



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude des moustiques anthropophiles de France : le cas particulier du genre *Coquillettidia*.

Julien Sérandour

## ► To cite this version:

Julien Sérandour. Contribution à l'étude des moustiques anthropophiles de France : le cas particulier du genre *Coquillettidia*.. Ecologie, Environnement. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00436245

**HAL Id: tel-00436245**

**<https://theses.hal.science/tel-00436245>**

Submitted on 26 Nov 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE  
Pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I  
Spécialité : BIOLOGIE

**Contribution à l'étude des moustiques anthropophiles de France :  
le cas particulier du genre *Coquillettidia*.**

Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2007  
Par

Julien Sérandour

Composition du jury :

Brigitte Frérot (Ingénieur de Recherche, INRA Versailles), rapporteur  
Philippe Sabatier (Pr, Ecole Vétérinaire, Lyon), rapporteur  
Muriel Raveton (MCF, Grenoble I), directeur de thèse  
Guy Lempérière (PAST, Caen), directeur de thèse  
Cécilia Claeys-Mekdade (MCF, Aix-Marseille III), examinateur  
Patrick Ravanel (Pr, Grenoble I), examinateur  
Philippe Saglio (Ingénieur de Recherche, INRA Rennes), examinateur  
Francis Schaffner (Entomologiste, Zürich), examinateur  
Rémi Foussadier (Dr. EID Rhône-Alpes), examinateur

Thèse préparée au Laboratoire d'Ecologie Alpine (UMR UJF-CNRS 5553) en partenariat  
avec l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication Ain, Isère, Rhône, Savoie

## Remerciements

Cette thèse n'est pas seulement le fruit de mon travail ; elle est le résultat d'un travail d'équipe, de concertations, conseils, critiques ; elle est ce qu'elle est aujourd'hui parce que des personnes y ont cru, et m'ont soutenu. Je tiens donc à remercier :

Jean-Claude Meyran, initiateur de ce travail, qui a fait confiance à un jeune breton descendu dans les Alpes en 2003, et à qui j'aurais aimé présenter l'ampleur de ces résultats, cet aboutissement.

Muriel Raveton et Guy Lempérière, qui ont repris la direction de ma thèse dans des circonstances difficiles, mais qui n'ont pas cessé de m'y faire croire, et m'ont donné un nouveau départ. Muriel, toujours disponible pour échanger sur les dernières avancées, pour me conseiller sur les différentes étapes de ce travail, et sans qui ces résultats n'auraient pas autant de valeur à mes yeux. Guy, dont l'expérience et le recul ont permis de recadrer ce sujet de thèse et d'en donner les grandes orientations. Toujours d'une bonne humeur contagieuse, qui me regonflait quand j'étais dans le creux de la vague (les vertus de l'humour anglais ?). Merci aux directeurs de la thèse et aux amis que vous êtes.

Patrick Ravanel, directeur de l'équipe de recherche PEX, qui m'a accueilli et a toujours répondu présent quand j'en avais besoin : un coup de main sur le terrain, l'expérience et les conseils, le soutien moral et financier, autant d'éléments essentiels pour moi et pour ma thèse.

Les membres du jury, Brigitte Frérot, Philippe Sabatier, Cécilia Claeys-Mekdade, Philippe Saglio, Francis Schaffner, Rémi Foussadier pour avoir accepté de juger mon travail.

L'Entente Interdépartementale pour la Démoustication, par l'intermédiaire de son directeur, Rémi Foussadier, et de son personnel, Delphine, Gilles... qui a souhaité que cette thèse se fasse, et l'a permis grâce à un soutien financier, scientifique et technique. L'EID qui m'a personnellement soutenu financièrement pendant 3 ans, soutien sans lequel cette thèse n'aurait pu voir le jour.

L'Office Pour les Insectes et leur Environnement, le Réseau national "*Oiseaux & Zones humides*" O.N.C.F.S./F.N.C./F.D.C., qui ont permis par leur collaboration le bon déroulement de cette thèse.

Joëlle et Thierry, dont la collaboration technique a été plus qu'appréciable, indispensable au bon déroulement des expériences, et avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments.

Tous les amis qui ont contribué à ce travail, parce qu'un jour ils sont venus frapper à ma porte pour me demander un stage de recherche... C'est Franck, Momo, Nelly, Sébastien, Benoît, Thomas, Marrouann, Pierre et Guillaume qui ont posé les premières pierres et à qui ce travail appartient aussi un peu.

Stéphane, qui est un peu mon stagiaire mais surtout un ami, qui a permis à un volet de ma thèse de se développer ; pour les heures passées en manip, à faire des stats, ou à boire un café, merci !

Les chercheurs avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler, à échanger, sur ma problématique et même plus, Cécilia, Jacky, Lucile, Jérôme, Jean-philippe, Michel...

Les amis du labo, ceux qui sont partis avant moi, mais qui m'ont énormément apporté sur le plan personnel et qui ont été de bon conseil pendant ces 4 (5 ?) années. Merci Seb, Mathieu, PF, Fred, Pierrot, Nico, Junior, Cyrille, Jean-Marie, Grande Flo, Eva, Aurelie, Amandine...

Merci aussi à ceux qui restent après moi, mais dont le tour viendra : Petite Flo, Abdé, Fabrice, Ozgür, Mick, Angelique, Rodolphe...Merci à mon informaticien préféré, Olivier.

Merci aux potes du foot, de la pétanque, du bad, et à ceux qui ne font pas de sport !

Merci enfin à Anne-Laure, mes parents et mes petites sœurs, dont le soutien a compté plus que tout, même si ça a été long pour eux aussi...

## **Contribution à l'étude des moustiques anthropophiles de France : le cas particulier du genre *Coquillettidia*.**

Les principaux enjeux de la gestion des moustiques en France sont la prévention des risques vectoriels et le contrôle de la nuisance. A travers une étude historique sur la transmission du paludisme dans les vallées alpines, nous avons démontré que les aménagements hydrauliques devaient être considérés comme des facteurs à risque pour le développement de maladies vectorielles.

L'estimation de la nuisance perçue permettrait d'adapter le contrôle des moustiques aux attentes de la population. L'expérience de deux enquêtes sociologiques a conduit à poser les bases d'un observatoire de la nuisance, qui emploierait conjointement et régulièrement les outils sociologiques et les échantillonnages sur le terrain, pour une démoustication raisonnée.

Les moustiques du genre *Coquillettidia* représentent une nuisance mais sont inefficacement contrôlés, les larves vivant fixées aux racines des végétaux en profondeur, à l'abri des traitements. A l'issue d'une vaste étude de terrain, une liste d'indicateurs écologiques caractéristiques des gîtes larvaires à *Coquillettidia* a été dressée pour faciliter leur localisation. La nature des plantes aquatiques et la présence de kairomones (p-crésol, acides laurique et heptadécanoïque), le courant, la salinité, la turbidité, la pérennité de la pièce d'eau et son entretien, sont très probablement impliqués dans le choix des gîtes colonisés par ces moustiques.

Des tests comportementaux couplés à des analyses chimiques en laboratoire ont permis de déterminer les mécanismes gouvernant la fixation des larves aux racines, dont dépend leur survie. Nous avons mis en évidence l'implication de substances allélochimiques généralistes (glycérol, uracile, thymine, uridine et thymidine) dans la reconnaissance des plantes hôtes par les larves. L'influence de l'intensité lumineuse, de la teneur en oxygène de l'eau, et de la morphologie des racines sur le comportement de fixation a été démontrée.

Enfin une stratégie larvicide adaptée à l'écologie particulière de *Coquillettidia* a été mise au point. Nous avons prouvé que des plantes aquatiques pouvaient acheminer un insecticide systémique, le diméthoate, par voie phloémienne jusqu'aux racines, et libérer des composés toxiques au contact des larves. La fixation est fortement perturbée (- 85%), ce qui amplifie l'efficacité de cette stratégie.

## **Contribution to French anthropophilic mosquitoes study : the particular cases of the genus *Coquillettidia***

Mosquito pest and disease vector populations are the main purposes of mosquito control and monitoring in France. In an historical study on malaria transmission in Alpine valleys, we pointed out that hydraulic developments should be considered as risk factors for vector-borne disease outbreaks.

The evaluation of public perception of mosquito nuisance could help to adapt insecticidal treatments to people's expectations. Experience achieved in two sociological studies led us to propose the establishment of a mosquito pest survey based on the regular and combined uses of sociological tools and field sampling.

*Coquillettidia* mosquitoes are a major nuisance and are difficult to control, since larvae live in a protected and deep habitat, attached to plant roots for their oxygen supply. The results of a large field study allowed us to inventory ecological indicators of *Coquillettidia* breeding sites, that can help to locate them. Aquatic plant species and kairomones emission (p-cresol, lauric and heptadecanoic acids), water flow, salinity, turbidity, persistence of standing waters and impact of human operations must be involved in the choice of the breeding sites by these mosquitoes.

Behavioral tests combined with chemical analysis enabled us to identify the mechanisms governing larval behavior of attachment to roots, determinant for their survival. It is proved that generalist semiochemicals (glycerol, uracil, thymine, uridine and thymidine) are involved in the host-plant identification by swimming larvae. Light intensity, oxygen concentration of water and roots morphology are also influencing larval attachment.

Finally, a larvicidal strategy specially adapted to larval *Coquillettidia* ecology was set up. The capacity of aquatic plants to transport the systemic insecticide dimethoate via the phloem to the roots, and to release toxic compounds in larval surroundings has been proven. The high diminution (-85%) of larval attachment abilities increases the efficiency of this strategy.

## Remerciements

Cette thèse n'est pas seulement le fruit de mon travail ; elle est le résultat d'un travail d'équipe, de concertations, conseils, critiques ; elle est ce qu'elle est aujourd'hui parce que des personnes y ont cru, et m'ont soutenu. Je tiens donc à remercier :

Jean-Claude Meyran, initiateur de ce travail, qui a fait confiance à un jeune breton descendu dans les Alpes en 2003, et à qui j'aurais aimé présenter l'ampleur de ces résultats, cet aboutissement.

Muriel Raveton et Guy Lempérière, qui ont repris la direction de ma thèse dans des circonstances difficiles, mais qui n'ont pas cessé de m'y faire croire, et m'ont donné un nouveau départ. Muriel, toujours disponible pour échanger sur les dernières avancées, pour me conseiller sur les différentes étapes de ce travail, et sans qui ces résultats n'auraient pas autant de valeur à mes yeux. Guy, dont l'expérience et le recul ont permis de recadrer ce sujet de thèse et d'en donner les grandes orientations. Toujours d'une bonne humeur contagieuse, qui me regonflait quand j'étais dans le creux de la vague (les vertus de l'humour anglais ?). Merci aux directeurs de la thèse et aux amis que vous êtes.

Patrick Ravanel, directeur de l'équipe de recherche PEX, qui m'a accueilli et a toujours répondu présent quand j'en avais besoin : un coup de main sur le terrain, l'expérience et les conseils, le soutien moral et financier, autant d'éléments essentiels pour moi et pour ma thèse.

Les membres du jury, Brigitte Frérot, Philippe Sabatier, Cécilia Claeys-Mekdade, Philippe Saglio, Francis Schaffner, Rémi Foussadier pour avoir accepté de juger mon travail.

L'Entente Interdépartementale pour la Démoustication, par l'intermédiaire de son directeur, Rémi Foussadier, et de son personnel, Delphine, Gilles... qui a souhaité que cette thèse se fasse, et l'a permis grâce à un soutien financier, scientifique et technique. L'EID qui m'a personnellement soutenu financièrement pendant 3 ans, soutien sans lequel cette thèse n'aurait pu voir le jour.

L'Office Pour les Insectes et leur Environnement, le Réseau national "*Oiseaux & Zones humides*" O.N.C.F.S./F.N.C./F.D.C., qui ont permis par leur collaboration le bon déroulement de cette thèse.

Joëlle et Thierry, dont la collaboration technique a été plus qu'appréciable, indispensable au bon déroulement des expériences, et avec qui j'ai partagé beaucoup de bons moments.

Tous les amis qui ont contribué à ce travail, parce qu'un jour ils sont venus frapper à ma porte pour me demander un stage de recherche... C'est Franck, Momo, Nelly, Sébastien, Benoît, Thomas, Marrouann, Pierre et Guillaume qui ont posé les premières pierres et à qui ce travail appartient aussi un peu.

Stéphane, qui est un peu mon stagiaire mais surtout un ami, qui a permis à un volet de ma thèse de se développer ; pour les heures passées en manip, à faire des stats, ou à boire un café, merci !

Les chercheurs avec lesquels j'ai eu plaisir à travailler, à échanger, sur ma problématique et même plus, Cécilia, Jacky, Lucile, Jérôme, Jean-philippe, Michel...

Les amis du labo, ceux qui sont partis avant moi, mais qui m'ont énormément apporté sur le plan personnel et qui ont été de bon conseil pendant ces 4 (5 ?) années. Merci Seb, Mathieu, PF, Fred, Pierrot, Nico, Junior, Cyrille, Jean-Marie, Grande Flo, Eva, Aurelie, Amandine...

Merci aussi à ceux qui restent après moi, mais dont le tour viendra : Petite Flo, Abdé, Fabrice, Ozgür, Mick, Angelique, Rodolphe...Merci à mon informaticien préféré, Olivier.

Merci aux potes du foot, de la pétanque, du bad, et à ceux qui ne font pas de sport !

Merci enfin à Anne-Laure, mes parents et mes petites sœurs, dont le soutien a compté plus que tout, même si ça a été long pour eux aussi...

## Sommaire

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
A. Les moustiques et les zones humides .....	1
B. Moustiques, risque sanitaire et nuisance .....	3
C. Le contrôle des moustiques : modalités, limites et enjeux environnementaux .....	5
D. Problématique de l'étude .....	8
<b>1<sup>ère</sup> partie : Problématique vectorielle et nuisance : des enjeux de société</b> .....	<b>10</b>
A. Prévenir le risque sanitaire : référence au passé .....	10
A.1. Matériel et méthodes .....	11
A.2. Résultats .....	13
A.2.1. Evolution démographique dans les communes de la plaine alluviale .....	13
A.2.2. Les populations d'Anophèles dans les vallées alpines .....	14
A.2.3. Relations entre conditions météorologiques et évolution démographique .....	16
A.2.4. Aménagements hydrauliques dans la vallée de l'Isère et évolution démographique .....	16
A.2.5. Aménagements hydrauliques dans la vallée de l'Arc et évolution démographique .....	19
A.3. Discussion .....	20
A.3.1. Contrôle des crues, densité des populations d'Anophèles et fluctuations démographiques .....	20
A.3.2. Un message du passé à replacer dans le contexte actuel de changement global .....	22
B. La nuisance : mieux la connaître pour mieux la contrôler .....	25
B.1. Etude sociologique sur la nuisance due aux moustiques en Rhône-Alpes .....	27
B.1.1. Méthode .....	27
B.1.2. Résultats .....	29
B.1.2.1. Perceptions et représentations associées au moustique .....	29
B.1.2.2. Perception de la nuisance due aux moustiques .....	30
B.1.2.3. Connaissance et perception sociale de la démoustication .....	33

B.2. Apports de la sociologie à la problématique biologique de démoustication.....	34
B.2.1. Le dualisme entre visions anthropocentrique et biocentrique du rapport aux moustiques .....	34
B.2.2. Dualisme anthropocentrisme / biocentrisme et démoustication .....	36
B.3. Perspectives : un projet d'observatoire de la nuisance .....	38

## **2<sup>ème</sup> partie : Biologie et contrôle des moustiques du genre**

<b>Coquillettidia .....</b>	<b>42</b>
Biologie particulière du genre <i>Coquillettidia</i> .....	45
Problématique .....	48
A. Caractérisation des gîtes larvaires .....	50
A.1. Etude bibliographique .....	50
A.1.1. Les types de zones humides colonisées par <i>Coquillettidia</i> .....	50
A.1.2. La végétation caractéristique des gîtes colonisés par <i>Coquillettidia</i> .....	55
A.2. Présentation de l'hypothèse de terrain .....	56
A.3. Matériel et méthodes .....	57
A.3.1. Localisation des gîtes étudiés .....	57
A.3.2. Caractérisation de la végétation des gîtes .....	58
A.3.3. Mesures des caractéristiques physiques des gîtes .....	59
A.3.3.1. Hauteur de la colonne d'eau .....	59
A.3.3.2. Vitesse du courant .....	59
A.3.3.3. Température .....	59
A.3.3.4. Humidité relative de l'air .....	59
A.3.4. Mesures des caractéristiques chimiques des gîtes .....	60
A.3.4.1. pH .....	60
A.3.4.2. Conductivité, salinité, oxygène .....	60
A.3.4.3. Matières en suspension .....	60
A.3.4.4. Dosage des nitrites et nitrates .....	60
A.3.4.5. Analyse chimique complémentaire .....	61
A.3.5. Prospection / échantillonnage de larves de <i>Coquillettidia</i> dans les gîtes .....	62
A.3.6. Analyses statistiques des données .....	62
A.4. Résultats .....	64
A.4.1. Distribution de <i>Coquillettidia</i> dans les stations .....	64
A.4.2. Analyse de la distribution de la végétation terrestre dans les stations .....	65

A.4.3. Analyse de la distribution de la végétation aquatique dans les stations .....	67
A.4.4. Caractéristiques physiques des stations et distribution de <i>Coquillettidia</i> .....	69
A.4.4.1. Hauteur de la colonne d'eau .....	69
A.4.4.2. Le courant .....	69
A.4.4.3. Température .....	69
A.4.4.4. Humidité relative de l'air .....	71
A.4.5. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des stations et distribution de <i>Coquillettidia</i> .....	71
A.4.5.1. Teneur en oxygène de l'eau .....	71
A.4.5.2. pH de l'eau .....	71
A.4.5.3. Conductivité et salinité de l'eau .....	72
A.4.5.4. Matières en suspension dans l'eau .....	73
A.4.5.5. Teneurs en nitrites et nitrates de l'eau .....	73
A.4.5.6. Analyse de la composition chimique de l'eau .....	74
A.5. Discussion .....	78
<b>B. Etude de la relation plante-insecte .....</b>	<b>87</b>
B.1. Introduction .....	87
B.2. Matériel et méthodes .....	89
B.2.1. Matériel animal .....	89
B.2.2. Matériel végétal .....	90
B.2.2.1. La massette : <i>Typha latifolia</i> (Linnaeus, 1753).....	90
B.2.2.2. La glycérie flottante : <i>Glyceria fluitans</i> (Linnaeus, 1810) .....	90
B.2.2.3. Le plantain d'eau lancéolé : <i>Alisma lanceolatum</i> (Withering, 1796) .....	90
B.2.2.4. Le maïs : <i>Zea mays</i> (Linnaeus, 1753) .....	90
B.2.2.5. Le tournesol : <i>Heliantus annuus</i> (Linnaeus, 1753) .....	91
B.2.3. Molécules de synthèse .....	91
B.2.3.1. Le glycérol .....	91
B.2.3.2. Les bases azotées .....	92
B.2.3.3. Les nucléosides .....	92
B.2.3.4. Autres molécules .....	92
B.2.4. Protocole d'extraction des composés racinaires de plantes .....	93
B.2.5. Protocole de récolte des exsudats racinaires des plantes .....	95
B.2.6. Traitement des échantillons de terrain .....	95
B.2.7. Analyse de la composition chimique des extraits par CPG-MS .....	95
B.2.8. Protocole de suivi du comportement de fixation des larves à un support .....	96
B.2.9. Protocole de suivi du comportement d'orientation des larves .....	97
B.2.9.1. Tests de choix en groupe, sur une longue durée .....	97
B.2.9.2. Tests de premier choix .....	99
B.2.10. Analyses statistiques.....	100



B.3. Résultats .....	101
B.3.1. Facteurs influençant la fixation des larves .....	101
B.3.1.1. Influence de l'intensité lumineuse .....	101
B.3.1.2. Influence de la couleur du substrat .....	102
B.3.1.3. Influence de la teneur en oxygène de l'eau .....	102
B.3.1.4. Influence du diamètre des racines .....	103
B.3.1.5. Discussion .....	104
B.3.2. Nature du signal impliqué dans l'orientation des larves vers les racines .....	106
B.3.2.1. Hypothèse n°1 : Les larves répondent à des stimuli visuels .....	106
B.3.2.2. Hypothèse n°2 : Les larves répondent à des stimuli chimiques .....	107
B.3.2.3. Hypothèse n°3 : Les stimuli chimiques sont spécifiques d'un genre végétal .....	107
B.3.2.4. Hypothèse n°4 : Les tissus racinaires contiennent des substances chimiques attractives .....	108
B.3.2.5. Hypothèse n°5 : Les exsudats racinaires sont attractifs .....	109
B.3.2.6. Hypothèse n°6 : Les échantillons de terrain sont attractifs .....	110
B.3.2.7. Discussion .....	111
B.3.3. Identification des médiateurs chimiques impliqués dans cette relation plantes-larves .....	113
B.3.3.1. Analyse de la composition chimique d'extraits naturels attractifs .....	113
B.3.3.2. Réponse des larves à un screening de molécules de synthèse .....	115
B.3.3.3. Discussion .....	117
B.3.4. Complexité du signal chimique attractif pour les larves de <i>Coquillettidia</i> .....	119
B.3.4.1. Evaluation de la relation dose / effet pour les composés attractifs .....	119
B.3.4.2. Concentrations des composés attractifs dans les extraits de plantes .....	121
B.3.4.3. Réponse des larves à un assemblage de molécules attractives .....	122
B.3.4.4. Discussion .....	125
C. Mise au point d'une stratégie larvicide contre <i>Coquillettidia</i> .....	130
C.1. Synthèse bibliographique .....	130
C.1.1. Moyens de lutte contre les populations larvaires de <i>Coquillettidia</i> .....	130
C.1.1.1. Les moyens de lutte chimiques .....	130
C.1.1.2. Les moyens de lutte biologiques .....	132
C.1.1.3. Les moyens de lutte par action sur le milieu .....	133
C.1.2. Moyens de lutte contre les populations adultes de <i>Coquillettidia</i> .....	134
C.2. Hypothèse d'un contrôle anti-larvaire via le couvert végétal .....	135
C.2.1. Mécanismes de pénétration foliaire d'une substance organique exogène .....	135
C.2.2. Transport dans les tissus conducteurs de la plante .....	137
C.2.3. Libération par les racines dans l'environnement .....	138
C.2.4. Présentation de la démarche expérimentale .....	139
C.3. Matériel et méthodes .....	140
C.3.1. Molécules de synthèse .....	140

C.3.1.1. Le mannitol .....	140
C.3.1.2. Le 2,4-D .....	140
C.3.1.3. Le glyphosate .....	141
C.3.1.4. Le méthyl-parathion .....	141
C.3.1.5. Le diméthoate .....	142
C.3.2. Matériel végétal .....	142
C.3.2.1. Le maïs .....	142
C.3.2.2. La massette .....	143
C.3.3. Matériel animal .....	143
C.3.3.1. <i>Coquillettidia richiardii</i> .....	143
C.3.3.2. <i>Aedes aegypti</i> .....	143
C.3.4. Protocole de suivi de l'acquisition d'un xénobiotique par des larves de moustiques .....	143
C.3.5. Protocole des tests toxicologiques sur larves de moustiques .....	144
C.3.6. Protocole d'extraction des xénobiotiques des plantes .....	144
<b>C.4. Résultats .....</b>	<b>146</b>
C.4.1. Mise au point du protocole de traitement des plantes .....	146
C.4.1.1. Choix des conditions de traitement .....	146
C.4.1.2. Screening de différents xénobiotiques candidats au transfert phloemien .....	148
C.4.1.3. Transfert phloemien du glyphosate et du diméthoate dans une plante aquatique .....	154
C.4.1.4. Discussion .....	157
C.4.2. Mise au point de la stratégie larvicide avec un insecticide systémique .....	161
C.4.2.1. Mise en évidence de l'effet larvicide du diméthoate .....	161
C.4.2.2. Mise au point du protocole de la stratégie larvicide avec le diméthoate .....	163
C.4.2.3. Discussion .....	167
C.4.3. Influence du traitement des plantes au diméthoate sur la fixation de larves de <i>Coquillettidia</i> .....	169
C.4.3.1. Influence du traitement des plantes sur l'orientation des larves de <i>Coquillettidia</i> .....	170
C.4.3.2. Influence du traitement des plantes sur la fixation des larves de <i>Coquillettidia</i> .....	171
C.4.3.3. Discussion .....	171
C.4.4. Perspectives d'utilisation de la stratégie insecticide pour le contrôle de <i>Coquillettidia</i> .....	172
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>175</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>179</b>
<b>Table des figures</b>	
<b>Tables des tableaux</b>	

## Introduction générale

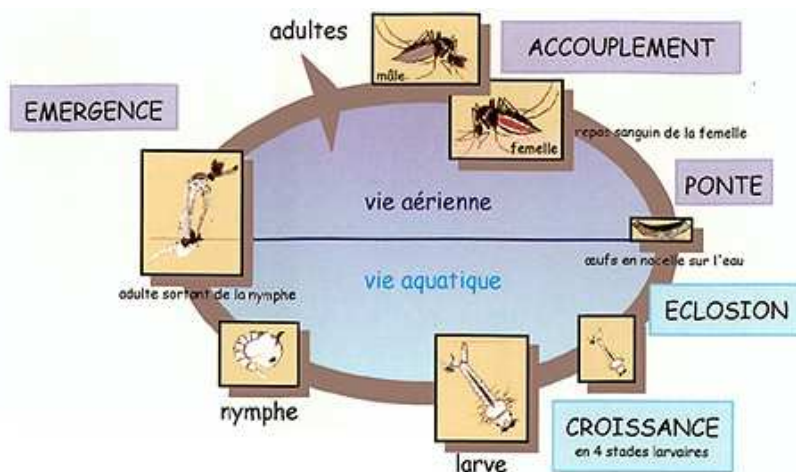
### **A. Les moustiques et les zones humides**

Les moustiques font partie de la classe des Hexapodes et de l'ordre des Diptères (les adultes ne possèdent qu'une paire d'ailes), le deuxième ordre en nombre d'espèces (plus de 250 000) après celui des Coléoptères. Les moustiques appartiennent à la famille des Culicidés qui compte de part le monde environ 3500 espèces et sous-espèces.

L'écologie des moustiques est étudiée depuis longtemps et les mœurs de nombreuses espèces ont été décrites dans la littérature (Gillett, 1971 ; Service, 1993 ; Schaffner *et al.*, 2001). Dans la bibliographie, les études concernant les moustiques et leurs habitats ont toutes pour objet l'étude du vecteur, au mieux du nuisible ; l'insecte n'est présenté comme indicateur de biodiversité que dans de rares ouvrages (Schäfer, 2004 ; Willott, 2004). Une approche récente du sujet propose de classer les espèces de moustiques en groupes fonctionnels, selon leurs caractéristiques biologiques (Schäfer *et al.*, 2004 ; Pradel *et al.*, 2007). Cette classification en fonction des traits d'histoire de vie des espèces permet de donner des informations relatives à la biodiversité des zones humides échantillonnées.

La Convention de Ramsar relative aux zones humides d'importance internationale (1971) définit ces milieux comme « des étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douce, saumâtre ou salée, y compris des étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres ». Hormis dans les eaux courantes et salées, on retrouve des moustiques dans tous les types de zones humides correspondant à cette définition. Les zones humides ont été assainies en nombre ces dernières décennies, parce qu'elles étaient un frein à l'agriculture et à l'urbanisation, mais aussi parce que fréquentées par les moustiques, elles étaient associées aux nuisances et aux maladies. Aujourd'hui, une prise de conscience générale a émergé qui a permis d'attribuer aux zones humides des statuts de milieux remarquables, protégés par des lois : Convention de Ramsar (1971), Directives Européennes Oiseaux (1979) et Habitats (1992). Pour autant, leur gestion reste par endroits sujette à controverses, car elle profite aux populations de moustiques qui prolifèrent.

Les moustiques sont présents sur tous les continents sauf en Antarctique, à proximité de pièces d'eau stagnante, nécessaires au développement des stades immatures (Lehane, 1991 ; Clements, 1999). Les femelles déposent leurs œufs soit directement à la surface de l'eau, c'est le cas des genres *Anopheles* (Meigen, 1818) et *Culex* (Linnaeus, 1754) par exemple, soit sur un substrat humide dont l'inondation permettra l'éclosion, c'est le cas des genres *Aedes* (Meigen, 1818) et *Ochlerotatus* (Lynch Arribalzaga, 1891). Les individus immatures passent par quatre stades de développement larvaire successifs, qui se nourrissent principalement de microorganismes, algues et détritus. Ils respirent à la surface de l'eau l'oxygène aérien, sauf pour les genres *Coquillettidia* (Dyar, 1905) et *Mansonia* (Blanchard, 1901) qui puisent l'oxygène circulant dans les racines de certaines plantes aquatiques. Après un stade nymphal de transformation complète de l'organisme (insecte holométabole), l'imago émerge pour investir le milieu aérien (figure 1). Les adultes se nourrissent de nectar de plantes, et après accouplement la femelle recherche un animal vertébré pour effectuer un repas de sang nécessaire au développement des œufs (les femelles de certaines espèces peuvent toutefois pondre sans avoir pris de repas de sang, il s'agit alors d'une ponte autogène).



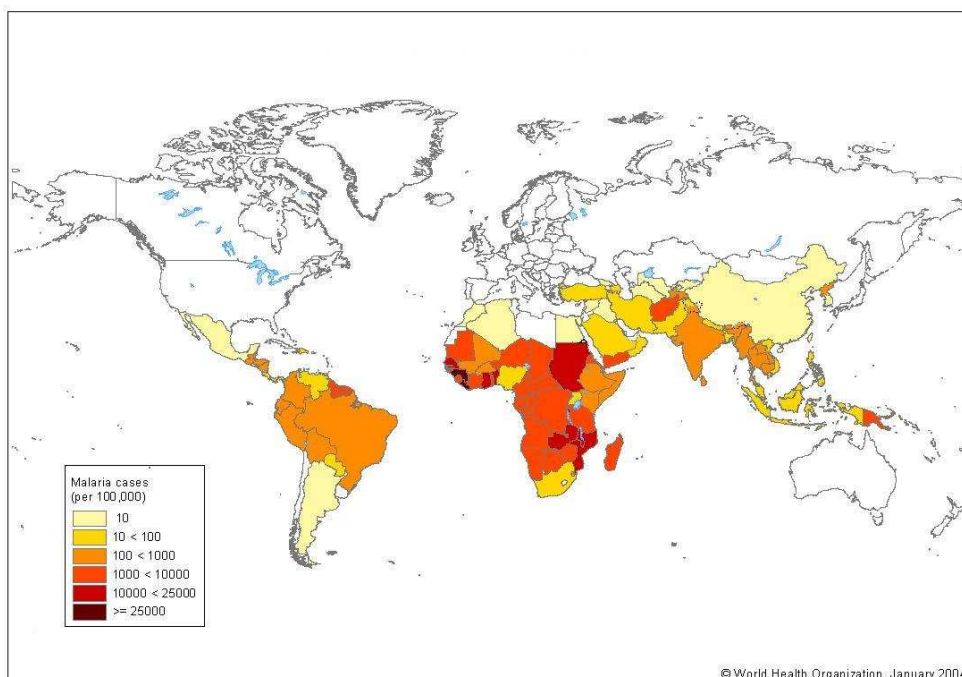
**Figure 1** : Cycle de vie du moustique commun *Culex (Culex) pipiens* (Linnaeus)

Source : site internet de l'EID Rhône-Alpes.

## **B. Moustiques, risque sanitaire et nuisance**

Tous les moustiques ne piquent pas l'homme, mais par le biais du repas de sang, les espèces qui le font représentent une menace, car elles sont potentiellement vecteurs de pathogènes, transmis à l'hôte par la salive injectée au cours de la piqûre. Les moustiques sont ainsi impliqués dans la transmission de dizaines de maladies humaines ou vétérinaires, certaines tristement célèbres comme le paludisme, la dengue. Dans le cas de cette dernière l'agent pathogène transmis par un moustique du genre *Aedes* est un arbovirus du groupe des flavivirus, infectant chaque année 50 millions de personnes dans le monde (Source : site internet de l'OMS, 2002). Dans le cas du paludisme, maladie responsable d'un million de décès chaque année et endémique dans 107 pays, un protozoaire du genre *Plasmodium* est transmis par une femelle *Anopheles* (WHO, 2005). La transmission de ces maladies est endémique lorsque le parasite rencontre les conditions nécessaires à leur reproduction et que la densité des hôtes (moustiques et hommes) est suffisante pour qu'ils rentrent fréquemment en contact. Les zones tropicales du globe sont les plus touchées parce que les conditions climatiques, la diversité d'habitats favorisent la prolifération des moustiques, et que l'hygiène et la santé des populations humaines accroît leur vulnérabilité (figure 2).

Plus au nord, en Scandinavie ou au Canada par exemple, de grosses densités de moustiques sont responsables de nuisances qui rendent certaines régions inhabitables. Les réactions de l'homme aux piqûres (irritations, rougeurs, causant souvent insomnies et prostration) étaient considérées au Canada comme le problème numéro un en entomologie médicale il y a 50 ans (West, 1961). Des explosions soudaines des populations de moustiques y étaient fréquemment observées, empêchant non seulement les activités de plein air, mais compromettant gravement le développement de régions (Harrison & Cousineau, 1973). Aujourd'hui ces situations se reproduisent mais leurs conséquences sont moins dramatiques grâce aux progrès des techniques de démoustication.



**Figure 2** : Carte de la répartition mondiale des cas de paludisme (source : OMS, octobre 2005)

Carte en libre accès à l'adresse : [http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/global\\_cases.jpg](http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/global_cases.jpg)

En France, la problématique vectorielle liée aux moustiques est limitée depuis l'éradication complète du paludisme sur le territoire européen dans les années 50. Au 19<sup>ème</sup> siècle, la maladie était répandue du bassin méditerranéen à la Grande-Bretagne (Dobson, 1980 et 1994 ; Reiter, 2000) et même jusqu'au Danemark et en Finlande (Bruce-Chwatt & Zulueta, 1980 ; Huldén *et al.*, 2005). Les derniers cas de transmission de fièvres paludéennes par des moustiques autochtones en France métropolitaine remontent aux années 40, avec le retour de soldats infectés des zones d'endémie. Le dernier cas autochtone signalé pour la Corse remontait à 1972 (Guillet, 1996 ; Gourvellec *et al.*, 2005), jusqu'à la récente suspicion de trois cas lors de l'été 2006, toujours en Corse (Armengaud *et al.*, 2006 ; Ponçon *et al.*, 2007).

Quelques cas de transmission du virus du Nil Occidental aux équins ont été observés sur le littoral méditerranéen ces dernières années et 7 cas humains non mortels ont été diagnostiqués dans le Var en octobre 2003 (Mailles *et al.*, 2003). Le vecteur soupçonné est l'espèce *Culex modestus*, commune sur le territoire (Ludwig *et al.*, 2005). Les moustiques assurent aussi la transmission aux mammifères de virus (myxomatose, Puech, 1980) et de nématodes (filarioses). Le risque sanitaire représenté par les espèces anthropophiles en France

est surtout lié actuellement aux réactions de type allergique provoquées par les piqûres. Elles sont la conséquence de l'injection par le moustique d'une petite quantité de salive allergène sous la peau de l'hôte avant le prélèvement du sang au niveau des capillaires.

### **C. Le contrôle des moustiques : modalités, limites et enjeux environnementaux**

En France l'idée d'un contrôle des populations de moustiques est née à la fin des années 50. La principale cause n'était pas le risque sanitaire, mais bien plus la vocation touristique de certains territoires, présentant des incompatibilités avec de fortes nuisances. Les départements voisins de la Camargue, conscients que leur territoire était associé aux moustiques dans l'inconscient collectif, ont décidé de contrôler ces nuisances pour ne pas être privés des retombées économiques du tourisme.

Sur le plan législatif, la loi de 1964 sur la démoustication et ses décrets d'application ont permis la création d'établissements spécialisés dans la lutte contre les moustiques : les Ententes Interdépartementales pour la Démoustication (EID). Ces structures sont habilitées à procéder aux prospections, traitements, travaux et contrôles nécessaires à cette action sur les zones d'intervention déterminées par arrêté préfectoral et en fonction des décisions des conseils généraux et des communes. Les EID Méditerranée, EID Rhône-Alpes et EID Atlantique ont ainsi été créées au cours des années 60, permettant de répondre aux attentes des élus et des populations concernées.

La lutte orchestrée en France par les EID n'a pas pour but d'éliminer les moustiques d'une région, mais de contrôler leurs populations pour limiter la nuisance qu'elles génèrent à un seuil tolérable par les riverains (Besnard & Gruffaz, 1999). Elle s'appuie en premier lieu sur l'entretien physique des milieux (drainage, action sur la végétation), pour limiter les facteurs de prolifération des moustiques (Maire, 1971). Ensuite, un suivi régulier des populations larvaires connues sur le terrain est réalisé grâce à la cartographie écologique des milieux, qui utilise la végétation comme indicateur biotique de gîtes larvaires (Rioux *et al.*, 1967). En effet, l'évolution de certaines formations végétales, unités écologiques dont le fonctionnement est régi par le rythme des assèchements et des mises en eau, est corrélée au cycle biologique des moustiques, qui dépendent des mêmes conditions. Lorsque ces populations larvaires sont importantes, leur contrôle par des insecticides s'impose, afin de

prévenir de fortes densités d'adultes vulnérants. Les traitements sont surtout efficaces sur les stades aquatiques (larves et nymphes), aux densités généralement fortes dans les pièces d'eau stagnante et qui s'alimentent continuellement, mais le contrôle des adultes est parfois nécessaire en complément.

Les premiers insecticides utilisés pour lutter contre des moustiques étaient des substances naturelles comme la nicotine et la roténone (Tissut *et al.*, 1979). La première molécule de synthèse, le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) découvert en 1939, fut largement utilisée à travers le monde pour combattre le typhus, les fièvres des tranchées et le paludisme pendant la 2<sup>ème</sup> guerre mondiale (Smith, 2000). Lui succédèrent une longue liste de molécules que l'on regroupe par familles aux modes d'actions différents : les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. Lors des premières années de démoustication, l'EID Rhône-Alpes a utilisé des organo-phosphorés comme le téméphos (formulation commerciale ABATE 500E) entre 1970 et 1989 (source : site internet de l'EID). Mais ces molécules peu sélectives et dangereuses pour l'environnement ont progressivement laissé leurs places aux bactério-insecticides comme le *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israëlis*) et le *Bs* (*Bacillus sphaericus*), très sélectifs et sans effet néfaste démontré sur l'environnement (Merritt, 1989 ; Becker & Margalit, 1993 ; Boisvert & Boisvert, 2000). Ces bactério-insecticides produisent, après ingestion sous forme de spores, des cristaux protéiques toxiques qui détruisent l'épithélium intestinal des larves, qui meurent rapidement (Nielsen-Leroux & Charles, 1992). D'autres formes de lutte biologique ont été expérimentées dans le monde, utilisant des prédateurs des larves de moustiques comme les larves de libellules, les poissons (gambusies et épinoches), ou des parasites (nématodes, champignons), mais ne sont pas employées en France.

Avec l'interdiction d'usage de l'ABATE dans le cadre de la directive européenne Biocide 98/8/CE, les bactério-insecticides *Bti* et *Bs* sont utilisés en traitement anti-larvaires, et l'utilisation de fénitrothion (organophosphoré), de deltaméthrine et de pyréthrine (pyréthrinoïdes) est permise au moment des émergences d'adultes (source : site internet de l'EID méditerranée).

L'emploi d'insecticides en démoustication rencontre des contraintes d'ordres écotoxicologique et écologique. La première limite est liée à la capacité des populations de moustiques à développer des résistances à certains insecticides au fil des générations (Hemingway *et al.*, 2004). L'emploi récurrent du même insecticide durant plusieurs années



peut induire chez les individus une tolérance ou une mutation leur permettant de contrer l'effet de la matière active. Cette résistance peut ainsi se transmettre aux générations suivantes. Les premières résistances décrites ont été observées avec le DDT dès 1959 (Luen & Shalaby, 1962), puis celles au téméphos et au bactéricide *Bs* sont apparues au cours des années 1990 (BenCheik & Pasteur, 1993 ; Rodscharoen & Mulla, 1996). L'emploi alterné de différents insecticides est donc nécessaire pour éviter l'apparition de résistances chez les populations de moustiques.

La deuxième limite est liée au choix d'un insecticide respectueux de l'environnement. En effet la majorité des insecticides chimiques commercialisés ont un spectre d'action large et sont interdits en lutte contre les moustiques. Les insecticides utilisables en démoustication doivent avoir une faible rémanence dans la zone humide, être sélectifs et ne pas s'accumuler dans les tissus des organismes non-cibles de la faune compagne (directive européenne Biocide 98/8/CE).

La démoustication doit donc trouver des compromis pour répondre à une double demande de la société : limiter efficacement les nuisances et contrôler les risques liés aux moustiques, tout en respectant l'environnement. Depuis une vingtaine d'années, on observe une demande sociétale grandissante pour la préservation de l'environnement et en particulier des zones humides, particulièrement menacées. Pourtant, notre société cherche toujours à améliorer son confort de vie, et les nuisances dues aux moustiques sont rarement tolérées. Face à ce paradoxe, les disciplines de la biologie et de l'écologie ne suffisent pas à elles seules pour trouver des solutions applicables aux problèmes rencontrés par la démoustication.

## **D. Problématique de l'étude**

Ce travail de thèse en biologie adopte une démarche originale, tournée vers la pluridisciplinarité dont le but est de cerner les problématiques actuelles de contrôle des moustiques en France et de contribuer au développement de nouveaux outils de gestion.

La première partie de ce travail présente les rapports existant entre les moustiques et les hommes à travers deux études, l'une traitant du risque sanitaire et l'autre de la nuisance. La première étude historique analyse les facteurs en cause dans la transmission du paludisme par les *Anopheles* en Rhône-Alpes au 19<sup>ème</sup> siècle. Les résultats sont discutés au regard du contexte actuel du changement global, qui s'accompagne d'une ré-émergence de certaines maladies infectieuses en Europe (Sérandour *et al.*, 2007).

La deuxième étude utilise les outils de la sociologie pour évaluer les représentations du moustique dans la société actuelle et la perception de la nuisance qu'il génère. A la croisée des problématiques de protection de la nature, de contrôle des nuisances et de prévention des risques sanitaires, cette approche pluridisciplinaire doit permettre de clarifier la nature de la demande sociétale et faire émerger des éléments de réponse pour les gestionnaires. A partir des résultats obtenus sur le territoire rhône-alpin et dans d'autres régions françaises (Sérandour & Claeys-Mekdade, 2007), les éléments permettant la mise en place d'observatoires régionaux de la nuisance sont dégagés et discutés.

La deuxième partie de la thèse vise à apporter des connaissances sur l'écologie et la biologie larvaire des moustiques du genre *Coquillettidia*, qui représentent une nuisance difficilement contrôlable actuellement. En effet, les larves de ces moustiques vivent en profondeur dans les gîtes où elles échappent aux traitements classiques.

Cette seconde partie s'articule autour de trois volets, dont le premier est une étude de terrain visant à approfondir la connaissance des gîtes larvaires de *Coquillettidia*. L'intérêt de cette étude est de dégager des indices permettant une localisation plus aisée des populations larvaires, en vue d'un échantillonnage ou d'un traitement.

Le deuxième volet est la recherche, en laboratoire, des mécanismes régissant la relation particulière entre les larves de *Coquillettidia* et les plantes-hôtes, relation permettant leur survie en milieu anoxique. L'étude du comportement de fixation des stades larvaires aux

racines des végétaux est complétée par la recherche de médiateurs chimiques, impliqués dans la reconnaissance des plantes par les larves.

Enfin le troisième volet est la mise au point en laboratoire d'une stratégie insecticide adaptée au contrôle des *Coquillettidia*. La méthode envisagée vise à utiliser la relation étroite entre la plante et l'insecte pour administrer efficacement un traitement larvicide.

## 1<sup>ère</sup> partie :

### Problématique vectorielle et nuisance : des enjeux de société

#### A. Prévenir le risque sanitaire : référence au passé (*Sérandour et al., 2007*)

Depuis la fin de la deuxième guerre mondiale, la transmission de maladies vectorielles à l'homme a pratiquement cessé en Europe. L'assainissement des zones humides, les progrès dans l'hygiène et les changements de pratiques agricoles ont fortement limité les contacts entre moustiques et hommes, et par conséquent les transmissions. Pourtant depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, les recherches se multiplient pour évaluer les probabilités de ré-émergence de certaines maladies infectieuses comme le paludisme (Reiter, 2001 ; Romi *et al.*, 2001). Le changement global à travers ses différentes manifestations, changement climatique, changement d'utilisation des terres et multiplication d'espèces invasives, fait craindre aux autorités sanitaires l'arrivée de vecteurs et de pathologies exotiques sur le continent. Les scientifiques surveillent notamment la colonisation fulgurante de l'Europe par l'espèce asiatique *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1894), vecteur de la Dengue et du Chikungunya sous les tropiques (Guillet & Nathan, 1999 ; Schaffner & Karch, 2000). Des programmes européens et nationaux de recherche visent à étudier l'état des populations de moustiques français susceptibles d'être impliqués dans des épidémies de fièvre du Nil Occidental, ou de paludisme (par exemple le projet européen EDEN<sup>1</sup>).

Le paludisme était endémique en Rhône-Alpes jusqu'à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Dans certains villages des Dombes, région d'étangs située à l'est de Lyon, l'espérance de vie d'un habitant était de 24 ans contre 35 ans pour la moyenne des français, et jusqu'à 94% des habitants étaient atteints de paludisme (Deruaz, 1988). Les plaines alluviales marécageuses des fleuves alpins aux fortes densités de moustiques Anophèles, étaient également de sinistres foyers paludéens (Chiron, 1846 ; Mosca, 1860).

Actuellement, les populations d'Anophèles de la région sont mal connues car elles ne représentent pas de risque sanitaire ni de nuisance forte. Dans un contexte de prévention des risques sanitaires liés aux moustiques, il apparaît important d'identifier les facteurs à risque pour un retour des maladies vectorielles en Rhône-Alpes, et en particulier du paludisme.

L'étude historique présentée ici a pour but de déterminer l'impact des fièvres paludéennes sur la démographie au 19<sup>ème</sup> siècle dans la vallée de l'Isère, et d'identifier les facteurs ayant joué un rôle dans les différentes phases de recrudescence de la maladie. Les relations entre des données météorologiques reconstituées de l'époque, les différents aménagements de la plaine alluviale et les cas de paludisme sont analysées à partir de données d'archives. Les résultats de l'étude sont replacés dans le contexte actuel du changement global et des maladies émergentes.

#### A.1. Matériel et méthodes :

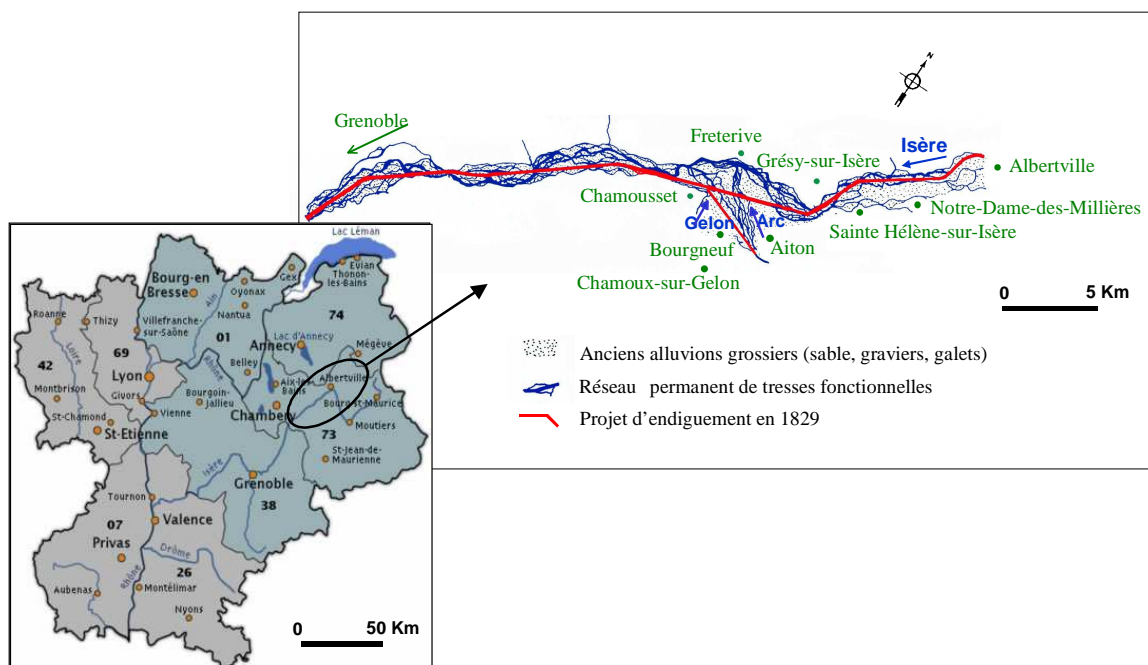
---

<sup>1</sup> Le projet EDEN : Emerging Diseases in a changing European eNvironment, est un projet intégré du 6<sup>ème</sup> PCRD de la Commission Européenne.

Des informations historiques de sources variées, susceptibles d'expliquer les conditions de transmission du paludisme dans la vallée de l'Isère au 19<sup>ème</sup> siècle, ont été recherchées.

Les données démographiques ont été obtenues dans les registres de décès de huit communes situées dans la vallée de l'Isère autour de la confluence avec l'Arc, zone marécageuse particulièrement malsaine à l'époque.

Les communes de Notre-Dame-des-Millières (1030 habitants en 1844), Sainte-Hélène-sur-Isère (non documentée), Grésy-sur-Isère (non documentée), Aiton (890), Fréterive (non documentée), Bourgneuf (406), Chamousset (301) et Chamoux-sur-Gelon (1409) ont ainsi été



**Figure 3** : Carte de la vallée de l'Isère en Rhône-Alpes avant les travaux d'endiguement en 1829 choisies (figure 3). démographiques sont disponibles dans chaque mairie sous la forme du recensement des décès de chaque année, depuis l'année 1828 jusqu'à 1900 (sauf pour Chamousset et Sainte-Hélène-sur-Isère où des registres manquent).

Les causes des décès n'étant pas reportées dans ces registres, les informations concernant les cas de fièvres paludéennes ont été recueillies à partir de rapports de médecins locaux décrivant les symptômes à travers la population (Masson, 1883 ; Marie-Girod, 1884). Ces descriptions sont précises (« fièvres intermittentes », « fièvres tierces », fièvres quartes »)

car ces médecins tenaient les fièvres paludéennes pour responsables des pics de mortalité observés certaines années.

La description des différents aménagements hydrauliques ayant concerné l'Isère et ses affluents (l'Arc et le Gelon) au cours du 19<sup>ème</sup> siècle a été obtenue à partir de documents d'ingénieurs hydrauliques, disponibles aux archives départementales de Savoie, à Chambéry ("Archives administratives de la période sarde (1816-1860): série FS: génie civil et travaux publics" ; "Travaux publics depuis 1860 (série S): Fonds du service des Ponts-et-Chaussées, sous-série SPC").

Les données météorologiques du 19<sup>ème</sup> siècle ont été obtenues à partir du jeu de données de températures et précipitations reconstruites pour les Alpes par Casty *et al.* (2005). Les températures et précipitations mensuelles estimées ont été analysées pour la localité d'Albertville (45,25°N – 6,25°E) afin d'évaluer l'influence du climat de l'époque sur les décès enregistrés dans les communes étudiées. Des tests de corrélation ont été menés à partir de ces données météorologiques et des données démographiques recensées pour les mêmes périodes, avec le logiciel StatView 4.57.0.0.

## A.2. Résultats :

### A.2.1. Evolution démographique dans les communes de la plaine alluviale

Le calcul des taux de mortalité montre une augmentation rapide et importante des décès dans la vallée de l'Isère entre 1828 et 1843, alors que les populations restent stables (tableau 1). Cette augmentation est générale dans les communes étudiées (de +21% à Aiton à +167% à Notre-Dame-des-Millières en 15 ans) mais n'est pas observée à l'échelle de la France pour la même période, le taux de mortalité étant stable entre 2.51% et 2.35% (Demonferrand, 1835 ; Boudin, 1857). Cette augmentation des décès paraît donc limitée à la zone d'étude, où les taux de mortalité sont déjà plus élevés que la moyenne nationale en 1828 (+6% à +94%).

**Tableau 1** : Comparaison des taux de mortalités de 5 communes bordant l'Isère entre 1828 et 1843.

Les taux de mortalité sont calculées à partir de données de Replat *et al.* (1844) et de Gex (1940)

Communes	Taux de mortalité % (1828-1836)	Taux de mortalité % (1837-1843)
Aiton	4,86	5,86
Bourgneuf	3,66	5,63
Chamousset	3,32	5,32
Chamoux-sur-Gelon	2,67	3,86
Notre-Dame-des-Millières	2,78	7,44

Les médecins de cette époque expliquaient la recrudescence des décès par une mauvaise gestion des cours d'eau affluents de l'Isère, l'Arc et le Gelon qui vers 1834 « refluent dans la vallée, pour y déverser les miasmes délétères qui y décimèrent dès lors la population, jusque là exempte des fièvres paludéennes ». Le témoignage du médecin de l'hôpital de Betton (73), situé au niveau de la confluence Arc-Isère, sur la dégradation de l'état de santé des ses patients aliénés mentaux, est très évocateur. A la création de l'établissement en 1832, aucun des 43 aliénés n'est atteint de fièvres. En 1834, l'équipe médicale note que malgré la bonne tenue de l'établissement, « les fièvres intermittentes y attaquaient les aliénés, les employés et les sœurs » et « qu'il était rare que les habitants échappassent à la fièvre après six mois de séjours ». En 1842, « la quantité de quinquina consommée dans la maison était vraiment fabuleuse. L'asile destiné à la guérison de la folie devint un hôpital de fiévreux ». Les fièvres y étaient constantes et « dans une seule année, sur 135 aliénés traités, 20 étaient décédés par suite des fièvres endémiques » (Marie-Girod, 1884).

Ces témoignages et la description des symptômes caractéristiques de fièvres paludéennes confortent l'hypothèse d'une transmission du paludisme affaiblissant l'ensemble de la population de la vallée de l'Isère. L'augmentation du taux de mortalité observée vers

1840 dans les communes de la zone d'étude pourrait donc être liée à de forts taux d'infection de la population certaines années.

### **A.2.2. Les populations d'Anophèles dans les vallées alpines**

Les scientifiques étaient certainement moins intéressés par l'étude des moustiques avant la découverte, par Laveran, en 1903, de la transmission du paludisme à l'homme par la piqûre d'un moustique *Anopheles* femelle, ce qui explique l'absence de description des moustiques en Rhône-Alpes, au 19<sup>ème</sup> siècle. Aujourd'hui, les espèces d'Anophèles et leur implication dans la transmission de la maladie sont documentées, et nous nous appuyons sur ces données pour évaluer à posteriori l'état des populations d'Anophèles au 19<sup>ème</sup> siècle dans la région.

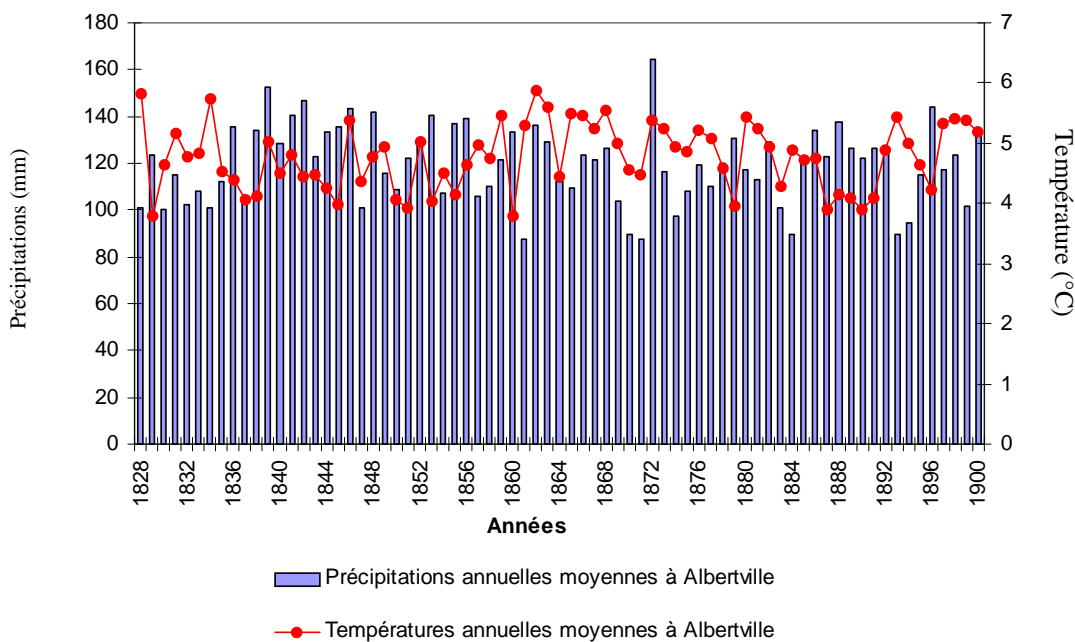
13 espèces d'Anophèles sont décrites en France, parmi lesquelles seules *Anopheles labranchiae* (Falleroni, 1926), *Anopheles superpictus* (Grassi, 1899) et *Anopheles sacharovi* (Favre, 1903) sont considérées comme anthropophiles (Schaffner *et al.*, 2001). Ces espèces sont connues pour avoir été les vecteurs principaux du paludisme à *Plasmodium vivax*, dans les pays du bassin méditerranéen, mais elles ne sont présentes qu'en Corse actuellement. Une récente étude a démontré un comportement très agressif et anthropophile des moustiques de l'espèce *Anopheles hyrcanus* (Pallas, 1771) dans la région Camarguaise, mais cette espèce est également absente en région Rhône-Alpes (Ponçon *et al.*, 2007). L'espèce *Anopheles atroparvus* (Van Thiel, 1927) était impliquée dans la transmission du paludisme en France jusqu'au début du 20<sup>ème</sup> siècle et était responsable de nuisances dans la vallée du Rhône dans les années 1980 (Gilot *et al.*, 1976). Des études ont montré sa sensibilité à l'infection par *P. vivax* mais elle n'a jamais montré de sensibilité à des souches africaines de *Plasmodium falciparum* (Daskova & Rasnitsyn, 1982). Cette espèce se nourrit sur mammifères et sur humains occasionnellement. Ses densités semblent faibles en Rhône-Alpes où l'espèce pourrait avoir été progressivement remplacée par *Anopheles messeae* (Falleroni, 1926) au cours des dernières décennies (Pichot & Deruaz, 1981).

Des espèces considérées comme vecteurs secondaires ou occasionnelles de paludisme sont présentes en Rhône-Alpes, notamment *Anopheles plumbeus* (Stephens, 1828) qui est responsable de nuisances chaque été, aux abords de grandes villes (communication personnelle EID). Des cas de transmission autochtone de paludisme ont été attribués à cette espèce en Angleterre et en Allemagne à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, et des tests d'infection en



laboratoire ont confirmé que des *An. plumbeus* européens étaient sensibles à des souches africaines de *P. falciparum* (Shute & Maryon, 1974 ; Kruger *et al.*, 2001). Les espèces *Anopheles claviger* (Meigen, 1804) et *An. messeae* présentent un comportement zoophile mais pourraient avoir été impliquées dans la transmission du paludisme comme *An. atroparvus* en Rhône-Alpes jusqu'au 19<sup>ème</sup> siècle.

Des espèces d'Anophèles susceptibles de transmettre le paludisme étaient donc certainement présentes dans les vallées de Rhône-Alpes au 19<sup>ème</sup> siècle, et l'évolution du nombre de cas et de décès pourrait être directement lié à la fluctuation des densités de vecteurs.



**Figure 4** : Estimations moyennes annuelles des précipitations et des températures à Albertville entre 1828 et 1900. (Adapté de Casty *et al.*, 2005)

### A.2.3. Relations entre conditions météorologiques et évolution démographique

Les densités de populations de moustiques sont étroitement influencées par la conjonction des précipitations et de la température, qui jouent sur l'éclosion des œufs, la création de gîtes larvaires, la vitesse du développement post-embryonnaire et la survie des

adultes. Les températures et précipitations aux alentours d'Albertville, au 19<sup>ème</sup> siècle, ont été analysées et mises en relation avec l'évolution démographique des populations humaines locales. Aucun évènement climatique majeur n'est à noter pendant la période 1828-1900 en ce qui concerne les températures (figure 4). L'analyse des températures mensuelles permet toutefois de dégager une corrélation entre les températures du mois de juin (toutes années confondues) et le nombre de décès dans la population l'année qui suit ( $R^2 = 0,102$ ; Anova  $F = 8,06$ ,  $p=0,0059$ , 1 ddl). Les précipitations, annuelles comme mensuelles, ne sont pas corrélées au nombre de décès dans la population (figure 4,  $P > 0,05$ ).

Les conditions météorologiques ne semblent pas suffisantes pour expliquer le grand nombre de cas de paludisme et de décès dans la population des 8 communes étudiées, au 19<sup>ème</sup> siècle. D'autres facteurs influençant les densités de moustiques Anophèles ont donc été recherchés.

#### A.2.4. Aménagements hydrauliques dans la vallée de l'Isère et évolution démographique

Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, l'Isère dans la combe de Savoie était un fleuve tressé auquel étaient associés de nombreux bras morts et marécages qui faisaient de la plaine alluviale un important foyer de fièvres paludéennes (Mosca, 1860). Pendant les mois chauds, l'étiage favorisait la prolifération de mares temporaires où les paysans récoltaient la blâche (*Carex* Linné) pour nourrir le bétail. La présence d'eau stagnante et les émanations des marais étaient tenues pour responsables de la morbidité du lieu et du développement des fièvres. Le gouvernement Sarde de l'époque décida, en 1829, d'assainir les lieux en procédant à l'endiguement de l'Isère (figure 3). A partir des documents laissés par les ingénieurs ayant travaillé sur ce projet, les différentes étapes de l'aménagement de la plaine alluviale ont été retracées et représentées dans la figure 5.

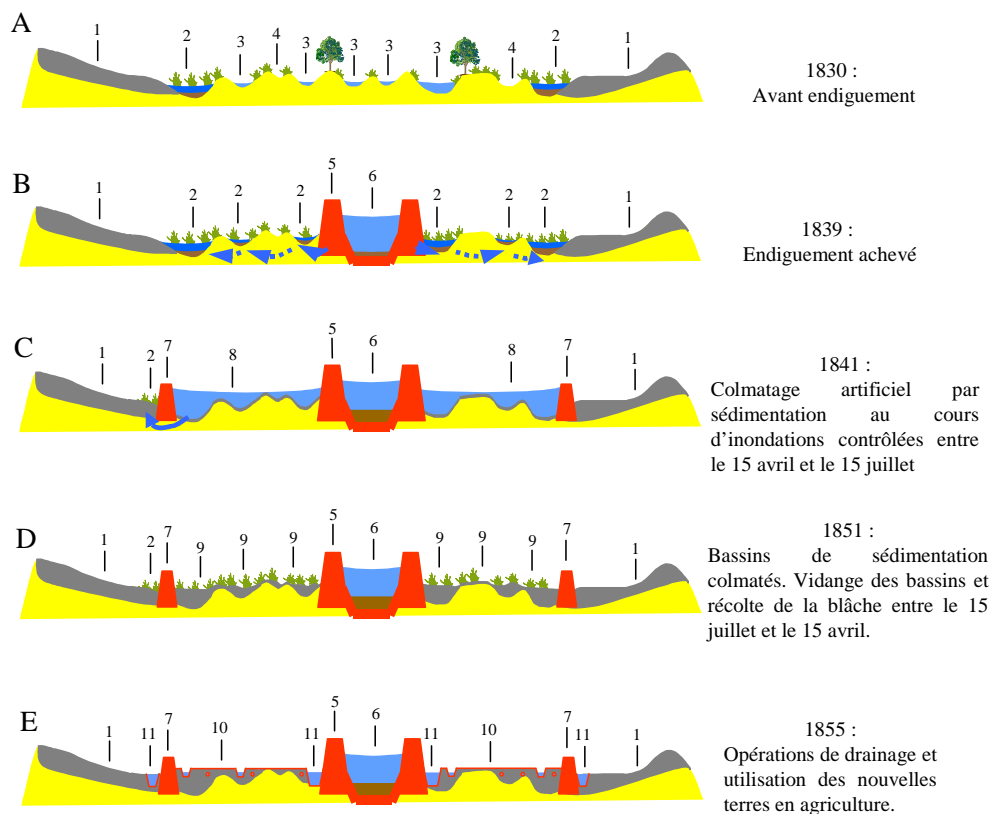
Les travaux d'endiguement du fleuve ont eu lieu de 1830 à 1854, selon les secteurs. Le but de cet ouvrage était d'assécher les marécages voisins en coupant les connexions avec le fleuve (figure 5A). De nombreux ouvriers furent infectés par les fièvres paludéennes au cours du chantier et le nombre de décès fut multiplié par 3 en l'espace de 10 ans, dans les communes environnantes (période 1830-1840, figure 6). Les bras morts et zones

marécageuses restaient connectées, malgré les digues, par des infiltrations en période de débâcle, chaque printemps (Chiron, 1846 ; figure 5B). Au voisinage de Grésy-sur-Isère, le niveau du fleuve s'élevait dans le canal artificiel, entraînant des inondations récurrentes à la période des hautes eaux, de mi-avril à mi-juillet, et la création de mares temporaires.

Les architectes décidèrent de colmater les marécages de la plaine en utilisant la déposition naturelle de sédiments du fleuve, dont le cours serait détourné dans des bassins de colmatage, de part et d'autre du chenal au moment de la débâcle (figure 5C). Les végétaux aquatiques re-colonisaient rapidement ces bassins de colmatage et les paysans continuaient de récolter une biomasse végétale importante chaque été (figure 5D). Les années suivantes, les cas de fièvres et le nombre de décès augmentaient à nouveau (+75%, figure 6 ; Replat *et al.*, 1844).

Une nouvelle loi française sur les associations syndicales de communes, adoptée en 1865, permit une meilleure coopération entre villages voisins et une circulation efficace des eaux à travers de vastes bassins de drainage, résultant au colmatage progressif de l'ensemble des marais (figure 5E). Ces derniers travaux d'aménagements contribuèrent certainement à réduire la mortalité (-60% entre 1870 et 1900, figure 6) et le nombre de cas de fièvres dans la vallée (Girel, en préparation).

La concordance des dates entre les différents aménagements de l'Isère et les pics de mortalité dans la population locale de Notre-Dame-des-Millières et Grésy-sur-Isère, suggère que les travaux de contrôle des crues ont joué un rôle important dans la progression des fièvres.



**Figure 5 :** Coupe transversale du fleuve Isère au voisinage du village de Sainte Hélène sur Isère, illustrant l'évolution des aménagements hydrauliques (période 1830-1860)

- Légende :**
- 1 : Terrasses anciennes limoneuses cultivées
  - 2 : Gîte permanent (ancien bras alimenté par des infiltrations)
  - 3 : Chenaux fonctionnels de cours d'eau tressé
  - 4 : Chenaux fonctionnels en hautes eaux
  - 5 : Chenal artificiel endigué
  - 6 : Lit artificiel plus ou moins remblayé
  - 7 : Turcie (bourrelet délimitant les zones à colmater)
  - 8 : Bassin de colmatage inondé par une lame d'eau courante
  - 9 : Bassin en voie de colmatage. Sols battants limono-argileux. Gîtes temporaires.
  - 10 : Bassin assaini par des fossés et des drains enterrés (sol limono-argileux)
  - 11 : Contre-canaux latéraux (canaux de colature)
- Alluvions grossiers de systèmes tressés (sables, graviers, galets)
  - Infiltrations
  - Couleur symbolisant les ouvrages artificiels

### A.2.5. Aménagements hydrauliques dans la vallée de l’Arc et évolution démographique

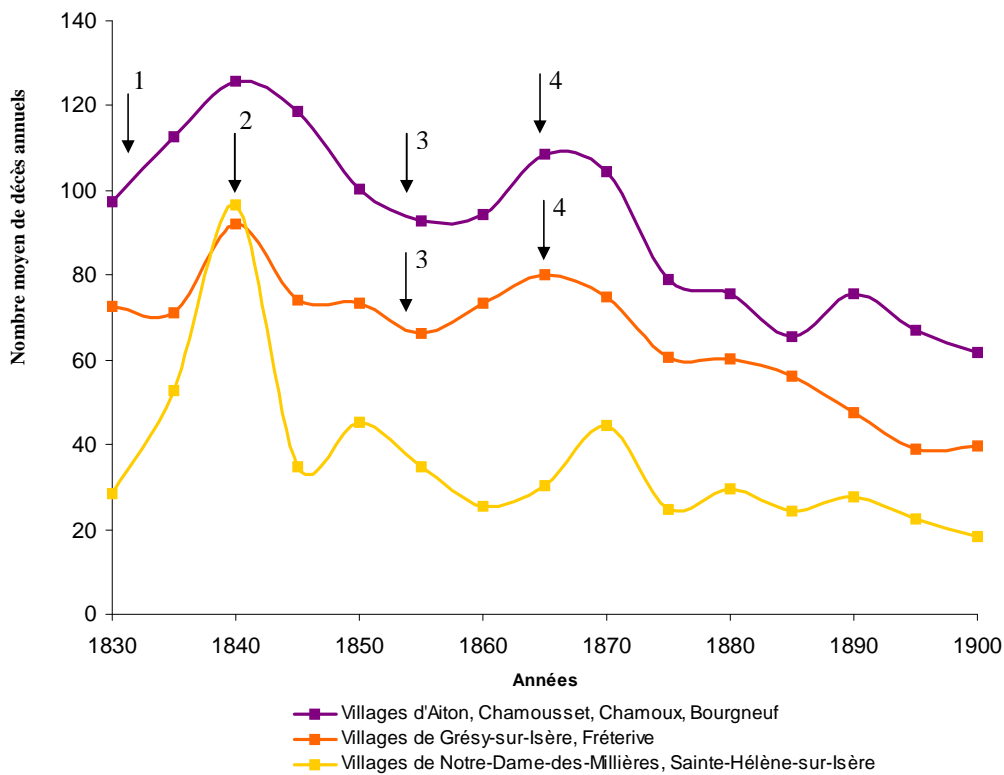
Le nouveau chenal de l’Arc (figure 3) fut construit entre 1830 et 1839, simplifiant l’ancien circuit emprunté par la rivière tressée. Dès 1832, l’élévation progressive du lit endigué de la rivière, par accumulation de sédiments en aval, eut pour conséquence le débordement de l’Arc et de son affluent le Gelon sur des terres cultivées de la plaine (Mosca, 1860). La zone devint rapidement marécageuse et les cas de fièvres progressèrent rapidement dans les localités de Bourgneuf, Aiton et Chamoux. Le nombre de décès dans la population augmenta dès 1832, atteignant un pic de 126 décès annuels entre 1840 et 1845 (+28%, figure 6).

Les travaux de diversion du cours du Gelon dans le fleuve Isère, entre 1842 et 1854, limitèrent les crues et la mortalité diminua dans la population, entre 1845 et 1860, avec un minimum de 93 décès annuels (-26%).

Les travaux de colmatage de la plaine de l’Arc commencèrent en même temps que ceux de la vallée de l’Isère. Ils favorisèrent également dans un premier temps la persistance de mares temporaires et de marécages (plus de 1000 ha de marais le long du Gelon, figure 5D). En conséquence, les cas de fièvres et le nombre de décès augmentèrent avec un nouveau pic entre 1865 et 1870 (+17%, figure 6).

Les opérations de drainage de la vallée finirent par assainir la vallée de l’Arc dans les années 1880, comme ce fut le cas dans la vallée de l’Isère (Dausse, 1872 ; figure 5E). Une baisse significative du nombre de malades et de décès était relevée au voisinage des rivières Arc et Gelon en 1900 (-43%, figure 6).

L’endiguement des rivières, les opérations de colmatage artificiel et de drainage dans les vallées ont fortement perturbé le fonctionnement des systèmes fluviaux au niveau de la confluence Arc-Isère, dans la combe de Savoie. Ces aménagements ont fortement modifié les hauteurs de nappe d’eau souterraines, ils ont participé à la création de zones marécageuses dans les vallées, phénomènes qui apparaissent fortement liés au développement des fièvres et aux fluctuations démographiques observées (Girel *et al.*, 1997 ; Girel *et al.*, 2003).



**Figure 6 :** Evolution du nombre de décès entre 1830 et 1900 dans les communes situées au voisinage de la confluence entre les rivières Arc et Isère.

- 1 : Crues récurrentes de l'Arc et du Gelon consécutives à leur endiguement
- 2 : Achèvement de l'endiguement de l'Isère
- 3 : Colmatage artificiel en cours
- 4 : Début des opérations de drainage

### A.3. Discussion

#### A.3.1. Contrôle des crues, densité des populations d'Anophèles et fluctuations démographiques

Pendant la période 1828-1900, les températures moyennes du mois de juin sont corrélées à la mortalité dans les communes de la vallée de l'Isère l'année suivante. Actuellement, les Anophèles sont observées à l'état larvaire au printemps en Rhône-Alpes. Il est probable que les fluctuations de températures du mois de juin aient eu une influence sur

les quantités d'Anophèles atteignant le stade adulte, et par conséquent sur les densités de vecteurs. Néanmoins, les températures de juin n'expliquent pas les densités larvaires d'Anophèles dans la vallée de l'Isère, et des facteurs liés au fonctionnement hydrologique et à la production de gîtes larvaires sont probablement en cause dans la transmission du paludisme au 19<sup>ème</sup> siècle.

Les résultats de cette étude démontrent l'impact qu'eurent les opérations de contrôle des crues sur la progression des fièvres et l'augmentation des décès dans la vallée de l'Isère au 19<sup>ème</sup> siècle. Les pics de mortalité observés concordaient avec les périodes d'expansion des mares et marais, favorables au développement des moustiques, ce qui confirme que les fièvres paludéennes transmises par les Anophèles ont eu un impact manifeste sur la démographie locale. La transmission était favorisée par les pratiques agricoles des paysans qui récoltaient la blâche dans les marais, au contact des Anophèles, quand leurs densités étaient les plus fortes.

Avant le début des opérations d'aménagement de l'Isère et de ses affluents, les bras secondaires des rivières tressées s'asséchaient en été, créant des mares temporaires idéales pour le développement larvaire des moustiques. La transmission du paludisme par les Anophèles adultes aux paysans avait donc lieu à la fin de l'été et au début de l'automne.

Après l'endiguement de l'Isère et de l'Arc, la diminution espérée des fièvres et des décès n'eût pas lieu. Les densités d'Anophèles étaient fortes, dès le début de l'été, suite à la création de gîtes larvaires par les infiltrations et les débordements des rivières pendant la période des hautes eaux.

Pendant les premières années du colmatage artificiel des plaines alluviales, les bassins de sédimentation en eau tout l'été, favorisaient un contact prolongé entre Anophèles et paysans jusqu'à l'automne. Comme les travaux d'endiguement de l'Isère avaient eu lieu progressivement d'aval (Grésy-sur-Isère) en amont (Notre-Dame-des-Millières), le colmatage artificiel commença plus tard en amont. Ce délai dans la réalisation des opérations explique très bien le décalage de quelques années entre les pics de mortalité observés dans les années 1860-1870, dans les deux localités.

Il est certain que le colmatage complet de la plaine alluviale et son drainage ont progressivement stoppé la production de gîtes à moustiques, ce qui expliquerait la diminution définitive du taux de mortalité dans la population locale à partir de 1880.

Au cours de l'endémie de paludisme, il est probable que la transmission du paludisme par les Anophèles ait pu se poursuivre à l'intérieur des habitations, après la période de récolte

de la blâche, comme cela a été reporté dans d'autres pays (Reiter, 2000 ; Hulden *et al.*, 2005). Le principal vecteur supposé du paludisme en France, *An. atroparvus*, a en effet été décrit comme une espèce pouvant passer l'hiver dans les fermes, s'y nourrissant occasionnellement (Sicart & Escande, 1954 ; Marjolet, 1977). L'espèce de plasmodium la plus dangereuse, *P. falciparum*, était présente depuis longtemps en Europe du sud au 19<sup>ème</sup> siècle (Sallares *et al.*, 2004), mais il est probable que la majorité des cas de paludisme dans les vallées alpines étaient dus à *P. vivax*, espèce supportant mieux les conditions climatiques parfois rudes dans la région. Cette espèce est rarement la cause de la mort chez les paludéens mais de récentes études ont démontré qu'il ne devait plus être considéré comme responsable d'un paludisme bénin (Mendis *et al.*, 2001 ; Picot, 2006).

Comme dans les régions marécageuses d'Angleterre, *P. vivax* a probablement été un facteur de morbidité et de mortalité important dans les vallées alpines, en association à la malnutrition et aux maladies (Hutchinson & Lindsay, 2006). Hormis le paludisme, les populations des vallées alpines ont peu connu les épidémies au 19<sup>ème</sup> siècle. Les épidémies de choléra de 1854 et de 1867 touchèrent peu le département de la Savoie, et touchaient surtout les villes. Il est probable que moins de 1% de la population savoyarde soit décédée du choléra pendant les épidémies en Savoie (Tous, 1976).

### A.3.2. Un message du passé à replacer dans le contexte actuel de changement global

Le cas de la transmission du paludisme dans la vallée de l'Isère n'est pas unique. A travers l'histoire, des témoignages nous rappellent que des mesures liées à la gestion de l'eau ont souvent été prises pour lutter contre les fièvres des marais (Salvagnoli-Marchetti, 1859 ; Gouver, 1883 ; Bertaux 1900). Le drainage des marais Pontins en Italie entre les deux guerres mondiales par le dictateur Mussolini est l'une des plus grandes opérations de ce type et l'une des plus documentée, qui fait suite à de nombreux échecs, notamment au temps des Romains (Linoli, 2005). Dans de nombreux cas, la diminution du paludisme observée suite à la réalisation de ces aménagements, a été suivie d'une recrudescence de la maladie, conséquence de la mauvaise gestion et au délabrement des ouvrages mis en place. D'autres facteurs comme les changements dans les pratiques agricoles, l'urbanisation et le développement des voies de communication ont entraîné par endroits de profondes perturbations des systèmes fluviaux, en lien direct avec des recrudescences du paludisme (Girel, en préparation).



Les progrès dans l'hygiène et la santé au début du 20<sup>ème</sup> siècle, avec notamment la large consommation de dérivés de quinine en traitement anti-paludéen, ont joué un grand rôle dans la disparition du paludisme en Rhône-Alpes, en même temps que l'assainissement des vallées alpines (Marchoux, 1929 ; Charmot, 1997). Le changement des pratiques agricoles, de l'utilisation des terres et l'exode rural ont également contribué à réduire le contact entre populations humaines et Anophèles (Ramsdale & Gunn, 2000). Depuis un siècle, la majorité des zones humides de Rhône-Alpes a disparu, par manque de connectivité avec les cours d'eau endigués, ou tout simplement pour satisfaire au développement de l'agriculture et de l'urbanisation. Actuellement les populations humaines sont concentrées dans les vallées alpines, le long des fleuves, là où subsistent les dernières zones humides de plaine.

Les Alpes sont déjà sensibles aux prémices du réchauffement climatique et les scientifiques prédisent d'ici 2050 la fonte des glaciers, des pluies torrentielles plus fréquentes et l'augmentation de 20% des inondations (Beniston, 2003). Pour prévenir le risque d'inondations dans les vallées urbanisées et industrialisées de Rhône-Alpes, des opérations d'aménagement des cours d'eau sont en projet. Dans la vallée de l'Isère, la dernière crue centennale remonte à 1859 ; elle avait alors noyé l'agglomération grenobloise sous 1m50 d'eau et fait 6 morts. Le Projet Isère Amont prévoit d'utiliser certaines parcelles agricoles de la plaine du Grésivaudan comme zones de débordement contrôlé de l'Isère, en cas de crue, afin de protéger une population de plus de 300 000 habitants d'une catastrophe. Les travaux, prévus à partir de 2008, doivent également permettre d'élargir le lit du fleuve dans certains secteurs, de renforcer les digues fragilisées et de restaurer la ripisylve et les zones humides riveraines (Rouillon, 2006). Ce type de projet d'aménagement, basé sur le retour à une divagation plus libre de la rivière et sur la protection des zones humides, peut favoriser la création d'habitats favorables aux moustiques. Les populations d'Anophèles de Rhône-Alpes, actuellement faibles, pourraient s'en trouver renforcées à l'avenir.

Les entomologistes s'accordent à dire que certaines maladies infectieuses comme le paludisme pourraient s'étendre au-delà de leurs limites septentrionales actuelles, avec le réchauffement annoncé (Sutherst, 2001). *Anopheles* et *Plasmodium* sont sensibles aux variations climatiques, leur développement et leur survie dépendent de la température et de l'humidité (Martens *et al.*, 1995 ; Snow, 1999). Par conséquent une élévation des températures pourrait avoir une influence sur les densités de moustiques et leur capacité vectorielle (Epstein *et al.*, 1998).

La région Rhône-Alpes, parce qu'elle bénéficie de services de contrôle des moustiques et de veille sanitaire efficaces, n'est pas un territoire au potentiel malariogénique fort. Toutefois, au regard de l'impact que pourrait avoir un changement climatique sur les systèmes fluviaux et les populations de moustiques dans la région, l'étude des facteurs à risque pour une ré-émergence du paludisme s'impose.

Le message fort de cette étude historique est que les perturbations humaines sur les cours d'eau peuvent être considérées comme des facteurs à risque pour le retour du paludisme. Comme les nouvelles stratégies d'aménagement hydraulique et de contrôle des crues sont relativement récentes (Green *et al.*, 2000), seules des hypothèses quant à leur impact sur les paysages fluviaux et la possible ré-émergence de maladies infectieuses peuvent être avancées.

## B. La nuisance : mieux la connaître pour mieux la contrôler

**Commentaire [JS1]:** Pb : comment faire 2 parties de taille égale dans ma thèse alors que Coquillett représente ¾ du boulot ??

### Cadre de l'étude

En France, les moustiques ont longtemps transmis des maladies, et leurs populations sont surveillées, encore actuellement, pour prévenir l'émergence de maladies infectieuses dont ils seraient vecteurs. Mais les moustiques, s'ils ne sont pas vecteurs, n'en restent pas moins dérangeants, surtout quand ils sont nombreux à proximité des habitations, des lieux de vie humaine, et c'est avant tout pour cette raison qu'ils sont contrôlés.

Le contrôle des nuisances dues aux animaux est un sujet complexe. Il oppose une volonté d'action née de l'agacement occasionné par une nuisance, à un sentiment de culpabilité lié à la lutte contre un animal qui fait partie intégrante de la Nature, qu'on souhaite préserver. La mission de démoustication doit s'adapter à ces deux points de vue partagés dans la société : contrôler efficacement les moustiques anthropophiles sans nuire à leur environnement, la zone humide et les espèces qu'elle abrite. Pour cela, elle doit cerner au mieux les caractéristiques de la nuisance à contrôler : son origine, son intensité, ses victimes...

### Evaluer la nuisance : l'expérience camarguaise

Dans un souci d'évaluation de l'efficacité de la lutte contre les moustiques et afin de cerner au mieux les attentes de la population sur les sujets de la démoustication et de l'environnement, l'EID Méditerranée commande en 2000 une étude sociologique dans le cadre d'un projet interdisciplinaire Life-Environnement.

L'étude, basée sur la comparaison de deux territoires, l'un démoustiqué (la Petite Camargue), l'autre non démoustiqué (la Camargue) a d'abord montré que la question des moustiques est très liée à celle de la Camargue, et à l'attachement territorial affiché par la population camarguaise (Claeys-Mekdade & Morales, 2000). Le moustique souffre d'une image plutôt négative et la nuisance est plus fortement perçue en zone non démoustiquée, ce qui met en évidence l'efficacité de l'EID Méditerranée. Paradoxalement, la majorité des

Camarguais ne se sentent pas concernés par la démoustication, et certains sont même contre la lutte anti-moustiques sur leur territoire, la nuisance leur assurant une relative tranquillité de la part des touristes en été.

Cette enquête a permis de mettre en évidence les représentations associées au moustique, la perception de la nuisance, et les paradoxes d'un territoire : la Camargue. Elle a apporté des réponses au questionnaire local, mais l'ensemble des conclusions tirées ne s'applique pas à d'autres territoires.

### Evaluer la nuisance : expériences sur le territoire rhône-alpin

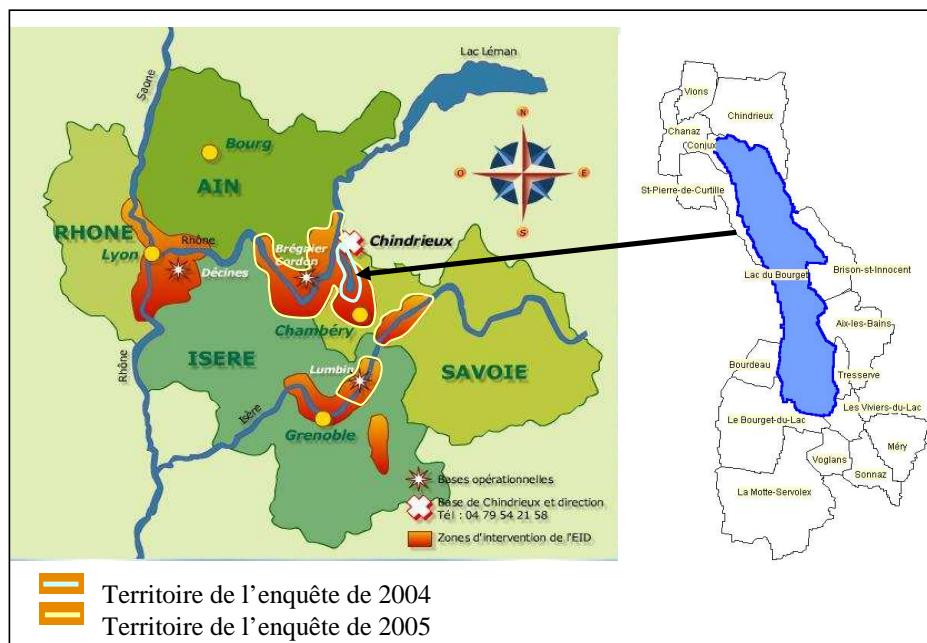
En 2004, l'EID Rhône-Alpes s'intéresse également à l'évaluation de la nuisance par la population du territoire qu'elle traite depuis 40 ans, et par conséquent à l'évaluation de son action. A sa demande, nous initiions une étude sociologique, sur un territoire de 15 communes dans la région du lac du Bourget en Savoie. Ce travail nous sert plus tard de référence pour la réalisation d'une étude plus conséquente, en 2005, concernant cette fois une centaine de communes, soit la moitié du territoire démoustiqué en Rhône-Alpes.

Le premier point de ce chapitre présente le protocole et les résultats de l'étude sociologique réalisée en 2005 en Rhône-Alpes. Dans une deuxième partie, l'apport de la sociologie à la biologie sur la question de la nuisance et de son contrôle sera discuté (à travers les études réalisées en Camargue et en Rhône-Alpes). Enfin la perspective de l'utilisation régulière des techniques de la sociologie dans le cadre des problématiques de démoustication sera évoquée avec la présentation d'un projet d'observatoire régional de la nuisance due aux moustiques.

## B.1. Etude sociologique sur la nuisance due aux moustiques en Rhône-Alpes

### B.1.1. Méthode

L'étude de 2004 s'est articulée autour de deux enquêtes, une pré-enquête qualitative par entretiens semi-directifs avec une dizaine de personnes, et une enquête quantitative, basée sur la diffusion de questionnaires. La pré-enquête a visé à vérifier la pertinence des questionnements de l'enquêteur, et à dégager éventuellement de nouvelles questions, à prendre en compte dans la conception de l'enquête par questionnaires. Ces entretiens préliminaires ont été réalisés en faible nombre ; les témoignages recueillis ne sont donc pas représentatifs de l'opinion publique mais caractéristiques d'une certaine diversité des opinions existantes. En effet les entretiens ont été réalisés avec des personnes particulièrement actives sur le territoire du Pays du lac du Bourget, au niveau politique, économique, ou touristique. Le questionnaire comptant 31 questions a été construit autour de grandes thématiques : les représentations du moustique, la perception de la gêne due aux moustiques, la connaissance et les représentations du contrôle des moustiques, puis pour finir les questions sur l'identité et la catégorie sociale des répondants (annexe). 220 questionnaires ont été diffusés par téléphone auprès de la population des 15 communes du territoire d'étude (figure 7).



**Figure 7** : Carte présentant les territoires d'étude en Rhône-Alpes en 2004 et 2005.

L'étude de 2005 est une enquête quantitative, reprenant en grande partie le questionnaire de l'enquête de 2004, dont 320 ont été diffusés par téléphone, en été pendant la plus forte période de nuisance (annexe). Pour les deux études, l'échantillon de population est représentatif de la population mère selon les critères d'âge, de sexe et de catégories socioprofessionnelles. La taille du territoire échantillonné (102 communes, figure 7) nous a permis d'obtenir des témoignages représentatifs de l'ensemble de la population du territoire démostriqué. Afin d'atténuer les disparités entre villes et petites communes, et pour ne pas négliger le témoignage des populations rurales, concernées elles-aussi par la problématique de démostration, un poids plus important a été affecté au critère de superficie communale qu'à celui du nombre d'habitants par communes, dans le calcul du nombre de questionnaires diffusés par commune.

Les questionnaires ont été conçus, remplis et traités à l'aide du logiciel Sphinx Plus<sup>2</sup>. Chaque variable a été soumise à un tri à plat, c'est-à-dire à un tri simple permettant de relever l'effectif et la fréquence de chaque modalité de réponse, pour chaque variable au sein du pool de réponses. Les variables les plus informatives ont été soumises à un tri croisé qui permet d'analyser les relations entre deux, ou plus de deux variables, considérées simultanément. Cette technique permet de révéler les modalités de réponses les plus fréquemment associées par les répondants, souvent révélatrices du point de vue de la population étudiée. Des analyses en composantes multiples (ACM) ont été réalisées pour dégager des relations entre les réponses à différentes questions parmi les témoignages.

## B.1.2. Résultats

L'enquête de 2005 étant réalisée sur un grand territoire comprenant le territoire d'étude de 2004, et les résultats des deux enquêtes n'étant pas différents, nous ne présentons ici que les résultats traités de 2005.

L'échantillon de population est proche de la population mère mais n'est pas représentatif selon les critères retenus d'âge, de sexe et de catégories socioprofessionnelles. Les femmes sont sur-représentées (60% au lieu de 52%) et les personnes les plus jeunes (15-19 ans) et les plus âgées (>75 ans) de l'échantillon sont sous-représentées. Les inactifs et ouvriers sont également sous-représentés dans notre échantillon.

### ***B.1.2.1. Perceptions et représentations associées au moustique***

#### **« Que vous évoque le mot Moustique ? »**

Les personnes interrogées associent en grande majorité le moustique aux piqûres et à la sensation (« ça gratte » ou « ça gonfle ») qu'elles génèrent, à un désagrément, plutôt qu'à une souffrance. En effet les mots les plus cités à l'évocation du mot « moustique » sont « piqûre » (39%), « gêne » (17%), « démangeaisons » (13%).

#### **« Estimez-vous que le moustique est un animal nuisible ? »**

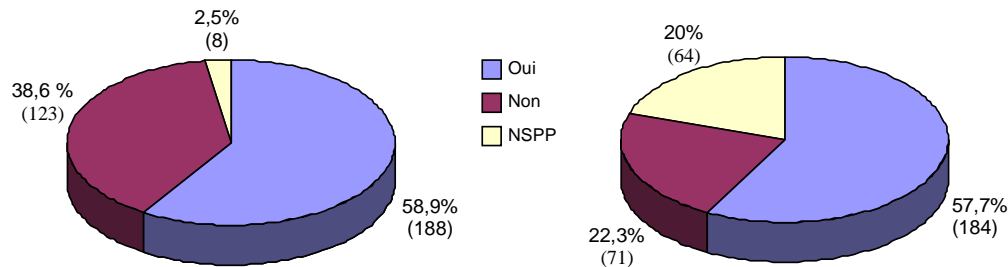
Pour près de 59% des personnes interrogées, le moustique est un animal nuisible (figure 8). Cette réponse est surtout observée chez les femmes et les personnes âgées (plus de 60 ans). La gêne est la première raison évoquée (26%), suivie des piqûres (22%), et de la transmission de maladies (17%) à l'homme. On observe que les deux-tiers des personnes habitant les zones rurales (les secteurs de la vallée de l'Isère et du Haut Rhône) considèrent que le moustique est nuisible, alors que les citadins (habitant Chambéry et Aix-les-bains) sont partagés.

#### **« Selon vous, dans la nature, le moustique a-t-il une utilité ? »**

Plus de la moitié des répondants pensent que le moustique a une utilité dans la nature. Parmi eux, près d'une personne sur deux perçoit le moustique comme un animal à la fois nuisible pour l'homme et utile pour son écosystème. Il s'agit en majorité de personnes d'âge moyen, entre 20 et 60 ans.

Question : « Estimez-vous que le moustique est un animal nuisible ? »

Question : « Selon vous, dans la nature, le moustique a-t-il une utilité ? »



**Figure 8** : Répartition relative des caractères nuisible et utile du moustique dans les témoignages

« En France, pensez-vous que les moustiques transmettent des maladies à l'homme ? »

Il apparaît que la population interrogée est très mal renseignée sur les risques de transmission de maladies à l'homme par les moustiques. 40% d'entre eux pensent que c'est actuellement le cas, contre 44% qui pensent qu'aucune maladie n'est actuellement transmise à l'homme par les moustiques français. Les personnes âgées sont les plus nombreuses à associer le moustique aux transmissions, mais très peu citent des maladies (20 répondants citent le paludisme et 7 le SIDA).

### **B.1.2.2. Perception de la nuisance due aux moustiques**

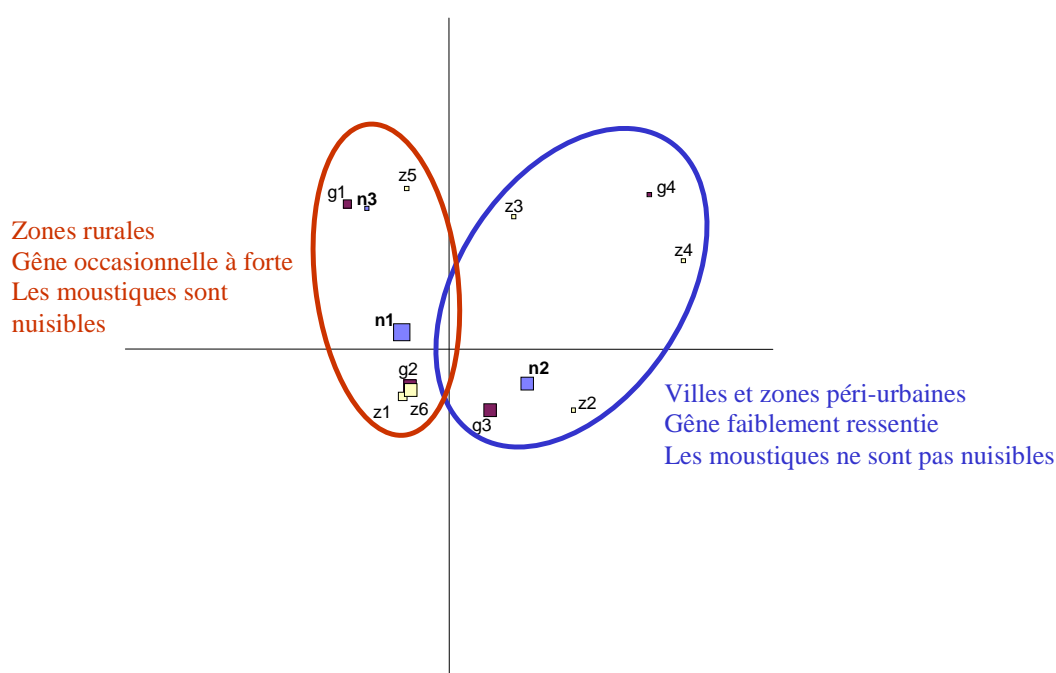
« Etes-vous gêné par les moustiques ? »

Un peu plus de la moitié de l'échantillon est gênée au moins occasionnellement, 16% se disent souvent gênés. La nuisance n'est pas fortement ressentie à l'échelle du territoire d'étude mais les moustiques restent un inconfort dans la région pour une partie de la population. Un contraste s'établit dans l'intensité de la gêne ressentie en fonction du lieu d'habitation, les personnes habitant en zones rurales se déclarant beaucoup plus facilement gênées que les personnes des villes ou zones péri-urbaines.



« Comment définiriez-vous votre sensibilité aux moustiques? »

La majorité des répondants est sensible aux moustiques, ils sont moins de 40% à déclarer les supporter. Les hommes sont de façon générale plus tolérants envers ces insectes que les femmes. La sensibilité aux moustiques déclarée par les répondants est d'autant plus élevée que la gêne ressentie est forte (figure 9). De même les personnes les plus sensibles déclarent à 86% que le moustique est nuisible, contre 28% seulement pour les plus tolérantes.



**Figure 9** : Analyse des correspondances multiples représentant les différences de sensibilités des personnes habitant en zones rurales et urbaines

**Légende** : La carte montre les positions des 13 modalités.

25.3% de la variance est expliquée par les deux axes représentés.

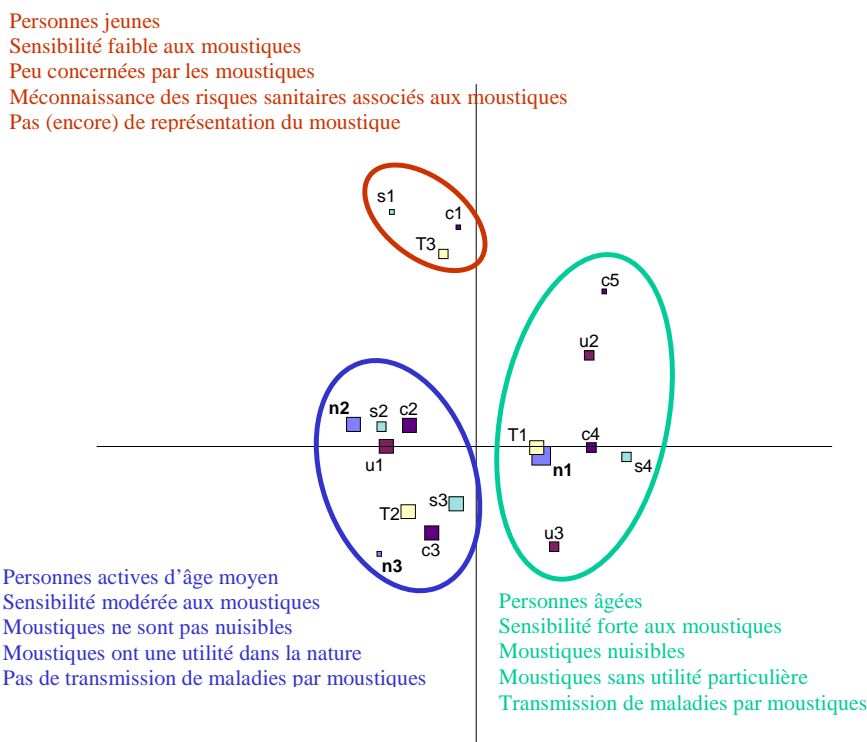
Les non-réponses ont été ignorées.

Variables : - Nuisible : n1 : Oui; n2 : Non; n3 : NSPP

- Gêne : g1 : Souvent, g2 : Occasionnellement, g3 : Rarement, g4 : Jamais

- Zone : z1 : vallée de l'Isère, z2 : Chambéry, z3 : sud du lac, z4 : Aix les Bains, z5 : Chautagne, z6 : Beley-Yenne

Le territoire d'étude semble touché de façon hétérogène par la nuisance due aux moustiques. En zones rurales la gêne ressentie est plus forte qu'en ville, et elle est associée à une sensibilité plus forte de la population aux moustiques.



**Figure 10** : Analyse des correspondances multiples représentant 3 catégories de personnes aux représentations et sensibilités différentes

Légende : La carte montre les positions des 18 modalités.

23.3% de la variance est expliquée par les deux axes représentés.

Les non-réponses ont été ignorées.

Variabiles : - Nuisible : n1 : Oui; n2 : Non; n3 : NSPP

- Utile : u1 : Oui; u2 : Non; u3 : NSPP

- Transmission maladies : T1 : Oui; T2 : Non; T3 : NSPP

- Classe d'âge : c1 : 15-19 ans; c2 : 20-39 ans; c3 : 40-59 ans; c4 : 60-74 ans; c5 : + de 75 ans

- Sensibilité : s1 : Vous les ignorez s2 : Vous les tolérez

s3 : Vous êtes rapidement importunés s4 : Vous trouvez cela insupportable

La sensibilité aux moustiques semble aussi être liée à l'âge des personnes interrogées et à la représentation qu'ils ont du moustique (figure 10). Nous identifions trois catégories de personnes qui affichent une sensibilité différente à ces insectes :

- Les personnes âgées (plus de 60 ans) pour qui le moustique est nuisible et vecteur de maladies, sont les plus gênées ;
- Les classes d'âge moyen (20-60 ans) qui associent davantage le moustique à un inconfort passager qu'à une nuisance ou un risque sanitaire, et lui attribuent une utilité dans la nature, affichent une sensibilité modérée ;

- Les jeunes (15-20 ans), qui se sentent peu concernés par les moustiques, la nuisance et les risques sanitaires qui lui sont attribués, disent tolérer, voire même ne pas remarquer la présence de ces insectes.

### ***B.1.2.3. Connaissance et perception sociale de la démoustication***

53% des personnes interrogées disent savoir que leur commune est démoustiquée. Les gens savent que leur commune est démoustiquée parce qu'ils voient les agents traiter chez eux ou dans leur voisinage, ou parce qu'ils habitent à côté d'un établissement de l'EID. Ce chiffre est au plus bas dans les villes, ce qui s'explique par une action plus discrète : il y a moins d'interventions chez les particuliers car peu d'entre eux possèdent un jardin, et plus d'interventions invisibles comme le traitement des vides sanitaires. La majorité de la population ignore qu'une structure est chargée de démoustiquer, seuls 14% parlent d'une entreprise de démoustication. 56% des personnes ne peuvent pas répondre quand on leur demande comment procèdent les agents EID. Ceux qui répondent parlent de traitement par pulvérisation de produits dans les points d'eau stagnante. La réponse est exacte mais vague, car peu d'entre eux savent quel type d'insecticide (chimique, biologique) est utilisé. Il n'empêche que 41% des répondants attribuent à la démoustication un effet nocif, sur l'environnement (100%) et sur la santé (67%).

Les personnes qui ont des attentes envers l'EID sont de deux types :

Celles qui ressentent une gêne, et veulent plus d'efficacité de l'EID ; ils sont souvent demandeurs (45%) d'informations sur l'établissement, les moustiques, les moyens de lutte employés.

Celles qui ne sont pas vraiment gênées qui désirent des informations du même ordre (33%) et certains mentionnent parmi leurs attentes la prise en compte, pendant les traitements, du respect de l'environnement.

## B.2. Apports de la sociologie à la problématique biologique de démoustication

Les résultats de cette enquête montrent que les représentations du moustique, la perception de la gêne ressentie et la connaissance de la démoustication sont très variées au sein de la population d'étude de Rhône-Alpes. Comment expliquer que certains considèrent le moustique comme un animal nuisible, d'autres comme un animal utile, d'autres encore comme nuisible et utile à la fois ? La perception d'une gêne due aux moustiques est-elle uniquement liée à de fortes densités de moustiques proches des habitations des plaignants, ou fait-elle intervenir la sensibilité personnelle et le vécu de chacun ? La connaissance de la biologie des moustiques, de la démoustication et de ses modalités fait-elle partie du bagage culturel des individus ou est-elle motivée par une gêne ressentie ?

Le contrôle de la nuisance due aux moustiques étant un service à la population, il est nécessaire de comprendre les raisons de ces différents points de vue afin de cerner les attentes réelles des individus et adapter l'effort de démoustication en retour. La dimension sociologique de cette étude apporte des explications aux interrogations et paradoxes soulevés par les questionnaires de populations de moustiques, de formation biologiste.

### B.2.1. Le dualisme entre visions anthropocentrique et biocentrique du rapport aux moustiques

La complexité des représentations liées aux moustiques s'explique par la cohabitation au sein de la population de deux groupes de personnes aux regards qui s'opposent, l'un plutôt anthropocentrique, l'autre plutôt biocentrique. La culture anthropocentrique est l'héritage de la société à dominante agricole du 19<sup>ème</sup> siècle. L'anthropocentrisme appréhende la nature comme une ressource au service de l'homme, qui se doit de la prélever, la domestiquer, la conquérir, transformer en utile (pour lui) ce qui ne l'est pas, détruire ce qui ne peut être soumis à son contrôle. Ainsi, l'assainissement des zones humides, ces dernières décennies, au profit des surfaces agricoles et la lutte contre les moustiques qui s'est organisée pour le confort de la société, étaient guidées par une conception anthropocentrique du rapport de l'homme à la nature. La part de la population qui qualifie le moustique de nuisible et nie son utilité adhère à cette vision anthropocentrique.

A l'opposé, la vision biocentrique est récente, née à la fin des années 1960, lors des mouvements contestataires estudiantins et à la faveur d'un meilleur accès aux connaissances en sciences de la vie. Elle est relayée ensuite par les nouvelles couches moyennes intellectuelles et le développement des politiques environnementales à l'échelle internationale. Le biocentrisme place la nature au cœur de ses préoccupations, rejetant l'homme au rang de destructeur, pollueur, perturbant un équilibre écosystémique fragile. Ainsi une part de la population considère que les moustiques sont utiles, et rejettent le qualificatif « nuisible » qu'ils trouvent trop fort et inadapté.

Ainsi les témoignages recueillis dans notre enquête sur la population de Rhône-Alpes nous permettent d'identifier deux catégories de personnes, l'une à culture plutôt anthropocentrique, l'autre biocentrique, et de les caractériser :

➤ Sous-population à vision anthropocentrique du rapport à la nature et aux moustiques :

Elle regroupe surtout les personnes les plus âgées de l'échantillon de population, notamment celles qui sont âgées de plus de 60 ans. Cette tranche de la population est à dominante rurale, son niveau d'étude est très variable et elle associe les moustiques à la transmission de maladies. Cette sous-population reste attachée à une culture anthropocentrique où l'espace rural est exploité par l'homme, où le moustique est considéré comme source de nuisance et lié à un environnement sale et nauséabond (marais). Les peurs ancestrales de maladies liées au moustique (fièvres, paludisme) persistent et sont renforcées dans l'inconscient collectif par des craintes liées à une actualité plus récente et très médiatisée (Chikungunya, grippe aviaire, SIDA).

➤ Sous-population à vision biocentrique du rapport à la nature et aux moustiques :

Elle est plus jeune puisque la majorité des personnes âgées de 20 à 60 ans y adhère. La majorité des urbains et péri-urbains interrogés en font partie, et ils sont plus nombreux à avoir fait des études supérieures que dans l'autre sous-population. Cette catégorie de personnes redoute moins la transmission de maladies par les moustiques de France métropolitaine, même si elle apparaît mal informée à ce sujet. On retrouve donc dans cette sous-population les différents aspects d'une conception biocentrique du rapport au moustique : indépendamment de la gêne ressentie, le moustique est considéré comme utile pour

l'environnement, notamment pour le rôle, la place qu'il a dans le réseau trophique d'un écosystème. Les piqûres et allergies sont certes gênantes mais le mot nuisible est pour la plupart un qualificatif trop fort qu'ils substituent à « momentanément et localement proliférant ».

Une troisième sous-population émerge dans les résultats de l'enquête, regroupant les individus les plus jeunes du panel (15-20 ans), en général désintéressés et peu concernés par la question des moustiques et de la démoustication. Les attentes de ce groupe envers la démoustication sont donc négligeables et ne font pas l'objet d'une analyse dans ce chapitre.

Une part des individus de l'échantillon global (28%) qualifie tout à la fois le moustique d'utile et de nuisible, partagés entre le subjectif (représentation du moustique comme maillon de la chaîne alimentaire) et l'objectif (piqûres, démangeaisons, allergies provoquées par les insectes). Si deux regards s'opposent au sein de la population, l'un empreint de la culture anthropocentrique, l'autre d'une vision biocentrique, ils cohabitent parfois chez le même individu.

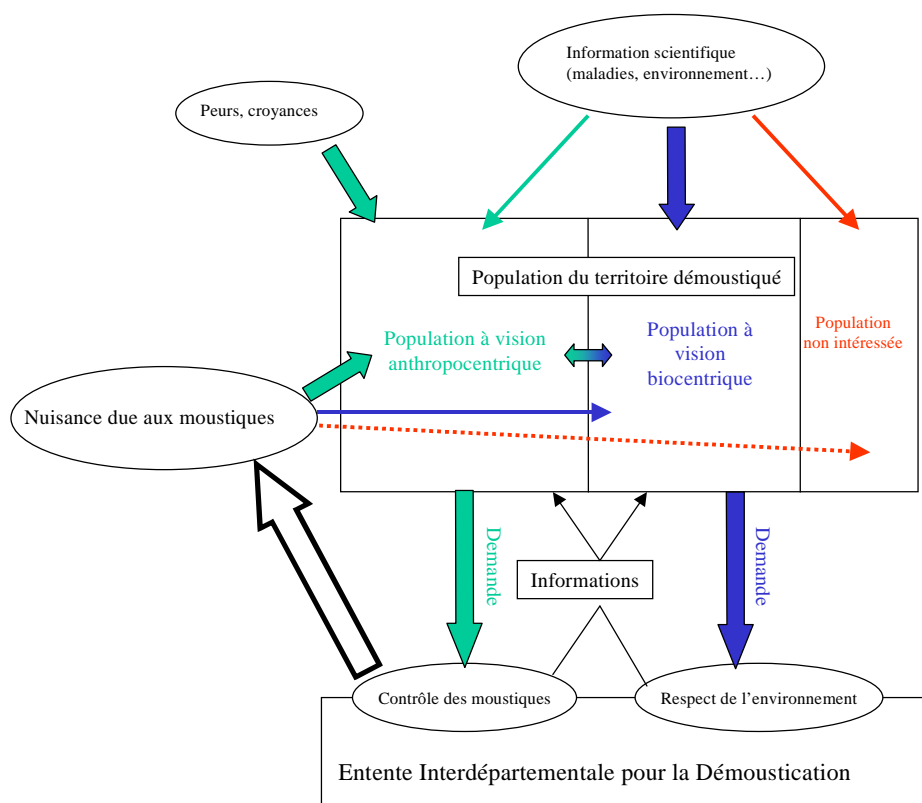
### B.2.2. Dualisme anthropocentrisme / biocentrisme et démoustication

L'EID Rhône-Alpes se définit comme un établissement de lutte contre les moustiques et de gestion des zones humides. La première mission est donc un service rendu à la société, la deuxième un service rendu à l'environnement. Mais plutôt que de s'opposer, ces deux missions se complètent dans la démarche de l'EID : un bon entretien des zones humides les rendant moins productives en moustiques (Besnard & Gruffaz 1999).

Dans sa mission première de démoustication, l'établissement doit cerner au mieux le niveau de la nuisance ressentie par la population pour répondre à ces attentes en matière de confort. Le contrôle des moustiques est guidé par une demande sociétale à la fois anthropocentrique et biocentrique, ce qui contraint l'EID à trouver un compromis entre une démoustication efficace et le respect de l'environnement. A l'heure actuelle, une forme de compromis existe : il s'agit d'une stratégie de lutte contre les stades larvaires de moustiques, par épandage du bactério-insecticide *Bti*. Cet insecticide sélectif est utilisé depuis plus de 20 ans en Amérique du Nord et en Europe et les études d'impact réalisées s'accordent à dire que

les différentes formulations de *Bti* sont inoffensives pour les organismes non cibles des milieux aquatiques, hormis les Simulidés et Dixidés, taxons de l'ordre des Diptères, très proches des Culicidés (Merritt 1989, Becker & Margalit 1993, Boisvert & Boisvert 2000). Le *Bti* n'ayant pas d'effet néfaste à court terme pour l'environnement et la faune compagne des moustiques, l'utilisation exclusive de cet insecticide par l'EID en Rhône-Alpes répond bien aux attentes d'une partie de la population.

Les enquêtes en Camargue et en Rhône-Alpes ont certes mis en évidence la cohabitation des deux catégories de personnes définies précédemment dans la population, mais elles montrent aussi une forte tendance de la société à adopter une conception biocentrique du rapport à la nature (Sérandour & Claeys-Mekdade, 2007). Cette tendance s'accompagne d'un intérêt grandissant pour les enjeux sanitaires et environnementaux, grâce à une plus grande accessibilité aux informations d'origine scientifique. La persistance de peurs et de croyances liées aux moustiques dans l'inconscient de personnes souvent âgées devrait s'atténuer dans le futur à la faveur d'une meilleure information collective (figure 11).



**Figure 11** : Relations entre la nuisance due aux moustiques, l'EID, et la population du territoire traité

**Figure 11** : Relations entre la nuisance due aux moustiques, l'E.I.D. et la population du territoire traité.

A l'avenir, il est donc probable d'observer un décalage des représentations de la société vers une vision plutôt biocentrique du rapport homme / nature. L'appréciation des nuisances ressenties et l'adaptation des traitements (doses, fréquence...) aux attentes de la population en seraient alors facilitées pour l'EID.

### **B.3. Perspectives : un projet d'observatoire de la nuisance**

Les expériences apportées par une succession d'enquêtes sociologiques menées ces dernières années sur différents territoires (Région Camarguaise : Claeys-Mekdade & Nicolas, 2002 ; Région Rhône-Alpes : Sérandour & Claeys-Mekdade, 2004 et 2005 ; Golfe du Morbihan : Huneau, 2006) sont riches en enseignements. Elles ont permis de souligner l'intérêt d'inclure des techniques empruntées aux sciences sociales dans le traitement de problématiques biologiques. En particulier, ces enquêtes ont donné une image générale de la nuisance due aux moustiques ressentie sur chaque territoire d'étude, et ont parfois permis d'identifier des localités plus touchées. Ces informations sont très intéressantes pour les opérateurs de démoustication, mais elles sont le reflet d'une situation limitée dans l'espace et le temps. C'est pourquoi l'idée de procéder régulièrement à des enquêtes sociologiques sur des territoires démoustiqués est séduisante pour les EID car elle pourrait permettre un suivi année après année de la nuisance et de son évolution. Utilisé en complément des suivis de populations de moustiques sur le terrain, l'outil sociologique est un angle essentiel de l'observatoire régional de la nuisance.

Les 3 angles de l'observatoire :

#### **1. Un protocole d'enquête sociologique adapté aux besoins du gestionnaire :**

L'utilisation de l'outil sociologique est essentielle pour la collecte des témoignages et des attentes de la population en matière de démoustication et d'information. Un protocole clair d'enquête sociologique est établi pour le suivi régulier des perceptions de la population, de manière à avoir une estimation fiable de la nuisance ressentie sur le territoire traité et de son évolution temporelle (Sérandour, 2006).



- Définition du territoire d'étude :

Le territoire d'étude correspond à l'ensemble du territoire sur lequel une EID désire évaluer la nuisance perçue, soit en général l'ensemble des communes de sa zone d'action. Certaines zones du territoire peuvent faire l'objet d'un effort d'enquête plus important, en fonction du degré de précision dans l'évaluation de la nuisance attendu par l'opérateur.

- Définition de la population d'étude :

L'échantillon de population interrogé doit être représentatif de la population du territoire d'étude, selon les critères de l'âge, du sexe et des catégories socio-professionnelles (échantillonnage par quotas). Toutefois, les personnes d'âge inférieur à 15 ans peuvent être écartés de la population d'étude car leur incompréhension ou leur désintérêt pour l'enquête risquerait de biaiser les résultats.

- Choix du type d'enquête :

Afin d'obtenir un nombre suffisant de témoignages sur l'ensemble du territoire d'étude et donc de garantir la fiabilité des informations recueillies, le type d'enquête le mieux adapté est le questionnaire téléphonique. L'expérience des enquêtes en Camargue, en Rhône-Alpes et dans le Golfe du Morbihan montre que la diffusion d'un questionnaire simple et rapide à remplir est un moyen efficace de contacter un grand nombre de personnes en peu de temps. Les thématiques abordées dans ce questionnaire sont fonction des attentes de l'EID, mais elles visent en général à évaluer si une gêne due aux moustiques est ressentie, son intensité, sa situation dans l'espace et dans le temps (extérieur/intérieur des bâtiments, période de l'année, moment de la journée), l'origine probable des moustiques en cause. Des questions visant à évaluer la notoriété de l'EID ou la perception de la démoustication peuvent être ajoutées. Enfin des questions relatives à l'adresse géographique et à l'identité des répondants sont nécessaires pour satisfaire aux critères de représentativité de l'échantillon.

Il est également envisageable de faire appel à un réseau de personnes référentes dans différentes localités, témoins particuliers de la nuisance due aux moustiques qui pourraient fournir des informations exhaustives sur la nuisance et capturer les moustiques en cause.

## **2. Le suivi des populations de moustiques sur le terrain :**

Le suivi des populations larvaires de moustiques dans les gîtes traités par les agents, et les captures régulières d'adultes devraient permettre de renforcer les données recueillies par l'enquête sociologique. Les captures d'adultes doivent être renouvelées tout au long de la saison favorable et le maillage du territoire choisi pour ce suivi doit être le même que dans le protocole d'enquête sociologique. Le suivi de la dynamique des populations permet d'estimer les densités de populations de moustiques et donne une idée du potentiel de nuisance à proximité des gîtes.

## **3. Le recueil d'informations de plaignants :**

Les EID recueillent chaque année des centaines de témoignages de personnes déclarant une nuisance. Le recueil d'informations précises concernant le lieu, le moment de cette gêne, et l'insecte en cause sont nécessaires, ainsi que le déplacement d'un agent EID chez le plaignant pour constatation de la nuisance. Dans ce cas, la capture et la détermination des moustiques en cause permettent de caractériser la source de la nuisance.

Les intérêts de l'observatoire :

- L'observatoire permet une évaluation de l'intensité de nuisance ressentie par la population ;
- Il permet d'avoir une vision, chaque année, à la fin de l'été, de l'efficacité du contrôle de la nuisance, à l'échelle du territoire régional ;
- Cet outil a une valeur prédictive pour le gestionnaire qui peut anticiper certains épisodes de nuisance ;
- Il peut mettre en évidence l'apparition de foyers de nuisance ;
- L'intégration dans un système d'informations géographiques (SIG) des informations issues des témoignages et des suivis de terrain au niveau des gîtes et des habitations permet de visualiser l'évolution spatiale et temporelle de la nuisance et des populations de moustiques, année après année ;

- Au fil des années, l'observatoire permet de suivre l'évolution des gîtes, des types de nuisance et la dynamique des populations de moustiques (intérêt non négligeable compte-tenu du changement climatique qui s'amorce et qui pourrait avoir des conséquences sur la distribution et le cycle de vie des espèces de Culicidés) ;
- A travers les enquêtes sociologiques, les EID ont l'opportunité de renforcer leur communication directement avec les populations des communes traitées, et notamment de mieux les informer.

## Conclusion

La démoustication a pour double mission de concilier les intérêts humains et les intérêts environnementaux en contrôlant les populations de moustiques sans nuire à leur environnement. Pour cela les EID s'intéressent depuis quelques années aux outils leur permettant d'une part de cerner les attentes de la société en matière de démoustication, et d'autre part d'évaluer les nuisances ressenties. Actuellement, au vu des résultats d'enquêtes réalisées dans les différents territoires d'action des EID françaises, les techniques sociologiques apparaissent comme des outils pertinents. La possibilité de les utiliser au service d'observatoires régionaux de la nuisance est séduisante, même si l'intégration de protocoles sociologiques dans des problématiques biologiques n'en est qu'au stade expérimental.

L'utilisation de ces techniques doit tenir compte de leurs limites qui sont liées à la difficulté d'évaluer la fiabilité des témoignages. Ceux-ci peuvent être biaisés par diverses raisons : la réceptivité du répondant à l'enquête, sa sensibilité personnelle par rapport aux moustiques, son vécu, son capital socio-culturel, la localisation de son domicile... Les témoignages, qui sont les données de base des enquêtes, sont donc un reflet plus ou moins fidèle d'une nuisance réelle. Les enquêtes sociologiques de ces dernières années ont montré également une limite dans la précision des informations recueillies, en ce qui concerne les questions de caractérisation des nuisances ressenties. Des questions faisant appel à des souvenirs confus des répondants (heure à laquelle la nuisance est ressentie ? Taille de l'insecte responsable de la gêne ?...) trouvent le plus souvent des réponses évasives. Par conséquent, le suivi des populations de moustiques (le genre *Coquillettidia* par exemple, dont la localisation et le contrôle sont difficiles pour les EID) ne pourrait reposer sur les seules

informations fournies par les enquêtes par questionnaires. Les informations issues des enquêtes n'en sont pas moins précieuses et sont à compléter par une bonne connaissance des populations de moustiques sur le terrain.

## 2<sup>ème</sup> partie :

### **Biologie et contrôle des moustiques du genre *Coquillettidia***

En 2000, la population savoyarde à proximité du lac du Bourget a subi une forte nuisance dans la période estivale liée à l'émergence de moustiques adultes du genre *Coquillettidia* (communication personnelle, EID). Les espèces *Coquillettidia* (*Coquillettidia*) *richiardii* (Ficalbi, 1889) et *Coquillettidia* (*Coquillettidia*) *buxtoni* (Edwards, 1923) ont été très peu étudiées en France, car elles ont rarement été responsables de nuisances avant la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. A plusieurs reprises depuis les années 1970, des épisodes de nuisances ont toutefois attiré l'attention des EID sur ces moustiques. Ainsi, les premières études concernant *Cq. richiardii* étaient motivées par des épisodes de nuisances importants et la découverte de nouvelles zones colonisées sur le littoral méditerranéen (Rioux *et al.*, 1966 ; Cousserans & Guille, 1974 ; Guille, 1976 ; Moussiegt, 1986). Une nouvelle vague de nuisance due à ces espèces a été observée à Montpellier en été 1998, en pleine coupe du monde de football. Cette nuisance, à chaque fois locale, est fortement ressentie une année, diminue, puis un nouveau pic apparaît quelques années plus tard.

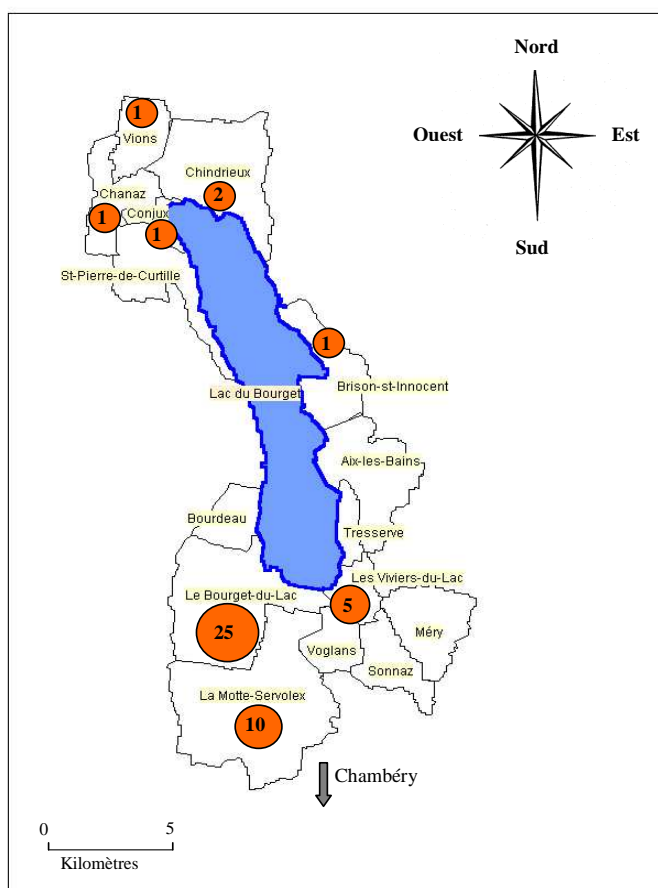
Ce caractère épisodique semble indiquer une dynamique de populations explosive certaines années, ce qui a soulevé des interrogations quant au potentiel invasif des populations rhône-alpines de *Coquillettidia* suite à la nuisance ressentie en 2000 (Sérandour, 2003). Il existe plusieurs définitions du terme « espèce invasive », mais toutes s'accordent sur le fait qu'il s'agit d'une espèce exogène, c'est-à-dire établie au-delà de son aire de distribution naturelle, le plus souvent introduite par l'homme. La description des espèces *Cq. buxtoni* et *Cq. richiardii* en région Rhône-Alpes (Roman & Ahrary, 1970) et dans le sud de la France (Rioux *et al.*, 1966) est antérieure aux premiers épisodes de forte nuisance, et tend à prouver qu'elles sont naturellement établies dans ces régions. Le qualificatif « invasif » n'est donc pas adapté à ces populations de moustiques, mais leur potentielle prolifération locale et/ou temporelle nous a conduit à entreprendre une prospection de la région Rhône-Alpes entre 2000 et 2007.

Les populations connues sont réparties dans cinq départements (Ain, Isère, Rhône, Savoie et Haute-Savoie) et apparaissent très distantes les unes des autres, sauf autour du lac du Bourget en Savoie. La figure 12 présente la répartition des sites où des individus du genre *Coquillettidia* (larves et/ou adultes) ont été récoltés pendant cette période. C'est en effet au sud et au nord du lac que les nuisances à *Coquillettidia* ont été ressenties depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle. Cette nuisance s'explique par la présence de gîtes larvaires très productifs dans un secteur accueillant la moitié de la population du département (figure 13).



**Figure 12** : Répartition des sites où des larves et/ou adultes de *Coquillettidia* ont été capturés en Rhône-Alpes entre 2000 et 2007

Au-delà de la nuisance générée, il existe un risque sanitaire lié à la multiplication des cas d'allergies chez des personnes sensibles, lors des booms démographiques des populations de *Coquillettidia*. *Cq. richiardii* a par ailleurs été décrite comme vecteur du virus de la fièvre du Nil Occidental en Europe de l'Est (Hubalek & Halouzka, 1999 ; Higgs *et al.*, 2004). L'espèce cousine d'Amérique du Nord *Coquillettidia perturbans* (Walker, 1856) est, quant à elle, vecteur de l'encéphalite équine de l'Est et du Virus du Nil Occidental (Crans et Schulze, 1986 ; Godsey *et al.*, 2005). La connaissance de ces moustiques représente un enjeu majeur au vu de la nuisance et du risque sanitaire qu'ils peuvent représenter, car le contrôle efficace de leurs populations est actuellement impossible.



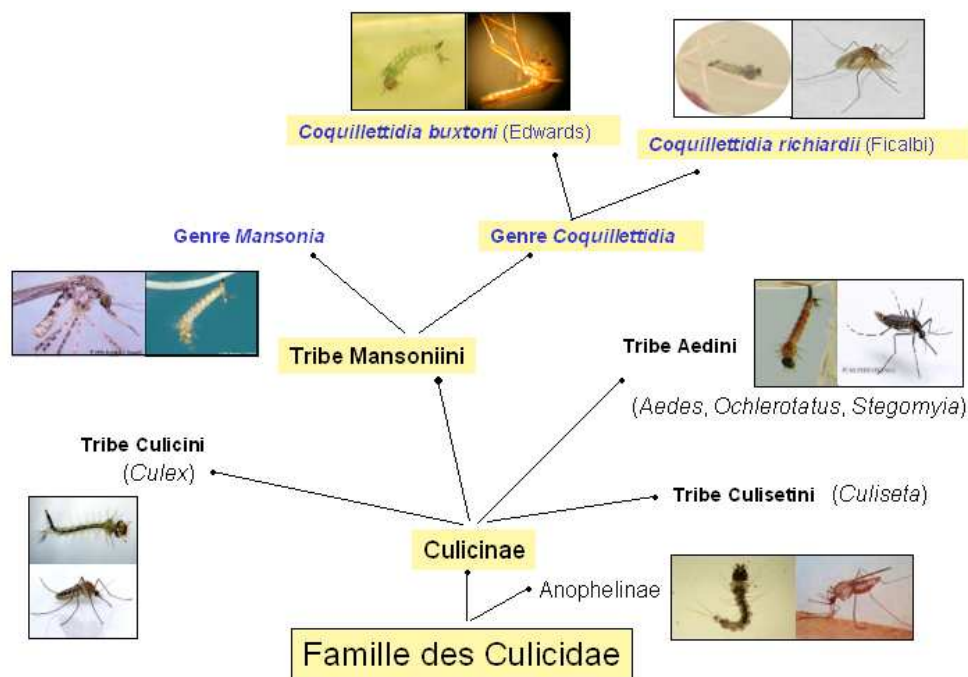
**Figure 13** : Spatialisation de la nuisance à *Coquillettidia* autour du lac du Bourget (73) entre 1997 et 2000.

En orange est reporté le nombre de plaintes d'habitants gênés par *Coquillettidia* pendant cette période.

1 à 25 individus ont été capturés sur les lieux de nuisance, soit 3-4 adultes en moyenne.

## Biologie particulière des moustiques du genre *Coquillettidia*

D'un point de vue systématique, on retrouve des larves de moustiques possédant un siphon respiratoire modifié pour perforer les racines de végétaux aquatiques dans les genres *Mansonia* et *Coquillettidia*, et quelques espèces du genre *Mimomyia* (Van den Assem, 1958). Ces moustiques font partie de la sous-famille des Culicinae et de la tribu des Mansoniini (figure 14). Les espèces du genre *Mansonia* sont réparties dans les régions tropicales du globe ; leurs larves percent les racines de la végétation flottante (Laurence, 1960). Le genre *Coquillettidia* est plus largement répandu (Afrique, Asie, Australie, Europe, Amérique) et les espèces *Cq. perturbans* (Canada, Etats-Unis) et *Cq. richiardii* (Europe) sont parmi les plus documentées.

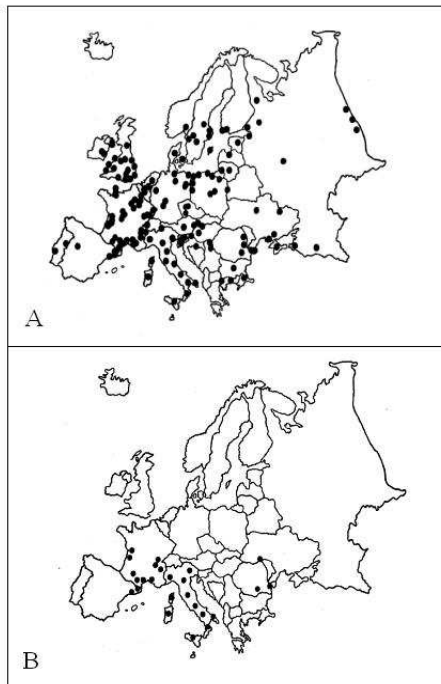


**Figure 14** : Position systématique de *Coquillettidia richiardii* et *Coquillettidia buxtoni* dans la famille des Culicidae.

Les espèces *Cq. richiardi* et *Cq. buxtoni* ont une large répartition en Europe, même si la limite nord de l'aire de répartition de *Cq. buxtoni* semble plus méridionale (figure 15 ; Guille, 1976 ; Ramsdale & Snow, 2001, Trari *et al.*, 2002). Cette espèce est beaucoup moins documentée que *Cq. richiardi*, ce qui peut s'expliquer par une confusion des deux espèces aux stades larvaires qui fréquentent les mêmes gîtes, *Cq. buxtoni* étant prise pour *Cq. richiardi* (Gabinaud & Sinègre, 1968 ; figure 16).

**Commentaire [MSOffice2]:** A enlever, redondant avec carte

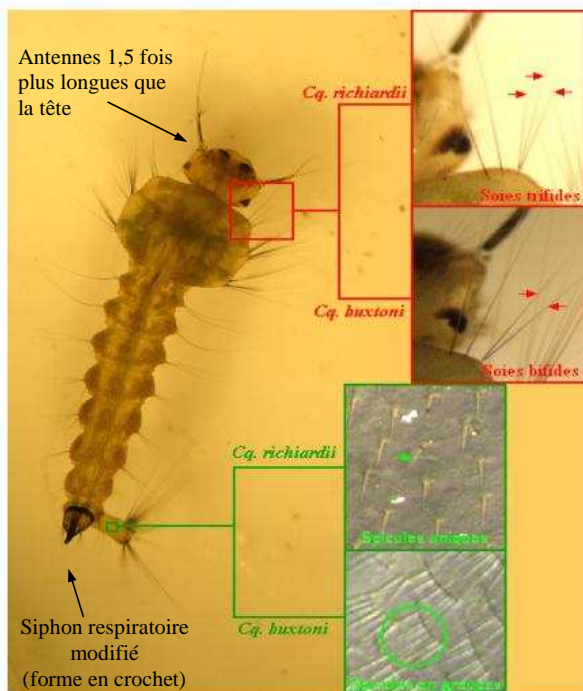




**Figure 15 :**

Répartition géographique de *Coquillettidia richiardii* (A) et *Coquillettidia buxtoni* (B) en Europe.

D'après Ramsdale & Snow (2001).



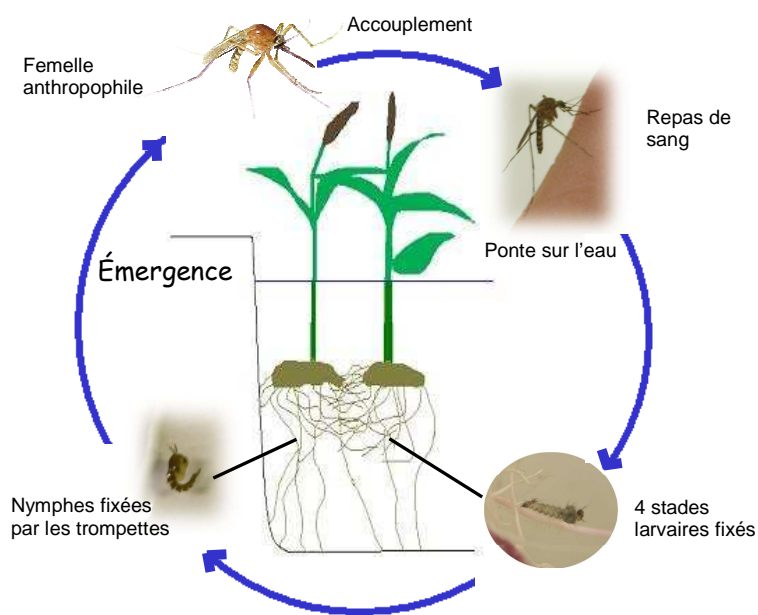
**Figure 16 :**

Caractéristiques morphologiques d'une larve de *Coquillettidia* et critères de détermination entre les espèces *Cq. richiardii* et *Cq. buxtoni*.

Les espèces du genre *Coquillettidia* sont univoltines à nos latitudes (Guille, 1976). L'émergence a lieu de juin à septembre pour les femelles et de juin à août pour les mâles

(figure 17). Après accouplement, les femelles effectuent un repas sanguin sur un hôte humain, un mammifère ou un oiseau, pour la maturation des œufs. La ponte peut toutefois être autogène ; elle est déposée à la surface de l'eau sous forme de nacelle (Colas-Belcourt, 1943).

Les 4 stades larvaires et le stade nymphal aquatiques vivent en profondeur dans un substrat boueux riche en matière organique, se nourrissant principalement de microorganismes (Laurence, 1960). L'habitat particulier des larves est contraint par le manque d'oxygène, et leur survie dépend de leur capacité à puiser l'oxygène circulant dans les méats aérifères développés par les racines. Ce mode de vie est rendu possible par l'adaptation morphologique du siphon de la larve (des trompettes respiratoires pour les nymphes) en appareil de perçage des racines des hélophytes, et par un métabolisme ralenti des larves assimilable à une diapause (Burton, 1965 ; Guille, 1976 ; Bosak & Crans, 2002).



**Figure 17** : Cycle de vie de *Coquillettidia*

## Problématique

L'écologie particulière des stades aquatiques pose problème pour leur contrôle. En effet, leur localisation est difficile puisqu'elles ne remontent pas en surface pour respirer comme les larves des autres espèces. De plus, les traitements anti-larvaires sont inefficaces contre ces espèces car l'insecticide est stoppé par l'épais matelas de sédiments, de racines et de débris végétaux qui protège les larves. Le traitement des gîtes au téméphos (formulation ABATE 500 E) à des concentrations 8 fois supérieures à celles utilisées contre les *Aedes* et *Culex* ne permet pas d'éliminer toutes les larves de *Coquillettidia* (Sinègre *et al.*, 1971 ; Rey *et al.*, 2001 ). Ces stratégies de lutte ne sont donc pas envisageables du fait de la faible sensibilité des *Coquillettidia* aux insecticides et du danger qu'elles représentent pour la faune compagne. Seule la lutte physique sur la végétation aquatique ou par assèchement des gîtes a jusqu'à présent montré son efficacité pour contrôler les *Coquillettidia*, mais ces actions sont rarement réalisables car préjudiciable pour la grande diversité biologique inféodée à ces milieux humides (Armstrong, 1941).

Dans le cadre de ce travail de thèse, des recherches ont été menées dans le but d'apporter des connaissances sur la biologie de ces moustiques particuliers. En effet, une meilleure connaissance du choix du lieu de ponte, du comportement larvaire et du mode de fixation, nous permettrait d'expliquer les raisons de l'échec du contrôle des populations larvaires.

La première raison de l'inefficacité de la lutte contre *Coquillettidia* est la difficulté de localisation des populations larvaires. La première partie de ce chapitre présente une étude de terrain sur 4 ans visant à caractériser les gîtes larvaires à *Coquillettidia* et à dégager des indicateurs de présence de ces moustiques *in natura*. L'étude s'est naturellement concentrée au niveau des sites où la présence de ces espèces est la mieux connue, autour du lac du Bourget en Savoie.

La deuxième raison de l'échec des traitements anti-larvaires est liée à l'écologie des larves, dont l'habitat est situé en profondeur au niveau des racines des plantes aquatiques auxquelles elles se fixent. De ce fait, les larves vivent sous un tapis de débris végétaux dont l'épaisseur est suffisante pour constituer un obstacle aux traitements insecticides conventionnels. La deuxième partie de ce chapitre présente une série d'expérimentations en laboratoire visant à comprendre les mécanismes régissant l'orientation des larves vers les

zones profondes et la relation larves / plantes hôtes permettant leur survie dans cet habitat anoxique.

Enfin, la troisième et dernière partie présente la mise au point d'une nouvelle stratégie de contrôle des populations de *Coquillettidia*. Ce traitement insecticide a été conçu afin de contourner la barrière physique constituée par les débris végétaux et les sédiments qui arrêtent la propagation des matières actives jusqu'au lieu de vie des larves de *Coquillettidia*. Cette stratégie a été mise au point et testée en laboratoire afin d'étudier les mécanismes de transfert jusqu'aux zones profondes sédimentaires et d'évaluer son efficacité insecticide.

## **A. Caractérisation des gîtes larvaires**

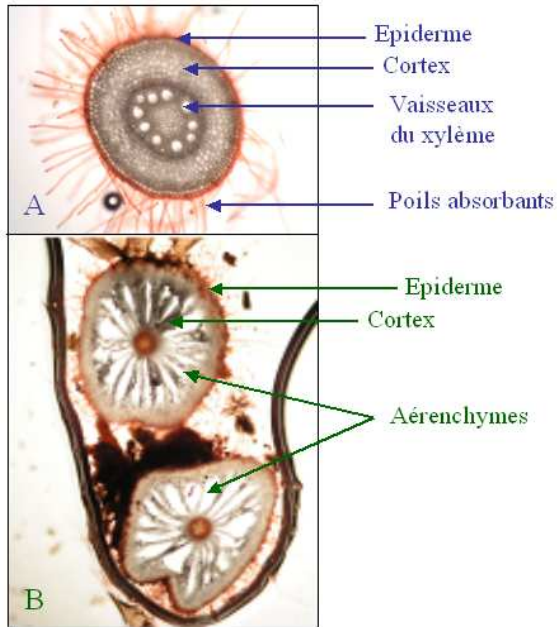
### **A.1. Etude bibliographique**

#### A.1.1. Les types de zones humides colonisées par *Coquillettidia*

Les zones humides colonisées par les moustiques du genre *Coquillettidia* sont des pièces d'eau douce ou oligohaline, stagnante et permanente, conditions garantissant le bon développement des stades aquatiques, les larves étant présentes toute l'année. Ces zones humides continentales sont colonisées par une végétation aquatique dont les larves utilisent les parties souterraines pour se fixer.

La végétation doit être en place depuis plusieurs années, 6 au minimum d'après Guille (1976). Cette période est nécessaire à la formation, à l'interface entre la colonne d'eau et le sédiment solide, d'une strate de vase très riche en colloïdes argileux et en débris végétaux, où sont enfoncés les rhizomes et racines des végétaux servant de support aux larves. La stagnation de l'eau a pour conséquence une faible teneur en oxygène de l'eau et de la boue sous-jacente. La présence d'eau en permanence et la faible teneur en oxygène de l'eau sont les principaux facteurs déterminant la composition des communautés végétales et animales de ces zones humides, qui développent des adaptations à ces conditions de vie contraignantes. Les plantes retrouvées fréquemment dans ces milieux comme le roseau commun ou la massette développent ainsi des tissus conducteurs d'oxygène, les aérénchymes (figure 18), qui permettent la circulation, dans le système racinaire, d'oxygène produit par les parties aériennes photosynthétiques (Justin & Armstrong, 1987 ; Wiessner *et al.*, 2002).

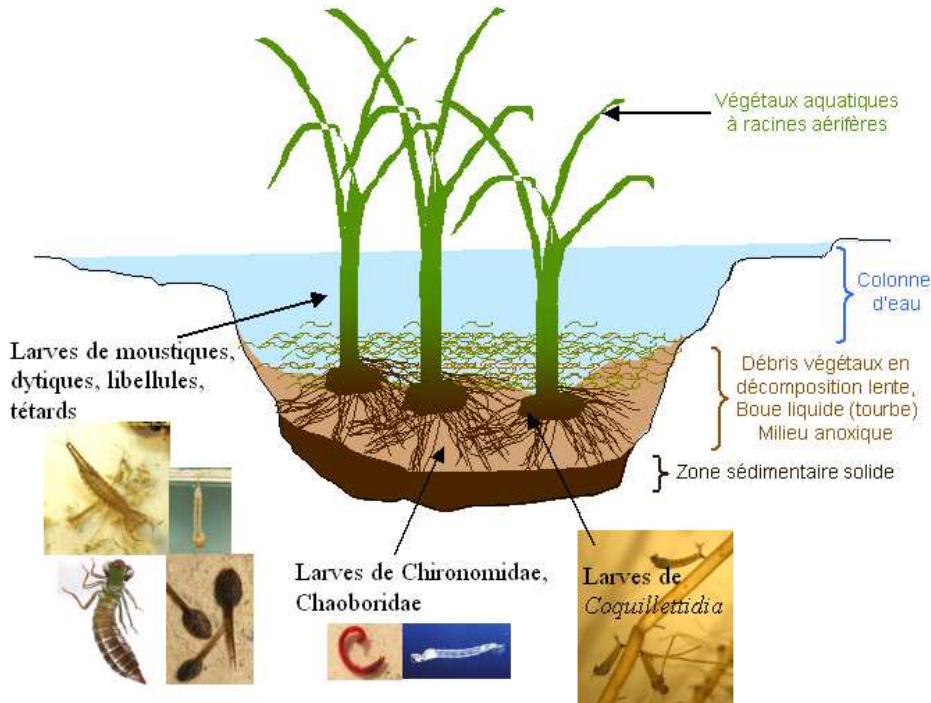
Les larves de moustiques respirant l'oxygène aérien, elles survivent dans les eaux en hypoxie, à l'instar de nombreux autres invertébrés ayant développé des stratégies de survie. Par contre, la vie animale est très limitée dans la strate boueuse anoxique sous-jacente qui n'est pas en contact direct avec le milieu aérien. On y retrouve des Diptères, comme les Chaoboridae et Chironomidae, et les moustiques du genre *Coquillettidia*, qui puisent de l'oxygène en fixant leur siphon respiratoire modifié au niveau des aérénchymes des plantes aquatiques (figure 19 ; Sérandour *et al.*, 2006).



**Figure 18 :**

Coupes transversales de racines de 2 monocotylédones : le maïs (A) et la massette (B).

Coloration au rouge congo. La massette produit des aérenchymes en conditions naturelles, en réponse au manque d'oxygène.



**Figure 19 :** Schéma de l'organisation d'un gîte larvaire à *Coquillettidia* et de sa biocénose (coupe transversale).

Les zones humides réunissant les critères présentés et donc potentiellement colonisables par les stades larvaires de *Coquillettidia* sont variées, au niveau de leur origine, de leurs caractéristiques topographiques, physico-chimiques, et au niveau de leur composition floristique et faunistique. Elles peuvent être naturelles ou créées de façon artificielle pour les loisirs, ou à la suite de travaux hydrauliques ou miniers.

Les gîtes larvaires à *Coquillettidia* d'origine naturelle correspondent à la catégorie « **Mares/marais d'eau douce permanents; étangs (moins de 8 hectares), marais et marécages sur sols inorganiques; avec végétation émergente détrempée durant la majeure partie de la saison de croissance au moins** » du système de classification des zones humides de la convention de RAMSAR. En Rhône-Alpes par exemple, la présence de *Coquillettidia* a été observée au niveau des roselières formant les ceintures de végétation de lacs (Lac du Bourget, Savoie ; Rey, 2002) et d'étangs (étangs du Grand Lemps et de Courtenay-Lancin, Isère ; Gilot *et al.*, 1976 ; Gilot *et al.*, 1983), ainsi que dans les anciens lits du Rhône de faible profondeur (en général inférieure à 1m), au stade d'évolution géomorphologique caractérisé par les groupements végétaux à *Typha latifolia* (Linnaeus, 1753). En région Languedoc-Roussillon, les gîtes à *Coquillettidia* sont de grandes roselières, dont au moins une partie est en eau toute l'année, comme les étangs de l'Estagnol et du Luquier près de Montpellier (Hérault), ou la roselière riveraine de l'étang de Berre à Saint-Chamas (Bouches-du-Rhône ; Guille, 1976). En Italie, dans le nord de la Toscane, les communes de la côte Versilia subissent de fortes nuisances à *Coquillettidia*, dont le lieu d'origine, le Lago di Porta, est également une roselière en eau permanente (Leone & Puccini, communication personnelle).

Plusieurs auteurs ont noté la présence de *Coquillettidia* dans des mares, trous d'eau, fossés, ou autres zones humides artificielles, laissant penser que l'expansion de ces moustiques serait fortement liée aux activités humaines, telles que la restauration des zones humides, la création d'aménagements hydrauliques, ou l'extraction minière.

Les « **étangs, y compris agricoles, étangs pour le bétail, petits réservoirs (généralement moins de 8 hectares ; catégorie 2 de la classification des zones humides artificielles de la convention de Ramsar)** » et les « **zones de stockage de l'eau,**

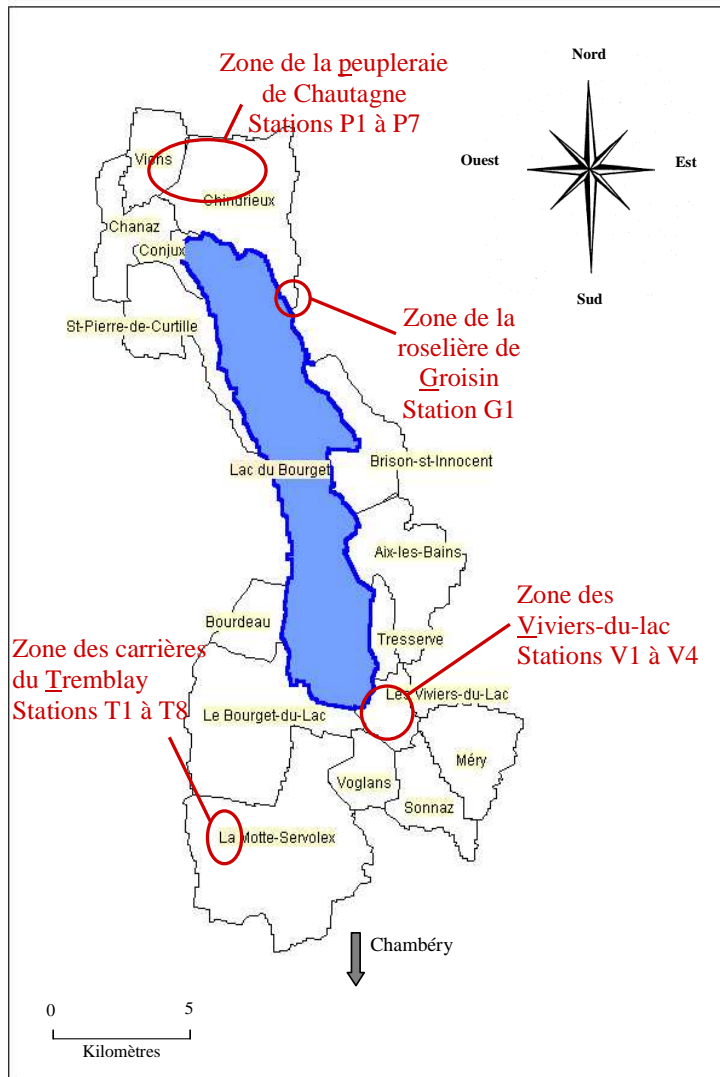
**réservoirs/barrages/retenues de barrage/retenues d'eau (généralement plus de 8 hectares, catégorie 6) »** présentent parfois les conditions permettant la colonisation de *Coquillettidia*. Avant son récurage en 2006, la queue de l'étang restauré de Jarrie (Isère) était colonisée par des groupements à *Typha latifolia* où des larves de *Coquillettidia* ont été échantillonnées en 2005 et 2006. En Ukraine, Gozhenko (1982) décrivait la dynamique des populations de *Cq. richiardii* au niveau des gîtes larvaires situés en bordure du réservoir Kakhov.

Les « **excavations, gravières/ballastières/glaisières, sablières, puits de mines (catégorie 7) »** qui sont laissés à l'abandon sont en général rapidement colonisées par la végétation aquatique et notamment les hélophytes qui s'y installent, accueillent les populations larvaires de *Coquillettidia*. Le site des carrières d'extraction de graviers du Tremblay à La Motte Servolex (Savoie, figure 20), qui est l'un des principaux sites d'approvisionnement en larves au cours de ma thèse, est constitué de nombreux bacs de décantations d'âges différents. Le principal gîte à *Coquillettidia* de ce site est une dépression de bas de pente, formant un fossé d'une profondeur variant entre 30cm et 1m50, et colonisé par des hélophytes dans les parties les moins profondes. En Floride, *Cq. perturbans* représente une nuisance très forte aux abords des nombreuses mines à phosphate laissées à l'abandon depuis les années 70, et qui leur servent d'habitat (Lounibos & Escher, 1983).

Les « **canaux et fossés de drainage (catégorie 9) »** mal entretenus sont également des gîtes favorables pour l'établissement de *Coquillettidia*, dans la mesure où l'eau y stagne et où la végétation s'installe rapidement. Le marais de Chautagne au nord du lac du Bourget (Savoie) est quadrillé par un réseau de canaux de drainage dont certains sont en eau stagnante et sont colonisés par *Coquillettidia*. C'est l'autre site de collecte des larves utilisées au cours de ma thèse car les populations larvaires y sont nombreuses. Dans le sud de la France, les fossés de drainage appelés 'roubines' sont également propices à l'établissement des colonies larvaires de ce moustique (Guille, 1976).

Les gîtes décrits dans la bibliographie sont donc de nature et d'origine variées, mais ils présentent des éléments communs, comme la persistance d'une pièce d'eau stagnante toute l'année, et la présence de végétaux aquatiques établis depuis plusieurs années. La composition végétale des gîtes larvaires à *Coquillettidia* est également très diversifiée d'un type de zone humide à l'autre, d'une région à l'autre.





**Figure 20 :** Répartition des stations étudiées dans les zones à *Coquillettidia* autour du Lac du Bourget (Savoie).

### A.1.2. La végétation caractéristique des gîtes colonisés par *Coquillettidia*

Les auteurs ayant étudié les stades larvaires des moustiques du genre *Coquillettidia* ont tous relevé leur présence en association avec plusieurs espèces de plantes hôtes. Wesenberg-Lund (1918, 1920-21) au Danemark et Marshall (1938) en Grande-Bretagne, décrivent la présence de larves de *Cq. richiardii* dans des gîtes composés de *Acorus* sp. (Linnaeus, 1753), *Glyceria spectabilis* (Mert. & Koch, 1823), *Ranunculus lingua* (Linnaeus, 1753) et *Typha angustifolia* (Linnaeus, 1753), et d'autres composés de *Scirpus* sp. (Linnaeus, 1753) et *Sparganium* sp. (Linnaeus, 1753). En France, dans la plaine alluviale du Rhône, la même espèce est trouvée fixée en majorité aux racines de *Typha latifolia*, mais également sur *Phragmites australis* (Cav.) Steudel (1840) ssp. *australis* et *Sparganium ramosum* (Hudson, 1778) (Aïn *et al.*, 1973).

En région méditerranéenne, Guille (1976) compare le nombre de larves de *Cq. richiardii* récoltées sur les espèces *P. australis*, *T. angustifolia* et *Scirpus lacustris* (Linnaeus, 1753), qui sont dominantes dans la roselière et caractéristiques de l'association végétale *Scirpeto-Phragmitetum mediterraneum*, Tx. & Preiising (1942). Les larves de *Cq. buxtoni* ont été très peu décrites, car elles sont souvent confondues avec celles de *Cq. richiardii* (Gabinand et Sinègre, 1968), mais des observations en Rhône-Alpes et sud de la France laisse penser que les deux espèces partagent fréquemment les mêmes gîtes.

Les habitats larvaires à *Cq. perturbans* dans les anciennes mines de Floride sont dominés par trois espèces de plantes aquatiques : la jacinthe d'eau *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Typha* sp. et *Ludwigia octovalis* (Jacq.) Raven. Lounibos et Escher (1983) ont collecté des larves à la fois sur les racines des jacinthes dans un substrat pseudo-liquide, et sur les racines des deux autres plantes, enfoncées dans un substrat organique épais. Batzer et Sjogren (1986a) dans le Minnesota ont également noté la fixation de larves de cette espèce sur des radeaux de plantes flottantes (*Phragmites* sp., *Carex* sp., *Lythrum salicaria* L.) et au niveau de chevelus racinaires flottants de plantes émergentes, solidement ancrées comme *Typha* sp.

### A.2. Présentation de l'hypothèse de l'étude de terrain

Cette étude bibliographique met en évidence une grande variété de plantes pouvant servir de support de fixation pour les larves de *Coquillettidia*, et rentrant dans la liste des plantes potentiellement indicatrices de la présence de ces moustiques. Si les roseaux et les massettes sont souvent décrits comme plantes-hôtes, il est difficile d'affirmer qu'il existe des plantes préférentiellement choisies pour support de fixation par les larves (Gilot, 1968). La nécessité de dresser une liste d'indicateurs de présence de *Coquillettidia in natura* pour faciliter leur contrôle a motivé notre étude.

La présence d'une population larvaire dans un gîte est la conséquence du choix de ce gîte comme site de ponte par une ou plusieurs femelles de la génération précédente. L'hypothèse qui en découle est qu'une femelle *Coquillettidia* doit être sensible à certains signaux en provenance de la zone humide qui lui permettent de déterminer si celle-ci est propice au développement des larves issues de la ponte.

L'idée de rechercher dans l'environnement des indicateurs de présence de moustiques est née au début des années 70, dans le but d'appliquer la cartographie des gîtes à moustiques à la démoustication (Rioux *et al.*, 1967 ; Pautou *et al.*, 1973). L'établissement de la typologie des grands types de gîtes repose sur une analyse des composantes hydrologique, pédologique, phytosociologique et entomologique. Dans notre étude, nous avons étudié ces différents paramètres, non pas pour cartographier les gîtes à *Coquillettidia* à l'échelle de la région Rhône-Alpes, mais dans le but d'identifier des indicateurs de gîte à *Coquillettidia* au niveau de zones humides de faible taille, perceptibles par un observateur *in situ*.

### A.3. Matériel et méthodes

### A.3.1. Localisation des gîtes étudiés

Cette étude s'est déroulée entre 2004 et 2007, aux mois d'avril et mai de chaque année. Une trentaine de stations ont été étudiées dans l'Ain, l'Isère, la Savoie, la Haute-Savoie et les Bouches-du-Rhône au cours de ces 4 années de prospection (figure 12). Les données présentées concernent 20 stations échantillonnées dans une zone volontairement très localisée et homogène aux niveaux géomorphologique et climatique (zones humides au nord et au sud du Lac du Bourget en Savoie), comme Guille (1976) l'avait fait dans les années 1970 aux alentours de Montpellier.

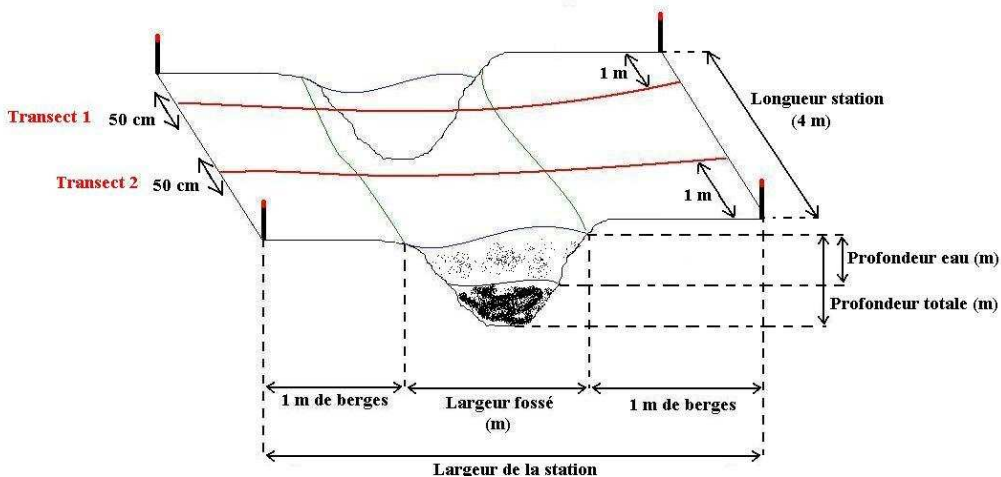
Les stations étudiées se trouvent au sein de zones géographiques choisies soit parce que nous y avons trouvé des larves de *Coquillettidia* par prospection, soit parce que des captures d'adultes de *Coquillettidia* y ont été réalisées par l'EID (figure 20). Dans chacune des zones, plusieurs stations ont donc été sélectionnées de façon à refléter la diversité des conditions biotiques (associations végétales, faune aquatique) et abiotiques des milieux (ouverture/fermeture, hauteur d'eau, courant...). Tous ces points d'eau sont permanents, condition obligatoire au développement des stades immatures de *Coquillettidia*.

La démarche suivie comporte 4 étapes et est identique pour l'ensemble des stations :

1. Dans un premier temps, des relevés floristiques sont effectués de manière à caractériser le gîte du point de vue de la végétation ;
2. ensuite une série de paramètres physiques liés au gîte sont relevés ;
3. des mesures de paramètres physico-chimiques de l'eau sont réalisées *in situ* et des échantillons d'eau sont prélevés pour analyser en laboratoire leurs compositions chimiques ;
4. enfin, la présence de larves de *Coquillettidia* est recherchée dans le gîte en suivant un protocole standard.

### A.3.2. Caractérisation de la végétation des gîtes

Chaque station, délimitée par 4 balises, a une surface de 4 mètres de long sur une largeur égale à celle du plan d'eau (en général un fossé), plus 1 mètre de berges de chaque côté du fossé (figure 21).



**Figure 21** : Schéma d'organisation d'une station en coupe transversale

Deux transects de 50 cm de large sont tracés au centre de la station, dans le sens de la largeur, recouvrant à la fois les berges et la surface en eau de la station. Les espèces végétales présentes de part et d'autre de ces transects sont déterminées à l'aide d'une flore (Flore de la Suisse, Aeschimann & Burdet, 1994) et un coefficient de recouvrement leur est attribué (tableau 2) selon l'échelle de Braun-Blanquet (1936). Les relevés floristiques sur les berges et à la surface de l'eau ont été dissociés pour être analysés séparément.

**Tableau 2** : Relation entre indice de recouvrement et recouvrement par la végétation

Indices de recouvrement	Recouvrement (R) de la végétation (%)
+	0% < R < 1%
1	1% < R < 5%
2	5% < R < 25%
3	25% < R < 50%
4	50% < R < 75%
5	75% < R < 100%

### A.3.3. Mesures des caractéristiques physiques des gîtes

#### **A.3.3.1. Hauteur de la colonne d'eau**

Au centre de chaque station, la profondeur de la colonne d'eau a été mesurée à l'aide d'une sonde plongée dans le gîte jusqu'à rencontrer une surface solide.

#### **A.3.3.2. Vitesse du courant**

La vitesse du courant a été estimée (3 répétitions) à partir du temps mis par un objet flottant de 2cm<sup>2</sup> pour parcourir un trajet de 3 mètres.

#### **A.3.3.3. Température**

La température de l'air est relevée en ces deux points par le même appareil (3 répétitions).

La température de l'eau, 5 cm sous la surface, est mesurée également à 3 reprises à l'aide d'une sonde SenTix® 41-3 reliée à un appareil de mesure multiparamètre Multi350i (WTW).

Les mesures de température ont été prises lors de journées ensoleillées et chaudes de printemps (fin avril et début mai), entre 10h le matin et 17h l'après-midi. Les mesures de températures varient au cours de la journée, alors que nos valeurs sont ponctuelles et ne tiennent pas compte de ces fluctuations. Afin d'atténuer ce biais, le critère retenu pour caractériser chaque station est le rapport entre les températures de l'eau et de l'air aux abords du gîte.

#### **A.3.3.4. Humidité relative de l'air**

L'humidité relative de l'air a été mesurée à 50 cm de hauteur au niveau des berges et à 10cm au-dessus de la surface de l'eau (3 répétitions) à l'aide d'un thermohygromètre (Carl Roth).

### **A.3.4. Mesures des caractéristiques chimiques des gîtes**

#### **A.3.4.1. pH**

Dans chaque station, 3 mesures de pH ont été effectuées à 5 cm sous la surface de l'eau à l'aide d'une sonde SenTix® 41-3 reliée à l'appareil Multi350i (WTW).

#### **A.3.4.2. Conductivité, salinité, oxygène**

Des mesures de conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), de salinité (sans unité<sup>2</sup>, mesurée à partir de la mesure de conductivité du même échantillon) et de concentration en oxygène ( $\text{mg}/\text{L}$ ) ont été réalisées à 3 reprises à 5 cm sous la surface de l'eau à l'aide d'une sonde ConOx-3 reliée à l'appareil Multi350i (WTW).

#### **A.3.4.3. Matières en suspension (M.E.S.)**

La quantité de M.E.S. (l'ensemble des particules minérales et organiques non dissoutes présentes dans une eau, en  $\text{mg}/\text{l}$ ) a été mesurée à partir de volumes identiques pour chaque station ( $V = 15 \text{ mL}$ ). Les échantillons d'eau ont été filtrés à l'aide de filtres de cellulose (Millipore ; maille de  $0,5 \mu\text{m}$ ) de masse sèche connue. Le filtre a ensuite été séché en étuve à  $80^\circ\text{C}$  puis pesé. En faisant la différence des masses finale et initiale du filtre, une quantité de M.E.S. est obtenue pour un volume connu d'eau de surface.

#### **A.3.4.4. Dosage des nitrites et nitrates**

Le dosage des nitrites et des nitrates a été réalisé à partir d'échantillons d'eau de surface prélevés dans chaque station (triplicats) avec les kits de dosage Spectroquant 1.14776.0001 et Spectroquant 1.14773.0001 (Merck KgaA). La réaction des nitrites de l'échantillon (volume :  $1 \text{ mL}$ ) avec l'acide sulfanilique et le N-(naphtyl-1)-éthylènediamine dichlorhydrate a produit un colorant azoïque rouge violet dosé par spectrophotométrie à  $540 \text{ nm}$ . L'équation suivante permet de connaître la teneur en nitrites de l'échantillon ( $R^2 = 0.9985$ ) :

$$[\text{NO}_2^-] = (\text{DO}_{540} - 0.0382)/0,7487$$

Dans de l'acide sulfurique concentré, les ions nitrates de l'échantillon (volume :  $750 \mu\text{L}$ ) ont réagi avec un dérivé de l'acide benzoïque pour former un composé nitré rouge dosé par spectrophotométrie à  $515 \text{ nm}$ . L'équation suivante permet de connaître la teneur en nitrates de l'échantillon ( $R^2 = 0.999$ ) :

$$[\text{NO}_3^-] = (\text{DO}_{515} - 0.1566)/0,016$$

#### **A.3.4.5. Analyse chimique complémentaire**

---

<sup>2</sup> Depuis 1978 (UNESCO, 1981) l'échelle pratique de salinité définit la salinité en terme de rapport de conductivité (celle de l'échantillon à analyser et celle d'une solution témoin de KCL). Elle est exprimée sans unité. Par exemple la salinité de l'eau de mer est 35.

Pour chaque station, un volume d'eau de surface de 100 mL a été filtré, congelé puis lyophilisé dans le but d'être analysé par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS).

La fraction solide obtenue par lyophilisation a été suspendue dans un volume de 50 µL d'acétonitrile et de 100 µL réactif BSTFA (Supelco). Cette étape de silylation était nécessaire pour augmenter la volatilité des constituants de nos échantillons notamment les composés les plus polaires, et donc faciliter leur détection.

Le chromatographe utilisé (HP6890, Agilent Technologies, Les Ulis, France) était couplé à un spectromètre de masse (HP5973, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Au cours de chaque programme d'analyse, la température du four augmente de 70°C à 240°C à la vitesse de 50°C/min, cette température était alors maintenue pendant 20 min.

Les échantillons étaient volatilisés à haute température et injectés dans une colonne MDN-12 à capillaires de silice (30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm de film ; Supelco). Les composés étaient séparés dans la colonne en fonction de leur structure et de leur polarité qui influençaient leur distribution au cours du temps entre la phase mobile (le gaz vecteur : hélium) et la phase stationnaire (colonne).

Les analyses des échantillons ont été réalisées en mode « SCAN » qui permet de détecter les constituants majoritaires des extraits. Les profils d'analyse obtenus pour les différentes stations ont ensuite été comparés au profil d'analyse de l'eau distillée ayant séjourné dans un tube identique à ceux ayant servi aux prélèvements (témoin). Les spectres de masse obtenus pour chaque pic détecté sont analysés grâce à la librairie de spectres de masses (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Version 2.0 d ; 2005).

#### A.3.5. Prospection/échantillonnage de larves de *Coquillettidia* dans les gîtes

Les méthodes permettant la détection des larves de *Coquillettidia* sont souvent difficiles à mettre en place et peu productives (Guille, 1975). La collecte des larves a été réalisée en utilisant la méthode de Morozov (Guille, 1975) non destructive pour la végétation et permettant d'obtenir un bon rendement d'échantillonnage.

Elle consiste à piétiner le sol meuble de la station, au niveau de la végétation (sur une surface de 1 m<sup>2</sup> pendant 1 minute), pour détacher et mettre en suspension les larves. On laisse les larves remonter dans la colonne d'eau pendant 3 minutes et huit coups de filets troubleau (diamètre = 25 cm, profondeur = 20 cm) sont donnés pour récolter les volumes d'eau boueuse. La recherche des larves dans de grandes barquettes plates dure 10 minutes. Elles sont prélevées à l'aide d'une pipette lorsqu'elles remontent en surface et sont déposées dans un récipient d'eau claire avec un plan de massette pour support de fixation.



### A.3.6. Analyses statistiques des données

#### ➤ *Données qualitatives :*

Les données de recouvrement des relevés floristiques concernant les berges et le plan d'eau de chaque station ont été rassemblées dans deux tableaux de contingence, et ont subi un tri visant à éliminer les espèces les moins représentées (à l'état de traces) dans chaque station ou à les regrouper (Exemple : toutes les espèces de la strate arbustive ont été regroupées sous l'étiquette « arbre »). Ces tableaux clarifiés ont ensuite été analysés par une Analyse Factorielle des Correspondances (AFC, avec le logiciel XLSTAT 2007.5.) afin d'étudier l'association de certaines espèces ou cortèges d'espèces aux stations colonisées ou non par *Coquillettidia*.

#### ➤ *Données quantitatives :*

Nous avons cherché à dégager des variables explicatives, c'est-à-dire des paramètres susceptibles d'influencer la présence de larves de *Coquillettidia* dans une station, parmi les paramètres suivants : concentration en oxygène de l'eau, M.E.S., conductivité, salinité, pH, hauteur de la colonne d'eau, le rapport des températures mesurées sur les berges et à 10 cm de la surface de l'eau, humidité relative de l'air (rapport des mesures à 50 cm et 10 cm de la surface de l'eau), teneurs en nitrites et nitrates. Pour chacun de ces paramètres, 2 échantillons de données ont été comparés : le groupe de valeurs correspondant aux stations à *Coquillettidia* et les valeurs des stations où *Coquillettidia* était absent. Un test de Shapiro-Wilk a ensuite été effectué pour savoir si les données suivaient une distribution normale. Si c'était le cas, nous procédions à un test paramétrique t de Student de comparaison des moyennes de nos 2 échantillons ; dans le cas contraire nous comparions les 2 échantillons par un test non paramétrique U de Mann-Whitney (logiciel Statview 4.57.0.0.). Lorsque les valeurs d'un paramètre étaient significativement différentes entre les 2 échantillons, ce paramètre était considéré comme une variable explicative de la distribution de *Coquillettidia* dans les stations.

➤ *Données quantitatives et qualitatives :*

Une Analyse Canonique des Correspondances (ACC, logiciel XLSTAT.) a été réalisée à partir de données qualitatives (relevés floristiques) et de données quantitatives (les paramètres dont les valeurs diffèrent significativement entre les stations colonisées et non colonisées par *Coquillettida*) pour les 20 stations. Cette analyse avait pour but d'étudier les relations entre stations, associations végétales et paramètres physiques et chimiques mesurés.

## A.4. Résultats

### A.4.1. Distribution de *Coquillettidia* dans les stations

La prospection réalisée à proximité du lac du Bourget entre 2003 et 2007 (figure 20) a permis de répertorier des stations contenant des larves de *Coquillettidia* et des stations, parfois très proches, dépourvues de larves de *Coquillettidia*.

Ainsi sur 20 stations sélectionnées, 11 d'entre elles sont des gîtes à *Coquillettidia* (certaines de manière récurrente sur chaque année d'étude : T5, T7, T8, P2, P3 ) et 9 d'entre elles ne possèdent pas de larves, et ceci pendant la durée totale d'étude (entre 2003-2007).

**Tableau 3** : Distribution de *Coquillettidia* dans les différentes stations.

Zone géographique	Code station	<i>Coquillettidia</i>	Description
Le Tremblay	T1	Oui	Stagnant, ensoleillé
	T2	Oui	Stagnant, ensoleillé
	T3	Non	Stagnant, fermé
	T4	Oui	Stagnant, ensoleillé
	T5	Oui	Stagnant, fermé
	T6	Non	Stagnant, fermé
	T7	Oui	Stagnant, fermé
	T8	Oui	Stagnant, fermé
Les Viviers-du-lac	V1	Non	Eau courante, ombragé
	V2	Non	Stagnant, ensoleillé, eutrophie
	V3	Non	Eau courante, ombragé
	V4	Non	Stagnant, ensoleillé, eutrophie
La peupleraie de Chautagne	P1	Non	Eau courante, ombragé
	P2	Oui	Stagnant, très fermé
	P3	Oui	Stagnant, très fermé
	P4	Non	Stagnant, ensoleillé, jeune
	P5	Non	Stagnant, ensoleillé, jeune
	P6	Oui	Stagnant, ensoleillé, ancien
	P7	Oui	Stagnant, ensoleillé, ancien
Roselière de Groisin	G1	Oui	Stagnant, ensoleillé, ancien

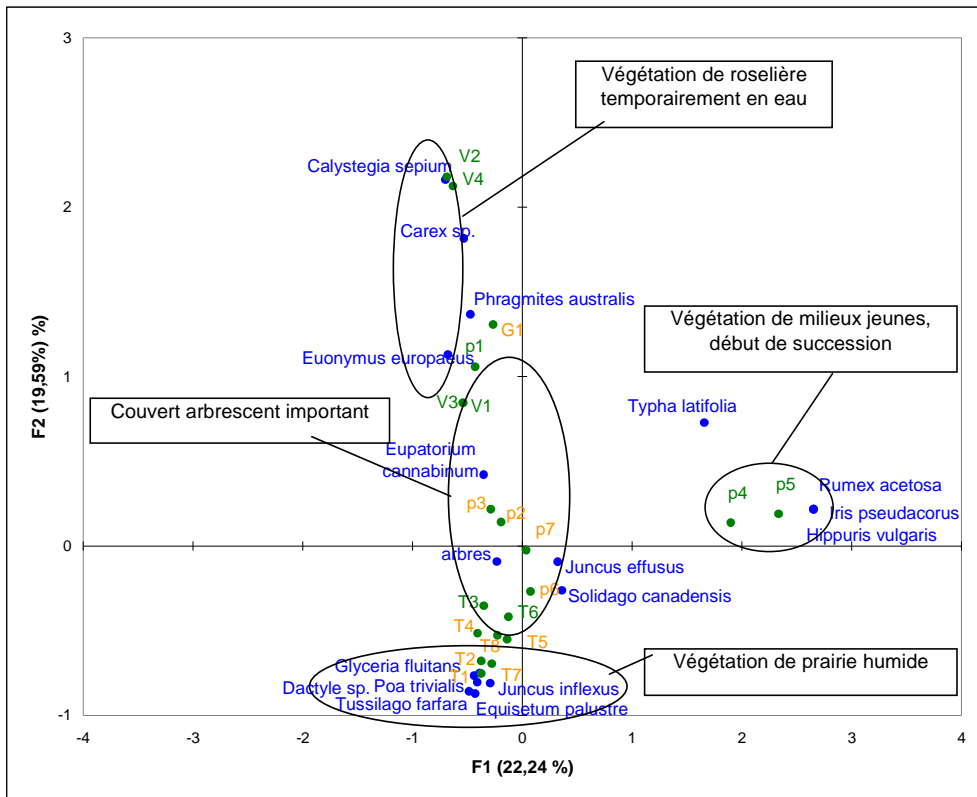
#### A.4.2. Analyse de la distribution de la végétation terrestre dans les stations

Les groupements végétaux des berges des stations sélectionnées sont composés de 18 taxons majoritaires (tableau 4). Les espèces végétales présentes sont des plantes communes en zones humides.

**Tableau 4** : Taxons majoritaires dans les groupements végétaux des berges et recouvrement  
Les stations à *Coquillettida* sont en rouge, les autres sont en noir

Taxon ou groupe de taxons	Stations (indice de recouvrement)
arbres	T1 (3); T2 (3); T3 (2); T4 (3); T5 (3); T6 (4); T7 (3); T8 (4); V1 (3); V3 (3); P1 (2); P2 (4); P3 (4); P4 (2); P6 (3); P7 (2); G1 (2)
<i>calystegia sepium</i>	V2 (1); P1 (1)
<i>Carex</i> sp.	V1 (1); V3 (1); V4 (2); P1 (1); G1 (4)
<i>Dactyle</i> sp.	T1 (2); T2 (1); T4 (2)
<i>Equisetum palustris</i>	T2 (2); T4 (1); T7 (2)
<i>Euonymus europaeus</i>	V1 (2); V3 (2)
<i>Eupatorium cannabinum</i>	P1 (+); P2 (1); P3 (2)
<i>Glyceria fluitans</i>	T1 (1); T2 (1); T4 (2); T7 (1); T8 (2)
<i>Hippuris vulgaris</i>	P4 (2); P5 (2)
<i>Iris pseudacorus</i>	P4 (2); P5 (2)
<i>Juncus effusus</i>	T1 (1); T2 (1); T4 (1); P1 (+); P2 (2); P3 (1); P4 (1); P5 (1)
<i>Juncus inflexus</i>	T1 (3); T5 (3); T6 (2); T7 (2); T8 (1)
<i>Phragmites australis</i>	T3 (1); T4 (1); V2 (2); V4 (2); P2 (1); P3 (1); P7 (1); G1 (4)
<i>Poa trivialis</i>	T1 (2); T2 (2); T3 (2); T4 (2); T5 (1)
<i>Rumex acetosa</i>	P4 (2); P5 (2)
<i>Solidago canadensis</i>	T3 (1); T5 (3); T6 (2); T7 (2); T8 (2); P4 (2); P5 (2); P6 (4); P7 (4); G1 (1)
<i>Tussilago farfara</i>	T1 (1); T2 (2); T7 (2); T8 (1)
<i>Typha latifolia</i>	P4 (1); P5 (1); G1 (1)

Les relevés floristiques présentent des similarités au sein de chaque zone géographique, comme l'indique l'AFC (figure 22). Sur les berges de la plupart des stations de la zone du Tremblay, la végétation est caractéristique d'une prairie humide avec un recouvrement dominant des graminées (*Glyceria fluitans*, *Dactyle* sp., *Poa trivialis*). La végétation des stations de la peupleraie de Chautagne reflète un couvert arborescent important, sauf pour les stations P4 et P5 où les espèces dominantes sont caractéristiques de milieux humides jeunes. Les stations V2 et V4 de la zone des Viviers-du-lac et G1 à Groisin sont dominées par une végétation de roselière sèche, parfois en eau (*Phragmites australis*, *Carex* sp.).



**Figure 22** : Analyse Factorielle des Correspondances représentant les stations et les taxons végétaux recouvrant les berges des stations.

Les stations colonisées par *Coquillettida* sont en orange, les autres en vert.

Les taxons végétaux sont en bleu.

41,83% de l'inertie totale est représentée par les axes F1 (22,24%) et F2 (19,59%).

L'AFC ne permet pas de dégager un groupe d'espèces végétales caractéristiques des gîtes larvaires à *Coquillettida*, la présence des larves ne semble donc pas liée à la végétation de bordure de la station.

#### A.4.3. Analyse de la distribution de la végétation aquatique dans les stations

Onze taxons majoritaires composent les groupements végétaux aquatiques relevés dans les 20 stations (tableau 5). Certains ne sont présents que dans les stations sans *Coquillettidia*, c'est le cas de *Sparganium erectum* et *Carex* sp.

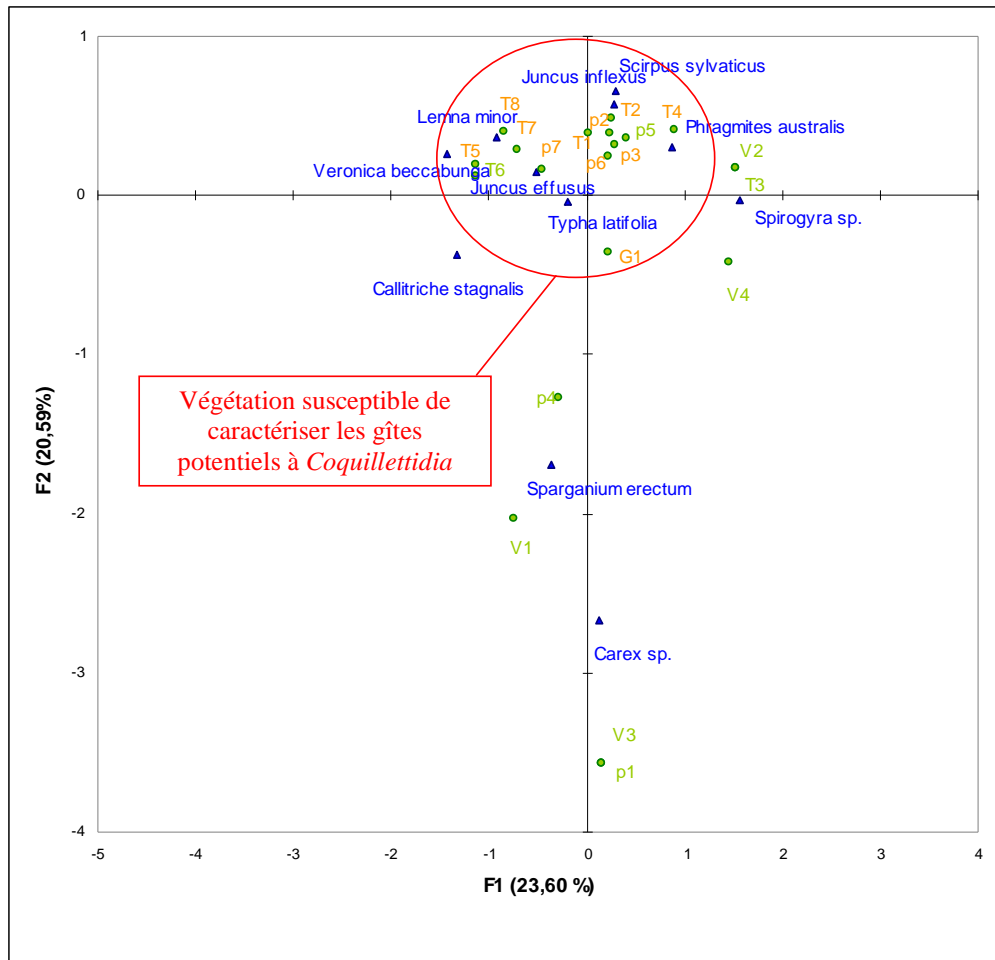
**Tableau 5** : Taxons majoritaires dans les groupements végétaux aquatiques et recouvrement  
Les stations à *Coquillettidia* sont en rouge, les autres sont en noir

Taxon ou groupe de taxons	Stations (indice de recouvrement)
Algues	T3 (2); V2 (3); V4 (4); <b>P6 (2)</b>
<i>Callitriche stagnalis</i>	<b>T5 (2)</b> ; T6 (2); V1 (1)
<i>Carex</i> sp.	V1 (1); V3 (1); V4 (1); P1 (2); P4 (2); <b>G1 (1)</b>
<i>Juncus effusus</i>	<b>T1 (2); T2 (1); T5 (2); T6 (2); T7 (3); T8 (2); P2 (1); P3 (1); P4 (2); P6 (2); P7 (4); G1 (1)</b>
<i>Juncus inflexus</i>	<b>T1 (2); T2 (3); P5 (2)</b>
<i>Lemna minor</i>	<b>T5 (3); T6 (3); T7 (4); T8 (4); P2 (1); P6 (2)</b>
<i>Phragmites australis</i>	<b>T1 (1); T2 (2); T3 (2); T4 (5); V2 (3); V4 (2); P2 (3); P3 (2); P5 (2); P6 (2); G1 (2)</b>
<i>Sparganium erectum</i>	P4 (2)
<i>Scirpus sylvaticus</i>	<b>T2 (2)</b>
<i>Typha latifolia</i>	<b>T1 (1); T2 (2); T5 (1); T7 (2); P3 (+); P4 (3); P5 (2); P6 (1); P7 (2); G1 (1)</b>
<i>Veronica beccabunga</i>	<b>T5 (3)</b>

L'AFC (figure 23) met en évidence que les taxons présents dans les stations avec *Coquillettidia* sont également souvent retrouvés dans des stations sans larve du moustique (*Juncus effusus*, *Juncus inflexus*, *Phragmites australis* par exemple).

Les espèces les plus représentatives des stations à *Coquillettidia* sont *Juncus effusus* (10 occurrences sur 11), *Typha latifolia* (8/11) et *Phragmites australis* (7/11). Au moins l'une de ces 3 espèces est présente dans les stations où des larves ont été échantillonnées avec un indice de recouvrement très variable compris entre + et 5.

**Les groupements végétaux aquatiques présents dans les stations à *Coquillettidia* sont donc dominés par ces espèces qu'on retrouve le plus souvent associées (*J. effusus* - *T. latifolia* : 8 occurrences sur 11, *J. effusus* - *P. australis* : 6/11, *J. effusus* - *T. latifolia* - *P. australis* : 5/11).**



**Figure 23 :** Analyse Factorielle des Correspondances représentant les stations et les taxons végétaux recouvrant la surface de l'eau.

Les stations colonisées par *Coquillettidia* sont en orange, les autres en vert.

Les taxons végétaux sont en bleu.

44,19% de l'inertie totale est représentée par les axes F1 (23,60%) et F2 (20,59%).

#### A.4.4. Caractéristiques physiques des stations et distribution de *Coquillettidia*

Le tableau 6 rassemble les valeurs mesurées pour chaque paramètre physique.

##### A.4.4.1. Hauteur de la colonne d'eau

La profondeur de l'eau dans les 20 stations varie de 2,6 cm à 40 cm. Dans les gîtes larvaires, la profondeur moyenne est de  $19,8 \pm 12,84$  cm, contre en moyenne  $12,2 \pm 5,16$  cm dans les stations non colonisées. **Il n'y a pas de différence significative entre les profondeurs relevées dans les stations avec et sans larves de *Coquillettidia*** (test t de Student :  $t = 1,507$  ; 18 ddl ;  $p = 0,149$ ).

##### A.4.4.2. Le courant

La majorité des stations échantillonnées sont en eau stagnante, sauf P1, V1 et V3 pour lesquelles les débits mesurés sont : 10 m/min., 6 m/min. et 7 m/min. respectivement. Dans ces trois stations, les prospections n'ont pas permis de détecter la présence de larves. **Le courant apparaît comme un paramètre important expliquant la distribution de *Coquillettidia* dans les stations** (test de Mann & Whitney :  $U = 33$  ;  $p = 0,0438$ ).

##### A.4.4.3. Température

➤ Différentiel de température entre l'eau et l'air au niveau des berges

Le rapport entre les températures au niveau de l'air et de l'eau est compris entre 1,33 et 2,38 sur l'ensemble des stations. Au niveau des gîtes larvaires, la température de l'air est en moyenne  $1,79 \pm 0,15$  fois plus élevée que la température dans l'eau. Pour les stations sans *Coquillettidia*, le rapport moyen est de  $1,89 \pm 0,35$ . Cette différence n'est pas significative (test t de Student :  $t = -0,830$  ; 17 ddl ;  $p = 0,418$ ), néanmoins il apparaît que la variance de ce rapport de températures est plus faible dans les gîtes colonisés par *Coquillettidia*, qui apparaissent donc moins soumis aux variations de températures.

➤ Différentiel de température entre l'eau et l'air 10 cm au-dessus de la surface



Le rapport entre les températures de l'air, 10 cm au-dessus de la surface, et de l'eau, 5 cm sous la surface est compris entre 1,29 et 2,24 pour les 20 stations. Au niveau des sites à *Coquillettidia*, la température aérienne au-dessus de l'eau est en moyenne  $1,76 \pm 0,22$  fois plus élevée que la température de l'eau. Au niveau des stations sans larves, le rapport de températures est en moyenne de  $1,82 \pm 0,33$ . La différence n'est pas significative (test t de Student :  $t = -0,430$  ; 17 ddl ;  $p = 0,672$ ), **la colonisation d'une station par *Coquillettidia* ne semble pas liée à la température près de la surface de l'eau.**

#### A.4.4.4. Humidité relative de l'air aux abords du gîte

➤ L'humidité relative de l'air au niveau des berges

L'humidité relative de l'air au niveau des berges varie de 21% à 66% au niveau de l'ensemble des stations. Dans les stations où des larves ont été collectées, le pourcentage moyen est de  $50\% \pm 11,8$ , contre  $33 \pm 10,3$  % en moyenne dans les gîtes sans. **L'humidité de l'air aux alentours des stations où *Coquillettidia* est présente est significativement plus élevée** (test t de Student :  $t = 3,324$  ; 17 ddl ;  $p = 0,004$ ), cette variable environnementale paraît influencer la colonisation d'un gîte par les moustiques.

➤ Humidité relative de l'air à 10 cm au-dessus de la surface

L'humidité relative de l'air, 10 cm au-dessus de la surface de l'eau est très variable d'une station à l'autre et comprise entre 20% et 69%. Dans les stations où des individus de *Coquillettidia* sont présents, le pourcentage moyen d'humidité de l'air est de  $49 \pm 15,6$  %, contre  $33,8 \pm 12,8$  % dans les stations où ils sont absents. **L'humidité de l'air au-dessus de la surface de l'eau, dans les stations où *Coquillettidia* est présente est significativement plus élevée** (test de Mann & Whitney :  $U = 20$  ;  $p = 0,041$ ), cette variable environnementale paraît influencer la colonisation d'un gîte par les moustiques. Néanmoins, les conditions météorologiques variables rencontrées peuvent avoir influencé nos mesures, le rapport des deux mesures d'humidité a donc été calculé afin d'atténuer cet effet.

➤ Rapport entre l'humidité de l'air au niveau des berges et au-dessus de l'eau

En considérant le rapport 'humidité berges/humidité surface', les différences entre gîtes à *Coquillettidia* et stations sans *Coquillettidia* ne sont plus significatives (test t de

Student :  $t = 0,614$  ; 17 ddl ;  $p = 0,55$ ). Cette variable environnementale ne semble pas être impliquée dans le choix des femelles *Coquillettidia* du gîte de ponte. Cependant, la pertinence de nos mesures effectuées en journée peut-être discutée puisque les femelles effectuent leur ponte en soirée en période estivale. Par ailleurs, ce critère, même reconsidéré, n'est certainement pas un facteur environnemental spécifique du genre *Coquillettidia* mais un facteur influençant la ponte de l'ensemble des moustiques, toutes espèces confondues.

#### A.4.5. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau des stations et distribution de *Coquillettidia*

Le tableau 6 rassemble les valeurs mesurées pour les paramètres physico-chimiques de l'eau dans les 20 stations.

##### A.4.5.1. Teneur en oxygène de l'eau

La teneur en oxygène de l'eau de surface dans les stations est faible ; elle varie de 0 à 7,8 mg/L. La teneur moyenne dans les stations à *Coquillettidia* est de  $1,59 \pm 2,2$  mg/L, contre  $2,61 \pm 2,9$  mg/L dans les stations où ces moustiques sont absents. **Les teneurs en oxygène de l'eau dans les stations colonisées ou pas ne sont pas significativement différentes** (test U de Mann & Whitney :  $U = 42,5$  ;  $p = 0,595$ ), cette variable n'explique pas la distribution de *Coquillettidia* dans les stations.

##### A.4.5.2. pH de l'eau

**Le pH de l'eau est neutre dans l'ensemble des stations et très peu variable** (de 6,98 à 7,8). Il n'y a pas de différence significative entre le pH de l'eau dans les stations à *Coquillettidia* et dans les stations où le moustique n'est pas trouvé (test t de Student :  $t = 0,034$  ; 18 ddl ;  $p = 0,973$ ), les pH moyens étant respectivement de  $7,39 \pm 0,16$  et  $7,38 \pm 0,28$ .

**Tableau 6** : Valeurs des paramètres physiques et physico-chimiques et significativité

	Hauteur d'eau (cm)	Courant (m/min)	T° air 50 cm/T° eau	T° air 10 cm/T° eau	Humidité 50 cm (%)
--	-----------------------	--------------------	---------------------	---------------------	-----------------------

	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne
Présence de <i>Coquillettidia</i>	5,3	40	19,81	0	0	0	1,5	1,98	1,79	1,4	2,1	1,76	26	66	29,93
Absence de <i>Coquillettidia</i>	2,7	39	12,19	0	10	4,28	1,3	2,38	1,89	1,3	2,2	1,82	21	51	32,96
Significativité	NS			p<0,05			NS			NS			p<0,01		

	Humidité 10 cm (%)			pH			Conduct. (µS/cm)			Salinité			Teneur en O <sub>2</sub> (mg/L)		
	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne
Présence de <i>Coquillettidia</i>	26	69	49,07	7,1	7,6	7,39	383	606	514,9	0,1	0,2	0,17	0	7	1,59
Absence de <i>Coquillettidia</i>	20	51	33,76	6,9	7,9	7,38	483	2143	946,7	0,1	1,1	0,41	0	7,8	2,61
Significativité	p<0,05			NS			p<0,05			p<0,05			NS		

	M.E.S. (mg/L)			Nitrites (µg/L)			Nitrates (mg/L)		
	min	max	moyenne	min	max	moyenne	min	max	moyenne
Présence de <i>Coquillettidia</i>	76	153	124	0	7,8	1,1	0	6,86	2,39
Absence de <i>Coquillettidia</i>	100	711	260	0	99	14,6	0	10,7	5,18
Significativité	p<0,05			NS			NS		

#### A.4.5.3. Conductivité et salinité de l'eau

##### ➤ Conductivité de l'eau

La conductivité de l'eau varie beaucoup moins dans les stations à *Coquillettidia*, moyenne  $515 \pm 66,5$  µS/cm) que dans les sites où nous n'avons pas trouvé le moustique (moyenne  $947 \pm 657,8$  µS/cm). Notamment, de fortes valeurs de conductivité ont été relevées dans deux stations (V2 et V4) non colonisées dans la zone des Viviers-du-Lac (3 à 4 fois supérieures à celles mesurées ailleurs), qui expliquent cette variabilité. Ces différences de valeurs entre les stations colonisées ou non est significative (test U de Mann & Whitney :  $U = 20$  ;  $p = 0,025$ ). **La conductivité de l'eau semble influencer la distribution des larves dans les 20 stations de l'étude.**

##### ➤ Salinité de l'eau

La salinité est d'une façon générale très faible dans les stations échantillonnées (de 0,1 à 0,3), exceptées dans les deux stations V2 et V4, où les valeurs sont 5 à 10 fois supérieures (autour de 1). Les moyennes des valeurs de salinité relevées dans les gîtes avec et sans *Coquillettidia* sont respectivement de  $0,17 \pm 0,05$  et de  $0,41 \pm 0,37$ . La différence est significative (test U de Mann & Whitney :  $U = 21,5$  ;  $p = 0,033$ ), **la salinité semble donc être une variable influençant la colonisation des stations par *Coquillettidia*.**

#### **A.4.5.4. Matières en suspension (M.E.S) dans l'eau**

Les stations où des larves de *Coquillettidia* sont prélevées présentes une eau moins chargée en matières en suspension (moyenne  $124 \pm 27,1$  mg/L) que les stations sans larves (moyenne  $260 \pm 206,2$  mg/L). Les plus fortes quantités de M.E.S. sont à nouveau relevées dans les stations sans larve V2 et V4 (491 et 711 mg/l respectivement). La différence de quantité de M.E.S. est significative (test t de Student :  $t = -2,174$  ; 18 ddl ;  $p = 0,043$ ), **ce paramètre semble influencer la colonisation des stations par les larves.**

#### **A.4.5.5. Teneurs en nitrites et nitrates de l'eau**

Les teneurs en nitrites sont très faibles dans les stations, et sous le seuil de détection du test pour 11 des 20 stations (limite de détection à 5 µg/l). Dans les gîtes à *Coquillettidia*, la teneur moyenne est de  $1 \pm 2,5$  µg/L, contre  $14,6 \pm 32,1$  µg/L dans l'eau des stations non colonisées. La différence n'est pas significative (test t de Student :  $t = -1,404$  ; 18 ddl ;  $p = 0,178$ ).

Les teneurs en nitrates sont en moyenne deux fois plus élevées dans les gîtes sans *Coquillettidia* que dans les gîtes colonisés ( $5,18 \pm 3,71$  mg/L et  $2,40 \pm 2,30$  mg/L, respectivement) mais cette différence n'est pas significative (test t de Student :  $t = -2,059$  ; 18 ddl ;  $p = 0,054$ ). Les plus fortes valeurs sont relevées dans deux stations sans larves, situées sur le même ruisseau dans la zone des Viviers-du-Lac, V1 et V3 (10,68 et 9,52 mg/L, respectivement). **Les teneurs en nitrites et nitrates ne semblent pas expliquer la distribution de *Coquillettidia* dans les stations.**

#### **A.4.5.6. Analyse de la composition chimique de l'eau**

L'analyse chimique des eaux de surface prélevées dans les 20 stations étudiées a révélé la présence de 45 composés majoritaires qui sont listés dans le tableau 7 (voir aussi le tableau détaillé en annexes). Ces composés appartiennent aux familles chimiques des alcools, sucres, acides aminés, acides carboxyliques, composés phénoliques et aromatiques et acides gras, cette dernière famille comptant la moitié des composés détectés.

Sur l'ensemble des produits trouvés, une douzaine de molécules sont déjà décrites dans la bibliographie comme impliquées dans la relation des Culicidés avec leur habitat. Certaines molécules sont connues comme attractives (glycérol (Huang *et al.*, 1991), p-crésol (Linley, 1989), acide lévulinique (Linley, 1989), acide lactique (Smallegange *et al.*, 2005)) ou stimulant de ponte (phénol (Kumar & Jebanesan, 2002), acide laurique (Ganesan *et al.*, 2006)). Des composés sont décrits comme inhibiteurs de ponte (acide nonanoïque (Millar *et al.*, 1992), acide caprique (Hwang *et al.*, 1982), acide linoléique et acide oléique (Hwang *et al.*, 1984)). D'autres molécules sont répertoriées à la fois comme attractant/stimulant et inhibiteur de ponte ; leur effet dépendant de la quantité présente dans le milieu (acide caproïque (Smallegange *et al.*, 2005 ; Hwang *et al.*, 1982), acide palmitolaïdique (Ganesan *et al.*, 2006 ; Hwang *et al.*, 1984).

Chaque composé mis en évidence dans nos échantillons a fait l'objet d'une analyse statistique (test U de Mann & Whitney) afin d'évaluer : 1) si leur présence/absence expliquait la présence de larves de *Coquillettidia*, et 2) si leur quantité pouvait influencer sur le choix des gîtes.

La présence dans nos échantillons de la plupart des composés n'explique pas (test U de Mann & Whitney :  $p > 0,05$ ) le choix du gîte de ponte ou la présence/absence de larves de *Coquillettidia*. D'autre part, la présence de certaines molécules attractives comme le glycérol ( $p = 0,32$ ), l'acide lévulinique ( $p = 0,99$ ) et l'acide lactique ( $p = 0,42$ ) ne caractérise pas les gîtes à *Coquillettidia*. De même, les molécules décrites comme stimulatrices de ponte (phénol,  $p = 0,32$ ) ou comme inhibitrices de ponte (acide caprique,  $p = 0,62$  ; acide nonanoïque,  $p = 0,27$  ; acide linoléique,  $p = 0,56$  ; acide oléique,  $p = 0,51$ ) ne semblent pas expliquer l'absence ou la présence de larves dans nos eaux de stations. L'unique molécule dont la présence explique la distribution des larves dans les stations est le 2,6-di-tert-butyl-p-crésol qui est détecté dans 7 stations sur 11 (test U de Mann & Whitney :  $U = 18$  ;  $p = 0,017$ ). Ce composé est proche du p-crésol, molécule connue pour être **attractive pour certains moustiques** (genres *Aedes*, *Culex* et *Toxorhynchites* ; Linley, 1989).

Concernant l'acide laurique, qui est décrit comme stimulant d'oviposition pour *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) (Ganesan *et al.*, 2006) et l'acide heptadécanoïque sont tous les deux dosés en quantités plus faibles dans les stations à *Coquillettidia* que dans les stations non colonisées. Cette différence de concentration dans les eaux de surface semble expliquer le choix du lieu de ponte dans les gîtes contenant de faibles doses en ces deux produits (test U de Mann & Whitney; acide laurique :  $U=21$ ,  $p=0,043$ ; acide heptadécanoïque :  $U = 17$ ,  $p = 0,040$  ).

Dans nos échantillons d'eau de surface, des phtalates ont été détectés sur l'ensemble des stations, exceptées les stations T5 (présence de *Coquillettidia*) et V4 (absence de *Coquillettidia*). Ces molécules ont été décrites comme répulsives sur *Aedes aegypti* (Vartak *et al.*, 1994). Leurs variations de concentrations d'un site à l'autre n'expliquent pas la présence ou l'absence de larves de *Coquillettidia* (test U de Mann & Whitney :  $U = 38$  ;  $p = 0,38$ ).

**Il est donc probable que la composition chimique de l'eau de surface, en particulier les concentrations de certaines molécules impliquées dans la ponte des moustiques, ait une influence sur la colonisation d'une station par *Coquillettidia*.**







## A.5. Discussion

### Influence de la végétation environnante sur la colonisation par *Coquillettidia*

L'étude de la végétation des berges des stations nous renseigne sur les formations environnant les pièces d'eau. Les berges sont une zone d'interface entre deux écosystèmes, l'un aquatique (le gîte larvaire potentiel) et l'autre terrestre (la prairie, la roselière sèche...). La végétation des berges est donc composée d'espèces des deux cortèges floristiques dont la distribution est fonction de leur tolérance à la principale contrainte : l'eau.

Les stations des Viviers-du-Lac et de Groisin se détachent bien des autres sur l'AFC (figure 22) représentant la végétation des berges, les espèces dominantes sont caractéristiques d'une roselière sèche une bonne partie de l'année.

Dans les stations du site du Tremblay, qui sont également regroupées sur cette figure 22, la végétation des berges est caractéristique de la prairie humide, habitat majoritaire sur ce site d'anciennes carrières en cours de réhabilitation.

Les deux stations de la peupleraie de Chautagne situées au niveau d'un canal de drainage récemment curé, P4 et P5, présentent une composition floristique originale et diversifiée typique d'un début de succession.

Certaines stations de la peupleraie de Chautagne, du site du Tremblay et de celui des Viviers-du-Lac sont également caractérisées par un couvert arborescent important. Cette fermeture du milieu ne semble pas être un critère de grande influence sur la présence de larves de *Coquillettidia* dans le gîte, puisqu'on en retrouve aussi bien en P2, P3, P6 et P7, stations à fort couvert arborescent, qu'en T1 et T2 où le recouvrement par la strate arborescente est quasi-nul.

La composition des groupements végétaux présents en bordure des gîtes ne semble pas être liée à la présence de larves. Il semble que le choix du site de ponte pour une femelle *Coquillettidia* soit déterminé par d'autres facteurs, d'autres signaux, en provenance de la pièce d'eau plutôt que de l'écosystème qui l'environne.

## Influence de la végétation aquatique sur la colonisation par *Coquillettidia*

Les stations où des larves de *Coquillettidia* ont été collectées présentent en général une faible diversité de plantes aquatiques, en moyenne 4 espèces végétales sont représentées dont une ou deux dominant en recouvrement. Cette faible diversité est à associer au stade de développement de la succession végétale et donc à l'âge de création du gîte.

Les résultats de l'analyse factorielle des correspondances sur la végétation aquatique des stations (figure 23) montrent que *Sparganium erectum* et *Carex* sp. sont absents des gîtes à *Coquillettidia* et présents dans la plupart des stations sans larve. Pourtant, ces deux taxons ne peuvent être considérés comme des indicateurs d'absence de *Coquillettidia* car nous avons observé la fixation de larves aux racines de ces plantes en laboratoire, et ils ont été décrits comme plante-hôte de *Cq. richiardii* par d'autres auteurs (Marshall, 1938 ; Aïn *et al.*, 1973). Si dans notre étude, ces taxons ne sont retrouvés qu'au niveau des stations où les larves de *Coquillettidia* sont absentes, c'est qu'ils sont le reflet des conditions particulières du milieu où on les trouve (eau courante, collection d'eau récente).

Nos résultats montrent que les espèces *Typha latifolia*, *Juncus effusus* et *Phragmites australis* sont les plus représentatives des gîtes à *Coquillettidia* et sont souvent présentes en association dans les stations. On peut faire le parallèle entre les cortèges floristiques des gîtes de Rhône-Alpes et du sud de la France, où les espèces dominantes sont très proches : *Phragmites australis*, *Typha angustifolia*, *Typha latifolia* et *Scirpus lacustris*, et où Guille note une densité larvaire plus importante quand la végétation est mixte (Guille, 1976). La présence de ces espèces peut donc être considérée comme indicatrice de gîte potentiel à *Coquillettidia*, d'autant plus si la densité de ces héliophytes est importante et que des débris végétaux sont visibles, indiquant un établissement ancien de la végétation.

## Influence des paramètres physiques des stations sur la colonisation par *Coquillettidia*

D'après nos résultats sur 20 stations, la présence de larves de *Coquillettidia* ne semble pas liée à la hauteur de la colonne d'eau. Guille (1976) montre que dans le gîte larvaire de l'Estagnol (Hérault) dans le sud de la France, la densité d'individus de *Cq. richiardii* est plus

grande pour des profondeurs comprises entre 50 et 100 cm. Nous n'avons pas pu le vérifier, la hauteur maximale que nous avons relevée étant de 40 cm et les points d'eau étudiés étant soumis à des régimes de variation de la nappe d'eau très différents de l'étang de l'Estagnol. Il semble toutefois qu'une hauteur d'eau minimale soit nécessaire pour éviter l'exondation et permettre le développement des larves toute l'année.

La présence d'une zone boueuse et riche en débris végétaux, située à l'interface entre la colonne d'eau et le sédiment solide, est nécessaire à l'installation des larves de *Cq. richiardii* et *Cq. buxtoni* (Guille, 1976 ; Sérandour *et al.*, 2006). Cette zone est difficile à délimiter mais a été observée dans toutes les stations où des larves ont été récoltées dans notre étude. C'est à cet endroit que le réseau de racines et de radicelles des plantes hôtes est le plus dense, les plants de *Typha* sp. y développent par exemple des chevelus racinaires propices à la fixation des larves, appelées racines d'eau par Batzer et Sjögren (1986).

Dans les gîtes en eau courante, cette zone boueuse a été observée mais elle y est fine, moins chargée en débris végétaux et en racines, la végétation étant plus faible et de nature différente. Le courant apparaît comme une contrainte importante au développement et à la survie de *Coquillettidia*, les pontes et les larves pouvant être emportées et la densité de plantes hôtes étant faible (Muirhead-Thomson, 1940). Toutefois, Batzer et Sjögren (1986) ont récolté quelques larves de *Cq. perturbans* aux Etats-Unis dans un gîte en eau faiblement courante, de débit similaire à ceux relevés en V1, V3 et P1 (aux alentours de 10 m/min).

Notre étude montre que les stations colonisées par *Coquillettidia* sont celles où le degré d'humidité de l'air à proximité de l'eau est le plus fort. L'humidité est un facteur important influençant le vol, l'agressivité des femelles et le choix du site de ponte (Provost, 1973). Nos mesures ont été prises en journée, parfois en plein soleil, alors que l'activité des femelles est forte après la tombée de la nuit ; les valeurs d'humidité relevées ne sont donc pas comparables à celles auxquelles les femelles de *Coquillettidia* sont sensibles.

De même, les températures de l'eau en surface et de l'air relevées au niveau de chaque station sont soumises à de fortes variations au cours d'une même journée, et d'un jour à l'autre, ce qui nous a conduit à exprimer des rapports de température pour atténuer ce biais. Les stations à *Coquillettidia* sont caractérisées par de plus faibles amplitudes thermiques entre l'air et l'eau, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un couvert arborescent dans ces stations, recouvrant en partie la surface en eau et limitant les variations micro-climatiques. Toutefois, certains gîtes à *Coquillettidia* comme ceux de l'Estagnol (Hérault) et de Saint-Chamas (Bouches du Rhône) dans le sud de la France, ne présentent pas de couvert

arborescent. Ce sont de vastes roselières dont la densité pourrait favoriser le maintien d'une certaine humidité de l'air.

## Influence des paramètres chimiques des stations sur la colonisation par *Coquillettidia*

La quantité de matières en suspension, la conductivité, et la salinité sont apparus comme des paramètres importants, pouvant expliquer l'absence de *Coquillettidia* dans certaines stations.

La forte conductivité de l'eau dans les sites V2 et V4 notamment, traduit une minéralisation excessive et explique la salinité élevée relevée. Guille (1976) et Pennetier (2003) ont démontré la sensibilité des larves de *Cq. richiardii* à la salinité de leur milieu, les qualifiant de sténohalines, et considérant que pour une salinité<sup>3</sup> supérieure ou égale à 4, l'éclosion des œufs et le développement des stades immatures étaient compromis. Il est possible que la salinité relevée en V2 et V4 (autour de 1) explique l'absence de larves, mais une salinité de 2,2 est relevée dans les gîtes larvaires de *Coquillettidia* les plus productifs de la région Montpellieraine. Chez les espèces de moustiques *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) et *Culex (Culex) pipiens* (Linnaeus, 1758), les femelles pondent préférentiellement dans des milieux peu concentrés en chlorure de sodium, et y pondent des nacelles plus grandes (Wallis, 1954 ; Hudson, 1956). Pennetier (2003) n'a pas montré d'influence de la salinité sur le choix du site de ponte des femelles de *Cq. richiardii* en conditions de laboratoire.

La majorité des stations présentaient de faibles teneurs en oxygène sous la surface de l'eau, la plupart des milieux étant anoxiques. Nous n'avons pas montré de lien entre la présence de larves de *Coquillettidia* et la teneur en oxygène de l'eau, contrairement à d'autres auteurs, qui mesuraient ce paramètre au niveau de la rhizosphère (Batzer & Sjogren, 1986a). Par exemple, Callahan et Morris (1987) ne relèvent la présence de *Cq. perturbans* que dans des milieux où la concentration en oxygène est inférieure à 1,5 mg/L. Nous avons choisi de ne pas mesurer l'oxygène en profondeur au niveau de l'habitat des larves car les mesures y sont très imprécises, difficiles à stabiliser et varient avec les moindres mouvements de l'électrode. Nos résultats confirment néanmoins que dans les stations à *Coquillettidia*, les teneurs en

---

<sup>3</sup> Les auteurs n'adoptent pas le système d'échelle pratique de la salinité et expriment les valeurs de salinité en grammes par litre d'eau. Seule l'unité change, la valeur relevée est la même dans les deux systèmes.

oxygène sont probablement très faibles et souvent nulles au niveau de la rhizosphère, ce paramètre décroissant dans les eaux stagnantes quand la profondeur augmente.

Le pH des 20 stations est neutre, et il y a très peu de variations entre les sites ; le pH ne semble pas influencer la colonisation par *Coquillettidia*, même si un pH proche de la neutralité semble être requis (Guille, 1976).

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer le choix du site de ponte d'une femelle moustique, et donc de déterminer la présence de larves, la présence de signaux chimiques (phéromones, kairomones...) au niveau du site est particulièrement importante (Kennedy, 1977). Une molécule que nous n'avons pas détecté dans nos échantillons d'eau a été identifiée comme étant une phéromone d'agrégation associée aux pontes de plusieurs espèces du genre *Culex* (i.e. *Culex tarsalis* Coquillett, 1896 et *Culex quinquefasciatus* Say, 1823) et favorisant la ponte : le (5R,6S)-6-Acetoxy-5-hexadecanolide (Osgood, 1971 ; Hwang *et al.*, 1987 ; Braks *et al.*, 2007).

De nombreux autres composés naturels sont décrits comme étant des stimulants de ponte, mais aucune étude n'a été réalisée sur *Coquillettidia*. Certains de ces composés sont des dérivés phénoliques comme le p-cresol, le 3methyl-5methyl phenol, le 2methyl-3methyl phenol, stimulants pour certaines espèces des genres *Culex*, *Aedes* et *Toxorhynchites* (Ikeshoji, 1968 ; Bentley *et al.*, 1979). Un composé très proche du p-cresol a été détecté dans les gîtes où nous avons échantillonné des larves, cette molécule pourrait donc être utilisée par les femelles *Coquillettidia* comme une kairomone, signal influençant leur choix d'un site de ponte. D'autres molécules présentes dans les stations comme l'acide laurique et l'acide palmitoléique sont décrits comme stimulants de ponte pour les femelles d'*Ae. aegypti* et sont présents dans leurs pontes (Ganesan *et al.*, 2006). La présence de larves de *Coquillettidia* semble corrélée à la concentration en acide laurique et en acide heptadécanoïque dans l'eau des stations, ce qui suggère une sensibilité dose-dépendante des femelles à cet acide gras. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la ponte des femelles *Coquillettidia* serait favorisée au niveau des gîtes où des congénères ont déjà pondu, l'acide laurique jouant alors le rôle d'une phéromone, comme chez *Ae. aegypti*.

Les acides nonanoïque, caprique, oléique et linoléique sont présents à des concentrations comparables dans les stations avec et sans *Coquillettidia*. Ces acides gras sont décrits comme inhibiteurs de ponte pour les femelles gravides de *Cx. quinquefasciatus*, cet effet étant dose-dépendant (Hwang *et al.*, 1984). Il est possible que les femelles de *Coquillettidia* soient également sensibles à ces composés, mais seuls des tests

comportementaux en laboratoire nous informeraient sur leur effet aux teneurs détectées dans les prélèvements.

D'autres composés décrits comme attractifs (glycérol, acides lévulinique, lactique et caproïque), stimulants de ponte (phénol, acide palmitélaïdique), ou inhibiteurs de ponte (acides caproïque et palmitélaïdique à certaines concentrations) pour des moustiques, sont présents dans les stations échantillonnées.

Il est probable que certaines molécules parmi celles que nous avons détectées soient effectivement mises en jeu dans le choix du site de ponte des femelles *Coquillettidia*. La composition chimique des eaux prélevées montre que plusieurs molécules ont potentiellement cette fonction, et peuvent agir seules ou en synergie, ou avoir des effets antagonistes dépendants de la dose.

Quelque soit la complexité des signaux chimiques perçus par les femelles aux abords d'un gîte, ils sont à mettre en relation avec les processus biologiques en cours dans cet écosystème aquatique : matière organique à différents stades de dégradation, métabolisme des végétaux en croissance, métabolismes bactérien et fongique, présence de congénères, de prédateurs sont autant de sources possibles de ces signaux.

### Facteurs liés à l'absence de *Coquillettidia* dans les stations

Parmi les 8 stations échantillonnées dans la zone géographique du Tremblay, seules les deux stations T3 et T6 n'ont pas révélé la présence de larves de *Coquillettidia*. Ces deux stations sont différentes des 6 autres au niveau de la composition floristique, puisqu'elles ne présentent pas de plantes aquatiques émergentes décrites comme support de fixation potentiel pour les larves de *Coquillettidia*. On note uniquement la présence de *Rumex* sp. (très faible recouvrement) en T3, mais il est peu probable que cette plante soit choisie par les larves, comme l'avait montré Guille (1976), qui ne trouvait aucune larve en échantillonnant au niveau de ces plantes. T6 est une station où la colonne d'eau est profonde et la végétation aquatique est seulement représentée par les lentilles d'eau, dont les racines sont trop fines pour servir de support de fixation (observation en laboratoire), et par quelques touffes de joncs ancrées dans le substrat solide des berges. On peut donc facilement expliquer l'absence de larves de *Coquillettidia* dans ces deux stations par l'absence de plantes-hôtes.

Les 4 stations échantillonnées sur le site des Viviers-du-Lac n'ont produit aucune larve de *Coquillettidia* au cours des prospections de 2005, 2006 et 2007. Pourtant, des captures d'adultes avaient été réalisées sur ce site en 2000 (Rey, 2002), confortées par la récolte de quelques larves aux abords des stations V2 et V4. En V1 et V3, la présence de courant semble être la principale cause de l'absence de *Coquillettidia*, influençant la composition en plantes aquatiques émergentes, représentées uniquement par les *Carex* sp. Les stations V2 et V4 présentent un fort recouvrement des héliophytes *Typha latifolia* et *Phragmites australis*, comme la plupart des stations de l'étude où des larves ont été trouvées. Elles sont néanmoins très différentes au niveau de la qualité physico-chimique de l'eau, la salinité y est remarquablement plus haute (d'un facteur 10) que dans les autres stations étudiées, la quantité de matières en suspension et la conductivité également (4 fois supérieures). Ces stations apparaissent eutrophisées, leur surface est recouverte d'algues qui se dégradent très mal, chargeant l'eau en matières en suspension. En général des entrées de phosphore et d'azote exogènes sont liées à cette eutrophisation, mais les teneurs en nitrites et nitrates relevées, dix fois inférieures aux normes européennes concernant l'eau potable (50 mg/L), ne semblent pas expliquer à elles seules la mauvaise qualité du milieu.

Parmi les 7 stations échantillonnées dans le réseau de canaux de la peupleraie de Chautagne, 3 n'ont pas révélé la présence de larves, à savoir P1, P4 et P5. P1 est caractérisée par la présence de courant, condition défavorable à la survie des œufs et larves de *Coquillettidia*. P4 et P5 sont deux stations situées sur le même canal de drainage, qui a été curé en 2005. Le curage a substitué de la terre à la strate de boue servant de gîte aux larves prélevées l'année précédente, et a réinitialisé la succession végétale. Ces deux stations sont donc caractérisées par une plus grande diversité floristique que la majorité des autres stations, où quelques espèces dominent. L'absence de *Coquillettidia* en P4 et P5 s'explique donc facilement par l'absence de strate boueuse caractéristique de leur habitat.

L'absence de larves dans 9 stations, dans des zones où des adultes ont été collectés, semble donc principalement liée à 3 facteurs : le courant, l'absence de plantes-hôtes et l'absence de strate boueuse liquide, en général liée à l'âge récent des groupements végétaux installés.

## Indicateurs de présence/d'absence de *Coquillettidia* dans les zones humides

La figure 24 permet de visualiser l'influence des différents facteurs considérés sur la distribution de *Coquillettidia* dans les 20 stations.

D'une manière plus générale, une zone humide ne sera pas colonisée par des larves de *Coquillettidia* si :

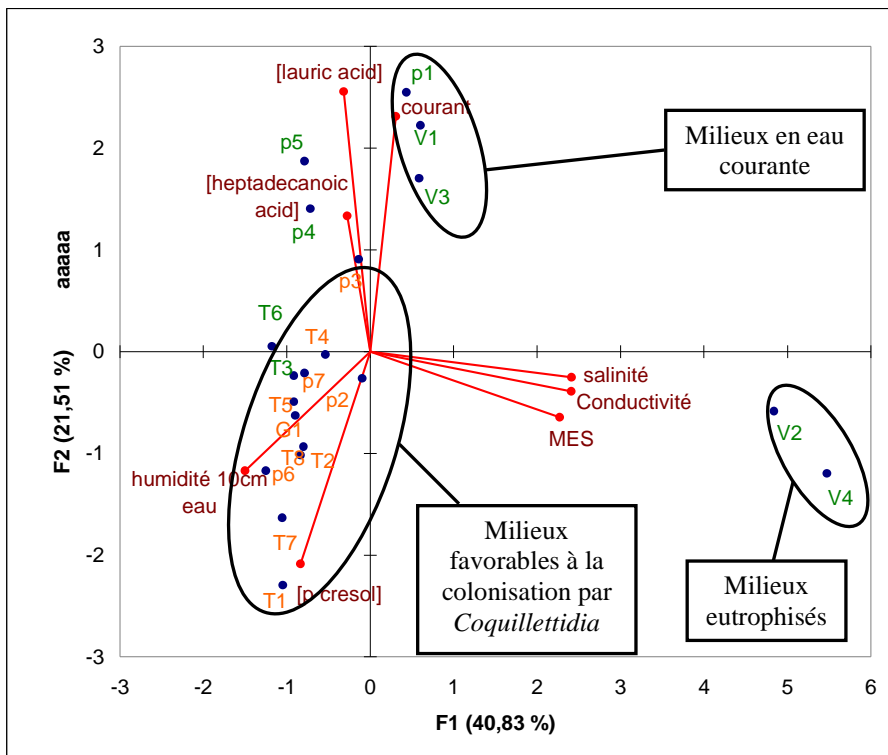
- elle est en eau courante,
- elle s'assèche / est desséchée périodiquement,
- elle est entretenue régulièrement, par exemple si le sol est retourné,
- elle ne présente pas de plantes aquatiques émergentes.

Dans le cas contraire d'une pièce d'eau permanente et stagnante, rarement ou jamais entretenue, une analyse plus poussée des paramètres suivants permet d'indiquer la présence potentielle de *Coquillettidia* :

- Une végétation aquatique peu diversifiée, dominée par des plantes émergentes à racines aérifères : *Typha* sp., *Phragmites* sp., *Scirpus* sp., *Juncus* sp. par exemple,
- la présence de nombreux débris végétaux dans l'eau, indiquant que plusieurs années ont passé depuis l'établissement de la végétation et que la dégradation de la matière organique est mauvaise,
- la présence d'une strate boueuse à l'interface entre la colonne d'eau et le substrat solide dans lequel les végétaux sont ancrés, dont la teneur en oxygène est nulle ou très faible ; c'est l'habitat potentiel des larves de *Coquillettidia*,
- une eau de pH neutre, oligo-haline (salinité < 4), peu chargée en M.E.S.,
- une forte humidité relative de l'air à proximité de l'eau semble être un paramètre important, en lien dans les stations de notre étude avec la présence d'un couvert arborescent plus ou moins dense. Néanmoins il nous est impossible de déterminer un seuil d'humidité aux abords du gîte, favorable à la colonisation de *Coquillettidia*.



- la présence de p-crésol et de faibles concentrations en acide laurique et en acide heptadécanoïque dans les eaux de surface caractérisent les eaux colonisées par *Coquillettidia*.



**Figure 24** : Analyse en Composantes principales représentant les stations et les variables explicatives.

Les stations colonisées par *Coquillettidia* sont en **orange**, les autres en **vert**.  
 Les variables explicatives sont en **bordeaux**.  
 62,34% de l'inertie totale est représentée par les axes F1 (40,83%) et F2 (21,51%).

Il existe une diversité de zones humides qui réunissent les critères énumérés ci-dessus. Pour autant elles ne sont pas forcément colonisées par *Coquillettidia*, mais leurs caractéristiques en font des gîtes potentiels pour ces moustiques. Cette liste d'indicateurs n'est

pas exhaustive mais permet de dégager les sites à surveiller en priorité dans le suivi et la gestion des populations de *Coquillettidia*.

## **B. Etude de la relation plante-insecte**

### **B.1. Introduction**

La relation existant entre les moustiques du genre *Coquillettidia* et certaines plantes aquatiques conditionne le développement des larves et des nymphes, qui vivent fixées aux racines, et par conséquent la survie des populations (Guille, 1975). Une des étapes de cette relation plante-insecte a lieu au stade adulte, où les femelles sont responsables du choix d'un site de ponte propice au développement des stades larvaire et nymphal, comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent. Il est donc très probable qu'elles soient capables de détecter dans les gîtes, la présence de plantes dont les racines pourraient servir de support aux larves et aux nymphes. Après l'éclosion des œufs, les larves de *Coquillettidia* doivent rapidement chercher à se fixer à des racines de plantes aquatiques, pour respirer, s'alimenter, et échapper aux prédateurs (Van den Assem, 1958 ; Laurence, 1960 ; Burton, 1964). De cette adaptation à la fixation dépend leur survie et les difficultés rencontrées dans le contrôle de ces populations de moustiques en découlent. C'est ce qui fait l'originalité et l'intérêt de cette interaction plante-insecte.

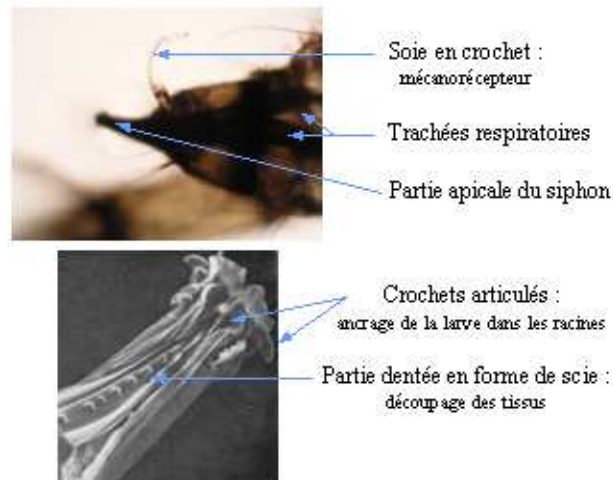
Peu d'études en milieu aquatique concernent les relations plantes-insectes, notamment du point de vue de l'écologie chimique, mais des associations originales ont été observées où plantes et insectes ont développé des adaptations à la survie dans un environnement contraint par le manque d'oxygène. Comme souvent dans les interactions plantes-insectes, l'association est la conséquence d'une co-évolution des deux organismes. Les hélophytes ont créé des tissus spécialisés dans la circulation des gaz, les aérénchymes, pour garantir un apport en oxygène à leurs racines situées dans un milieu anoxique (Wiessner *et al.*, 2002).

En retour, des insectes aquatiques ont développé des adaptations morphologiques, physiologiques et comportementales pour utiliser cette ressource et survivre dans un habitat hostile. C'est le cas de *Donacia simplex* (Fabricius, 1775 ; Coleoptera : Chrysomelidae), un coléoptère aquatique dont les adultes se nourrissent de plantes aquatiques et pondent sur la partie inférieure des feuilles flottantes. Les stades immatures vivent dans le sédiment meuble en profondeur, les larves se nourrissant des racines et des rhizomes de ces plantes aquatiques. Les larves et adultes sont capables de respirer en perforant les tissus végétaux grâce à deux épines abdominales communiquant avec les trachées (Houlihan, 1970).

Dans ce type d'interaction, les étapes essentielles du développement de l'insecte, son alimentation et sa reproduction dépendent des macrophytes, et aucune étude n'a permis d'estimer l'impact et le coût de cette association pour les plantes hôtes. Des adaptations à la perforation des tissus végétaux en lien avec la respiration sont retrouvées chez d'autres insectes aquatiques de positions systématiques variées. Les larves de *Desiantha ascita* (Pascoe ; Coleoptera : Cucurlionidae), les larves des diptères *Notiphila riparia* (Meigen, 1830 ; Ephydriidae) et *Erioptera squalida* (Loew, 1871 ; Limoniidae) possèdent également un appareil respiratoire doté d'appendices en forme de pointe ou de lame pour perforer les tissus des végétaux aquatiques (Houlihan, 1969 ; May, 1970 ; Foote, 1995).

Les larves de *Coquillettidia* et de *Mansonia* possèdent un siphon respiratoire modifié, dont la partie apicale sclérifiée est effilée et recourbée (figure 25). C'est cette partie qui pénètre dans les racines, grâce à une pièce mobile en forme de scie qui découpe les tissus végétaux, animée par les contorsions de la larve. Une série de crochets articulés armant l'extrémité du siphon, se relâchent pour ancrer la larve à son support, et se rétractent quand elle se détache. Deux soies en forme de crochets sont associées au siphon et ont la fonction de mécanorécepteurs, permettant à la larve de détecter les zones propices à la fixation sur les racines. La description anatomique de ce système respiratoire modifié a fait l'objet de nombreuses études (Wesenberg-Lund, 1920 ; Galliard, 1934 ; Burton, 1964 ; Guille, 1975 ; Bosack & Crans, 2002), mais aucune n'a examiné l'influence des facteurs environnementaux sur la fixation des larves. Cette adaptation est responsable indirectement de l'inefficacité du contrôle des populations de *Coquillettidia*. Il est donc important de déterminer les facteurs l'influençant, et de façon plus générale, d'identifier les mécanismes régissant cette relation plante-insecte particulière.

Dans ce chapitre, nous avons dans une première approche analysé le comportement des larves de *Coquillettidia* en fonction des paramètres de son environnement, en évaluant l'impact de facteurs abiotiques (lumière, teneur en oxygène, ...). Nous avons ensuite analysé les choix comportementaux des larves vis-à-vis du support biotique, en travaillant sur l'aspect visuel puis l'aspect morphologique du support de fixation (diamètre, variété végétale,...). Dans un deuxième temps, nous avons étudié la relation chimique existant entre les larves et les racines végétales. Nous avons appuyé nos recherches sur des expérimentations d'olfactométrie afin de sélectionner les messagers chimiques à pouvoir attractif sur *Coquillettidia*.



**Figure 25** : Siphon respiratoire modifié de la larve

Adapté de Guille, 1975.

## B.2. Matériel et méthodes

### B.2.1. Matériel animal

Les larves de *Coquillettidia* utilisées pour les tests de laboratoire proviennent de prélèvements effectués sur le terrain (description de la méthode d'échantillonnage en A.3.5.). Les difficultés liées à la localisation des gîtes larvaires à *Coquillettidia* et à la collecte d'un grand nombre de larves de taille standard de la même espèce nous ont conduit à utiliser pour les tests des lots de larves mêlant des individus de stades 3 et 4 et des deux espèces (*Cq. buxtoni* et *Cq. richiardii*). Des tests préliminaires ont montré que l'ensemble de ces individus exprimaient des comportements d'orientation et de fixation similaires (Anova ;  $p > 0,05$ ).

Entre les tests comportementaux, les individus ont été stockés dans des aquariums remplis d'eau du robinet, comportant des plantes collectées sur le terrain pour leur servir de support de fixation. L'eau est maintenue à 12°C, la luminosité ambiante est nulle et aucune nourriture n'est ajoutée au milieu, les larves se nourrissant des colonies de micro-organismes colonisant les racines des plantes (Guille, 1975). Dans ces conditions, les populations larvaires peuvent être conservées pendant 1 à 2 mois sans montrer de trouble du comportement. Les mêmes larves n'ont jamais été utilisées plus d'une fois par jour pour les tests comportementaux.

## B.2.2. Matériel végétal

Les plantes ont été cultivées en milieu hydroponique de Hoagland et en conditions contrôlées : photopériode de 16 heures d'éclairement et 8 heures d'obscurité ; température  $25 \pm 2$  °C ;  $80 \pm 5$  % d'humidité relative ; intensité lumineuse  $1065 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ .

### **B.2.2.1. La massette : *Typha latifolia* (Linnaeus, 1753)**

La massette est une plante aquatique (hélrophyte) monocotylédone faisant partie du sous-embranchement des Angiospermes (famille des Typhaceae), et un support végétal naturel des larves et nymphes du genre *Coquillettida*. Les plantes utilisées ont été obtenues par bouturage de plantes prélevées sur le terrain. La procédure consiste à isoler des fragments de rhizomes possédant des racines vivantes et à les cultiver en solution hydroponique. Les plantules utilisées pour les expériences (stade 2-3 feuilles) ont été obtenues en quelques semaines.

### **B.2.2.2. La glycérie flottante : *Glyceria fluitans* (Linnaeus, 1810)**

La glycérie flottante est une monocotylédone de la famille des Poaceae, colonisant les prairies humides, mares temporaires et ruisseaux de faible débit. Les plantes ont été collectées dans la prairie humide bordant l'un des gîtes à *Coquillettida* du site du Tremblay.

### **B.2.2.3. Le plantain d'eau lancéolé : *Alisma lanceolatum* (Withering, 1796)**

Le plantain d'eau est une plante aquatique, du groupe des monocotylédones et de la famille des Alismataceae. Les plantes ont été collectées directement dans leur habitat, au niveau de mares voisines des gîtes larvaires à *Coquillettida* du site du Tremblay. Elles ont été transportées au laboratoire et cultivées dans les conditions précédemment décrites.

### **B.2.2.4. Le maïs : *Zea mays* (Linnaeus, 1753)**

Les plantules de maïs (monocotylédones, famille des Poaceae) ont été utilisées comme modèles de laboratoire car elles présentent l'avantage d'être faciles à cultiver et de se développer rapidement, ce qui a permis l'obtention rapide de plantules de taille standard. Des

études préliminaires avaient par ailleurs démontré que les larves de *Coquillettidia* s'y fixaient en grand nombre (Sérandour *et al.*, 2006). Les semences de maïs ont été mises à germer puis cultivées en conditions standards. Les plantules utilisées étaient âgées d'une quinzaine de jours (stade 2-3 feuilles).

#### **B.2.2.5. Le tournesol : *Heliantus annuus* (Linnaeus, 1753)**

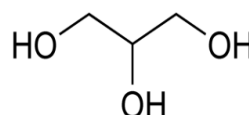
Le tournesol est une plante du groupe des dicotylédones et de la famille des Asteraceae. C'est une plante cultivée tolérant le manque d'eau. Les plantules utilisées (stade 2-3 feuilles) ont été obtenues en une dizaine de jours à partir de semences mises à germer dans les conditions standards décrites.

### **B.2.3. Molécules de synthèse**

Les molécules suivantes ont été étudiées pour mettre en évidence leur éventuelle implication dans la relation chimique entre les plantes et les larves de moustiques.

#### **B.2.3.1. Le glycérol**

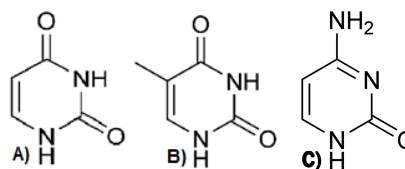
Le glycérol (propan-1,2,3-triol ; figure 26) se présente sous forme d'un liquide transparent, visqueux, incolore et inodore (RECTAPUR TM, pureté : 98%). C'est une molécule soluble dans l'eau et l'éthanol, d'un poids moléculaire de  $92,09 \text{ g.mol}^{-1}$ . Dans le vivant on le retrouve principalement comme précurseur des lipides membranaires et du fructose chez les végétaux (Gerber *et al.*, 1988).



**Figure 26 :**  
Formule chimique développée du glycérol

### B.2.3.2. Les bases azotées

L'uracile (2,4-dioxypyrimidine ; 112,09 g.mol<sup>-1</sup>), la thymine (5-méthyluracile ; 126,12 g.mol<sup>-1</sup>) et la cytosine (2-oxo-4-aminopyrimidine ; 111,10 g. mol<sup>-1</sup>) sont trois bases pyrimidiques (figure 27). L'uracile est spécifique de l'ARN, la thymine de l'ADN, la cytosine est retrouvée dans les deux types d'acides nucléiques. Ces substances se présentent toutes trois sous la forme d'une poudre blanche soluble dans l'eau (Sigma-Aldrich, >99% pureté).

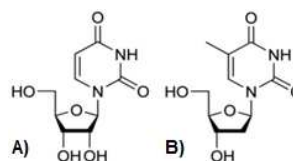


**Figure 27 :**

Formules chimiques développées de l'uracile (A), de la thymine (B) et de la cytosine (C).

### B.2.3.3. Les nucléosides

L'uridine (244,2 g.mol<sup>-1</sup>) est le nucléoside qui résulte de l'attachement de l'uracile sur un cycle ribose (figure 28). La thymidine, ou désoxythymidine, (242,2 g.mol<sup>-1</sup>) est le nucléoside qui résulte de l'attachement de la thymine sur un cycle désoxyribose. Ces deux molécules se présentent sous la forme d'une poudre blanche soluble dans l'eau (Sigma-Aldrich, >99% pureté).



**Figure 28 :**

Formules chimiques de l'uridine (A) et de la thymidine (B)

### B.2.3.4. Autres molécules

D'autres molécules ont également été utilisées en tests comportementaux sur les larves de *Coquillettidia*, parce qu'elles sont présentes et/ou décrites dans les exsudats du maïs (Kumar *et al.*, 2006). Les acides aminés (glycine, thréonine, proline, sérine), les acides organiques (acides citrique, malique, succinique, ferrulique, coumarique, cinnamique), les monosaccharides (glucose, ribose, désoxyribose), un acide gras (monopalmitine), et des métabolites secondaires (la DIMBOA (purification selon Raveton *et al.*, 1997) et les flavonoïdes rutine et quercétine) ont été testés sous forme de solution pure (> 98 %) provenant de la société Sigma-Aldrich.

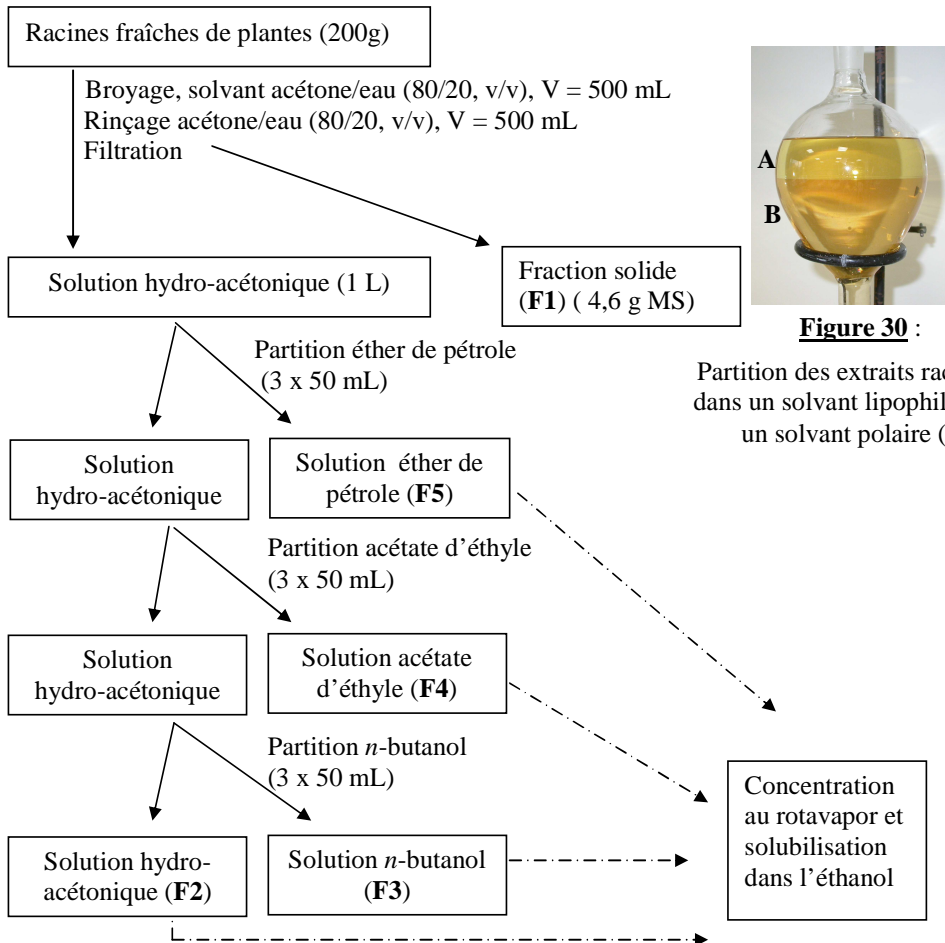


#### B.2.4. Protocole d'extraction des composés racinaires des plantes

Afin d'identifier les composés racinaires susceptibles de jouer un rôle dans la relation entre les plantes et les larves, leur extraction a été réalisée en plusieurs étapes (figure 29) :

- 1- Des plantes de maïs et de massettes, reconnues comme attractives pour les larves de *Coquillettidia* (Sérandour *et al.*, 2006), ont été disséquées afin de réunir une quantité importante de racines fraîches (masse = 200g).
- 2- Ces racines ont été broyées dans un solvant acétone (99,99%, HPLC grade, Fischer Chemicals)/eau (80/20, v/v) et le broyat a été filtré sur papier filtre. Les résidus solides ont été re-suspendus dans un solvant acétone/eau (80/20, v/v), agités puis filtrés. Le broyat restant a été séché à l'étuve (30 min à 30°C), et tamisé pour séparer les fibres racinaires et les composés ayant précipité dans l'acétone (fraction **F1**).
- 3- Cette solution hydro-acétonique a ensuite été mélangée à un solvant lipophile, l'éther de pétrole (40°- 60°, Analytical Reagent grade, Fischer Chemicals), de façon à extraire les composés très lipophiles (figure 30).
- 4- La solution hydro-acétonique recueillie a été partagée contre un solvant de polarité intermédiaire : l'acétate d'éthyle (99,99%, HPLC grade, Fischer Chemicals).
- 5- La dernière étape de cette extraction consiste à partager la solution hydro-acétonique contre un solvant de lipophilie plus faible : le *n*-butanol (99,99%, HPLC grade, Fischer Chemicals).
- 6- Les quatre solutions obtenues ont ensuite été évaporées au rotavapor (Heidolph 94200), et reprises dans un faible volume d'éthanol (20 à 40 mL) (99,99%, HPLC grade, Fischer Chemicals).

Les composés racinaires ont ainsi été séparés selon leur polarité en 5 fractions (**F1** à **F5**).



**Figure 30 :**  
Partition des extraits racinaires dans un solvant lipophile (A) et un solvant polaire (B).

**Figure 29 :** Etapes de la séparation des composés racinaires par partition et diffusion dans des solvants de polarité croissante.

### B.2.5. Protocole de récolte des exsudats racinaires des plantes

Les exsudats racinaires des plantes de maïs et de massettes ont été recueillis afin d'en analyser la composition et de déterminer s'ils étaient mis en jeu dans la relation plante-larves. Pour cela, 5 plantes de massettes ou 20 plantules de maïs ont été disposées dans un récipient contenant 400 mL d'eau du robinet stérilisée (l'ensemble du dispositif étant fermé pour éviter les contaminations extérieures). Les parois du cristallisateur ont été recouvertes de papier aluminium, ne laissant que les parties aériennes des plantes exposées à la lumière, de façon à éviter le développement d'algues. Chaque 24h, les exsudats ont été collectés et filtrés sur un filtre de cellulose (Whatman, No 1), congelés puis lyophilisés. Les lyophilisats ont été repris dans une solution eau/éthanol (99,99%, HPLC grade, Fischer Chemicals) (30/10, v/v) puis conservés à -20°C.

### B.2.6. Traitement des échantillons de terrain

Des échantillons de terrain ont été prélevés au site du Tremblay (Savoie, figure 13) dans un fossé colonisé par des larves de *Coquillettida*. Des fractions de sédiments ont été collectées au niveau des racines et donc de l'habitat des larves. Ces boues meubles ont été centrifugées (1000 rpm, 15 min) afin de culotter les matières organiques et les débris solides. Les surnageants limpides ont été récupérés (V = 700 mL), congelés et lyophilisés. Les lyophilisats ont été re-suspendus dans 20 mL eau/éthanol (35/5, v/v) puis conservés à -20°C.

### B.2.7. Analyse de la composition chimique des extraits par CPG-MS

Les exsudats de plantes, les échantillons d'eau et de boue filtrée prélevés dans les gîtes larvaires et les fractions issues du broyage de racines ont été silylés et analysés par la technique de CPG-MS décrite précédemment (A.3.4.5.). L'analyse en mode «SCAN» a permis d'identifier les composés majoritaires de chaque échantillon. Une analyse en mode

« SIM » (« Selected Ion Monitoring ») a également été réalisée pour doser des composés présents en très faibles quantités dans les extraits (cas des bases azotées et nucléosides). Les masses et les temps de rétention ont été sélectionnés grâce aux standards chimiques silylés : uracile ( $m/z = 256, 241$  ;  $t_R = 7,60$ ), thymine ( $m/z = 270, 255$  ;  $t_R = 7,81$ ), cytosine ( $m/z = 254, 240$  ;  $t_R = 8,19$ ), uridine ( $m/z = 217, 259$  ;  $t_R = 14,36$ ), thymidine ( $m/z = 261, 277$  ;  $t_R = 13,72$ ). L'étape de silylation nous permet de doser les composés de petite taille et peu volatiles comme décrit par Miller *et al.* (1976) and Yoon (2007).

Les concentrations en produits dans nos échantillons ont été évaluées grâce à des gammes étalons de standards chimiques réalisées en duplicats. Les équations établies sont les suivantes (régressions linéaires) :

- Glycérol : [glycérol] = (surface de pic - 4000000) / 11831; ( $R^2 = 1$ ) ;
- Uracile : [uracile] = (surface de pic - 20572,43) / 245,17 ; ( $R^2 = 0,9996$ ) ;
- Thymine : [thymine] = (surface de pic + 426256,93) / 466,08 ; ( $R^2 = 0,994$ ) ;
- Uridine : [uridine] = (surface de pic + 49828,36) / 143,43 ; ( $R^2 = 0,995$ ) ;
- Thymidine : [thymidine] = (surface de pic - 881,16) / 2,93 ; ( $R^2 = 0,998$ ).

#### B.2.8. Protocole de suivi du comportement de fixation des larves à un support

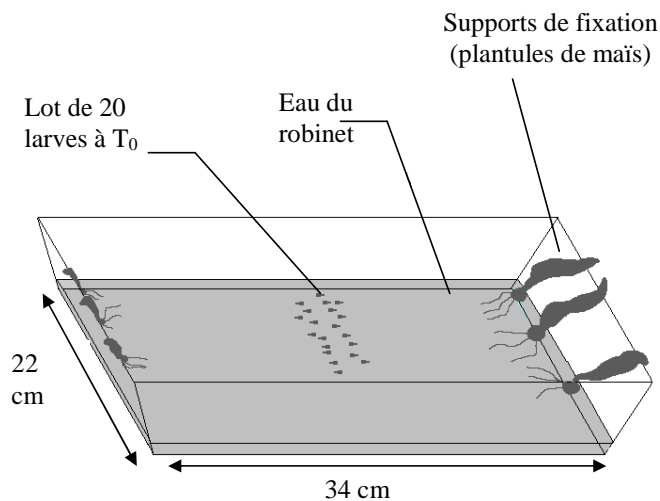
Le protocole que nous avons mis au point est le suivant : un lot de 20 larves de *Coquillettidia* est disposé au temps  $T_0$  au centre d'un dispositif de test en plastique, de forme rectangulaire, contenant 1500 mL d'eau du robinet à température ambiante et des plantules de maïs pour la fixation (figure 31). Le nombre de larves fixées aux racines est compté régulièrement, en général toutes les 5 minutes pendant 60 minutes. L'influence des paramètres environnementaux sur le comportement de fixation des larves a été évaluée en faisant varier les paramètres suivants (tableau 8) :

**Tableau 8** : Variables testées dans l'étude du comportement de fixation

Variable testée	Valeur de la variable	Nombre d'essais
<b>Intensité lumineuse</b>	Obscurité totale	16
	120 Lux	16
<b>Couleur du fond</b>	Noir	10
	Blanc	10
<b>Teneur en oxygène dissous</b>	0 %	30

	100 %	30
<b>Diamètre des racines</b>	< 1 mm	14
	> 1 mm	14

- L'intensité lumineuse a été mesurée avec une cellule d'enregistrement LI-COR de la marque Glen Spectra. Dans ce cas, les comptages ont lieu toutes les 30 minutes pendant 2h, puis toutes les heures jusqu'à 8h, et enfin à 12h et 24h ;
- la couleur du fond du dispositif (intensité lumineuse très faible : 20 Lux) ;
- la concentration en oxygène dissous de l'eau, mesurée avec une électrode à oxygène ConOx-3 de la marque WTW). Une eau à teneur nulle en oxygène a été obtenue par bullage à l'azote, une eau saturée en oxygène par bullage à l'oxygène (intensité lumineuse : 20 Lux) ;
- la fixation préférentielle des larves à des racines de gros diamètre ou de petit diamètre a également été testée (intensité lumineuse : 20 Lux).



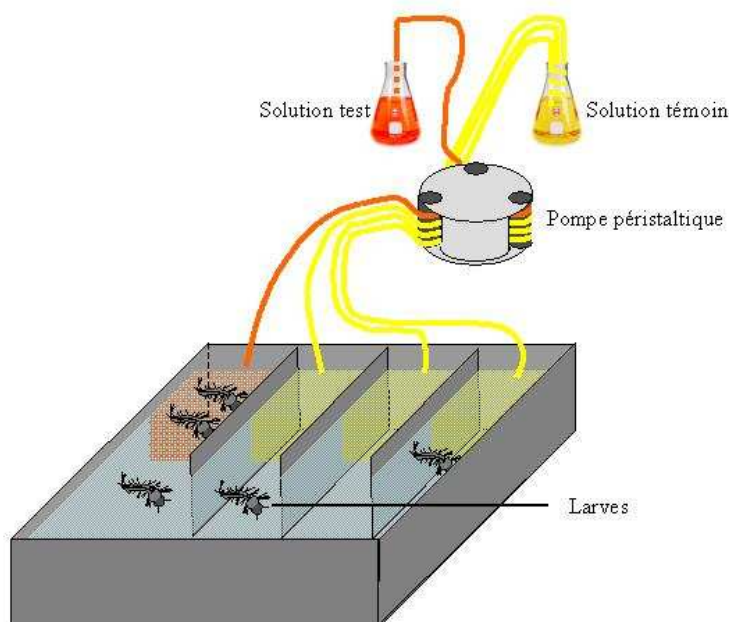
**Figure 31** : Dispositif de suivi du comportement de fixation des larves (Sérandour *et al.*, 2006)

### B.2.9. Protocole de suivi du comportement d'orientation des larves

L'étude du comportement d'orientation des larves de *Coquillettidia* a été réalisée suivant deux protocoles différents, que nous avons mis au point lors d'essais préliminaires.

#### *B.2.9.1. Tests de choix en groupe, sur une longue durée*

Une première étape a consisté à tester l'attractivité de plantes, d'extraits de plantes ou de molécules de synthèse par rapport à un témoin, pour des lots de 20 larves. Ces essais ont été réalisés dans des dispositifs rectangulaires (34 cm x 22 cm) dont une extrémité est séparée en 4 voies parallèles de taille égale. Aux extrémités de ces voies ont été disposés les items à tester (plantes, arrivée de solutions : extraits de plantes ou molécules de synthèse), et les items témoin (leurre inerte ou arrivée d'eau). Dans le cas de tests de solutions, celles-ci ont été acheminées à débit contrôlé (3,2 mL/minute) dans le dispositif grâce à une pompe péristaltique (Ismatec-Ecoline ; figure 32).



**Figure 32** : Dispositif de suivi du comportement d'orientation des larves par rapport aux items présentés, sur une longue durée

Le protocole mis au point consiste, au temps  $T_0$ , à déposer les 20 individus testés à l'opposé des items proposés puis à procéder au comptage du nombre de larves présentes dans chaque voie, toutes les 5 minutes pendant une durée totale de 60 minutes. Dans le cas de tests de solutions,  $T_0$  correspond au moment où ces solutions rentraient dans l'arène de test. Durant l'essai, le dispositif a été maintenu à l'obscurité par un couvercle, celui-ci étant délicatement retiré à l'occasion des comptages. Au minimum, 10 réplicats espacés d'une étape de rinçage

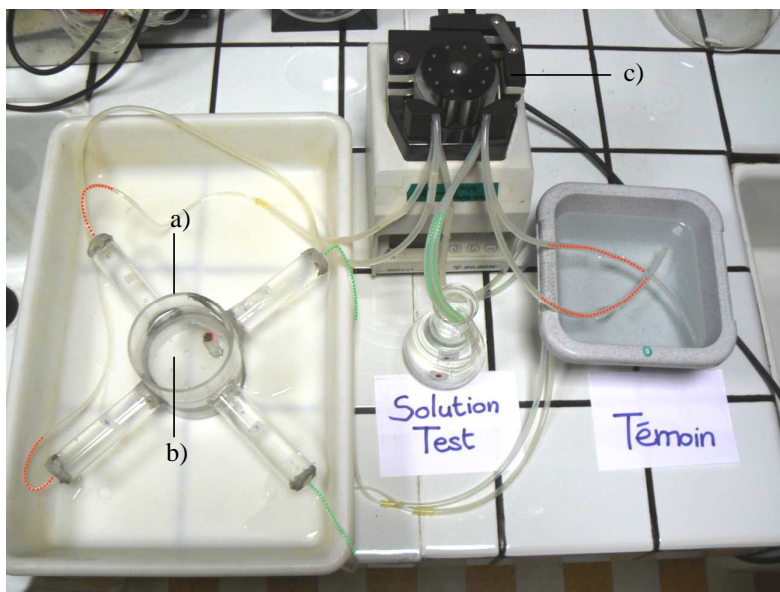
du dispositif (éthanol puis eau) ont été réalisés pour chaque essai, en permutant à chaque fois la position des items dans les voies de l'arène.

### **B.2.9.2. Tests de premiers choix**

Un deuxième protocole a été établi pour suivre le comportement d'orientation des larves, individu par individu, en continu et sur la base de leur premier choix. Ces essais ont été réalisés dans des dispositifs construits au laboratoire, qui sont des adaptations du modèle utilisé par Saglio et Blanc (1983) pour l'étude comportementale de la carpe.

Chaque dispositif est constitué d'une arène circulaire en plexiglas de 10 cm de diamètre, munie de 4 bras équidistants, de 10 cm de long et de 2,5 cm de diamètre (figure 33). L'arène possède un fond fixé et un couvercle amovible permettant d'ajuster la hauteur d'eau dans l'arène à 2,5 cm. Ce couvercle possède un orifice en son centre permettant l'insertion de la larve de moustique et la sortie d'eau. A l'extrémité de chaque bras débouche un tuyau relié à une pompe péristaltique, par lequel est acheminée la solution test ou témoin, à débit contrôlé (3,2 mL/minute).

Afin d'éviter les biais comportementaux liés à la lumière blanche, et comme l'observation en continu est impossible en obscurité totale, les tests ont été réalisés sous lumière rouge (650 nm), à laquelle la majorité des Diptères sont insensibles (Wu & Lin, 1990).



**Figure 33** : Dispositif de suivi du premier choix des larves

- a) Arène circulaire à 4 bras ;
- b) orifice central du couvercle (insertion larve) ;
- c) Pompe péristaltique

Le protocole retenu consiste à déclencher la pompe péristaltique pour acheminer les solutions test et témoin de façon synchrone au niveau des bras de l'arène, préalablement remplie d'eau du robinet. L'essai débute à l'entrée des solutions dans l'arène, une larve est alors déposée en son centre au temps  $T_0$ . Le choix réalisé par la larve entre la voie de la solution test ou celle de la solution témoin est noté. La durée maximale de chaque essai a été fixée à 3 minutes après réalisation de tests préliminaires, plus de 90% des individus exprimant un choix dans ce pas de temps.

Les essais ont été réalisés sur 60 individus au moins (de 60 à 90).

Le dispositif a été abondamment rincé à l'éthanol puis à l'eau à l'issue de chaque test, et les voies d'arrivée des solutions ont été permutées à chaque essai.

#### ***B.2.10. Analyses statistiques***

Les résultats des tests de suivi du comportement de fixation des larves ont été exprimés comme le nombre moyen de larves fixées ( $\pm$  erreur standard) à chaque intervalle de temps. Les cinétiques de fixation obtenues, correspondant au nombre moyen de larves fixées dans chaque condition (test / témoin) en fonction du temps ont été comparées, par une analyse de variance (Anova). L'éventuelle interaction du temps avec la variable environnementale testée a été évaluée, au moyen d'une Anova à mesures répétées, avec le logiciel SPSS 11.0.

Les résultats des tests de suivi du comportement d'orientation de larves dans des dispositifs à 4 couloirs (figure 32) ont été exprimés comme le nombre moyen de larves attirées dans chaque direction ( $\pm$  erreur standard), à chaque intervalle de temps. Les fréquentations moyennes observées dans les couloirs pour les différents items proposés (eau / solutions tests / leurre / plantes) ont été comparées par une Anova (logiciel Statview 4.57.0.0.).

Lors des tests de premier choix, réalisés avec un seul individu en olfactomètre (figure 33), la nature de la première voie choisie par la larve au cours des 3 minutes imparties a été notée. La fréquentation des différentes voies (voies test et témoin) a été comparée avec un test de conformité du  $\chi^2$  à la fréquentation attendue par hasard des voies (25% pour chacun des bras de l'arène, soit 50% pour chacune des solutions testées). Le logiciel utilisé pour les tests du  $\chi^2$  de conformité est Statview 4.57.0.0.

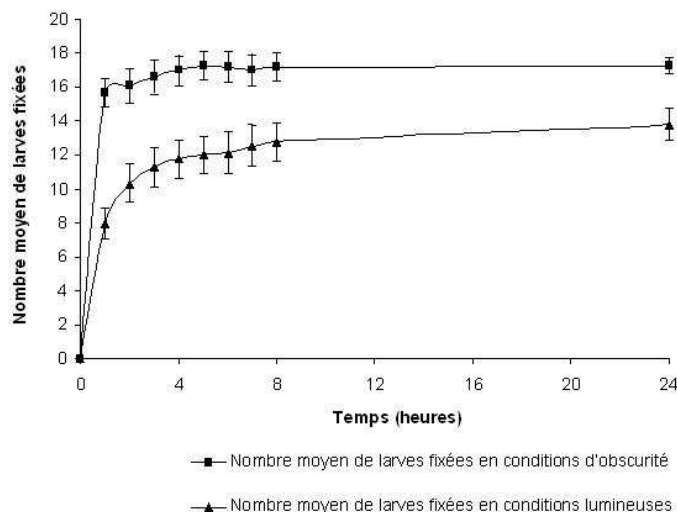


### B.3. Résultats

#### B.3.1. Facteurs influençant la fixation des larves (Sérandour et al., 2006)

##### B.3.1.1. Influence de l'intensité lumineuse

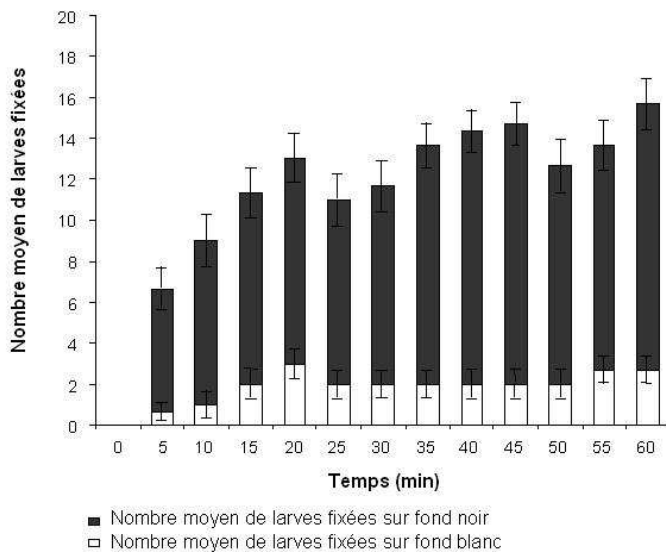
La comparaison des cinétiques de fixation des larves aux racines de plantules de maïs, en conditions de lumière et d'obscurité, indique que l'obscurité a un effet significatif sur le comportement de fixation (ANOVA univariée pour mesures répétées :  $F_{1,30} = 16.81$ ,  $p < 0.001$ ). En effet, près de 80% des larves testées se sont fixées dans les 2 premières heures à l'obscurité, contre 40% sous intensité lumineuse (figure 34). La proportion de larves fixées est toujours plus importante à l'obscurité qu'à la lumière au bout de 24h (86% contre 69%). Le comportement de fixation des larves varie significativement sous l'effet conjoint du temps et de l'intensité lumineuse (ANOVA multivariée pour mesures répétées :  $F_{10,21} = 4.99$ ,  $p < 0.001$ ).



**Figure 34** : Influence de l'intensité lumineuse sur la cinétique de fixation des larves

### B.3.1.2. Influence de la couleur du substrat

Le comportement de fixation des larves aux racines, est significativement influencé par la couleur du substrat (ANOVA univariée pour mesures répétées :  $F_{1,18} = 64.86$ ,  $p < 0.001$ ). Le nombre de larves fixées dans des conditions où le fond du dispositif est noir est supérieur au nombre de larves fixées lorsque le fond est blanc, et ceci pour chaque intervalle de temps testé (figure 35). Cette tendance s'accroît avec le temps, révélant une influence conjointe du temps et de la couleur du fond du dispositif expérimental sur le comportement de fixation des larves (ANOVA multivariée pour mesures répétées :  $F_{11,8} = 6.37$ ,  $p < 0.01$ ). Au bout de 60 minutes, elles sont près de 5 fois plus nombreuses à s'être fixées aux racines sur fond noir (65% des larves fixées) que sur fond blanc (13,3% des larves fixées).

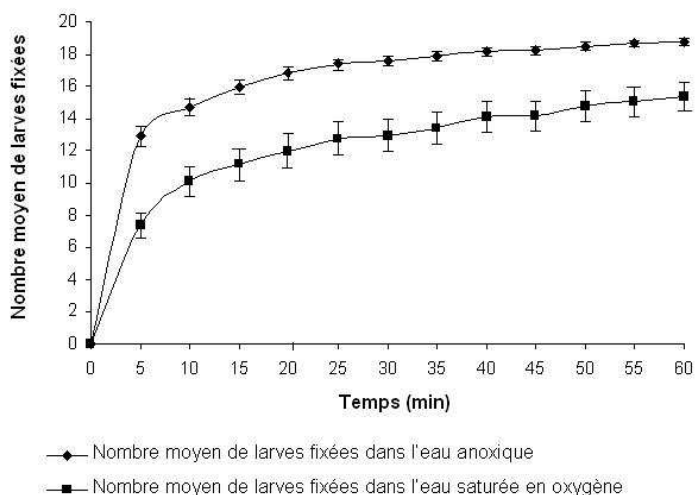


**Figure 35** : Influence de la couleur du fond (substrat) sur la cinétique de fixation des larves

### B.3.1.3. Influence de la teneur en oxygène de l'eau

La teneur en oxygène de l'eau influence significativement le comportement de fixation, les larves se fixant plus rapidement et en plus grand nombre aux racines en milieu

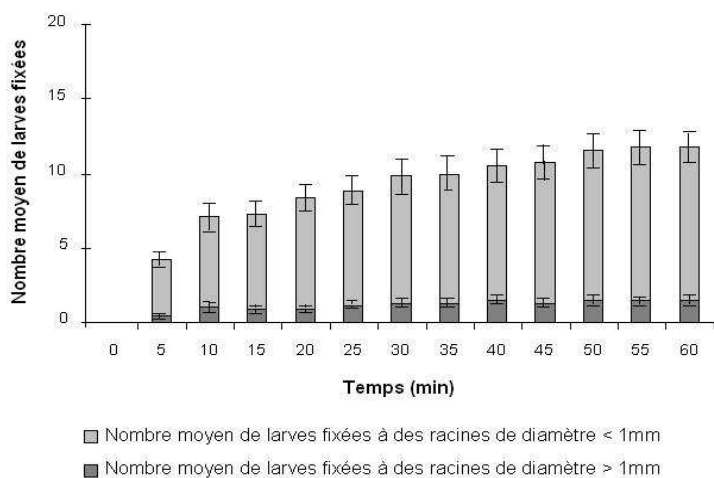
anoxique (ANOVA univariée pour mesures répétées :  $F_{1,26} = 48.59$ ,  $p < 0.001$ ). Les 2/3 des larves sont fixées dès les 5 premières minutes de l'expérience en milieu anoxique, contre 37% en milieu saturé en oxygène (figure 36). Au bout de 60 minutes, 94% des larves sont fixées en conditions anoxiques, contre 77% dans le milieu oxygéné.



**Figure 36** : Influence de la teneur en oxygène de l'eau sur la cinétique de fixation des larves

#### B.3.1.4. Influence du diamètre des racines

Les larves se fixent préférentiellement aux racines de faible diamètre (ANOVA univariée pour mesures répétées :  $F_{1,26} = 48.59$ ,  $p < 0.001$  ; figure 37).



**Figure 37** : Influence du diamètre des racines sur la fixation des larves

Dès les 5 premières minutes et jusqu'à la fin de l'expérience, les larves sont 6 à 8 fois plus nombreuses à se fixer à des racines fines. Ce rapport varie peu et au bout de 60 minutes, 51% des larves se sont fixées aux racines de faible diamètre, contre 8% seulement aux racines de gros diamètre.

#### **B.3.1.5. Discussion**

Le comportement de fixation des larves de *Coquillettidia* aux racines des plantes est influencé par des variations des conditions environnementales. Les résultats des tests indiquent que l'intensité lumineuse est un facteur limitant la fixation des larves, un environnement obscur et un fond noir apparaissant comme des conditions optimales. En général, les larves de moustiques sont attirées par la lumière, des pièges ont d'ailleurs été conçus sur ce principe (Clements, 1999). Les larves des genres *Aedes* et *Culex*, qui respirent en surface, réagissent fortement à des variations d'intensité lumineuse en plongeant en profondeur, ce qui leur permet d'échapper à des prédateurs (Mellanby, 1958). Les larves de *Coquillettidia* sont au contraire lucifuges, ce qui s'explique par l'originalité de leur habitat, qui est complètement obscur du fait d'une eau boueuse très chargée en particules argileuses et en débris végétaux. Leur système visuel est d'ailleurs rudimentaire, constitué par deux yeux latéraux de petite taille composés d'ocelles captant les variations lumineuses (Guille, 1975).

Les larves de *Coquillettidia* vivent en permanence dans un habitat contraint par le manque d'oxygène, leur survie dépend donc de leur capacité à détecter rapidement des racines aérifères où ce gaz est disponible. En effet, les larves se sont révélées très sensibles à la teneur en oxygène de l'eau au cours des expériences. Elles ont été moins rapides et moins nombreuses à se fixer aux racines en milieu oxygéné, ce qui laisse penser qu'une concentration faible ou nulle en oxygène initie le comportement de recherche d'une plante hôte. Les insectes ayant développé des adaptations leur permettant de respirer l'oxygène des tissus végétaux en milieu anoxique sont rares. Les adultes de *Donacia simplex* (Fabricius, 1775 ; Coleoptera : Chrysomelidae), les larves de *Desiantha ascita* (Pascoe ; Coleoptera : Cucurlionidae) et les larves des diptères *Notiphila riparia* (Meigen, 1830 ; Ephydriidae) et *Erioptera squalida* (Loew, 1871 ; Limoniidae) possèdent également un appareil respiratoire doté d'appendices en forme d'épine ou de lame pour perforer les tissus des végétaux aquatiques (Houlihan, 1969, 1970 ; May, 1970 ; Foote, 1995). Les larves de *Coquillettidia*

ont également la capacité de respirer l'oxygène en surface, comme la majorité des larves de moustiques, mais ce comportement n'est pas naturel et les rend vulnérables, leur nage ralentie ne leur permettant pas d'échapper aux prédateurs.

La fixation des larves ne se fait pas au hasard sur les racines des plantes, comme l'indiquent nos résultats. Le choix marqué pour des racines de faible diamètre s'explique par le coût moins important en énergie que la perforation de tissus jeunes et fins occasionne, par rapport à des tissus de racines plus âgées et lignifiées. Les parties fines correspondent également aux zones pilifères fonctionnelles des racines, zones où l'on trouve des aérénchymes développés chez la massette *T. angustifolia* (Guille, 1976). La description faite par Batzer et Sjögren (1986) des racines d'eau, propices à la fixation des larves de *Cq. perturbans*, correspond également à des racines fines en chevelu dense. Nous avons toutefois observé que les larves n'étaient pas capables de se fixer sur des radicelles de lentilles d'eau (*Lemna minor* Linnaeus, 1753), de diamètre très fin (< 500  $\mu\text{M}$ ).

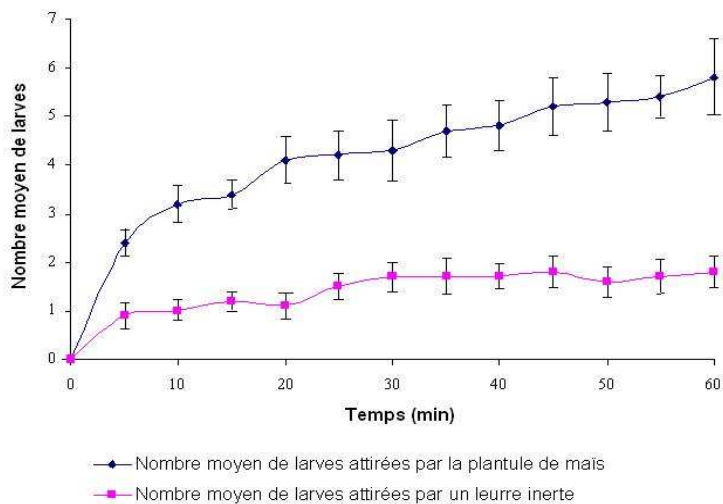
Le comportement original de fixation à un support végétal exprimé par les larves de *Coquillettidia* paraît déterminé en premier lieu par la nécessité d'obtenir de l'oxygène dans un milieu en anoxie. Cette adaptation a une valeur de survie car des larves ne pouvant se fixer en conditions naturelles seraient contraintes de remonter en surface pour respirer et seraient susceptibles de mourir rapidement. La nécessité de détecter les racines de végétaux dans leur environnement pour s'y fixer est d'autant plus importante que la nage est très coûteuse en énergie pour ces larves au métabolisme ralenti. De plus, c'est dans la rhizosphère où elles sont fixées, qu'elles trouvent les microorganismes qui composent leur régime alimentaire (Guille, 1976). Enfin, la fixation permet aux larves d'éviter d'éventuels prédateurs par mimétisme, leur position immobile permettant la confusion avec les radicelles des plantes (Van den Assem, 1958). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les larves de *Coquillettidia* ne détectent pas les racines des végétaux en nageant au hasard, mais en utilisant des signaux émis par les plantes. La prochaine étape de cette étude a pour but de vérifier cette hypothèse et de déterminer la nature de ces signaux.

### B.3.2. Nature du signal impliqué dans l'orientation des larves vers les racines

La démarche suivie a consisté à tester la réponse des larves à des stimuli variés, de façon à déterminer la nature du signal leur permettant de repérer les supports de fixation dans leur habitat.

#### B.3.2.1. Hypothèse n°1 : les larves répondent à des stimuli visuels

Le nombre de larves qui orientent leur nage en direction de la plantule de maïs est significativement plus grand que le nombre de larves s'orientant vers un leurre inerte (ANOVA:  $F_{1,23} = 15,59$  ;  $p < 0,0001$  ; figure 38).



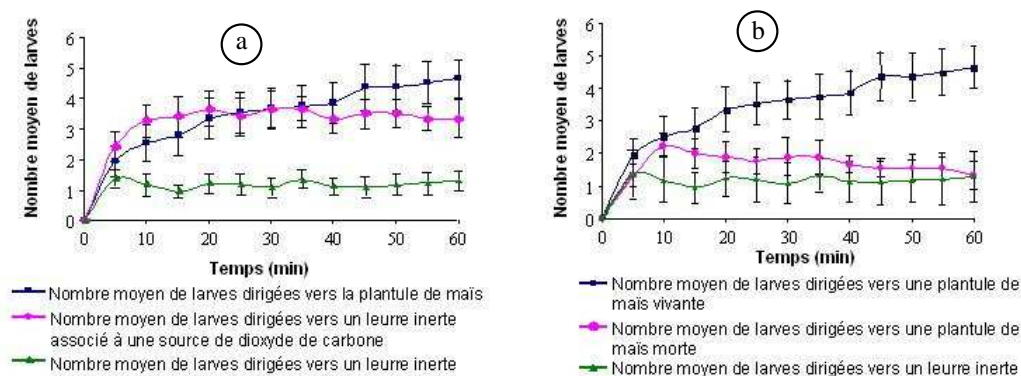
**Figure 38** : Choix des larves entre une plantule de maïs et un leurre inerte

Le leurre inerte mime une plantule et est constitué de plastique.

Les larves de *Coquillettidia* différencient une plantule de maïs et un leurre mimant une plantule, l'orientation n'est donc pas liée à des repères visuels.

### B.3.2.2. Hypothèse n°2 : les larves répondent à des stimuli chimiques

Les larves de *Coquillettidia* ne montrent pas de différence significative dans leur choix, entre une plantule de maïs et l'association d'un leurre à une source de dioxyde de carbone (figure 39a ; ANOVA:  $F_{1,30} = 0,45$  ;  $p = 0,51$ ). La source de dioxyde de carbone est significativement plus attractive que le leurre témoin (ANOVA :  $F_{1,23} = 8,03$  ;  $p < 0,0001$ ).



**Figure 39** : Choix des larves entre différentes sources de stimuli chimiques

Les larves sont significativement plus nombreuses à se diriger vers une plantule de maïs vivante que vers une plantule de maïs morte (figure 39b ; ANOVA:  $F_{1,23} = 1,88$  ;  $p = 0,012$ ). Il n'y a pas de différence significative d'attraction entre un leurre et une plante morte (congelée puis décongelée) (ANOVA:  $F_{1,23} = 0,57$  ;  $p = 0,95$ ).

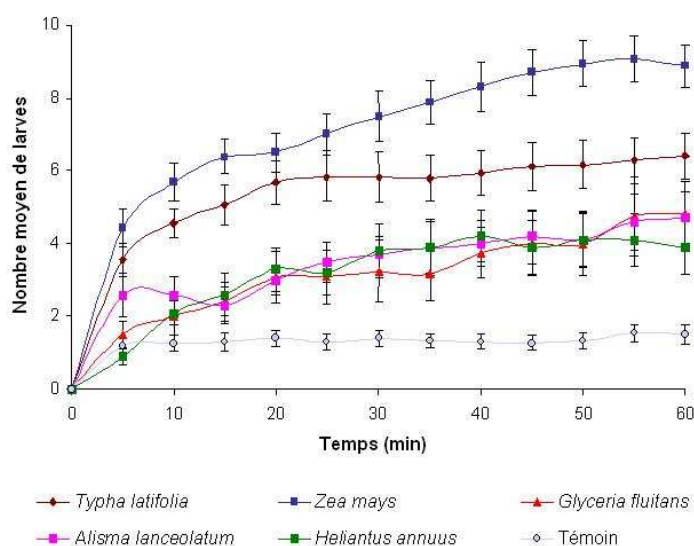
Les larves de *Coquillettidia* sont sensibles à des signaux chimiques émis par les plantules de maïs vivantes, puisqu'on observe une perte de l'attraction avec une plante morte. Le dioxyde de carbone est attractif ; il est potentiellement impliqué dans la reconnaissance des plantes par les larves.

### B.3.2.3. Hypothèse n°3 : les stimuli chimiques sont spécifiques d'un genre végétal

Nous avons testé la réponse des larves à des plantes différentes, sur le plan de l'habitat (milieux humides / sols cultivés), de la stature (macrophyte / herbacée) et de la position

systématique (monocotylédones / dicotylédones), afin de connaître la diversité d'espèces végétales possédant une attraction.

Les 5 plantes testées sont attractives par rapport au témoin (eau). La glycérie flottante, qui a été la moins choisie des plantes, présente une attraction significativement plus élevée que le témoin (ANOVA:  $F_{1,11} = 2,51$  ;  $p < 0,0001$ ). Les plantules de maïs sont les plus attractives des plantes testées, devant les plantules de massette (figure 40 ;  $p < 0,0001$ ). L'attraction relative des plantes est différente mais elles sont toutes reconnues par les larves de *Coquillettidia*. Le signal chimique impliqué dans la reconnaissance des plantes par les larves pour la fixation semble commun à une grande variété d'espèces végétales.



**Figure 40** : Attractivité de différentes espèces végétales pour les larves de *Coquillettidia*

#### B.3.2.4. Hypothèse 4 : Les tissus racinaires contiennent des substances chimiques attractives

Les larves de *Coquillettidia* sont attirées de façon significative par les 5 fractions de broyats de racines de *Zea mays* (F1M à F5M) et de *Typha latifolia* (F1T à F5T ; tableau 9). Concernant les extraits de racines de maïs, la fraction la plus polaire F1 est la plus attractive pour les larves, suivie de la fraction F5, la plus lipophile et de F3, de lipophilie intermédiaire. La fraction F5T de broyat de racines de massette est la plus attractive, suivie de F1T et F3T.

Des composés chimiques responsables de l'attraction des larves semblent présents dans toutes les fractions de broyats de racines, mais plus particulièrement dans 3 fractions, F1,



F3 et F5. Il semble que des composés polaires et lipophiles présents dans les racines des

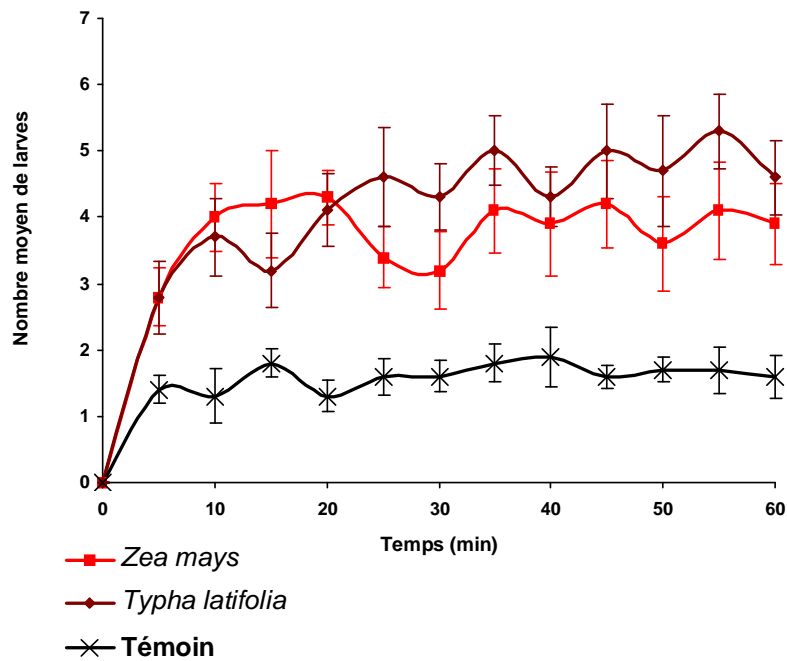
**Tableau 9** : Attractivité d'extraits de racines de maïs et de massette pour des larves de *Coquillettidia*.

Extraits de racines	Volume fraction / volume eau	Attraction	Analyse statistique (Anova)	
			Statistique F	Significativité p
F1M	0,1/1000	Oui	58,006	< 0,0001
F2M	0,1/1000	Oui	14,350	0,0002
	1/1000	Non	2,108	>0,05
F3M	1/1000	Oui	43,144	< 0,0001
F4M	0,1/1000	Oui	7,836	0,0055
F5M	0,1/1000	Oui	51,501	< 0,0001
	1/1000	Oui	5,957	0,0156
F1T	0,1/1000	Oui	8,867	0,0032
	0,5/1000	Oui	25,274	< 0,0001
	1/1000	Oui	36,674	< 0,0001
F2T	0,1/1000	Oui	6,622	0,0106
F3T	0,1/1000	Non	1,023	>0,05
	1/1000	Oui	28,130	< 0,0001
F4T	Non testée			
F5T	0,1/1000	Oui	24,567	< 0,0001
	1/1000	Oui	58,491	< 0,0001

#### **B.3.2.5. Hypothèse n°5 : les exsudats racinaires sont attractifs**

Les exsudats de maïs sont significativement plus attractifs que l'eau du robinet (ANOVA:  $F_{1,23} = 6,11$  ;  $p < 0,0001$  ; figure 41). Les larves sont également plus nombreuses à se diriger vers les exsudats de massette que vers l'eau du robinet (ANOVA:  $F_{1,23} = 12,81$  ;  $p < 0,0001$ ). Il n'y a pas de différence significative d'attractivité entre les exsudats des deux espèces végétales (ANOVA:  $F_{1,23} = 1,15$  ;  $p = 0,30$ ).

Le signal chimique responsable de l'attraction des larves est présent dans les exsudats des plantes de maïs et de massette.

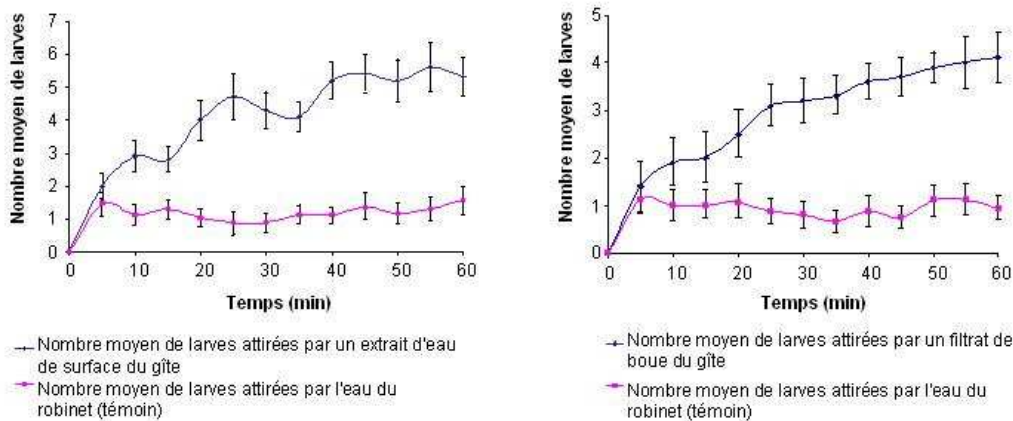


**Figure 41** : Attractivité d'exsudats de plantes pour les larves de *Coquillettidia*

### B.3.2.6. Hypothèse n°6 : les échantillons de terrain sont attractifs

Les larves de *Coquillettidia* sont sensibles à des extraits d'eau prélevés dans des gîtes larvaires. En effet, elles sont significativement plus nombreuses à se diriger vers un extrait d'eau prélevé en surface d'un gîte larvaire, que vers un échantillon d'eau du robinet (figure 42 ; ANOVA :  $F_{1,11} = 110,38$  ;  $p < 0,0001$ ). Elles sont également significativement attirées par un extrait de boue prélevée en profondeur dans un gîte larvaire, puis filtré (ANOVA :  $F_{1,11} = 61,08$  ;  $p < 0,0001$ ).

Un signal chimique reconnu par les larves semble donc présent dans l'eau des gîtes larvaires.



**Figure 42** : Attractivité d'extraits aqueux de gîte larvaire pour les larves de *Coquillettidia*

### B.3.2.7. Discussion

Les essais de comportement réalisés mettent en évidence l'existence d'un signal perçu par les larves de *Coquillettidia*, qui leur permet de reconnaître une plante. Ce signal n'est pas un stimulus visuel, puisque les larves font la distinction entre une plantule de maïs et un leurre inerte de forme semblable. Cette observation est concordante avec les suggestions émises précédemment sur le rôle faible de la vision chez ces organismes vivant dans un environnement obscur. Le stimulus auquel les larves répondent est plus probablement de nature chimique, mais il est absent dans l'eau du robinet, qui n'est pas attractive.

Les tests ont montré qu'une plantule de maïs vivante était attractive, mais que cette attractivité était perdue par la plantule, une fois morte. On peut donc émettre l'hypothèse qu'un signal chimique est émis par les plantules vivantes, qui est directement lié à leur métabolisme.

Les larves sont attirées par des plantes très différentes sur le plan de la position systématique et de l'écologie. En effet, la massette, plante naturellement choisie pour la fixation dans les gîtes larvaires, n'est pas plus attractive qu'une plantule de maïs, espèce cultivée en terre arable. Deux monocotylédones de zones humides, la glycérie flottante et le plantain d'eau lancéolé, sont autant attractifs qu'une dicotylédone de sol cultivé : le tournesol.

La conclusion importante de ces observations est que le signal chimique reconnu par les larves est très généraliste, puisqu'il est émis par une grande variété d'espèces végétales. Il

semble toutefois y avoir de faibles nuances dans la signature chimique d'attraction de ces différentes espèces, au vu de la réponse des larves aux 5 plantes testées. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les larves repèrent les racines des végétaux grâce à un ou des stimulus (i) chimique (s) composé (s) de molécule (s) très commune (s) issue (s) du métabolisme des plantes.

Le signal chimique reconnu par les larves est présent dans les racines des plantes attractives et dans leurs exsudats. Les racines sont donc responsables de son émission, en libérant dans le milieu extérieur des composés issus du métabolisme végétal. En effet, au cours de leur vie, les racines des plantes libèrent des composés organiques dans leur environnement proche. Ce processus appelé rhizodéposition est responsable d'une perte dans le sol de 1% à 40% de produits issus de la photosynthèse (Dilkes *et al.*, 2004).

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ces pertes de carbone : la production de cellules en bordure de la coiffe des racines en croissance, la sécrétion par les racines de certaines plantes d'un mucilage constitué de polysaccharides, et l'exsudation au sens strict, c'est à dire la diffusion passive de composés de faible poids moléculaire depuis les cellules vivantes de racines vers la solution du sol (Rovira *et al.*, 1979). L'exsudation représente une libération de carbone de 10 à 100 fois plus importante que le mucilage et les cellules de bordure (Nguyen, 2003). Les exsudats racinaires désignent au sens large les composés de faible poids moléculaire libérés par les racines (Nguyen, 2003 ; Walker *et al.*, 2003 ; Jones *et al.*, 2004), quelque soit le mécanisme mis en jeu, et c'est cette définition qui sera gardée pour l'ensemble du manuscrit. Les molécules communément retrouvées dans les exsudats de plantes sont les sucres, les acides organiques, les acides aminés, mais également des phénols, alcools et autres composés issus du métabolisme secondaire des végétaux (tableau 10 ; Kumar *et al.*, 2006).

Les larves de *Coquillettidia* sont attirées par des échantillons d'eau et de boue prélevés directement dans les gîtes larvaires. Un signal chimique est donc présent en concentration suffisante dans l'eau du gîte pour être attractif. Ces observations nous permettent de faire évoluer notre hypothèse : un message chimique est émis par des plantes vivantes dans le milieu et cette signature des plantes persiste un certain temps dans l'eau. Il possède donc une bonne solubilité dans l'eau et est probablement produit en quantité suffisante pour compenser sa dégradation et/ou sa consommation dans l'écosystème.

La prochaine étape de cette étude consiste à analyser la composition du message chimique libéré par les racines des plantes et reconnu par les larves.

**Tableau 10** : Composés carbonés libérés par les racines des végétaux dans la rhizosphère.

Adapté de Kumar *et al.* (2006).

Acides aminés	Acides organiques	Sucres	Vitamines	Purines / Nucléosides	Enzymes	Ions inorganiques et gaz
$\alpha$ -Alanine	Citrique	Glucose	Biotine	Adénine	Phosphatase	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Asparagine	Oxalique	Fructose	Thiamine	Guanine	Invertase	OH <sup>-</sup>
Aspartate	Malique	Galactose	Niacine	Cytidine	Amylase	H
Cystine	Fumarique	Maltose	Pantothénate	Uridine		CO <sub>2</sub>
Glutamate	Acétique	Xylose				
Glycine	Butyrique	Rhamnose				
Leucine	Valérique	Arabinose				
Lysine	Piscidique	Déoxyribose				
Méthionine	Formique	Oligosaccharides				
Sérine	Aconitique					
Thréonine	Lactique					
Proline	Pyruvique					
Valine	Glutarique					
Tryptophane	Malonique					
Ornithine	Aldonique					
Histidine	Erythronique					
Arginine	Tétronique					
Homosérine						
Phénylalanine						
Acide aminobutyrique						
Acide aminoadipique						

### B.3.3. Identification des médiateurs chimiques impliqués dans cette relation plantes-larves

La démarche que nous avons suivie comporte plusieurs étapes : 1. Nous avons procédé à des analyses chimiques d'extraits dont le potentiel attractif est connu, pour dégager les composés les plus probablement impliqués dans l'attraction des larves (1<sup>ère</sup> sélection). 2. Nous avons réalisé des tests de choix par olfactométrie pour vérifier l'attractivité des composés sélectionnés (2<sup>ème</sup> sélection).

#### B.3.3.1. Analyse de la composition chimique d'extraits naturels attractifs

Les extraits naturels analysés par CPG-MS sont les échantillons d'eau de surface (**Eg**) et de filtrat de boue (**Bg**) prélevés dans les gîtes larvaires, les exsudats de *Typha latifolia* (**ExT**) et de *Zea mays* (**ExM**), les 5 fractions de broyats de racines de *Typha latifolia* (**F1T** à **F5T**) et de *Zea mays* (**F1M** à **F5M**). Les composés majoritaires retrouvés dans ces 14 extraits sont listés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Composition chimique de 14 extraits naturels attractifs

X : Composé détecté grâce au dosage SIM.

Composés	Détection dans les extraits (après silylation)														
	Eg	Bg	ExT	ExM	F1T	F1M	F2T	F2M	F3T	F3M	F4T	F4M	F5T	F5M	
Acides aminés	L-alanine		X			X		X		X	X	X	X		X
	L-valine		X			X		X	X	X	X	X			X
	L-leucine					X		X		X	X		X		
	L-isoleucine							X	X	X	X	X			X
	L-proline			X				X		X	X		X		
	Glycine		X		X	X	X	X		X	X	X			
	L-serine		X		X	X	X	X	X	X	X	X			X
	L-threonine		X			X		X	X	X	X	X			
	β-alanine						X		X			X			
	L-aspartate					X		X							
	L-proline-5-oxo		X		X	X		X		X	X	X			
	Phenyl-alanine							X	X	X	X	X			
	L-asparagine										X		X		
	Acides gras	Lactique	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Heptenoïque								X		X	X	X			
Butanoïque								X		X				X	X
4-pentenoïque											X				
Butanedioïque						X	X	X	X		X	X	X	X	X
Laurique		X	X	X	X	X						X		X	X
Myristique		X	X	X	X	X	X					X		X	X
Palmitique		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Linoléique		X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Stéarique		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
1-myristine		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Arachidique												X		X	
2-monopalmitine		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
1-monopalmitine		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2-monostearine		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
2,3-Bis monostearine		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acides organiques	Cinnamique				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Férulique				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sucres	Lyxose		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Xylose		X		X			X	X	X	X	X	X	X	X
	Arabinose		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Ribose		X			X		X	X	X	X	X	X	X	X
	Fructose				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Galactose		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Glucose				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Saccharose					X	X	X	X	X	X	X	X		X
	Turanose					X	X	X	X	X	X	X	X		X
	Alcools	Glycérol	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X
Myo-inositol						X	X	X	X	X	X				X
Purines / nucléosides	Uracile	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	Thymine	X	X	X	X				X	X					
	Uridine	X	X	X	X		X	X	X	X	X				X
	Thymidine	X	X	X	X		X		X	X					

Dans les exsudats de massette et de maïs ainsi que dans les eaux collectées *in natura*, les composés retrouvés correspondent à des acides aminés (7), des acides gras (11), des acides organiques (2), des sucres (6), des alcools (1) et des purines/nucléosides (4) dont certains sont déjà décrits dans le tableau 10. Les vitamines, qui sont thermolabiles, ne sont pas détectées car notre méthode d'analyse n'est pas appropriée (températures : 70-240°C). Une analyse par HPLC-MS devra être envisagée pour la détection des composés thermolabiles.

Les exsudats de maïs et de massette montrent des profils chimiques similaires, seuls quelques produits diffèrent : la proline présente uniquement dans ExT ; les acides organiques (cinnamique et férulique) et les sucres (fructose/glucose) présents uniquement dans ExM. Cependant, ces différences sont certainement liées à une plus faible quantité de produits qui ne serait pas détectée en mode 'SCAN', d'autant plus que ces produits très communs sont détectés dans les fractions de racines des deux plantes.

Dans les fractions issues de l'extraction des racines de massette et de maïs, de nombreux autres produits ont été détectés, comme par exemple : des acides aminés (L-isoleucine,  $\beta$ -alanine, phényl-alanine, L-asparagine), des acides gras (hepténoïque, butanoïque, penténoïque, butanedoïque, arachidique), des sucres (saccharose, turanose), des alcools (myo-inositol).

Suite à cette analyse chimique des exsudats et des fractions, aucun composé particulier permettant d'expliquer l'attraction mesurée sur les larves n'émerge de l'étude. D'autre part, l'ensemble des produits détectés correspond à des molécules communes appartenant aux métabolites primaires.

### ***B.3.3.2. Réponses des larves à un screening de molécules de synthèse***

En nous basant sur notre analyse chimique et sur les données de la littérature (tableaux 10-11), nous avons choisi de tester l'attractivité de composés détectés dans les extraits attractifs, en sélectionnant un ou plusieurs représentants de chaque famille chimique. Nous avons également testé d'autres molécules, décrites dans les exsudats de plantes, comme les flavonoïdes, les acides organiques (Kumar *et al.*, 2006), et la DIMBOA (Raveton *et al.*, 1997). Le tableau 12 présente les résultats des tests de choix réalisés pour 25 composés avec des lots de 20 larves de *Coquillettida*, dans le dispositif décrit au B.2.9.1. (figure 32).

Les larves de *Coquillettidia* ne sont pas attirées par les acides organiques et aminés testés aux concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et 1000  $\mu\text{M}$ , la sérine est même significativement répulsive à 1000  $\mu\text{M}$ . La monopalmitine, la DIMBOA, la quercétine et la rutine ne sont pas attractives à une concentration de 10  $\mu\text{M}$ . Les acides gras et métabolites secondaires testés (flavonoïdes, DIMBOA) ne semblent pas impliqués dans l'attraction des larves.

**Tableau 12** : Réponse des larves à des composés présents dans des extraits naturels attractifs.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$

<sup>a</sup> : Limite de solubilité dans l'eau dépassée (10  $\mu\text{M}$ )

<sup>b</sup> : 2,4-dihydroxy-7-méthoxy-1,4-benzoxazin-3-one

Composés	Attraction		
	10 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
Acides aminés	Thréonine	Non	Non
	Proline	Non	Non
	Sérine	Non	Non **
	Glycine	Non	
Acides gras	1-Monopalmitine	Non	Non <sup>a</sup>
Acides organiques	Acide férulique	Non	Non
	Acide coumarique	Non	Non
	Acide cinnamique [1]	Non	
	Acide citrique [2,3]	Non	Non
	Acide malique [2,3]	Non	Non
Flavonoïdes	Quercétine [4]	Non	
	Rutine [5]	Non	Non
Acide hydroxamique	DIMBOA [6] <sup>b</sup>	Non	
Sucres	Ribose [3,7]	Non	Non
	Déoxyribose	Non	Non
	Glucose [3,7]	Non	Non
Alcools	Glycérol	Oui	Oui ***
Purines	Uracile	Oui ***	Oui ***
	Thymine	Oui ***	Oui ***
	Cytosine	Non	Non
Nucléosides	Uridine	Oui ***	Oui **
	Thymidine	Non	Oui **

Références : [1] : Walker *et al.*, 2003 ; [2] : Chen *et al.*, 2007 ; [3] : Kamilova *et al.*, 2006 ; [4] : Kidd *et al.*, 2001 ; [5] : Kalinova *et al.*, 2007 ; [6] : Wenger *et al.*, 2005 ; [7] : Fischer *et al.*, 2003.



Cinq composés détectés dans les exsudats de plantes et dans les échantillons d'eau du gîte sont attractifs pour les larves. Il s'agit du **glycérol**, de l'**uracile**, de la **thymine**, de l'**uridine** et de la **thymidine**.

Le glycérol est attractif aux concentrations de 100  $\mu\text{M}$  et 1000  $\mu\text{M}$ . L'uracile et la thymine sont aussi significativement attractifs à 100 et 1000  $\mu\text{M}$ . Par contre, les larves ne sont pas attirées par la cytosine, une autre purine dont la structure chimique est très proche. L'uridine et la thymidine, les nucléosides correspondant à l'attachement d'un pentose à l'uracile et la thymine, sont attractifs à l'une des concentrations au moins. L'attractivité d'une purine n'est donc pas altérée par l'ajout d'un pentose (ribose pour l'uridine et déoxyribose pour la thymidine). Le ribose et le déoxyribose ne sont pas attractifs aux concentrations testées, tout comme le glucose.

#### ***B.3.3.3. Discussion***

Les racines de massette et de maïs ont une composition qualitative très similaire en acides aminés, acides gras, acides organiques, sucres, alcools et bases azotées / nucléosides. Des différences de composition apparaissent entre les exsudats de maïs et de typha puisque des sucres et acides aminés sont détectés uniquement dans les solutions extraites du maïs. Il est probable que les quantités de ces composés libérées par les racines de massettes soient trop faibles pour être détectées lors de l'analyse chromatographique. En effet, les plantules de maïs utilisées pour la récolte d'exsudats étaient en pleine phase de croissance racinaire et en plus grand nombre que les plantules de massette, dont les racines étaient déjà développées à la récolte des exsudats.

Parmi les composés végétaux utilisés pour les tests de choix, les larves de *Coquillettidia* sont attirées par un alcool de petite taille (chaîne à 3 carbones) : le glycérol, par 2 bases azotées puriques et 2 nucléosides. Ces molécules ont un faible poids moléculaire (maximum pour l'uridine :  $244 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et sont solubles dans l'eau, deux propriétés facilitant leur exsudation par diffusion ou par lyses cellulaires dans le milieu aquatique. Ce sont des molécules très courantes, puisque le glycérol rentre dans la constitution des triglycérides, éléments essentiels des membranes biologiques (Gerber *et al.*, 1988); les purines et nucléosides sont des constituants des acides nucléiques, également présents dans tout élément

vivant. Cette observation confirme l'hypothèse émise précédemment de composés très généralistes impliqués dans la relation entre les plantes et les larves de *Coquillettidia*.

Dans les relations plantes-insectes en milieu aérien, les médiateurs chimiques sont en général des molécules volatiles, émises par les parties aériennes des plantes (feuilles, fleurs). Ils peuvent être ubiquistes (les alcools à faible nombre de carbones par exemple) ou spécifiques (des polyphénols par exemple) (Metcalf & Metcalf, 1992 ; Bruce *et al.*, 2005). En milieu aquatique, les composés sémiochimiques sont véhiculés par l'eau, et sont par conséquent hydrosolubles et non volatiles. Des molécules communes, de faible poids moléculaire comme des sucres ou des acides aminés par exemple, sont attractifs pour certaines espèces de poissons et de crustacés (Saglio *et al.*, 1990 ; Decho *et al.*, 1998). Marko *et al.* (2005) ont montré que le glycérol et l'uracile étaient deux médiateurs chimiques de l'interaction entre le coléoptère aquatique *Euhrychiopsis lecontei* (Dietz, 1896 ; Coleoptera : Curculionidae) et une plante immergée du groupe des dicotylédones : *Myriophyllum spicatum* (Linnaeus, 1753 ; Haloragaceae).

Nous montrons pour la première fois l'attraction de larves de moustiques pour le glycérol, l'uracile, la thymine, la thymidine et l'uridine. La thymine a une structure très proche de l'uracile, puisqu'un seul groupement méthyle les différencie (figure 27). Cette différence structurale ne semble pas avoir de rôle fonctionnel perturbant l'attraction des larves. Par contre, la cytosine, qui est également une purine, n'est pas attractive. La différence structurale entre la cytosine et l'uracile, qui consiste en la substitution d'une fonction cétone par un groupement amine, pourrait être responsable de la perte d'attraction (figure 27). L'ajout d'un pentose à une purine attractive pour les larves de *Coquillettidia* ne semble pas perturber cette attractivité. En effet, l'uridine et la thymidine, qui sont respectivement formés par l'attachement d'un ribose à l'uracile et d'un déoxyribose à la thymine (figure 28), sont significativement attractives. Cette attraction des deux nucléosides semble liée à la structure purique et non au pentose, puisque le ribose et le déoxyribose ne se sont pas révélés attractifs.

Cinq composés attractifs pour les larves ont été détectés dans des extraits de plantes et dans des échantillons d'eau provenant de gîtes larvaires. La prochaine étape de notre démarche consiste à préciser les concentrations de ces composés dans les exsudats de plantes, et à connaître les doses auxquelles les larves sont sensibles, afin de recréer le signal chimique responsable de l'attraction *in natura*.

### B.3.4. Complexité du signal chimique attractif pour les larves de *Coquillettidia*

La démarche que nous avons suivie pour recréer un signal chimique attractif comporte 3 étapes : 1. Nous avons évalué la réponse des larves à une gamme de concentrations pour chacun des 5 composés attractifs, afin de déterminer les relations doses-effet ;

2. Nous avons mesuré les concentrations des molécules attractives dans les exsudats de plantes, et les rapports de concentrations entre ces molécules ;

3. Enfin nous avons testé la réponse des larves à un cocktail composé de ces molécules, à des concentrations proportionnelles à celles retrouvées dans les exsudats.

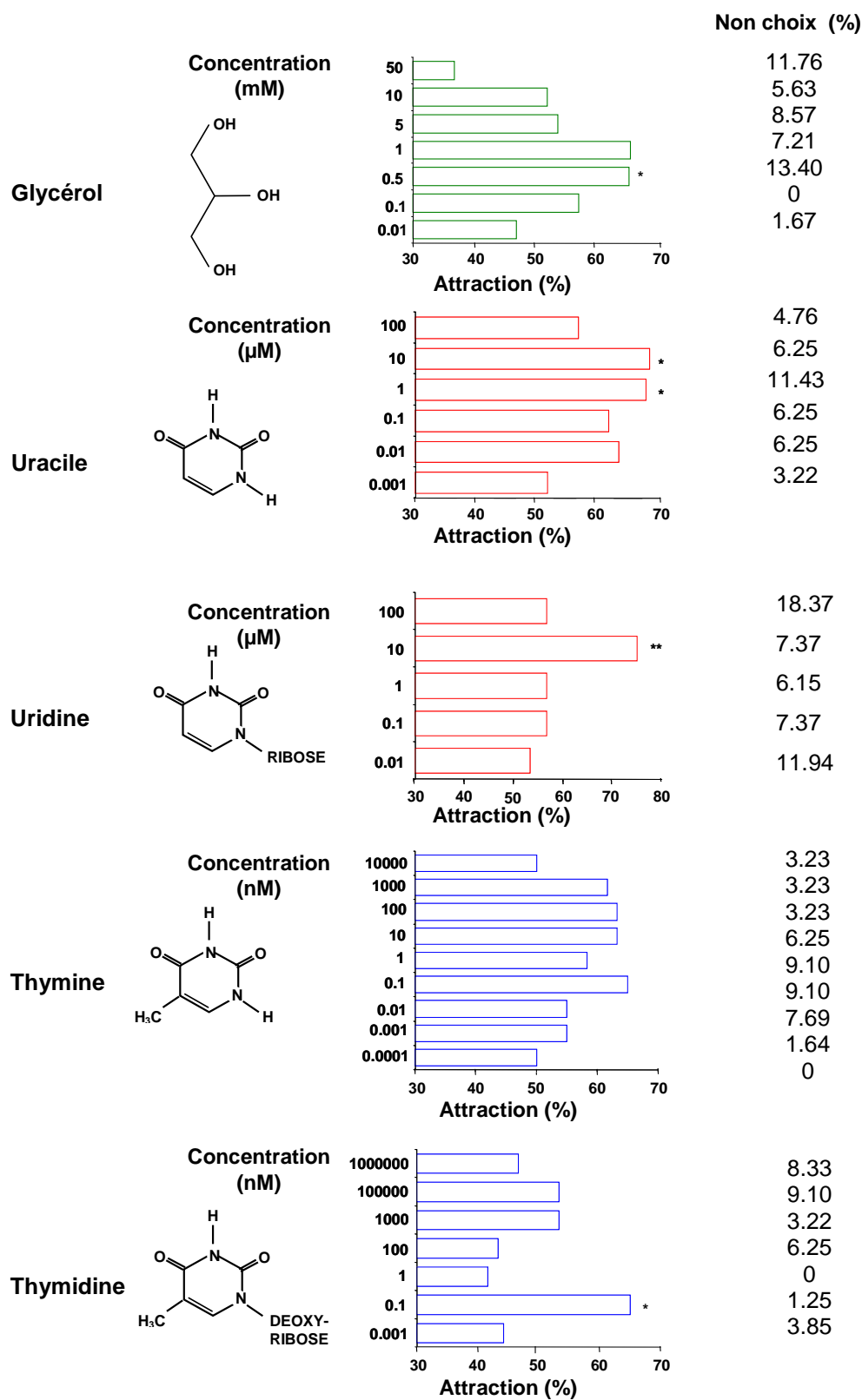
#### ***B.3.4.1. Evaluation de la relation dose/effet pour les composés attractifs.***

Les tests de premier choix ont été réalisés en olfactomètre (figure 43), sur des larves testées individuellement selon le protocole décrit au B.2.9.2.

Les larves de *Coquillettidia* ne sont pas attirées par le glycérol à des concentrations inférieures à 0,5 mM, ou supérieures à 1 mM (figure 43). Par contre, le glycérol est significativement attractif à 0,5 mM (test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 3,93$  ; 1 ddl ;  $p < 0,049$ ) qui est la concentration la plus attractive. Les larves sont attirées à 65% par le glycérol à la concentration de 1mM, ce qui n'est pas significativement différent du témoin (test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 2,76$  ; 1 ddl ;  $p = 0,096$ ). 37% des larves seulement sont attirées par le glycérol à 50 mM (pas significativement répulsif,  $p = 0,3$ ) et un nombre élevé de « non-choix » est observé (près de 12%). De plus, à cette dose, elles expriment un comportement jusque là rarement observé de tentative de fixation aux parois de l'olfactomètre.

Le nombre de larves attirées par l'uracile augmente avec la concentration, entre 1 nM et 10  $\mu$ M, puis diminue pour une concentration de 100  $\mu$ M (figure 43). 67,7% des larves sont attirées par une solution d'uracile à 1  $\mu$ M (test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 4,03$  ; 1 ddl ;  $p = 0,045$ ) ; 68,3% sont attirées par l'uracile à 10  $\mu$ M (test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 4,17$  ; 1 ddl ;  $p = 0,041$ ), qui est la dose la plus attractive.

L'uridine est significativement attractive à la concentration de 10  $\mu$ M (75% d'attraction ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 8,00$  ; 1 ddl ;  $p = 0,005$ ). Les autres concentrations testées ne sont pas plus attractives que l'eau du robinet (figure 43). Le nombre de « non-choix » est plus important pour la plus faible et la plus forte concentration (10 nM et 100  $\mu$ M), qui sont aussi les moins attractives.



**Figure 43** : Réponse olfactométrique des larves à des concentrations croissantes en glycérol, uracile, uridine, thymine et thymidine. \*:  $p < 0,05$  ; \*\*:  $p < 0,01$

La courbe dose/attraction de la thymine est bimodale (figure 43), suggérant deux niveaux de sensibilité des larves à la molécule. En effet 65% des larves préfèrent la thymine à 0,1 nM au témoin (test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 2,76$  ; 1 ddl ;  $p = 0,096$ ). Cette préférence tombe à 58% pour une concentration de 1 nM, puis remonte à plus de 63% pour les concentrations 10 nM et 100 nM ( $p > 0,05$ ). Aucune de ces concentrations n'est significativement attractive pour les effectifs testés.

La courbe dose/attraction de la thymidine présente le même profil bimodal que celle de la thymine (figure 43). Les larves sont significativement attirées par la thymidine à 0,1 nM (65,4% ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 3,93$  ; 1 ddl ;  $p = 0,048$ ). Une concentration 10 fois plus faible ou jusqu'à 100 fois plus forte n'est pas attractive. A 1  $\mu$ M et 100  $\mu$ M, les larves sont attirées à 53,3% ( $p > 0,05$ ) et une concentration de 1 mM n'est plus attractive.

#### ***B.3.4.2. Concentrations des composés attractifs dans les extraits de plantes***

Les concentrations en uracile, thymine, uridine, thymidine et glycérol dans les exsudats de maïs et de massette sont présentés dans le tableau 13.

Les 5 composés sont présents dans les racines de maïs et de massette, et sont notamment tous retrouvés en plus grandes quantités dans les fractions à lipophilie intermédiaire des broyats de racines (F3M et F3T) qui sont parmi les plus attractives (B.3.2.5). La composition des fractions F3M et F3T est similaire. Lors des tests comportementaux, les fractions F3M et F3T ont été testées avec facteurs de dilution au 1/1000<sup>ème</sup> avec une attraction significative et au 0,1/1000<sup>ème</sup> avec une perte d'attractivité (tableau 9).

Les composés attractifs sont retrouvés dans les exsudats de maïs (ExM) et de massette (ExT) à des concentrations similaires, excepté le glycérol qui est 10 fois moins concentré dans les exsudats de massette. La thymidine est celui des 5 composés qui est le plus concentré dans les exsudats de plantes. L'uridine et le glycérol sont présents à des concentrations similaires, entre 1 et 12 nM. L'uracile et la thymine sont présents à des concentrations très faibles, inférieures à 1 nM.

L'échantillon de boue du gîte a une concentration en bases azotées et nucléosides deux fois plus faible que l'échantillon d'eau de surface, et une concentration en glycérol 300 fois plus faible. Les concentrations de ces composés sont du même ordre de grandeur dans les exsudats de massette et dans les filtrats de boue (où sont libérés les exsudats de plante

aquatique), à l'exception de la thymine qui est 166 fois moins concentrée dans les exsudats. Ces échantillons sont attractifs sur les larves de *Coquillettidia* (figure 42).

**Tableau 13** : Concentrations en composés attractifs calculées dans les exsudats de maïs et massette.

<sup>a</sup> : concentration inférieure au seuil de détection en CPG-MS.

Composés	Concentration dans les racines					Concentration dans les extraits			
	(μM)					naturels (nM)			
	F3M	F3M 1/1000	F3T	F3T 1/1000	F3T 0.1/1000	ExM	ExT	Eg	Bg
Glycérol	597	0,6	395	0,4	0,04	12	1,35	212	0,73
Uracile	2,17	0,002	5,29	0,005	0,0005	< 0,5 <sup>a</sup>	< 0,5 <sup>a</sup>	< 0,5 <sup>a</sup>	< 0,5 <sup>a</sup>
Thymine	2,21	0,002	2,55	0,002	0,0002	0,08	0,04	13,77	6,63
Uridine	19,82	0,02	17,72	0,02	0,002	10	7,5	7,32	2,85
Thymidine	38,54	0,04	110	0,11	0,011	122	113	175	86,23

D'après ces résultats, la présence de glycérol, uracile, thymine, uridine et thymidine dans une solution lui confère un pouvoir attractif, mais la présence des 5 composés n'est pas obligatoire pour observer cet effet.

Les racines de maïs et de massette contiennent les 5 composés attractifs, ce qui explique l'attraction des larves de *Coquillettidia* par des broyats de racines. Elles libèrent ces 5 composés dans leurs exsudats qui sont également attractifs, et ces composés rentrent dans la composition des eaux de terrain, où ces exsudats sont libérés. Un assemblage de ces 5 substances attractives apparaît comme la signature chimique d'origine végétale attractive pour les larves. La prochaine étape consiste à recréer cette signature olfactive à partir des 5 molécules de synthèse, et à valider son pouvoir attractif sur les larves de *Coquillettidia*.

#### **B.3.4.3. Réponse des larves à un assemblage de molécules attractives**

Des solutions attractives mimant les exsudats de plante ont donc été recréées à partir de molécules pures et en respectant les rapports de concentrations entre les 5 composés (d'après le tableau 13) :

- Solution mimant F3M :

$$[\text{thymidine}] = 0,06 \times [\text{glycérol}] = 2 \times [\text{uridine}] = 20 \times [\text{thymine}] = 20 \times [\text{uracile}]$$

- Solution mimant F3T :

[thymidine] = 0,3 x [glycérol] = 6 x [uridine] = 40 x [thymine] = 22 x [uracile]

- Solution mimant les exsudats de maïs :

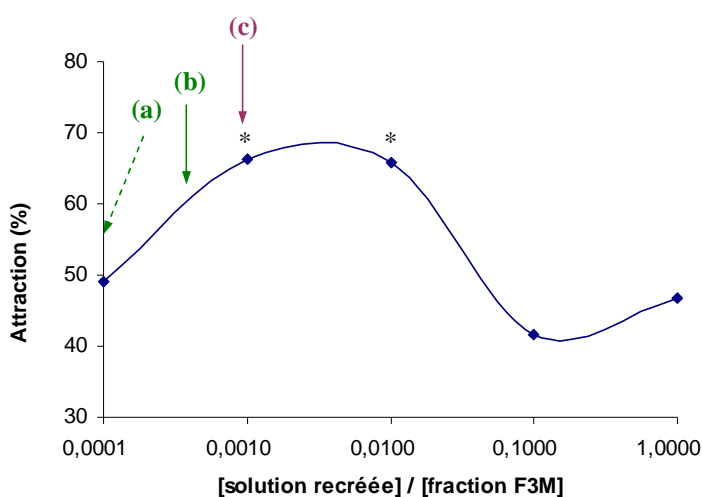
[thymidine] = 10 x [glycérol] = 10 x [uridine] = 1000 x [thymine] = 1000 x [uracile]

- Solution mimant les exsudats de massette :

[thymidine] = 100 x [glycérol] = 10 x [uridine] = 1000 x [thymine] = 1000 x [uracile]

Les larves sont sensibles à une solution mimant une fraction F3 de broyat de racines de maïs, diluée 100 fois (65,85% d'attraction; figure 44, c ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 4,23$  ; 1 ddl ;  $p = 0,039$ ) et 1000 fois (66,25% d'attraction; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 4,34$  ; 1 ddl ;  $p = 0,037$ ). L'attraction observée des larves par la fraction F3M diluée au 1/1000 (tableau 9) est donc retrouvée avec la solution mime.

Les larves sont attirées par une solution mimant une fraction F3 de racines de massette, diluée 1000 fois (figure 44, b ; plus de 60% d'attraction), ce qui confirme l'attraction observée de F3T à 1/1000 (tableau 9). Il semble que cette attraction soit perdue pour une solution mime plus diluée (figure 44, a ; moins de 50%), ce qui va dans le sens des résultats obtenus avec F3T à 0,1/1000 (tableau 9).



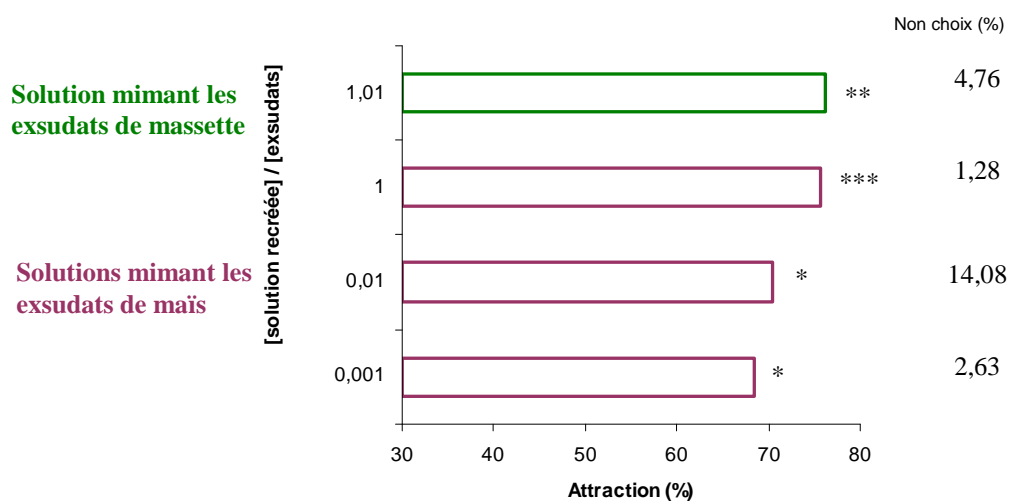
**Figure 44** : Réponse des larves à des solutions mimant les extraits de racines de massette et de maïs, à différentes concentrations.

(a) : zone d'attraction de la fraction F3T diluée à 0,1/1000 ; (b) : zone d'attraction de F3T diluée à 1/1000 ; (c) : zone d'attraction de la fraction F3M diluée à 1/1000.

[solution recréée] / [fraction F3M] : rapport de concentrations entre la solution créée et la solution F3M.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Les larves sont très significativement attirées par une solution composée des 5 composés attractifs aux concentrations présentes dans les exsudats de massette (76,19% d'attraction; figure 45 ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 9,34$  ; 1 ddl ;  $p = 0,002$ ). L'attraction d'une solution mimant les exsudats de maïs est similaire (75,64% ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 10,98$  ; 1 ddl ;  $p = 0,0009$ ). Dans les deux cas, les individus ayant nagé dans la direction des solutions tests ont ensuite exprimé un comportement particulier, marqué par des tentatives répétées de fixation aux parois du dispositif. Les larves restent très sensibles à la solution mime après dilution par 100 (70,42% ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 6,22$  ; 1 ddl ;  $p = 0,012$ ) et par 1000 (68,42% ; test du  $\chi^2$  ;  $\chi^2 = 5,34$  ; 1 ddl ;  $p = 0,021$ ).



**Figure 45** : Réponse des larves à des solutions mimant les exsudats de massette et de maïs, à différentes concentrations.

[solution recréée] / [exsudats] : rapport de concentrations entre la solution créée et la solution d'exsudats

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

En assemblant le glycérol, l'uracile, la thymine, l'uridine et la thymidine, à des concentrations proportionnelles à celles retrouvées dans les exsudats, nous avons recréé un signal très attractif pour les larves de *Coquillettidia*.



#### **B.3.4.4. Discussion**

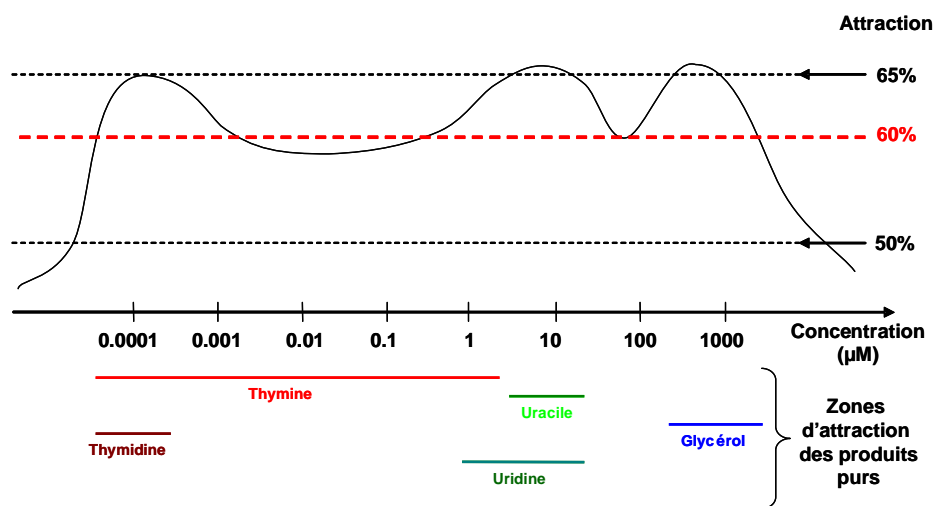
L'attraction des larves de *Coquillettidia* a été mise en évidence pour 5 produits que nous avons détectés et dosés dans les racines *in situ*, dans les exsudats de maïs et de massette et dans les échantillons de terrain. Ces composés sont des métabolites primaires : le glycérol a un rôle de protection contre les stress abiotiques, c'est un osmolyte des cellules végétales, et il rentre dans la constitution des membranes biologiques (Weig & Jakob, 2000 ; Eastmond, 2004) ; l'uracile et l'uridine sont respectivement une base pyrimidique et un nucléoside constitutifs de l'acide ribonucléique (ARN) ; la thymine et la thymidine sont une base pyrimidique et un nucléoside rentrant dans la constitution de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ainsi, les larves de *Coquillettidia* sont attirées par des solutions de glycérol de 500  $\mu\text{M}$  et 1 mM, ce qui correspond au même ordre de grandeur que les concentrations attirant le coléoptère *E. lecontei* (de 18  $\mu\text{M}$  à 1,8 mM, maximum d'attraction à 180  $\mu\text{M}$ ) dans l'étude de Marko *et al.* (2005). Elles paraissent toutefois sensibles à une gamme de concentration en glycérol moins large que *E. lecontei*. Les concentrations en glycérol dans des feuilles de maïs sont comprises entre 0,1 mM et 6 mM, concentrations attractives pour certains insectes herbivores en milieu terrestre (Gerber *et al.*, 1988). Les carbohydrates d'origine végétale, à des concentrations de cet ordre de grandeur, agissent généralement comme stimulants du comportement alimentaire des insectes (Bernays & Chapman, 1994).

Les larves de *Coquillettidia* et les adultes de *E. lecontei* ont des sensibilités à l'uracile similaires ; ils sont attirés par la purine à des concentrations comprises entre 10 nM et 15  $\mu\text{M}$ , l'attraction étant maximale pour des doses comprises entre 1 et 15  $\mu\text{M}$ . Une concentration supérieure est moins attractive pour les larves de moustique, mais n'a pas été testée avec les coléoptères aquatiques. L'uracile est attractif à des doses 100 à 1000 fois inférieures au glycérol sur ces deux insectes aquatiques. Cet ordre de grandeur est trop bas pour être celui d'un stimulant du comportement alimentaire ; il correspond plutôt aux doses de composés chimiques attractifs de type spécifiques dans l'environnement (Marko *et al.*, 2005). L'uracile n'est pas un composé spécifique, mais sa présence dans les exsudats est probablement liée à la croissance racinaire, les bases azotées étant mobilisées en quantités importantes au niveau des zones méristématiques pour la synthèse d'acides nucléiques. Ainsi, la détection d'uracile, mais aussi de thymine, uridine et thymidine par les larves dans la rhizosphère peut leur indiquer les racines les plus jeunes, les plus propices à la perforation, ce qui est démontré par nos expériences de fixation sur les jeunes racines (figure 37).

L'analyse et surtout le dosage de ces composés dans nos échantillons montrent leur présence à des concentrations plus faibles que celles déterminées par nos expériences d'attraction en produit pur. En effet, la dose attractive de glycérol (0,5 mM) est 50 000 à 500 000 fois plus importante que la dose mesurée dans les exsudats de plantes. L'uracile est attractif à des concentrations (1  $\mu$ M et 10  $\mu$ M) au moins 5000 fois plus élevées que celles mesurables dans des exsudats. Pour l'uridine, les solutions attractives sont 1000 fois plus concentrées que celles des exsudats. Par contre, les larves sont attirées par la thymine à des concentrations (0,1 nM) proches (facteurs 1,25-2,5) de celles retrouvées dans les exsudats de maïs (0,077 nM) et de massette (0,04 nM). Les mêmes concentrations de thymidine attirent les larves, mais ce nucléoside est 1000 fois plus concentré dans les exsudats de maïs et de massette (122 et 113 nM respectivement).

Nos résultats démontrent que le mélange des 5 composés (mimant les exsudats) entraîne une réponse très franche (figure 44, 76% d'attraction ;  $p < 0.001$ ) des larves témoignant d'un effet synergique. L'association des 5 produits à des concentrations faibles (de l'ordre du nM) permettrait d'augmenter leur pouvoir d'attraction sur les larves. L'attraction des larves par les solutions mimant les exsudats de maïs et de massette est équivalente, alors que la teneur en glycérol est 10 fois moins importante pour la solution de massette. Il se pourrait donc que le pouvoir attractif des exsudats soit lié au mélange uracile-thymine-uridine-thymidine. Par ailleurs, le mélange mimant les extraits de racines de maïs montre une attraction significative (66% d'attraction,  $p = 0,037$ ) à des concentrations plus fortes des 5 composés, notamment en glycérol (facteur 60). Dans ce cas, il semblerait que le glycérol soit lui aussi impliqué dans l'attraction des molécules en synergie. Ces résultats indiqueraient que l'attraction du mélange glycérol-uracile-thymine-uridine-thymidine est liée au rapport des concentrations des produits entre eux.

Nous constatons qu'un même mélange glycérol-uracile-thymine-uridine-thymidine présente une attraction variable à des concentrations croissantes ou décroissantes. Nous notons une attraction forte du mélange où la concentration en thymidine est la plus efficace sur les larves (0,1 nM). Ainsi, on peut avancer l'hypothèse d'une attraction variant en fonction des concentrations optimales de chacun des produits dans le mélange, comme l'illustre la figure 46. Des tests de choix avec des solutions mimes à des concentrations supérieures aux exsudats de maïs pourraient être envisagés. Ils indiqueraient si le potentiel attractif est conservé en augmentant les doses de chaque composé, notamment en s'approchant des concentrations en uridine (10  $\mu$ M), en uracile (1  $\mu$ M) et en glycérol (0,5 mM) auxquelles les larves sont les plus sensibles.



**Figure 46** : Courbe hypothétique d'attraction des larves de *Coquillettidia* suivant un gradient de concentration en glycérol-uracile-thymine-uridine-thymidine.

Le signal chimique attractif que nous avons recréé est probablement moins complexe que celui effectivement attractif en conditions naturelles, où les composés attractifs sont consommés par les micro-organismes de la rhizosphère ou rapidement dégradés, et où une quantité d'autres molécules occasionnent un bruit de fond susceptible de perturber l'attraction. Nous n'avons pas évalué l'effet de la concentration en gaz (dioxyde de carbone, oxygène) de la solution attractive recréée sur la réponse des larves. En effet, le dioxyde de carbone dissout est apparu attractif pour les larves de *Coquillettidia* dans nos essais préliminaires (figure 39). Il pourrait signaler aux larves la présence des plantes et des micro-organismes gravitant dans la rhizosphère, dont elles se nourrissent. L'oxygène, rare dans cet habitat, pourrait également être impliqué dans l'attraction, car la fixation des larves aux racines des plantes est en particulier déterminée par la nécessité de respirer.

Quelque soit sa complexité, le signal chimique émis par les racines des plantes aquatiques a une valeur de survie pour les larves. La capacité à reconnaître ce signal suggère la présence de récepteurs chimiosensoriels adaptés. Les chimiorécepteurs des insectes peuvent être spécifiques, c'est à dire impliqués dans la reconnaissance d'une substance

sémiochimique, par exemple une phéromone, à des concentrations très faibles (Schoonhoven *et al.*, 1998). Ils sont le plus souvent généralistes, et interviennent par exemple au niveau de l'attraction de l'insecte par un substrat alimentaire, répondant à plusieurs substances émises par ce substrat (Visser, 1988 ; Chapman, 2003). L'attraction des larves de *Coquillettidia* par les racines de plantes met en jeu au moins 5 substances allélochimiques différentes, pouvant agir à différentes concentrations, ce qui suggère l'implication de récepteurs généralistes.

Les chimiorécepteurs des larves de moustiques sont encore mal identifiés, mais ils sont probablement présents en grand nombre sous forme de soies (appelées sensilles olfactives) au niveau des antennes et des palpes maxillaires portés par la capsule céphalique (Clements, 1999). Des sensilles présentant pour la plupart des pores cuticulaires, situées à l'apex des antennes des larves d'*Ae. aegypti*, ont été décrites comme des sensilles gustatives par Jez et McIver (1980). Les mêmes auteurs ont également décrit des sensilles antennaires de forme basiconique, innervées par une dizaine de neurones, qu'ils considèrent comme perméables aux substances chimiques. Une étude récente a confirmé leur hypothèse en démontrant l'expression du gène codant pour un chimiorécepteur spécifique des diptères, au niveau des antennes de larves d'*Ae. aegypti* (Melo *et al.*, 2004). Les palpes maxillaires des larves de moustiques sont également pourvus d'un grand nombre de sensilles, dont certaines sont probablement des chimiorécepteurs (McIver & Siemicki, 1982).

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la fixation des larves de *Coquillettidia* aux racines des plantes était l'aboutissement d'une séquence comportementale complexe. Les larves évoluent dans un environnement obscur et riche en sédiments et matière organique, qui complique la détection des plantes hôtes. Elles sont néanmoins capables de reconnaître à distance un signal composé de gaz (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) et de substances allélochimiques exsudées par les racines des végétaux, grâce à des chimiorécepteurs. Elles semblent orienter ainsi leur nage en direction de la source du signal chimique (réponse par chimiotaxie), en remontant le gradient de concentration. Une fois les racines atteintes, des mécanorécepteurs (soies en crochet) situés au niveau du siphon respiratoire peuvent prendre le relais, percevant des informations nécessaires à la sélection d'une zone propice à la fixation dans la racine. Enfin la larve perce les tissus végétaux à l'aide de son siphon effilé et denté, qui atteint les aérénchymes où l'oxygène est disponible.

Dans une optique de contrôle des populations de *Coquillettidia*, la découverte de médiateurs chimiques conditionnant la fixation et donc la survie des larves offre des perspectives intéressantes. On peut imaginer par exemple une stratégie de contrôle basée sur le traitement des gîtes larvaires avec une solution mimant le signal chimique attractif, à laquelle est ajoutée une molécule insecticide. En effet, on peut émettre l'hypothèse que la présence de cette solution attractive dans l'eau compenserait l'attraction des larves vers les profondeurs après éclosion, les exposant ainsi à l'insecticide. L'utilisation de cette stratégie pendant la saison de ponte des femelles *Coquillettidia* pourrait ainsi se solder par une génération très diminuée l'année suivante, et une baisse des nuisances générées.

## **C. Mise au point d'une stratégie larvicide contre *Coquillettidia***

### **C.1. Synthèse bibliographique**

#### **C.1.1. Moyens de lutte contre les populations larvaires de *Coquillettidia***

Le contrôle des populations larvaires de *Mansonia* et *Coquillettidia* est rendu très difficile par la biologie particulière de ces stades immatures, continuellement fixés aux racines de la végétation aquatique (Sjogren *et al.*, 1986 ; Lord & Fukuda, 1990). Pour être efficaces, les traitements insecticides anti-larvaires, qu'ils soient chimiques ou biologiques, doivent traverser un couvert végétal dense pour atteindre la pièce d'eau, puis se répandre dans l'ensemble de la colonne d'eau au niveau des racines colonisées. Atteindre des larves de *Coquillettidia* fixées en profondeur aux racines de végétaux ancrés dans le substrat est quasiment impossible car le tapis de débris végétaux, de racines et de sédiment constituant l'habitat des larves fait obstacle à la progression de la plupart des formulations insecticides. De ce fait, la majorité des formulations insecticides commerciales agissant par contact ou par ingestion sont inactifs ou très peu efficaces contre les stades juvéniles de *Coquillettidia* et *Mansonia*. De nombreuses études de laboratoire et de terrain ont été réalisées, surtout sur des espèces de *Mansonia*, afin d'évaluer l'efficacité de différents moyens de contrôle de ces moustiques.

##### **C.1.1.1. Les moyens de lutte chimiques**

L'efficacité du téméphos (formulation liquide Abate 500E), insecticide organophosphoré largement utilisé en démoustication en France métropolitaine jusqu'en 2006, a été testée sur *Cq. richiardii* en laboratoire et dans des gîtes larvaires du littoral méditerranéen (Sinègre *et al.*, 1971). Le téméphos s'est révélé plus toxique pour les larves de *Cq. richiardii* que les 7 autres insecticides étudiés : les organophosphorés chlorpyrifos (Dursban), phenthoate (Cidial), fenthion, fenitrothion, iodfenphos et bromophos et l'organochloré DDT. En tests toxicologiques de laboratoire et sur le terrain, les larves de *Cq. richiardii* montrent une sensibilité au parathion proche de celle observée avec le téméphos (CL<sub>50</sub> = 0,005 ppm), et une moindre sensibilité au malathion et à la dieldrine (Chapman,

1955). Les larves de *Coquillettidia* montrent une grande tolérance à l'égard de ces insecticides chimiques, la CL<sub>50</sub> du fenitrothion pour *Cq. richiardii* (0,09 ppm) étant 45 fois plus élevée que pour *Aedes (Ochlerotatus) caspius* (Pallas). Sur le terrain, l'étude de Sinègre *et al.* (1971) révèle qu'il faut appliquer l'Abate 500E à des doses 20 fois plus importantes que pour le contrôle des *Aedes* et *Culex* (100 g/ha de matière active) pour obtenir 100% de mortalité sur les larves de *Coquillettidia*, dose importante provoquant des effets toxiques sur la faune. Une formulation granulaire sur Celatom ou à base de sable permettent d'obtenir une libération plus lente du téméphos, mais l'effet sur la densité des populations larvaires de *Cq. perturbans* est faible aux doses maximales autorisées (Sjogren *et al.*, 1986b).

Des expériences de contrôle utilisant l'organophosphoré fenthion (Baytex) ont été réalisées dans des mares d'une région de l'Inde, polluées et densément colonisées par des populations larvaires de *Mansonia* spp. L'application de formulations granulaires à base de sable et de calcaire, visant à limiter les pertes dans le couvert végétal et à assurer une libération lente et progressive de la matière active dans l'eau, s'est révélée très efficace aux doses de 2,5 g/m<sup>2</sup>, stoppant les émergences pendant près d'un mois (Krishnamoorthy *et al.*, 1992). Ces auteurs ont également obtenu une forte réduction des populations larvaires et du taux d'émergence de *Mansonia* spp. dans la même région avec l'application de méthoprène (Altosid), un mimétique d'hormone juvénile régulateur de croissance, aux doses de 0.5, 1 et 2 ppm (Krishnamoorthy *et al.*, 1993).

Dans le Minnesota aux Etats-Unis, les émergences d'adultes de *Cq. perturbans* ont été réduites de plus de 90% par l'application de méthoprène formulé en briquettes (Altosid) et en boulettes (Altosid XR) à libération progressive d'une durée de 150 et 30 jours respectivement (Ranta *et al.*, 1994). L'utilisation de formulations de méthoprène et de fenthion adaptées à l'écologie des genres *Mansonia* et *Coquillettidia* s'est révélée efficace, et sans conséquence pour d'autres espèces du gîte, d'après Batzer et Sjogren (1986b) et Krishnamoorthy *et al.* (1992). La toxicité du fenthion pour la faune aquatique à des doses rencontrées dans l'environnement a par ailleurs été démontrée, notamment sur la daphnie *Daphnia pulex* (Leydig, 1860) pour laquelle la CL<sub>50</sub> à 48h est de 1,30 µg/L (Roux *et al.*, 1995). D'autres études confirment l'impact minime du méthoprène sur la faune aquatique aux doses appliquées en démoustication, mais précisent que la toxicité de cette molécule sur les mammifères reste mal connue (Henrick, 2007 ; Harmon *et al.*, 2007). Néanmoins celles-ci ne concernent qu'un faible nombre de taxons de la faune compagne, et ne suffisent pas à démentir que ces molécules peuvent s'avérer dangereuses pour des espèces non-cibles.

L'utilisation du méthoprène et du Fenthion n'est pas envisageable pour le contrôle des populations françaises de *Coquillettidia* car ils ne sont pas homologués en France<sup>4</sup>.

L'application aérienne d'Arosurf MSF, un film monomoléculaire lipophile de surface, pour contrôler les émergences d'adultes dans des populations de *Cq. perturbans* s'est révélée efficace pendant une durée d'une semaine dans des sites à faible végétation (Kenny & Ruber, 1992). Cette stratégie de contrôle n'a pas d'effet sur les populations de micro-crustacés, mais les auteurs n'ont pas étudié l'impact sur les autres taxons de la faune compagne. De plus, cette technique n'est pas adaptée aux gîtes larvaires où la végétation est trop dense (Kenny & Ruber, 1993).

Compte-tenu d'une sensibilité moindre des larves de *Mansonia* et de *Coquillettidia* aux formulations insecticides chimiques classiques et des difficultés du traitement liées à la densité de la végétation dans les gîtes, ces composés ne sont efficaces qu'à des doses largement supérieures aux doses homologuées en démoustication. Ils ne peuvent donc pas être utilisés pour le contrôle des populations larvaires de *Coquillettidia* sans effet préjudiciable pour l'environnement.

#### **C.1.1.2. Les moyens de lutte biologiques**

Des tests toxicologiques de laboratoire ont montré que les larves de *Coquillettidia* sont très peu sensibles au *Bti*, la CL<sub>50</sub> pour *Cq. richiardii* (14 mg/L) est en effet 140 fois plus élevée que celles de *Culex* spp. et *Aedes* spp. (Rey *et al.*, 2001). Ces résultats ont été confirmés par des essais de contrôle de populations larvaires de *Cq. perturbans*. Traitées au *Bti* (poudre mouillable Bactimos) aux doses maximales autorisées, ces populations n'ont pas connu de baisse significative de densité (Sjogren *et al.*, 1986b).

L'efficacité relative des bacilles *Bacillus sphaericus* (*Bs*) et *Bti* a été évaluée par de nombreux auteurs sur différentes espèces asiatiques et américaines de *Mansonia*, avec des résultats très variables selon les espèces de moustiques et les souches de bacilles utilisées (Foo & Yap, 1983 ; Lord & Fukuda, 1990 ; Yap *et al.*, 1991). En conditions de laboratoire, les larves de *Mansonia uniformis* (Theobald, 1901) sont très sensibles aux souches 1593 et 2362 de *Bs*, mais leur biologie et leur habitat les rendent peu sensibles en conditions naturelles (Yap *et al.*, 1988). Des formulations en briquettes ou boulettes permettant une libération

---

<sup>4</sup> Catalogue des produits phytopharmaceutiques homologués en France (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche)  
<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>



progressive et durable des spores semblent donner les résultats les plus satisfaisants (Rajendran *et al.*, 1991).

Le champignon aquatique *Lagenidium giganteum* (Couch, 1935) possède des propriétés entomopathogènes, spécifiquement sur les moustiques. Les spores mobiles infectent activement les larves d'un grand nombre d'espèces de moustiques qui meurent au bout de 1 à 3 jours, puis se multiplient, entretenant l'infection dans les populations larvaires. Des tests d'ensemencement de gîtes à *Mansonia dyari* (Belkin, 1970) en spores de *La. giganteum* se sont avérés très prometteurs pour le contrôle de ces moustiques, entraînant une diminution de plus de 77% de l'émergence des adultes (Cuda *et al.*, 1995). Son efficacité en cas d'utilisation dans les gîtes à *Coquillettidia* de France métropolitaine serait toutefois limitée par la température de l'eau, inférieure une bonne partie de l'année aux températures optimales pour la sporulation (25-28°C ; Domnas *et al.*, 1982).

L'utilisation de prédateurs naturels de larves de moustiques ne permet pas de contrôler efficacement les larves de *Coquillettidia*, leur comportement de fixation aux racines des végétaux les rendant difficiles à percevoir (Van den Assem, 1958). De plus leur habitat est très contraignant pour la plupart des autres animaux aquatiques, dépourvus d'adaptations à la survie dans les milieux anoxiques.

### **C.1.1.3. Les moyens de lutte par action sur le milieu**

La méthode de lutte la plus efficace contre les populations larvaires de *Coquillettidia* est l'action sur le milieu, soit sur la végétation hôte, soit directement sur le gîte lui-même (Guille, 1976). L'utilisation d'herbicides comme le glyphosate, le diquat et le 2,4-D destinés à réduire la densité de végétaux flottants dans les gîtes à *Coquillettidia* et *Mansonia* de Floride a eu pour conséquence inattendue de limiter les émergences d'adultes de ces moustiques (Haag & Buckingham, 1991). Toutefois, l'utilisation d'herbicide ne régule les populations de moustiques que de manière très temporaire et peut avoir des conséquences désastreuses pour l'ensemble de la végétation d'une zone humide, et par enchaînement pour la faune associée (Cuda *et al.*, 1995).

L'arrachage de la végétation-hôte se révèle très efficace (Armstrong, 1941), mais est difficilement applicable à grande échelle, notamment quand la végétation est dominée par des roseaux. Cette action est préjudiciable pour de nombreuses espèces remarquables qui vivent, se nourrissent ou hivernent dans la végétation des zones humides, elle n'est donc pas envisageable.

La lutte physique consistant à faucarder<sup>5</sup> la végétation des gîtes larvaires sous la surface de l'eau a pour conséquence de détacher la majorité des larves de *Coquillettidia* de leur support pendant quelques jours, celles-ci sont ainsi plus vulnérables aux prédateurs ou aux éventuels traitements insecticides (Cousserans *et al.*, 1973). Toutefois, l'efficacité de cette méthode est relativement aléatoire car la disparition observée des larves libres après quelques jours peut signifier qu'elles se sont fixées à nouveau aux racines en profondeur (Rey, 2002).

Le faucardage par l'homme peut être remplacé par le pacage<sup>6</sup> d'animaux herbivores dans les gîtes à *Coquillettidia*, mais leur action sur la végétation est surtout locale et préférentiellement ciblée sur certaines espèces, l'efficacité de cette méthode est donc faible (MacLaren, 1967). La destruction du gîte larvaire par comblement n'est pas applicable, pour les mêmes raisons.

La méthode des assecs s'est révélée efficace à plusieurs reprises pour limiter les émergences de *Coquillettidia* dans les gîtes du littoral méditerranéen et sur le littoral sud du lac du Bourget en Savoie (Pennetier, 2003 ; Sérandour, 2003). Elle consiste à faire varier le niveau d'eau, à une période de l'année choisie en fonction des exigences des espèces remarquables de la zone humide, de façon à assécher temporairement le gîte, ce qui a pour conséquence la disparition des populations larvaires pendant 3 à 4 années. Cette méthode s'applique aux gîtes larvaires de grande envergure, pour lesquels des systèmes de vannes, permettant le contrôle du niveau de l'eau sont en place, mais elle ne s'applique pas à la majorité des gîtes larvaires connus en région Rhône-Alpes.

Le drainage des gîtes modifie la stratification de la colonne d'eau et par conséquent l'habitat des larves, mais cette technique est souvent difficile à mettre en oeuvre.

### C.1.2. Moyens de lutte contre les populations adultes de *Coquillettidia*

Les moyens de lutte contre les populations larvaires de *Coquillettidia* sont donc dans l'ensemble peu efficaces ou difficilement applicables au regard de leur dangerosité pour l'environnement. Les traitements aériens contre les adultes au niveau des gîtes, lors de fortes émergences, avec des organo-phosphorés comme le fénitrothion notamment, sont le dernier recours pour limiter les nuisances (Sinègre *et al.*, 1971). Ils sont cependant techniquement

---

<sup>5</sup> Faucher la végétation aquatique avec un faucard.

<sup>6</sup> Action de faire paître le bétail.

difficiles à réaliser, car ils nécessitent des conditions météorologiques favorables et sont gênés par la densité des formations végétales (Guille, 1976).

## C.2. Hypothèse d'un contrôle anti-larvaire via le couvert végétal

La nécessité de développement de techniques alternatives pour le contrôle de ces moustiques nous a conduit à établir une stratégie larvicide basée sur l'hypothèse suivante : les plantes aquatiques pourraient servir de vecteur d'une molécule insecticide entre le couvert végétal et les larves fixées aux racines. La barrière physique constituée par la matière organique en décomposition serait ainsi contournée. Cette stratégie repose sur plusieurs étapes dont il convient de préciser les mécanismes : 1) la pénétration du xénobiotique dans la plante, à partir des parties aériennes sur lesquelles il est déposé ; 2) sa prise en charge dans les tissus conducteurs de la plante et son transport jusqu'aux racines ; 3) sa libération dans l'environnement immédiat des racines, et son action au contact des larves.

### C.2.1. Mécanismes de pénétration foliaire d'une substance organique exogène

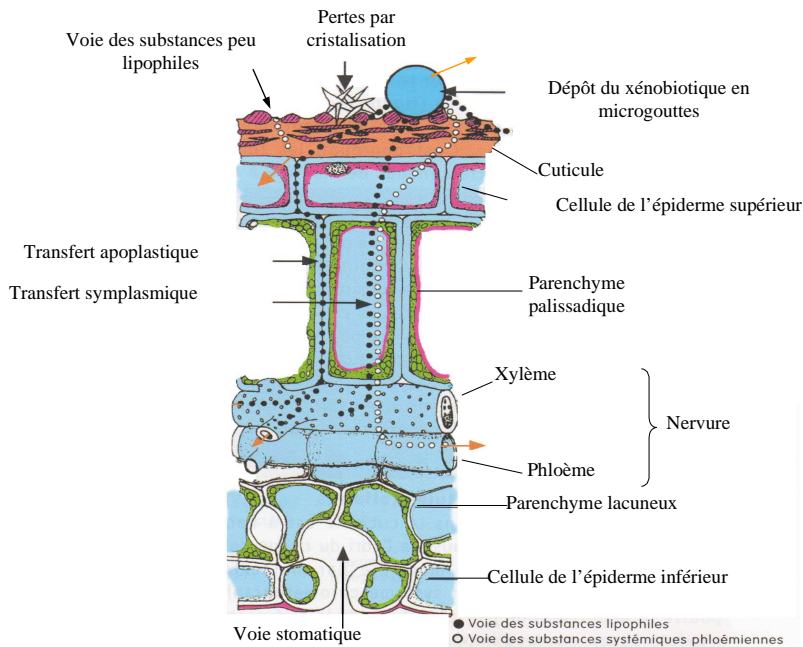
La pénétration foliaire d'une substance exogène s'effectue en deux étapes : le franchissement des barrières inertes des feuilles (cuticule, paroi), puis le passage des membranes biologiques des cellules végétales. La cuticule des plantes est la première barrière à la pénétration foliaire des composés xénobiotiques (Van Overbeek, 1956). C'est une structure recouvrant la surface des parties aériennes des plantes dont elle permet de limiter les pertes d'eau. Elle est constituée d'un polymère, la cutine et de cires intracuticulaires et épicuticulaires (Scalla, 1991).

Le franchissement de cette barrière dépend des propriétés physico-chimiques et de la formulation du xénobiotique, de l'espèce et du stade de développement de la plante, et des conditions environnementales (éclairage, humidité, température) (Tissut & Séverin, 1984 ; Baur & Schönherr, 1995). Généralement, une augmentation de la température et de l'humidité relative de l'air améliorent la pénétration et la translocation des xénobiotiques dans le végétal (Satchivi *et al.*, 2001).

Le transit cuticulaire des xénobiotiques suit un processus en deux étapes : la partition du composé entre la solution déposée et les lipides de la cuticule, puis la diffusion à travers les couches de cires et de cutine (Franke, 1967 ; Raveton *et al.*, 1999). Les molécules

lipophiles pénètrent plus facilement, mais les composés hydrophiles peuvent également transiter à travers la cuticule en conditions d'hygrométrie élevée de l'air. Dans cette situation, la cutine et la cellulose fixent des molécules d'eau et gonflent, les amas de cire s'écartent, laissant le passage pour des molécules polaires (Tissut, 1989). Des xénobiotiques peuvent également pénétrer dans les feuilles par les stomates, grâce à des molécules tensioactives du groupe des organosilicones (Knoche, 1994 ; Schönherr, 2006). Après la partition/diffusion dans la cuticule, les composés xénobiotiques passent la paroi sous-jacente par diffusion et rentrent en contact avec le plasmalemme, c'est à dire le réseau de membranes cellulaires (figure 47).

Le plasmalemme est une barrière hémiperméable sélective. Il existe trois mécanismes de pénétration cellulaire (Tissut *et al.*, 2006) : 1) Les petites molécules lipophiles se partitionnent et diffusent passivement au travers du plasmalemme, grâce à leurs affinités pour les lipides membranaires, c'est le cas de l'atrazine et de nombreux autres herbicides ; 2) Certaines molécules pénètrent activement dans la cellule à l'aide d'un transporteur. C'est le cas du glyphosate, un herbicide de la famille des aminophosphonates, qui est reconnu et pris en charge par un transporteur spécifique des ions phosphates pour pénétrer dans les cellules ; 3) Des composés peuvent également entrer dans les cellules végétales par endocytose, c'est à dire ingestion par encerclement des composés par les membranes des cellules.



**Figure 47 :** Schéma illustrant la pénétration cuticulaire et le transfert d'un xénobiotique appliqué en dépôt foliaire (coupe transversale). Adapté de Tissut *et al.* (2006)

### C.2.2. Transport dans les tissus conducteurs de la plante

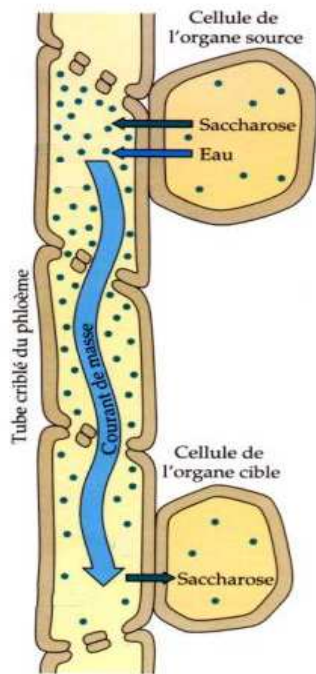
Le phloème est un tissu conducteur des végétaux constitué d'un ensemble de tubes criblés, reliés entre eux par des connections symplasmiques. Il a pour fonction de véhiculer la sève élaborée contenant les produits de la photosynthèse, depuis les parties photosynthétiques de la plante (zone source) vers les zones en croissance (zones puits), comme les extrémités des racines par exemple (Cronshaw, 1981 ; figure 48). Le saccharose (sucre majoritaire dans les tissus conducteurs) passe dans le phloème après avoir transité dans les cellules du mésophylle par voie apoplastique, c'est à dire dans l'espace pariétal intercellulaire, ou bien par voie symplasmique, c'est à dire par communication intercellulaire à travers les plasmodesmes (Truernit, 2001 ; Turgeon & Medville, 2004). Le saccharose est chargé activement dans le phloème par des transporteurs spécifiques, ce qui augmente la différence de concentration entre les tubes criblés du phloème et l'extérieur, et établit une pression hydrostatique par entrée d'eau. La différence de pression entre la zone source et la zone puits provoque alors un mouvement de la sève élaborée vers la zone puits ; il s'agit du « mass flow » (Van Bel, 2003). Le chargement de molécules dans le phloème est sous le contrôle de



Zone source :  
les feuilles

**Figure 48 :**

cellules vivantes, les cellules compagnes, qui portent les transporteurs de saccharose, et dépend de la production de ce sucre dans les feuilles (Oparka & Turgeon, 1999).



Les xénobiotiques susceptibles d'être transportés par voie phloémienne (systémie descendante), sont des molécules présentant une lipophilie intermédiaire, comme le carbofuran ( $\log Kow = 2,32$ )<sup>7</sup>, insecticide systémique du groupe des carbamates (Scalla, 1991). Les produits très lipophiles se concentrent dans les membranes biologiques, alors que les produits polaires parviennent difficilement à passer le plasmalemme pour pénétrer dans les tissus de conduction du phloème. Toutefois, des molécules hydrophiles aux propriétés herbicides comme le glyphosate sont connues pour leur aptitude à transférer dans le phloème, grâce à un transport actif entre cellules (Denis & Delrot, 1993).

### C.2.3. Libération par les racines dans l'environnement

Les pesticides qui pénètrent dans les plantes sont en grande partie métabolisés et les composés libérés par les racines sont souvent un mélange de produits de dégradation de la

<sup>7</sup> Kow est un coefficient de partage *n*-octanol/eau. Il s'agit du rapport de la concentration d'un xénobiotique dans un volume de *n*-octanol sur sa concentration dans l'eau lorsque le système biphasique est en équilibre.

molécule d'origine (Korte *et al.*, 2000). Les composés de faible poids moléculaire sont majoritairement libérés par diffusion passive dans la rhizosphère en réponse au fort gradient de concentration existant entre le compartiment cellulaire et l'extérieur. La sécrétion de ces composés est accentuée par l'établissement d'un gradient électrochimique, lorsque la solution d'exsudats est négativement chargée (Kuziakov & Jones, 2006). L'autre mécanisme expliquant la libération de xénobiotiques ou de leurs métabolites par les racines est la lyse cellulaire. Les racines en croissance sont soumises à des fluctuations climatiques (gel/dégel), aux frottements avec le sol, à des attaques de micro-organismes ou d'organismes invertébrés. Ces facteurs occasionnent des lésions dans les tissus racinaires, entraînant une lyse de cellules qui conduit à une libération du contenu cellulaire dans la rhizosphère. C'est par cette voie que sont libérées les molécules de poids moléculaire plus élevé (Baudoin *et al.*, 2003 ; Walker *et al.*, 2003).

#### C.2.4. Présentation de la démarche expérimentale

La localisation des larves de *Coquillettidia* en profondeur dans les gîtes larvaires, protégées par le couvert végétal et une strate importante de débris organique, rend les traitements de démoustication inefficaces. La mise au point d'une stratégie de contrôle chimique de ces populations larvaires basée sur l'utilisation des plantes comme vecteur d'insecticide, a nécessité une démarche expérimentale visant à proposer un protocole de traitement efficace. Cette démarche expérimentale se déroule en 3 étapes :

- La première étape consiste à établir un protocole de traitement foliaire des plantes, qui permette de vérifier notre hypothèse de départ, à savoir que des plantes aquatiques ont la capacité de véhiculer un xénobiotique depuis les feuilles jusqu'aux racines et de l'exsuder. Cette étape doit permettre d'établir les conditions favorisant un bon rendement (un rapport 'quantité de xénobiotique exsudée/quantité déposée' élevé). L'espèce végétale servant de modèle, la formulation de la substance active qui améliorera le transit à travers la cuticule lipophile des feuilles, les doses non-phytotoxiques et les conditions expérimentales (photopériode, humidité relative, durée des essais) doivent ainsi être déterminées.
- La deuxième étape est le choix d'une molécule ayant des propriétés lui permettant de transférer dans les plantes, et qui soit également toxique pour des larves de moustiques. La molécule choisie ne doit être ni trop polaire, ni trop lipophile, pour

pouvoir être chargée dans le phloème. Elle ne doit pas avoir un poids moléculaire trop élevé pour pouvoir être exsudée en quantités suffisantes par les racines. Enfin, certains des produits de dégradation de la molécule idéale doivent être toxiques pour les larves de moustiques. Le suivi de l'acquisition du xénobiotique par les insectes en milieu aquatique et des tests de toxicité sont donc réalisés.

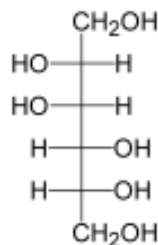
- Enfin la dernière étape consiste à tester l'efficacité de la stratégie avec l'association de la molécule insecticide et de la plante aquatique retenues. Après dépôt foliaire de l'insecticide, sa distribution dans le système plante aquatique-larves est suivie, et la toxicité mesurée sur des larves de moustiques.

### C.3. Matériel et méthodes

#### C.3.1. Molécules de synthèse

##### C.3.1.1. *Le mannitol*

Le mannitol est un polyol, forme réduite d'un sucre à six carbones, le mannose (figure 49). Le mannitol possède des propriétés osmotiques impliquées dans la réponse des plantes aux stress abiotiques comme le froid, la salinité et la sécheresse (Everard *et al.*, 1992). Il est également impliqué chez plus d'une centaine de végétaux supérieurs (notamment les familles des Apiaceae, Rubiaceae, oleaceae) dans le transport à longue distance du carbone, au même titre que le saccharose. Chez ces végétaux, le mannitol est un produit primaire de la photosynthèse qui transite des zones sources vers les zones puits, *via* le phloème, où il est chargé activement par des transporteurs spécifiques (Noiraud *et al.*, 2001). C'est pour ces propriétés systémiques qu'il a été choisi, ainsi que pour ses propriétés chimiques : c'est une molécule hydrophile ( $\log Kow = -2,47$ ) de faible poids moléculaire (182,17 g.mol<sup>-1</sup>). Le <sup>14</sup>C-D-mannitol a été fourni par ICN Pharmaceuticals (Activité spécifique : 32 mCi/mmol) et utilisé dans une formulation contenant du Tween 80 au 1/1000<sup>e</sup>.



**Figure 49 :**

Formule chimique développée du D-mannitol



### C.3.1.2. Le 2,4-D

L'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D ; figure 50) est un herbicide sélectif des Dicotylédones (Scalla, 1991). C'est un herbicide auxinique (phytohormone) choisi pour ses propriétés systémiques. C'est également une molécule polaire (Log Kow = -0.83 à 25°C, pH 7) de faible poids moléculaire (221,04 g.mol<sup>-1</sup>).

Le <sup>14</sup>C-2,4-D a été fourni par Sigma Aldrich (Activité spécifique : 5,17 mCi/mmol) et utilisé dans une formulation contenant un solvant, le diméthyl-sulfoxyde (DMSO, Prolabo) à 3/100<sup>e</sup> et du Tween 80 au 1/1000<sup>e</sup>.

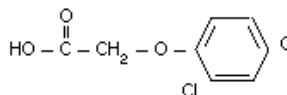
### C.3.1.3. Le glyphosate

Le glyphosate (Glycine,N-(Phosphonométhyl) ; figure 51) est un herbicide de post-levée à large spectre d'action (Merck Index, 1996). Il inhibe l'enzyme enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, impliquée dans la synthèse d'acides aminés essentiels pour les plantes (Rogers *et al.*, 1983). Cette molécule a été choisie pour ses propriétés systémiques et de pénétration foliaire. C'est une molécule polaire (Log Kow = -3.2 à 25°C) de faible poids moléculaire (169,1 g.mol<sup>-1</sup>).

Le <sup>14</sup>C-Glyphosate a été fourni par Sigma Aldrich, (Activité spécifique : 2,2 mCi/mmol) et a été utilisé en solution avec un surfactant, le Tween 80 (Prolabo) concentré à 1/1000<sup>e</sup>. Cette formulation permet d'augmenter la surface de contact entre les gouttes de dépôt et la feuille, et de faciliter la pénétration des xénobiotiques à travers la cuticule.

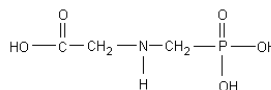
### C.3.1.4. Le méthyl-parathion

Le méthyl-parathion (O,O-diméthyl O-(4-nitrophényl) phosphorothioate) est un insecticide, acaricide appartenant à la famille des organophosphorés (Merck Index, 1996 ; figure 52). Il a une action neurotoxique et agit au niveau des synapses



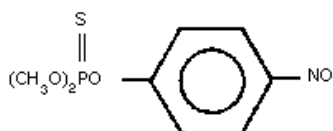
**Figure 50 :**

Formule chimique développée du 2,4-D



**Figure 51 :**

Formule chimique développée du glyphosate



**Figure 52**

Formule chimique développée du méthyl-parathion

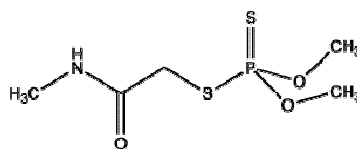
cholinergiques, en inhibant l'acétylcholinestérase. Cette substance active, parmi les plus toxiques des organophosphorés, a été interdite d'usage par l'Union Européenne (directive 91/414/CEE) et ne bénéficie plus d'autorisation de mise sur le marché en France depuis 2003. Le méthyl-parathion est une substance lipophile (Log Kow = 3) qui a un poids moléculaire de 263,23 g.mol<sup>-1</sup>. La molécule de synthèse non marquée se présente sous la forme d'une poudre cristalline insoluble dans l'eau et a été utilisée en solution dans du DMSO à 3%. La forme marquée (activité spécifique : 13.8 mCi/mmol) est solubilisée dans du toluène a été utilisée dans une formulation contenant du Tween 80 au 1/1000<sup>e</sup>. Les substances actives froide et radio-marquée ont été fournies par Sigma-Aldrich.

#### C.3.1.5. Le diméthoate

Le diméthoate (Phosphorodithioate S-[(méthylcarbamoyl)méthyle] O,O-diméthyle ; figure 53) est un insecticide, acaricide appartenant à la famille des organophosphorés (Merck Index, 1996). C'est un insecticide systémique, utilisé sur

diverses cultures de fruits et de légumes, contre les insectes suceurs de sève, comme les pucerons. Les propriétés physico-chimiques de cette molécule lui permettent en effet d'être véhiculé dans la plante *via* la systémie phloémienne. C'est un neurotoxique inhibiteur de l'acétylcholinestérase qui possède un spectre d'action large et n'est pas employé en lutte contre les populations de moustiques. Ce xénobiotique d'un poids moléculaire de 229 g.mol<sup>-1</sup> est relativement peu lipophile (Log Kow = 0.704) comparé aux insecticides de la même famille utilisés en démoustication, le fénitrothion (Log Kow = 3,38) et le téméphos (Log Kow = 4,90). La molécule de synthèse radiomarquée, le [méthylène-<sup>14</sup>C]-diméthoate, a été fournie par Amersham. Son activité spécifique est de 55 mCi/mmol, il est pur à 87%.

Pour le suivi de la distribution de l'insecticide dans un système plante-eau, nous avons utilisé cette molécule radiomarquée, en mélange avec une solution commerciale de diméthoate (Techn'oate, Sipcam-Phyteurop) contenant des agents de formulation permettant d'améliorer la pénétration foliaire. La molécule de synthèse non marquée utilisée pour évaluer la toxicité du diméthoate pour les larves de moustiques a été fournie par Sigma-Aldrich.



**Figure 53**

Formule chimique développée du diméthoate

## C.3.2. Matériel végétal

### C.3.2.1. *Le maïs*

Les semences de maïs ont été mises à germer dans les conditions suivantes de photopériode : 14 h d'éclairement, 10 h d'obscurité ; de température : 25°C et d'humidité relative : 80%. A l'apparition du coléoptile, les plantules ont été transplantées dans des bacs contenant du terreau, afin de favoriser leur développement racinaire et foliaire, en conditions contrôlées (40% d'humidité relative). Les plantules utilisées pour les expériences de laboratoire étaient âgées de 10 jours (stade 3 feuilles).

### C.3.2.2. *La massette*

Les expériences ont été réalisées à partir d'individus de taille homogène (30 cm), obtenus par bouturage de plantes de terrain préalablement conditionnées en salle de culture (description des conditions au paragraphe B.2.2.1.).

## C.3.3. Matériel animal

### C.3.3.1. *Coquillettidia richiardii*

Les larves de *Coquillettidia* utilisées pour les tests de laboratoire proviennent de prélèvements sur le terrain (description de la méthode d'échantillonnage au A.3.5.).

### C.3.3.2. *Aedes aegypti*

Les individus de la souche Bora-Bora, de l'espèce *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) ont été élevés en conditions contrôlées : 25°C, 80% d'humidité relative et une photopériode simulant 16h de jour et 8h de nuit. Cette espèce est sensible aux insecticides de la famille des organophosphorés (Rey *et al.*, 2001), ce qui fait d'elle une espèce de référence pour la réalisation de tests toxicologiques.

#### C.3.4. Protocole de suivi de l'acquisition d'un xénobiotique par des larves de moustiques

Des lots de 100 larves vivantes et mortes (1 minutes à 60°C) d'*Ae. aegypti* au stade 4 ont été placés dans une solution d'insecticide marqué au  $^{14}\text{C}$  (volume : 5 mL, activité spécifique : 55 mCi/mmol). La concentration en diméthoate choisie est sub-létale (4  $\mu\text{M}$ ) n'induisant pas d'effet toxique durant le temps d'expérimentation. A 2, 6, 24 et 48 heures, les larves ont été prélevées et lavées dans une solution d'insecticide froid (1 mM) à 3 reprises, pesées, puis broyées dans l'éthanol. La radioactivité présente dans le bain (y compris celle des solutions de rinçage) et dans les broyats de larves a ensuite été mesurée par  $\beta$ -scintillation.

#### C.3.5. Protocole des tests toxicologiques sur larves de moustiques

Les tests toxicologiques, ou bioessais, ont été réalisés en triplicats pour l'espèce *Ae. aegypti*, et en duplicats pour l'espèce *Cq. richiardii*, dans des gobelets en plastique contenant chacun 50 mL de solution aqueuse à différentes concentrations en insecticide. 20 larves de taille standard (4<sup>ème</sup> stade de développement larvaire) ont été disposées dans chaque gobelet et le nombre de larves mortes dans chaque lot a été compté 2h, 4h, 8h, 24h et 48h après le début du bioessai. Les larves n'ont pas été nourries pendant le bioessai, et aucun support de fixation n'a été apporté pour les larves de *Cq. richiardii*.

La sensibilité larvaire aux différentes concentrations de diméthoate en fonction du temps a été exprimée par le calcul du taux de mortalité (%). Si celui-ci était supérieur à 20% dans le lot de larves témoin, le test était annulé. Si le taux était compris entre 5 et 20%, une correction devait être effectuée grâce à la formule d'Abbott (1925) :

$$\text{Pourcentage de mortalité corrigé} = \frac{\text{Mortalité dans le lot test} - \text{mortalité dans le lot témoin}}{100 - \text{mortalité dans le lot témoin}} \times 100$$

Les données ont été analysées par le logiciel Log-Probit (Raymond, 1993), qui calcule les  $\text{CL}_{50}$  (concentration létale pour 50% des individus).

### C.3.6. Protocole d'extraction des xénobiotiques des plantes

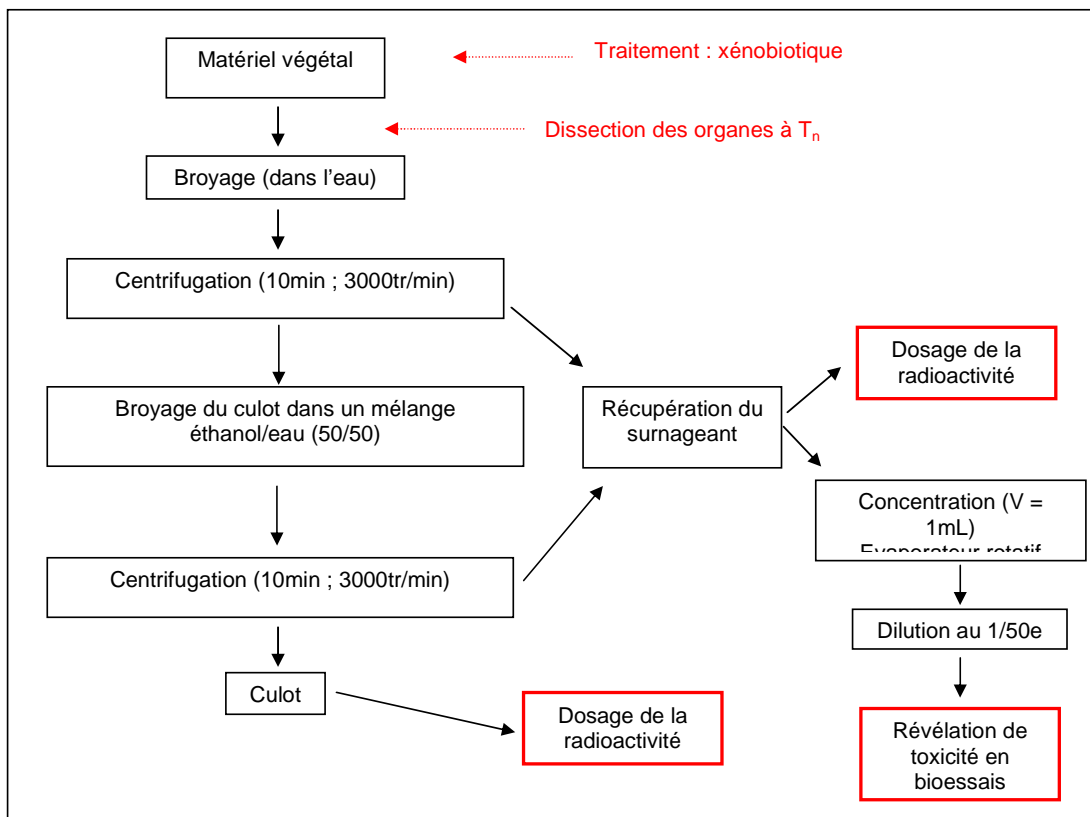
#### ➤ *Extraction des xénobiotiques*

L'extraction des molécules radioactives contenues dans les plantes a été réalisée après dissection des organes aériens (feuilles) et souterrains (racines). Ces parties végétales ont été pesées puis broyées à deux reprises, dans de l'eau pour l'extraction des composés polaires (glyphosate, 2,4-D et mannitol) ou dans de l'éthanol/eau (50/50) pour les composés plus lipophiles (méthyl-paration et diméthoate). Chaque broyage a été suivi d'une centrifugation, et le surnageant a été récupéré pour doser le xénobiotique (figure 54).

#### ➤ *Révélation de la répartition des xénobiotiques dans les plantes*

La radioactivité présente dans chaque échantillon a été mesurée à l'aide d'un appareil de comptage à scintillation (1414 Winspectral™, Wallac). Les résultats sont exprimés en nombre de désintégrations par minute (DPM). En complément, un herbier a été réalisé avec un individu traité pour une révélation de la distribution dans la plante de la radioactivité, à l'aide du Cyclone (Perkin Elmer®) et d'un logiciel de traitement (optiquant™).

La présence de diméthoate, non marqué, dans les extraits de plantes, a été mise en évidence par exposition de larves de moustiques à ces extraits dans le cadre de tests toxicologiques.



**Figure 54** : Protocole d'extraction et de révélation de la répartition des xénobiotiques dans les plantes  
 $T_n$  : Temps après traitement des plantes ( $n$  = nombre de jours)

## C.4. Résultats

### C.4.1. Mise au point du protocole de traitement des plantes

#### C.4.1.1. Choix des conditions de traitement

##### ➤ Formulation

Les substances actives ont été formulées avant traitement par adjonction d'une substance tensioactive, le Tween 80. Une dilution au 1/1000<sup>e</sup> a été retenue car elle n'entraînait pas d'effet phytotoxique visible sur les plantes de maïs après 14 jours de suivi

(absence de nécroses foliaires, développement morphologique similaire aux témoins, gain de biomasse similaire aux témoins (test de Mann & Whitney :  $U = 2$  ;  $p = 0,8$ )). L'ajout de surfactant à cette concentration permet d'augmenter la surface d'échange entre la gouttelette d'eau et la cuticule de la feuille. Cela limite les pertes de produits par ruissellement et favorise la partition du xénobiotique entre ces deux matrices (figure 55).



**Figure 55 :**

Photographie illustrant l'adhérence des microgouttes à un support vertical après ajout de Tween 80 (tensioactif) à la solution de dépôt. (Vue de dessus).

➤ Conditions de culture

Dans les conditions régnant en salle de culture (photopériode : 14 heures de jour, 10 heures de nuit ; 25°C et 40% HR), l'évaporation rapide des dépôts foliaires a été observée entraînant une cristallisation du xénobiotique. De ce fait, la pénétration trans-cuticulaire de la matière active était fortement compromise et non reproductible. Afin d'améliorer le transit dans la cuticule des feuilles, les dispositifs ont été placés 24h à l'obscurité et en condition d'humidité saturante. Dans ces conditions, l'assèchement des microgouttes est évité, et la transpiration des plantes est limitée, ce qui favorise la pénétration du xénobiotique. Pour la suite de l'expérience, les dispositifs ont été placés en conditions contrôlées, le volume d'eau dans lequel baignaient les racines (bain) étant remis à niveau régulièrement pour éviter un stress hydrique des plantes.

➤ Durée de l'expérience

Afin de suivre la cinétique de distribution des xénobiotiques, une autoradiographie des organes disséqués de plantules traitées a été réalisée après 7 et 14 jours, et la radioactivité a été mesurée tous les 7 jours dans les plantes et tous les 2 jours dans le bain. Une durée totale d'expérience de 14 jours a finalement été choisie pour comparer la pénétration des

différents xénobiotiques dans les plantes, leur transfert et leur libération dans le bain (4 réplicats).

➤ Volume et concentration

Les dépôts de la solution formulée de xénobiotique ont été effectués à l'aide d'une microseringue (Hamilton). Des microgouttes ont été déposées sur la face supérieure d'une feuille chlorophyllienne de chaque plantule, à raison de 4 µL/cm<sup>2</sup> de surface foliaire (figure 56). Pour chaque xénobiotique, des tests préliminaires ont été réalisés avec une gamme de quantité déposée sur les feuilles, afin de suivre l'apparition potentielle d'effets phytotoxiques. Les symptômes suivis sont l'observation de nécroses foliaires et de perturbations du développement estimé par le suivi de masses sèches pendant 14 jours de traitement. Grâce à ces mesures, les quantités de xénobiotiques sélectionnées pour nos expériences sont listées dans le tableau 14. Pour ces doses utilisées, aucun effet phytotoxique n'est observé (tests de Mann & Whitney :  $p > 0,05$ ), excepté pour le glyphosate qui est un herbicide puissant sur maïs. Cependant, l'étude du glyphosate reste intéressante d'une part comme molécule modèle (transfert phloémien) et d'autre part, pour ses propriétés herbicides sur le support végétal de fixation des larves de *Coquillettidia*.



**Figure 56 :**

Photo du dépôt foliaire de micro-gouttes de <sup>14</sup>C-2,4-D sur maïs.

**Tableau 14 :** Récapitulatif des concentrations des xénobiotiques utilisés en traitement foliaire  
Mesures de l'effet phytotoxique par comparaison des masses sèches de plantules traitées (N=4) et témoin (N=4) après 14 jours (tests de Mann & Withney).  
 $p < 0,05$  signifie un effet phytotoxique significatif.

Xénobiotique	Concentration des solutions (mg/L)	Concentration en radioactivité (DPM/µL)	Volume déposé (µL)	Quantité déposée par plante (µg)	Effets phytotoxiques sur le développement
Mannitol	155	60000	10	1.55	Non ( $p=0,13$ )
2,4-D	81	4200	100	8.05	Non ( $p=0,83$ )
Glyphosate	225	6500	100	22.5	Oui ( $p=0,004$ )
Méthyl-parathion	470	55000	10	4.7	Non ( $p=0,52$ )
Diméthoate	5000	Non marquée	400	2000	Non ( $p=0,81$ )



#### C.4.1.2. Screening de différents xénobiotiques candidats au transfert phloémien

A cette étape de la démarche expérimentale, nous avons comparé les capacités de différents xénobiotiques à pénétrer, transférer dans une plantule de maïs et à être libérés par ses racines. Le choix des substances actives s'est porté sur des molécules naturelles transportées par le phloème (mannitol), des molécules décrites comme systémiques phloémiennes (2,4-D et glyphosate) et des insecticides potentiellement à systémie descendante (diméthoate, méthyl-parathion). Pour cette sélection de matière active, nous avons utilisé une plante modèle à germination et croissance rapide : le maïs (*Zea mays*).

##### ➤ Mannitol

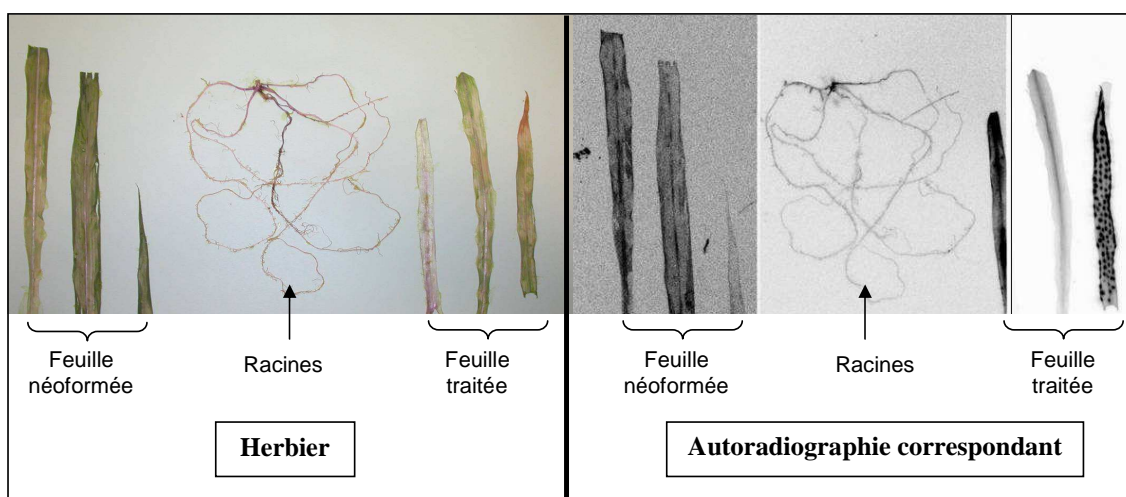
Le mannitol a très bien pénétré dans les feuilles de plantules de maïs, puisque plus de 99% de la quantité déposée sont retrouvés dans le système plante-eau après 14 jours (tableau 15). Le mannitol est accumulé dans la feuille traitée des plantes, et seulement 5,2% de la quantité déposée a migré dans les autres organes des plantes. 2,4% ont migré vers les racines, dont 30% a été libéré dans l'eau. La pénétration du mannitol dans les plantules de maïs est excellente mais le transfert depuis la feuille traitée vers les racines est très faible.

**Tableau 15** : Répartition des différents xénobiotiques radiomarqués dans les compartiments du système plantule de maïs/bain, 14 jours après le traitement.

Xénobiotique	Proportion (%) après 14 jours de la dose en xénobiotique déposée à T0					
	Fraction non pénétrée	Feuille traitée	Parties aériennes	Racines	Bain	Pertes
Mannitol	0,08	94,67	2,80	1,72	0,71	0,02
2,4-D	15,8	61,5	0,8	1,4	1,3	18,2
Glyphosate	13,8	34,1	9,7	2,0	24,6	15,8
Méthyl parathion	23,60	48,27	1,12	0,63	0,15	26,22

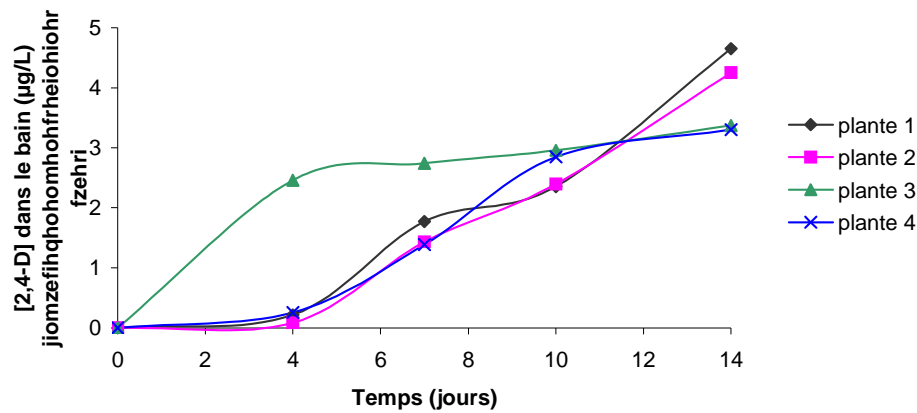
➤ 2,4-D

D'après l'autoradiographie (figure 57) et le dosage quantitatif des échantillons (tableau 15), le 2,4-D s'est réparti dans tous les organes de la plante traitée, ainsi que dans la solution dans laquelle baignent les racines, 14 jours après traitement. Il s'accumule principalement dans la feuille traitée, où l'on retrouve 62% de la radioactivité totale déposée. Une proportion très faible de l'herbicide a transféré dans la plante puisque moins de 5% de la quantité déposée est retrouvée dans les parties aériennes non traitées, dans les racines et dans l'eau. Environ 1,4% de la radioactivité déposée a été libérée par les racines dans la solution.



**Figure 57** : Répartition du  $^{14}\text{C}$ -2,4-D dans une plantule de maïs 14 jours après dépôt foliaire individus (figure 58) mais la concentration du xénobiotique dans le bain augmente progressivement durant les 14 jours d'expérience après traitement.

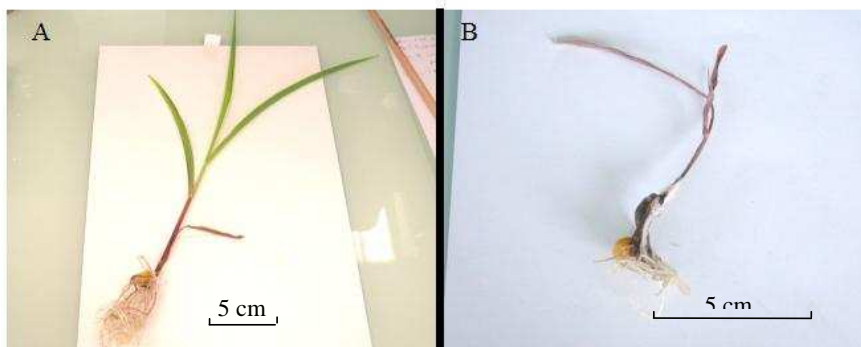
Les résultats obtenus démontrent la capacité du 2,4-D ainsi formulé à franchir la barrière cuticulaire des feuilles, mais son transport dans la plante reste faible, ainsi que les quantités libérées dans le milieu aquatique.



**Figure 58** : Cinétique de libération du 2,4-D dans l'eau par les racines de plantules de maïs

➤ Glyphosate

Le glyphosate a bien pénétré dans les feuilles de plantules de maïs, puisque plus de 70% de la quantité déposée est retrouvée dans le système plante-eau après 14 jours (tableau 15). Le glyphosate est présent en plus grande quantité (34,1%) dans la feuille traitée des plantes, mais un peu plus du tiers de la quantité déposée (36,3%) a migré dans les autres organes des plantes. Le quart de la quantité de radioactivité déposée est retrouvée dans le bain (24,6%) soit 12 fois plus que dans les tissus racinaires, ce qui suggère une libération massive du produit par les racines.



**Figure 59** : Effets phytotoxiques du glyphosate sur les plantules de maïs après 14 jours

A : plante non traitée ; B : plante traitée avec 22,5µg de glyphosate

Un effet phytotoxique évident du glyphosate à la dose de 225 mg/L a été noté sur les plantules de maïs. Il s'est traduit par l'apparition de nécroses et de brûlures sur les feuilles dès 7 jours de traitement, par la diminution de la biomasse racinaire et la mort prématurée de nombreuses racines, et par l'obtention d'un bain très trouble (figure 59). Le suivi des mesures biométriques des plantes met en évidence un arrêt de la croissance foliaire des plantes traitées dès 7 jours, puis leur dessèchement ; elles sont 2 fois moins longues (test U de Mann & Whitney,  $U=1$  ;  $p=0,006$ ) et 3 fois plus légères (test U de Mann & Whitney,  $U=0$  ;  $p=0,004$ ) après 14 jours que des feuilles de plantes témoin (tableau 16). Un effet est visible entre 7 et 14 jours sur les racines, qui arrêtent leur croissance et sont deux fois plus légères que les racines de plantes non traitées à 14 jours. Ces symptômes suggèrent une lyse cellulaire importante au niveau des racines après 7 jours qui expliquerait la libération importante de radioactivité dans le bain.

**Tableau 16** : Effets phytotoxiques du glyphosate sur la croissance des feuilles et racines de maïs

Nombre de jours	Rapport plante traitée/plante témoin			
	Longueur des feuilles (cm)	Masse sèche des feuilles (g)	Longueur des racines (cm)	Masse sèche des racines (g)
Témoin 7 jours	25,35 ±1,54	0,09 ±0,01	12,23 ±2,79	0,14 ±0,02
Traité 7 jours	12,83 ±2,13	0,05 ±0,01	13,17 ±2,31	0,13 ±0,02
Témoin 14 jours	26,27 ±8,21	0,13 ±0,04	17,17 ±6,11	0,13 ±0,04
Traité 14 jours	13,67 ±3,50	0,05 ±0,02	13,25 ±3,47	0,07 ±0,02

Les résultats obtenus démontrent la capacité du glyphosate à pénétrer dans la plante en grande quantité. Cet herbicide à la dose utilisée présente des effets phytotoxiques sur les plantules de maïs, mais les fortes proportions de radioactivité transférées dans la plante et libérées dans le bain confirment les propriétés systémiques du glyphosate en système hydroponique.

➤ Méthyl-parathion

L'expérience de traitement foliaire des plantes de maïs au  $^{14}\text{C}$ -méthyl-parathion a eu un rendement plus faible que les autres expériences, plus du quart de la quantité déposée n'étant pas retrouvée (tableau 15). Les 2/3 de la radioactivité retrouvée ont pénétré dans la plante, dont 96,2% est accumulé dans la feuille traitée après 14 jours. La quantité de

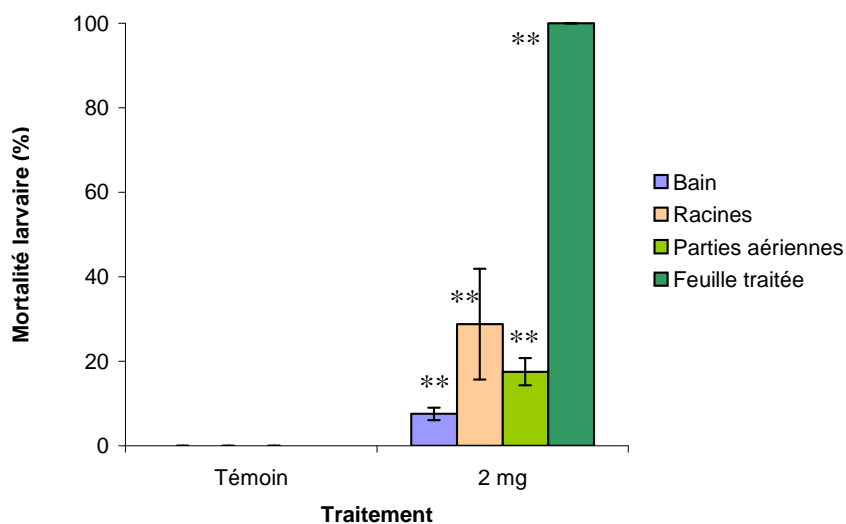
radioactivité ayant migré de la feuille traitée vers les autres organes est très faible (3,8% de la quantité pénétrée). Les feuilles non traitées ont reçu l'essentiel de la radioactivité transférée (2.2% de la quantité pénétrée), les proportions retrouvées dans les racines (1,25%) et dans le bain (0,3%) sont très faibles.

Le méthyl-parathion pénètre assez bien dans les plantes à partir d'un dépôt foliaire mais son transfert vers les racines et le bain est très faible.

➤ Diméthoate :

La révélation de la distribution de l'insecticide dans le système maïs-eau a été réalisée à travers des tests toxicologiques où les larves de moustiques ont été exposées aux extraits de plantes traitées. Les extraits de plantes témoins ne présentent pas de toxicité alors que ceux des plantes traitées sont tous toxiques pour les larves de moustiques (figure 60). Le xénobiotique est majoritairement présent dans la feuille traitée, mais il a été transféré dans les autres feuilles et dans les racines en quantités suffisantes pour être révélées par bioessais. La toxicité du bain est faible mais suggère la présence de xénobiotique, à une concentration avoisinant la limite de sensibilité des larves.

Ces bioessais montrent que le diméthoate a pénétré dans la plante et y a transféré. Un effet insecticide libéré dans le bain par les racines est observé.



**Figure 60 :** Toxicité à 48h de différents extraits de plantes de maïs traitées au diméthoate sur des larves *d'Aedes aegypti*.

Traitement : dose de diméthoate appliquée par plante.

Mortalité moyenne calculée à partir de 4 réplicats.

\*\* : différence significative avec le témoin (Mann & Whitney),  $p < 0,01$ .

➤ Sélection des substances actives à systémie phloémienne :

L'étude du transfert phloémien des cinq molécules précédentes sur plantules de maïs nous a permis de mettre en évidence les propriétés systémiques intéressantes de deux molécules : le glyphosate et le diméthoate. Ces molécules semblent pénétrer dans les feuilles et être réparties dans l'ensemble des organes de la plante traitée. Le résultat marquant est la libération par les racines de <sup>14</sup>C-glyphosate et d'un pouvoir insecticide lié au diméthoate, dans le bain après 14 jours. Ces deux molécules sont donc choisies pour valider le protocole de la stratégie insecticide sur des plantes aquatiques.

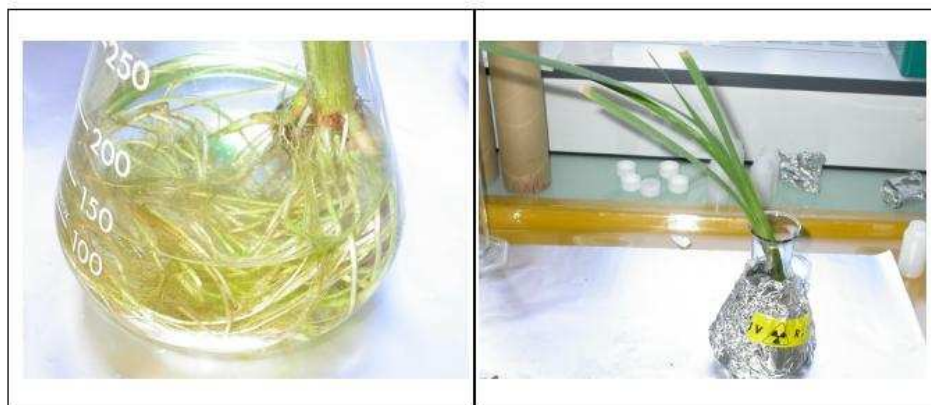
***C.4.1.3. Transfert phloémien du glyphosate et du diméthoate dans une plante aquatique***

Nous avons choisi d'utiliser les massettes (*Typha latifolia*) comme modèle de plante aquatique, car les larves de *Coquillettidia* se fixent aux racines de cette espèce végétale *in natura*.

➤ Glyphosate

Aucun effet phytotoxique dû à l'application de glyphosate à la dose sélectionnée n'a été observé sur les plantes de massette (figure 61).

Le <sup>14</sup>C-glyphosate a pénétré à 99% dans les plantes et s'est réparti dans tous les compartiments du système massette-eau, 14 jours après traitement (tableau 17). Il est principalement localisé au niveau de la feuille traitée où la quantité moyenne de matière active mesurée correspond à 81,6% du total déposé, et seulement 17% du total est exporté. Les parties souterraines (rhizome + racines) représentent le compartiment qui accumule le plus de radioactivité après la feuille traitée. Ce compartiment a accumulé en moyenne 7,6% du glyphosate total déposé et en a libéré 2,6% dans le milieu. Plus de la moitié de la radioactivité exportée est mesurée dans les parties souterraines (58,3%).



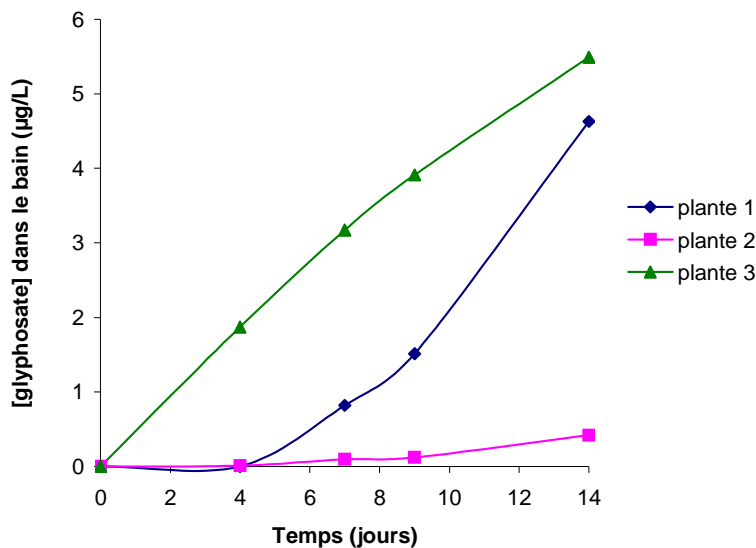
**Figure 61** : Photographies des racines et des feuilles d'une plante de massette traitée au glyphosate 14 jours après traitement.

Dose appliquée : 22,5µg. Racines et feuilles en bon état, pas de nécrose visible.

**Tableau 17** : Répartition du <sup>14</sup>C-glyphosate dans les différents compartiments du système massette/eau, 14 jours après traitement.

Xénobiotique	Proportion (%) après 14 jours de la dose en xénobiotique déposée à T0					
	Fraction non pénétrée	Feuille traitée	Parties aériennes	Parties souterraines	Bain	Pertes
Glyphosate	0,9	81,6	7,3	7,6	2,6	0

La cinétique de libération du <sup>14</sup>C-glyphosate par les racines n'est pas similaire pour l'ensemble des plantes (figure 62). Les plantes 1 et 3 présentent une cinétique semblable, avec une libération régulière de matière active au cours du temps. La plante 2 montre une très faible libération de glyphosate, 7 jours après traitement. L'observation du réseau racinaire des plantes 1 et 3 témoigne d'un état biologique en voie de létalité puisque certaines racines montrent une lyse cellulaire avancée. La plante 2 possède à 14 jours un réseau racinaire mieux développé et plus fonctionnel. Ces observations semblent indiquer que le transfert phloémien du glyphosate a été moins efficace dans la plante 2.



**Figure 62** : Cinétique de libération du glyphosate par des racines de massette

Le glyphosate est une molécule modèle qui nous a permis de démontrer l'existence du transfert d'un xénobiotique des parties aériennes végétales jusqu'à sa libération dans le milieu liquide environnant les racines et ceci grâce à un transfert phloémien à longue distance au sein d'une plante aquatique.

➤ Diméthoate

Aucun effet phytotoxique n'a été observé, 14 jours après dépôt du diméthoate.

La quantité de diméthoate ayant pénétré dans la plante est importante (près de 90%). 1% de la quantité déposée a migré vers les parties souterraines, dont 22% sont retrouvés dans le bain après 14 jours (tableau 18).

**Tableau 18** : Répartition du <sup>14</sup>C-diméthoate dans le système massette/eau, 14 jours après traitement.

Les feuilles ont toutes été traitées et ont été regroupées (parties aériennes).

Proportion (%) après 14 jours de la dose en xénobiotique déposée à T0					
Xénobiotique	Fraction non pénétrée	Parties aériennes	Parties souterraines	Bain	Pertes



Diméthoate	7.09	89.59	0.79	0.22	2.11
------------	------	-------	------	------	------

Les résultats de cette expérience montrent une bonne pénétration du diméthoate dans la plante et le transfert vers les racines d'une faible proportion du xénobiotique déposé.

Les résultats obtenus avec le glyphosate mettent en évidence la possibilité pour ce xénobiotique polaire de pénétrer dans une plante aquatique sur laquelle il a été préalablement déposé, d'y transférer et d'être libéré par les racines dans le milieu aquatique. Le diméthoate montre une bonne pénétration trans-cuticulaire mais semble être transféré en moins grande quantité en direction des racines et du bain. Ces observations valident donc le protocole de notre stratégie insecticide.

#### ***C.4.1.4. Discussion***

Nos résultats montrent que les cinq molécules testées n'ont pas toutes des propriétés leur permettant de pénétrer dans les plantes, d'y transférer et d'être libérées dans le milieu extérieur par les racines.

Une part très importante du mannitol déposé sur les feuilles a pénétré dans les plantes, mais de très faibles proportions ont été prises en charge dans le phloème car la concentration en mannitol dans les organes puits (racines et parties aériennes non traitées) est 19 fois plus petite que dans les feuilles traitées. La faible proportion du mannitol transportée dans le phloème du maïs peut s'expliquer par le fait que cette espèce végétale ne l'utilise pas dans le transport à longue distance du carbone. On peut émettre l'hypothèse que les cellules du maïs ne possèdent pas de transporteur membranaire spécifique du mannitol, au contraire d'autres espèces d'importance agricole appartenant aux familles des Apiaceae, Rubiaceae, Oleaceae (Noiraud *et al.*, 2001). Le mannitol n'étant pas pris en charge efficacement dans le phloème des plantes de maïs, cette molécule n'est pas idéale pour valider notre protocole de traitement insecticide.

Le 2,4-D est un acide faible en milieu acide, qui a la particularité d'être chargé dans la circulation phloémienne par le phénomène de piégeage d'acides. Dans l'espace apoplastique

entourant les tubes criblés du phloème, les acides faibles de pKa proche de 6 sont sous forme neutre (R-COOH), relativement lipophile, ce qui leur permet de franchir les membranes biologiques et de se retrouver dans la circulation phloémienne. Dans la sève du phloème, qui est à pH 8, ces molécules sont en revanche présentes majoritairement sous forme ionisée (R-COO<sup>-</sup>), très hydrophile, qui peut difficilement sortir du compartiment cellulaire. Les acides faibles pénètrent donc facilement dans le phloème et y sont piégés, ce qui leur confère des propriétés systémiques intéressantes (tableau 19 ; Kleier, 1988). Le 2,4-D étant une phytohormone auxinique, il est reconnu par les transporteurs de l'auxine et peut également migrer dans la plante en croissance par transfert actif entre les cellules.

D'après nos résultats, le 2,4-D pénètre bien dans les feuilles de maïs avec la formulation testée, mais la quantité qui migre dans la plante en 14 jours (3.5% de la quantité déposée) paraît faible pour une molécule systémique. Ces résultats sont très proches de ceux décrits par Gauvrit et Gaillardon (1991), également sur maïs, qui montrent une pénétration de 66%, après 24 heures, du 2,4-D déposé sur les feuilles (plantules au stade 4 feuilles), et l'exportation de moins de 1,5% de l'herbicide, qui est très vite dégradé (80% en 72 heures). Le 2,4-D n'étant pas efficacement exporté vers les racines de la plante et libéré dans l'environnement, ce n'est pas la molécule permettant de valider notre protocole.

Le méthyl-parathion est un insecticide utilisé dans certains pays contre les ravageurs de culture, notamment les insectes suceurs de sève, mais il agit par contact, et non par ingestion dans la sève, comme la plupart des insecticides systémiques utilisés en lutte anti-pucerons. C'est un insecticide à volatilité relativement élevée (0.14 mg/m<sup>3</sup> à 20 °C), ce qui peut expliquer les pertes assez importantes observées (Sanders & Seiber, 1983). Le méthyl-parathion est décrit comme un organo-phosphoré non systémique dans les plantes par l'OMS (WHO, 1995), ce qui peut expliquer le faible transfert observé dans les plantes de maïs (tableau 19). De par sa lipophilie élevée, son transit dans la cuticule des feuilles par diffusion est facilité, mais il est probable qu'il s'accumule ensuite dans les membranes biologiques, ce qui limiterait son chargement dans le phloème. Les propriétés du méthyl-parathion n'en font pas une molécule modèle pour la mise au point de la stratégie de contrôle de *Coquillettidia*.

Le glyphosate pénètre bien dans les feuilles de massette, malgré son caractère très hydrophile (tableau 19), notamment grâce à l'ajout d'un surfactant (Sprankle *et al.*, 1975). Les cuticules des feuilles sont en effet pourvues de pores les rendant perméables aux solutions aqueuses et aux ions en solution, d'autant plus lorsqu'un surfactant est ajouté (Schönherr,

2006). La quantité de glyphosate transportée dans les plantes de massettes est plus importante que les quantités de mannitol, 2,4-D et méthyl-parathion ayant migré dans des plantes de maïs après 14 jours. La forte migration du glyphosate s'explique par le fait qu'il est chargé activement dans le phloème par des transporteurs de groupements phosphate (Denis et Delrot, 1993), et que son transfert est renforcé par le phénomène du piégeage d'acide, qui s'applique à cette molécule. Le dépôt foliaire de formulations similaires de glyphosate a été réalisé par Satchivi *et al.* (2000) sur les plantes *Abutilon theophrasti* Medic. (1787, famille des Malvaceae) et *Setaria faberi* F. Herm. (1910, famille des Poaceae). Les résultats ont montré la pénétration de 25 à 43% du glyphosate déposé, 72 heures après traitement, en fonction de l'espèce végétale, soit un taux de pénétration plus faible que celui calculé dans notre expérience sur *Typha latifolia* (64% de pénétration). 17% du glyphosate déposé a transféré dans les plants de *A. theophrasti*, 37% dans ceux de *S. faberi* après 72 heures, valeur supérieure à la quantité moyenne exportée par les feuilles traitées de *T. latifolia* dans notre expérience (17,5%). Cette substance active permet de valider le protocole de traitement foliaire des plantes et démontre que le transfert de xénobiotiques par voie phloémienne est possible dans un modèle de plante aquatique, *T. latifolia*.

Le glyphosate semble induire des lyses cellulaires au niveau des racines et ceci à de faibles doses. De ce fait, la fixation des larves de *Coquillettidia* sur les racines pourrait s'en trouver perturbée car la structure même des tissus et surtout la présence des aérénchymes seraient modifiées. Par conséquent, l'impact du traitement herbicide pourrait avoir un rôle insecticide indirect et pourrait jouer un rôle dans le contrôle des populations de *Coquillettidia*. Cette stratégie semble peu appropriée car les plantes aquatiques apparaissent sensibles au glyphosate et son utilisation à grande échelle pourrait avoir une répercussion sur l'ensemble de la zone humide en déstructurant totalement le couvert végétal. L'impact écologique serait alors important sur la diversité végétale et animale. C'est pour cette raison que nous avons poursuivi notre étude pour sélectionner une matière active insecticide qui, appliquée avec une formulation adéquate et à de faibles doses, pourrait agir de façon ciblée au niveau racinaire sur les larves de *Coquillettidia*.

La meilleure molécule candidate pour la validation de la stratégie larvicide à ce stade de l'étude est le diméthoate. D'après les résultats des tests toxicologiques et du suivi de la molécule radiomarquée, cette substance active semble bien pénétrer dans la plante et semble être transférée vers d'autres organes depuis les feuilles traitées, puis libérée par les racines.

Santi et de Pietri-Tonelli (1959) ont les premiers mis en évidence les propriétés systémiques du diméthoate par des expériences utilisant la molécule radiomarquée au  $^{32}\text{P}$  en application foliaire sur des plants de haricots. Ils ont montré que des quantités non négligeables d'insecticides étaient présentes dans les fruits des plantes traitées, permettant un contrôle d'insectes ravageurs de cultures. De nombreuses études ont ainsi analysé la distribution du diméthoate au cours du temps dans des fruits et légumes traités, destinés à la récolte, mais celles qui mentionnent un transport vers les parties souterraines sont rares. De très faibles quantités d'insecticides sont retrouvées dans des carottes (parties souterraines), quelques semaines après le traitement foliaire des plantes au diméthoate (FAO, 1985). Santi (1962) a observé un transport massif de  $^{32}\text{P}$ -diméthoate, depuis le tronc d'un citronnier où l'insecticide avait été injecté, vers les feuilles et les fruits de l'arbre, mais de très faibles quantités ont été retrouvées au niveau des racines. Le diméthoate est donc massivement utilisé en traitement de plantes de cultures pour lutter contre un large spectre d'insectes et d'acariens. Il n'est pas utilisé en démoustication, mais a fait l'objet de quelques études en laboratoire sur certaines espèces de moustiques aux stades larvaires. Deux hypothèses pourraient expliquer les propriétés systémiques du diméthoate. Tout d'abord, cet organophosphoré pourrait, comme le glyphosate, être reconnu et chargé dans le phloème par des transporteurs à groupements phosphate. Cependant, l'analyse de la formule développée de la molécule (figure 53) indique qu'elle possède un groupement thio-phosphate (atomes de soufre et de phosphore sur le même groupement) différent du groupement phosphate du glyphosate (figure 51). De plus, le diméthoate a montré un transfert phloémien plus faible que le glyphosate dans nos expériences, ce qui nous permet d'envisager une seconde hypothèse. Le diméthoate est une substance active à lipophilie intermédiaire (tableau 19), ce qui lui confère une mobilité à travers les membranes biologiques que n'ont pas des molécules lipophiles ou hydrophiles, et lui permet d'être chargé sans nécessiter de transport actif (Scalla, 1991). Le diméthoate présente donc les qualités requises pour la mise au point d'une stratégie de contrôle de *Coquillettidia*, il est donc retenu pour la suite de l'étude.

Les résultats que nous obtenons confirment que certains xénobiotiques peuvent pénétrer et migrer dans les plantes aquatiques de l'espèce *T. latifolia*, qui servent de support de fixation aux larves de *Coquillettidia*, et être libérés dans le milieu où elles évoluent (tableau 19). Les plants de massette sont donc de bons modèles pour l'application de la stratégie larvicide. La prochaine étape consiste à mettre au point le protocole de stratégie insecticide, avec une molécule à action insecticide et aux propriétés systémiques, le diméthoate, dans un système plante-eau-larves de moustiques.

**Tableau 19 :** Comparaison des propriétés systémiques des 5 matières actives utilisées.

Echelle de Polarité (log Kow)	Substance active	Systémie phloémienne 14 J (% dose déposée)				Chargement phloémien	Références
		Racines maïs	Bain maïs	Racines massette	Bain massette		
Hydrophile -3,2 -2,47 -0,83 0,7 3 Lipophile	Glyphosate	2,0	24,6	7,6	2,6	Piégeage d'acides + transporteur	[1]
	Mannitol	1,72	0,71	-	-	transporteur	[2]
	2,4-D	1,4	1,3	-	-	Piégeage d'acides	[3]
	Diméthoate	Non quantifié	Non quantifié	0,79	0,22	Lipophilie intermédiaire	Hypothèse
	Méthyl-parathion	0,63	0,15	-	-	Lipophilie intermédiaire	Hypothèse, non décrit

Crédit : Mis au point de la stratégie larvicide avec un insecticide systémique

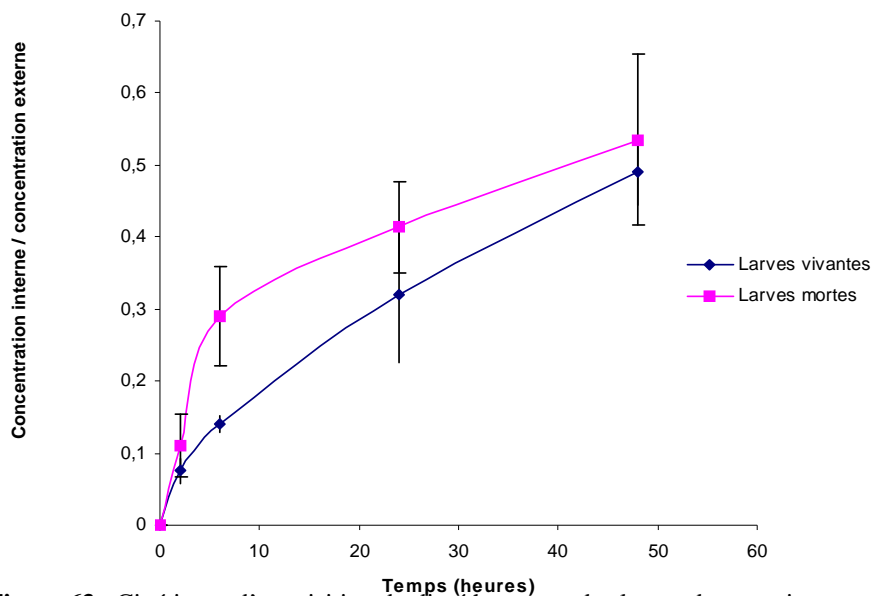
[1] : Denis & Delrot, 1993 ; [2] : Noiraud *et al.*, 2001 ; [3] : Kleier, 1988.

#### C.4.2.1. Mise en évidence de l'effet larvicide du diméthoate

Les résultats des expériences de traitement de plantes de maïs et de massettes au diméthoate ont montré la capacité de cet insecticide à pénétrer dans les feuilles, à transférer dans la plante, et à être libéré dans le bain. Cet insecticide possède les propriétés systémiques requises pour l'utilisation dans la stratégie de lutte contre les larves de moustiques, mais il reste à évaluer sa toxicité sur ces insectes. L'acquisition de l'insecticide par les larves et des bioessais ont donc été réalisés avec des larves d'*Aedes aegypti* et de *Coquillettidia richiardii*.

##### ➤ Acquisition du diméthoate par les larves de moustique

Les larves de moustique vivantes exposées à une solution sub-létale de diméthoate (concentration : 4,10 µmol/L) acquièrent l'insecticide au fil du temps (figure 63). Le rapport entre les concentrations de diméthoate dans les larves (Concentration interne) et dans le milieu extérieur (Concentration externe) augmente significativement avec le temps (Anova, F= 36,78 ; 3 ddl ; p<0,0001). Les larves mortes accumulent également l'insecticide en fonction du temps (Anova, F = 16,07 ; 3 ddl ; p < 0,001).



**Figure 63** : Cinétiques d'acquisition du diméthoate par des larves de moustiques mortes et vivantes, sur 48h. Moyennes calculées à partir de triplicats

Les cinétiques d'acquisition du diméthoate des larves vivantes et mortes sont significativement différentes (Anova,  $F = 8,19$  ; 1 ddl ;  $p < 0,011$ ). Elle est plus rapide pendant les premières heures pour les larves mortes que pour les larves vivantes (concentration interne 2 fois plus élevée après 6h), puis ralentit (concentration interne 1,3 fois plus élevée à 24h et 1,1 fois plus élevée à 48h). Les cinétiques n'atteignent pas de plateau au bout de 48h, ce qui signifie que les larves continuent d'acquérir le diméthoate après 2 jours d'exposition.

#### ➤ Toxicité du diméthoate sur les larves de moustique

Les bioessais ont été réalisés avec la gamme de concentrations en diméthoate suivante : 0 mg/L (témoin), 2, 4, 6, 8 et 10 mg/L. Les premières larves mortes sont apparues après les 8 premières heures dans les solutions de diméthoate. La mortalité dans les témoins était inférieure à 5% pour l'ensemble des lots de larves à 48h. A 24h, la  $CL_{50}$  du diméthoate mesurée sur des larves de *Cq. richiardii* est 6 fois plus grande que celle des larves d'*Ae. aegypti* (tableau 20). Cette différence de sensibilité est encore importante à 48h, la  $CL_{50}$  mesurée sur des larves de *Cq. richiardii* étant 3,7 fois plus importante que celle des larves

d'*Ae. aegypti*. Les larves de *Cq. richiardii* sont donc moins sensibles au diméthoate que celles d'*Ae. aegypti*.

**Tableau 20** : Tableau comparatif des CL<sub>50</sub> d'*Aedes aegypti* et *Coquillettidia richiardii* au diméthoate à 24 et 48h

	Toxicité du diméthoate en solution	
	CL <sub>50</sub> à 24h (mg/l) ± ES	CL <sub>50</sub> à 48h (mg/l) ± ES
<i>Aedes aegypti</i>	4,24 ± 0,79	2,58 ± 0,36
<i>Coquillettidia richiardii</i>	25 ± 0,24	9,60 ± 0,28

Ces résultats montrent que les larves de moustiques sont capables d'acquérir au sein de leurs tissus le diméthoate et montrent une certaine sensibilité au diméthoate. Cette molécule organophosphorée a donc les propriétés insecticides et systémiques requises pour être utilisé en traitement foliaire dans la stratégie de lutte contre *Coquillettidia*.

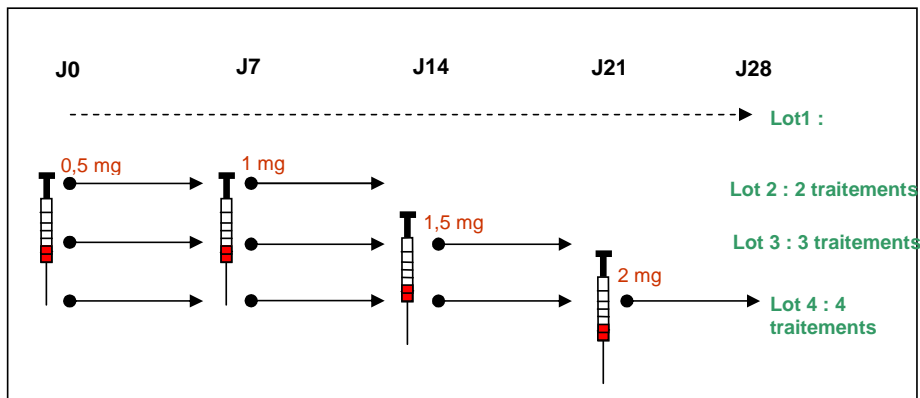
#### C.4.2.2. Mise au point du protocole de la stratégie larvicide avec le diméthoate

##### ➤ Protocole de traitement retenu

L'application foliaire du diméthoate ne devait pas entraîner d'effet toxique pour la plante, mais devait être effectuée à une dose suffisamment élevée pour que les exsudats soient toxiques pour des larves de moustiques. La concentration en diméthoate retenue pour l'application foliaire est de 2 g/L, cette concentration n'ayant pas entraîné d'effet phytotoxique sur les plantes de massette. Le volume maximal de solution qui pouvait être déposé sur la surface foliaire des plantes était de 300 µL, correspondant à une dose de 0,5 mg de diméthoate à chaque traitement.

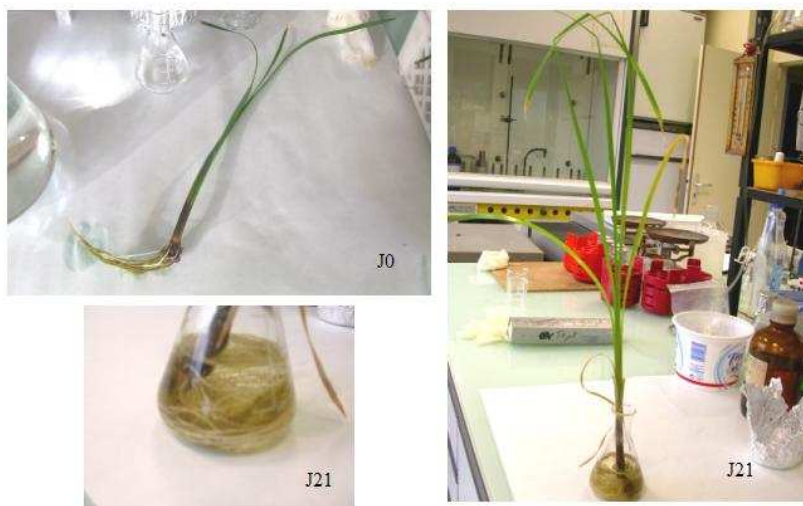
Il a donc été décidé de procéder à plusieurs traitements successifs à la dose de 0,5mg, afin d'augmenter la quantité totale déposée tout en protégeant le développement de la plante. La répétition des traitements a eu lieu tous les 7 jours, les individus (duplicats) étant traités à 2, 3, ou 4 reprises, deux plantes ne subissant pas de traitement au diméthoate (témoins). A 14,

21 et 28 jours, un lot de 2 plantes a été retiré afin d'évaluer le transfert du diméthoate dans les organes végétaux (figure 64).



**Figure 64** : Schéma de traitement des plantes au diméthoate par applications répétées

J0 : jour 0 de l'expérience.



**Figure 65** : Photographies d'une même plante à J0 et après le 4<sup>ème</sup> traitement (J21)

La surface foliaire a augmenté et le réseau racinaire s'est développé. Pas de nécroses visibles

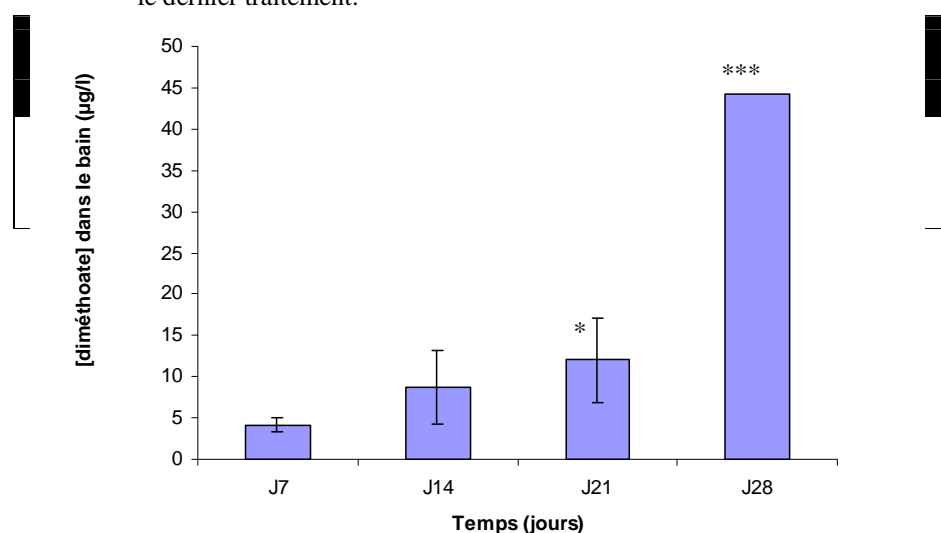
Le suivi de la libération de radioactivité dans le bain des plantes a été réalisé à partir d'aliquotes prélevées tous les 7 jours. Aucune plante n'a montré de signe de phytotoxicité, même après 4 traitements consécutifs (figure 65).



➤ Suivi de la distribution du diméthoate dans le système massette-eau

La quantité de diméthoate appliquée en dépôt foliaire qui pénètre dans les plantes est constante (90%), quelle que soit la dose à laquelle sont soumis les individus. La proportion du xénobiotique qui transfère depuis les feuilles vers les parties souterraines est faible (moins de 2%) mais augmente avec la dose appliquée et la durée de l'expérience (tableau 21). La quantité de radioactivité retrouvée dans le bain augmente avec la dose d'application (Anova,  $F_{1,3} = 27.455$  ;  $p < 0,0001$  ; figure 66), mais représente toujours 0.05 à 0.1% de la dose appliquée.

**Tableau 21** : Répartition du  $^{14}\text{C}$ -diméthoate dans le système massette/eau, 7 jours après le dernier traitement.



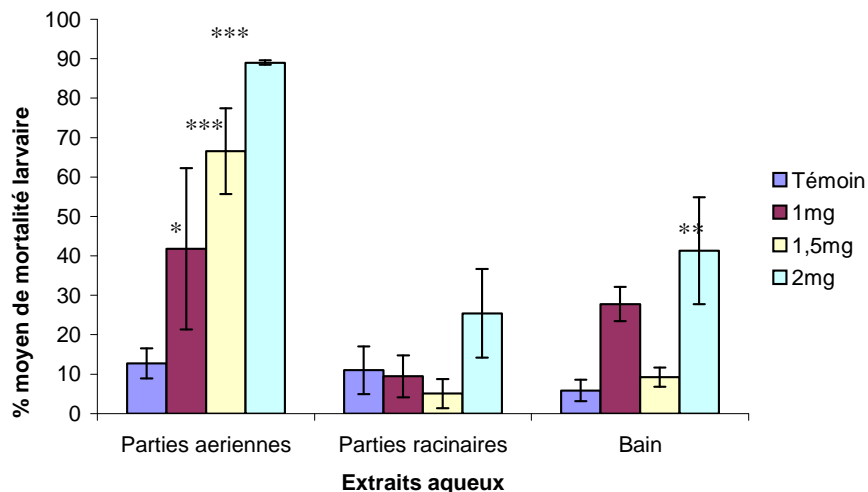
**Figure 66** : Concentration en diméthoate dans le bain en fonction du temps

Les concentrations moyennes sont calculées à partir d'échantillons prélevés tous les 7 jours (duplicats).  
Les barres d'erreur représentent les erreurs standard.

L'application du diméthoate par dépôts successifs d'une même dose sur les feuilles de massettes permet d'augmenter la quantité de diméthoate qui pénètre dans la plante, qui migre vers les racines et qui est exsudée dans le milieu extérieur, sans effet toxique visible pour la plante. La présence de radioactivité dans le bain signale qu'une partie du composé radiomarqué est exsudé, mais ne permet pas de déterminer s'il s'agit du diméthoate ou d'un métabolite. La prochaine étape a pour but de vérifier que les composés marqués exsudés par les racines conservent des propriétés insecticides.

➤ Evaluation de la toxicité de la stratégie au diméthoate pour les larves de moustiques

Au cours de tests toxicologiques, des larves de moustiques ont été exposées aux exsudats de ces plantes et aux extraits de plantes broyées, qui ont été dilués au 1/5<sup>ème</sup> afin de s'affranchir de la toxicité naturelle des plantes. Les extraits de plantes témoins conservent leur toxicité naturelle malgré leur dilution, puisqu'on retrouve 13%, 11% et 6% de mortalité, respectivement dans les lots témoin d'extraits de feuilles, de racines, et d'exsudats. Les données de mortalité ont par conséquent été corrigées par la formule d'Abbott. La mortalité larvaire est variable entre les réplicats des même lots (figure 67), suggérant une répartition différenciée de l'insecticide dans les organes des plantes traitées avec les mêmes doses.



**Figure 67** : Pourcentage de mortalité larvaire chez *Aedes aegypti* après 48h d'exposition aux extraits de plantes traitées avec différentes doses de diméthoate.

Les pourcentages moyens sont calculés à partir de 6 réplicats pour les lots témoin, 1 mg et 1,5 mg, et 9 réplicats pour 2 mg. Les barres d'erreur représentent les erreurs standard.

\* : différence significative avec le lot témoin (ANOVA),  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  ; \*\*\* :  $p < 0.001$

La toxicité différentielle des extraits de plante concorde avec la distribution observée de la radioactivité dans les plantes. Les extraits de feuilles des plantes traitées sont en effet plus toxiques que les extraits de racines (Anova,  $F = 3.65$ ,  $p < 0.0001$ ) et que les exsudats à 48h (Anova,  $F = 3.62$ ,  $p < 0.0001$ ). La mortalité des larves exposées aux extraits de feuilles augmente significativement en fonction de la dose de diméthoate déposée sur les plantes (42% de mortalité pour 1 mg, 67% pour 1,5 mg et 89% pour 2 mg). La toxicité des extraits dilués de racines de plantes traitées est faible sur les larves d'*Ae. aegypti* et seul le lot correspondant à la dose de 2 mg entraîne une mortalité supérieure au lot témoin à 48h (25% contre 11% de mortalité ; NS). La mortalité larvaire dans les exsudats révèle la libération par les racines d'un composé insecticide dans le milieu extérieur. La toxicité des exsudats de plantes traitées à 1 mg et 2 mg est supérieure à celle des témoins et atteint 41% de mortalité à 48h pour le lot correspondant à un traitement foliaire de 2 mg de diméthoate. Une activité insecticide est donc libérée dans le bain, 28 jours après le premier traitement des massettes au diméthoate.

Le traitement des plantes de *T. latifolia* au diméthoate à la dose de 2 mg par plante 40 mg / m<sup>2</sup> de surface foliaire) permet d'obtenir au bout d'une semaine la libération de composé insecticide dans le milieu aquatique, à des concentrations s'avérant toxiques pour des larves de moustiques de l'espèce *Ae. aegypti*. Ces résultats suggèrent la libération dans l'eau d'une partie du diméthoate déposé, ou bien d'un de ses métabolites formé dans la plante, qui aurait lui-même des propriétés toxiques. La stratégie insecticide est donc validée avec l'utilisation d'un insecticide organophosphoré, le diméthoate, déposé sur les plantes de massettes selon le protocole développé au cours de cette étude.

#### ***C.4.2.3. Discussion***

##### ➤ Toxicité du diméthoate

Les larves exposées au diméthoate en solution dans l'eau sont capables d'acquérir cette matière active, ce qui renforce la toxicité de l'insecticide. Cette substance de lipophilie intermédiaire peut diffuser du compartiment aqueux au compartiment organique, comme le

suggère l'accumulation progressive dans les tissus des larves mortes. La concentration en diméthoate dans les larves augmente probablement jusqu'à atteindre un équilibre entre les concentrations interne et externe, équilibre non visible lors de notre expérience au bout de 48h. Les larves vivantes acquièrent moins de diméthoate que les mortes lors des premières heures d'exposition, ce qui peut s'expliquer par un processus de métabolisation de l'insecticide suivie de l'excrétion des métabolites.

La CL<sub>50</sub> à 24h que nous avons mesurée sur des larves d'*Ae. aegypti* au 4<sup>ème</sup> stade larvaire (4,2 mg/L) est concordante avec la valeur de 4,6 mg/L décrite sur la même espèce par Schmidt et Weidhaas (1961), également sur des larves au 4<sup>ème</sup> stade de développement exposées à une solution de diméthoate formulé. La toxicité du diméthoate mesurée par Rettich (1979) sur des individus de 4<sup>ème</sup> stade larvaire de *Culex pipiens molestus* est proche, la CL<sub>100</sub> à 72h étant de 500 µg/L. Les larves de *Cq. richiardii* montrent une sensibilité plus faible à cet insecticide que les *Culex* et *Aedes*, d'après nos résultats. Une plus grande tolérance des larves du genre *Coquillettidia* a été relevée également pour l'insecticide *Bti*, la CL<sub>50</sub> de *Cq. richiardii* étant 140 fois plus élevée que celles de *Cx. pipiens* et *Ae. aegypti* (Rey *et al.*, 2001). Sinègre *et al.* (1971) calculent une CL<sub>50</sub> à 48h des larves de *Cq. richiardii* (2<sup>ème</sup> stade larvaire) au fénitrothion de 90 µg/L, et au téméphos de 5 µg/L, soit respectivement 100 et 1800 fois plus faibles que celle que nous calculons pour le diméthoate. Le diméthoate présente donc une toxicité modérée sur les larves de moustiques, comparé à d'autres insecticides de la famille des organophosphorés comme le fénitrothion et le téméphos, qui sont (ou ont été) utilisés en démoustication.

➤ Efficacité de la stratégie insecticide mise au point avec le diméthoate

Les résultats des tests toxicologiques sur larves d'*Ae. aegypti* avec les extraits et exsudats de plantes traitées ont mis en évidence les capacités du diméthoate formulé à pénétrer dans les plantes aquatiques, à transférer dans les tissus conducteurs du phloème et à être libéré par les racines dans le milieu extérieur. La quantité d'insecticide libérée au niveau de la rhizosphère des plantes traitées est faible (0,1 % de la dose déposée), mais suffisante pour observer des effets toxiques sur larves de moustiques aux doses appliquées (41% de mortalité à la dose de 2 mg par plante, soit environ 40 mg/m<sup>2</sup> de surface foliaire).

Les pesticides pénétrant dans les plantes y sont en grande partie métabolisés et les composés libérés par les racines sont souvent des produits de dégradation de la molécule ayant pénétrée (Korte *et al.*, 2000). Le diméthoate est rapidement dégradé dans

l'environnement par les bactéries ainsi que par les plantes (Pappas & Kyriakidis, 2002). Ishiguro et Saito (1971) ont étudié la répartition du diméthoate dans des plantules de riz en début de croissance. Ils ont observé une accumulation rapide et massive de diméthoate dans les parties aériennes des plantes, par lesquelles l'insecticide aurait pénétré en grande partie, puis une métabolisation importante dans les tissus végétaux, notamment au niveau de la jonction entre parties aériennes et racinaires. Par ailleurs, Hacskeylo et Bull (1963) ont démontré que 5 jours après le traitement de plantules de coton au diméthoate radioactif, 11 composés issus de sa dégradation étaient synthétisés. Le produit de dégradation majoritaire de cet insecticide est l'ométhoate (oxydation du diméthoate), un métabolite présentant également un potentiel insecticide (Merck Index, 1996). L'ométhoate est beaucoup plus toxique que le diméthoate pour les organismes aquatiques comme la daphnie *Daphnia magna* (40 fois), pour laquelle les CL<sub>25</sub> des substances actives étant de 3,8 et 145 µg/L respectivement (Canton *et al.*, 1980). Ces études confirment les propriétés systémiques du diméthoate et révèlent la forte métabolisation du xénobiotique dans les plantes. Elles montrent également une faible allocation de l'insecticide vers les racines depuis une application foliaire, observation qui concorde avec les faibles proportions de radioactivité retrouvées dans les racines et dans les exsudats des plantes de *T. latifolia* traitées.

Il est probable qu'une part importante du diméthoate ayant pénétré dans les feuilles de massettes traitées ait été métabolisée, notamment en ométhoate plus toxique, qui pourrait être en partie responsable de la mortalité observée des larves de moustiques. En effet, même si la concentration en radioactivité retrouvée dans le bain de plantes traitées (44 µg/L à 28 jours) est 58 fois plus faible que la CL<sub>50</sub> du diméthoate (2,6 mg/L), près de 50% des larves sont mortes après 48h d'exposition. L'utilisation de techniques analytiques comme la chromatographie sur couche mince (CCM) nous permettrait de séparer les différents composés radiomarqués présents dans les exsudats racinaires de plantes traitées et de mettre en évidence cette métabolisation par la plante. Des appareils d'analyse quantitative par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplées à un spectromètre de masse, permettraient d'identifier ces produits de dégradations et de connaître la proportion du potentiel toxique (diméthoate + ométhoate) perdu par dégradation dans la plante.

A ce stade, les expériences réalisées ont montré une efficacité larvicide de la technique employée avec le diméthoate sur des larves de moustiques exposées pendant plusieurs heures aux exsudats de racines. La prochaine étape consiste à déterminer si une exposition brève de

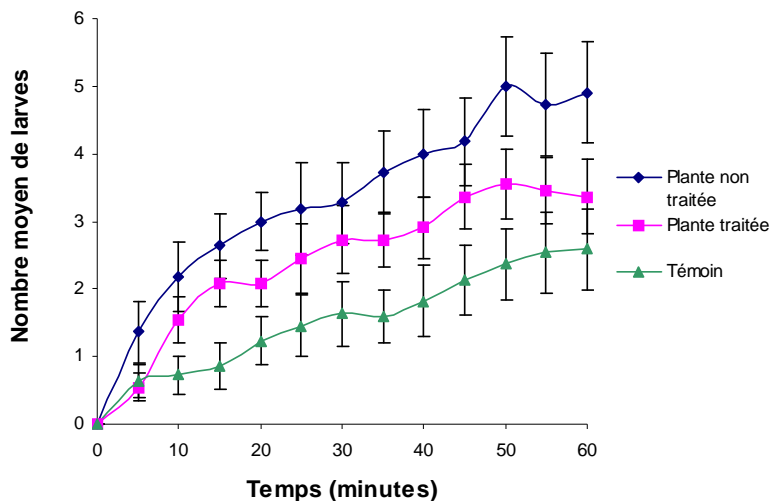
larves de *Coquillettidia* aux exsudats de plantes traitées au diméthoate peut modifier leur comportement, notamment le comportement de fixation aux racines. La fixation des larves a une valeur de survie pour elles, c'est pourquoi la modification de ce comportement en présence d'exsudats toxiques serait une découverte très intéressante à développer dans une optique de contrôle de ces moustiques.

#### **C.4.3. Influence du traitement des plantes au diméthoate sur la fixation de larves de *Coquillettidia***

Des tests ont été réalisés afin d'évaluer si le traitement de leur plante-hôte au diméthoate influence les comportements d'orientation et de fixation des larves de *Coquillettidia*. Les tests d'orientation ont été réalisés selon le protocole défini au chapitre précédent (B). Au cours de ces essais, le comportement de fixation des larves a également été suivi, en relevant le nombre de larves fixées aux racines des plantes, toutes les 5 minutes pendant une heure. Pour ces tests, des plantules de maïs traitées au diméthoate ont subi plusieurs applications répétées d'une solution de diméthoate à 2 g/L selon le protocole de traitement mis au point et validé dans cette étude. La dose reçue par chaque plante était de 1mg, dose suffisante pour observer une toxicité des exsudats de racines, d'après le résultat des expériences précédentes.

##### ***C.4.3.1. Influence du traitement des plantes sur l'orientation des larves de *Coquillettidia****

Les larves de *Coquillettidia* orientent leur nage préférentiellement dans la direction des plantes de maïs témoin, plutôt que vers les couloirs vides (figure 68 ; ANOVA,  $F = 6,992$  ; 23 ddl ;  $p < 0,0001$ ). Elles sont significativement plus nombreuses à se diriger vers la plante témoin que vers la plante traitée au diméthoate (ANOVA,  $F_{1,23} = 4,239$  ;  $p < 0,0001$ ). Le traitement d'une plante au diméthoate (1mg) a donc pour effet de limiter son attractivité pour les larves. Néanmoins, le traitement n'a pas d'effet répulsif sur les larves, le couloir de la plante traitée étant plus visité que les couloirs vides (ANOVA,  $F_{1,23} = 5,559$  ;  $p < 0,0001$ ).

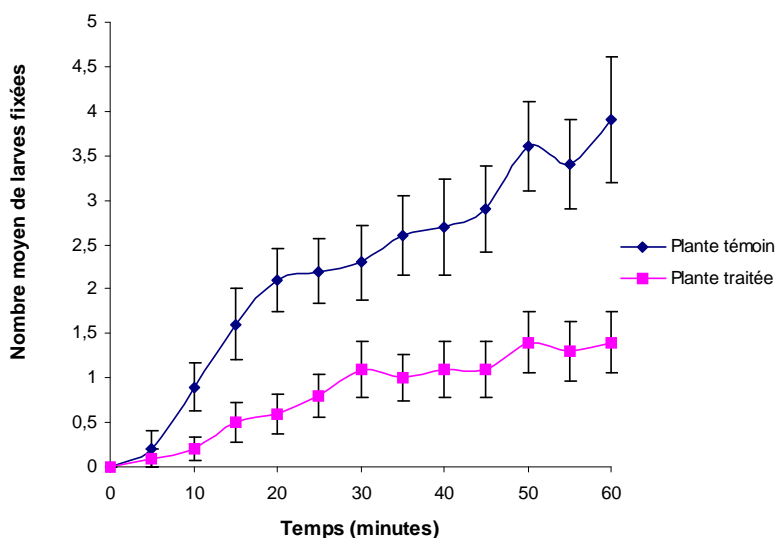


**Figure 68 :** Nombre de larves attirées par des plantes traitée et non traitée, ou par le témoin, en fonction du temps (N = 11).

#### C.4.3.2. Influence du traitement des plantes sur la fixation des larves de *Coquilletidia*

Le nombre de larves fixées aux racines des plantules témoins est significativement plus grand et augmente avec le temps (ANOVA,  $F_{1,23} = 8,884$  ;  $p < 0,0001$  ; figure 69).

Le nombre de larves fixées aux racines des plantes traitées est de 85% plus faible à la fin des essais. La fixation des larves aux racines est donc perturbée dans le cas de plantes traitées avec du diméthoate.



**Figure 69 :** Nombre de larves fixées sur plantes témoin et traitée, en fonction du temps (N=10).

#### C.4.3.3. Discussion

Ces résultats montrent un effet à court terme de la stratégie larvicide sur le comportement des larves. Elles s'orientent davantage vers des plantes saines et les choisissent préférentiellement comme support de fixation, même si les plantes traitées n'apparaissent pas répulsives. Il serait intéressant de reproduire les essais de fixation sur des pas de temps plus importants, en ne proposant qu'un seul item (plante témoin ou plante traitée) aux larves, afin de voir si la perturbation observée du comportement de fixation persiste. Dans l'hypothèse où les larves seraient peu nombreuses à se fixer à des plantes traitées au diméthoate, l'effet du traitement serait renforcé, car des larves non fixées survivent rarement plus de 4 jours (mesuré au laboratoire). La stratégie larvicide mise au point s'avère donc efficace en laboratoire, limitant le comportement de fixation des larves à court terme et pouvant affecter leur survie à plus long terme.

De nouvelles expériences en laboratoire sont requises pour valider l'effet larvicide de cette stratégie sur *Coquillettidia*. Les larves de *Cq. richiardii* sont moins sensibles au diméthoate que les larves d'*Ae. aegypti*, comme nos résultats le montrent. Il est donc possible que l'application d'une dose de 2 mg sur des plantes de *T. latifolia* ne suffise pas à entraîner de la mortalité sur des larves de *Coquillettidia* exposées à leurs exsudats. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée au cours de ce travail, mais l'hypothèse inverse, d'une stratégie larvicide plus efficace contre *Coquillettidia* qu'*Aedes*, est également probable. En effet, dans les gîtes larvaires, les larves de moustiques des genres *Anopheles*, *Culex* et *Aedes* évoluent librement dans la colonne d'eau et sont rarement en contact prolongé avec les composés exsudés par les racines, comme c'est le cas dans nos dispositifs expérimentaux. Par contre, les larves de *Coquillettidia* vivent au niveau des racines et sont donc continuellement exposées à leurs exsudats. Elles sont donc plus vulnérables aux composés toxiques éventuellement émis par les racines des plantes. De plus, la fixation préférentielle de ces larves aux racines tendres en croissance (Sérandour, 2006), occasionne des lésions par perforation dans des tissus végétaux approvisionnés en sève élaborée *via* le phloème. Par conséquent, il est probable que ces lésions augmentent le phénomène d'exsudation au contact des larves, ce qui les rendrait davantage vulnérables en cas de présence dans le phloème de composés toxiques. De nouvelles expériences utilisant ce protocole sont nécessaires, afin d'évaluer l'efficacité du procédé sur les larves de *Coquillettidia*, dans des conditions naturelles ou semi-naturelles.



#### C.4.4. Perspectives d'utilisation de la stratégie insecticide pour le contrôle de *Coquillettidia*

De nouvelles étapes de développement de la stratégie larvicide sont nécessaires afin de renforcer son efficacité, comme le test de différentes doses et de nouvelles formulations de diméthoate. La formulation commerciale utilisée dans cette étude (Tech'noate) est conçue pour faciliter la pénétration et le transfert de la substance active dans la plante, car elle a pour cible principale des suceurs de sève, les pucerons. La concentration maximale (2 g/L) utilisée à chaque traitement des massettes dans nos expériences n'a pas eu d'effet phytotoxique visible. Il est donc envisageable de tester l'effet de concentrations de dépôt supérieures sur les plantes aquatiques. Comme les plantes aquatiques présentes dans les gîtes larvaires à *Coquillettidia* sont de grande stature, le volume d'insecticide applicable sur les végétaux *in natura* est également plus important que dans nos conditions de laboratoire. L'efficacité de la stratégie larvicide peut donc être améliorée dans les conditions naturelles, en augmentant la quantité d'insecticide déposée par plante.

Des tests sont également nécessaires pour optimiser le mode d'application de l'insecticide sur les plantes, les dates d'intervention et la fréquence des traitements. Le dépôt de l'insecticide en micro-gouttes sur la surface des feuilles est plus difficile à réaliser en conditions naturelles qu'en laboratoire. Un épandage par pulvérisation depuis des engins terrestres amphibies constitue probablement le mode d'application à privilégier pour les gîtes larvaires étendus, où la végétation arborescente est dense. La pulvérisation aérienne est envisageable dans le cas de gîtes larvaires ouverts sur une grande surface, comme les grandes roselières du littoral méditerranéen. La plupart des gîtes en région Rhône-Alpes sont peu étendus et présentent une couverture arborescente dense, qui ne permet pas d'intervention aérienne. La pulvérisation d'insecticide depuis un atomiseur porté par un agent de démontication est dans ce cas la méthode de traitement la plus efficace.

Dans tous les cas, l'intervention doit tenir compte de la phénologie des plantes aquatiques et privilégier les périodes où les parties souterraines sont en croissance (au printemps par exemple, observation personnelle), pour optimiser la quantité d'insecticide libérée dans la rhizosphère. En effet, lors des phases de poussée racinaire la plante alloue davantage de matière (sucres, acides aminés...) aux racines, à travers la circulation phloémienne. Le traitement doit être effectué à la tombée de la nuit pour limiter l'évaporation

et la cristallisation de l'insecticide, et favoriser sa pénétration dans la feuille lors des premières heures (Tissut *et al.*, 2006).

Enfin, l'application de l'insecticide peut être réalisée par traitements successifs afin d'utiliser des concentrations d'insecticide faibles et moins toxiques pour l'environnement à chaque opération. Des essais sont donc à envisager pour déterminer le nombre de traitements optimal et leur fréquence.

Dans cette étude, réalisée en laboratoire, le diméthoate s'est avéré être un candidat idéal pour l'utilisation de la stratégie de contrôle de *Coquillettidia*. Cependant, le diméthoate est un insecticide à large spectre d'action, et certains de ses produits de dégradation (ométhoate notamment) sont très toxiques pour la faune aquatique. Cet insecticide, de lipophilie intermédiaire, est soluble dans l'eau et s'accumule dans les tissus animaux, ce qui renforce sa toxicité. Des essais utilisant d'autres xénobiotiques systémiques sont donc à envisager, en ciblant notamment des substances actives à spectre d'action réduit, ou à toxicité modérée pour la faune aquatique non cible.

L'utilisation d'insecticides naturels et facilement biodégradables comme les formulations commerciales à base d'azadirachtin, un tétranortriterpénoïde isolé des graines de margousier (neem), représente un champ d'investigation intéressant<sup>8</sup>. L'azadirachtine possède des propriétés systémiques comparables au diméthoate (Gill et Lewis, 1971), ce qui représente une des conditions essentielles de son utilisation dans la stratégie de contrôle des populations larvaires de *Coquillettidia*. Il est d'ailleurs utilisé avec succès en sylviculture dans le contrôle des lépidoptères défoliateurs de conifères. Des études ont montré que cet insecticide, injecté dans le tronc des arbres à hauteur d'homme, pouvait réduire de 95% les populations de défoliateurs situés à la cime des conifères (Wanner *et al.*, 1997 ; Helson *et al.*, 2001). Les extraits naturels du neem sont toxiques pour un grand nombre d'insectes, agissant comme des régulateurs de croissance (Ruscoe, 1972). La toxicité de la formulation commerciale Neemarin a été démontrée pour les larves de moustiques *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) et *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), pour lesquelles les CL<sub>50</sub> sont de 0,35 et 0,69 mg/L respectivement (Vatandoost et Vaziri, 2004). Les extraits de neem sont donc de bons candidats pour l'utilisation de la stratégie larvicide, mais leur toxicité sur la faune aquatique non cible est à évaluer avec soin. En effet, des études ont montré la toxicité de l'insecticide pour des populations de daphnie (*D. pulex*) et de têtards de l'espèce *Bufo*

---

<sup>8</sup> Substance actuellement non autorisée en France (<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/>)

*marinus* (Linnaeus, 1758), à des concentrations proches de 0,5 mg/L (Stark, 2001 ; Punzo & Parker, 2005).

## Conclusion générale

**L'intégration d'aspects historiques et sociologiques à la problématique du contrôle des moustiques a permis de formuler des propositions en matière de gestion.**

- **La compréhension des modalités de transmission de maladies vectorielles dans le passé est nécessaire pour une prévention efficace du risque sanitaire.**

Dans un contexte de changement global, il est important d'étudier des facteurs pouvant favoriser l'établissement et la prolifération des populations de moustiques à risque, et la transmission de pathogènes aux populations humaines. A travers une étude historique basée sur le recoupement d'informations démographiques, climatiques, sanitaires et liées à l'aménagement du territoire, nous avons étudié les conditions de la transmission du paludisme dans la population savoyarde de la vallée de l'Isère, au 19<sup>ème</sup> siècle. Nous avons mis en évidence un lien étroit entre les recrudescences successives de décès liés au paludisme et l'évolution des aménagements liés aux cours d'eau de la vallée, de 1830 à 1900. Nous replaçons les résultats de cette étude dans le contexte actuel en faisant le lien avec la multiplication des projets d'aménagement des zones humides et des fleuves. Le message de cette étude est qu'il faut intégrer à ces projets d'aménagement une réflexion sur les risques de création de conditions favorables pour des populations de moustiques potentiellement dangereuses.

- **L'évaluation de la nuisance perçue dans la population est nécessaire pour adapter l'effort de démoustication : les bases d'un observatoire de la nuisance.**

Aujourd'hui, le contrôle des moustiques est moins lié aux enjeux sanitaires qu'aux nuisances générées par les insectes piqueurs. Les Ententes Interdépartementales pour la Démoustication ont pour mission d'empêcher la prolifération des espèces piquant l'homme, afin d'assurer son confort, tout en limitant l'impact des traitements sur l'environnement.

La deuxième étude de ce travail, basée sur la réalisation d'enquêtes sociologiques, a mis en évidence une variété des perceptions et représentations liées au moustique au sein de la population de Rhône-alpes, et par conséquent des attentes différentes vis à vis de la

démoustication. Nous avons montré que des catégories de personnes à vision anthropocentrique et à vision biocentrique du rapport aux moustiques cohabitent au sein de la population. Cette analyse d'un découpage des perceptions de la nuisance dans la population trouve une application pour les EID, qui peuvent évaluer pour chaque catégorie de personnes le seuil de nuisance au-dessus duquel une intervention est nécessaire. Cette étude a montré l'intérêt des enquêtes sociologiques pour le suivi de la nuisance liée aux moustiques sur un territoire. Ainsi, un guide méthodologique pour la mise en place d'un observatoire de la nuisance a été conçu, basé sur le suivi des populations de moustiques sur le terrain et sur une évaluation régulière de la nuisance perçue sur le même territoire. Fort des expériences apportées par la sociologie et la biologie, nous proposons un nouvel outil de gestion, au service d'un contrôle raisonné des populations de moustiques anthropophiles.

Un observatoire de la nuisance est un outil offrant d'intéressantes perspectives en démoustication, mais il n'est applicable que pour le contrôle de populations dont la localisation est connue et contre lesquelles les traitements sont efficaces. Ainsi, les moustiques du genre *Coquillettidia* génèrent une nuisance, mais leur contrôle est inefficace, car les populations larvaires vivent en profondeur, et sont par conséquent difficiles à localiser et à atteindre par les méthodes de traitement habituelles.

### **Notre exploration de l'écologie et de la biologie larvaire des moustiques du genre *Coquillettidia* a abouti à des perspectives de gestion concrètes.**

- **L'investigation écologique des gîtes larvaires a permis de dégager une liste d'indices utilisable pour localiser les populations dans une optique de contrôle.**

L'étude de terrain réalisée sur un échantillon de 20 zones humides rhône-alpines a permis d'identifier les relations entre les populations de *Coquillettidia* et leur habitat. Nous démontrons que les actions humaines sur la zone humide, les cortèges d'espèces composant la végétation aquatique, les propriétés physiques du milieu aquatique, la qualité chimique de l'eau et notamment la présence de certaines substances allélochimiques, sont des critères importants qui influencent la colonisation par *Coquillettidia*. Cette liste d'indices reflète la diversité des gîtes potentiellement colonisables par ces moustiques en Rhône-Alpes, et devrait

permettre de faciliter leur localisation, leur échantillonnage et leur contrôle à l'avenir. L'application de ces résultats au contrôle d'espèces de *Coquillettidia* d'autres régions ou pays est contrainte par la diversité des gîtes potentiellement colonisés, très dépendante des conditions climatiques et géomorphologiques. Des études similaires sont donc nécessaires dans ces localités pour étendre nos connaissances sur l'écologie de ces moustiques.

➤ **La fixation des larves aux racines des plantes est dépendante de médiateurs chimiques d'origine végétale et influencée par les conditions environnementales.**

L'étude en laboratoire du comportement des larves a mis en évidence l'influence de paramètres environnementaux abiotiques (intensité lumineuse, teneur en oxygène de l'eau) et biotiques (nature et morphologie du support de fixation) sur la fixation aux racines de plantes. Les tests comportementaux et analyses chimiques ont apporté la preuve que les larves étaient sensibles à une grande variété de plantes, dont les exsudats contiennent un signal chimique attractif composé d'au moins 5 molécules. Ces substances allélochimiques ont été associées pour créer un message chimique mimant celui qui est libéré par les plantes. Ce cocktail de molécules s'est révélé très attractif pour les larves, ce qui valide la fonction de médiateur chimique du glycérol, de l'uracile, de la thymine, de l'uridine et de la thymidine.

Nous pouvons établir les différentes étapes d'une séquence comportementale dont la fixation larvaire est l'aboutissement : 1) la reconnaissance de substances allélochimiques d'origine végétale par des chimiorécepteurs ; 2) la nage orientée par chimiotaxie vers les racines des plantes ; 3) la sélection d'une zone propice de fixation sur les racines, mettant en jeu des mécanorécepteurs ; 4) la perforation des racines et l'ancrage du siphon respiratoire au niveau de tissus racinaires où circule l'oxygène, les aérénchymes.

La découverte des mécanismes gouvernant ce comportement de fixation, dont la survie des larves dépend, peut conduire vers d'intéressantes perspectives en matière de contrôle des populations larvaires de *Coquillettidia*.

➤ **Mise au point et validation d'une stratégie larvicide contre *Coquillettidia*, utilisant les plantes comme vecteurs de substances insecticides.**

Nous avons déterminé les conditions dans lesquelles un insecticide systémique, le diméthoate, peut pénétrer dans une plante aquatique et transférer jusqu'aux parties souterraines à partir d'un traitement foliaire. Nous avons démontré que les racines libéraient alors un pouvoir insecticide dans l'environnement aquatique, auxquelles des larves de moustiques sont sensibles. A court terme, la fixation des larves de *Coquillettidia* à des plantes traitées est perturbée, et la mortalité est observée après une exposition prolongée. La stratégie larvicide mise au point offre donc des perspectives très prometteuses dans l'optique d'un contrôle des populations de *Coquillettidia*. De nouvelles recherches employant des substances insecticides à spectre d'action plus réduit, ainsi que des tests d'application en conditions naturelles sont un préalable indispensable à l'utilisation de cette stratégie larvicide.

A travers cette étude des moustiques *Coquillettidia*, nous avons apporté des éléments de réponse et des solutions aux questions initiales. A la difficulté rencontrée par les agents de démoustication pour localiser les populations larvaires, nous proposons une liste d'indicateurs écologiques caractéristiques de gîtes larvaires potentiels. Nous apportons les éléments nécessaires à la compréhension du comportement de fixation des larves aux racines des plantes aquatiques, particularité écologique responsable de l'inefficacité des traitements. Enfin, nous proposons une nouvelle stratégie de contrôle des larves, efficace et spécialement adaptée à leur écologie.

## Bibliographie

- Abbott W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economical Entomology*, **18**: 265-267.
- Aeschimann D. & Burdet H.M. 1994. Flore de la Suisse et des territoires limitrophes, le nouveau Binz, Deuxième édition. Edition du Griffon, Neuchâtel. 603p.
- Ain G., Gilot B. and Pautou G. 1973. Etude écologique des anciens lits du Rhône entre le confluent du Guiers et le confluent de l'Ain. Lab. Biol. Vég. USM Grenoble.
- Armengaud A., Legros F., Quatresous I., Barre H., Valayer P., Fanton Y., D'Ortenzio E. and Schaffner F. 2006. A case of autochthonous *Plasmodium vivax* malaria, Corsica, August 2006. *Eurosurveillance*, **11** (11).
- Armstrong R.L. 1941. *Mansonia perturbans* (walk.) on Cape Cod. *Proc. 28 th ann. Meet. New Jersey Mosq. Exterm. Ass.*, **28** : 184-188.
- Batzer D. P. & Sjogren R. D. 1986a. Larval habitat characteristics of *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae). *Can. Entomol.* **118**(11): 1193-1198.
- Batzer D.P. & Sjogren R.D. 1986b. Potential effect of Altosid <sup>TM</sup> (methoprene) briquet treatments on *Eubbranchipusbundyi* (Anostraca: Chirocephalidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **2**(2): 226-227.
- Baudoin E., Benizri E. and Guckert A. 2003. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **35** : 1183-1192.
- Baur P. & Schönherr J. 1995. Temperature dependance of the diffusion of organic compounds across plant cuticles. *Chemosphere*, **30** (7) : 1331-1340.
- Becker N. & Margalit J. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice (Edited by P.F. Entwistle, J.S. Cory, M.J. Bailey and S. Higgs). Wiley, New York. pp. 147-170.
- Ben Cheikh H. & Pasteur N. 1993. Resistance to temephos, an organophosphorus insecticide, in *Culex pipiens* from Tunisia, North Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **9** : 335-337.
- Beniston M. 2003. Climatic change in mountain regions: a review of possible impacts. *Climatic Change*, **59**: 5-31.
- Bernays E.A. & Chapman R.F. 1994. Host plant selection by phytophagous insects. Chapman & Hall, New York.
- Bertaux E. 1900. La malaria en Italie. *La Revue des Deux Mondes*, **160** (4<sup>ème</sup> période, 15 août 1900) : 853-873.
- Besnard G. & Gruffaz R. 1999. Préservation de l'environnement et lutte contre des espèces vulnérantes pour l'homme. Inventaire et cartographie des invertébrés comme contribution à la gestion des milieux naturels français. Actes du séminaire tenu à Besançon les 8, 9 et 10 juillet 1999. *Publications scientifiques du Museum National d'Histoire Naturelle*, 171-173.
- Boisvert M. & Boisvert J. 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on target and nontarget organisms: a review of laboratory and field experiments. *Biocontrol Science and Technology*, **10** : 517-561.
- Bosak P. J. & Crans W. J. 2002. The structure and function of the larval siphon and spiracular apparatus of *Coquillettidia perturbans*. *J. Am. Mosq. Control. Assos.*, **18** : 280-283.



- Boudin, J. C. M. 1857. Traité de géographie et de statistique médicales et des maladies endémiques comprenant la météorologie et la géologie médicales, les lois statistiques de la population et de la mortalité, la distribution géographique des maladies et la pathologie comparée des races humaines. Paris, J.-B. Baillière et fils.
- Braks M.A., Leal W.S. and Cardé R.T. 2007. Oviposition responses of gravid female *Culex quinquefasciatus* to egg rafts and low doses of oviposition pheromone under semifield conditions. *J. Chem. Ecol.*, 33(3): 567-78.**
- Braun-Blanquet J. 1936. La chênaie d'Yeuse méditerranéenne. *Mémoire Soc. Bot. Nîmes*, 5: 147 p.
- Bruce T.J.A., Wadhams L.J. & Woodcock C.M. 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends in Plant Science*, 10: 260-274.
- Bruce Chwatt L. J. & De Zulueta J. 1980. The rise and fall of malaria in Europe. 340p.
- Burton G. J. 1965. Method of attachment of pupae of *Mansonia annulifera* (Theobald) and *Mansonia uniformis* (Theobald) to *Pistia statiotes*. *Bull. Entomol. Res.*, 55 : 691-696.
- Callahan J. L. & Morris C. D. 1987. Habitat characteristics of *Coquillettidia perturbans* in central Florida. *Journal of American Mosquito Control Association*, 3: 176-180.
- Campbell N.A. (1995). Biologie. Eds De Boeck-Wesmael - 1190 pages, ISBN : 2804120848.
- Canton J.H., Wegman R.C.C., Van Oers A., Tammer A.H.M., Mathijssen-Spiekman E.A.M. and Van den Broek. H.H. 1980. Environmental Toxicological Research with Dimethoate and Omethoate. Rep.No.121/80, Natl.Inst.Public Health Environ.Hyg.:6 p.(DUT).
- Casty C., Wanner H., Luterbacher J., Esper J. and Böhm R. 2005. Temperature and precipitation variability in the European Alps since 1500. *International Journal of Climatology*, 25: 1855-1880.
- Chapman H.C. 1955. Tests with granulated and systemic insecticides against *Mansonia* larvae. *Mosq. News*, 15(4): 204-206.
- Chapman R.F. 2003. Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 48: 455-484.
- Charmot G. 1997. Histoire du développement des antipaludiques. *la Revue du Praticien*, 47: 244-248.
- Chen Z., Jin X., Wang Q., Lin Y., Gan L., Tang C. 2007. Confirmation and determination of carboxylic acids in root exudates using LC-ESI-MS. *J. Sep. Sci.*, In Press.
- Chiron A. 1846. Atterrissements artificiels dans la vallée de l'Isère, cause des fièvres endémiques et périodiques de cette vallée et moyens de les prévenir. Chirio et Mina, impr. ed. (Turin), 24p., 1 carte depl. hors-texte.
- Claeys-Mekdade C. & Morales A. 2002. Moustiques et démoustication. Une enquête sociologique auprès des Arlésiens et des Camarguais, Contrat PNRC / IMEP – DESMID, Rapport final, responsable scientifique : Picon B.
- Claeys-Mekdade C. & Nicolas L. 2002. Etre ou ne pas être démoustiqué, enquêtes ethnologique et sociologique comparatives : Camargue et Petite Camargue , Contrat DESMID-EID , programme européen Life-environnement N°life 99 env/F/000489, Rapport d'enquête, responsable scientifique : B. Picon, 104 p.

- Clements A. N. 1999. The Biology of Mosquitoes, Vol. 2 : Sensory Reception and Behaviour. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Colas-Belcourt J. 1943. L'œuf et la ponte de *Taeniorhynchus (Coquillettidia) richiardii* (Ficalbi). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **36** (3/4) 101-105.
- Cousserans J., Gabinaud A., Guille G., Rouzaud C. and Sinègre G. 1973. A propos d'une méthode de lutte anti-larvaire contre le genre *Coquillettidia*. *Cahiers O.R.S.T.O.M. ser. Ent. Med. et Parasitol.*, **11** (4) : 233-236.
- Cousserans J. & Guille G. 1974. Situation actuelle du problème *Coquillettidia* sur le littoral Languedoc-Roussillon et dans les Bouches du Rhône. Montpellier, Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen, (Doc. EID N°23) 42p. 3 cartes h.t.
- Crans W.J. & Schulze T.L. 1986. Evidence incriminating *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae) as an epizootic vector of eastern equine encephalitis. I. Isolation of EEE virus from *C. perturbans* during an epizootic among horses in New Jersey. *Bulletin of the Society for Vector Ecology*, **11**: 178-184.
- Cronshaw J., 1981. Phloem structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32** : 465-484.
- Cuda J.P. 1995. Evaluation of *Lagenidium giganteum* for biocontrol of Florida *Mansonia* mosquitoes. FIPR publication N° 05-037-113.
- Daskova N.G. & Rasnitsyn S.P. 1982. [Review of data on susceptibility of mosquitos in the USSR to imported strains of malaria parasites](#). *Bull World Health Organ*, **60**: 893-7.
- Dausse M.F.B. 1872. Etudes relatives aux inondations et à l'endiguement des rivières. *Mémoires présentés par divers savants à l'Académie des Sciences de l'Institut de France* (Gauthier-Villars, Paris), **20** (1) : 287-509.
- Decho A.W., Browne K.A. and Zimmerfaust R.K. 1998. Chemical cues: Why basic peptides are signal molecules in marine environments. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1410-1417.
- Denis M.-H. & Delrot S. 1993. Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiologia Plantarum*, **87** (4): 569-575.
- Demonferrand F. 1835. Essai sur les lois de la mortalité et de la population en France. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences, Paris*, **1**: 157.
- Deruaz D. 1988. Les Anophèles du "complexe *maculipennis*" (Diptera: Culicidae) dans la région lyonnaise: Identification des espèces jumelles par chétotaxie larvaire et électrophorèses des isoenzymes de l'adulte. Thèse d'université extrait.
- Dilkes N. B., James D. L. and Farrar J. 2004. Temporal dynamics of carbon partitioning and rhizodeposition in wheat. *Plant Physiol.* **134**: 706-715.
- Dobson M. J. 1980. Marsh Fever - The geography of malaria in England. *Journal of History and Geography*, **6**: 357-389.
- Dobson M. J. 1994. Malaria in England: a geographical and historical perspective. *Parassitologia*, **36**: 35-60.
- Domnas A.J., Fagan S. M., Jaronski S. 1982. Factors Influencing Zoospore Production in Liquid Cultures of *Lagenidium giganteum* (Oomycetes, Lagenidiales). *Mycologia*, **74**(5): 820-825.
- Durst F. 1991. Métabolisation des herbicides. In *Les herbicides*, R. Scalla, INRA Ed., Paris, pp 193-236.
- Eastmond P.J. 2004. Glycerol-insensitive *Arabidopsis* mutants : Gl11 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *Plant J.*, **37**: 617-625.

- EID du littoral méditerranéen. 1966. Extension de *Mansonia richiardii* dans le département du Gard. Montpellier, Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen, (Doc. EID n°1) 7 p.
- Epstein P.R., Diaz H.F., Elias S., Grabherr G., Graham N.E., Martens W.J.M., Mosley-Thompson E. and Susskind J. 1998. Biological and Physical Signs of Climate Change: Focus on Mosquito-borne Diseases. *Bulletin of the American Meteorological Society*, **79**(3): 409-417.
- Everard J.D., Kann S.C. and Loescher W.H. 1992. Investigations into the salt tolerance of the mannitol producer celery (abstract no. 166). *Plant Physiol.*, **99**: S-28.
- FAO. 1985. Pesticides residues in food. Evaluations 1984. Data and recommendations of the joint meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues, Rome, 24 September - 3 October 1984.
- Fischer S.E., Miguel M.J. and Mori G.B. 2003. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiology Letters*, **219**: 53-62.
- Foo A.E.S. & Yap H.H. 1983. Field trials on the use of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against *Mansonia* mosquitoes in Malaysia. *Mosquito News*, **43**(3): 306-310.
- Foote B.A. 1995. Biology of shore flies. *Annual Review of Entomology*, **40**: 417-442.
- Franke W. 1967. Mechanisms of foliar penetration of solutions. *Annual Review of Plant Physiology*, **18** : 281-300.
- Gabinaud A. & Sinègre G. 1968. Présence de *Mansonia (Coquillettidia) buxtoni* (Edwards, 1923) sur le littoral méditerranéen. Montpellier, Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral méditerranéen, (Doc. EID n°10 bis) 5 p.
- Galliard H. 1934. Notes sur la biologie et l'anatomie de la larve de *Taeniorhynchus richiardii* Ficalbi. *Ibid.*, **12** :465-471.
- Ganesan K., Mendki M., Suryanarayana M.V.S., Prakash S. and Malhotra R.C. 2006. Studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) ovipositional responses to newly identified semiochemicals from conspecific eggs. *Australian Journal of entomology*, **45**(1) : 75-80.
- Gauvrit C. & Gaillardon P. 1991. Effect of low temperatures on 2,4-D behaviour in maize plants. *Weed Research*, **31** (3) : 135-142.
- Gerber D.W., Byerrum R.U., Gee R.W. and Tolbert N.E. 1988. Glycerol concentration in crop plants. *Plant Science*, **56**: 31-38.
- Gex F. 1940. Le diguement de l'Isère dans la Combe de Savoie. *Revue de Géographie Alpine*, (Grenoble), **48**: 1-71.
- Gill J.S. & Lewis T. (1971). Systemic action of an insect feeding deterrent. *Nature*, **232**: 402-403.
- Gillett J. D. 1971. Mosquitos. Weindenfeld and Nicholson, London.
- Gilot B. 1968. Introduction à l'écologie des Culicinae de la région grenobloise. Etude de « chorologie verticale ». Thèse de Médecine, Grenoble, 243 p.
- Gilot B., Aïn G., Pautou G. and Gruffaz R. 1976. Les Culicides de la Région Rhône-Alpes: Bilan de dix années d'observation. *Bulletin de la Société Entomologique de France*, **81**: 235-245.

- Gilot B., Puech M. and Girel J. 1983. Les Culicides exophiles et mammophiles dans le nord de l'Isère: essai de cartographie à visée épidémiologique, à grande échelle, en période estivale. *Bulletin d'Ecologie*, **14**(3): 179-192.
- Girel J. & Pautou G. 1997. The influence of sedimentation on vegetation structure. In: *Buffer zones: their processes and potential in water protection* (N. Haycock, T. Burt, K.W.T. Goulding & G. Pinay eds), Quest Environmental & Environment Agency (Harpenden), White Crescent Press (Luton), 93-112.
- Girel J., Garguet-Duport B. and Pautou G. 1997. Present structure and construction processes of landscapes in Alpine floodplains. A case study: the Arc-Isère confluence (Savoie, France). *Environmental Management*, **21**(6), 891-907.
- Girel J., Vautier F. and Peiry J.-L. 2003. Biodiversity and land-use history of the Alpine riparian landscapes (the example of the Isère river, France). In: U. Mander & M. Antrop (eds) *Multifunctional Landscapes, Volume 3: Continuity and Change*, (167-200), WIT-Press, International series on Advances in Ecological Sciences, Southampton.
- Girel J. 2007. River Diking and Reclamation: The Case of an Alpine river. In: Christof Mauch & Thomas Zeller (eds) *Designing and Conceiving Waterways in Europe and North America* (The University of Pittsburgh Press). In Press.
- Godsey M.S., Nasci R., Savage H.M., Aspen S., King R., Powers A.M., Burkhalter K., Colton L., Charnetzky D., Lasater S., Taylor V. and Palmisano C.T. 2005. West-Nile virus-infected mosquitoes, Louisiana, 2002. *Emerging Infectious Diseases*, **11**(9) : 1399-1404.
- Gourvellec G. 2005. Surveillance du paludisme en Corse, 1999-2002.  
[http://www.invs.sante.fr/publications/2005/paludisme\\_corse/index.html](http://www.invs.sante.fr/publications/2005/paludisme_corse/index.html)
- Gouvert A. 1833. Mémoire sur les marais en Savoie considérés sous le rapport de l'hygiène et de l'agriculture. Précis de topographie médicale sur la vallée qui s'étend de Chambéry au Lac du Bourget et particulièrement sur la commune de La Motte Servolex. *Mémoire de la Société Royale Académique de Savoie*, (Chambéry), **6**: 49-169.
- Gozhenko V.A. 1982. Fertility of the female *Mansonia richiardii* (Culicidae) in the area surrounding the Kakhovka reservoir. *Parazitologiya*, **16**(2): 131-135.
- Green C.H., Parker D.J. and Tunstall S.M. 2000. Assessment of Flood Control and Management Options. Thematic Review IV.4 prepared as an input to the World Commission on Dams, Cape Town, [[www.dams.org](http://www.dams.org)].
- Guille G. 1975. Recherches éco-éthologiques sur *Coquillettidia (Coquillettidia) richiardii* (Ficalbi), 1989 (Diptera-Culicidae) du littoral méditerranéen français. I. Techniques d'étude et morphologie. *Annales de sciences naturelles, Zoologie et Biologie animale*, 12<sup>e</sup> Série. **17** (3) : 229-272.
- Guille G. 1976. Recherches éco-éthologiques sur *Coquillettidia (Coquillettidia) richiardii* (Ficalbi), 1989 (Diptera-Culicidae) du littoral méditerranéen français. II. Milieu et comportement. *Annales de sciences naturelles, Zoologie et Biologie animale*, 12<sup>e</sup> Série. **18** (1) : 5-112.
- Guillet P. 1996. Paludisme, lutte antivectorielle et démouscication en Corse. Rapport de mission - 1 au 13 août 1996 - ORSTOM.
- Guillet P. & Nathan M. 1999. *Aedes albopictus*, une menace pour la France? *Médecine Tropicale*, **59**: 49-52.

- Haag K.H. & Buckingham G.R. 1991. Effects of Herbicides and Microbial Insecticides on the Insects of Aquatic Plants. *Journal of Aquatic Plant Management JAPMDB*, **29**: 55-57.
- Hacskeylo, J. & Bull, D. L. (1963) Metabolism of dimethoate in cotton leaves. *J. Agr. Food Chem.*, **11**: 464-466.
- Harmon M.A., Boehm M.F., Heyman R.A. and Mangelsdorf D.J. 2007. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **92**(13): 6157-60.
- Harrison R. J. & Cousineau G. 1973. Les moustiques au Québec, leur importance médicale, vétérinaire, économique, et la nécessité d'un programme de démoustication. *Proceedings of the International Seminar on Mosquito Control*. University of Quebec at Trois-Rivières, Quebec, Canada pp 5-20.
- Healy T.P. & Copland M.J.W. 2000. Human sweat and 2-oxopentanoic acid elicit a landing response from *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.*, **14**:195-200.
- Helson B.V., Lyons D.B. and Wanner K.W. 2001. Control of conifer defoliators with neem-based systemic bioinsecticides using a novel injection device. *The Canadian Entomologist*, **133**: 729-744.
- Hemingway J., Hawkes N.J., McCarroll L. and Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**: 653-666.
- Henrick C.A. (2007). Methoprene. *J. Am. Control Assoc.*, **23** (2 suppl.): 225-239.
- Higgs S., Snow K.R. and Gould E. 2004. The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **98**: 82-87.
- Houlihan D.F. 1969. The structure and behaviour of *Notiphila riparia* and *Erioptera squalida*, two root-piercing insects. *Journal of Zoology*, London **159**: 249-267.
- Houlihan D.F. 1970. Respiration in low-oxygen partial pressures: the adults of *Donacia simplex* that respire from the roots of aquatic plants. *Journal of Insect Physiology*, **16**: 1607-1622.
- Huang X.J., Dong G.F. and Xue R.D. 1991. Studies on the attractiveness of some compounds of *Aedes albopictus*. *Chin. J. Vec. Biol. Contr.*, **2**:55-58.
- Hubàlek Z. & Halouzka J. 1999. West Nile Fever - a Reemerging Mosquito-Borne Viral Disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases*, **5**(5): 643-650.
- Hudson A. 1956. The behaviour of the female mosquito in selecting water for oviposition. *J. Exp. Biol.*, **33**: 478-492.
- Huldén L., Huldén L. and Heliövaara K. 2005. Endemic malaria: an 'indoor' disease in northern Europe. Historical data analysed. *Malaria Journal*, **4**: 19.
- Huneau V. 2006. Enquête et analyse sociologique d'une zone non démoustiquée du Morbihan : Séné, Theix et St-Armel. Rapport d'enquête, Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral Atlantique, 69 p.
- Hutchinson R.A. & Lindsay S.W. (2006). Malaria and deaths in the English marshes. *Lancet*, **367**: 1947-51.
- Hwang Y.-S., Mulla M.S., Chaney J.D., Lin G.G. and Xu H.J. 1987. Attractancy and species specificity of 6-acetoxy-5-hexadecanolide, a mosquito oviposition attractant pheromone. *J. Chem. Ecol.*, **13**:245-252.
- Hwang Y.S., Schultz G.W., Axelrod H., Kramer W.L. and Mulla, M.S. 1982. Ovipositional repellency of fatty acids and their derivatives against *Culex* and *Aedes* mosquitoes. *Environ. Entomol.*, **11**: 223-226.
- Hwang Y.S., Schultz G.W. and Mulla M.S. 1984. Structure-activity relationship of unsaturated fatty acids as mosquito ovipositional repellents. *J. Chem. Ecol.*, **10**: 145-151.

- Ishiguro T. & Saito T. 1971. The fundamental research to the application of systemic insecticides. Part II. The absorption and translocation of several insecticides in rice plants by solid application. *Botyu-Kagaku*, **36**(1): 17-24.
- Jez D.H. & McIver S.B. 1980. Fine structure of antennal sensilla of larval *Toxorhynchites brevivalpis* Theobald (Diptera: Culicidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, **9**: 147-159.
- Jones D. L., Hodge A. and Kuzyakov Y. 2004. Plant and micorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* **163**: 459-480.
- Justin S.H.F.W. & Armstrong W. 1987. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist*, **106**: 465-495.
- Kalinova J., Vrchtova N. and Triska J. 2007. Exudation of allelopathic substances in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *J. Agric. Food Chem.*, **55**(16): 6453-6459.
- Kamilova F., Kravchenko LV., Shaposhnikov A.I., Azarova T., Makarova N. and Lugtenberg B. 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **19**(3): 250-256.
- Kennedy J.S. 1977. Olfactory responses to distant plants and other odor sources. In *Chemical Control of Insect Behavior : Theory and Application* (eds H.H. Shorey and J.J. McKelvey), John Wiley & Sons, New York, pp. 67-91.
- Kenny E.A. & Ruber E. 1992. Effectiveness of aerially applied Arosurf MSF in the control of the cattail mosquito, *Coquillettidia perturbans*. *Journal of the Mosquito Control Association*, **8**: 361-363.
- Kenny E.A. & Ruber E. 1993. Effects of Arosurf MSF on microcrustacea associated with the cattail mosquito, *Coquillettidia perturbans*. *Journal of the Mosquito Control Association*, **9** (3): 325-327.
- Kidd P.S., Lugany M., Poschenrieder C., Günsé B. and Barcelo J. 2001. The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, **52**(359): 1339-1352.
- Kleier D.A. 1988. Phloem mobility of xenobiotics. I. Mathematical model unifying the weak acid and intermediate permeability theories. *Plant Physiology*, **86**: 803-810.
- Knoche M. 1994. Organosilicone surfactant performance in agricultural spray application : a review. *Weed Res.*, **34** : 221-239.
- Korte F., Kvesitadze D., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Khatisashvili G., Buadze O., Zaalishvili, G. and Coulston F., 2000. Organic toxicants and plants. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **47** : 1-26.
- Krishnamoorthy K., Rajendran G. and Panicker K.N. 1992. Effectiveness of slow release formulations of fenthion (Baytex) in the control of *Mansonia* breeding in polluted pond habitats. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **23**(1): 116-120.
- Krishnamoorthy K., Rajendran G., Sebesan S. and Panicker K.N. 1993. Efficacy of Altosid, a juvenile hormone analogue against the immatures of *Mansonioides* mosquitoes, the vectors of *Brugia malayi*. *Entomon.*, **18**(1 & 2): 31-37.
- Krüger A., Rech A., Su X.Z. and Tannich E. 2001. Two cases of autochthonous *Plasmodium falciparum* malaria in Germany with evidence for local transmission by indigenous *Anopheles plumbeus*. *Tropical Medicine and International Health*, **6**: 983-985.

- Kumar S.R. & Jebanesan A. 2002. Oviposition attractancy of *Solanum aerianthum* D. Don. leaf extract for *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Exp. Zool.*, **5**:221-224.
- Kumar R., Pandey S., Pandey A. 2006. Plant roots and carbon sequestration. *Current Science*, **91**(7): 885-890.
- Kuziakov Y. & Jones D.L. 2006. Glucose uptake by maize roots and its transformation in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, **38** : 851-860.
- Laurence B. R. 1960. The biology of two species of Mosquito, *Mansonia Africana* (Theobald), and *Mansonia uniformis* (Theobald) belonging to the subgenus *Mansoniodes* (Diptera, Culicidae). *Bull. Entomol. Res.*, **51** : 491-517.
- Lehane M. J. 1991. Biology of blood-sucking insects. Chapman & Hall, London, UK.
- Linley J.R. 1989. Laboratory tests of the effects of p-cresol and 4-methylcyclohexanol on oviposition by three species of *Toxorhynchites* mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.*, **3**:347-352.
- Linoli A. 2005. Twenty-six centuries of reclamation and agricultural improvement on the Pontine marshes. In: Integrated Land and Water Resources Management in History, Schriften der DWhG, Sonderband 2, Siegburg 2005, 27-55.
- Lord J. C. & Fukuda T. 1990. Relative potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* 2362 for *Mansonia titillans* and *Mansonia dyari*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **6**: 325-327.
- Lounibos L.P. & Escher R.L. 1983. Seasonality and sampling of *Coquillettidia perturbans* (Diptera: Culicidae) in South Florida. *Environmental Entomology*, **12**(4): 1087-1093.
- Ludwig A., Bicout D. J., Chalvet-Monfray K. and Sabatier P. 2005. Modélisation de l'agressivité de *Culex modestus*, vecteur potentiel de West Nile en Camargue, en fonction de données météorologiques. *Environnement, Risques & Santé*, **4** (2): 109-113.
- Luen S.C. & Shalaby A.M. 1962. Preliminary note on the development of DDT resistance in *Anopheles culicifacies* Giles, in Panchmahal district. *Bull. World Health Organ.* **26** : 128.
- MacLaren J. P. 1967. Marnatees as a naturalistic biological mosquito control method. *Mosq. News*, **27**(3): 387-393.
- Mailles A., Zeller H., Durand J.P., Zientara S., Goffette R., Gloaguen C., Armengaud A., Schaffner F., Hars J., Chodorge E. and Barbas J. 2003. Human and equine West Nile virus infections in France August-September 2003. *Eurosurveillance*, **7** (3).
- Maire A. 1971. Incidences des opérations de démoustication sur les biotopes larvaires à *Aedes* dans la région Rhône-Alpes. Thèse de doctorat, USM Grenoble, 89 p.
- Marshall J.F. 1938. The British Mosquitoes. Trustees of the British Museum (Natural History), London, UK. 341 p.
- Marchoux, M. E. 1929. Prophylaxie du paludisme. Le paludisme dans les Dombes et en Camargue. *Revue d'Hygiène et de Médecine Préventive*, **51**(10): 67-88.
- Marie-Girod M. 1884. Les aliénés en Savoie. Châtelain (successeur de Puthod), imprimeur-éditeur (Chambéry), 215p.
- Marjolet M. 1977. Les Culicides des zones humides de Loire-Atlantique. Aspects écologiques et nuisances. Thèse d'université. Université de Nantes, UER de Médecine et Techniques Médicales, 1977.

- Marko M., Newman R., Gleason F. 2005. Chemically Mediated Host-Plant Selection by the Milfoil Weevil: A Freshwater Insect-Plant Interaction. *Journal of Chemical Ecology*, **31**(12): 2857-2876.
- Martens W.J.M., Niessen L.W., Rotmans J., Jetten T.H. and McMichael A.J. 1995. Potential Impact of Global Climate Change on Malaria Risk. *Environmental Health Perspectives*, **103**(5): 458-464.
- Masson A. 1883. De la fièvre intermittente dans la vallée de Chambéry. *Mémoires de l'Académie des Sciences, Belles lettres et Arts de Savoie* (Chambéry), 3ème série, **9**: 1-29.
- May B.M. 1970. Aquatic adaptation in the larva of *Desiantha ascita* (Coleoptera : Curculionidae). *New Zealand Entomologist*, **4**(4): 7-11.
- McIver S.B. & Siemicki R. 1982. Fine structure of maxillary sensilla of larval *Toxorhynchites brevivalpis* Theobald (Diptera: Culicidae) with comments on the role of sensilla in behavior. *Journal of Morphology*, **171**: 293-303.
- Mellanby K. 1958. The alarm reaction of mosquito larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **1**(3) : 153-160.
- Melo A.C.A., Rützler M., Pittz R.J. and Zwiebel L.J. 2004. Identification of a chemosensory receptor from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, that is highly conserved and expressed in olfactory and gustatory organs. *Chemical Senses*, **29**: 403-410.
- Mendis K., Sina B.J., Marchesini P. and Carter R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **64**(1, 2): 97-106.
- Merck Index 1996. Twelfth edition. Published by Merck Research Laboratories Division of Merck & co., Inc. White house station, NJ. ,1741, 1208.
- Merritt R.W. 1989. A broad evaluation of *B.t.i.* for black fly (Diptera: Simuliidae) control in a Michigan river: efficacy, carry and nontarget effects on invertebrates and fish. *J. Am. Mosq. Contr. Ass.*, **5**(3): 397-415.
- Metcalf R.L. & Metcalf E.R. 1992. Chemical ecology of plant kairomones. Chapman and Hall, New York, NY.
- Millar J.G., Chaney J.D. and Mulla M.S. 1992. Identification of oviposition attractants for *Culex quinquefasciatus* from fermented Bermuda grass infusions. *J. Am. Mosq. Control Ass.*, **8**:11-17.
- Miller V., Pacakova V. And Smolkova E. 1976. Gas-liquid chromatographic analysis of trimethylsilyl derivatives of pyrimidine and purine bases and nucleosides. *Journal of Chromatography*, **119**: 355-67.
- Mosca J. 1860. Mémoire sur l'endiguement de l'Isère et de l'Arc en Savoie, manuscrit, Archives départementales (Chambéry), S-762, 43p. et cartes h.t. (cartes, profils, schémas).
- Moussiegt O. 1986. Moustiques de France. Bibliographie et répartition. *Inventaires Faune et Flore n°30*. Museum National d'Histoire Naturelle. Paris, 184 pp.
- Muirhead-Thomson R.C. 1940. Studies on the behaviour of *Anopheles minimus*. Part II. The influence of water movement on the selection of the breeding place. *J. Malaria Inst. India*, **3** : 295-322.
- Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and control. *Agro*. **23**: 375-396.
- Nielsen-Leroux C. & Charles J.F. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.*, **210** : 585-590.
- Noiraud N., Maurousset L. and Lemoine R. 2001. Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**: 717-728.
- Oparka, K. J. & Turgeon, R. 1999. Sieve elements and companion cells - traffic control centers of the phloem. *Plant Cell*, **11**: 739-750.



- Osgood C.E. 1971. An oviposition pheromone associated with the egg rafts of *Culex tarsalis*. *J. Econ. Entomol.*, **64**: 1038-41.
- Pappas C.J. & kyriakidis N.V. 2002. A comparison of dimethoate degradation in lemons and mandarins on the trees with two GC systems. *Food Chemistry*, **80**(1): 23-28.
- Pautou G., Aïn G., Cousserans J., Gabinaud A. and Simonneau P. 1973. Cartographie appliquée à la démoustication. *Doc. De Cartographie écologique*, **11** : 1-16.
- Pennetier C. 2003. Ecologie de *Coquillettidia richiardii*. Etude de l'effet de la variation du facteur salinité sur *Cq. richiardii* (Diptera : Culicidae). Rapport de stage. Document EID méditerranée, 33 p.
- Pichot J. & Deruaz D. 1981. Les *Anopheles* du complexe *maculipennis* dans la région lyonnaise. *Lyon Médical*, **245**: 117-121.
- Picot S. 2006. *Plasmodium vivax* est-il encore le paradigme d'un paludisme simple ? *Médecine et maladies infectieuses*, **36**: 406-413.
- Ponçon N., Toty C., L'Ambert G., Le Goff G., Brengues C., Schaffner F. and Fontenille D. 2007. Biology and dynamics of potential malaria vectors in Southern France. *Malaria Journal*, **6**(18): 1-9.
- Pradel J., Rey D., Foussadier R. and Bicoud D. 2007. Etude écologique des moustiques (Diptera, culicidae) – vecteurs potentiels d'arboviroses – dans la région Rhône-Alpes. *Bulletin de l'Association pour l'Etude de l'Epidémiologie des Maladies Animales*, in press.
- Provost M.W. 1973. Mosquito flight and night relative humidity in Florida. *Fla. Scient.* **36**: 217-225.
- Puech M. 1980. Contribution aux recherches de cartographie épidémiologique : étude écologique des populations de culicidés adultes en rapport avec la myxomatose dans la région Rhône-Alpes. Thèse de doctorat, USM Grenoble. 160 p.
- Punzo F. & Parker M. 2005. Effects of azadirachtin on mortality, fertilization, and swimming speed in larvae of the cane toad, *Bufo marinus* (Anura: Bufonidae). *J. Environ. Biology*, **26**(4): 687-691.
- Rajendran G., Sabesan S., Kuppasamy M. and Balaraman K. 1991. Evaluation of *Bacillus sphaericus* formulation, Spherifix for the control of *Mansonioides* larvae. *Entomon*, **16**(3): 213-216.
- Ramsdale C. D. & Gunn N. 2005. History of and prospects for mosquito-borne disease in Britain. *European Mosquito Bulletin*, **20**: 15-30.
- Ramsdale C.D. & Snow K.R. 2001. Distribution of the genera *Coquillettidia*, *Orthopodomyia* and *Uranotaenia* in Europe. *European Mosquito Bulletin*. **10**: 25-29.
- Ranta S.R., Batzer D.P., Sharkey K.R. and Sjogren R.D. 1994. Efficacy of methoprene pellets against *Coquillettidia perturbans* larvae. *Journal of the Mosquito Control Association*, **10**(1): 106-107.
- Raveton M., Ravanel P., Kaouadji M., Bastide J. and Tissut M. 1997. The chemical transformation of atrazine in corn seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **58**: 199-208.
- Raveton M., Schneider A., Desprez-Durand C., Ravanel P. and Tissut M. 1999. Comparative diffusion of atrazine inside aqueous or organic matrices and inside plant seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **65**: 36-43.
- Raymond M. 1993. PROBIT CNRS-UMII. Licence L93019. Avenix, 24680 St-Georges-d'Orques, France.
- Reiter P. 2000. From Shakespeare to Defoe: Malaria in England in the Little Ice Age. *Emerging Infectious Diseases*, **6** (1): 1-11.

- Reiter P. 2001. Climate change and mosquito-borne diseases. *Environ. Health Perspect.*, **109**(suppl 1):141-161.
- Replat A., Despine C.M.J. and Fagnani E. 1844. Rapport sur les atterrissements de l'Isère et les effets qu'ils produisent. *Gazette de l'Association Agricole* (Turin), 2ème année, **24**: 198-200.
- Rettich F. 1979. Laboratory and field investigations in Czechoslovakia with fenitrothion, pirimiphos-methyl, temephos and other organophosphorous larvicides. *Mosq. News*, **39**(2) : 320-328.
- Rey D. 2002. Etude sur un moustique du genre *Coquillettidia*. Entente Interdépartementale Ain-Isère-Rhône-Savoie pour la Démoustication. Rapport préliminaire 28 p.
- Rey D., David J.P., Besnard G., Jullien J.L., Lagneau C. and Meyran J.C. 2001. Comparative sensitivity of larval mosquitoes to vegetable polyphenols versus conventional insecticides. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **98** : 361-367.
- Rioux J.A., Crosset H. and Sinègre G. 1966. Présence de *Mansonia (Coquillettidia) richiardii* (Ficalbi) dans le « midi » méditerranéen (Diptera-Culicidae). *Cah. Natur.*, **22** (3) 94-96.
- Rioux J.A., Crozet H., Corre J.J. and Simonneau P. 1967. Les bases phyto-écologiques de la lutte anticulticienne. Cartographie des biotopes larvaires, ses applications opérationnelles dans le Midi méditerranéen. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, **42**(6): 665-680.
- Rodcharoen J. & Mulla M. S. 1996. Cross resistance to *Bacillus sphaericus* strains in *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, **12** (2) : 247-250.
- Rogers S.G., Brand L.A., Holder S.B., Sharps E.S. and Brackin M.J. 1983. Amplification of the aroA gene from *Escherichia coli* results in tolerance to the herbicide glyphosate. *Applied and environmental microbiology*, **46** (1): 37-43.
- Roman E. & Ahrary F.A. 1970. Le genre *Mansonia* dans la région Lyonnaise (Diptères Culicidae). *Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon*, **39** (7) : 236-238.
- Romi R., Sabatinelli G. and Majori G. 2001. Could malaria reappear in Italy? *Emerging Infectious Diseases*, **7**(6): 915-919.
- Rouillon N. 2006. Integrated Upstream Isère Project. Sogreah. *La lettre internationale*. July 2006. N°13.
- Roux D., Jooste S., Truter E. and Kempster P. 1995. An aquatic toxicological evaluation of fenthion in the context of Finch control in South Africa. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **31**(2): 164-172.
- Rovira A.D., Foster R.C. and Martin J.K. 1979. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere, in: Harley J.L., Russell R.S. (Eds.), *The Soil Root Interface*, Academic Press, London, pp. 1-4.
- Ruscoe C.N.E. 1972. Growth disruption effects of an insect antifeedant. *Nature New Biology*, **236** : 159-160.
- Saglio P. & Blanc J.M. 1983. Etude en olfactomètre de la réponse comportementale aux acides aminés chez le juvénile de carpe, *Cyprinus carpio* L. *Biology of Behaviour*, **8** :359-370.
- Saglio P., Fauconneau B. and Blanc J.M. 1990. Orientation of carp, *Cyprinus carpio* L., to free amino acids from *Tubifex* extract in an olfactometer. *Journal of Fish Biology*, **37**: 887-898.
- Sallares R., Bouwman A. and Anderung C. 2004. The Spread of Malaria to Southern Europe in Antiquity : New Approaches to Old Problems. *Medical History*, **48** : 311-328.

- Salvagnoli-Marchetti A. 1859. Rapporto al Presidente del Regio Governo della Toscana sul Bonificamento delle Maremme Toscane. *Tip. delle Murate*, Firenze, 142p.
- Sanders P.F. & Seiber J.N. 1983. A chamber for measuring volatilization of pesticides from model soil and water disposal systems. *Chemosphere*, **12**: 999-1012.
- Sant, R. & de Pietri-Tonelli P. 1959. Mode of action and biological properties of the S-(Methylcarbonyl) methyl 0,0-dimethyldithiophosphate. *Nature*, **183** : 398-399.
- Santi R. & Giacomelli R. 1962. Metabolic fate of P<sup>32</sup>-labeled dimethoate in olive fruits and some toxicological implications. *J. Agr. Food Chem.*, **10**(3): 257-61.
- Satchivi N.M., Wax L.M., Stoller E.W. and Briskin D.P. 2000. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. *Weed Science*, **48**: 675-679.
- Satchivi N. M., Stoller E. W., Wax L. M. and Briskin D.P. 2001. A nonlinear dynamic simulation model for xenobiotic transport and whole plant allocation following foliar application. III. Influence of chemical properties, plant characteristics, and environmental parameters on xenobiotic absorption and translocation. *Pestic Biochem Phytol.*, **71** : 77-87.
- Scalla R. 1991. Les herbicides mode d'action et principes d'utilisation. Du labo au terrain INRA éditions 450p.
- Schäfer M. 2004. Mosquitoes as a part of Wetland Biodiversity. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology*, **1042** 63pp. Uppsala. ISBN 91-554-6094-1.
- Schäfer M. L., Lundström J. O., Pfeffer M., Lundkvist E. and Landin J. 2004. Biological diversity versus risk for mosquito nuisance and disease transmission in constructed wetlands in southern Sweden. *Medical and Veterinary Entomology*, **18** : 256-267.
- Schaffner F., Angel G., Geoffroy B., Hervy J.-P., Rhaiem A., and Brunhes J. 2001. The mosquitoes of Europe. An identification and training programme, IRD-Taxonomie des vecteurs & EID-Laboratoire cellule Entomologie, Montpellier, France.
- Schaffner F. & Karch S. 2000. Première observation d'*Aedes albopictus* (Skuse, 1894) en France métropolitaine. - First record of *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) in metropolitan France. *C. R. Acad. Sci. III – Vie*, **323**: 373-375.
- Schmalko M.E., Ramallo L.A., Ferreira D. and Berlingheri R.D. 2002. Dimethoate degradation in plants and during processing of Yerba Maté leaves. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **45**(4): 419-422.
- Schmidt C.H. & Weidhaas D.E. 1961. The toxicological action of three organophosphorous insecticides with three species of mosquito larvae. *J. Econ. Entomol.* **54**(3) : 583-586.
- Schönherr J. 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany*, **57** (11): 2471-2491.

- Schoonhoven L.M., Jermy T. and van Loon J.J.A. 1998. Insect-Plant Biology. From Physiology to Evolution. Chapman & Hall, London, 1998, 409 pp.
- Sérandour J. 2003. Les populations invasives du moustique *Coquillettidia richiardii* autour du lac du Bourget : enjeux pour la société et relation larve-plante hôte. Institut de Géographie Alpine, Université Joseph Fourier, Grenoble I. Mémoire DEA.
- Sérandour J. & Claeys-Mekdada C. 2004. Rapport d'enquête sociologique concernant la nuisance due aux moustiques sur le territoire du Pays du lac du Bourget. Rapport EID Ain-Isère-Rhône-Savoie, 67 p.
- Sérandour J. & Claeys-Mekdada C. 2005. Représentations sociales du moustique et de la démoustication chez la population locale en Rhône-Alpes. Rapport EID Ain-Isère-Rhône-Savoie, 55 p.
- Sérandour J. 2006. Guide méthodologique pour la mise en place d'un observatoire de la nuisance due aux moustiques sur le territoire démoustiqué de Rhône-Alpes. Rapport EID Ain-Isère-Rhône-Savoie, 44 p.
- Sérandour J., Rey D. and Raveton M. 2006. Behavioural adaptation of *Coquillettidia richiardii* larvae to underwater life: Environmental cues governing Plant-Insect Interaction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120 : 195-200.
- Sérandour J. & Claeys-Mekdada C. 2007. Entre biologie et sociologie : Les moustiques, des marais camarguais aux vallées alpines. *Nature, Science et Sociétés*, Soumis 10/2007.
- Sérandour J., Girel J., Boyer S., Ravanel P., Lemperiere G. and Raveton M. 2007. How human practices have affected vector-born diseases in the past: a study of malaria transmission in Alpine Valleys. *Malaria Journal*, 6: 115.
- Service M.W. 1993. Mosquito ecology. Field Sampling Methods, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London, UK.
- Shute P.G. & Maryon M. 1974. Malaria in England past, present and future. *Roy. Soc. Health J.*, 1: 23-29.
- Sicart M. & Escande F. 1954. Le problème de l'*Anopheles maculipennis* vu par l'école italienne. *Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de Toulouse*, 89: 292-298.
- Sinègre G., Cousserans G., Vigo G. and Crespo O. 1971. Sensibilité des larves de *Mansonia (C.) richiardii* (Ficalbi) à quelques insecticides : effet de l'abate dans un biotope larvaire. *Cahiers de l'ORSTOM, Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 3: 255-263.
- Sjogren R.D., Batzer D.P. and Juennemann M.A. 1986. Evaluation of methoprene, temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Coquillettidia perturbans* larvae in Minnesota. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 2(3): 276-279.
- Smallegange R.C., Qiu Y.T. Van Loon, J.J.A. and Takken W. 2005. Synergism between ammonia, lactic acid and carboxylic acids as kairomones in the host-seeking behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Chem. Senses.*, 30: 145-152.
- Smith A.G. 2000. How toxic is DDT ? *Lancet* 356: 267-268.
- Snow K. 1999. Malaria and mosquitoes in Britain: the effect of global climate change. *European Mosquito Bulletin*, 4: 17-25.
- Sprankle P., Meggitt W.F. and Penner D. 1975. Absorption, action and translocation of glyphosate. *Weed Research*, 23: 235-240.
- Stark J.D. 2001. Population-level effects of the neem insecticide, Neemix, on *Daphnia pulex*. *J. Environ. Sci. Health B.*, 36(4): 457-465.

- Sutherst R. W. 2001. The vulnerability of animal and human health to parasites under global change. *International Journal for Parasitology*, **31**: 933-948.
- Tissut M. 1989. Initiation à la physiologie cellulaire des plantes. Université Joseph Fourier. 192p.
- Tissut M., Delval P., Mamarot J. and Ravanel P. 2006. Plantes, herbicides et désherbage. ACTA, Paris, 635 p.
- Tissut M. & Séverin F. 1984. Plantes herbicides et désherbage bases scientifiques et techniques. ACTA. 251p.
- Tous J.G. 1976. Le choléra en Savoie au 19<sup>e</sup> siècle. Doctorat en science, Archives départementales de la Savoie, J 800.
- Trari B., Dakki M., Himmi O. & El Agbani M.A. 2002. Les moustiques (Diptera Culicidae) du Maroc. Revue bibliographique (1916-2001) et inventaire des espèces. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **95** (4) : 329-334.
- Truernit E. 2001. Plant physiology: the importance of sucrose transporters. *Current Biology*, **11**: 169-171.
- Turgeon R. & Medville R. 2004. Phloem loading. A reevaluation of the relationship between plasmodesmatal frequencies and loading strategies. *Plant Physiology*, **136**: 3795-3803.
- UNESCO. 1981. The Practical Salinity Scale 1978 and the International Equation of State of Seawater 1980. *Technical Papers in Marine Science*, N°36 UNESCO Division of Marine Sciences (Paris), 25pp.
- Van Bel A.J.E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, cell and environment*, **26**(1): 125-149.
- Van den Assem J. 1958. Some experimental evidence for the survival value of the rootpiercing habits of *Mansonia* larvae (Culicidae) to predators. *Entomol. Exp. Applic.*, **1** : 125-129.
- Van Overbeek J. 1956. Absorption and translocation of plant regulators. *Annu Rev Plant Physiol.*, **7**: 355-372.
- Vartak P.H., Tungikar V.B. and Sharma R.N. 1994. Comparative repellent properties of certain chemicals against mosquitoes, house flies and cockroaches using modified techniques. *J. Comm. Dis.*, **26**: 156-160.
- Vatandoost H. & Vaziri V.M. 2004. Larvicidal activity of a neem tree extract (Neemarin) against mosquito larvae in the Islamic Republic of Iran. *East Mediterr. Health J.*, **10**(4-5): 573-581.
- Visser J.H. 1988. Host-plant finding by insects: orientation, sensory input and search patterns. *Journal of Insect Physiology*, **34**: 259-268.
- Walker T. S., Bais H.P., Grotewold E. and Vivanco J. M. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.*, **132** : 44-51.
- Walker T.S., Bais H.P., Halligan K.M., Stermitz F.R. and Vivanco J.M. 2003. Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(9): 2548-2554.
- Wallis R. C. 1954. The effect of pollution density and of NaCl concentrations in test series in laboratory experiments with oviposition of *Aedes aegypti*. *Mosq. News*, **47**: 393-396.
- Wanner K.W., Helson B.V. and Kostyk B.C. 1997. Foliar and systemic applications of neem seed extract for control of spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clem.) (Lepidoptera: Tortricidae), infesting black and white spruce seed orchards. *The Canadian Entomologist*, **129**: 645-655.
- Weig A.R. & Jakob C. 2000. Functional identification of the glycerol permease activity of *Arabidopsis thaliana* NLM1 and NLM2 proteins by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, **281**: 293-298.
- Wenger K., Bigler L., Suter M.J., Schönenberger R., Gupta S.K. and Schulin R. 2005. Effect of corn root exudates on the degradation of atrazine and its chlorinated metabolites in soils. *J. Environ. Qual.* **34**(6) : 2187-2196.

- Wesenberg-Lund C. 1918. Anatomical description of the larva of *Mansonia richiardii* (Ficalbi) found in Danish freshwaters. *Vidensk. Medd. Dansk Naturh. Foren. Kbh.*, **69**: 277-328.
- Wesenberg-Lund C. 1920-1921. Contribution to the biology of the Danish Culicidae. *Kgl. Danske Vid. Selsk. Skz. Nat.-Mat. Afd.*, 1-210.
- West A. A. 1961. Nature and causation of insect bite reactions. Reprinted from *Pediatric Clinic of North America*, **8** : 795-816.
- Wiessner A., Kusch P., Kästner M. and Stottmeister U. 2002. Abilities of Helophytes Species to Release Oxygen into Rhizospheres with Varying Redox Conditions in Laboratory-scale Hydroponic Systems. *International Journal of Phytoremediation*, **4** (1) : 1-15.
- Willott E. 2004. Restoring nature, without mosquitoes ? *Restoration Ecology*, **12** : 147-153.
- WHO 2004. Réunion OMS/WPRO/SEARO sur la mise en place du réseau DengueNet dans les Régions de l'Asie du Sud-Est et du Pacific occidental, Kuala Lumpur, 11-13 décembre 2003. *Weekly Epidemiological Record*, **6** : 57-62.
- WHO 2005. World Malaria Report 2005, [<http://www.rbm.who.int/wmr2005/>].
- Wu C.Y., Lin J.T. 1990. Spectral sensitivity of the compound eye of moth (*Heliothis armigera*). *Chinese Journal of Entomology*, **10**: 151-158.
- Yap H.H., Tan H.T., Yahaya A.M., Baba R. and Chong N.L. 1991. Small-scale field trials of *Bacillus sphaericus* (strain 2362) formulations against *Mansonia* mosquitoes in Malaysia. *Journal of the Mosquito Control Association*, **7**(1): 24-29.
- Yap H.H., Ng Y.M., Foo A.E.S. and Tan H.T. 1988. Bioassays of *Bacillus sphaericus* (strain 1593, 2297 and 2362) against *Mansonia* and other mosquitoes of public health importance in Malaysia. *Malaysian Applied Biology*, **17**: 9-13.
- Yoon H.R. 2007. Two step derivatization for the analyses of organic, amino acids and glycines on filter paper plasma by GC-MS/SIM. *Arch. Pharm. Res.*, **30**(3): 387-95.

## Table des figures

Figure 1 : Cycle de vie du moustique commun <i>Culex (Culex) pipiens</i> (Linnaeus) .....	2
Figure 2 : Carte de la répartition mondiale des cas de paludisme .....	4
Figure 3 : Carte de la vallée de l'Isère en Rhône-Alpes avant les travaux d'endiguement en 1829 .....	11
Figure 4 : Estimations moyennes annuelles des précipitations et des températures à Albertville entre 1828 et 1900. ....	15
Figure 5 : Coupe transversale du fleuve Isère au voisinage du village de Sainte- Hélène-sur-Isère, illustrant l'évolution des aménagements hydrauliques (période 1830-1860) .....	18
Figure 6 : Evolution du nombre de décès entre 1830 et 1900 dans les communes situées au voisinage de la confluence entre les rivières Arc et Isère .....	20
Figure 7 : Carte présentant les territoires d'étude en Rhône-Alpes en 2004 et 2005 .....	27
Figure 8 : Répartition relative des caractères nuisible et utile du moustique dans les témoignages .....	30
Figure 9 : Analyse des correspondances multiples représentant les différences de sensibilités des personnes habitant en zones rurales et urbaines .....	31
Figure 10 : Analyse des correspondances multiples représentant 3 catégories de personnes aux représentations et sensibilité différentes .....	32
Figure 11 : Relations entre la nuisance due aux moustiques, l'E.I.D. et la population du territoire traité .....	37
Figure 12 : Répartition des sites où des larves et/ou adultes de <i>Coquillettidia</i> ont été capturés en Rhône-Alpes entre 2000 et 2007 .....	43
Figure 13 : Spatialisation de la nuisance à <i>Coquillettidia</i> autour du lac du Bourget (73) entre 1997 et 2000.....	44
Figure 14 : Position systématique de <i>Coquillettidia richiardii</i> et <i>Coquillettidia buxtoni</i> dans la famille des Culicidae .....	45
Figure 15 : Répartition géographique de <i>Coquillettidia richiardii</i> (A) et <i>Coquillettidia</i> <i>buxtoni</i> (B) en Europe .....	46
Figure 16 : Caractéristiques morphologiques d'une larve de <i>Coquillettidia</i> et critères de détermination entre les espèces <i>Cq. richiardii</i> et <i>Cq. buxtoni</i> .....	46
Figure 17 : Cycle de vie de <i>Coquillettidia</i> .....	47

Figure 18 : Coupes transversales de racines de 2 monocotylédones : le maïs (A) et la massette (B) .....	51
Figure 19 : Schéma de l'organisation d'un gîte larvaire à <i>Coquillettidia</i> et de sa biocénose (coupe transversale). .....	51
Figure 20 : Répartition des stations étudiées dans les zones à <i>Coquillettidia</i> autour du Lac du Bourget (Savoie) .....	54
Figure 21 : Schéma d'organisation d'une station en coupe transversale .....	58
Figure 22 : Analyse Factorielle des Correspondances représentant les stations et les taxons végétaux recouvrant les berges des stations .....	66
Figure 23 : Analyse Factorielle des Correspondances représentant les stations et les taxons végétaux recouvrant la surface de l'eau.....	68
Figure 24 : Analyse en Composantes principales représentant les stations et les variables explicatives .....	86
Figure 25 : Siphon respiratoire modifié de la larve .....	89
Figure 26 : Formule chimique développée du glycérol .....	91
Figure 27 : Formules chimiques développées de l'uracile, de la thymine et de la cytosine. ....	92
Figure 28 : Formules chimiques de l'uridine et de la thymidine .....	92
Figure 29 : Etapes de la séparation des composés racinaires par partition et diffusion dans des solvants de polarité croissante .....	94
Figure 30 : Partition des extraits racinaires dans un solvant lipophile et un solvant polaire.....	94
Figure 31 : Dispositif de suivi du comportement de fixation des larves .....	97
Figure 32 : Dispositif de suivi du comportement d'orientation des larves par rapport aux items présentés, sur une longue durée.....	98
Figure 33 : Dispositif de suivi du premier choix des larves.....	99
Figure 34 : Influence de l'intensité lumineuse sur la cinétique de fixation des larves.....	101
Figure 35 : Influence de la couleur du fond (substrat) sur la cinétique de fixation des larves .....	102
Figure 36 : Influence de la teneur en oxygène de l'eau sur la cinétique de fixation des larves .....	103
Figure 37 : Influence du diamètre des racines sur la fixation des larves.....	103
Figure 38 : Choix des larves entre une plantule de maïs et un leurre inerte .....	106
	107



Figure 39 : Choix des larves entre différentes sources de stimuli chimiques	
Figure 40 : Attractivité de différentes espèces végétales pour les larves de <i>Coquillettidia</i> .....	108
Figure 41 : Attractivité d'exsudats de plantes pour les larves de <i>Coquillettidia</i> .....	110
Figure 42 : Attractivité d'extraits aqueux de gîte larvaire pour les larves de <i>Coquillettidia</i> .....	111
Figure 43 : Réponse des larves à des concentrations croissantes en glycérol, uracile, uridine, thymine et thymidine. ....	120
Figure 44 : Réponse des larves à des solutions mimant les extraits de racines de massette et de maïs, à différentes concentrations .....	123
Figure 45 : Réponse des larves à des solutions mimant les exsudats de massette et de maïs, à différentes concentrations. ....	124
Figure 46 : Courbe hypothétique d'attraction des larves de <i>Coquillettidia</i> suivant un gradient de concentration en glycérol-uracile-thymine-uridine-thymidine .....	127
Figure 47 : Schéma illustrant la pénétration cuticulaire et le transfert d'un xénobiotique appliqué en dépôt foliaire (coupe transversale).....	136
Figure 48 : Schéma représentant le fonctionnement du phloème dans la plante .....	137
Figure 49 : Formule chimique développée du D-mannitol .....	140
Figure 50 : Formule chimique développée du 2,4-D .....	140
Figure 51 : Formule chimique développée du glyphosate .....	141
Figure 52 : Formule chimique développée du méthyl-parathion .....	141
Figure 53 : Formule chimique développée du diméthoate .....	142
Figure 54 : Protocole d'extraction et de révélation de la répartition des xénobiotiques dans les plantes .....	145
Figure 55 : Photographie illustrant l'adhérence des microgouttes à un support vertical après ajout de Tween 80 (tensioactif) à la solution de dépôt .....	146
Figure 56 : Photo du dépôt foliaire de micro-gouttes de <sup>14</sup> C-2,4-D sur maïs .....	147
Figure 57 : Répartition du <sup>14</sup> C-2,4-D dans une plantule de maïs 14 jours après dépôt foliaire .....	149
Figure 58 : Cinétique de libération du 2,4-D dans l'eau par les racines de plantules de maïs .....	150
Figure 59 : Effets phytotoxiques du glyphosate sur les plantules de maïs après 14 jours .....	151
.....	153

Figure 60 : Toxicité à 48h de différents extraits de plantes de maïs traitées au diméthoate sur des larves <i>d'Aedes aegypti</i> .	
Figure 61 : Photographies des racines et des feuilles d'une plante de massette traitée au glyphosate 14 jours après traitement .....	154
Figure 62 : Cinétique de libération du glyphosate par des racines de massette .....	155
Figure 63 : Cinétiques d'acquisition du diméthoate par des larves de moustiques mortes et vivantes, sur 48h .....	161
Figure 64 : Schéma de traitement des plantes au diméthoate par applications répétées .....	163
Figure 65 : Photographies d'une même plante à J0 et après le 4 <sup>ème</sup> traitement (J21) .....	164
Figure 66 : Concentration en diméthoate dans le bain en fonction du temps .....	165
Figure 67 : Pourcentage de mortalité larvaire chez <i>Aedes aegypti</i> après 48h d'exposition aux extraits de plantes traitées avec différentes doses de diméthoate .....	166
Figure 68 : Nombre de larves attirées par des plantes traitée et non traitée, ou par le témoin, en fonction du temps .....	170
Figure 69 : Nombre de larves fixées sur plantes témoin et traitée, en fonction du temps .....	171

## Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des taux de mortalités de 5 communes bordant l'Isère entre 1828 et 1843	13
Tableau 2 : Relation entre indice de recouvrement et recouvrement par la végétation	58
Tableau 3 : Distribution de <i>Coquillettidia</i> dans les différentes stations	64
Tableau 4 : Taxons majoritaires dans les groupements végétaux des berges et recouvrement	65
Tableau 5 : Taxons majoritaires dans les groupements végétaux aquatiques et recouvrement	67
Tableau 6 : Valeurs des paramètres physiques et physico-chimiques et significativité	72
Tableau 7 : Composés majoritaires détectés dans les échantillons d'eau de surface prélevés dans les stations	77
Tableau 8 : Variables testées dans l'étude du comportement de fixation	96
Tableau 9 : Attractivité d'extraits de racines de maïs et de massette pour des larves de <i>Coquillettidia</i>	109
Tableau 10 : Composés carbonés libérés par les racines des végétaux dans la rhizosphère	113
Tableau 11 : Composition chimique de 14 extraits naturels attractifs	114
Tableau 12 : Réponse des larves à des composés présents dans des extraits naturels attractifs	116
Tableau 13 : Concentrations en composés attractifs calculées dans les exsudats de maïs et massette	122
Tableau 14 : Récapitulatif des concentrations des xénobiotiques utilisés en traitement foliaire	148
Tableau 15 : Répartition des différents xénobiotiques radiomarqués dans les compartiments du système plantule de maïs/bain, 14 jours après le traitement	149
Tableau 16 : Effets phytotoxiques du glyphosate sur la croissance des feuilles et racines de maïs	151
Tableau 17 : Répartition du <sup>14</sup> C-glyphosate dans les différents compartiments du système massette/eau, 14 jours après traitement.	155

Tableau 18 : Répartition du <sup>14</sup> C-diméthoate dans le système massette/eau, 14 jours après traitement .....	156
Tableau 19 : Comparaison des propriétés systémiques des 5 matières actives utilisées .....	160
Tableau 20 : Tableau comparatif des CL <sub>50</sub> d' <i>Aedes aegypti</i> et <i>Coquillettidia richiardii</i> au diméthoate à 24 et 48h .....	162
Tableau 21 : Répartition du <sup>14</sup> C-diméthoate dans le système massette/eau, 7 jours après le dernier traitement .....	164

## **Contribution à l'étude des moustiques anthropophiles de France : le cas particulier du genre *Coquillettidia*.**

Les principaux enjeux de la gestion des moustiques en France sont la prévention des risques vectoriels et le contrôle de la nuisance. A travers une étude historique sur la transmission du paludisme dans les vallées alpines, nous avons démontré que les aménagements hydrauliques devaient être considérés comme des facteurs à risque pour le développement de maladies vectorielles.

L'estimation de la nuisance perçue permettrait d'adapter le contrôle des moustiques aux attentes de la population. L'expérience de deux enquêtes sociologiques a conduit à poser les bases d'un observatoire de la nuisance, qui emploierait conjointement et régulièrement les outils sociologiques et les échantillonnages sur le terrain, pour une démoustication raisonnée.

Les moustiques du genre *Coquillettidia* représentent une nuisance mais sont inefficacement contrôlés, les larves vivant fixées aux racines des végétaux en profondeur, à l'abri des traitements. A l'issue d'une vaste étude de terrain, une liste d'indicateurs écologiques caractéristiques des gîtes larvaires à *Coquillettidia* a été dressée pour faciliter leur localisation. La nature des plantes aquatiques et la présence de kairomones (p-crésol, acides laurique et heptadécanoïque), le courant, la salinité, la turbidité, la pérennité de la pièce d'eau et son entretien, sont très probablement impliqués dans le choix des gîtes colonisés par ces moustiques.

Des tests comportementaux couplés à des analyses chimiques en laboratoire ont permis de déterminer les mécanismes gouvernant la fixation des larves aux racines, dont dépend leur survie. Nous avons mis en évidence l'implication de substances allélochimiques généralistes (glycérol, uracile, thymine, uridine et thymidine) dans la reconnaissance des plantes hôtes par les larves. L'influence de l'intensité lumineuse, de la teneur en oxygène de l'eau, et de la morphologie des racines sur le comportement de fixation a été démontrée.

Enfin une stratégie larvicide adaptée à l'écologie particulière de *Coquillettidia* a été mise au point. Nous avons prouvé que des plantes aquatiques pouvaient acheminer un insecticide systémique, le diméthoate, par voie phloémienne jusqu'aux racines, et libérer des composés toxiques au contact des larves. La fixation est fortement perturbée (- 85%), ce qui amplifie l'efficacité de cette stratégie.

## **Contribution to French anthropophilic mosquitoes study : the particular cases of the genus *Coquillettidia***

Mosquito pest and disease vector populations are the main purposes of mosquito control and monitoring in France. In an historical study on malaria transmission in Alpine valleys, we pointed out that hydraulic developments should be considered as risk factors for vector-borne disease outbreaks.

The evaluation of public perception of mosquito nuisance could help to adapt insecticidal treatments to people's expectations. Experience achieved in two sociological studies led us to propose the establishment of a mosquito pest survey based on the regular and combined uses of sociological tools and field sampling.

*Coquillettidia* mosquitoes are a major nuisance and are difficult to control, since larvae live in a protected and deep habitat, attached to plant roots for their oxygen supply. The results of a large field study allowed us to inventory ecological indicators of *Coquillettidia* breeding sites, that can help to locate them. Aquatic plant species and kairomones emission (p-cresol, lauric and heptadecanoic acids), water flow, salinity, turbidity, persistence of standing waters and impact of human operations must be involved in the choice of the breeding sites by these mosquitoes.

Behavioral tests combined with chemical analysis enabled us to identify the mechanisms governing larval behavior of attachment to roots, determinant for their survival. It is proved that generalist semiochemicals (glycerol, uracil, thymine, uridine and thymidine) are involved in the host-plant identification by swimming larvae. Light intensity, oxygen concentration of water and roots morphology are also influencing larval attachment.

Finally, a larvicidal strategy specially adapted to larval *Coquillettidia* ecology was set up. The capacity of aquatic plants to transport the systemic insecticide dimethoate via the phloem to the roots, and to release toxic compounds in larval surroundings has been proven. The high diminution (-85%) of larval attachment abilities increases the efficiency of this strategy.