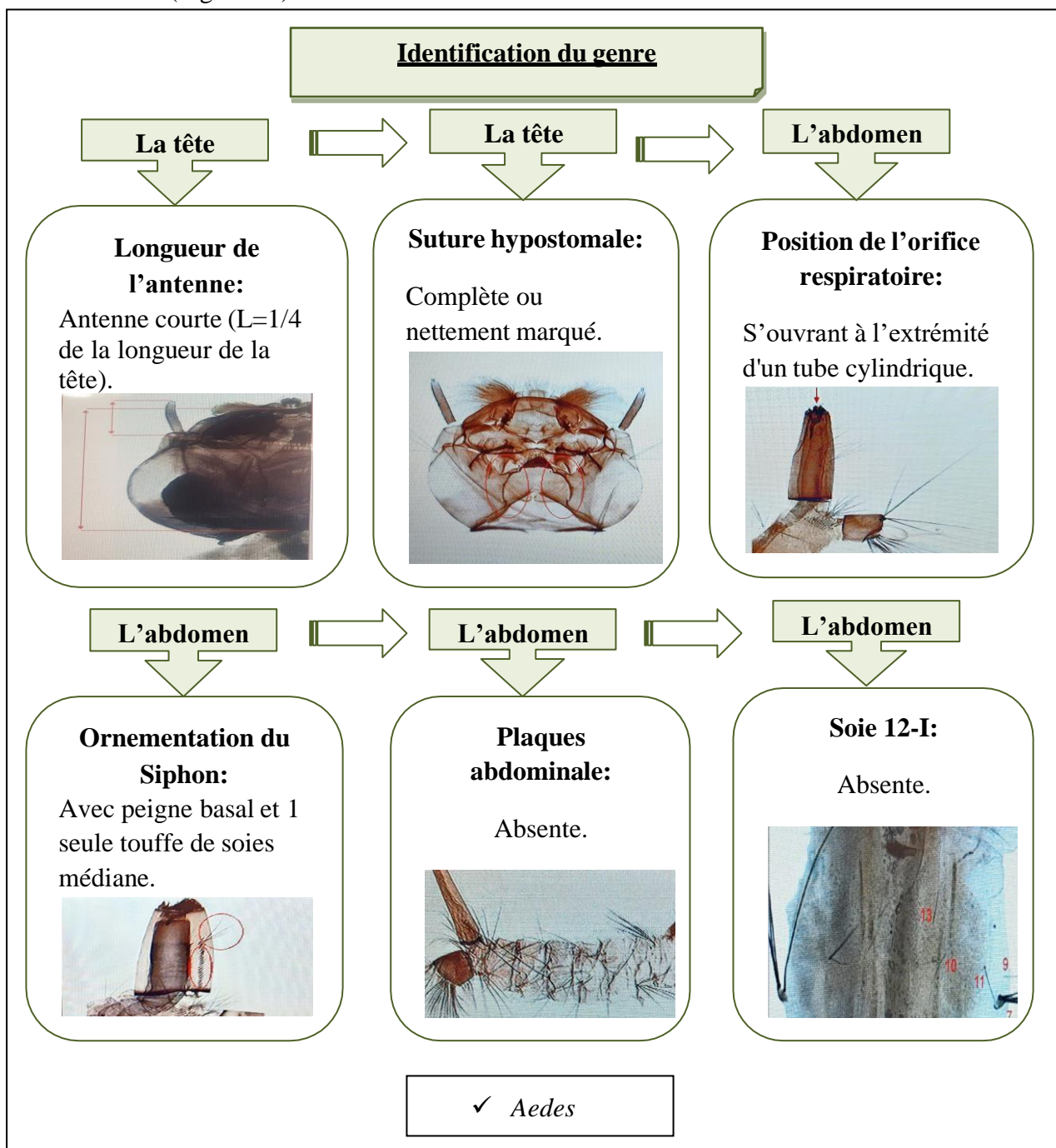
# *Chapitre III*

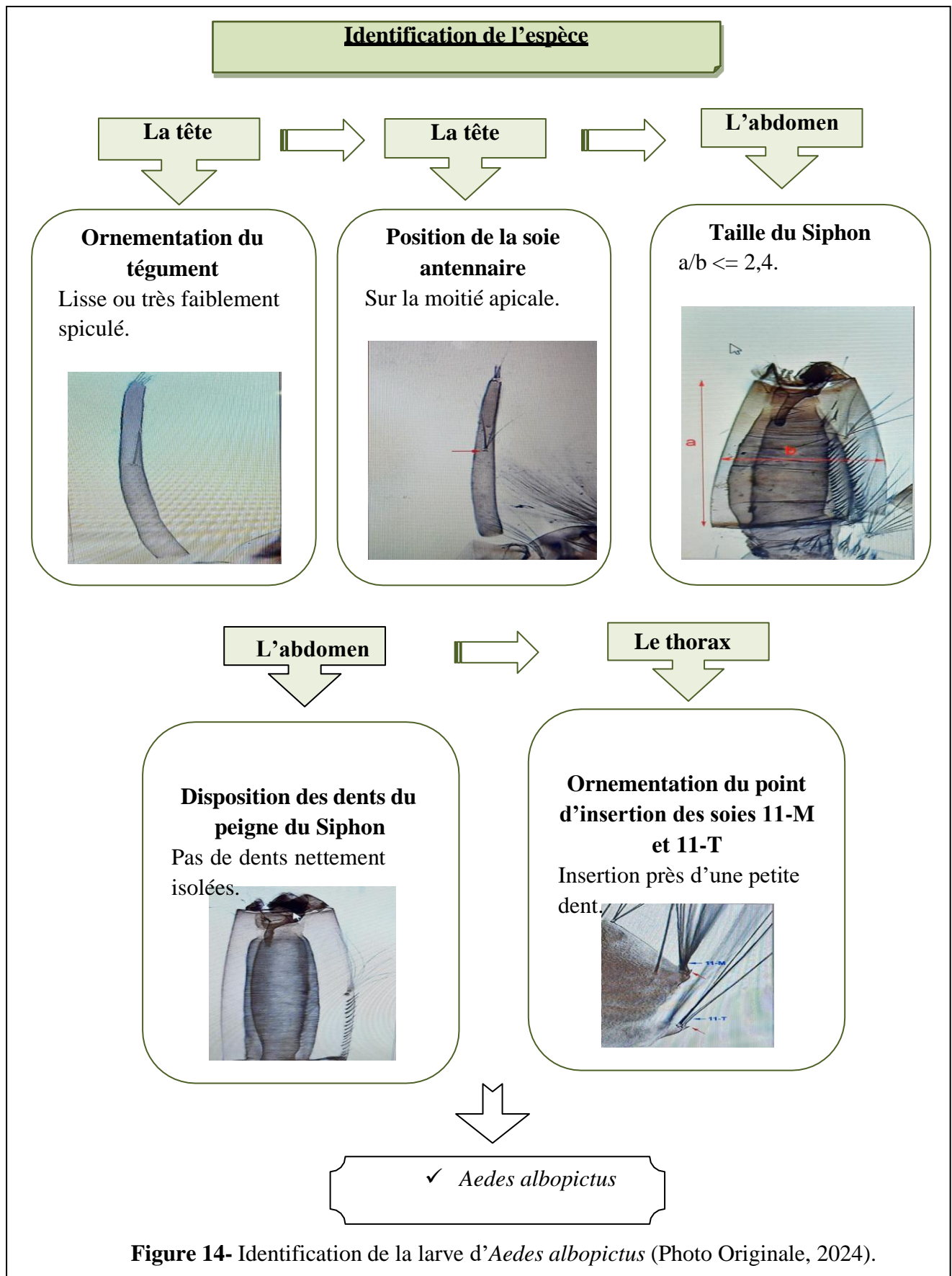
## *Résultats*

Dans l'objectif d'étudier l'effet larvicide d'*Aspergillus flavus* sur *Aedes albopictus*, nous avons réalisé une série de tests en utilisant des doses croissantes sur les larves du stade L3-L4.

### III.1. - Identification des larves

Après avoir suivis une série de choix successifs basés sur des images du logiciel d'identification et d'enseignement «Les moustiques d'Europe». Les étapes ont été suivis comme suit (Figure 14) :



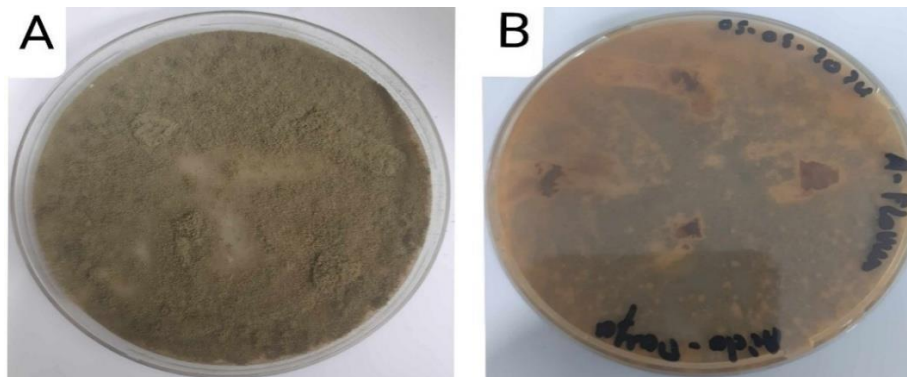


**Figure 14-** Identification de la larve d'*Aedes albopictus* (Photo Originale, 2024).

### III.2. - Identifications des isolats

L'identification macroscopique :

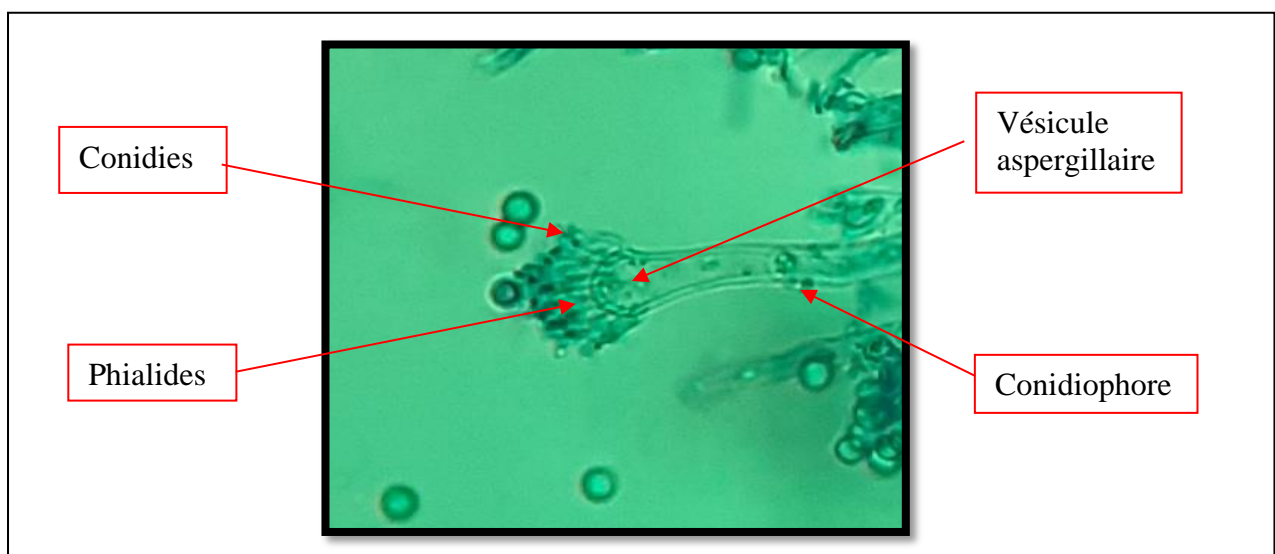
Lors de l'observation d'un échantillon, *Aspergillus flavus* se distingue par sa couleur allant du vert au jaune verdâtre, ses colonies qui varient de veloutées à poudreuses, ainsi que par la présence de structures distinctives telles que des conidiophores ramifiés portant des spores conidiennes jaunes à vertes (figure 15).



**Figure 15** - Aspect macroscopique (recto «A» et verso «B») du champignon *Aspergillus flavus*  
(Photo Originale, 2024).

L'identification microscopique :

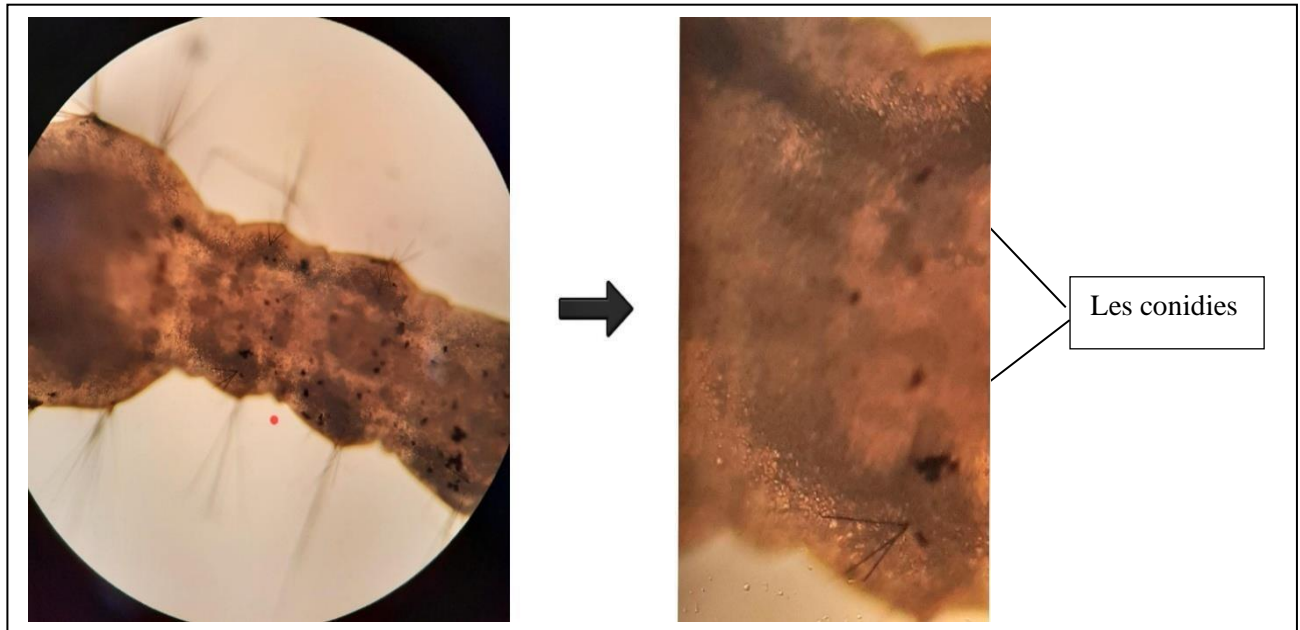
L'observation d'*Aspergillus flavus* sous microscope optique au grossissement ( $\times 40$ ) montre l'existence de filaments mycéliens, des conidiophores échinulé, d'une tête aspergillaires uni ou bisériée, ainsi la présence d'une vésicule aspergillaires qui porte sur elle des phialides et des conidies (figure 16).



**Figure 16** - Identification microscopique d'*Aspergillus flavus* sous microscope optique au grossissement ( $\times 40$ ) (Photo Originale, 2024).

### III.3. - Test de confirmation

Sous un microscope optique, nous avons pu observer la larve morte du stade L4 d'*Aedes albopictus* qui a révélé la présence d'une grande quantité de conidies d'*Aspergillus flavus* à sa surface, leur présence sur la larve peut indiquer des interactions spécifiques entre eux qui ont pu causer la mort de celle-ci (figure 17).

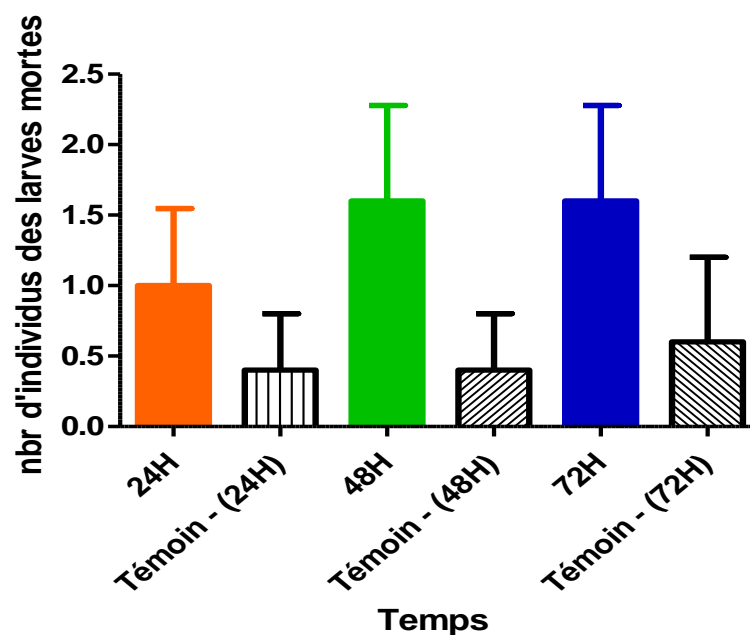


**Figure 17** - Larve d'*Aedes albopictus* au stade L4 morte vue sous microscope optique au grossissement ( $\times 40$ ) et ( $\times 100$ ) (Photo Originale, 2024).

### III.4. - L'effet d'*Aspergillus flavus* sur les larves d'*Aedes albopictus*

#### III.4.1. - Résultats des Variations de taux de mortalité d'*Aedes albopictus* traitées par *Aspergillus flavus*

Les résultats des 3 tests du champignon *Aspergillus flavus* effectués sur les larves de stade L3-L4 d'*Aedes albopictus* sont représentés graphiquement ci-dessous :



**Figure 18-** Mortalités des larves *d'Aedes albopictus* du stade L3-L4 traitées par les spores d'*Aspergillus flavus* (Test 1).

La figure 18 montre le nombre de mortalités des larves d'*Aedes albopictus* du stade L3-L4 traitées par les spores d'*A.flavus* sur une période de 72 h pour le premier Test. Les barres colorées représentent les mortalités observées avec le traitement à différents intervalles de temps (24h, 48h, 72h), ainsi les barres hachurées représentent les mortalités des témoins non traités aux mêmes intervalles de temps.

À chaque intervalle de temps, les larves traitées montrent une mortalité supérieure à celles des témoins non traités.

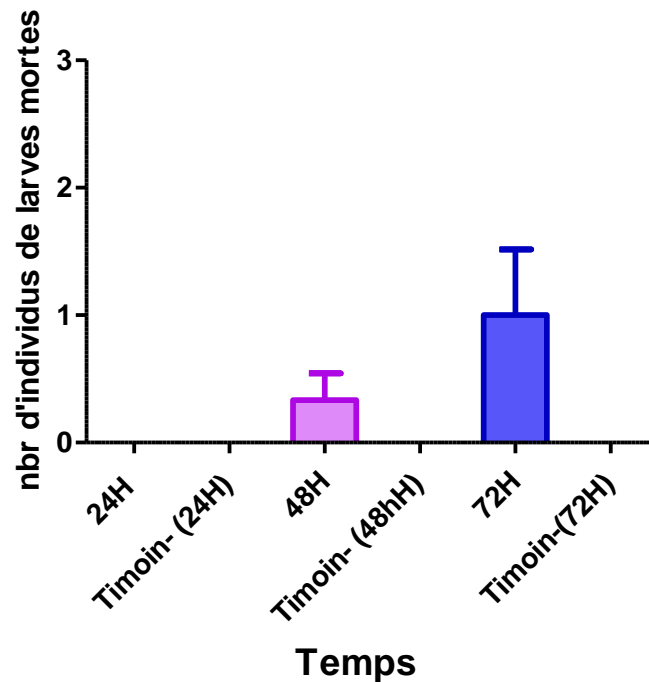
Le traitement par *A. flavus* augmente la mortalité des larves d'*Aedes albopictus* par rapport aux témoins. Donc y'a une différence significative sur la mortalité des larves entre le témoin et le nombre de mortalités des larves d'*Aedes albopictus*.

Tableau ANOVA	SS	df	MS
Traitement	7,867	5	1,573
Résidu	38,00	24	1,583
Total	45,87	29	

**Tableau 1** - Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 1.

L'analyse statistique par ANOVA à un facteur, montre l'absence d'un effet significatif d'*Aspergillus* dans le temps sur les larves de stade L3-L4 d'*Aedes albopictus* car au bout de 72 ha révélé une mortalité de 4 individus en fonction des doses traités.

Pour le Test 1, la P value = 0.4424. Cette P value est supérieure à 0.05. En conclusion, La différence entre la mortalité des traités et des témoins n'est pas significative.



**Figure 19** - Mortalités des larves d'*Aedes albopictus* du stade L3-L4 traitées par les spores d'*Aspergillus flavus* (Test 2).

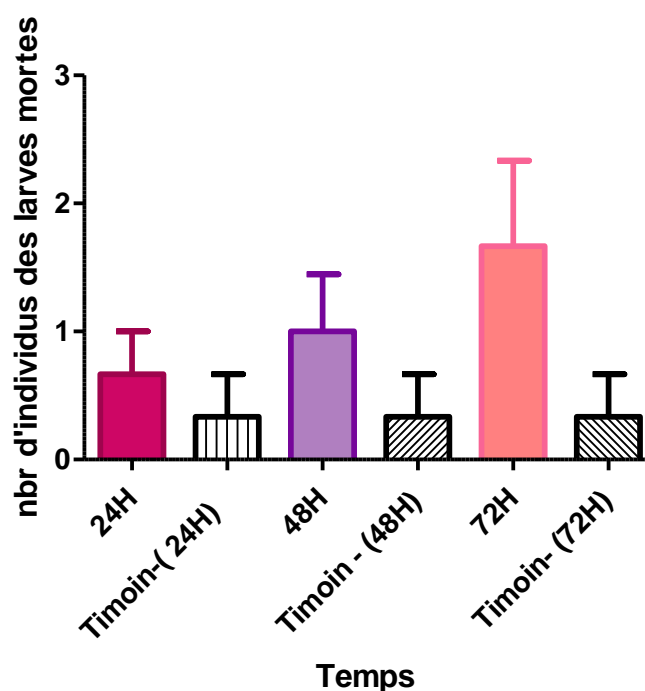
Selon la figure 19 qui montre que le traitement des larves du stade L3-L4 d'*Aedes albopictus* par les spores d'*A.flavus* (Test 2) entraîne une mortalité accrue des larves dans le temps. Les témoins montrent une mortalité très faible à travers toutes les périodes, tandis que les larves traitées montrent une mortalité croissante, particulièrement notable à 72 heures. Les résultats aberrants du test 2 n'ont pas permis de faire une analyse statistique.

Tableau ANOVA	SS	df	MS
Traitement	4,889	5	0,9778
Résidu	9,333	30	0,3111
Total	14,22	35	

**Tableau 2** – Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 2.

Après l'analyse ANOVA les résultats indiquent que l'efficacité du traitement augmente avec le temps, atteignant un maximum à 72 heures, ainsi la différence entre le témoin et les doses utilisées n'est pas significative.

Pour le Test 2, la P value = 0.1156. Bien que cette P value soit plus proche de 0.05 que celle du Test 1, elle reste supérieure à 0.05. En conclusion la différence entre la mortalité des traitées et des témoins n'est pas significatif.



**Figure 20** - Mortalités des larves d'*Aedes albopictus* du stade L3-L4 traitées par les spores d'*Aspergillus flavus* (Test 3).

La figure 20 montre le nombre de mortalités des larves d'*Aedes albopictus* du stade L3-L4 traitées par les spores d'*A. flavus* au fil du temps pour le Test 3.

Le traitement par *A. flavus* provoque une mortalité supérieure à celle du témoin après 24h et 48h, et après 72 heures, le traitement provoque plus de mortalités par rapport au témoin.

Tableau ANOVA	SS	df	MS
Traitement	8,556	5	1,711
Résidu	32,67	30	1,089
Total	41,22	35	

**Tableau 3** – Résultats d'analyse statistique par ANOVA du test 3.

L'analyse statistique par ANOVA montre l'absence d'un effet significatif d'*A.flavus* dans le temps car au bout de 72 h a révélé une mortalité de 4 individus en fonction des doses traités.

Pour le Test 3, la P value = 0.1983, cette P value est également supérieure à 0.05. En conclusion, la différence entre le nombre mortalité des larves traitées et des témoins n'est pas significative.

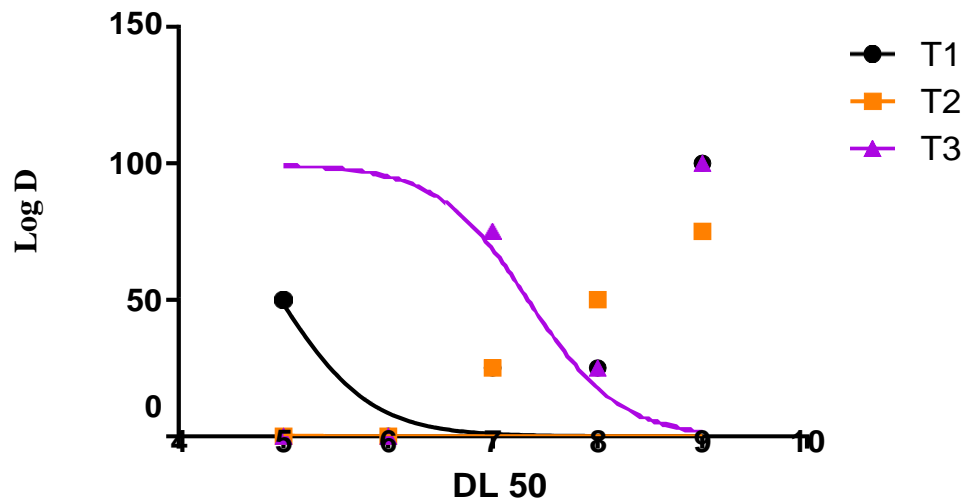
En conclusion, aucune des P value des trois tests n'est inférieure à 0.05, ce qui signifie que les résultats de ces tests ne sont pas statistiquement significatifs.

#### III.4.2. - Estimation des DL à 50% d'*Aspergillus flavus*

La figure 21 montre un graphe qui représente la dose létale à 50% pour les larves L3-L4 d'*Aedes albopictus* varie entre les trois séries de tests.

Le test 1 montre une sensibilité plus élevée (plus faible DL50%) par rapport au test 2 et test 3, suggérant que les larves du 1<sup>er</sup> test sont plus susceptibles au traitement que celles du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> test.

Les résultats montrent une augmentation de la DL50% dans les tests subséquents (T2 et T3), indiquant potentiellement une tolérance accrue ou une résistance développée par les larves à mesure que les tests progressent.



**Figure 21** - Les DL 50% du nombre de spores d'*Aspergillus flavus* sur les larves au stade L3-L4 d'*Aedes albopictus* pour le 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup>, et 3<sup>ème</sup> Tests.

### III.4.3. - Comparaison des DL 50% des trois tests

Après avoir effectué l'analyse par une régression non linéaire au bout de 72h, nous avons obtenu les valeurs des DL50% suivantes :

Test 1:  $DL50 = 0,009 \times 10^7$  spores

Test 2: DL50 non significative

Test 3:  $DL50 = 2,2 \times 10^7$  spores

Les résultats montrent une variabilité dans l'efficacité d'*Aspergillus flavus* sur *Aedes albopictus* entre les trois tests. Au cours du Test 1, nous avons obtenu une forte efficacité avec une DL50 très faible. Le Test 2 : ne fournit pas de valeur de DL50, et le Test 3 : montre une efficacité beaucoup plus faible avec une DL50 très élevée.

# *Chapitre IV*

## *Discussion*

Dans cette étude, nous avons exploré l'activité larvicide du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* vis-à-vis des larves de moustique tigre *Aedes albopictus* nous nous sommes concentrés sur les propriétés larvicide de ce champignon. L'Analyse a été structurée en plusieurs segments distincts.

Notre recherche a débuté par l'élevage de moustique tigre puis par l'isolement du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* à partir d'un spécimen prélevé sur un patient. Cette opération a été réalisée en utilisant le milieu de culture Sabouraud chloramphénicol. C'est un milieu utilisé pour isoler et cultiver des champignons entomopathogènes, il est recommandé pour les prélèvements fortement contaminés par des bactéries, car le chloramphénicol inhibe la croissance des bactéries, permettant ainsi une croissance plus efficace des champignons (Carlier et al., 1948).

Dans la deuxième partie de notre recherche, nous nous concentrons sur des bio-tests utilisant le champignon *Aspergillus flavus*, et de l'*Aedes albopictus* élevées en laboratoire d'entomologie. Nous avons répétés les bio-tests trois fois pour garantir que l'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions et que les protocoles de mesure ont été rigoureusement suivis.

Nos résultats indiquent que la comparaison entre le nombre de mortalités des larves traitées et des témoins effectués à l'aide de l'analyse ANOVA a un facteur, a révélé qu'il n'existait pas de différence significative dans les trois tests, avec une valeur de P value=0,4424 >0.05 pour le premier test, P value =0,1156>0.05 pour le deuxième test, et P value=0,1983> 0.05 pour le troisième test.

La productibilité des DL50 obtenue à partir des trois tests sur les larves des stades L3-L4 réalisé par l'analyse régression non linéaire, suggère une forte efficacité d'*Aspergillus flavus* dans le test 1 avec une valeur ( $DL50 = 0,009 \times 10^7$ ) est relativement basse, ce qui indique que la dose nécessaire pour tuer 50 % des *Aedes albopictus* est faible. Par contre l'absence de valeur de DL50 dans le test 2 pourrait signifier que la dose létale 50 n'a pas été atteinte avec les doses testées. Il pourrait aussi y avoir des erreurs expérimentales ou des conditions expérimentales différentes. Pour le test 3 la  $DL50 = 2,2 \times 10^7$ , Cette valeur de est beaucoup plus élevée que celle du Test 1, indiquant qu'une dose beaucoup plus importante est nécessaire pour tuer 50 % des *Aedes albopictus*. Cela suggère une efficacité moindre d'*Aspergillus flavus* dans ce test par rapport au Test 1.

Nos résultats indiquent une augmentation de la DL50 dans le test 3, suggérant un développement potentiel de tolérance ou de résistance chez les larves au fil du temps. Cela signifie que des doses plus élevées sont nécessaires pour atteindre 50% de mortalité dans les tests ultérieurs. Ces résultats sont en accord avec la littérature existante, L'étude de Larson et al., (2015) a investigué l'efficacité d'*Aspergillus flavus* contre les larves de moustiques, en se concentrant spécifiquement sur *Aedes albopictus*. Leurs résultats ont révélé une diminution notable de la survie larvaire, suggérant une toxicité accrue du champignon à mesure que la concentration augmentait. Tang et al., (2018) ont étudié l'impact d'*Aspergillus flavus* sur les larves de divers moustiques, y compris *Aedes aegypti*, observant une augmentation de la mortalité larvaire en fonction de la dose de champignon appliquée. Mnyone et al., (2016) ont examiné l'utilisation potentielle d'*Aspergillus flavus* comme bio-pesticide contre les larves de moustiques, montrant une baisse significative de la survie larvaire après exposition au champignon. Moraos et al., (2001) mis en évidence l'efficacité de plusieurs espèces d'*Aspergillus* dont *A.flavus* contre *Aedes fluviatilis*. Cependant, ces mêmes souches ont été testées sur *Cx.quinquefasciatus* mais sans succès. En revanche, les espèces comme *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* se sont révélées efficaces contre les larves et les adultes des espèces de moustiques comme *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, *Cx.pipiens*, *Cx.tarsalis*, *Cx.tritaeniorhynchus*, *An.stephensi* et *An.albimanus* au laboratoire et en milieu naturel (Clark et al., 1968; Alves et al., 2002; Wright et al., 2005; Scholte et al., 2007; Kanzok et Lorena, 2006; Luz et al., 2007; Suman et al., 2008; Siva et Kadarkarai, 2011). Par ailleurs d'après Riba et al., (1985) la souche de *M.anisopliae* est la souche la plus agressive sur les larves d'*Aedes albopictus* et sur les larves de *Culex pipiens*.

# *Conclusion*

## Conclusion

---

Lutter contre les vecteurs de maladies uniquement avec des insecticides chimiques serait irresponsable. Utiliser des substances naturelles pour combattre les moustiques offre une solution adéquate aux problèmes de pollution, d'impact environnemental et de résistance aux produits chimiques. C'est pourquoi notre étude a examiné les effets du champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* sur les larves de moustiques *Aedes albopictus*.

Nos résultats ont démontré que l'activité larvicide de ce champignon augmente proportionnellement à sa concentration. Au cours des trois tests réalisés (24h, 48h, 72h), il a été observé une diminution progressive des mouvements des larves du moustique *Aedes albopictus*, un allongement de leur développement, suivi de leur mortalité après un certain temps. En outre, notre étude a permis de déterminer l'efficacité réelle du champignon sur les larves d'*Aedes albopictus*.

Bien que les résultats actuels soient prometteurs et suggèrent un potentiel d'utilisation d'*Aspergillus flavus* pour contrôler les populations de moustiques *Aedes albopictus*, ils ne suffisent pas à établir de manière définitive son efficacité et sa sécurité. Nos analyses statistiques ont montré que l'effet larvicide d'*Aspergillus flavus* est très faible et non significatif. Des études plus approfondies sont nécessaires pour confirmer que la réponse observée est bien due à l'effet toxique du champignon.

Concernant les stades larvaires des moustiques *Aedes albopictus* traités, nos résultats indiquent que les larves du stade L4 présentent une résistance accrue à *Aspergillus flavus*. Cette résistance semble avoir été acquise au cours du temps, probablement en raison de l'exposition répétée au champignon entomopathogène.

Les résultats observés soulignent l'importance de poursuivre les recherches en réalisant plus de 3 tests et de prolonger la période de contact entre le champignon et les larves afin de comprendre les mécanismes sous-jacents et maximiser l'efficacité d'*Aspergillus flavus* comme agent de lutte biologique contre *Aedes albopictus*.

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- **Alves SB, Alves LFA, Lopes RB, Pereira RM, Vieira SA, (2002).** Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt. Culicidae). *Journal of Applied Entomology*, 126: 504-509-
- **Anna –Bella Failloux., (2018).** Article les moustiques vecteurs d'arbovirus (une histoire sans fin).
- **Auerswald H, Boussioux C, In S, et al., (2018).** Protection immunitaire large et durable contre divers génotypes de *Chikungunya* démontrée par les participants à une étude transversale dans une communauté rurale cambodgienne. (*Emerg Microbes Infect*);7(1):13.
- **Benallal, K., Tine, R., & Toumi, A, (2019).** "Epidémiologie et écologie du moustique *Aedes albopictus* en Algérie." *Journal de la Santé Publique et de l'Épidémiologie*, 7(2), 115-123.
- **Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A., (2013).** The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*, 29(9), 460-468.
- **Brady, O.J., Johansson, M.A., Guerra, C.A., Bhatt, S., Golding, N., Pigott, D.M., et al., (2013)** Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field setting. *Parasit. Vectors* 6:351
- **Butt et al., (1990).** Production of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* 13:274-288.
- **Cailly, P., Tran A., Balenghien T., L'Ambert G., Toty C., Ezanno P., (2012).** A climate – driven abundance model to assess mosquito control strategies. *Ecological Modelling* 227, 7-17.
- **Centre de recherche sur la conservation des documents graphiques, (2007).** Moisissures et biens culturels. Ministère de la Culture et de la Communication. France.
- **Clark TB, Kellen WR, Fukuda TJ, Lindgren E, (1968).** Field and laboratory studies of the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *J. Invertebr. Pathol.*, 11: 1-7.-
- **Clausen, P.C, (1972).** Entomophagous insect, New York : Edition Hafner. 688p.
- **Clements, A. N, (1992)** .The biology of mosquitoes : Development , nutrition and reproduction Chapman & Hall.
- **Clémentine Desfemmes, (2021).** Article "La lutte biologique", la revue Alternatives Sub, volume 28, numéro 3.

## Références bibliographiques

---

- **Cloutier,C, (1992).** Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. In la lutte bioogique, sous la direction de C. Vincent et D.Coderre, Pages 19-88.Chicoutimi, Québec, Canada : Gaétan Morin éditeur ltée.
- **Didier Fontenille, Christophe Paupy, Anna-Bella Failloux du livre : Duvallet G., Fontenille D., Robert V., eds, (2017).** Extrait du Chapitre 11. Culicinae Entomologie médicale et vétérinaire. Marseille-Versailles, IRD Editions- Quae, 650 pp.
- **Dominique Chabasse, (Novembre 2023).** Dossier scientifique « Les maladies tropicales négligées », Revue Francophone des Laboratoires• N° 556 .Page : 52.
- **Duvallet G., Didier Fontenille, Vincent Robert, (2017).** Entomologie médicale et vétérinaire Marseille, Versailles. IRD Éditions-Quae. Pages: 687 .
- **Estrada-Franco, J.G. and Craig G.B, (1995).** Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus* pan American health organization, pan American sanitary bureau. Regional office of the World HealthOrganization.
- **Failloux A.B, (2019).** Les moustiquesvecteurs d' arbovirus : une histoire sans fin. BiolAujourd'hui, 212.
- **Feuillet C., Dassonval F., Lavaud H., Viniaker L., Bidat , (2006).** Mosquito bites allerg, whichprevention. Archives de pédiatrie, Vol.13, Issue 1 ? France, 93-99.
- **Fontenille D., Lagneau C., Lecollinet V., Lefait-Robin R., Setbon M., Tirel B., Yebakima A.(Eds), (2013).** La lutte anti-vectorielle en France,IRD Editions, Marseille, Page :533.
- **Foster ,W.A, (1995).** Mosquito sugarfeeding and reproductive energetics .Annu. Rev.Entomol 40 :443-474.
- **Gomes,A. de C., Gotlieb, S.L., Marques ,C.C.,de Paula ,M.B., and Marques, G.R, (1995).** Duration of larval and pupal de velopment stages of *Aedes albopictus* in natural and artificial containers. Rev .Sau de Publica 29:15-19.
- **Gubler, D. J, (2002).** Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. Trends in Microbiology, 10(2), 100-103.
- **Guzman de, Pena D, (2007).** [Exposure to aflatoxin B1 in experiental animals and its public health significance]. SaludPublica Mex. 49[3], 227-235.
- **Hamid, A., Bouzid, A., & Khaled, S, (2021).** "Lutte intégrée contre *Aedes albopictus*: Stratégies et défis en Algérie." Revue de la Santé et de l'Environnement, 12(1), 98-110.
- **Harbach, R.E., (2007).** The Culicidae review of taxonomy, classification an Zootaxa, 1668:591-638.

## Références bibliographiques

---

- **Hawley, W.A, (1988).** The biology of *Aedes albopictus* .J. Am .Mosq. Control Assoc.Suppl.1:1-39.
- **Hedayati, M .T.,Pasqualotto , A.C., Warn , P .A.,Bowyer , P., and Denning D.W, (2007).**Aspergillus flavus : human pathogen ,allergen and mycotoxin producer. Microbiology, 153(Pt 6), 1677-1692.
- **Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., et al., (2011).** Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. Nature, 476(7361), 454-457.
- **Horn, B.W, (2007).** Biodiversity of *Aspergillus* section Flavi in the United States: a review.Food Addit. Contam. 24[10], 1088-1101.
- **Juliano, S. A., et Lounibos, L. P, (2005).** "Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health." \*EcologyLetters\*, 8(5), 558-574.
- **Kanzok SM, Lorena MJ, (2006).** Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. Trends in Parasitology, 22: 49–51.
- **Karunaratne, S.H.P.P.,Weeraratne, T.C., Perera, M.D.B., andSurendran, S.N, (2013).** Insecticide resistance and efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Srilanka. Pestic.Biochem. Physiol. 107:98-105.
- **Khelifi, R., Benmehdi, S., & Moulai, R, (2021).** "Effets des insecticides biologiques sur *Aedes albopictus* en Algérie." Journal Algérien de l'Entomologie, 5(2), 56-64.
- **Kucera, M. et A. Samsinakova, (1968).** Toxins of the Entomophagous fungus*Beauveria bassiana*. J. Invertebr. Pathol. 12:316-320.
- **Lacey, L. A, (2007).** *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. Journal of the American Mosquito Control Association, 23(sp2), 133-163.
- **Lacey, L. A., & Kaya, H. K, (2007).** Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and Evaluation of Pathogens for Control of Insects and Other Invertebrate Pests (2nd ed.). Springer Science & Business Media
- **Larson, V. M., Smith, J. K., & Thompson, R. L, (2015).** Efficacy of *Aspergillus flavus* against *Aedes albopictus* larvae. \*Journal of Vector Ecology\*, 40(2), 180-188.
- **Linley,J.R, (1989).** Comparative fine structure of the eggs of *Aedes albopictus*, *Ae.aegypti*,and *Ae.bahamensis* (Diptera :Clicidae).J. Med .Entomol. 26 :510-521.

## Références bibliographiques

---

- **Lowenberg Neto, P. and Navarro-Silva, M.A, (2004).** Development, longevity, gonotrophic cycle and oviposition of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera :Culicidae) under cyclic temperatures Neotrop .Entomol 33 :29-33.
- **Luz C, Tai MHH, Santos AH, Rocha LFN, Albernaz DAS, Silva HHG, ( 2007).** Ovicidal activity of entomopathogenic Hyphomycetes on *Aedes aegypti*(Diptera: Culicidae) under laboratory conditions. Journal of Medical Entomology, 44: 799–804.
- **Malar Sivanathan , M, (2006).**The ecology and biology of *Aedes aegypti*(L.) and *Aedes albopictus* (skuse) (Diptera : Culicidae) and the resistance status of *aedes albopictus* (field strain) against organophosphates in Penang, Malaysia.
- **Mathulwe, L.L., Malan, A.P., Stokwe, N.F.A, (2020).** Review of the biology and control of the obscure mealybug, *Pseudococcus viburni* (Hemiptera: Pseudococcidae), with special reference to biological control using entomopathogenic fungi and nematodes. African Entomology. 29(1), 1-16.
- **Mebarki, Y., Benaissa, M., & Ait-Kaci, S, (2020).** "Surveillance entomologique et mesures de contrôle de *Aedes albopictus* en Algérie." Bulletin de l'Institut Pasteur d'Algérie, 29(4), 221-230.
- **Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W, (2012).** "A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options." \*Vector-Borne and Zoonotic Diseases\*, 12(6), 435-447.
- **Messai N., Berchi S., Boulknaf F., Louadi K, (2011).** Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). Vol.63, n°3, pp 203-206.
- **Mitchell , C.J, (1995).** Geographic spread of *Aedes Albopictus* and potential for involvement in Arbovirus cycles in the mediterranean basin .Journal of vector ecology, 20(1),44-58.
- **Mnyone, L. L., Ng'habi, K. R., & Nkwengulila, G, (2016).** Potential use of *Aspergillus flavus* as a biopesticide against mosquito larvae. \*Malaria Journal\*, 15(1), 321-329.
- **Moraes AML, Costa GL, Camargo BMZ, Oliveira RL, Oliveira PC, (2001).** The entomopathogenic potential of *Aspergillus* spp. in mosquitoes vectors of tropical diseases. Journal of Basic Microbiology, 41: 45-49.
- **Musso D, Ko AI, Baud D, (2019).** Infection par le virus Zika – Après la pandémie. N Engl J Med.;381(15).
- **Nicolas Henon, (2022), TIGER .** Photographies des stades larvaires .Tri-national Initiative Groupe of Entomology in upper Rhine Valley.

## Références bibliographiques

---

- **Philippe Bousses , Jean –Sébastien Dehecq, Didier Fontenille., (2021).** les moustiques de la Réunion , chapitre 8. Descriptif des espèces présentes à la Réunion.
- **Pitt, J. I. , & Hocking , A.D., (1997).** *Aspergillus* and related teleomorphs . In *Fungi and food spoilage* (pp. 339-416). Springer , Boston , MA.
- **Raper K , Fennel D.J., (1965).** The genus *Aspergillus* , Williams and Wilkins editor, Baltimore.
- **Riba G, (2000).** *Fungi diagnosis and pathology of diseases from locust* , France.
- **Robert V., Fontenille D., Simard F., (2008).** Introduction aux vecteurs et aux maladies à transmission vectorielle. *Epidémiol Santé Anim*, 54, 1-11.
- **Roiz D, Wilson AL, Scott TW, Fonseca DM, Jourdain F, Müller P, et al., (2018)** Integrated Aedes management for the control of Aedes-borne diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 12(12): e0006845. Editor: Olaf Horstick, University of Heidelberg, GERMANY
- **Samson R.A., Hong S.B. et Frisvad J.C, (2006).** Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus* . *Medical Mycology*. 44 :133-148.
- **Samson R .A , Visagie CM , Houbraken J, Hong S.B , Hubka V, Klaassen CHW , Perrone G, Seifert KA , Susca A, Tanney JB, Varga J , Kocsubé S , Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC, (2014).** Phylogeny , identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78: 141-173.
- **Schaffner et al., (2009).** "Schaffner 2009 mosquito larvae identification software."
- **Scholte EJ, Takken W, Knols BGJ, (2007).** Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Tropica*, 102: 151–158-
- **Scholte, E. J., & Schaffner, F, (2007).** Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe* (pp. 241-260). Wageningen Academic Publishers.
- **Shah, P.A., Pell, J.K, (2003).** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61(5), 413-423.
- **Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., & Stanaway, J. D, (2017).** The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infectious Diseases*, 17(9), e193-e204.
- **Siva K, Kadarkarai M., (2011).** Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* for the control of Dengue vector, *Aedes aegypti* (Insecta: Diptera: Culicidae). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(6): 1195-1201.

## Références bibliographiques

---

- **St. Leger, R. J., P. K. Durrands, A. K. Charnley et R. M. Cooper, (1988).** Role of extracellular chitinase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 285-293.
- **St. Leger, R.J., Butt, T.M., Staples, R. et Roberts, D.W, (1989).** Production in vitro of a cuticle-degrading protease by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* 13: 253-262.
- **Suckling D.M., Stringer, L.D., stephes, A.E., woods, B., Williams, DaG., Baker, G. et El- Sayed A.M, (2014).** From integrated pest management to integrated pest eradication: technologies and future needs-pest-Management. *Sci*, 70 (2): 179-189p
- **Suman SM, Kamaraju R, Kumar MP, Aditya PD., (2008).** Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 1199–1202.
- **Sylvie Lecollinet et Nonito Pagès, (2022).** Ouvrage « Le moustique en France public N°1? », Collection Enjeux Sciences, Editions Quae.
- **Tang, H., Li, P., Zhang, Q., & Wang, Y, (2018).** Impact of *Aspergillus flavus* on larvae of various mosquito species including *Aedes aegypti*. *\*Parasitology Research\**, 117(4), 1507-1515.
- **Vey, A.J., Fargues, J. et Robert, P, (1982).** Histological and ultrastructural studies of factors determining the specificity of pathotypes of the fungus *Metarhizium anisopliae* for scarabid larvae. *Entomophaga* 27: 387-397.
- **Vladimir Ostry, (2021).** Revue Aflatoxines : Histoire, Etape Importante, Donnée Récentes sur leur toxicité et Moyens de Mitigation , page 3 *Toxins* 13,399.
- **Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H, (2012).** Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 104:126-131. Article: Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes in southern Benin, West Africa, Published online 2023 Apr 21.
- **Wright MS, Raina AK, Lax AR, ( 2005).** A strain of the fungus *Metarhizium anisopliae* for controlling subterranean termites. *Journal of Economic Entomology*, 98: 1451-1458
- **Wright, A. D., Osterhage, C., and König, G.M, (2003).** Epicoccamide, a novel secondary metabolite from a jellyfish –derived culture of *Epicoccum purpurascens*, *Org. Biomol. Chem.* 1(3), 507-510.

## Références bibliographiques

---

- **Yu, J., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., and Bennett, J. W., (2005).** *Aspergillus flavus* genomics ; gateway to human and animal health , food safety , and crop resistance to diseases. *Rev. Iberoam. Micol.* 22(4), 194-202.
- **Zermane, A., Abdelkader, F., & Mezhoud, H., (2022).** "Impact des programmes de sensibilisation sur la lutte contre *Aedes albopictus* en Algérie." *Annales de l'Épidémiologie et de la Santé Communautaire*, 34(3), 145-153.

# *Annexes*

### Annexe I:

Matériels de travail

Matériel	Appareils
Cage, Aspirateur à bouche	Humidificateur
Pipette en plastique, Anse de platine	Lampes anti-moustiques UV
Bec bunsen, Boite de pétri	Etuve
Pipette pasteur, Cellule de Thoma	Loupe binoculaire
Lame et lamelle, Portoir	Microscope optique
Compteur, Tube conique	Centrifugeur
Gélose Sabouraud-chloramphénicol	Réfrigérateur
Tween 80, Flacon en verre.	Agitateur Vortex
	Micropipette

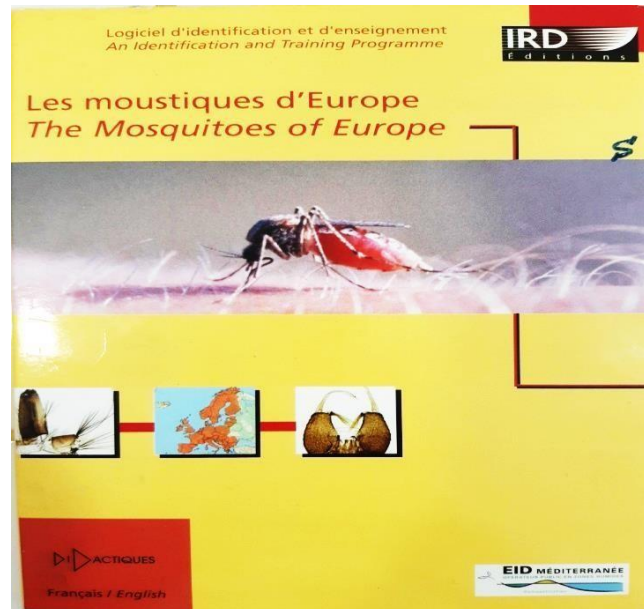
### Annexe II:

Préparation du milieu du montage PVA :

Alcool polyvinylique ..... 12g  
Acide formique..... 20g  
Hydrate de chloral .....24g  
Phénol..... 24g

- ❖ Mélanger ces quatre produits à la fois et à l'air libre.
- ❖ Verser le mélange dans un flacon et le placer au bain marie durant une nuit complète pour avoir une solution aqueuse.
- ❖ Mélanger sous agitation à chaud pendant quelques minutes.

## Annexe III:



**Figure** - Le logiciel d'identification et d'enseignement « Les moustiques d'Europe ».

## Annexes

---

### Annexe IV:

**Tableau 1** - Résultats statistiques de l'ANOVA à un facteur des 3 tests de traitement d'*A. flavus* sur les larves du stade L3-L4 d'*Aedes albopictus*.

	Test 1	Test 2	Test 3
P value	0.8841	0.1156	0.3811
P value Summery	ns	ns	ns
Significative ? P < 0.05	No	No	No

### Annexe V:

Résultats statistiques du test 1 de traitement d'*A. flavus* sur les larves du stade L3-L4 d'*Aedes albopictus*.

Temps Doses	24 h	Témoin (-) 24h	48 h	Témoin (-) 48h	72 h	Témoin (-) 72h
D8 = 10 <sup>8</sup>	3	2	4	2	4	3
D7 = 10 <sup>7</sup>	1	0	1	0	1	0
D6 = 10 <sup>6</sup>	1	0	1	0	1	0
D5 = 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0
D4 = 10 <sup>4</sup>	0	0	2	0	2	0

## Annexes

---

### Annexe VI:

Résultats statistiques du test 2 de traitement d'*A. flavus* sur les larves du stade L3-L4  
d'*Aedes albopictus*.

Temps Doses	24 h	Témoin (-) 24h	48 h	Témoin (-) 48h	72 h	Témoin (-) 72h
	D8 = 10 <sup>8</sup>	0	0	1	0	3
D7 = 10 <sup>7</sup>	0	0	1	0	2	0
D6 = 10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	1	0
D5 = 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0
D4 = 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0

### Annexe VII:

Résultats statistiques du test 3 de traitement d'*A. flavus* sur les larves du stade L3-L4  
d'*Aedes albopictus*.

Temps Doses	24 h	Témoin (-) 24h	48 h	Témoin (-) 48h	72 h	Témoin (-) 72h
	D8 = 10 <sup>8</sup>	1	2	2	2	4
D7 = 10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	1	0
D6 = 10 <sup>6</sup>	1	0	2	0	3	0
D5 = 10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0
D4 = 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0

## Annexes

---

### Annexe VIII:

Résultats statistiques de DL 50% des 3 tests de traitement d'*A. flavus* sur les larves du stade L3-L4 d'*Aedes albopictus*.

Tests Doses	Test 1	Test 2	Test 3
D8 = 10 <sup>8</sup>	4	3	4
D7 = 10 <sup>7</sup>	1	2	1
D6 = 10 <sup>6</sup>	1	1	3
D5 = 10 <sup>5</sup>	0	0	0
D4 = 10 <sup>4</sup>	2	0	0
Témoin (-)	3	0	2

## Résumé

Le moustique tigre est un vecteur de maladies transmissibles entre les animaux et les humains, présentant une importance médicale et vétérinaire significative. L'utilisation intensive d'insecticides chimiques contre ce moustique a conduit à l'apparition de la résistance, compliquant de plus en plus la lutte contre cet insecte. Dans la nature, divers ennemis naturels, notamment les champignons entomopathogènes, contribuent à la régulation des populations de moustiques. Cette étude a examiné l'utilisation d'un champignon entomopathogène *Aspergillus flavus* contre les deux stades larvaires L3-L4 en utilisant des concentrations croissantes des conidies ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  spores/ml). Nos résultats ont montré que la DL50 (la dose létale à 50% de mortalité des larves) indique une augmentation, suggérant un développement potentiel de tolérance ou de résistance chez les larves au fil du temps. L'analyse statistique ANOVA a révélé qu'il n'existait pas un effet significative pour ce champignon sur les larves d'*Aedes albopictus*, avec une valeur de  $P > 0.05$ .

**Mots clés :** moustique, *Aedes albopictus*, champignons entomopathogènes, *Aspergillus flavus*. Stades larvaires.

## Summary

The tiger mosquito is a vector of diseases transmissible between animals and humans, of significant medical and veterinary importance. The intensive use of chemical insecticides against this mosquito has led to the emergence of resistance, making control increasingly difficult. In nature, various natural enemies, notably entomopathogenic fungi, contribute to the regulation of mosquito populations. This study examined the use of an entomopathogenic fungus *Aspergillus flavus* against both larval stages L4 using increasing concentrations of conidia ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  spores/ml). Our results showed that the LD50 (lethal dose at 50% larval mortality) indicates an increase, suggesting a potential development of tolerance or resistance in larvae over time. ANOVA statistical analysis revealed that there was no significant effect of the fungus on *Aedes albopictus* larvae, with a  $P > 0.05$ .

**Key words:** mosquito, *Aedes albopictus*, entomopathogenic fungi, *Aspergillus flavus*. Larval stages.

## المخلص

بعوضة النمر هي ناقل للأمراض التي تنتقل بين الحيوان والإنسان، وهي ذات أهمية طبية وبيطرية كبيرة. وقد أدى الاستخدام المكثف للمبيدات الحشرية الكيميائية ضد هذا البعوض إلى ظهور مقاومة له، مما جعل السيطرة عليه أكثر صعوبة. في الطبيعة، تساعد الأعداء الطبيعية المختلفة، ولا سيما الفطريات الممرضة للحشرات، على تنظيم أعداد البعوض. اختبرت هذه الدراسة استخدام الفطريات المسببة للأمراض الحشرية *Aspergillus flavus* ضد طوري اليرقات L3-L4 باستخدام تركيزات متزايدة من الكونديا ( $10^4$ ،  $10^5$ ،  $10^6$ ،  $10^7$ ،  $10^8$  جراثيم/مل). أظهرت نتائجنا أن الجرعة المميتة 50 (الجرعة المميتة عند موت 50% من اليرقات) أظهرت زيادة، مما يشير إلى تطور محتمل للتحمل أو المقاومة لدى اليرقات بمرور الوقت. كشف التحليل الإحصائي ANOVA أنه لم يكن هناك تأثير كبير لهذا الفطر على يرقات الزاعجة المنقطة البيضاء، بقيمة

.P > 0.05

**الكلمات المفتاحية:** بعوضة، الزاعجة المنقطة، الفطريات الممرضة للحشرات، فطر الرشاشيات الفلافوس. مراحل اليرقات.