

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

UNIVERSITY OF YAOUNDE I



FACULTE DES SCIENCES

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES
DEPARTEMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE
LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY

**Caractérisation et évaluation au laboratoire de
l'effet de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur les
stades aquatiques de *Anopheles gambiae* Giles,
1902 (Diptera : Culicidae) vecteur du paludisme**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie
des Organismes Animaux

Option : Parasitologie et Ecologie
Par



THENO DJAPOUM Bertille Carine

Matricule : 12Q1159

Licenciée ès-sciences

Sous la direction de

FOKO DADJI Gisèle Aurelie

Maître de conférences

Année 2020

DEDICACE

A

Mes très chers parents

THENO Joseph & NONO Florence

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à la collaboration de nombreuses personnes qui par leurs enseignements, leurs soutiens et leurs conseils m'ont été d'une aide précieuse. Je rends grâce au Seigneur Dieu qui m'a donné la force, la santé et le courage de suivre le chemin de la science. Je tiens à remercier :

- Pr. FOKO DADJI Gisèle Aurélie pour la confiance qu'elle a placée en moi en m'accueillant au sein de son équipe de recherche. Son encadrement et sa rigueur scientifique ont été d'un immense apport dans l'aboutissement de ce travail ;

- Pr. TAMESSE Joseph Lebel pour le matériel de laboratoire et la bibliographie mis à ma disposition;

- Pr. LENTA Bruno pour son soutien et ses encouragements ;

- Pr. KEKEUNOU Sévilor, pour son assistance multiforme ;

- Pr. NYEGUE Maximilienne qui nous a ouvert les portes du Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I pour l'extraction de l'huile essentielle de notre plante ;

- Tous les enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I en particulier ceux du département de Biologie et Physiologie Animales pour leur contribution à ma formation.

- Mr. ABE Henri pour sa disponibilité et son assistance au laboratoire ;

- Mr. TADJOUTEU F. pour son aide dans l'identification de la plante ;

- Mr. TCHANGA Nestor pour sa participation lors des enquêtes sur la plante à Penja ;

- Mr. BETOTE Patrick pour son aide lors de l'extraction de l'huile essentielle et de sa caractérisation.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de mes camarades de laboratoire ATANGANA Yve, FOKEM Patrick, YONGO Chistelle pour leur collaboration ; tous mes camarades de la promotion RESILIENCE pour leur assistance et la sollicitude portée à mon égard, je pense à ONANA Nelly, NGAFFO Kelly, NANA Stella, MBALLA Paul ;

- Mes grandes sœurs THENO Loveline, THENO Christelle, TCHOUGNIA Sidonie pour leurs précieux conseils ;

- Mon fiancé TOUANGUE TCHOUATCHA Emmanuel pour son assistance et ses encouragements ;

- Mes amis NDAMBETH MBAKEMI Jessica Ulrich, NENKAM SIMO Patrick et tous ceux qui ne sont pas mentionnés qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

TABLE DE MATIERE

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DE MATIERE	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	vii
RESUME	viii
ABSTRACT.....	x
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I-1-Généralités sur le paludisme	3
I-1-1- Agent pathogène.....	3
I-1-2- Agents vecteurs	8
I-1-3-Facteurs du milieu influençant le développement des Anophèles	15
I-1-4- Méthodes de lutte anti-vectorielle	16
I-2- Généralités sur les huiles essentielles.....	18
I-2-1- Définition et historique	18
I-2-2-Propriétés physico-chimiques et Domaine d'utilisation des huiles essentielles.....	19
I-2-3- Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles	19
I-3-Généralité sur <i>Piper nigrum</i>	19
I-3-1- Définition et origine	19
I-3-2-Description de la plante	20
I-3-3- Position systématique de <i>Piper nigrum</i>	21
I-3-4- Activité pharmacologique et autres usages de <i>Piper nigrum</i>	21
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	22
II-1-Matériel.....	22
II-1-1-Site d'étude	22
II-1-2- Matériel Biologique.....	22
II-1-3-Matériel technique.....	23
II-2- Méthodes.....	24

II-2-1- Extraction de l'huile essentielle des graines de <i>Piper nigrum</i>	24
II-2-2- Élevage des stades de développement d' <i>Anopheles gambiae</i>	25
II-2-3- Évaluation de l'effet insecticide de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i> sur les différents stades pré-imaginaux d' <i>Anopheles gambiae</i>	27
II-2-4- Interprétation des taux de mortalité selon l'OMS	28
II-2-5- Analyses statistiques des résultats.....	28
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	30
III-1- Résultats	30
III-1-1- Rendement d'extraction	30
III-1-2- Caractérisation de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i>	30
III-1-3- Effet insecticide de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i> sur les stades pré-imaginaux d' <i>Anopheles gambiae</i>	32
III-2- Discussion.....	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	39
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	40

LISTE DES ABREVIATIONS

ACT : Artemisin based Combined Therapy (Combinaison thérapeutiques à base des dérivés de l'artémisinine) ;

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse ;

CPG/SM : Couplage Chromatographie en Phase Gazeuse / Spectrométrie de Masse ;

DDT : Dichloro- Diphényl- Trichloroéthane ;

HE : Huile Essentielle ;

MILDA : Moustiquaire Imprégnée d'insecticide à Longue Durée D'action ;

MINSANTE : Ministère de la Santé ;

OCEAC : Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale ;

OMS : Organisation Mondiale de la Santé ;

ORSTOM : Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer ;

PID : Pulvérisation Intradomiciliaire à effet rémanent ;

PNLP : Programme Nationale de Lutte contre le Paludisme ;

SRF : Section de Recherche Forestière ;

TDR : Test de Diagnostic Rapide ;

TPI : Traitement préventif intermittent ;

WHO : World Health Organization

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de développement des plasmodiums chez l'homme et chez l'Anophèle	5
Figure 2 : Distribution géographique des espèces d'Anophèles recensées au Cameroun entre 2000 et 2018.....	9
Figure 3 : Distribution des membres du complexe gambiae et <i>Anopheles funestus</i> au Cameroun	11
Figure 4 : Cycle de développement des Anophèles	12
Figure 5 : Œufs d'Anophèle	13
Figure 6 : Larve d' <i>Anopheles gambiae</i>	13
Figure 7 : Nymphe d' <i>Anopheles gambiae</i>	14
Figure 8 : Adulte d' <i>Anopheles gambiae</i> Giles prenant son repas sanguin	15
Figure 9 : Matériel végétal, <i>Piper nigrum</i>	20
Figure 10 : Graines de <i>Piper nigrum</i> (Poivre) de Penja.	22
Figure 11 : Localisation du site de collecte des graines de <i>Piper nigrum</i> dans le Département du Moungo.....	23
Figure 12 : Quelques accessoires du matériel technique	24
Figure 13 : Extraction de l'huile essentielle des graines de <i>Piper nigrum</i>	25
Figure 14 : Étapes de l'élevage d' <i>Anopheles gambiae</i> au laboratoire	26
Figure 15 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i>	30

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Données sur l'extraction de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i> (poivre).....	30
Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	31
Tableau III : Taux d'éclosion des œufs matures d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P.nigrum</i>	32
Tableau IV : Taux de mortalité des larves de stade 1 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	33
Tableau V : Taux de mortalité des larves de stade 2 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	34
Tableau VI : Taux de mortalité des larves de stade 3 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	34
Tableau VII : Taux de mortalité des larves de stade 4 d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	34
Tableau VIII : CL ₁₀ , CL ₅₀ et CL ₉₀ de l'huile essentielle de <i>Piper nigrum</i> au bout de 24 et 48h d'exposition des larves de stade 1, 2, 3 et 4 d' <i>Anopheles gambiae</i>	35
Tableau IX : Taux d'émergence des nymphes d' <i>Anopheles gambiae</i> en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>P. nigrum</i>	36

RESUME

Le paludisme demeure de loin la parasitose la plus importante dans le monde intertropical, et particulièrement en Afrique au sud du Sahara (Tchoumboungang *et al.*, 2009). Le changement de comportement et l'apparition de la résistance aux insecticides de synthèse dans les populations naturelles de vecteurs a conduit les chercheurs à envisager le recours aux molécules naturelles c'est-à-dire celles à base de plantes. Dans ce travail, les activités ovicides, larvicides et "nymphocides" de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* ont été évaluées sur *Anopheles gambiae* ss. Des moustiques adultes ont été fournis par l'OCEAC et élevés dans l'insectarium du Laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé. L'huile essentielle de *Piper nigrum* a été extraite par hydrodistillation et une analyse chimique a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (CPG/SM). Des œufs, des larves de stades 1, 2, 3, 4 et des nymphes ont été exposés à l'huile essentielle et testés en laboratoire suivant le protocole de l'OMS 2005. L'huile essentielle a été testée à 0,025 % ; 0,05 % ; 0,1 % ; 0,3 % ; 0,5 % ; 0,6 % ; 0,7 % ; 0,9 % ; 1 % ; 1,5 % ; 2 % ; 2,5 % et 3 %. Le rendement d'extraction de l'HE de *Piper nigrum* était de 0,26 %. Cette huile essentielle a révélé la présence de 30 composés terpéniques ; les monoterpènes étaient le principal groupe de composés trouvés avec le limonène (9,74 %), le (+)-camphène (8,44 %) et le β -pinène (8,00 %) comme ingrédients principaux. Des tests biologiques, un taux d'éclosion des œufs très faible (5 %) après 72h d'exposition à une concentration de 3 % a été obtenu ; après 48h d'exposition, 100% de mortalités chez les larves de stades 1 et 2 pour une concentration de 0,5 % a été observée ; quant aux larves de stades 3 et 4 pour avoir une mortalité totale, il a fallu des concentrations de 0,7 % et 0,9 % respectivement. Le stade nymphal a donné un taux d'émergence très bas (3 %) pour une concentration d'huile à 3 % après 72h d'exposition. De ces résultats, il apparaît que l'huile essentielle de *Piper nigrum* est dotée de propriétés ovicides, larvicides et "nymphocides" sur les stades aquatiques d'*Anopheles gambiae*.

Mots clés : Paludisme, huile essentielle, insecticide, *Piper nigrum*, *Anopheles gambiae*.

ABSTRACT

Malaria remains by far the most important parasitosis in the intertropical world, particularly in Africa South of the Sahara (Tchoumboungang *et al.*, 2009). Behavioral change and the emergence of resistance to synthetic insecticides in natural vector populations has led researchers to consider the use of natural molecules, that is, those of plant-based. In this work ovicidal, larvicidal and "nymphocidal" activities of the essential oil of *Piper nigrum* seeds were evaluated on *Anopheles gambiae* ss. Adults mosquitoes were supplied from OCEAC and were reared in the insectarium of the Laboratory of zoology of the Trachers Training College of Yaoundé. *Piper nigrum* essential oil was extracted by hydrodistillation and a chemical analysis was carried out by gas chromatography (GC) and by gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS) coupling. Eggs, larvae and nymphs were exposed to essential oil and tested in laboratory according to the protocol of the WHO 2005. The essential oil was tested at 0.025% ; 0.05% ; 0.1% ; 0.3% ; 0.5% ; 0.6% ; 0.7% ; 0.9% ; 1% ; 1.5% ; 2% ; 2.5% et 3%. The extraction yield of the *Piper nigrum* HE was 0.26%. This essential oil has revealed the presence of 30 terpenes compounds; Monoterpenes were the main group of compounds found with limonene (9.74%), (+) - camphene (8.44%) and β -pinene (8.00%) as the main ingredients. Biological tests showed a very low egg hatching rate (5%) after 72 hours of exposure at a concentration of 3% of essential oil was obtained; after 48 hours of exposure, 100% mortalities in 1 and instar 2 larvae at a concentrations of 0.5% were observed; 3 and 4 instar larvae to have a total mortality required concentration of 0.7% and 0.9% respectively. With nymphs, we have a very low emergence rate (3%) for a 3% oil concentration after 72 hours of exposure. From these results, it appears that the essential oil of *Piper nigrum* has ovicidal, larvicidal and "nymphocidal" properties on the aquatic stages of *Anopheles gambiae*.

Key words: Malaria, essential oil, insecticide, *Piper nigrum*, *Anopheles gambiae*.

INTRODUCTION

Le paludisme est une maladie causée par des parasites du genre *Plasmodium* dont la transmission est essentiellement assurée par les anophèles du complexe *Anopheles gambiae* et *Anopheles funestus* (Hunt *et al.*, 1998). Obstacle pour le développement puisqu'il affecte l'économie en réduisant son dynamisme et en entravant la scolarité des enfants (OMS, 2018), le paludisme représente un véritable défi pour la recherche. Des données statistiques récentes révèlent que cette parasitose provoque 88% de cas palustres, dont 90 % des cas de décès en Afrique Sub-Saharienne avec plus de 70 % principalement chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (OMS, 2016). On a dénombré en 2017, 219 millions de cas de paludisme contre 217 millions de cas enregistrés en 2016 ; le nombre de décès dûs au paludisme a été estimé à 435 000 en 2017 contre 451 000 en 2016 (OMS, 2018).

Au Cameroun, le paludisme demeure l'endémie majeure et la première cause de morbidité et de mortalité dans les groupes les plus vulnérables, c'est à dire les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Les statistiques sanitaires révèlent qu'il est responsable de 24% du total des décès dans les formations sanitaires, de 40% à 45% des consultations médicales et de 30% des hospitalisations (PNLP, 2012). Par ailleurs, 52% des consultations chez les enfants de moins de 5 ans sont dues au paludisme simple et grave (PNLP, 2012). Dans l'optique de réduire l'expansion du paludisme, le gouvernement Camerounais appuyé par de nombreuses organisations internationales a pris des mesures parmi lesquelles, la prise en charge gratuite des enfants de moins de 5 ans atteints du paludisme par toutes les formations sanitaires et la distribution gratuite de plusieurs millions de moustiquaires imprégnées à longue durée d'action (MILDA).

Malgré tous ces efforts fournis par la communauté scientifique pour réduire le taux de prévalence du paludisme, plusieurs facteurs rendent difficile son éradication. Il s'agit : de la recrudescence et de la résistance du plasmodium aux antipaludéens traditionnels utilisés (Ombito *et al.*, 2014) ; de la résistance des moustiques aux insecticides de synthèse (Marimuthu, 2010) ; des conditions d'hygiène de nos grandes villes favorisant le contact Homme/moustique, du coût élevé des nouveaux antipaludéens et insecticides (Tchoumboungang *et al.*, 2009) ; du changement de comportement des moustiques qui, piquent et se reposent plus à l'extérieur des habitations qu'à l'intérieur contournant ainsi les MILDA et les PID (Wondji *et al.*, 2018). Ces facteurs ont donc conduit à l'utilisation de synergistes qui

augmenteraient l'efficacité des insecticides en inhibant l'activité de l'enzyme détoxifiante. Les vertus thérapeutiques des plantes médicinales et aromatiques en tant que anti- inflammatoires, antiseptiques, antifongiques, bactéricides, antitoxiques, insecticides et insectifuges ont été rapportées (Brahim *et al.*, 2006). C'est ainsi que la recherche s'est tournée vers les bio-insecticides dotés des propriétés insecticides et répulsives, respectueux de l'environnement et généralement à base d'extraits de plantes et d'huiles essentielles. Plusieurs plantes ont donc été étudiées par plusieurs auteurs à l'exemple de Tchoumboungang *et al.*, 2009 ; Toto *et al.*, 2011; Akono *et al.*, 2012 ; Sayah *et al.*, 2014 ; Foko Dadjì *et al.* (2011, 2016, 2017, 2018) ; Kemabonta *et al.*, 2018 ; Abe *et al.*, 2019. Au Cameroun, Foko Dadjì *et al.* (2011) ont démontré l'effet adulticide de l'HE de *Piper nigrum* sur *Anopheles gambiae*, cependant aucun travail relatif à l'utilisation de l'huile essentielle de *Piper nigrum* vis-à-vis des stades aquatiques d'*Anopheles gambiae* n'a été mené. La présente étude a été menée avec pour objectif général d'évaluer l'effet insecticide de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur les stades aquatiques d'*Anopheles gambiae*. Plus spécifiquement, il s'agit de :

- extraire l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* ;
- caractériser l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* ;
- évaluer la sensibilité des œufs, larves et nymphes d'*Anopheles gambiae* aux différentes concentrations de l'huile essentielle.

Ce travail se décline, en plus des parties introduction, conclusion et perspectives en trois principaux chapitres. Le premier chapitre intitulé revue de la littérature fait le point sur les informations utiles pour situer la problématique du sujet. Le deuxième chapitre présente le matériel d'étude ainsi que la méthodologie utilisée pour atteindre les objectifs, enfin le troisième chapitre présente les résultats obtenus et la discussion.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I-1-Généralités sur le paludisme

Le paludisme est une maladie parasitaire due à un protozoaire unicellulaire du genre *Plasmodium*. Depuis les travaux de Ross (1897) en Inde, on sait que le parasite du paludisme (découvert par Laveran en 1880) n'est pas véhiculé par le mauvais air mais transmis d'homme à homme par l'intermédiaire d'un vecteur biologique du genre *Anopheles* (étymologiquement, «a» privatif et «Opheles» utile, autrement dit insecte dénué d'utilité) (Carnevale et *al.*, 2009). C'est une maladie qui sévit de façon endémique dans les régions tropicales et subtropicales de l'Afrique, de l'Asie du Sud et du Sud-Est et de l'Amérique. Il affecte les humains et certains animaux tels que les Chimpanzés, les Gorilles qui auraient des souches à partir desquelles s'est différenciée celle de l'Homme (Weimin et *al.*, 2010).

On estime que 3,2 milliards d'êtres humains vivant dans 107 pays et territoires sont confrontés à ce risque (OMS, 2005). Avec 207 millions de personnes malades et 627 000 décès en 2012, le paludisme demeure la parasitose la plus importante et concerne majoritairement les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes. Parmi les Anophèles, *Anopheles gambiae* est l'un des vecteurs majeurs responsable de la transmission de la maladie en Afrique tropicale (Foko Dadjì et *al.*, 2007). La région OMS de l'Afrique supporte une part disproportionnée de la charge mondiale du paludisme. Des données statistiques récentes révèlent que cette parasitose provoque 88% de cas palustre, dont 90 % des décès en Afrique Sub-Saharienne avec plus de 70% principalement chez les enfants de moins de cinq ans et les femmes enceintes (OMS, 2016). Le paludisme reste malheureusement de nos jours l'un des grands fléaux de l'humanité.

I-1-1- Agent pathogène

Le paludisme est causé par un protozoaire parasite unicellulaire hématozoaire appartenant à l'embranchement des Apicomplexa, ordre des Hemococcidae, famille des Plasmodidae, genre *Plasmodium* (Bouteille et *al.*, 2007). Il existe plusieurs espèces du genre *Plasmodium* qui sont pathogènes à l'Homme :

- *Plasmodium falciparum* Welch, 1897. C'est la plus répandue dans toute la ceinture tropicale du globe responsable d'environ 90% des cas de morbidité palustre et de la majorité des infections palustres graves et mortelles (Mouchet et *al.*, 2004) ;

- *Plasmodium ovale* Stephens, 1922. C'est l'agent de la fièvre bénigne en Afrique Centrale. Son incubation est de 15 jours au maximum, mais peut aller jusqu'à 4 ans (Guiguen et *al.* 1990) ;

- *Plasmodium malariae* Laveran, 1881 peut se développer sous les tropiques comme en zone tempérée, il est responsable de la fièvre quarte (Guigen, *et al.*, 1990) ;
- *Plasmodium vivax* Grassi & Feletti, 1890 est l'agent responsable de la fièvre tierce bénigne en Afrique du Nord, en Asie du Sud-Est et en Amérique du Sud. Sa période d'incubation est d'environ 15 jours mais peut s'étendre jusqu'à 9 mois ou plus, avec des rechutes à brève ou à longue échéance, observables pendant 3 à 4 ans (Guiguen *et al.*, 1990) ;
- *Plasmodium knowlesi* Karadjian, 2011 est une espèce découverte récemment chez l'homme ; essentiellement trouvée en Malaisie (Asie du Sud-est), elle est morphologiquement très proche du *Plasmodium ovale*. C'est un *Plasmodium* affectant originellement les singes avec un cycle de développement court (Cox-Singh, 2008) ;
- *Plasmodium cynomolgi* a été découvert pour la première fois chez l'Homme à Hulu Terengganu en Malaisie (Thuy *et al.*, 2014).

I-1-1-1- Cycle biologique du parasite

Ce cycle se déroule en deux parties ; une chez l'Homme (hôte intermédiaire) où se déroulent la reproduction asexuée et l'autre chez l'Anophèle (hôte définitif) où se déroule la reproduction sexuée (Fouet, 2010).

➤ Cycle du *plasmodium* chez l'Homme

Le cycle du *plasmodium* chez l'Homme commence par la piqure de l'Anophèle femelle infectée. Cette dernière inocule à l'homme le germe infectieux appelé sporozoïtes (Vogel & Angermann, 1994). Ce cycle se déroule en deux phases asexuées :

- La phase hépatique ou schizogonie exo-érythrocytaire

Unique, elle correspond à la phase d'incubation cliniquement asymptomatique (Bouteille *et al.*, 2007). Les sporozoaires inoculés par l'Anophèle femelle lors de son repas sanguin restent pendant une trentaine de minutes dans la peau (figure 1), la lymphe et le sang avant de se réfugier dans les hépatocytes via les vaisseaux sanguins, où ils se transforment en schizontes pré-érythrocytaires ou corps bleus (formes multi-nucléées) (Fouet, 2010). Ces derniers se multiplient, deviennent matures, éclatent et libèrent les mérozoïtes qui passent dans les globules rouges (Bouteille *et al.*, 2007., Fouet, 2010).

- La phase sanguine ou schizogonie endo-érythrocytaire

Chaque mérozoïte pénètre dans le sang, envahit un globule rouge et devient un trophozoïte qui se nourrit du contenu de l'hématie en particulier de l'hémoglobine. Les résidus de ce métabolisme vont former un pigment noir dans le cytoplasme du parasite appelé hémozoïne qui est une substance pyrétogène. Le trophozoïte grandit et devient un schizonte (figure 1) Ce dernier subit donc une multiplication asexuée produisant 08 à 20 mérozoïtes (Vogel &

Angermann, 1994). Cette multiplication entraîne des éclatements brutaux et synchrones des globules rouges par hémolyse : c'est ce qui provoque les accès de fièvre paludéenne. Lorsque le schizonte est mûr, son noyau se divise plusieurs fois et chaque noyau s'entoure de cytoplasme et forme ainsi le corps en rosace contenant un amas d'hémozoïne en son centre. Au bout de plusieurs cycles successifs, les trophozoïtes arrêtent de se diviser, modifient leur rapport nucléoplasmatique et se transforment en éléments sexués qui sont les microgamétocytes (mâles) et les macrogamétocytes (femelles) (précurseurs des cellules sexuelles pourvues d'un noyau volumineux et un cytoplasme densifié) qui vont demeurer en attente dans le sang (Vogel & Angermann 1994, Leke *et al.* 2010).

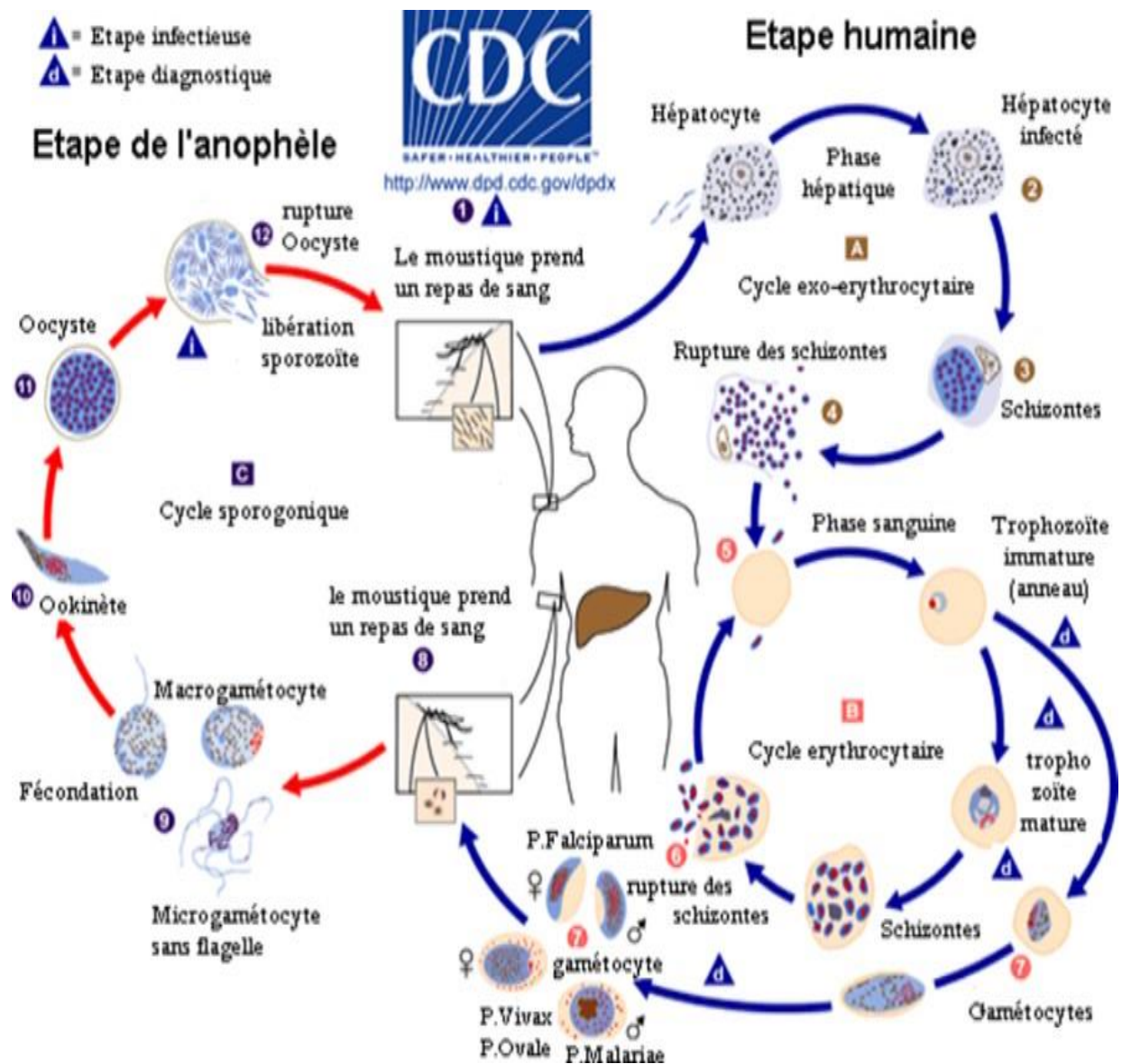


Figure 1: Cycle de développement des plasmodiums chez l'homme et chez l'Anophèle (Fouet, 2010).

➤ Cycle du *plasmodium* chez l'Anoplèle femelle (cycle sporogonique)

Chez l'anophèle femelle seule hémaphage, se déroule un cycle sexué ou sporogonie. Les gamétocytes, ingérés par le moustique lors d'un repas sanguin sur un sujet infecté se transforment en gamètes mâles et femelles (figure 1). Le gamète mâle va émettre 06 à 08 gamètes flagellés qui vont aller féconder des gamètes femelles pour donner naissance à un œuf libre, mobile, appelé ookinète (Bouteille *et al.*, 2007, Chabasse *et al.*, 2007). Cet ookinète quitte la lumière du tube digestif, se fixe ensuite à la paroi externe de l'estomac et se transforme en oocyste (OMS, 2003 ; Fouet, 2010). Ce dernier après éclatement donnera des centaines ou des milliers de sporozoïtes qui vont migrer vers les glandes salivaires du moustique d'où ils pourront contaminer un nouvel individu dès la prochaine piqûre, (Vogel & Angermann, 1994, Leke *et al.*, 2010).

I-1-1-2-Maladie palustre

➤ Etude clinique du paludisme

Après éclatement des rosaces, le paludisme se présente sous plusieurs formes : accès palustre simple, accès palustre grave, paludisme transfusionnel et paludisme viscéral évolutif, Neuropaludisme (Brenier & Pelloux, 2005).

- Accès palustre simple

On distingue l'incubation, les accès de primo-invasion et les accès de la phase d'état à fièvre périodique l'incubation correspond à la durée de la phase hépatocytaire (7 à 12 jours pour *P. falciparum*) et est totalement asymptomatique ; la primo-invasion est l'invasion des globules rouges par les plasmodies, elle se manifeste chez les personnes infectées pour la première fois comme les jeunes enfants et les voyageurs ayant jusqu'alors vécu en zone indemne de paludisme. Elle est caractérisée par un embarras gastrique fébrile associé à des céphalées et des myalgies ; la phase d'état : Cette forme clinique correspond à la description de la triade classique de l'accès palustre : « frissons, chaleur, sueurs » survenant tous les 2 ou 3 jours. Les signes d'anémie ou la présence d'une urine de couleur sombre peuvent être suggestifs. (Brenier & Pelloux, 2005) ;

- Le paludisme grave

C'est la présence d'une parasitémie avec des formes asexuées de *Plasmodium falciparum* et au moins un critère clinique ou biologique de gravité (OMS, 2000) ;

- Le Neuropaludisme

Il est observé chez les enfants et les femmes enceintes majoritairement. Il est causé exclusivement par *Plasmodium falciparum* et est dû à l'anoxie des vaisseaux sanguins présents dans le cerveau ;

- Le paludisme transfusionnel

Il est transmis par l'intermédiaire d'une transfusion sanguine ou échanges d'aiguilles

lors d'une piqûre ou entre les individus drogués. La période d'incubation est donc courte car il n'existe pas de cycle pré-érythrocytaire (Brenier & Pelloux, 2005) ;

- Le paludisme viscéral évolutif

Il survient chez les sujets insuffisamment prémunis et exposés à des infestations répétées. C'est une forme subaiguë et chronique associée à une anémie, une myalgie, une fièvre modérée et un retard staturo-pondéral chez l'enfant (Brenier & Pelloux, 2005) ;

I-1-1-4-Faciès éco-épidémiologique du paludisme au Cameroun

La dynamique de la transmission varie suivant les zones climatiques majeures correspondant à trois principaux faciès écologique du paludisme (wondji *et al.*, 2018):

- La zone climatique du Sud qui correspond à la région forestière. La transmission du paludisme y est pérenne et dure 7 à 12 mois. La pluviométrie y est abondante (jusqu'à 5 000 mm). On y distingue quatre saisons : deux saisons de pluies et deux saisons sèches. Le réseau hydrographique est dense et les principaux fleuves sont : le Wouri, la Sanaga, le Nyong, le Ntem, la Ngoko et le Kadeï ;

- La zone de climat tropical soudanien dans l'Adamaoua et au Nord qui correspond à la zone de savane boisée de l'Adamaoua et de la Bénoué, caractérisée par une saison de pluie et une saison sèche d'égale durée. La transmission est saisonnière et dure 6 à 8 mois et est intense pendant la période pluvieuse ;

- La zone de climat tropical sahélien à l'Extrême-nord. La transmission y est saisonnière et dure 1 à 3 mois, elle est perceptible pendant la saison de pluie qui est réduite à 3 mois.

I-1-1-5-Méthodes de lutte contre le parasite

Les méthodes de traitement antipaludique sont principalement axées sur la chimiothérapie à base des dérivés d'artémisine (ACT ou Artemisin based Combined Therapy) et de tests diagnostiques à l'instar du TDR (Test de Diagnostic Rapide) (OMS, 2015). L'artémisine est un médicament issu de la pharmacopée chinoise dont l'utilisation se fait en association en raison de l'existence d'une pression de sélection tendant à l'apparition de chimiorésistance (OMS, 2015). Au Cameroun, c'est l'association artesunate-amodiaquine comprimés et artemether-lumefantrine comprimés qui est le traitement recommandé compte tenu de l'efficacité dans le traitement antipaludique (Minsante, 2011). Pour ce qui est des femmes enceintes, le traitement préventif intermittent (TPI) avec Sulfadoxine-Pyriméthamine (SP) permet la protection de la mère et de son bébé (Minsante, 2011). Malgré l'absence de vaccin antipaludique confirmé, un vaccin dit « expérimental » contre *Plasmodium falciparum*, connu sous le nom de RTS, S/AS01, a été évalué dans le cadre d'un vaste essai clinique dans 7 pays d'Afrique et l'agence européenne des médicaments a donné un avis favorable en juillet 2015 (OMS, 2015).

I-1-2- Agent vecteur

I-1-2-1- Généralités sur les moustiques

Apparus il y a plus de 170 millions d'années, les moustiques ou Culicidae, appartiennent à la classe des insectes de l'embranchement des Arthropodes. Caractérisés par une paire d'ailes, ces Diptères comptent plus de 3500 espèces réparties majoritairement au sein des trois genres principaux que sont : *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* (Resh & Cardé, 2003). Parmi les 3500 espèces de moustiques décrites dans le monde, environ 500 sont des anophèles, soixante sont considérées comme vecteur de *Plasmodium* et donc de la maladie palustre à l'homme (Fontenille, 2008) et *Anopheles gambiae* l'un des vecteurs majeurs responsable de la transmission de la maladie en Afrique tropicale (Foko Dadji *et al.*, 2007).

I-1-2-2-Position systématique de *Anopheles gambiae* Giles, 1902 (Diptera : Culicidae)

D'après Harbach (2004), les Anophèles se positionnent d'un point de vue systématique comme suit :

Règne : Animal

Embranchement des Arthropoda Siebold & Stannius, 1845 :

Corps recouvert d'une cuticule chitineuse.

Sous-embranchement des Antennata

Tête portant une paire d'antennes et une paire de mandibules.

Super classe des Hexapoda

Corps divisé en 3 tagmes : tête-thorax-abdomen.

Classe des Ectognatha :

Pièces buccales visibles à l'extérieur.

Sous-classe des Ptérygota:

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

Section des Oligonéoptères :

Champ jugal avec une seule nervure longitudinale simple.

Ordre des Diptères Linné, 1758 :

Présence d'une paire d'ailes, les ailes postérieures étant transformées en balanciers.

Sous-ordre des Nématocères Latreille, 1825 :

Pronotum séparé du mésonotum par une suture transverse.

Famille des Culicidae Latreille, 1825 :

Corps recouvert d'écailles filiformes.

Sous-famille des Anophelinae Theobald, 1905 :

Trompe dressée en avant, beaucoup plus longue que le reste de la tête.

Tribu des Anophelini Belkin, 1962.

Genre *Anopheles* Meigen, 1918 :

Taches formées par les écailles claires et sombres sur la costa.

Espèce *Anopheles gambiae* Giles, 1902 :

Costa avec 5 taches pâles dont 2 basales.

I-1-2-3- Différentes espèces d'anophèles

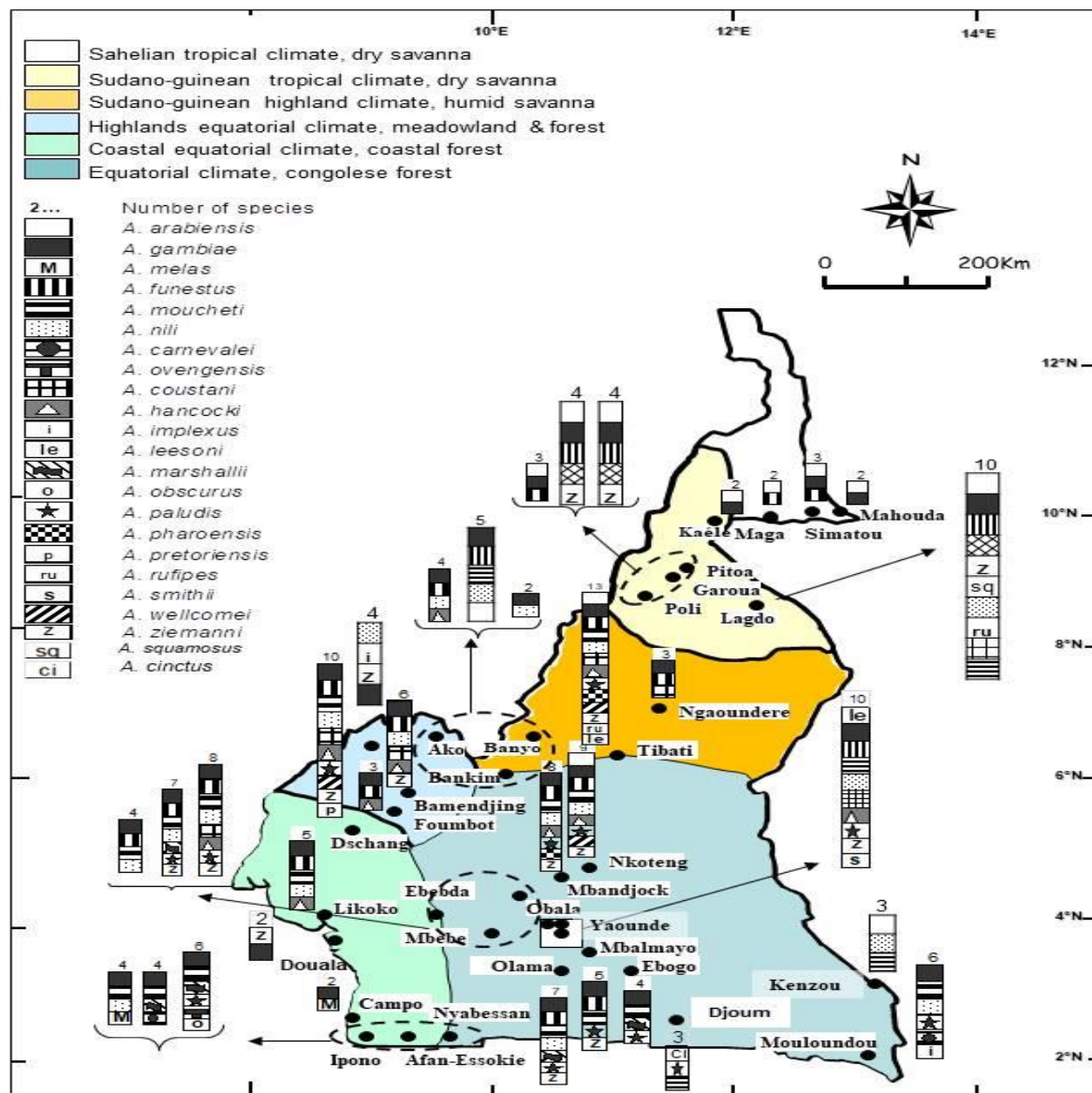


Figure 2: Distribution géographique des espèces d'anophèles recensées au Cameroun entre 2000 et 2018 (Wondji *et al.*, 2018)

➤ En Afrique

Dans la famille des Culicidae, il existe actuellement 35 genres dont le genre *Anophèles* qui comprend environ 528 espèces classées en 6 sous-genres. Parmi ces espèces, seule une cinquantaine peut transmettre le paludisme (Harbach, 2004). Les principaux vecteurs du

paludisme en Afrique sont : *Anopheles gambiae* Giles, 1902 ; *Anopheles arabiensis* Patton, 1904 ; *Anopheles funestus* Giles, 1900 ; *Anopheles nili* Théobald, 1904 ; *Anopheles moucheti* Evans, 1925 et *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013. Néanmoins, *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* y sont plus largement distribués par rapport aux autres espèces. D'ailleurs, *Anopheles gambiae* est rencontré dans la plus grande partie de l'Afrique subsaharienne et est doté d'une capacité de transmission très élevée du paludisme (Fouet, 2010).

➤ **Au Cameroun**

Le Cameroun compte 52 espèces anophéliennes dont 17 sont vectrices du paludisme (figure 2). Parmi ces dernières, 6 jouent un rôle majeur dans la transmission : *Anopheles gambiae* s.l. avec 3 espèces (*An. gambiae*, *An. coluzzii*, *An. arabiensis*), *An. funestus*, *An. nili* et *An. moucheti* ; et 11 espèces jouent un rôle secondaire : *An. ovengensis*, *An. carnevalei*, *An. coustani*, *An. hancocki*, *An. marshalli*, *An. pharoensis*, *An. paludis*, *An. wellcomei*, *An. rufipes*, *An. lesoni* et *An. Ziemanni*. Le complexe *An. gambiae* s.l. est représenté par *An. gambiae* répandu sur le territoire, *An. coluzzii* abondant dans la partie sud du pays et particulièrement en zone urbaine, *An. arabiensis* inféodé aux zones tropicales et sahéliennes, puis *An. melas* présent en zone côtière et jamais retrouvé infecté (Wondji *et al.*, 2018).

I-1-2-4-Espèces du Complexe *gambiae* et répartition géographique

En se basant sur des caractéristiques moléculaires, génomiques et bioécologiques, le complexe *gambiae* compte de nos jours huit espèces reproductivement isolées et non distinguables morphologiquement. Six espèces sont inféodées aux eaux douces : *Anopheles gambiae* ss. Giles, 1902 ; *Anopheles coluzzii* Coetzee & Wilkerson, 2013 ; *Anopheles arabiensis* Patton, 1904 ; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911 ; *Anopheles amharicus* Hunt, Wilkerson & Coetzee, 2013 et *Anopheles bwambae* White, 1985 ; tandis que *Anopheles melas* Theobald, 1903 et *Anopheles merus* Doenitz, 1902 sont inféodés aux eaux saumâtres (Coetzee *et al.*, 2013) .

• Complexe *gambiae* en Afrique

Les membres du complexe *Anopheles gambiae* sont retrouvés dans toute l'Afrique tropicale, au sud du désert du Sahara, avec *Anopheles arabiensis* s'étendant à travers le sud de l'Arabie. *Anopheles gambiae* s.s. est distribué dans toute l'Afrique subsaharienne, y compris Madagascar (Coetzee *et al.*, 2013). De plus, *Anopheles gambiae* et *Anopheles arabiensis* sont largement distribués sur tout le continent Africain. Ainsi, *Anopheles gambiae* occupe préférentiellement les zones de forêt et de savane humide alors que *Anopheles arabiensis* a une préférence pour les environnements secs jusqu'en bordure du sahara (Coetzee *et al.*, 2000).

• Complexe *gambiae* au Cameroun

Au Cameroun, on dénombre quatre membres du complexe, *Anopheles gambiae* s.s.

Anopheles coluzzii, *Anopheles arabiensis* et *Anopheles melas* (figure 3) qui sont susceptibles de transmettre le paludisme (Coetzee *et al.*, 2013, Antonio-Nkondjio *et al.*, 2006, Fontenille *et al.*, 2003). Les membres *Anopheles gambiae* et *Anopheles coluzzii* sont largement distribués dans le sud du Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). Cependant, dans la plupart des milieux urbains, les densités d'*Anopheles coluzzii* sont beaucoup plus importantes que celles de *Anopheles gambiae* qui est plus répandue dans les milieux péri-urbains et ruraux (Antonio Nkondjio *et al.*, 2017). *Anopheles coluzzii* est inféodé aux eaux polluées des milieux urbains, notamment dans les villes de Douala et de Yaoundé (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2014). Dans la partie nord du pays *Anopheles arabiensis* et *Anopheles gambiae* sont les principales espèces du complexe avec une nette dominance d'*Anopheles arabiensis* (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017). *Anopheles melas* se trouve près de la côte atlantique alors que *Anopheles funestus* a une large distribution et est présent dans tout le pays (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017).

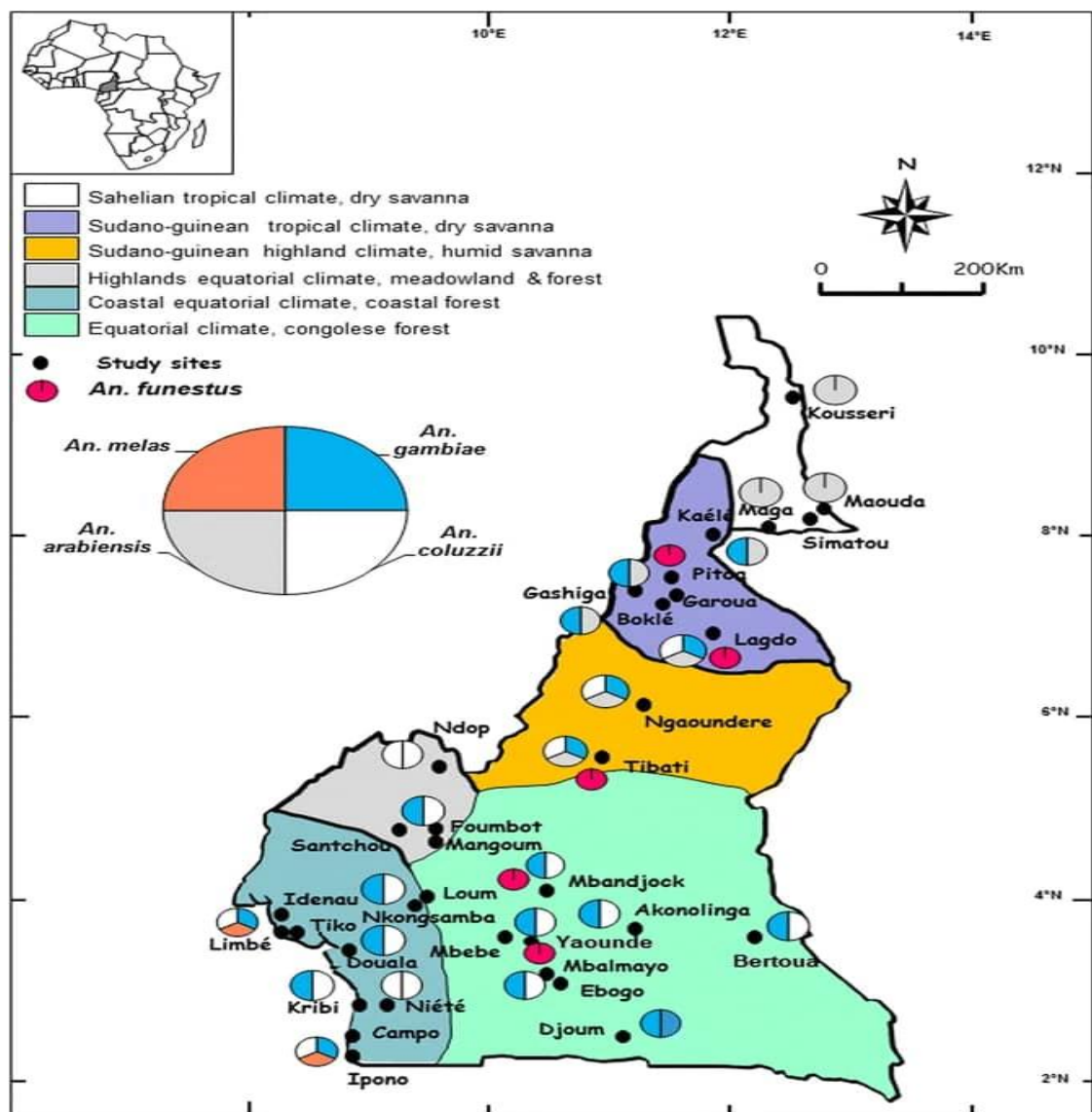


Figure 3: Distribution des membres du complexe gambiae et *Anopheles funestus* au Cameroun (Antonio-Nkondjio *et al.*, 2017)

I-1-2-5- Biologie de *Anopheles gambiae*

Les moustiques sont des insectes holométaboles. Les femelles en général présentent des pièces buccales de types piqueurs-suceurs dans l'ensemble et regroupées pour former un proboscis. Le cycle de développement de l'Anophèle comporte quatre stades : le stade œuf, les stades larvaires, le stade pupaire et le stade imaginal ou adulte (figure 4). Les trois premiers stades se déroulent en milieu aquatique et durent entre 7 jours et 5 semaines selon l'espèce et la température ambiante. Chez *Anopheles gambiae*, cette durée varie de 5 à 14 jours en fonction de la température, l'alimentation et la composition physicochimique du milieu (Foko Dadji *et al.*, 2007). Ces stades sont regroupés en deux phases :

- La phase aquatique ou pré-imaginale qui s'étend du début du stade œuf à la fin du stade nymphal ;
- La phase aérienne ou imaginale qui commence dès l'émergence des adultes et s'étend pendant toute la vie de l'adulte.

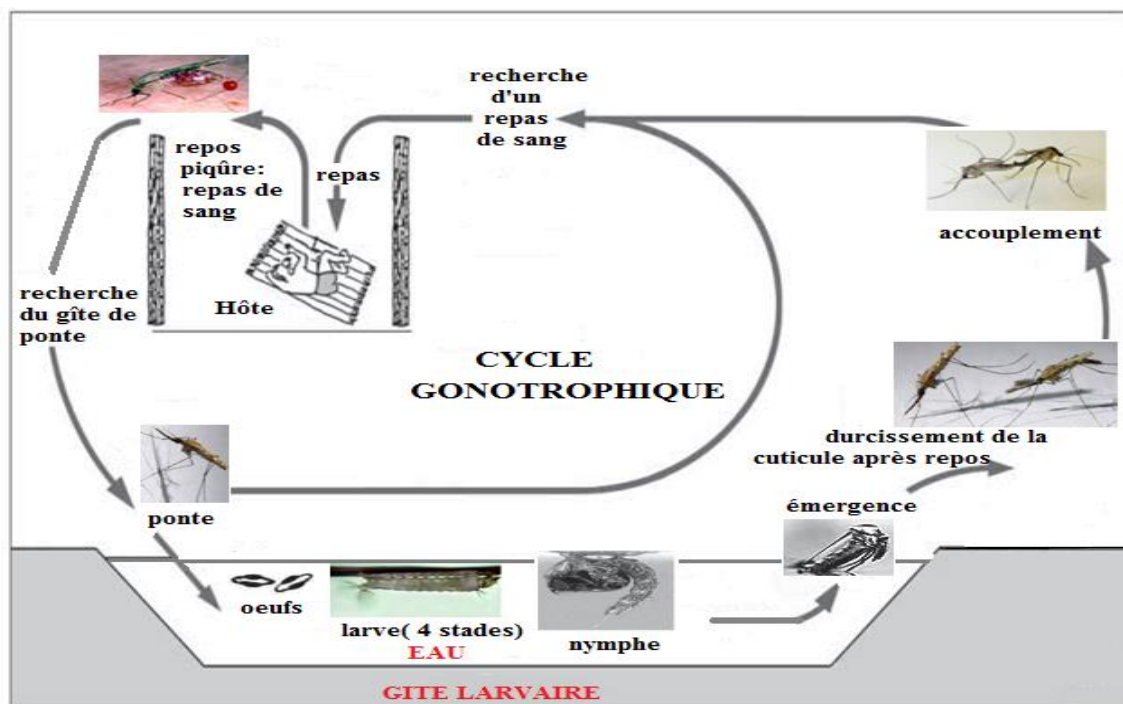


Figure 4 : Cycle de développement des Anophèles (Mouchet *et al.*, 2004)

➤ Phase aquatique ou pré-imaginale

- Stade œuf

Les femelles adultes sont des ovipares et chaque ponte comporte 30 à 300 œufs selon l'espèce. Les œufs de forme allongée et de longueur d'environ 0,6 à 0,8 mm sont pondus séparément par oviposition (fait de déposer les œufs à un certain endroit) directement sur l'eau et flottent grâce à des flotteurs latéraux (figure 5). L'éclosion a lieu 36 à 48 heures après la ponte (Mouchet & Carnevale, 1991).

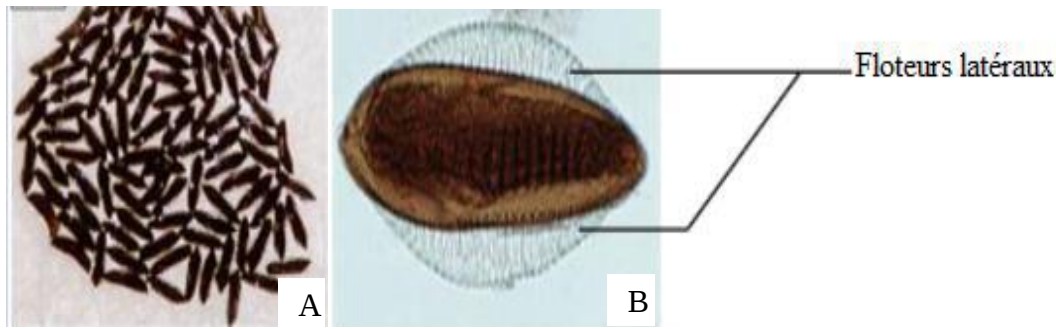


Figure 5: Œufs d'*Anophèle* (Mouchet & Carnevale ,1991)

A : grappe d'œufs

B : œuf montrant les flotteurs latéraux

- **Stade larvaire**

Les larves s'alimentent et se maintiennent au repos sous la surface de l'eau, respirant par leurs stigmates situés à l'avant dernier segment abdominal. Elles doivent pour respirer se maintenir parallèles à la surface de l'eau, ce qui est caractéristique de cette sous-famille. Cette position est assurée grâce à des poils hydrophobes ressemblant à des palmiers et situés sur le dos de l'abdomen. La larve vermiforme présente trois parties (figure 6): la tête, le thorax et l'abdomen. La vie larvaire est constituée de stades successifs entrecoupés de mues larvaires. A l'éclosion, la larve du premier stade subit une métamorphose entrecoupée de trois mues successives aboutissant à l'individu adulte (Mouchet *et al.*, 1995). Le caractère permettant de distinguer les larves d'*Anopheles* des larves d'autres moustiques est l'absence de siphon chez les *Anophèles*. La durée de vie larvaire varie de 8 à 12 jours dans les conditions favorables (Rodhain & Perez 1985) et en moyenne de 8 jours au laboratoire. La larve de stade quatre se distingue bien des autres stades par sa taille (9mm-14mm de longueur), ses brosses buccales sont denses et ses soies sont bien développées.

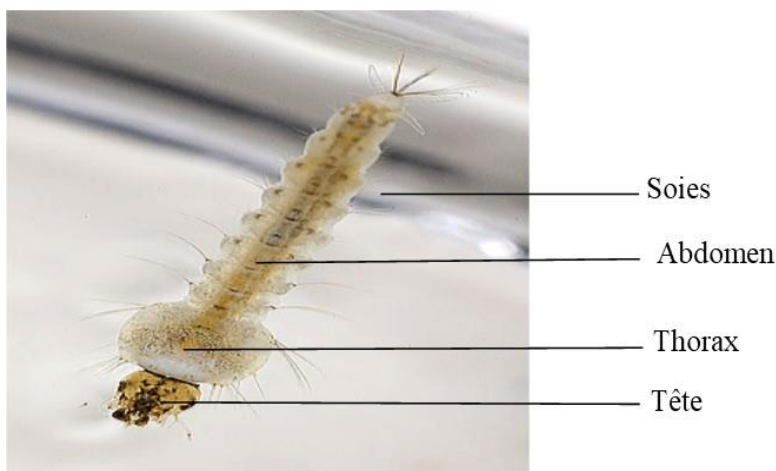


Figure 6 : Larve d'*Anopheles gambiae* Giles (Sabrina & Kaufman, 2014)

- **Stade nymphal ou pupaire**

A la fin du quatrième stade larvaire s'ensuit le stade nymphal ou pupal au cours duquel

la cuticule se fend dorsalement et libère la nymphe. Cette dernière est virguliforme et son corps se divise en deux parties (figure 7): le céphalothorax constitué des yeux composés, des trompettes respiratoires et des ébauches de pièces buccales ; l'abdomen constitué de plusieurs segments. Les nymphes ne se nourrissent pas mais passent la plus grande partie de leur vie à la surface de l'eau aspirant l'air par leur trompette respiratoire. La durée de vie nymphale est très courte (1 à 2 jours).

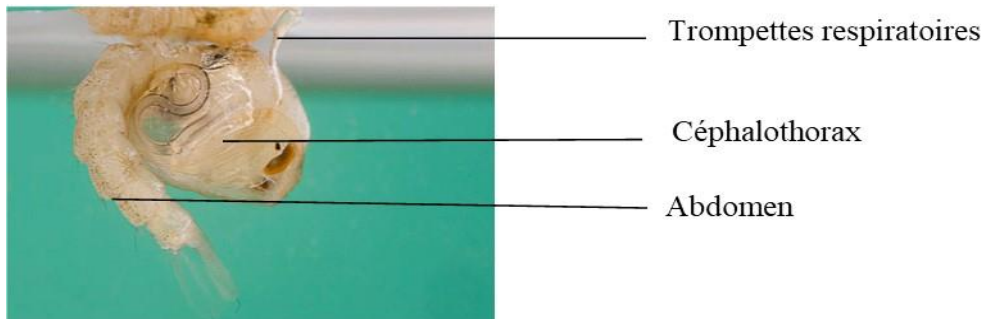


Figure 7 : Nympe d'*Anopheles gambiae* Giles (Sabrina & Kaufman, 2014)

➤ Phase imaginale ou adulte

Contrairement aux stades pré-imaginaux qui vivent en milieu aquatique, l'imago issu de la nymphe évolue en milieu aérien (Mouchet *et al.*, 2004). L'alimentation et la reproduction sont deux comportements qui caractérisent le stade adulte et l'ensemble de ces comportements s'inscrit dans le cycle biologique des *plasmodium* (Carnevale *et al.*, 2009). Après la vie nymphale, la cuticule du céphalothorax se fend dorsalement selon un plan sagittal et libère successivement les différentes parties de l'insecte adulte qui sont (figure 8) : La tête spécialisée pour acquérir l'information sensorielle et pour l'alimentation contient des yeux composés et une paire d'antennes permettant la distinction entre mâle et femelle (Carnevale *et al.*, 2009) ; le thorax spécialisé dans la locomotion contient trois paires de pattes uniramées, une paire d'ailes nervurées et une paire d'haltères (Carnevale *et al.*, 2009) ; l'abdomen qui contient le cœur et l'autre partie des stigmates est spécialisé dans la digestion et la reproduction (Chabasse *et al.*, 2007). Ce dernier reste immobile le temps que les ailes se déploient et que la cuticule durcisse : c'est la mue imaginale. Les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois au cours de leur vie (Brengues *et al.*, 1973). Les adultes se nourrissent de jus de plantes et de nectar de fleurs. Les femelles se nourrissent également du sang de mammifères pour la maturation et la ponte des œufs : on dit qu'elles sont hématoophages. Le temps qui s'écoule entre deux repas de sang successifs ou deux pontes successives est le cycle gonotrophique (Mouchet & Carnevale, 1991). Les spermatozoïdes sont stockés dans la spermathèque où ils conservent leur pouvoir fécondant jusqu'à la mort de la femelle (Bruce-chwatt & Zulueta, 1985).

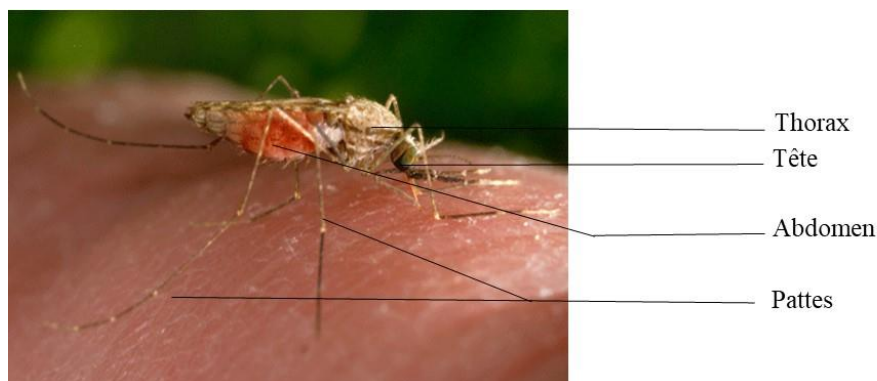


Figure 8 : Adulte d'*Anopheles gambiae* Giles prenant son repas sanguin (Sabrina & Kaufman, 2014)

I-1-3-Facteurs du milieu influençant le développement des Anophèles

Chaque espèce a des préférences écologiques : les espèces du genre *Anopheles* préfèrent une eau limpide, bien ensoleillée ; les espèces du genre *Culex* et *Aedes* préfèrent les eaux à l'ombre, plus ou moins troubles et chargées en matière organique (Carnevale *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs favorisent le développement des Anophèles :

- L'environnement

Les conditions environnementales ont un effet sur la survie et le comportement des anophèles, mais certaines espèces sont mieux adaptées que d'autres aux conditions extrêmes. Ces conditions sont :

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

. **L'estivation** : les femelles de certaines espèces d'anophèles peuvent survivre pendant les périodes de chaleur ou de sécheresse intense. C'est le cas d'*An. arabiensis* qui doit survivre à des périodes de chaleur et de sécheresse intense au Soudan, ceci explique la rapide répartition des moustiques au début de la saison de pluie suivante (Impact malaria, 2008) ;

. **La température** : c'est le facteur le plus important de la transmission du paludisme dans les pays tropicaux (OMS, 2015). La température externe affecte directement la durée du cycle trophogonique et du cycle sporogonique du parasite (Impact malaria, 2008). En d'autres termes, plus la température est basse, plus le parasite met du temps à compléter sa maturation, moins il y'a de chance pour que le moustique transmette l'infection. Il est généralement estimé que, l'efficacité de transmission est sérieusement réduite si la moyenne de température jour/nuit est moins de 20°C (ou plus de 33°C, mais pour des raisons différentes) (Impact malaria, 2008) ;

. **L'altitude** : c'est également un facteur important. Il est généralement admis que la transmission du paludisme n'a pas lieu au-dessus de 1,800m. Par ailleurs, plus l'altitude est élevée, plus la température est basse (Impact malaria, 2008) ;

. **L'humidité** : les conditions microclimatiques, particulièrement l'humidité, affectent l'entrée des moustiques dans les maisons. Il existe de nombreux exemples de l'effet que des changements de microclimat peuvent avoir sur le comportement piqueur ou le comportement de repos des femelles (OMS, 2015).

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

- **Densité des populations** : plus la population est grande, plus la densité des moustiques sera grande (Leke *et al.*, 2010).

I-1-4- Méthodes de lutte anti-vectorielle

La lutte anti-vectorielle peut s'envisager de plusieurs façons différentes : celle larvaire et celle anti-adulte (Coz & Hanon, 1967).

I-1-4-1- Lutte anti-larvaire

La lutte anti-vectorielle contre le paludisme visant faire à reculer cette maladie à travers le monde, est orientée contre les stades de développement des moustiques (OMS, 2012). Ainsi il existe les méthodes chimiques, les méthodes physiques ou écologiques, méthodes naturelles, méthodes biologiques et méthodes génétiques :

➤ **Méthodes chimiques :**

Elles consistent en l'utilisation de produits chimiques de synthèse pour lutter contre les larves et les imagos de moustiques. Le but recherché est toujours l'action efficace, rapide et persistante sur les vecteurs visés, tout en présentant le moins d'effets possibles sur l'Homme et les organismes non-cibles (Rodhain & Perez, 1985). Les principaux composés synthétiques utilisés appartiennent aux groupes des organochlorés (DDT, dieldrine), des organophosphorés (malathion, fenitrothion, temephos, chlorpyrifos), des carbamates (propoxur) et des

pyréthrinoides (perméthine, deltaméthrine, bifenthrine...). En revanche, seuls les pyréthrinoides sont autorisés en imprégnation de moustiquaires (WHO, 2007) ;

➤ Méthodes physiques ou écologiques :

Elles consistent à faire disparaître systématiquement et régulièrement toute eau stagnante, susceptible de constituer un site propice au développement pré-imaginal des moustiques c'est-à-dire les gîtes domestiques et péri-domestiques naturels et anthropiques (Carnevale *et al.*, 2012). Ces actions permettent de réduire la transmission palustre locale (Gu & Novak, 2009). Cette réduction résulte de la moindre disponibilité de sites de ponte entraînant probablement une augmentation de la durée du cycle trophogonique, accompagnée d'une baisse du taux de survie des vecteurs (Gu *et al.*, 2006 ; Killeen *et al.*, 2001). Les méthodes de cultures irriguées peuvent également être définies de manière à limiter les possibilités de développement des vecteurs, principalement par l'aménagement, l'entretien, le nettoyage des canaux, et l'assèchement périodique des parcelles (Mutero *et al.*, 2000 ; Keiser *et al.*, 2005) ;

➤ Méthodes biologiques :

Elles consistent en l'utilisation des organismes vivants et des virus capables d'affecter les populations d'arthropodes visés. Ce type de lutte a été envisagé dès la fin du dix-neuvième siècle, puis délaissé avec l'apparition des insecticides synthétiques vers 1940 (Legner, 1995). Certaines espèces de poissons culiciphages présentent un intérêt potentiel dans la lutte contre les larves d'anophèles (Rodhain & Perez, 1985 ; Legner, 1995), on a les moustiques prédateurs du genre *Toxorhynchites* dont les larves se nourrissent des larves d'autres moustiques (OMS, 1999) ;

➤ Méthodes génétiques :

Elles ont pour but de lutter contre les vecteurs par modification de leur patrimoine génétique ou par leur autodestruction. Elle n'est efficace que chez les arthropodes qui ne s'accouplent qu'une fois au cours de leur vie (Kumar, 1991). Elle concerne essentiellement les lâchers de mâles stériles dans la nature, qui s'accoupleraient avec les femelles sauvages pour ne pas produire de descendance viables (Pages *et al.*, 2007). Il a été envisagé de remplacer les souches locales de vecteurs par les souches inaptes à transmettre le paludisme ; cette manipulation génétique pose les mêmes problèmes que la substitution d'une espèce à une autre. Elle exige des connaissances extrêmement poussées non seulement dans le domaine de la génétique, mais aussi dans celui de l'écologie et de l'éthologie (Fatoumata, 2002).

I-1-4-2- Lutte anti-adulte

Elle est basée sur :

- l'utilisation des insecticides synthétiques (dichloro-diphényl-trichloroéthane DDT) ou naturel (nicotine), sur l'utilisation des répulsifs (diéthyltoluamide DEET) et également sur l'utilisation des pyréthrinoides synthétiques (Alpha-cyperméthrine, cyfluthrine) ;

- l'utilisation des grillages dans les maisons d'habitations (Impact malaria, 2008);
- les moustiquaires imprégnées à petites mailles avec des insecticides appropriés tels que le pyrétrinoïde (Minsanté, 2011);
- la construction des maisons à une certaine altitude, loin des marécages et des lacs (Carnevale *et al.*, 2012);
- pulvériser les insecticides sur les murs des maisons pour détruire les espèces endophiles.

I-1-4-3- Lutte par les plantes naturelles

Pendant des siècles, de nombreux paysans ont conservé leurs cultures et se sont protégés des piqûres d'insectes au moyen d'insecticides naturels ou des repulsifs trouvés dans les feuilles, les inflorescences et des fruits de certaines plantes (Wahundeniya, 1990). L'une des nouvelles approches dans la lutte contre les vecteurs du paludisme est l'utilisation des plantes ayant des propriétés insecticides (Foko Dadjì , 2007). A cet effet, de nombreux travaux ont été menés à partir des extraits végétaux (Koua *et al.*, 1998). C'est par exemple le cas des investigations menées par Tchoumboungang *et al.* (2009) au Cameroun qui ont démontré que les huiles essentielles *Cymbopogon citratus* Stapf , , *Ocimum gratissimum* L. var *gratissimum*, *Ocimum canum* Sims et *Thymus vulgaris* L. étaient des larvicides vis-à-vis de *Anopheles gambiae*. Akono *et al.* (2016) ont déterminé l'activité larvicide et nymphocide des huiles essentielles des zestes de trois plantes cultivées au Cameroun sur *Culex pipiens*. Foko Dadjì *et al.* (2016a) au Cameroun ont trouvé que l'huile essentielle des feuilles de *Ocimum basilicum* était un larvicide vis-à-vis de *Anopheles gambiae*. Abe *et al.* (2019) ont évalué la composition chimique et l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Piper umbellatum* sur le principal vecteur du paludisme *Anopheles gambiae* S.L et *Culex quinquefasciatus*. *Acalypha alinifolia* est une plante dont Kovendan *et al.* (2013) ont montré que l'extrait au méthanol de ses feuilles était un alduticide contre trois espèces de moustiques : *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi*, et *Culex quinquefasciatus*.

I-2- Généralités sur les huiles essentielles

I-2-1- Définition et historique

Les huiles essentielles, appelés aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, le bois. Elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse végétale (Padrini & Lucheroni, 1996). Elles sont odorantes et très volatiles. Les terpènes représentent la majeure partie de ces composants. Ces extraits contiennent en moyenne 20 à 60 composés qui sont pour la plupart des molécules peu complexes (monoterpènes, sesquiterpènes) (Meryem, 2009). Depuis plusieurs années, les diverses propriétés thérapeutiques des huiles essentielles sont découvertes. Les civilisations chinoises et indiennes employaient les huiles essentielles pour les soins thérapeutiques et cosmétiques (Benouali, 2015).

La médecine douce et les techniques de relaxation emploient les huiles et leurs arômes pour le traitement de plusieurs conditions comme le stress, l'insomnie, etc. La médecine traditionnelle aussi se penche de plus en plus vers les huiles essentielles en solution ou en inhalateur pour améliorer la qualité de vie des patients par l'aromathérapie.

I-2-2-Propriétés physico-chimiques et Domaine d'utilisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se distinguent des huiles grasses en ce sens que leurs tâches sur le papier sont passagères et elles se volatilisent à la chaleur ; elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée (Bruneton, 1999 ; Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont plus ou moins colorées et leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau (Degryse *et al.*, 2008 ; Bakkali *et al.*, 2008). Elles sont liposolubles et solubles dans les solvants organiques usuels, très peu solubles dans l'eau à qui elles communiquent leurs odeurs (Bruneton, 1999 ; Degryse *et al.*, 2008 ; Bakkali *et al.*, 2008).

En phytothérapie, les HE sont largement utilisées pour traiter les infections bactériennes ou virales, les troubles humoraux ou nerveux (Khadija, 2002 ; Degryse *et al.*, 2008). En aéro-ionisation, ils servent dans la fabrication du «Paragerm» solution volatile à base d'essences naturelles, à activité bactéricide, acaricide, fongistatique qui s'est révélée sans aucune toxicité pour l'Homme aux doses utilisées (Khadija, 2002). En parfumerie cosmétiques, l'utilisation des HE dans les crèmes et les gels permet de préserver ces produits cosmétiques grâce à leur activité antiseptique et anti-oxydante, tout en leur assurant une odeur agréable (Roulier, 1992 ; Khadija, 2002 ; Degryse *et al.*, 2008).

I-2-3- Principales méthodes d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs méthodes d'extraction d'huiles essentielles parmi lesquels :

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

I-3-Généralité sur *Piper nigrum*

I-3-1- Définition et origine

Le poivrier est une liane d'habitat forestier et de climat équatorial. Il prospère idéalement dans une zone géographique située entre le 15ième degré de latitude Nord et le 15ième degré latitude Sud. Il peut être rencontré aussi en climat tropical mais en saison sèche plus ou moins marquée (Pham, 2007). Il est originaire des forêts équatoriales de Transvancore (dans l'état du

Kerala) et de Malabar dans le Sud-Ouest de l'Inde. Vu son importance économique, il s'est répandu dans toutes les régions tropicales à l'instar du Brésil, l'Indonésie et même au Cameroun. Au Cameroun, la culture du poivre a été introduite par Antoine Decré planteur de bananes à Penja qui a décidé d'implanter dans cette zone, reconnue pour son terroir volcanique, quelques lianes de *Piper nigrum* provenant d'Inde. Penja est une commune située dans la région du Littoral et le département du Mounjo. Elle recouvre le territoire du Njombe-Penja et est connue pour son poivre (Franqueville *et al.*, 1971).

I-3-2-Description de la plante

C'est une liane dioïque à tige devenant ligneuse, grimpant à 5-20m de hauteur sur les arbres au moyens de racines crampons (figure 9A). Les tiges portent des feuilles alternes, ovales de forme allongée avec un sommet pointu. Cinq nervures les traversent, deux partent de la base et les trois autres un peu au-dessus. Le nombre chromosomique est $2n=52$. L'inflorescence donne des baies vertes virant au jaune puis au rouge au fur et à mesure que se développe la maturation (figure 9B). Le fruit est une baie sphérique de 0,28cm à 0,5cm de diamètre. Le poivre vert se récolte entre le cinquième et le sixième mois après la floraison, il est à l'état immature. Le poivre vert récolté à l'état mature entre le septième et le huitième mois est traité en le passant dans des marmites contenant de l'eau bouillante pendant une vingtaine de minutes, ce dernier passera du vert au blanchâtre ; il sera sorti de l'eau et passé au séchoir d'où la couleur noir. Le poivre blanc s'obtient à la maturité physique complète des baies au bout de neuf mois lorsque les baies virent au rouge ou à l'orange, ils sont récoltés et trempés dans de l'eau pendant sept à dix jours, cette eau étant renouvelée tous les deux jours ; lorsque la pulpe se dégage complètement de la graine on va laver, rincer et passer au soleil pendant trois jours d'où la couleur blanche (figure 9C). Le genre *Piper* comprend plus de 600 espèces dont une dizaine donne des produits plus ou moins utilisés soit comme des épices, soit comme des drogues médicamenteuses (Maistre, 1964). La graine renferme sous ses téguments un endoderme farineux dont le sommet est occupé par un albumen réduit enveloppant un très petit embryon (Maistre, 1964).



Figure 9 : Matériel végétal, *Piper nigrum*

A : plantation TCHOUMOU à Penja **B :** fruits presque mûr **C :** poivre vert, blanc et noir

I-3-3- Position systématique de *Piper nigrum* (Haggerty, 2011)

Domaine : Eucaryote

Les membres de ce domaine possèdent tous certains traits communs. Les cellules de ces organismes possèdent un véritable noyau et des organelles liées à la membrane.

Règne : Plantae

Ils sont multicellulaires et contiennent des chloroplastes qui permettent aux organismes de mener une activité photosynthétique

Embranchement : Magnoliophyta

Angiosperme ou plantes à fleurs, ils contiennent des organismes qui produisent des graines couvertes, des fleurs, de l'endosperme et des étamines.

Classe : Magnoliopsida

Dicotylédones, ils produisent un embryon avec deux cotylédons appariés et possèdent une structure de veinules en forme de filet dans leurs feuilles.

Ordre : Piperales

Possèdent de petites fleurs groupées ensemble dans des structures en forme de cône.

Famille : Piperacées

Vivent généralement dans des habitats chauds, tropicaux, foliés et ombragés

Genre : *Piper*

Plante contenant des vignes de poivre.

Espèce : *Piper nigrum*

I-3-4- Activité pharmacologique et autres usages de *Piper nigrum*

Piper nigrum est une plante dont les graines contiennent trois substances particulières : la pipérine, une HE et une résine. C'est à ces substances que le poivre doit toutes ces propriétés qui font sa valeur. La pipérine et ses dérivés agissent en tant qu'inhibiteur de prolifération du parasite *Trypanosoma cruzi* (Ribeiro *et al.*, 2004) ; le poivre sert à faciliter la digestion par son action sur les sécrétions salivaires, gastriques, pancréatiques et biliaires (Pham, 2007) ; il augmente la production de salive entraînant également une élévation de l'activité de l'amylase salivaire (Pruthi, 1980) ; il agit également en tant qu'anti-cancérigène (Selvendiran *et al.*, 2005).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II-1-Matériel

II-1-1-Site d'étude

Notre étude a été menée dans le laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé. Yaoundé chef-lieu de la région du Centre et capitale politique de la République du Cameroun. Yaoundé est situé dans la zone de forêt dense tropicale humide, parfaitement dégradée par les activités anthropiques (EPHTA, 1996). Cette ville est sous l'influence du climat équatorial de type guinéen à quatre saisons : une petite saison de pluie (de mi-mars à fin juin), une petite saison sèche (juillet-août), une grande saison de pluie (septembre à mi-novembre), et une grande saison sèche (mi-novembre à mi-mars) (Olivry, 1986). Les précipitations moyennes sont sensiblement de l'ordre de 1600mm par an (Ekodeck & Beyala, 2002) et les températures sont comprises entre 22°C et 29°C (Santoir & Bopda, 1995).

II-1-2- Matériel Biologique

Il est constitué d'une part d'un matériel végétal composé des graines de poivre (figure 10) acheté dans la plantation TCHOUMOU sur la nationale numéro 5, dans la localité de Penja. Cette plantation est située à 4°37'374' de latitude Nord et à 9°40'533'' de longitude Est (figure 11) et identifiées à l'Herbier National de Yaoundé N°20934/SRF-Cam ; d'autre part d'un matériel animal composé des œufs de *Anopheles gambiae* fournis par l'OCEAC, des larves, des nymphes et des adultes provenant de l'élevage au laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieur de Yaoundé et d'un Lapin (*Oryctolagus cuniculus*) âgé d'environ 6 mois, nous permettant de gorger les femelles. Ce lapin est nourri chaque matin à base des feuilles de patate (*Ipomoea patatas*) et de sissongo (*Pennisetum purpureum*) et sa cage est également nettoyée chaque jour.



Figure 10 : Graines de *Piper nigrum* (Poivre) de Penja.

A : graines de poivre blanc **B :** Moulin manuel à poivre blanc

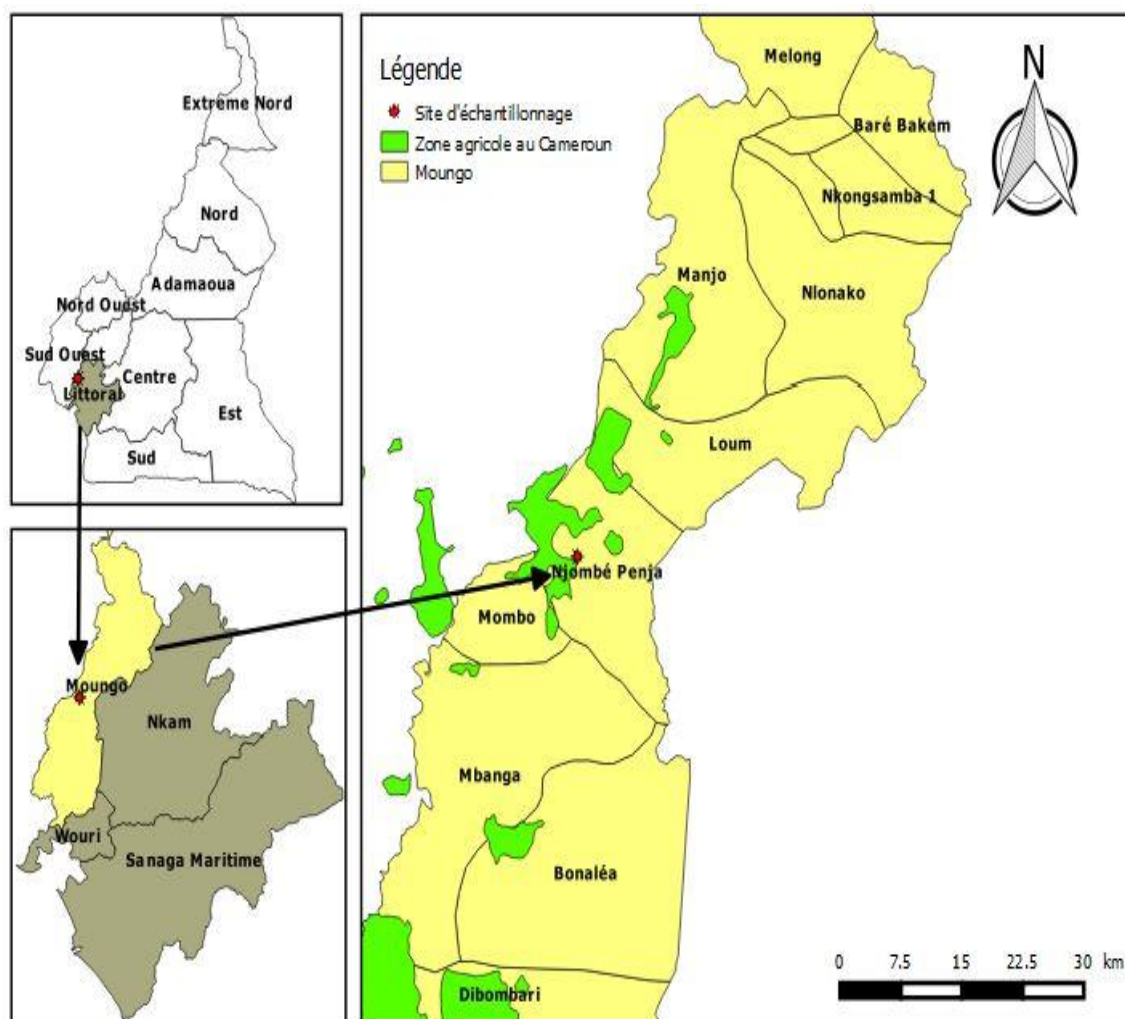


Figure 11 : Localisation du site de collecte des graines de *Piper nigrum* dans le Département du Moundou (source : Institut National de Cartographie, 2019 modifié)

II-1-3-Matériel technique

Il est constitué de :

L'aliment pour larves (TetraMin® baby fish food) ; l'aspirateur à bouche pour le prélèvement des imagos ; la balance de précision de marque SCOUT pro (OHAUS) ; des paires de gants ; des bidons ayant une capacité de 20L pour conserver l'eau de source ; des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre en plastique et en verre ; d'une burette graduée de 25mL ; de l'eau distillée ; des étagères en bois de 2 m de longueur et 1,7 m de hauteur constituées de tablettes superposées ; des gobelets en plastique d'une capacité de 150mL pour la réalisation des tests ovicides, larvicides et "nymphocides" sur *Anopheles gambiae*; d'une loupe manuelle ; des marqueurs pour identifier les différents gobelets pendant la manipulation ; des pipettes de 3 ml et d'une micropipette à embouche de 1 ml ; d'une paire de ciseaux ; des papier filtre ; d'un radiateur pour maintenir la température du laboratoire ; d'un ruban adhésif pour étiquetage ; du saccharose à 10% pour nutrition des imagos; d'une burette en plastique graduée de 2000ml; d'un hygromètre pour mesurer la température et l'humidité ; d'un hydrodistillateur ;du coton

hydrophile et d'eau de source pour élevage des moustiques puisée dans une source située au quartier Simbok à Yaoundé, à environ 10km du laboratoire de Zoologie de l'École Normale de Yaoundé (Foko Dadjì *et al.*, 2007). (figure 12)



Figure 12 : Quelques accessoires du matériel technique

II-2- Méthodes

Le protocole expérimental exploité durant ces travaux reposait essentiellement sur trois grandes étapes : l'extraction de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* ; l'élevage des stades de développement de *Anopheles gambiae* en vue de l'obtention de tous les stades de développement ; et l'étude de l'effet insecticide de l'huile essentielle sur les œufs, les larves de stade 1, 2, 3, 4 et les nymphes d'*Anopheles gambiae*. Des tests préliminaires ont été réalisés pour déterminer les concentrations nécessaires pour la poursuite des essais.

II-2-1- Extraction de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum*

L'extraction de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* s'est déroulée au laboratoire de microbiologie à l'annexe de l'Université de Yaoundé I. L'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* a été extraite par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un appareillage de type Clevenger. Cette méthode consiste à entraîner les composés volatiles des produits naturels avec la vapeur d'eau pour obtenir à la fin un hydrodistillat contenant une phase aqueuse ainsi qu'une phase organique constituée par l'huile essentielle.

A l'aide d'une soupière, les graines de *Piper nigrum* ont été concassées (figure 13A) puis pesées sur une balance de précision de marque SCOUT pro (figure 13B) pour déterminer la masse brute du matériel végétal. Ces graines concassées ont été introduites dans l'alambic en inox (figure 13C), douze litres d'eau de robinet ont été introduits dans ce dernier (figure 13D) et l'ensemble a été porté à ébullition sur une plaque chauffante (figure 13E) pendant 5 heures de temps jusqu'à l'apparition de la première goutte d'huile. À la fin de l'extraction, un distillat

constitué de deux phases a été obtenu au niveau de la colonne à décanter : Une phase aqueuse et une phase organique odoriférante surmontant la première, qui constitue l'huile essentielle. L'huile essentielle obtenue a été recueillie à l'aide d'une micropipette et filtrée sur une colonne de sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toutes traces d'eau résiduelles puis introduite dans un flacon en verre sombre hermétiquement fermé (figure 13F), pesée et conservée à 4°C dans un réfrigérateur. Le rendement d'extraction a été calculé grâce à la formule ci-dessous :

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



Figure 13 : Extraction de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum*.

A : graines concassées de *Piper nigrum* ; **B :** pesage des graines concassées; **C :** introduction des graines concassées dans l'alambic ; **D :** alambic hermétiquement fermé contenant de l'eau et des graines concassées ; **E :** montage du dispositif de Clevenger prêt pour hydrodistillation ; **F :** flacon en verre contenant l'HE.

II-2-2- Élevage des stades de développement d'*Anopheles gambiae*

L'élevage de routine de la souche d'*Anopheles gambiae* provenant de l'OCEAC s'est fait au laboratoire de Zoologie de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé et a débuté en Juillet 2017. Ces œufs ont été conservés dans les boîtes de Pétri pendant 24h (figure 14A) à température ambiante entre 25°C et 28°C pour leur maturation (Foko Dadjé *et al.*, 2007) ; cette température a été mesurée à l'aide d'un thermo hygromètre et contrôlée grâce à un radiateur. Après maturation, les œufs ont été introduits dans une bassine contenant 100ml d'eau de source (figure 14B). Après

24h, l'éclosion a débuté et des larves de premiers stades ont été obtenues, ces dernières ont été nourries au TetraMin®baby (3mg pour 100 larves par jour) (Vantaux *et al.*, 2015).

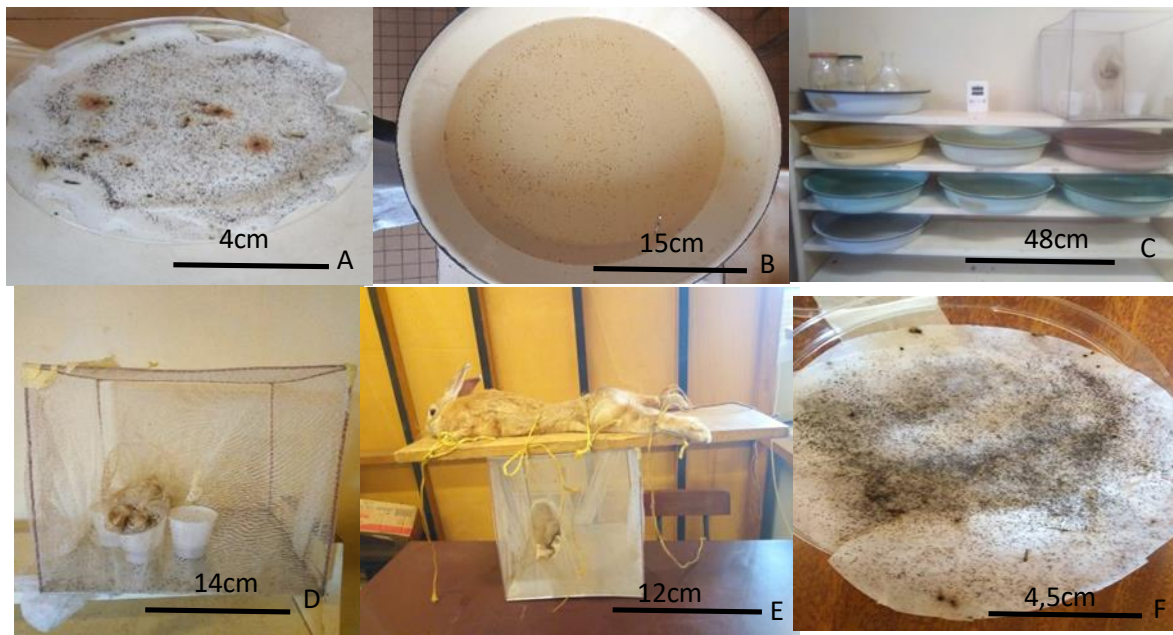


Figure 14 : Étapes de l'élevage d'*Anopheles gambiae* au laboratoire

A : souche d'*Anopheles gambiae* provenant de l'OCEAC; **B :** cuvettes d'eau de source contenant les larves; **C :** dispositif d'élevage des larves; **D :** cage contenant les nymphes pipetées et transférées dans des gobelets; **E :** gorgement de moustiques femelles à l'aide du sang de lapin ; **F :** pondoir contenant les œufs.

Les larves ont été par la suite réparties en lots dans d'autres bassines (environ 100 larves par récipient) pour éviter la surpopulation (figure 14C). A partir de Six à sept jours plus tard celles-ci ont donné des nymphes. Ces nymphes ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur de 3ml, transférées dans des gobelets en plastique et introduites dans une cage de forme cubique recouverte d'un tulle moustiquaire non imprégnée pour émergence (figure 14D). Les adultes issus de cette émergence ont été nourris au jus sucré constitué de saccharose à 10% imbibé sur du papier filtre. Les femelles sont gorgées du sang d'un lapin trois jours après l'émergence. Pour ce faire, le lapin préalablement rasé sur sa face ventrale à l'aide des ciseaux est maintenu en décubitus ventral sur un support en bois percé en son centre au-dessus de la cage contenant les imagos (figure 14E), cette opération dure 15 minutes et est répétée après deux jours. Deux jours plus tard après ce dernier repas sanguin, un pondoir constitué d'une boîte de Pétri renfermant du coton imbibé d'eau de source et recouverte par du papier filtre a été placée dans la cage. Le pondoir (figure 14F) a été retiré le jour suivant et conservé pendant 24 heures pour la maturation des œufs, température comprise entre 26 et 28°C et humidité relative comprise entre 70 et 80°C.

II-2-3- Évaluation de l'effet insecticide de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur les différents stades pré-imaginaux d'*Anopheles gambiae*

Ces tests ont consisté à évaluer le taux d'éclosion des œufs, de mortalité des larves et d'émergence des nymphes dans des solutions appropriées d'huile essentielle, suivant le protocole de l'OMS, 2005.

II-2-3-1- Préparation des solutions expérimentales

Une solution mère à 1% a été préparée dans un tube à essai en verre en diluant 200 mg d'huile essentielle (pesée sur une balance de précision de marque SCOUT pro) dans 20ml d'éthanol à 95° grâce à une micropipette pour un volume final de 20ml. Sur la base de cette solution mère, des dilutions en séries ont été effectuées dans d'autres tubes à essai avant d'être bouchés à leur extrémité par un coton hydrophile évitant ainsi l'évaporation de l'alcool. Nous avons utilisé 13 concentrations différentes (en %) à savoir : 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,6 ; 0,7 ; 0,9 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; et 3 %.

II-2-3-1-1- Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les œufs d'*Anopheles gambiae*

Après avoir préparé dix tubes à essais étiquetés à l'aide d'un ruban adhésif portant des concentrations suivantes : 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 et 3%, quarante gobelets en plastique contenant 99ml d'eau de source chacun à raison de quatre réplicats par concentration (pour augmenter la fiabilité et limiter les erreurs pendant la manipulation) ont été disposés sur une paillasse. Pour chaque concentration, nous avons utilisé un gobelet témoin. Dans chaque gobelet test étiqueté, 1ml de solution d'huile essentielle de concentration bien déterminée a été introduit et dans chaque gobelet témoin 1ml d'éthanol à l'aide d'une micropipette. Après maturation pendant 24h, des œufs pondus par les femelles d'*Anopheles gambiae*, 1250 spécimens ont été comptés à l'aide d'une loupe manuelle et d'une aiguille montée ; 25 œufs ont par la suite été introduits par gobelet. Les gobelets ont été recouverts de tulles moustiquaires non imprégnées dans le but de limiter la contamination du milieu par des agents étrangers et les jeunes larves ont été nourries à la TetraMin®Baby à raison de 3mg pour 100 larves par jour. Pour avoir le taux d'éclosion, nous avons filtré l'eau des gobelets contenant les œufs grâce au papier filtre puis compté les œufs éclos grâce à une loupe manuelle et une aiguille montée 24, 48, et 72h après exposition à des concentrations appropriées d'huile essentielle.

II-2-3-1-2- Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les larves de stade 1, 2, 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*

Ce test consistait à évaluer la mortalité des larves de stade 1, 2, 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* exposées à des solutions d'huiles essentielles de *Piper nigrum* suivant le protocole réaménagé de l'OMS, 2005. Des gobelets tests et témoins ont été étiquetés à l'aide d'un marqueur

et disposés sur une pailasse en lots de quatre répliques par concentration. Ainsi, pour chaque stade les concentrations suivantes ont été utilisées :

- stade 1 : 0,025% ; 0,05% ; 0,1% ; 0,3% et 0,5%
- stade 2 : 0,025% ; 0,05% ; 0,1% ; 0,3% et 0,5%
- stade 3 : 0,05% ; 0,1% ; 0,3% ; 0,5% ; 0,6% et 0,7%
- stade 4 : 0,1% ; 0,3% ; 0,5% ; 0,7% et 0,9%

Dans chaque gobelet contenant 99 ml d'eau de source, 1ml d'une concentration appropriée d'HE a été ajouté et dans les gobelets témoins seulement 1ml d'éthanol à 95%. Un lot de 25 larves d'*Anopheles gambiae* a été pipeté puis introduit dans chaque gobelet préparé comme indiqué ci-dessus avant d'être recouvert de tulles moustiquaires non imprégnées. Le dénombrement des larves mortes s'est fait après 24, et 48 heures d'exposition aux différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum*.

II-2-3-1-3- Préparation des milieux expérimentaux et protocole de test sur les nymphes d'*Anopheles gambiae*

Après étiquetage de 30 gobelets en plastique, ils ont été déposés sur une pailasse en lot de 4 répliques en plus des gobelets témoin selon les différentes concentrations suivantes : 0.9 ; 1 ; 1.5 ; 2 ; 2.5 et 3%, 99ml d'eau de source ont été dans chaque gobelet puis à l'aide d'un embout réglée à 1000 µl les gobelets test ont reçu 1ml de solution d'huile essentielle appropriée et les gobelets témoins 1ml d'éthanol. Des lots de 25 nymphes ont été introduits dans chaque gobelet recouvert par la suite de tulles moustiquaires non imprégnées afin d'éviter que des moustiques adultes s'échappent après émergence. Le dénombrement des nymphes mortes s'est fait après 24, 48 et 72h d'exposition.

II-2-4- Interprétation des taux de mortalité selon l'OMS

Les taux de mortalités ont été interprétés selon les critères de l'OMS, 2013 à savoir :

- taux de mortalité inférieur à 90% : population résistante,
- taux de mortalité compris entre 90-97% : résistance probable de la population,
- taux de mortalité compris entre 98-100% : population sensible.

II-2-5- Analyses statistiques des résultats

Les analyses ont été faites à l'aide du logiciel PAST 1. 77 (PALaeontological STatistic). Le test H de Kruskal Wallis (ANOVA à un facteur non paramétrique) a été utilisé pour évaluer l'effet du temps et de la concentration de l'huile essentielle sur le taux d'éclosion des œufs d'*Anopheles gambiae* et le taux de mortalité des larves de stades 1, 2, 3, 4 et des nymphes. Le logiciel Microsoft Excel 2016 a été utilisé pour tracer les courbes de variation des taux de mortalité en fonction des concentrations et de la durée d'exposition à l'huile essentielle. A partir

de ces courbes, les concentrations CL_{10} , CL_{50} et CL_{90} ont été graphiquement déterminées respectivement après 24h, 48h et 72h d'exposition à l'huile essentielle. L'intervalle de confiance a été fixé à 95% et le degré de signification a été fixé pour des valeurs de probabilité inférieures à 0,05.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III-1- Résultats

III-1-1- Rendement d'extraction

L'hydrodistillation de 4453g des graines de *Piper nigrum* a donné 11,6g d'huile essentielle de couleur vert pâle, soit un rendement de 0,26% (tableau I).

Tableau I : Données sur l'extraction de l'huile essentielle de *Piper nigrum* (poivre)

Famille	Genre	Espèce	Numéro d'identification	Organe	Masse du matériel végétal en (g)	Masse de l'huile essentielle en (g)	Rendement en (%)
Piperaceae	<i>piper</i>	<i>Piper nigrum</i>	20934/SRF-Cam	Graine	4453	11.6	0.26

III-1-2- Caractérisation de l'huile essentielle de *Piper nigrum*

Les noms des composés constituant l'huile essentielle de *P. nigrum* ont été déterminés grâce au chromatogramme de la figure 17, qui a révélé la présence d'environ 30 composés terpénique constituant 77,69% de l'huile essentielle (tableau II). En effet, des pics ont été enregistrés sur ce chromatogramme représentant ces composés.

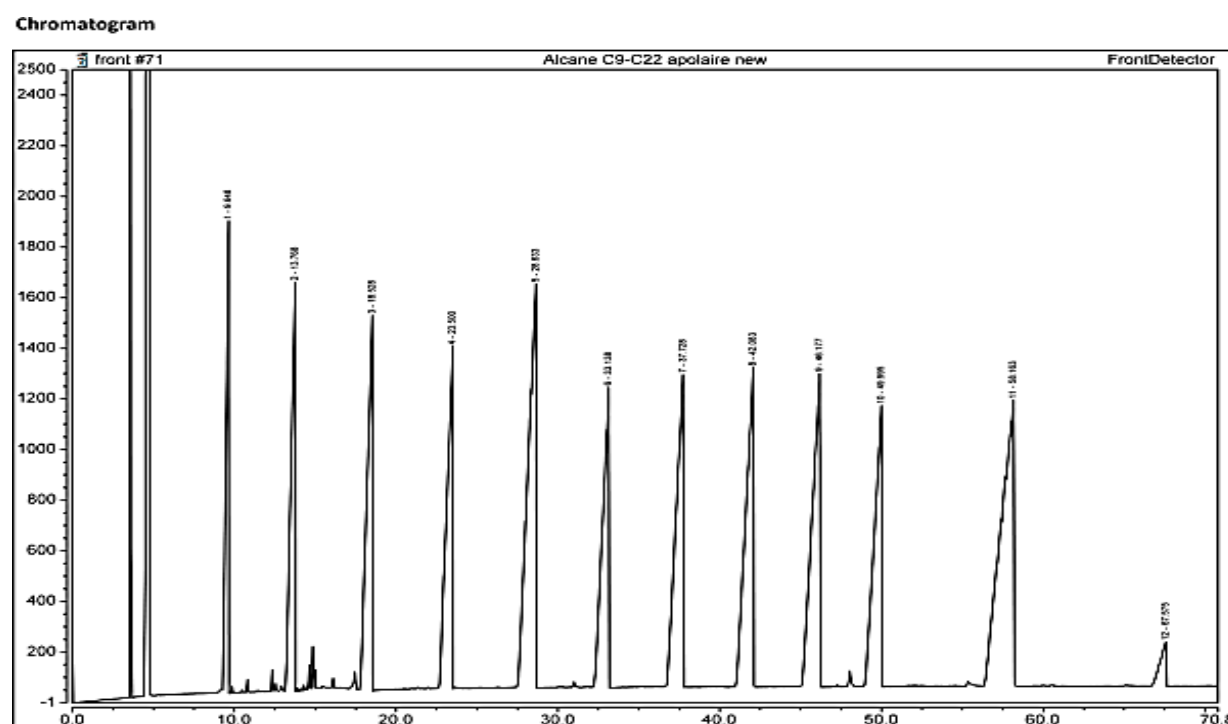


Figure 15 : Profil chromatographique de l'huile essentielle de *Piper nigrum*

Plusieurs grands groupes de composés ont été obtenus à partir l'huile essentielle de *Piper nigrum* à savoir : les monoterpènes hydrocarbonés (Camphène, β -pinène..) ; les monoterpènes oxygénés (linalol, 4-terpinéol..) et les sesquiterpènes hydrocarbonés (β -elemène et α -bisabolol..). Le groupe des monoterpènes s'est révélé être le plus abondant dans les proportions suivantes : le limonène (9,74 %), le (+)-camphène (8,44 %), le β -pinène (8,00%), le 3-carène (7,04 %) et l' α -pinène (6,32 %) (Tableau II). De même, le caryophyllène (19,12 %) a été le sesquiterpène le plus abondant dans l'HE. Les composés non identifiés dans cette étude ont représenté 22,31% de l'huile essentielle obtenue à partir des graines de *P. nigrum*.

Tableau II : Composition chimique de l'huile essentielle de *P. nigrum*

Ordre d'élution (N°)	Temps de rétention (min)	Composés	Pourcentage du composé (%)
		Monoterpènes hydrocarbonés	47,57
1	2,317	α -phelandrène camphène	0,40
2	2,693		0,13
3	2,752	Sabinène	2,98
4	2,869	β -pinène	8,00
5	2,974	α -pinène	6,32
6	3,181	3-carène	7,08
7	3,253	Trifluorométhanesulfényl fluoride	2,14
8	3,308	(+)-camphène	8,44
9	3,376	0-cymène	0,63
10	3,588	Limonène	9,74
11	3,623	β -phellandrène	0,94
12	3,998	Gamma-terpinène	0,11
13	4,414	Terpinolène	0,30
14	4,500	Terpinolène	0,36
		Monoterpènes oxygénés	0,3
15	4,584	Linalol	0,15
16	6,364	4-terpinéol	0,15
		Sesquiterpènes hydrocarbonés	29,82
17	9,209	Delta-Elemène	0,65
18	9,939	Copaène	0,70
19	10,142	β -elemène	1,15
20	10,540	α -Bergamotène	0,62
21	10,755	Caryophyllène	19,12
22	11,265	α -Caryophyllène	1,83
23	11,566	α -Cucurmène	0,41
24	11,640	Cedrène	0,64
25	11,967	β -Bisabolène	1,65
26	12,145	(+)-delta-Cadinène	0,32
27	13,162	Caryophyllène oxyde	1,78
28	13,729	Spathulénol	0,44
29	14,498	α -Bisabolol	0,41
30	12,643	2-Undécanone	0,10
Total			77,69

III-1-3- Effet insecticide de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur les stades pré-imaginaux d'*Anopheles gambiae*

III-1-3-1- Activité ovicide de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur *Anopheles gambiae*

Les taux d'éclosion des œufs d'*Anopheles gambiae* après 24h, 48 et 72h d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle des graines de *P. nigrum* sont consignés dans le tableau III.

Tableau III : Taux d'éclosion des œufs matures d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum*.

Concentration de l'HE (%)	Taux d'éclosion (%)			H	P
	24h	48h	72h		
0(témoin)	73±0,62	80±0,40	96±0,70	8,769	0,011*
0,1	69±0,85	78±0,28	89±0,47	9,269	0,008**
0,3	64±0,40	72±0,40	83±0,47	9,548	0,007**
0,5	56±1,29	65±0,62	75±0,62	6,933	0,029
0,7	56±0,70	56±1,08	67±0,75	4,106	0,121
0,9	48±0,70	61±1,03	64±1,22	6,010	0,044*
1	44±1,73	49±1,43	50±1,19	1,654	0,417
1,5	40±1,22	47±1,18	49±1,10	1,817	0,373
2	14±0,28	24±0,40	26±0,28	7,731	0,016*
2,5	7±0,5	15±0,25	15±0,25	7,385	0,013*
3	2±0,28	3±0,25	5±0,25	2,375	0,179
H	38,28	39,85	41,15		
P	0,000030**	0,000016**	0,000010**		

Codes : **P<0,01 : très significatif ; *P<0,05 : significatif ; h (heures)

Les taux d'éclosion à 24 h sont de 69 % ; 64 % ; 56 % ; 56 % ; 48 % ; 44 % ; 40 % ; 14 % ; 7 % et 2 %, pour les concentrations en huile essentielle de ; 0,1 % ; 0,3 % ; 0,5 % ; 0,7 % ; 0,9 % ; 1 % ; 1,5 % ; 2 % et 3 % respectivement alors qu'il est de 73 % dans les milieux témoins. Après 72h d'exposition à l'huile essentielle, ces taux d'éclosion sont passés à 89 % ; 83 % ; 75 % ; 67 % ; 64 % ; 50 % ; 49 % ; 26 % ; 15 % ; 5 % respectivement et 96 % dans le milieu témoin. D'après ces résultats, il ressort que le taux d'éclosion est cumulatif par rapport au temps pour une dose de concentration donnée mais diminue de manière significative avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle de *Piper nigrum*. On relève ainsi des taux d'éclosion de 2 %, 3 % et 5 % respectivement à 24h, 48h et 72h pour la concentration de 3% alors qu'ils sont respectivement de 69 %, 78 % et 96 % pour la concentration de 0,1% (tableau III). Par ailleurs, le test de Kruskal-Wallis a montré un effet significatif sur le taux d'éclosion quelle que soit la concentration utilisée et la durée d'exposition avec p=0,00003 à 24 h, p=0,000016 à 48 h et à 72h p=0,000010.

III-1-3-2-Activité larvicide de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur les larves d'*Anopheles gambiae*

Le taux de mortalité des larves d'*Anopheles gambiae* obtenu lors de notre expérience a montré qu'après exposition de ces dernières aux différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum*, il est proportionnel à la concentration. En effet, pour le stade 1 (tableau IV), après 48h d'exposition à une concentration de 0,025%, on observe un taux de mortalité de 40%, tandis qu'à 0,3 % on observe 98% de mortalité. Pour le stade 2 (tableau V), après 48h d'exposition à une concentration de 0,025 % on observe 26 % de mortalité ; à 0,3 % on observe 99% de mortalité. Il en est de même du stade 3 (tableau VI) qui, après une exposition de 48h à l'HE ont présenté des taux de mortalité de 18 % et 96 % pour des concentrations respectives de 0,05 % et 0,6 %. Pour le stade 4 (tableau VII), à 0,9 % après 48h d'exposition on a 100 % de mortalité alors qu'à 0,1 % on a 10 % de mortalité. Il apparait donc que le taux de mortalité larvaire est d'autant plus élevé que la concentration de l'huile essentielle est importante. Par ailleurs nous observons que l'activité de l'huile essentielle de *Piper nigrum* varie en fonction de la durée d'exposition car $p < 0,05$ aux concentrations 0,025 % ; 0,05 % ; 0,1 % et 0,5 % (stade 1) ; 0,025 % ; 0,05 % ; 0,1 % et 0,3 % (stade 2) ; 0,05 % et 0,1 % (stade 3) ; 0,3 % ; 0,7 % et 0,9 % (stade 4). De même, les probabilités du test H de Kruskal Wallis enregistrées après 24 h et 48 h ($p < 0,01$) mettent en évidence des différences très significatives du taux de mortalité des différents stades larvaires entre les temps d'exposition quelle que soit la concentration de l'HE. L'effet de l'huile est plus prononcé à 48 heures.

Tableau IV : Taux de mortalité des larves de stade 1 d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$). Codes : ** $P < 0,01$: très significatif ; * $P < 0,05$: significatif.

Concentration de l'HE (%)	Taux de mortalité (%)		H	P
	24h	48h		
0(témoin)	0±0	1±0,25	0,333	0,317
0,025	7±0,25	40±0,70	5,333	0,017*
0,05	21±0,47	57±0,85	5,333	0,020*
0,1	48±0,40	80±0,70	5,333	0,019*
0,3	95±0,25	98±0,28	2,083	0,095
0,5	97±0,25	100±0	3	0,040*
H	21,88	21,92		
P	0,0004**	0,0004**		

Tableau V : Taux de mortalité des larves de stade 2 d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

Concentration de l'HE (%)	Taux de mortalité (%)		H	P
	24h	48h		
0 (témoin)	1±0,25	1±0,25	0	1
0,025	10±1,19	26±1,55	3,521	0,057*
0,05	16±0,81	53±1,49	5,333	0,019*
0,1	45±2,05	81±1,31	5,333	0,020*
0,3	94±0,28	99±0,25	4,083	0,032*
0,5	97±0,75	100±0	0,333	0,317
H	21,01	21,61		
P	0,0007**	0,0005**		

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

Concentrations de l'extract (%)	Taux de mortalité (%)		H	P
	24h	48h		
0(témoin)	1±0,25	1±0,25	0	1
0,05	4±0,40	18±0,28	5,333	0,018*
0,1	12±0,40	41±1,49	5,333	0,020*
0,3	49±1,60	61±1,65	1,333	0,236
0,5	87±0,85	95±0,47	2,521	0,108
0,6	93±1,18	96±0,57	0,083	0,751
0,7	99±0,25	100±0	0,333	0,317
H	25,05	25,01		
P	0,0003**	0,0003**		

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

Concentrations de l'extract (%)	Taux de mortalité (%)		H	P
	24h	48h		
0(témoin)	0±0	0±0	0	0
0,1	5±0,62	10±0,28	2,083	0,134
0,3	26±0,64	39±0,47	5,333	0,020*
0,5	44±0,40	51±0,62	3	0,074
0,7	70±0,64	91±0,47	5,333	0,020*
0,9	78±0,64	100±0	5,333	0,014*
H	21,84	22,32		
P	0,0005**	0,0004**		

III-1-3-3-CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ des larves de stade 1, 2, 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*

Par définition, les CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ sont des concentrations capables d'induire respectivement 10 %, 50 % et 90 % de mortalité des larves de stade 1, 2, 3 et 4 d'*Anopheles gambiae* exposées à l'HE. Elles ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression après 24h, et 48h d'exposition à l'huile essentielle de *Piper nigrum* et ensuite consignées dans le tableau VIII ci- dessous. De ce dernier, il en découle que les CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ diminuent en fonction de la durée d'exposition à l'huile essentielle donc l'efficacité de l'huile essentielle de *Piper nigrum* augmenterait avec le temps d'exposition.

Tableau VIII : CL₁₀, CL₅₀ et CL₉₀ de l'huile essentielle de *Piper nigrum* au bout de 24 et 48h d'exposition des larves de stade 1, 2, 3 et 4 d'*Anopheles gambiae*.

Stades	Temps d'exposition (h)	Concentrations létales(%)		
		CL ₁₀	CL ₅₀	CL ₉₀
Stade 1	24	0,19	0,37	0,55
	48	0,08	0,29	0,49
Stade 2	24	0,20	0,38	0,56
	48	0,11	0,29	0,48
Stade 3	24	0,20	0,40	0,60
	48	0,13	0,35	0,57
Stade 4	24	0,19	0,42	0,65
	48	0,22	0,25	0,27

III-1-3-4- Activité "nymphocide" de l'huile essentielle de *Piper nigrum* sur *Anopheles gambiae* (test H de Kruskal Wallis, P< 0,05)

Après exposition des nymphes d'*Anopheles gambiae* aux différentes concentrations d'huile essentielle de *Piper nigrum* ; les taux d'émergence sont consignés dans le tableau IX ci-dessous. De ce tableau, il ressort que le taux d'émergence décroît en fonction de la concentration et de la durée d'exposition. Ainsi, après 72h d'exposition à l'huile essentielle on relève un taux d'émergence de 100% pour une concentration d'HE de 0,9 % ; 78 % pour une concentration d'HE de 1 % et 3 % pour une concentration d'HE de 3 %. Les probabilités du test H de Kruskal Wallis enregistrées après 24 h, 48 h, et 72 h (p < 0,01), mettent en évidence des différences très significatives des taux d'émergence des nymphes avec le temps d'exposition quelle que soit la concentration de l'huile essentielle. Le taux d'émergence des nymphes diminuerait de manière significative avec l'augmentation de la concentration en huile essentielle.

Tableau IX : Taux d'émergence des nymphes d'*Anopheles gambiae* en fonction de la durée d'exposition à différentes concentrations de l'huile essentielle de *Piper nigrum* (test H de Kruskal Wallis, $P < 0,05$).

Concentration de l'extrait (%)	Taux d'émergence (%)			H	P
	24h	48h	72h		
0(témoin)	99±0,25	100±0	100±0	0,461	0,367
0,9	91±0,25	93±0,25	100±0	7,856	0,009**
1	73±0,47	75±0,25	78±0,28	3,837	0,090*
1,5	56±1,22	62±0,95	67±0,85	2,625	0,254
2	26±0,64	32±0,40	39±0,62	6,760	0,029*
2,5	13±0,62	14±0,50	15±0,75	0,028	0,975
3	0±0	1±0,25	3±0,25	3,231	0,090
H	26,37	26,48	25,90		
P	0,0001**	0,0001**	0,0001**		

III-2. Discussion

Les différents résultats obtenus montrent que l'huile essentielle de *Piper nigrum* renferme des composés à fort potentiel toxique et ce en fonction de la concentration et du temps d'exposition. L'hydrodistillation de l'huile essentielle de *Piper nigrum* révèle un rendement d'extraction faible (0,26%) comparé à celui obtenu par Tchoumboungang *et al.* (2009) qui était de 1,10% sur la même plante ; cette différence pourrait être liée à la période de récolte aux facteurs édaphiques et climatiques, à l'état physiopathologique de la plante et au temps de distillation (Jazet *et al.*, 2002). Ce rendement est moyen par rapport à celui obtenu des travaux de Foko Dadjì *et al.* (2018), Akono *et al.* (2016) des huiles essentielles de *Clausena anisata* et *Citrus sinensis* qui étaient de 0,242 % et 0,72 % respectivement. Par contre il est très élevé comparé à celui obtenu des travaux d'Abe *et al.* (2019) de l'HE de *Piper umbellatum*, qui était de 0,012%. Cette variabilité peut s'expliquer par les différences de propriétés physicochimiques et même de composition chimique propre à chaque espèce (Jazet *et al.*, 2002) voir la méthode d'extraction utilisée pour chacune de ces plantes.

L'analyse chimique de l'huile essentielle de *P. nigrum* a révélé un mélange de nombreux composés, dont environ 30 composés terpéniques différent ont été identifiés constituant 77,69 % de L' HE. La composition chimique de l'HE des graines de *P. nigrum* montre la présence de monoterpènes et de sesquiterpènes rapportés efficaces contre les insectes et les bactéries. Les composés principaux sont : le caryophyllène (19,12 %), le limonène (9,74 %), le (+)-camphène (8,44%) et le β -pinène (8,00 %) ; ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Kapoor *et al.* (2009) sur *Piper nigrum* dont le profil chimique consistait en β -caryophyllène (29,9 %), limonène (13,2 %), β -pinène (7,9%) et sabine (5,9 %). Cependant ils diffèrent de ceux trouvés par Foko Dadjì *et al.* (2018) qui ont principalement obtenu de l'HE de *Clausena anisata* : (Z)

l'anéthole (37,25 %), le p-cymène (16,01 %), le γ -terpinène (4,07 %) et le linalool (3,80 %) et de ceux d'Abe *et al.* (2019) qui ont principalement obtenu de L'HE de *Piper umbellatum* : le γ -muurolène (11,37 %), le β -elemène (10,56 %) et le copaène (9,63 %). Ces variations seraient dues à la spécificité des essences, à la composition chimique des sols qui affecterait la composition biochimique des plantes d'un espace géographique à un autre. Il est établi que la salinité du sol influencerait le rendement d'extraction et le pourcentage des composés d'une huile essentielle (Eman *et al.*, 2013).

La lutte contre les stades aquatiques des vecteurs des maladies est essentielle pour arrêter à la fois la propagation du vecteur et le fardeau de la maladie (Abe *et al.*, 2019). Il a été prouvé au cours de cette étude que le taux d'éclosion des œufs d'*Anopheles gambiae* est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de *Piper nigrum*. On peut en déduire que cette essence est dotée de propriétés ovicides sur *Anopheles gambiae*. Ainsi donc, nous avons des taux d'éclosion de 2 %, 3 % et 5 % pour la concentration 3 % respectivement à 24 h, 48h et 72h, et un taux d'éclosion de 96 % pour le témoin à 72 h (tableau III). Ces résultats sont similaires à ceux de Foko Dadji *et al.* (2016b) qui ont démontré les propriétés ovicides de l'huile essentielle des graines d'*Aframomum sulcatum* sur *Anopheles gambiae* avec un taux d'éclosion de 70,67% pour une concentration de 0,01% après 48h d'exposition. Les potentiels ovicides des HE ont souvent été liés à la présence des monoterpènes oxygénés qui dans ce cas est le Linalol et le 4-terpinéol (Marimuthu, 2010). Ces composés actifs de l'HE de *Piper nigrum* diffuseraient dans la paroi de l'œuf (exoclorion) et auraient pour effet de tuer l'embryon.

Par ailleurs, les résultats des tests sur les larves d'*Anopheles gambiae* révèlent une activité larvicide de l'HE de *P. nigrum*. Le taux de mortalité des larves d'*Anopheles gambiae* augmentent avec la concentration d'HE de *Piper nigrum* comme décrit par Murugan *et al.* (2007). Nous avons observé une mortalité très élevée au niveau des larves de stades 1 et 2 avec 100 % de mortalité pour une concentration de 0,5 % pour ces 2 premiers stades de développement d'*An. gambiae*. Ceci pourrait être dû au fait qu'ils sont encore fragiles. Les stades larvaires 3 et 4 ont été moins sensibles à la toxicité de l'HE de *Piper nigrum* car il a fallu 0,7 % et 0,9 % respectivement pour avoir 100% de mortalité après 48h d'exposition. Ces résultats sont similaires à ceux de Kemabonta *et al.* (2018) au Nigeria qui ont démontré l'effet larvicide de *Piper nigrum* vis-à-vis de *Anopheles gambiae* après 24h à 0,009 %. Selon Silvia *et al.* (2008) le caryophyllène présenterait une activité larvicide très élevée par conséquent il pourrait être responsable de cet activité dans notre travail.

Les tests biologiques effectués sur les nymphes d'*Anopheles gambiae* révèlent que l'huile essentielle de *Piper nigrum* est dotée des propriétés "nymphocide" vis-à-vis d'*Anopheles*

gambiae. Le taux de mortalité des nymphes d'*Anopheles gambiae* en présence de *Piper nigrum* est variable, ainsi à 72h, on a 78%, 67%, 39%, et 15% pour les concentrations de 1%, 1.5%, 2%, 2.5% respectivement. Il a fallu 3% de concentration de HE de *Piper nigrum* pour atteindre un taux d'émergence faible étant de 3% ; ceci peut s'expliquer par sa composition chimique marquée par une forte proportion de sesquiterpènes, notamment les sesquiterpènes hydrocarbonés tel que le β -elemène dont l'activité "nymphocide" est connue (Chiasson & Beloin 2007). Les nymphes ne se nourrissent pas, la seule voie pour l'HE est le contact avec leur cuticule ou l'étouffement (Candido *et al.*, 2013), ce qui a exigé de fortes concentrations d'HE pour leur mortalité.

En mettant en parallèle ces différents résultats obtenus allant du stade œuf au stade nymphale, nous constatons que les larves sont plus sensibles à HE de *P. nigrum* que les nymphes car il faut 48h pour la mortalité totale des larves quelle que soit le stade ; Ce qui n'est pas le cas pour les nymphes où il en faut 72h. Concernant le stade œuf, étant donné que les œufs sont dotés d'une coque il a fallu une très forte dose de concentration (3%) pour une efficacité ovicide de L'HE. Ainsi, les stades œufs et nymphales d'*Anopheles gambiae* présentent une tolérance nettement supérieure à celui larvaire avec comme stade larvaire le plus vulnérable le stade 1.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Lors de cette étude, nous avons procédé à l'extraction de l'huile essentielle des graines de *Piper nigrum* par hydrodistillation, puis à son analyse chimique afin d'évaluer son effet insecticide sur les stades pré-imaginaux d'*Anopheles gambiae*. Il ressort de ce travail que cette huile contient un rendement d'extraction de 0,26%, qu'elle comprend environ 30 composés pour un total de 77,69% de la masse d'HE analysée. Cette HE est dotée des propriétés ovicides, larvicides et "nymphocides " très importantes qui pourraient être attribuées à sa composition chimique marquée par l'abondance des terpènes dotés de propriétés insecticides plus particulièrement des molécules actives telles que le Linalol, le 4-terpinéol, le caryophyllène et le β -elemène.

A l'issue de nos recherches plusieurs autres perspectives se présentent à savoir, isoler les composés ; mener des études approfondies afin de déterminer les sites et les mécanismes d'actions de ces molécules dans l'organisme du moustique ; mener les études sur d'autres espèces végétales ; mener une étude comparée sur des différents sites de récoltes afin de déterminer l'origine exacte des différences observées au niveau des rendements des extractions. Bien plus, l'huile essentielle de *Piper nigrum* doit être testée sur les souches sauvages d'*Anopheles gambiae*, qui sont souvent moins sensibles que celles de laboratoire, afin d'avoir un aperçu réel de son efficacité. Enfin, au cas où les essais de terrain seraient concluants, promouvoir donc la culture à grande échelle du poivre afin qu'il soit accessible à tous et moins onéreux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe H., Foko D.G.A. & Tamesse J.L. (2019). Chemical composition and Insecticidal Activity of *Piper umbellatum* leaf essential oil on the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.L and *Culex quinquefasciatus*. *International Journal of Entomology Research*, **4**(2): 59-67.
- Akono N., Belong P., Tchoumbougang F., Bakwo F. & Fankem H. (2012). Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* Sims et d'*Ocimum basilicum* L. sur les adultes d'*Anopheles funestus* ss., vecteur du paludisme au Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, **59** : 4340-4348.
- Akono Ntonga P., Tonga C., Kekeumou S., Jazet D.P., Magne T., Kouotou S., Tedongmo L. & Lehman L.G. (2016). Activité larvicide et nymphocide des huiles essentielles des pericarpes des fruits murs de quelques espèces de Citrus sur *Culex pipiens* Linnaeus 1758, vecteur de la filariose de Bancroft au Cameroun. *Cameroon Journal of Biological Sciences* (**24**): 18-25.
- Antonio-Nkondjio C., Kerah C.H., Simard F., Awono-Ambene P., Chouaibou M., Tchuinkam T. & Fontenille D. (2006). Complexity of the malaria vectorial system in Cameroon: contribution of secondary vectors to malaria transmission. *Journal of Medical Entomology*, **43** (6): 1215–1221.
- Antonio-Nkondjio C., Youmsi-Goupeyou M., Kopya E., Tene-Fossog B., Njiokou F., Costantini C. & Awono-Ambene. (2014). Exposure to disinfectants (soap or hydrogen peroxide) increases tolerance to permethrin in *Anopheles gambiae* populations from the city of Yaoundé, Cameroon. *Malaria Journal*, **13** (1): 1-7.
- Antonio-Nkondjio C., Sonhafouo-Chiana N., Ngadjeu C.S., Doumbe-Belisse P., Talipouo A., Djamouko-Djonkam L., Kopya E., Bamou R., Awono-Ambene P. & Wondji C.S. (2017). Review of the evolution of insecticide resistance in main malaria vectors in Cameroon from 1990 to 2017. *Parasites & Vectors*, **10** (1): 1-12.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. & Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, **46** : 446-475.
- Benouali D. (2015). Extraction et identification des huiles essentielles. *Cours de Séparation et analyse des biomolécules, Université des sciences et de la technologie d'oran, Faculté de Chimie, Département de Chimie Physiques*, 17 p.
- Bouteille B., Danis M., Candolfi E., Chabasse D., Richard-Lenoble D., Miégeville M., ContetAudonneau N., Darde M. L., Datry A., Derouin F., Fortier B., Gangneux J. P., GayAndrieu F., Guiguen C., Izri A., Paris L. & Picot S. (2007). Enseignement de Parasitologie et Mycologie, 2ème cycle des études médicales (ANOFEL), 3ème édition *Faculté de Médecine de Nantes*, 262 p.
- Brahim A., Saadia O., Fouad M. & Saadia M. (2006). Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles de ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclini sarticulata*) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex*

- pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**(2) : 67-71.
- Brengues J. & Coz J. (1973). Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (Sp. A) et d'*Anopheles funestus* Giles, en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. *Cahier ORSTOM, série Entomologie médicale et parasitologie*, **11**(2) : 107-126.
- Brenier- Pinchart M.P. & Pelloux H. (2005). Clinique du paludisme. *Paludisme*, 99 p.
- Bruce C.L.J. & Zulueta J. (1985). Essential Malarialogy. *Heinemann medecine Books Limited*, 166-209 pp.
- Bruneton J.L. (1999). Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicales. *Technologie et Documentation. Lavoisier, Paris, France*, 1120p.
- Candido LP., Cavalcanti M.T. & Beserra EB. (2013). Bioactivity of plant extracts on the larval and pupal stages of *Aedes aegypti* (Diptera Culucidae). *Revis da Soc. Brasil. de Med. Trop.*, 46(4): 420-425.
- Carnevale P., Robert V., Manguin S., Corbel V., Fontenille D., Garros C. & Rogier C. (2009). Les anophèles biologie, transmission du plasmodium et lutte antivectorielle. *IRD Edition Marseille 2009*, 402 p.
- Carnevale P., Trari B., Izri A. & Manguin S. (2012). Les cinq piliers de la protection familiale et personnelle de l'homme contre les moustiques vecteurs d'agents pathogènes. *Médecine et Santé Tropicale*, **22** (1): 13-21.
- Chabasse D., Danis M., Guigen C., Richard - Lenoble D., Botterel F. & Miégeville M. (2007). Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales « Connaissances et pratiques» (ANOFEL). *Réussir les Epreuves Classiques Nationales, Elsevier Masson*, 331 p.
- Chiasson H. & Beloin N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides nouveaux. *Revue de littérature. Bulletin de la société d'entomologie du Quebec. Antennae*, **14**(1): 3-6.
- Coetzee M., Craig M. & Le Sueur D. (2000). Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitology Today* **16**: 74-77.
- Coetzee M., Hunt R.H., Wilkerson R., Torre A.D., Coulibaly M.B. & Besansky N.J. (2013). *Anopheles coluzzii* and *Anopheles amharicus*, new members of the *Anopheles gambiae* complex. *Zootaxa*, **3619** (3) :246-274.
- Cox-Singh (2008). Le paludisme à *Plasmodium knowlesi* est largement répandu et potentiellement mortel CID. *Malaisie/Australie/London School*, **46** : 165–171.
- Coz J. & Hamon J. (1967). Recherche d'insecticide opérationnel en matière de lutte antipaludique. *Medical and veterinary Entomology* **1**: 109-119.
- Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A. (2008) Atelier santé et environnement; risque et bénéfices possibles des huiles essentielles. (AFSSAPS) *Ingénierie du Génie Sanitaire-École des Hautes Études de Santé Publique (IGS-EHESP)*, 94 p.
- Ekodeck, G. E. & Beyala, V. K. (2002). L'altérologie Normative et ses applications. Une expression particulière des roches aluminosilicatées du point de leur évolution supergène. *Presse Universitaire de Yaoundé*, 231 p.
- Eman E. A., Reham M. S. & Salah S. A. (2013). Plant Growth and Essential Oil Production of Sage (*Salvia officinalis* L.) and Curly- Leafed Parsley (*Petroselinum crispum* ssp.

- Crispum L.) Cultivated under Salt Stress Conditions. *World Applied Sciences Journal*, **28**(6): 785-796.
- EPHTA. (1996). IITA dans les Villages: Quelques Données de l'Enquête Agricole dans les Villages de Recherche. *Ecoregional Program for the Humid & Sub-humid of SubSaharian Africa, Ibadan, Nigeria*, 11 p.
- Fatoumata D. (2002). Sensibilité des vecteurs du paludisme aux DDT et aux pyréthrynoïde de synthèse préconisé pour l'imprégnation au Mali. *Thèse*, 144 p.
- Foko Dadji G.A (2007). Effet insecticide de certaines plantes sur les différents stades de développement de *Anopheles gambiae* Giles (Diptera: Culicidae), vecteur du paludisme. *Thèse Ph.D, Université de Yaoundé, Cameroun*, 307 p.
- Foko Dadji G.A., Tamesse J.L. & Messi J. (2007). Insecticidal effects of *Capsicum annuum* on *Anopheles gambiae* Giles under laboratory conditions. *Journal of Entomology*, **4**(4): 299-307.
- Foko Dadji G.A., Tamesse J.L. & Boyom F.F. (2011). Adulticidal effects of essential oils extracts from *Capsicum annuum* (Solanaceae) *Piper nigrum* (Piperaceae) and *Zingiber officinale* (zingiberaceae) on *Anopheles gambiae* (Diptera-Culicidae) vector of malaria. *Journal of Entomology*, **8** (2): 152–163
- Foko Dadji G.A., Nyegue M., Tsila G., Awono Ambene P.H., Ndong Massouka P. & Tamesse J. (2016a). Chemical Composition and Ovicidal, Larvicidal and Pupicidal Activity of *Ocimum basilicum* Essential Oil against *Anopheles gambiae*. (Diptera: Culicidae). *European Journal of Medicinal Plants*, **16** (3): 1-13.
- Foko Dadji G.A., Maximilienne A. & Tamesse J.L. (2016b). Effet insecticide de l'huile essentielle des graines d'*Aframomum sulcatum* (Oliv. & D. Hanb. Ex Baker) K. Schum sur les stades aquatiques de *Anopheles gambiae* Giles 1902, vecteur du paludisme. *Syllabus Review*, **6**: 69 – 80.
- Foko Dadji G.A., Zebase M., Zeukeng F. ; Nyegue M.A. & Tamesse J.L. (2017). Susceptibility of aquatic stages of *Anopheles gambiae* sensu lato to *Capsicum annuum* (red pepper) fresh fruits essential oil. *Journal of scientific research and studies*, **4**(11): 333-339.
- Foko Dadji G.A., Tamesse J.L., Nyegue M.A. & Bobo N.M.P. (2018). Chemical composition and biocide properties of *Clausena anisata* (Rutaceae) essential oil against developmental stages of the malaria vector *Anopheles coluzzii*. *American journal of essential oils and natural products*, **6**(1):09-15.
- Fontenille D., Cohuet A., Awono-Ambene P.H., Antonio-Nkondjio C., Wondji C. & Kengne P. (2003). Systematics and biology of *Anopheles* vectors of *Plasmodium* in Africa. *Médecine Tropicale*, **63** :247-253.
- Fontenille D. (2008). Ecosystèmes, entomologie et lutte anti-vectorielle. *Responsabilité & environnement*, **51** : 55-61.
- Fouet C. (2010) Polymorphisme chromosomique et adaptation à l'aridité chez *Anopheles gambiae* sensu stricto. *Thèse Doctorat/PHD, École Nationale Vétérinaire d'Alfort, Faculté de Médecine de Créteil*, 66 p.
- Franqueville A., Champaud J. & Elingui H. (1971). Dictionnaire des villages du Moundou. Yaoundé: ORSTOM, 33p.

- Gu W. & Novak R. (2009). Agent-based modelling of mosquito foraging behaviour for malaria control. *Malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg*, **103**(11): 1105-1112.
- Gu W., Regens J., Beier J. & Novak R. (2006) Source reduction of mosquito larval habitats has unexpected consequences on malaria transmission. *Academic Science* **103**: 17560-17563.
- Guigen C., Chabasse D., Simitzi L., Goullier F. & Dei C. (1990). Parasitologie et mycologie, laboratoire de parasitologie, *Faculté de Médecine de Rennes-France 4e édition*, pp. 226-245.
- Harbach R. E. (2004). The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetics relationships. *Bulletin of Entomological Research* **94**: 537-553.
- Haggerty A. (2011) *Piper nigrum* taxonomy. *edu /bio203*, 11 p.
- ²Hunt R., Coetzee M. & Fettene M. (1998). The *Anopheles gambiae* complex: a new species from Ethiopia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **92**: 231-235.
- Impact malaria (2008). World Malaria Report. *Genève, Suisse*, pp. 27-48.
- Jazet D.P.M., Keumedjio F., Boyom F.F., Ngadiui B.T. & Amvam Z.P.H. (2002). Essential oils from *Croton Zambesicus* Muel .Arg. growing in Cameroon. *Flavour and fragrance journal*, **17**(3): 215-217.
- Kapoor I. P. S., Singh B., Singh G., De Heluani C.S., De Lampasona M.P. & Catalan C.A.N. (2009). Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*). *J. Agric. Food Chem*, **57** : 5358–5364.
- Khadija R. (2002) Étude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum*. *Thèse de Doctorat National. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah*, 155 p.
- Keiser J., Singer B.H. & Utzinger J. (2005). Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Distribution* **5**(11): 695-708.
- Kemabonta K.A., Adediran O.I. & Ajelara K.O. (2018). The Insecticidal Efficacy of the Extracts of *Piper nigrum* (Black Pepper) and *Curcuma longa* (Turmeric) in the Control of *Anopheles gambiae* Giles (Dip., Culicidae). *Jordan Journal of Biological Sciences*, **11**(2): 195- 200.
- Killeen, Mckenzie F., Foy B., Bogh C. & Beier C. (2001). The availability of potential hosts as a determinant of feeding behaviours and malaria transmission by African mosquito populations. *Malaria*, **95**: 469-476.
- Koua H. K., Han S.H. & D'almeida M-A. (1998). Histopathologie d'*Anopheles gambiae* s.l. Giles, 1902(Diptera, Culicidae) soumis à l'activité de l'extrait acqueux de *Persea americana* Miller, 1978(laureaceae). *Entomologie médicale*, **91**(3): 252-256.
- Kovendan K., Murugan K., Mahesh Kumar P., Thiyagarajan P. & John William S. (2013). Ovicidal, repellent, adulticidal and field evaluations of plant extract against dengue, malaria and filarial vectors. *Parasitology Research*, **112** (3) : 1205-1219.
- Kumar R. (1991). La lutte contre les insectes ravageurs. *Karthala et CTA, Paris*, 311 p.
- Laveran A. (1880). Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. *CR Acad Sc*, **92**. 1268 p.

- Legner E. (1995). Biological control of Diptera of medical and veterinary importance. *Journal of Vector Ecology*, **20**: 59-120.
- Leke R.G.F., Wilfried F., Mbacham. & Tallah E.T.N. (2010). Guide pratique de lutte contre le paludisme. *Etudes Africaines, Harmattan*, **24**:27.
- Maistre J. (1964). Les plantes à épices : techniques agricoles et productions tropicales. *Maisonneuve & Larose*, **3** : 249-262.
- Marimuthu G. (2010). Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oil from *clausena anisata* (Willd.) Hook. *Journal Asian-Pacific Entomology*, pp. 874-877.
- Meryem A. B. (2009). Activités larvicides des extraits de plantes sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires. *Master Sciences et Techniques de l'Université de Fès*, 64 p.
- Minsante (2011). Plan stratégique national de lutte contre le paludisme. Yaoundé : Ministère de la Santé publique du Cameroun, 2011-2015, 82p.
- Mouchet J. & Carnevale P. (1991). Les Vecteurs et la Transmission. Paludisme. *Médecine tropicale, Ellipses* ; pp. 35-53.
- Mouchet J. & Blanchy S. (1995). Particularités et stratification du paludisme à Madagascar. *Santé : Cahier d'Etudes et de Recherches Francophone*, **5**(6) : 386-388.
- Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Lenoble R. D. & Sircoulou J. (2004). Biodiversité du paludisme dans le monde. *Editions John Libbey Euronext. Paris*, 428 p.
- Murugan K., Murugan P. & Northeen A. (2007). Larvicidal and repellent potential of *Albizia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector: *Aedes aegypti*. *Boiresource Technology*. 2007; **98**(1): 198-201.
- Mutero C., Blank H., Konradsen F. & Van Der Hoek W. (2000). Water management for controlling the breeding of *Anopheles* mosquitoes in rice irrigation schemes in Kenya. *Acta Tropical*, **76**: 253-263.
- Olivry, J. C. (1986). Fleuves et rivières du Cameroun. *Paris: MESRES-ORSTOM*, 781 p.
- Ombito O.J., Matasyoh C., Josphat. & Vuvule M. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum gillettii* essential oil against *Anopheles gambiae*. *African. Journal of Biotechnology*, **13**: 2175-2180.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé) (1999). La lutte antivectorielle : Méthodes à usage individuel et communautaire. Chapitre 1 : Moustique et autres diptères piqueurs. *OMS, Genève, Suisse*, pp. 9-194.
- OMS. (2000) Paludisme à *Plasmodium falciparum*. Comité d'experts sur le paludisme, série des rapports technique (i-v), 892 p.
- OMS (2003) Entomologie du paludisme et contrôle des vecteurs ; Guide du stagiaire. Mobilisation sociale et formation ; département du contrôle, de la prévention et de l'éradication ; groupe des maladies transmissibles, *Edition provisoire Partie I*, 102 p.
- OMS. (2005) Procédure pour tester la résistance aux insecticides chez les moustiques, vecteurs du paludisme. *Genève*, 55 p.
- OMS. (2012). Répartition géographique du paludisme, santé et prévention. ICAR. France, 23 p.
- OMS. (2015). Stratégie Technique de lutte contre le Paludisme 2016-2030. Genève, Suisse, 33 p.
- OMS (2016). Rapport sur le paludisme dans le monde. Résumé, 24 p.

- OMS (2018) Rapport sur le paludisme dans le monde 2018, 210 p.
- Padrini F., & Lucheroni M.T. (1996). Le grand livre des huiles essentielles, 212 p.
- Pages F., Orlandipradines E. & Corbel V. (2007). Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **37** (3) : 153-161.
- Pham J. (2007). *Piper nigrum* L: aspect botanique, chimique et pharmacologiques **51** :13-21.
- Pruthi J.S. (1980). Speces and condiments: chemistry, microbiology, technology. *Advances in food research*, **4**: 1- 449.
- PNLP (Programme National de Lutte contre le Paludisme) (2012). Rapport d'activité 2011, Yaoundé-Cameroun, 82 p.
- Resh V.H. & Cardé R.T. (2003). The Encyclopedia of insects. *Academic press*, 1203 p.
- Ribeiro T.S., Freire-de-Lima M.E., Freire-de-Lima L., Previato J.O., Mendonca- Previato L. & Heise N. (2004). Toxic effet of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal chemistry Letters*, **14**: 3555-3558.
- Rhodain F. & Perez C. (1985). Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. *Maloine, Paris*, 458 p.
- Roulier G. (1992) Les huiles essentielles pour votre santé. Traité pratique d'aromathérapie: Propriétés et indications thérapeutiques des essences de plantes. *Edition Dangles, France*, 125p.
- Ross R. (1897). On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed of malarial blood. *The British medical journal*, 1788 p.
- Sabrina A. & Kaufman E. (2014). African malaria mosquito *Anopheles gambiae* Giles (Insecta: Diptera: Culicidas), pp. 1-4.
- Sayah M.H., Chahdi O.F., El Kandri R.H., Lalami O.E.A., Greech H. & Errachidi F. (2014). Activité larvicide des extraits de plantes aromatiques sur les larves de moustiques vecteurs de maladies parasitaires. *Internationnal journal of innovation and applied studies*. **7**(3): 832-842.
- Santoir, C. & Bopda A. (1995). Atlas régional Sud- Cameroun : *Office de la recherche Scientifique et Technique Outre- Mer : Paris*, 53 p.
- Selvendiran K., Banu S.M. & Sakthisekaran D. (2005). Oral supplementation of piperine leads to altered phase II enzymes and reduced DNA damage and DNA-protein cross links in Benzo(a)pyrene induced experimental lung carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **268**:141- 147.
- Tchoumboungang F., Sameza M.L., Mbanjo E., Tiako F., Dongmo J.P.M., Amvam Z.P. & Menut C. (2009). Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**(1) : 77-84.
- Tchoumboungang F., Sameza M., Wouatsa N.A.V., Fombotioh N., Jazet D.P.M., Amvam Z.P. & Menut C. (2009). Comparative essential oils composition and insecticidal effect of different tissues of *Piper capense* L., *Piper guineense* Schum et Thonn., *Piper nigrum* L. and *Piper umbellatum* L. grown in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, **8**(3): 424-431.

- Thuy H.T., Shamilah H., Marta v, Adela I.J., Norparina I. & Jose M.R. (2014). First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. *Central Malaria Journal*, **13**(1): 68.
- Toto J.C., Besnard P., Le Mire J., Almeida D.S.I., Dos Santos M.A., Fortes F., Foumane V., Simard F., Awono-Ambene H.P. & Carnevale P. (2011) Premiers tests OMS d'évaluation de la sensibilité aux insecticides chez *Anopheles gambiae* et *Culex quinquefasciatus* à Lobito, Angola. *Bulletin de la Société Pathologique et Exotique*, **104** (4): 307-312.
- Vantaux A., François de Sales Hien D., Yameogo B., Dabiré K.R., Thomas F., Cohuet A. & Lefèvre T. (2015). Host-seeking behaviors of mosquitoes experimentally infected with sympatric field isolates of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* : no evidence for host manipulation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **3**. 86 p.
- Vogel G. & Angermann H. (1994) Atlas de la biologie. *Librairie générale française*, 641 p.
- Wahundeniya I. (1990). Effect of botanicals on the control of potato tuber moth (*phthorimaeae perculia*) in storage. *Integrate Pest Management of Tropical and Subtropical. Crops System* **3**: 999-1012.
- Weimin L., Yingying L., Learn G H., Rudicell R S., Robertson J D., Keele B F., Njanga J B D., Sanz C M., Morgan D B., Locatelli S., Gonder M K., Kranzusch P J., Walsh PD., Delaporte E., Mpoudi-Ngole E., Georgiev A V., Muller M N., Shaw G M., Peeters M., Sharp P M., Rayner J C. & Hahn B H. (2010). Origin of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *HHS Author Manuscripts*, **467**(7314): 420-425.
- WHO (World Health Organisation). (2007). WHO recommended insecticide products treatment of mosquito nets for malaria vector control, 43 p.
- Wondji C., Bigoga J., Tchuinkam T., Fokam E.B., Tabue R., Antonio N., Awono A.P., Ndo C., Nwane P., Tene F.B., Foko D.G., Elanga N.E., Fodjo A.B., Mbida M.A., Atangana J., Esemu F.L., Patchoke S., Piamieu C., Toto J.C., Zeukeng F. & Nguimdo C. (2018). Profil entomologique du paludisme au Cameroun, pp. 14-33.