جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES
كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

N° d'ordre : 84/2023

Centre des Etudes Doctorales : Sciences et Techniques et Sciences Médicales
Formation Doctorale : Sciences et Génie de la Matière, de la Terre et de la Vie
Discipline : Biologie
Spécialité: Biotechnologies/Physiologie, pharmacologie et santé
Laboratoire : Chimie Organique Appliquée

Thèse pour l'obtention de DOCTORAT

Optimisation de l'activité insecticide des huiles essentielles et des molécules bioactives *via* des formulations binaires et ternaires contre le moustique adulte, *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur de maladies.

Préparée par : **Mlle RAMZI Amal**

Soutenue le **Jeudi 16 Novembre 2023 à 10h** à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, devant le jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Etablissement	Qualité
SAFFAJ Taoufiq	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Président
BOUTALEB Nadia	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Mohammedia.	Rapporteur
CHAOUCH Abdelaziz	PES	Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail	Rapporteur
ERRACHIDI Faouzi	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Rapporteur
EZ ZOUBI Yassine	PH	Faculté des Sciences et Techniques d'al'Hoceima	Examinateur
FIKRI-BENBRAHIM Kawtar	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Examinatrice
EL OUALI LALAMI Abdelhakim	PH	Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé-Fès	Co-directeur
FARAH Abdellah	PES	Faculté des Sciences et Techniques de Fès	Directeur de thèse


وقل رب زدني علما

Au moustique

« Tu pourrais être innocent lors de ta piqure, mais notre sang est précieux, et notre santé est encore plus précieuse»

« Ta simple piqûre te transforme en un redoutable assassin, se métamorphosant en une tragédie »

"وإن الهمة العالية في تحقيق المبتغى لا تأتي من فراغ..."

« Et nous murmurons nos confidences

A l'oreille de la nature

Dont le souffle se répand

Dans la création entière :

Et nous écoutons battre son cœur

Poursuivant son rythme chantant »

Aboul-Qasim Al-Chabbi

Dédicaces

À mon cher père Bouazza RAMZI qui a toujours cru en moi et m'a encouragé en premier pour vivre cette belle aventure.

À ma chère mère Fatima RAchik, ma tendre mère dont les prières m'ont accompagné sans relâche, de jour comme de nuit

À mes chers frères Mohamed, Abderahmane, Abdelhak, mes partenaires inestimables, je suis reconnaissante de vous avoir à mes côtés.

À ma nièce, Rawan, tu fais briller mon cœur de joie, et sa mère Ahlam, Merci d'être une sœur.

A toute ma famille

A mes chères amies

A tous ceux qui me sont chers,...

« Je vous dédie ce travail et je dis grand Merci »

Remerciements

En premier lieu et avant tout, je suis reconnaissante envers Allah le tout-puissant pour avoir rendu possible mon parcours universitaire jusqu'à ce jour. La réalisation de cette thèse n'a été rendue possible sans l'aide d'Allah, qui m'a accordé la force, la santé, la patience et le courage nécessaires pour bien mener ce projet.

Je tiens d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers le Professeur **Abdellah Farah** de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et dans son équipe, et pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mon projet de thèse sous sa supervision et dans un contexte où j'ai pu acquérir de précieuses connaissances. Je le remercie chaleureusement pour la confiance qu'il m'a accordée, son soutien constant, ses directives pertinentes, ses encouragements ainsi que pour ses précieux conseils, ses idées, sa gentillesse, sa sympathie et sa disponibilité, malgré ses nombreuses responsabilités.

Mes sincères remerciements vont également à Monsieur **Abdelhakim El OUALI LALAMI**, Professeur à l'Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé de Fès relevant de la Direction Régionale de la Santé Fès-Meknès, pour son soutien tout au long de ce parcous. Je le remercie sincèrement pour son soutien constant, sa rigueur scientifique et son suivi attentif des travaux de recherche sa disponibilité précieuse malgré ses multiples engagements et responsabilités.

Je suis particulièrement reconnaissante au le Professeur **Ez zoubi Yassine** de la Faculté des Sciences et Techniques Al Hoceima pour son aide précieuse, son soutien inestimable, sa disponiblité et ses orientations constructives tout au long de mon parcours de thèse. Il a consacré son temps, ses ressources et son expertise pour garantir une très bonne qualité de ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement Mr. le président Pr. **Saffaj Taoufiq** d'avoir accepté de présider la présentation de ma thèse, j'adresse également mes remerciement aux rapporteurs P. **Nadia Boutaleb**, Pr. **Chaouch Abdelaziz**, Pr. **Errachidi Faouzi,** parce qu'ils ont consacré leurs temps à réviser et rapporter ce modeste travail, je tiens également à exprimer mes remerciements aux examinateurs Pr. **Ez zoubi Yassine** et Pr. **Fikri-Benbrahim Kawtar** qui ont accepté d'examiner et d'évaluer cette mémoire de thèse.

Tous les professeurs ont apporté une contribution significative pour que ce modeste travail soit réalisé. Ma profonde gratitude s'étend également à tous mes professeurs, depuis l'école primaire jusqu'à aujourd'hui.

Je tiens à exprimer ma gratitude toute spéciale et chaleureuse envers mon amie et sœur, **Soumia Ait Assou**, qui m'a toujours accueilli dans son logement, pendant mes années d'éloignement de ma famille, avec une hospitalité exceptionnelle, elle m'a encouragé, soutenu, et a continuellement suscité un sourire sur mon visage. Merci d'être toujours avec moi dans les moments difficiles. Merci pour ton amour inconditionel. Je te souhaite une vie pleine de reussite, de joie et de bonheur. J'exprime également mes sincères remerciements à mes chères amies, **Moussaid Siham** et **Mouna Aouine**. Merci d'être de vraies amies et merci pour les moments particulièrement mémorables que nous avons partagés ensemble.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance sincère à mes soeurs, mes amours, **Wahiba HabybEllah**, **Zaineb Boukhamssa**. Merci d'être toujours présentes à mes côtés, votre écoute, et votre soutien inconditionnel m'ont aidé à traverser tant d'obstacles et de moments difficiles. Vous êtes bien plus que simples amies pour moi, vous êtes une part essentielle de ma vie. Je vous souhaite à toutes, bonheur, réussite et tout le bien que vous méritez.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers toute l'équipe de Chimie Organique Appliqué, **Saoussan Annemer, Wafae Moustaid, Abdellatif Alami**, **Amine Assouguem**, **Amine Ez zoubi, et Omar Abdellaoui.**

Je n'oublie pas de remercier aussi mes amis et collègues que je n'ai pas nommés, mais qui se reconnaitront.

Je remercie infiniment toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet de thèse.

Merci à vous tous !

"*Les mots manquent aux émotions.*"

Victor Hugo (Le Dernier Jour d'un Condamné, 1829)

Production scientifique

Publications dans des revues indéxées

- **Ramzi, A.,** Farah, A., Ez Zoubi, Y., Annemer, S., & El Ouali Lalami, A. (2022). Aroma profile and fumigant toxicity of two Moroccan Lavandula species essential oils against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). International Journal of Tropical Insect Science, 42(3), 2663-2672.
- **Ramzi, A.;** El Ouali Lalami, A.; Ez zoubi, Y.; Assouguem, A.; Almeer, R.; Najda, A.; Ullah, R.; Ercisli, S.; Farah, A. Insecticidal Effect of Wild-Grown *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils and Their Main Monoterpenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Plants 2022, 11, 1193. https://doi.org/10.3390/plants11091193.
- **Ramzi, A.,** El Ouali Lalami, A., Annemer, S., Ez zoubi, Y., Assouguem, A., Almutairi, M. H., ... & Farah, A. (2022). Synergistic Effect of Bioactive Monoterpenes against the Mosquito, *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Molecules, 27(13), 4182.
- El-Akhal F, **Ramzi A.,** Farah A, Ez Zoubi Y, Benboubker M, Taghzouti K, El Ouali Lalami A (2021) Chemical composition and larvicidal activity of *Lavandula angustifolia subsp. angustifolia* and *Lavandula dentata spp. dentata* essential oils against Culex pipiens larvae, vector of West Nile virus. Psyche: A Journal of Entomology. Volume 2021, Article ID 8872139, pp. 7, https://doi.org/10.1155/2021/8872139.
- Ez-zoubi A., Ez zoubi Y., **Ramzi A.,** Fadil M., El Ouali Lalami A., Farah A., Ethanol and glycerol green emulsifying solvent for the formation of a Lavandula stoechas essential oil/β-cyclodextrin inclusion complex: mixture design and adulticidal activity against Culex pipiens, HELIYON, https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10204.
- Annemer, S., Ez zoubi, Y., **Ramzi, A.,** El Hadrami, E. M., El Ouali Lalami, A., Satrani, B., & Farah, A. (2022). Variations in saffron quality in Morocco (Taliouine and Taznakht) according to altitude and provenance: Chemometric investigation. Journal of Food Processing and Preservation, 46(2), e16292.
- Assouguem, A., Kara, M., **Ramzi, A.,** Annemer, S., Kowalczyk, A., Ali, E. A., ... & Farah, A. (2022). Evaluation of the effect of four bioactive compounds in combination with chemical product against two spider mites *Tetranychus urticae* and *Eutetranychus orientalis* (Acari: Tetranychidae). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022.

Communications à des congrès nationaux et internationaux

- Participation au 1er Workshop international de la Science au Service de l'Economie Sociale en tant que Listener et en tant que participante à l'atelier pratique « Fabrication des produits cosmétiques / Aromathérapie /Olfactothérapie ». De 3 au 5 Novembre 2022 à la Faculté Polydisciplinaire de Khouribga.
- Participation par des communications orales à distance « Synergistic effect of bioactive essential oils' compounds against the mosquito, *Culex pipiens* » et « Adulticidal Effect of Essential Oils bioactive Monoterpenes against the mosquito *Culex pipiens* » au « 4thInternational Conference on Advanced Engineering Technologies » Bayburt, Türkiye. Septembre 28-30,2022.
- Participation par communication orale à distance « Insecticidal Effect Of Plant-Based Essential Oils And Their Bioactive Compounds Against *Culex Pipiens* (Diptera : Culicidae) au Congrès International de l'Industrie l'Environnement et la Santé CIIES22. 6-8 Octobre 2022 à ISPITS-CASA.
- Participation par communication orale au 1er Congrès International sur les Ressources Naturelles : Recherches et stratégies pour un développement durable. RENA 2022. 26-28 Mai 2022.
- Participation par communication orale à distance « Adulticidal Activity of Moroccan Rosmarinus officinalis and Mentha pulegium Essential Oils against the Mosquito Vector, Culex pipiens «Safety and Efficacy of phytomedicine» Phytomed-2020 –Australie. 27/05/2020.
- Participation par communication orale à distance au « International Congress of Industry, Environment and Health » CIIES20. 05- 08 October 2020 Mohammedia.
- Participation par communication orale «Insecticidal Activity Of Moroccan Lavandula Officinalis And Lavandula Stoechas Essential Oils Against Mosquito Adults Culex Pipiens (Diptera: Culicidae), Disease Vector » à la deuxième édition du Forum International des Plantes Aromatiques et Médicinales, sous le thème «Savoir ancestral et innovation» 28-30/11/2019 à la FST de Fès.
- Participation par une communication orale «Activité larvicide de l'huile essentielle de Lavandula angustifolia cultivé au Maroc contre les larves du moustique Culex pipiens (Diptera : Culicidae) vecteur du Nil occidental » à la quatrième édition de la journée du Doctorant en Biologie de USMBA sous le thème «Pharmacologie et Biotechnologie» 10/07/2019 à la FST de Fès.

Résumé

Actuellement, la lutte intégrée est devenue une approche importante dans les programmes de gestion anti-vectorielle, en particulier pour résoudre les problèmes liés à l'utilisation des insecticides chimiques. L'objectif principal de la présente recherche était d'évaluer et d'optimiser le potentiel insecticide de nombreuses HEs et de leurs molécules bioactives, séparément et en combinaison, et aussi en mélange avec l'insecticide chimique, Déltamethrine, contre les adultes femelles du moustique *Culex pipiens* qui jouent un rôle crucial dans la transmission de virus dangereux tels que le virus du Nil Occidental et le virus Usutu. L'activité insecticide a été évaluée par la méthode de fumigation dans des bocaux en verre qui fait référence au protocole standard de l'OMS. L'optimisation de l'effet insecticide des mélanges binaires des ternaires des HEs, de leurs composés purs et de la Déltamethrine a été réalisé par la méthodologie des plans de mélange. D'un autre côté, nous avons opté à l'optimisation de la méthode d'extraction des HEs et par conséquent leur efficacité insecticide. Pour cela, une hydrodistillation simultanée a été mise en œuvre en utilisant les écorces de Citrus pour extraire l'HE de *L.* officinalis *via* l'approche de surface de réponse.

D'après les valeurs de CL_{50} obtenus pour les HEs étudiées, les HEs de *M. pulegium*, *O. basilicum* et *R. officinalis* étaient les plus actives après 24h et 48h de traitement avec des valeurs de CL_{50} inférieures à la concentration la plus élevée, soit 312,5µl/L d'air. Les résultats obtenus pour les molécules pures ont révélé que les monoterpènes α-pinène, carvone et camphre ont présenté les CL_{50} les plus faibles après 24h tandis que le camphre, le 1, 8-cinéole, et l'α-pinène ont montré les plus faibles valeurs après 48h. Les résultats du mélange des HEs ont montré que la combinaison binaire de 50 % de *L. stoechas* et de 50 % de *R. officinalis* était la plus efficace, tuant 86,96 % des moustiques femelles après 48h d'exposition. Alors que l'HE de *M. pulegium* a été efficace (85,45%) à la proportion de 100%. Le mélange ternaire qui a montré une efficacité insecticide de 77,45% était celui préparé par 67% de *L. stoechas*, 17% de *R. officinalis*, et 17% de *M. pulegium*. Pour le mélange binaire de monoterpènes, le mélange le plus efficace était celui de 1,8-cinéole (25%) + α-pinène (75%) causant 100% de mortalité après 48h. Les résultats obtenus avec le mélange de *M. pulegium* et de la Déltamethrine sont intéressants, car toutes les combinaisons testées ont montré des effets insecticides plus élevés que l'insecticide seul surtout après 48h, et une mortalité de 100% a été enregistrée en combinant 25% de l'HE et 75% de la Déltamethrine. Les résultats de l'optimisation du processus de la distillation et l'activité insecticide ont indiqué que le rendement maximal (2,27 ±0,98%) a été atteint en utilisant une quantité de 35g d'écorces de

Citrus, une période de séchage de 2 jours et un temps d'extraction de 140min. Les HEs obtenues par l'hydrodistillation simultanée et testées pour leur activité insecticide ont causé des mortalités importantes avec des faibles valeurs de CL_{50}. Il est également important de souligner que la Déltamethrine à 0,05% n'a pas provoqué une mortalité atteignant 50 %, que ce soit après 24 ou 48 heures. Cette recherche scientifique a mis en évidence le potentiel insecticide des HEs, et les résultats apportés pourraient contribuer à développer des insecticides à base de bio-molécules, offrant ainsi un outil plus sûr et respectueux de l'environnement pour une gestion intégrée et durable des moustiques.

Mots clés : *Culex pipiens*, Lutte integrée, Huiles essentielles, Molécules bioactives, Déltamethrine ; Activité insecticide; Optimisation; Plan de mélange ; Plan de surface de réponse ; hydrodistillation simultanée.

Abstract

Currently, integrated mosquito management has become an important approach in mosquito vector control programs, especially with issues related to the use of chemical insecticides. The main objective of this research was to evaluate and optimize the insecticidal potential of many Essential Oils (EOs) and their bioactive molecules, both separately and in combination, as well as in combination with the chemical insecticide, Deltamethrin. This was conducted against female adults of the *Culex pipiens* mosquito, which plays a crucial role in the transmission of dangerous viruses such as West Nile virus and Usutu virus. The insecticidal activity was evaluated using the fumigation method in glass jars, following the standard protocol of WHO. The optimization of the insecticidal effect of binary and ternary mixtures of Essential Oils, their pure compounds, and Deltamethrin was achieved through the methodology of mixture design. On the other hand, we optimized the extraction method of EOs and, then, their insecticidal efficacy. For this purpose, a simultaneous hydrodistillation method was implemented using Citrus peels to extract the EO of *L. officinalis* through the response surface methodology.

Based on the LC_{50} values obtained for the studied Essential Oils, the EOs of *M. pulegium*, *O. basilicum*, and *R. officinalis* were the most active after 24h and 48h of treatment, with LC_{50} values lower than the highest concentration tested, which was 312.5 µl/L of air. The results obtained for the pure molecules revealed that the monoterpenes α-pinene, carvone, and camphor exhibited the lowest LC_{50} values after 24h, while camphor, 1,8-cineole, and α-pinene showed the lowest values after 48h. The results of the Essential Oils mixtures showed that the binary combination of 50% *L. stoechas* and 50% *R. officinalis* was the most effective, killing 86.96% of female mosquitoes after 48h of exposure. Meanwhile, the EO of *M. pulegium* was effective (85.45%) at 100%. The ternary mixture prepared with 67% *L. stoechas*, 17% *R. officinalis*, and 17% *M. pulegium* demonstrated an insecticidal efficacy of 77.45%. For the binary mixtures of monoterpenes, the most effective combination was that of 1,8-cineole (25%)+α-pinene (75%), causing 100% mortality after 48h of treatment. The results obtained with the mixture of *M. pulegium* and Deltamethrin are interesting, as all tested combinations showed higher insecticidal effects than the insecticide alone, especially after 48 h of exposure. A mortality rate of 100% was recorded by combining 25% of the EO and 75% of Deltamethrin. The results of the optimization of the extraction and the insecticidal activity indicated that the maximum yield (2.27 ± 0.98%) was achieved using 35g of Citrus peels, with a drying period of 2 days, and an extraction time of 140 minutes. The EOs

obtained through simultaneous hydrodistillation and tested for their insecticidal activity caused significant mortality with low LC_{50} values. It is also noteworthy that Deltamethrin at 0.05% did not induce a mortality rate reaching 50%, either after 24 or 48 hours. This scientific research highlighted the insecticidal potential of plant-based EOs; these natural substances that contain a wide range of bioactive chemical molecules could be an alternative to manage mosquito vectors of public health importance. These finding could help to develop natural insecticides that may be used as a safer and eco-friendly tool in integrated and sustainable mosquito management.

Keywords: Mosquito, *Culex pipiens*, Integrated Mosquito Management, Essential oils, Monoterpenes, Deltamethrin, Insecticidal potential, Optimization, Simultaneous distillation.

Liste des abréviations

HEs : Huiles Essentielles

PAMs : Plantes Aromatiques et Médicinales.

GC-MS : Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

MTV : Maladies à Transmission Vectorielle

ECDPC : European center for Disease Prevention and Control

OPS : Organisation Panaméricaine de la Santé

CL_{50} : Concentration létale qui tue 50% des individus

CDCP: Centers for Disease Control and Prevention

GIV : Gestion Intégrée des Vecteurs

IMM: Integrated Mosquito Management

LAV : Lutte antivectorielle

Liste des tableaux

Tableau 1. Différentes méthodes adoptées dans la lutte antivectorielle 20
Tableau 2. Profil phytochimique des HEs analysées par GC-MS..... 38
Tableau 3. Les HEs étudiées et leurs chémotypes. 65
Tableau 4. Résultats du test d'ANOVA après applications des d'HEs contre des adultes de C. pipiens 72
Tableau 5. Valeurs de CL_{50} obtenues après exposition des adultes de *C. pipiens* aux différentes HEs 73
Tableau 6. Valeurs de CL_{50} enregistrées pour les composés purs 82
Tableau 7. Expériences sélectionnées pour chaque combinaison 93
Tableau 8. Sept expériences sélectionnées pour chaque mélange binaire 94
Tableau 9. Composition chimique de mélanges des HEs de *L. stoechas, R. officinalis, M. pulegium* 96
Tableau 10. Mortalités enregistrées après application des mélanges des trois HEs 100
Tableau 11. Analyse de la variance (ANOVA Two-way) pour le modèle adopté..... 101
Tableau 12. Coefficients de régression estimés pour le modèle de régression cubique incomplet 102
Tableau 13. Efficacité insecticide des deux mélanges contre les femelles adultes de *C. pipiens* 106
Tableau 14. Analyse de la variance du modèle adopté pour tous les mélanges sélectionnés 106
Tableau 15. Coefficients de régression estimés pour le modèle choisi..... 108
Tableau 16. Efficacité insecticide des mélanges binaires de l'HE de la menthe et l'insecticide 113
Tableau 17. Analyse de la variance (ANOVA Two-way) pour le modèle adopté..... 114
Tableau 18. Coefficients de régression estimés par le modèle choisi 115
Tableau 19. Domaines expérimentaux des facteurs étudiés..... 121
Tableau 20. Matrice expérimentale de Box-Behnken 122
Tableau 21. Rendements en HEs obtenus dans les différentes expériences 123
Tableau 22. Analyse de la variance du modèle adopté 124
Tableau 23. Coefficients de régression estimés par le modèle choisi 124
Tableau 24. Composition chimique des HEs obtenues pour toutes les expériences réalisées ..... .127
Tableau 25. Pourcentages de mortalités calculés pour les trois expériences après 24h et 48h d'exposition des adultes femelles de *C. pipiens* à différentes concentrations 128
Tableau 26. Valeurs de CL_{50} enregistrées pour 3 expériences..... 128

Liste des figures

Figure 1. Cycle de développement des moustiques (Aïssaoui, 2014) 5
Figure 2. Mécanisme de la piqure du moustique et transmission du pathogène (SCIAMA, 2006) 7
Figure 3. Cycle biologique d'un moustique *Culex pipiens* 11
Figure 4. Distribution de *C. pipiens* dans le monde (les zones en couleur mauve) (Yuki and McBride, 2022) 12
Figure 5. Carte de distribution nationale de *C. pipiens* (Trari, 2017) 13
Figure 6. Cycle de transmission de West Nile Virus (Hayes et al., 2005) 15
Figure 7. Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez les moustiques (CNEV, 2014) 17
Figure 8. Structures chimiques de certains constituants des HEs (terpènes et terpénoides) 25
Figure 9. Mécanismes d'action des HEs (Dassanayake et al., 2016) 27
Figure 10. Dispositif de test utilisé pour évaluer l'effet fumigant des HEs d'Eucalyptus contre *Aedes aegypti* 28
Figure 11. Dispositif du test insecticide (gauche), des moustiques traités introduits dans 29
Figure 12. Représentation d'un mélange binaire 31
Figure 13. Représentation du mélange ternaire 31
Figure 14. Représentation du plan box-behnken à 3 facteurs 32
Figure 15. Schèma récapitulatif du Chapitre II 33
Figure 16. Carte thermiques des principales classes chimiques des HEs analysées. 42
Figure 17. Composition chimique des HEs de la famille Lamiacée de notre étude et de celle de la littérature 51
Figure 18. Composition chimique de l'HE d'*E. globulus* (Famille Myrtacée) de notre étude et de celle de la littérature 54
Figure 19. Composition chimique des HEs de la famille Astéracée de notre étude et de celle de la littérature 58
Figure 20. Composition chimique de l'HE de *C. limon* de la famille Rutacée de notre étude et de celle de la littérature 60
Figure 21. Schèma récapitulatif du Chapitre III 62
Figure 22. Localisation géographique du site d'échantillonnage (Oued El-Mehraz : Google Earth Pro 2023) 66
Figure 23. A: Gîte larvaire ; B: Cage d'élevage ; C: Identification morphologique 67
Figure 24. Présentation de la méthode de fumigation dans des bocaux en verre 68
Figure 25. Structures moléculaires des molécules pures étudiées, dessinées par le logiciel professionnel ChemBioDraw (version 16.0). 68
Figure 26. Mortalités des adultes femelles après 24h d'exposition aux HEs étudiées selon différentes concentrations. L'insecticide : Deltaméthrine (0, 05%). 70

Figure 27. Mortalités des adultes femelles après 24h d'exposition aux HEs étudiées selon différentes concentrations. L'insecticide : Deltaméthrine (0, 05%)..... 71

Figure 28. Activité des monoterpènes sur les adultes de *C. pipiens* à différentes concentrations après 24h (A) et 48h (B) de traitement. Les résultats sont des moyennes de trois répétitions (n = 3). 81

Figure 29. Schéma récapitulatif du chapitre IV 90

Figure 30. Variations de la composition chimique des HEs dans les différents mélanges 97

Figure 31. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles après 24h et 48h de traitement..... 101

Figure 32. Profile de mélange 2D montrant la zone de l'optimisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) en fonction des trois HEs (A : *L. stoechas*, B : *R. officinalis* ; C : *M. pulegium*) 103

Figure 33. Représentation 3D montrant la zone de maximisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) de l'application du mélange des trois HEs (A : *L. stoechas*, B : *R. officinalis* ; C : *M. pulegium*) 103

Figure 34. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles pour les deux mélanges binaires. M1 : 1,8-cinéole+ α-pinène ; M2 : carvone+ R (+)-pulegone 107

Figure 35. Graphique de combinaison binaire montrant la zone de maximisation de la réponse étudiée en fonction de la proportion des composés. M1 (1,8-cinéole+ α-pinène) ; M2 (carvone+ R(+)-pulégone)..... 109

Figure 36. Profil de désirabilité des conditions optimales pour maximiser le taux de mortalité pour le mélange 1 (a) à 24h et (b) à 48h..... 110

Figure 37. Profil de désirabilité des conditions optimales pour maximiser le taux de mortalité pour le mélange 2 (a) à 24h et (b) à 48h..... 111

Figure 38. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles après 24h (A) et 48h (B) de traitement..... 114

Figure 39. Graphique de combinaison binaire montrant la zone de maximisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) en fonction de la proportion de l'HE et l'insecticide..... 115

Figure 40. Schèma récapitulatif du Chapitre V..... 118

Figure 41. Montage de l'hydrodistillation par co-solvant..... 120

Figure 42. Représentation 2D (a) et 3D (b) des paramètres conduisant à un rendement optimal 125

Table de matières

Dédicaces .....
Remerciements .....
Production scientifique .....
Résumé .....
Abstract .....
Liste des abréviations .....
Liste des tableaux .....
Liste des figures .....
Introduction générale 1
Chapitre I Synthèse bibliographique 4
I. Maladies à Transmission Vectorielle : Aperçu général et intérêt épidémiologique 5
I.1 Vecteurs des maladies transmissibles : Famille des Culicidae 5
I.1.1 Position systématique 5
I.1.2 Biologie et écologie 5
I.1.3 Importance médicale 6
I.2 Situation épidémiologique des maladies à transmission vectorielle. 7
I.2.1 Au niveau mondial 7
I.2.2 Au niveau national 10
I.3 Moustique *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) 11
I.3.1 Bioécologie 11
I.3.2 Répartition géographique 12
I.3.3 Situation épidémiologique 13
I.4 Moyens de lutte contre les larves et les adultes des moustiques 15
I.4.1 Lutte physique 15
I.4.2 Lutte chimique 16
I.4.2.1 Insecticides chimiques 16
I.4.2.2 Contexte reglementaire 18
I.4.3 Lutte biologique contre les moustiques 19
I.4.4 Lutte génétique 20
I.5 Lutte antivectorielle au Maroc 20
II. Plantes aromatiques et médicinales (PAMs) 21
II.1 Secteur des PAMs au Maroc 21

II.2 Importance socio-économique de la filière des PAMs au Maroc 21
II.3 Techniques d'extraction des huiles essentielles 22
II.3.1 Méthodes traditionnelles d'extraction des HEs 22
II.3.2 Méthodes innovantes d'extraction des HEs 22
II.4 Les huiles essentielles 23
II.4.1 Généralités 23
II.4.2 Composition chimique des HEs 23
III. Les HEs en tant que bioinsecticides 25
III.1 Généralités 25
III.2 Quelques méthodes d'évaluation des activités insecticides des HEs 27
III.2.1 Activité insecticide par fumigation dans des tubes acryliques transparents .. 27
III.2.2 Activité insecticide par fumigation par des cônes 28
III.2.3 Méthode de fumigation 29
IV. Optimisation de l'activité insecticide par les plans d'expériences 29
IV.1 Plans d'expériences 29
IV.1.1 Plan de mélange 30
IV.1.1.1 Plan à deux constituants 30
IV.1.1.2 Plan de mélange à trois constituants 31
IV.2 Plan de surface de réponse 31
Chapitre II Détermination des profils aromatiques des huiles essentielles étudiées 33
Introduction 34
Matériel et Méthodes 36
I. Lieu et période d'étude 36
II. Extraction et composition chimique des PAMs étudiées 36
II.1 Matériel végétal 36
II.2 Extraction des HEs 36
II.3 Analyse chimique des HEs 37
Résultats et discussion 37
I. Rendement en HEs 37
II. Détermination du profil chimique des espèces étudiées 38
II.1.1 Profil chimique des PAMs de la famille Lamiacée 42
II.1.1.1 Composition chimique de l'HE de *L. stoechas* 42
II.1.1.2 Composition chimique de l'HE de *L. officinalis* 44

II.1.1.3 Composition chimique de l'HE de *M. pulegium* 45
II.1.1.4 Profil chimique de *R. officinalis* 47
II.1.1.5 Profil chimique d'*O. basilicum* 49
II.1.2 Profil chimique des PAMs de la famille Myrtacée 52
II.1.2.1 Profil chimique d'*E.globulus* 52
II.1.3 Profil chimique des PAMs de la famille Astéracée 54
II.1.3.1 Profil chimique d'*A. herba-Alba* Asso 54
II.1.3.2 Profil chimique d'*O. mixta* 56
II.1.4 Profil chimique des PAMs de la famille Rutacée 58
II.1.4.1 Profil chimique de *C. limon* 58
Conclusion chapitre II 61
Chapitre III Evaluation des effets adulticides des huiles essentielles et de leurs molécules majoritaires sur le moustique *C. pipiens* 62
Introduction 63
Matériel et Méthodes 65
I. Choix des HEs 65
II. Echantillonnage et élevage de la cible biologique (*C. pipiens*) 65
II.1 Choix du moustique et le gîte larvaire 65
II.2 Echantillonnage quantitatif et élevage des larves du *C. pipiens* 66
II.3 Identification morphologique des moustiques adultes du *C. pipiens* 67
III. Evaluation de l'activité insecticide des HEs sur *C. pipiens* 67
IV. Analyse statistique 68
Résultats et discussion 69
I. Effet adulticide des HEs étudiées 69
II. Effet insecticide des molécules majoritaires pures 80
Conclusion Chapitre III 88
Chapitre IV Optimisation de l'activité insecticide par les plans de mélanges 90
Introduction 91
Matériel et Méthodes 92
I. Matériel 92
II. Méthodes 92
II.1 Préparation des mélanges par la méthodologie de plan de mélange 92

II.1.1 Mélange ternaire par les HEs de *L. stoechas, R. officinalis* et *M. pulegium* 92
i. Composition chimique 92
ii. Plan de mélange 93
a) Plan de mélange adopté et matrice d'expériences 93
b) Modèle mathématique 93
II.1.2 Mélange binaire des molécules bioactives et mélange de l'HE de *M. pulegium* et Deltaméthrine 94
II.1.2.1 Plan de mélange adopté 94
II.1.2.2 Modèle mathématique adopté 94
II.1.2.3 Evaluation de l'activité insecticide 95
II.1.2.4 Traitement statistique 95
Résultats et discussion 95
I. Mélange ternaire des HEs de *L. stoechas, R. officinalis* et *M. pulegium* 95
I.1 Profil phytochimique des mélanges des HEs de *L. stoechas, R. officinalis, M. pulegium* 95
I.2 Mortalités enregistrées par les mélanges ternaires 100
I.3 Traitement de la conception du mélange 100
I.3.1 Validation statistique du modèle choisi 100
I.3.2 Coefficients des mélanges ternaires 101
I.3.3 Optimisation de la formulation (Réponse= Mortalité) 102
II. Mélanges binaires des molécules bioactives 105
II.1 Effet insecticide des mélanges binaires 105
II.2 Traitement de la conception du mélange 106
II.2.1 Validation statistique du modèle sélectionné 106
II.2.2 Coefficients des mélanges binaires 107
II.2.3 Zones de réponses maximales (Isoresponses) 108
II.2.4 Fonction de désirabilité (Mortalité optimale) 109
III. Mélange binaire de l'HE de *M. pulegium* et Déltamethrine 113
III.1 Effet insecticide des mélanges binaires testés 113
III.2 Traitement de la conception du mélange binaire de l'HE et Déltamethrine 113
III.2.1 Validation statistique du modèle choisi 113
III.2.2 Coefficients des mélanges binaires 114
III.2.3 Zones de réponses maximales (Isoresponses) 115
Conclusion Chapitre IV 116

Chapitre V Effet de la distillation simultanée de Lavandula officinalis sur l'activité insecticide 118
Introduction 119
Matériel et Méthodes 119
I. Matériel végétal 119
II. Extraction des HEs de *L. officinalis* 119
III. Analyse chromatographique 120
IV. Plan d'optimisation adopté 120
IV.1 Identification des facteurs 120
IV.2 Définition de la réponse 121
IV.3 Matrice d'expérimentations 121
IV.4 Modèle mathématique 122
V. Test insecticide 122
VI. Analyses statistique et optimisation 123
Résultats et discussion 123
I. Plan d'expérimentation et rendement 123
II. Validation statistique du modèle adopté 124
III. Composition chimique 126
IV. Evaluation de l'activité insecticide contre *C. pipiens* 127
Conclusion Chapitre V 130
Conclusion générale et Perspectives 132
Références bibliographiques 136

Introduction générale

Les moustiques (Diptera : Culicidae) représentent l'un des vecteurs les plus importants du groupe des Arthropodes et sont bien connus en raison du risque élevé qu'ils représentent pour la santé humaine et animale. Ces insectes, en particulier les genres Culex, Aedes et Anophèles, sont hématophage c'est-à-dire sont capables de transmettre de dangereux agents pathogènes (Bactéries, parasites, virus, nématodes…) responsables à l'émergence de nombreuses maladies infectieuses telles que la dengue, le paludisme, la fièvre jaune, la maladie à virus Zika, le chikungunya, l'encéphalite japonaise, la filariose, la fièvre de la vallée du Rift et le virus du Nil occidental, qui causent des millions de morts chaque année (Benelli, 2015; Benelli and Mehlhorn, 2016 ; Benelli and Duggan, 2018 ; Benelli and Romano, 2017 ; Mayer et al., 2016 ; Shaukat et al., 2019). Le moustique *Culex pipiens* L. (*C. pipiens*) est un vecteur d'importants arbovirus tels le virus de la fièvre du Nil occidental, le virus Usutu, ainsi que celui de l'encéphalite japonaise (Clé et al., 2018, Eybpoosh et al., 2019 ; Hernández-Triana et al., 2018). *C. pipiens*, en transmettant ces virus, peut provoquer des réactions allergiques, et dans certains cas, il affecte le système nerveux tout en entrainant des dommages neurologiques (méningites, encéphalites) pouvant entraîner la mort (García-Carrasco et al. 2021 ; OMS, 2017a). Ces rapports soulignent la nécessité d'adopter des stratégies de gestion efficaces contre les moustiques en général dans le cadre du programme de lutte antivectorielle afin de contrôler et prévenir les maladies transmises par ces insectes (Huang et al., 2017 ; Govindarajan et al., 2016a). En effet, differents moyens de lutte sont adoptés à savoir la méthode physqiue (Assèchement des milieux humides, renouvèlement fréquents des réserves d'eau), biologique (Introduction des poissons larvivores, des insectes ou des microorganismes entomopathogènes), génétique (Introduction des insectes stériles), et la méthode chimique qui fait référence à l'utilisation d'insecticides de synthèse et qui est la plus utilisée. Néanmois, l'utilisation des insecticides chimiques entraine un déséquilibre environnemental, y compris la pollution de l'environnement, la perturbation des écosystèmes, ainsi que la toxicité envers les organismes non-cibles. De plus, l'utilisation irrationnelle des insecticides chimiques a entrainé l'apparition de la résistance et la résistance croisée chez les moustiques (Scott et al., 2015 ; El Joubari et al., 2015 ; El-Akhal et al., 2016 ; Tmimi et al., 2018 ; Aboulfadl et al. 2020). Depuis des années, la gestion durable, efficace et respectueuse de l'environnement des moustiques vecteurs a attiré l'attention des chercheurs qui s'est traduite par un nombre important de rapports sur l'efficacité de la lutte biologique à l'égard des moustiques (Benelli and Beier 2017 ; Fernandes et al. 2018). D'ailleurs, le recours au bio-

contrôle des moustiques constitue l'une des cinq stratégies fondamentales de la Gestion Intégrée des Vecteurs (GIV), reconnue comme la meilleure approche pour contrôler ces insectes et de réduire la transmission des arbovirus (AMCA, 2021). En effet, avec la gestion efficace de la propagation des moustiques, il est possible de diminuer les futurs impacts des épidémies transmises par ces insectes.

Dans le cadre de la lutte antivectorielle integrée, les produits naturels à base des plantes peuvent représenter une approche alternative, sûre et écologique, pour un contrôle durable des vecteurs (Pavela et al., 2019). Il est reconnu que les extraits des plantes peuvent avoir une action insecticide contre les différents stades larvaires et adultes des culicidés. Par conséquent, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux huiles essentielles issues des Plantes Aromatiques et Médicinales (PAMs) en tant qu'agents naturels de lutte contre les vecteurs et sans effets néfastes pour l'environnement et la santé humaine, ces métabolites secondaires ont fait l'objet d'une grande attention en tant que composés efficaces contre plusieurs espèces d'insectes (Pavela, 2016). Elles contiennent naturellement une large gamme de molécules bioactives y compris les monoterpènes, les sesquiterpènes et les phénypropènes. Nombreuses études ont rapporté l'efficacité des HEs ainsi que leurs dérivés chimiques contre les moustiques du genre Culex (Koliopoulos et al., 2010; Zahran and Abdelgaleil, 2011 ; Govindarajan et al., 2013 ; Ma et al., 2014 ; Benelli et al., 2015 ; Badawy et al., 2017 ; Zahran et al., 2017; Tabari et al., 2017 ; Pavela et al., 2019, Pavela et al., 2020, Pavela et al., 2021). Au Maroc, l'effet insecticide des HEs issues de différentes plantes a été rapporté envers le stade larvaire du moustique *C. pipiens* (El-Akhal et al., 2021a). Néanmoins, et d'après nos connaissances, aucun rapport n'a été publié au Maroc, jusqu'au présent, sur l'activité adulticide des HEs et leurs molécules bioactives pour lutter contre des femelles du *C. pipiens*.

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'objectif principal de cette thèse qui est l'évaluation et l'optimisation de l'activité insecticide de neuf HEs, et de leurs molécules pures, séparément et en combinaison, contre les adultes femelles du moustique *C. pipiens*. Les objectifs secondaires s'articulent autour de quatre objectifs :

- Le premier objectif de ce travail est consacré à la caractérisation phytochimique de neuf HEs, appartenant à différentes familles botaniques, tels que *Lavandula stoechas* L., *Lavandula officinalis* L., *Mentha pulegium* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptus globulus* Labill., *Artemisia herba alba* Asso, *Ormenis mixta* L. et *Citrus limon* L.

- Le deuxième objectif s'est concentré sur la valorisation de neuf HEs, ainsi que certaines molécules bioactives à savoir 1,8-cinéole, α-pinène, carvone, R(+)-pulégone, camphre, et D-limonène en tant que bio-insecticides contre les moustiques adultes femelles de *C. pipiens.*
- Le troisième objectif vise à optimiser l'efficacité envers ce moustique par l'approche de plan de mélange en adoptant une combinaison ternaire des HEs de *Lavandula stoechas* L., *Mentha pulegium* L., *Rosmarinus officinalis* L., un mélange binaire des monoterpènes, 1,8-cinéole, α-pinène, carvone, et R(+)-pulégone, et enfin l'élaboration d'une formulation par un mélange binaire de l'HE de la menthe et l'insecticide chimique, Déltamethrine.
- Le quatrième objectif est consacré à l'optimisation de la méthode d'extraction de l'HE de *Lavandula officinalis* L., en adoptant la méthodologie du plan de surface de réponse et aussi à l'évaluation de l'effet insecticide des HEs obtenues.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Maladies à Transmission Vectorielle : Aperçu général et intérêt épidémiologique

I.1 Vecteurs des maladies transmissibles : Famille des Culicidae

I.1.1 Position systématique

Les Culicidés communément nommés moustiques, constituent un groupe important dans la classe des insectes, ils font partie de l'ordre des Diptères et au sous-ordre des Nématocères, appartenant à l'embranchement des arthropodes (Rodolphe, 2011 ; Dahchar, 2017). On distingue trois sous-familles de la famille des Culicidae ; les Toxorhynchitinae, les Anophelinae et les Culicinae. Cette dernière sous-famille est sectionnée en 6 tribus dont la tribu Culicini Meigen, 1818 est représentée au niveau du Maroc par un seul genre qui est le Culex, comprenant 4 sous-genres y compris Culex Linnaeus, 1758 (Himmi, 2007 ; Trari 2017). Un nombre de 3721 espèces de moustiques réparties en 113 genres sont inventoriées au niveau mondial, la sous-famille Anophelinae compte trois genres et Culicinae 110 genres (Harbach, 2023). Les genres les plus étudiés et rapportés sont Culex, Aedes et Anopheles. Le genre *Culex* regroupe à lui seul 778 espèces réparties dans 26 sous-genres (Bousses et al., 2022).

I.1.2 Biologie et écologie

Ces petits insectes au corps allongé se différencient des autres Nématocères piqueurs par sa longue trompe ainsi que par la présence d'écailles sur les nervures des ailes (Dahchar, 2017). Les moustiques sont des insectes à métamorphose complète (holométaboles) avec une évolution progressive qui affecte parallèlement la larve et l'adulte (Bendali-Saoudi, 2006).

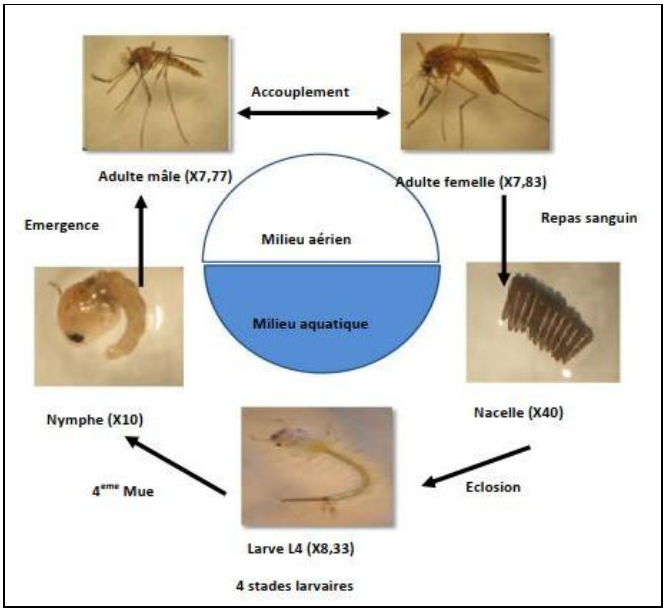


Figure 1. Cycle de développement des moustiques (Aïssaoui, 2014)

Leur cycle de vie se compose de quatre stades différents: Le stade œuf, larve, nymphe et l'adulte (aussi appelé l'imago). Ils se caractérisent par une vie aquatique concernant les trois premiers stades de développement, pré- imaginaux tels que l'œuf, la larve avec ses quatre stades (L1, L2, L3 et L4) et la nymphe, et l'autre vie aérienne au stade adulte (mâle et femelle) (Trari, 2017) (Figure 1).

I.1.3 Importance médicale

Bien qu'ils jouent un rôle dans l'écosystème tout en participant à la pollinisation ou à la nutrition comme source de nourriture (Torok et al., 2020), les moustiques sont bien réputés à cause de leur large distribution et leur forte abondance pour leurs fortes nuisances qui se traduit par des piqûres douloureuses et gênantes, et ils constituent le groupe le plus important des insectes vecteurs de nombreuses maladies vectorielles, humaines comme animales tout en transmettant plusieurs agents pathogènes (parasites, arbovirus, et nématodes). Le fait qu'ils soient hématophages est la raison pour laquelle ils peuvent transmettre ces agents pathogènes aux humains et aux animaux domestiques (Aïssaoui, 2014). Ainsi, pendant la piqure la femelle injecte de la salive anticoagulante (Figure 2), qui chez l'homme provoque une réaction inflammatoire plus ou moins importante selon les individus (Terrien, 2008) et peut transmettre des plasmodiums, des microfilaires ou des arbovirus (Adja et al., 2011). Toutes ces caractéristiques accordent à cette faune culicidienne une importance économique et un intérêt sanitaire important. En effet, les moustiques appartenant aux genres Culex, Aedes et Anopheles sont généralement reconnus comme étant les principaux vecteurs potentiels d'infections virales telles que le chikungunya, la dengue, la maladie à virus Zika, la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise, la fièvre du Nil occidental, ainsi que des maladies parasitaires telles que le paludisme et la filariose lymphatique. Ces maladies, avec les niveaux élevés de morbidité et de mortalité qu'elles entraînent, peuvent avoir des effets financiers et sociaux négatifs considérables constituant ainsi des obstacles significatifs pour le développement, la stabilité économique et la structure sociale (Franklinos et al., 2019).

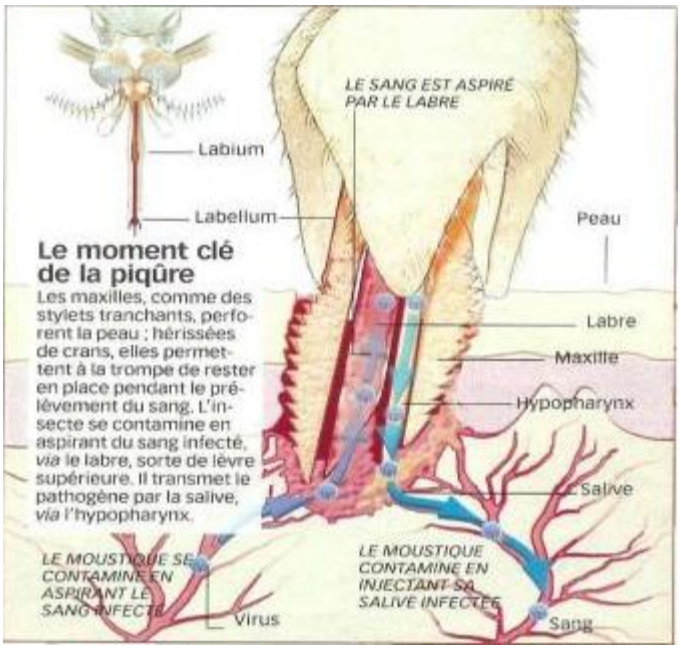


Figure 2. Mécanisme de la piqure du moustique et transmission du pathogène (SCIAMA, 2006)

En général, la transmission se produit par le biais de cycles très complexes comprenant divers hôtes et vecteurs (Diaz et al., 2013). En effet, les moustiques sont considérés comme le vecteur et les oiseaux comme le réservoir, tandis que les humains, les chevaux et d'autres mammifères sont considérés comme des hôtes qui ne contribuent pas à la propagation de la maladie (Rizzo et al., 2015; Toussaint et al., 2006). Ainsi, les oiseaux migrateurs pouvaient jouer le rôle d'hôte introducteur de différentes manières : ils peuvent infecter des arthropodes hématophages, transmettre directement des agents pathogènes, transporter des vecteurs infectés pendant leur migration, ou encore être infectés après leur arrivée à leur point d'atterrissage final (Brown and O'Brien, 2011; Maquart et al., 2021).

I.2 Situation épidémiologique des maladies à transmission vectorielle.

I.2.1 Au niveau mondial

Les maladies à transmission vectorielle (MTV) représentent actuellement 17% des maladies infectieuses ; et 28 % des maladies émergentes (OMS, 2020a). Plus de 80% de la population mondiale sont exposés au risque de contracter une maladie à transmission vectorielle. Ces maladies causent des millions de décès chaque année (Benelli and Mehlhorn, 2016 ; Paixão et al., 2017 ; Longbottom et al., 2017; Benelli and Duggan, 2018 ; Benelli and Romano, 2017; Mayer et al., 2016 ; Shaukat et al., 2019; Soni et al., 2023). Selon les données de l'OMS en 2020, plus de 700 000 décès surviennent chaque année dans le monde en raison de MTV telles que la dengue, la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise, la leishmaniose, la

maladie de Chagas, l'onchocercose, le paludisme, la schistosomiase et la trypanosomiase humaine africaine (OMS, 2020a).

En effet, le paludisme c'est une maladie infectieuse qui figure parmi les infections les plus mortelles dans le monde entier. Elle est causée par les parasites Plasmodium, transmis à l'homme par les moustiques du genre Anopheles. En 2018, environ 50% de la population mondiale répartie dans 91 pays et territoires résidait dans des régions exposées au risque de transmission du paludisme. On estime à 228 millions le nombre de cas et à 405 000 le nombre de décès liés à cette maladie à l'échelle mondiale (OMS, 2020b; CDCP, 2020). Au cours de cette période, l'Afrique a porté de manière immense la charge mondiale de la maladie. Cette région a enregistré 93 % des cas du paludisme dans le monde et 94 % des décès liés à cette maladie. Selon les régions établies par l'OMS, la même année a montré que le parasite, *Plasmodium falciparum*, était responsable de la majorité des cas estimés en Afrique (99,7%), en Méditerranée orientale (71%), dans le Pacifique occidental (65 %) et en Asie du Sud-Est (50 %). Quant à la région des Amériques, le *Plasmodium vivax* prédominait, étant à l'origine de 75 % des cas du paludisme (OMS, 2017b). A l'échelle mondiale en 2020, et d'après les données de l'OMS, 241 millions de cas de paludisme et 627 000 décès ont été enregistrés. Ces chiffres représentent des hausses de 6 % et 12 % par rapport à l'année 2019 (Sy et al., 2023). Récemment et aux États-Unis, cinq cas de paludisme liés à une transmission locale par les moustiques ont été confirmés en Floride et au Texas entre fin mai et début juillet 2023, c'était la première fois qu'il y avait une propagation locale en 20 ans dans le pays (CDC, 2023).

De même, la dengue est une maladie virale transmise par les moustiques du genre Aedes. Elle représente une menace pour la moitié de la population mondiale. Les cas de la dengue sont principalement signalés dans les régions tropicales et subtropicales du monde entier. La dengue impose une charge économique et sociale significative, et au fil des dernières décennies, son impact a considérablement augmenté. Selon une étude de prévalence, environ 3,9 milliards de personnes réparties dans 128 pays sont exposées au risque d'infection. D'après des estimations récentes de l'OMS, le nombre annuel d'infections de la dengue s'élève à 390 millions, entraînant environ 20 000 décès avec 96 millions de cas se sont manifestés cliniquement (OMS, 2020c). Selon le rapport de surveillance du Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDPC, 2018), environ 27 pays ont signalé des cas de la dengue dans l'Union Européenne, parmi lesquels des cas autochtones ont été signalés en France et en Espagne. En Afrique, le gouvernement du Soudan a signalé, entre juillet 2022 et

Avril 2023, plus de 2 700 cas confirmés de dengue et au moins 8 600 cas suspectés (DuRose, 2023).

En outre, la fièvre chikungunya est une maladie virale transmise par les moustiques du genre Aedes avec les deux espèces *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* sont les plus associées à des épidémies importantes de chikungunya. Elle a été détectée dans plus de 60 pays en Asie, en Afrique, en Europe et en Amérique. Cette maladie, pour laquelle il n'existe que des traitements symptomatiques, a connu une augmentation exponentielle dans les Amériques. Selon l'OMS, pendant les quatre premiers mois de 2022, la région a enregistré environ 135 000 cas (OMS, 2017c; AMSE, 2018).

Quant à l'infection à Zika, c'est une maladie émergente due à un virus transmis par la piqûre des moustiques du genre Aedes. Celle maladie se manifeste principalement dans les zones tropicales des Amériques, de l'Afrique, de l'Asie et du Pacifique (OMS, 2018a). Actuellement, des millions de personnes dans 97 pays et territoires, principalement en Asie du Sud-Est, en Amérique et en Afrique, sont exposées au risque d'infection par le virus Zika (PNUD, 2017). L'Amérique représente toujours une zone de risque avec 500 000 cas suspectés ont été signalés pendant la période 2016 (OPS, 2016). Les données de l'Organisation Panaméricaine de la Santé (OPS), en 2023, ont montré que la maladie à virus Zika présente une incidence de 27 000 cas (OPS, 2023). Selon le Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique (2016), la région africaine a également été identifiée comme un foyer actif pour l'émergence et la propagation de ce virus.

La filariose lymphatique est aussi parmi les MTV de grande importance dans la santé publique, est une maladie du système lymphatique et connue sous le nom d'éléphantiasis. L'infection survient lorsque des moustiques transmettent à l'homme les parasites filaires. D'ailleurs, différents types de moustiques sont responsables à la transmission de ces vers. Les moustiques Aedes jouent le rôle de vecteur dans certaines îles du Pacifique où la maladie est endémique. Les moustiques Anopheles, présents dans les zones rurales. De plus, les moustiques Culex, présents dans les zones urbaines et semi-urbaines, agissent également comme vecteurs. La diversité des habitats où ces moustiques se trouvent contribue à la prévalence élevée de cette maladie (OMS, 2020d). Cette maladie provoque des œdèmes, et on estime qu'à l'échelle mondiale, 15 millions de personnes souffrent de lymphoedème, 25 millions d'hommes sont touchés par l'hydrocèle, et au moins 36 millions de cas de défiguration des membres sont recensés (OMS, 2020d). Environ 65 % des cas sont détectés dans la région de l'Asie du Sud-Est, tandis que 30 % proviennent de la région africaine. Les

cas restants sont répartis dans les zones tropicales, incluant certaines parties des Amériques et du Pacifique occidental (OMS, 2014). A travers le monde, une population dépassant les 882 millions de personnes dans 44 pays, est exposée au risque de contracter la filariose lymphatique. En 2018, le nombre d'infections s'élevait à 51 millions de personnes (OMS, 2023). D'après le Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique (2019), il existe plus de 38 millions de cas de filariose lymphatique dans la Région Africaine de l'OMS.

Il existe d'autres MTV et qui constituent un sérieux problème de la santé publique, notamment dans la Région africaine de l'OMS par exemple la fièvre jaune dont de flambées épidémiques par cette maladie virale sont en augmentation dans la Région (Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique, 2019).

La propagation des arbovirus est apparemment liée à de nombreux facteurs tels que les changements climatiques, l'urbanisation et l'évolution des activités anthropiques comme les voyages (Torok et al., 2020).

I.2.2 Au niveau national

Le Maroc a été historiquement touché par le paludisme. Grâce au Programme National de Lutte contre le Paludisme, plusieurs décennies d'efforts ont conduit à la diminution du nombre de cas, aboutissant à l'interruption permanente de la transmission de la maladie en 2004 (BRMO, 2017). Après cinq années de consolidation de cette élimination, le Maroc a obtenu la certification de pays indemne du paludisme de l'OMS en 2010. Malgré le maintien de l'élimination du paludisme autochtone pendant 17 ans, la possibilité d'une réapparition subsiste en raison de la persistance des vecteurs de la maladie et de l'augmentation des cas de paludisme importé, atteignant une moyenne de 500 cas par an (MSPS, 2022). Le Maroc est très bien connu pour son ouverture aux pays européens et africains ce qui favorise l'augmentation de risque de transmission des maladies. En effet, la région de Fès a un bioclimat semi-aride, elle se situe à proximité des zones ayant un passé épidémiologique et présentant un risque potentiel de transmission de maladies notamment de paludisme ; provinces de Chefchaouen, Khouribga, Khémisset et Taounate (Faraj et al. 2003). Elle accueille également un grand nombre des ressortissants étrangers venant de différents pays d'Afrique, d'Asie et d'Europe, et cette particularité a une incidence considérable sur la progression des arbovirus qui pourrait constituer une menace pour la population (El Ouali Lalami et al., 2010). Le pays a également été touché par des épidémies du Virus de Nil Occidental en 1996, 2003 et 2010 (Fassil, et al., 2012 ; Figuerola et al., 2009). Au Maroc, le risque d'introduction des arboviroses est associé à la possibilité d'entrée de personnes malades

en provenance de zones endémiques, ainsi qu'au risque d'introduction ou de présence de vecteurs compétents (Faraj et al., 2018).

I.3 Moustique *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae)

I.3.1 Bioécologie

Le moustique commun ou maringouin domestique, *C. pipiens* Linnnaeus, 1758 fait partie du complexe "*Culex pipiens"*, et est l'espèce la plus commune des moustiques du genre Culex. Il se développe à la fois dans les milieux urbains et dans les eaux riches en matière organique et stagnantes, et est actif durant toute l'année atteignant un pic de développent pendant la saison chaude (Faraj et al., 2006). Le cycle de développement (Figure 3) débute quand les femelles déposent à la surface de l'eau, les œufs qui sont blanchâtres, sous forme d'un radeau, regroupés en nacelles flottantes (Faraj et al., 2006). Les larves sont nageuses et très mobiles, elles se déplacent grâces à des torsions du corps, souvent en serpentant la surface de l'eau et on distingue quatre stades larvaires notés généralement L1, L2, L3, L4. La nymphe représente le stade du développement intermédiaire entre la larve et l'adulte. C'est une pupe mobile dans l'eau qui désigne la sortie de l'adulte à la surface d'eau mais elle ne se nourrit pas pendant cette période (Berchi, 2000). *Culex pipiens* se caractérise par un siphon ou tube respiratoire long et étroit affleurant à la surface de l'eau qui caractérise la sous-famille des *Culicinae*. Ce tube est muni de 5 clapets qui s'ouvrent sur deux orifices où l'air pénètre à l'intérieur quand la larve monte à la surface ; ils se rabattent quand la larve descend à la profondeur (Himmi et al., 1995).



Figure 3. Cycle biologique d'un moustique *Culex pipiens*

I.3.2 Répartition géographique

Culex pipiens est une espèce originaire d'Afrique, d'Asie et d'Europe (Harbach, 2012 ; Trari, 2019), ayant pu coloniser d'autres parties du monde (Harbach, 2011) et dont l'expansion du Sud vers le Nord est fort probable (Asgharian et al., 2015). *C. pipiens* est une espèce ubiquiste, et très répondue dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie, d'Afrique, d'Australie, d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud (Harbach, 2012) (Figure 4).

Cette espèce est bien distribuée en Europe et en Afrique du Nord (Trari, 2017 ; Kettani et al., 2022**,** Brugman et al., 2018). Elle se trouve en Italie (Di Luca et al., 2016), en Belgique (Boukraa et al., 2015), en France métropolitaine (Martinet, 2021), et en Espagne (Bueno Marí *et al*., 2012; 2014). Dans le continent africain, *C. pipiens* est largement répandue en Afrique du Nord y compris les pays du Maghreb à savoir le Maroc, l'Algérie, et la Tunisie (Amraoui et al., 2012 ; Amara Korba et al., 2016; Hamaidia and Berchi, 2018).*C. pipiens* est très abondante au Maroc (Figure 5) (Trari, 2017) qui présente un point de rencontre de plusieurs citoyens étrangers. Il convient ainsi d'indiquer que les voyages plus le phénomène du changement climatique ont beaucoup contribué à la distribution de ce moustique (Tjaden et al., 2017 ; Franklinos et al., 2019). Ainsi, *C. pipiens* c'est l'espèce la plus répondue au niveau des gîtes représentatifs de la région de Fès (Mouatassem et al., 2021).

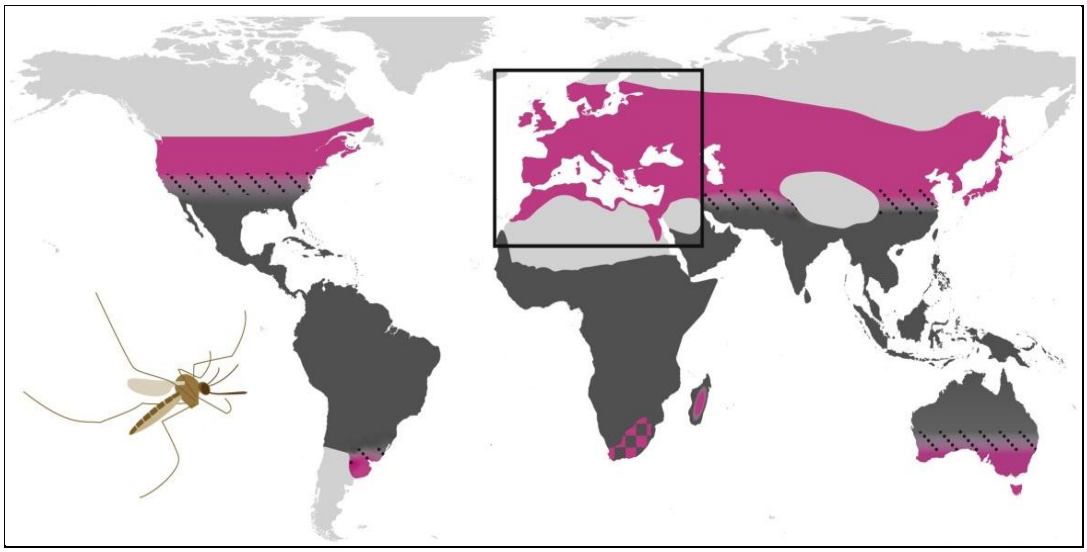


Figure 4. Distribution de *C. pipiens* dans le monde (les zones en couleur mauve) (Yuki and McBride, 2022)

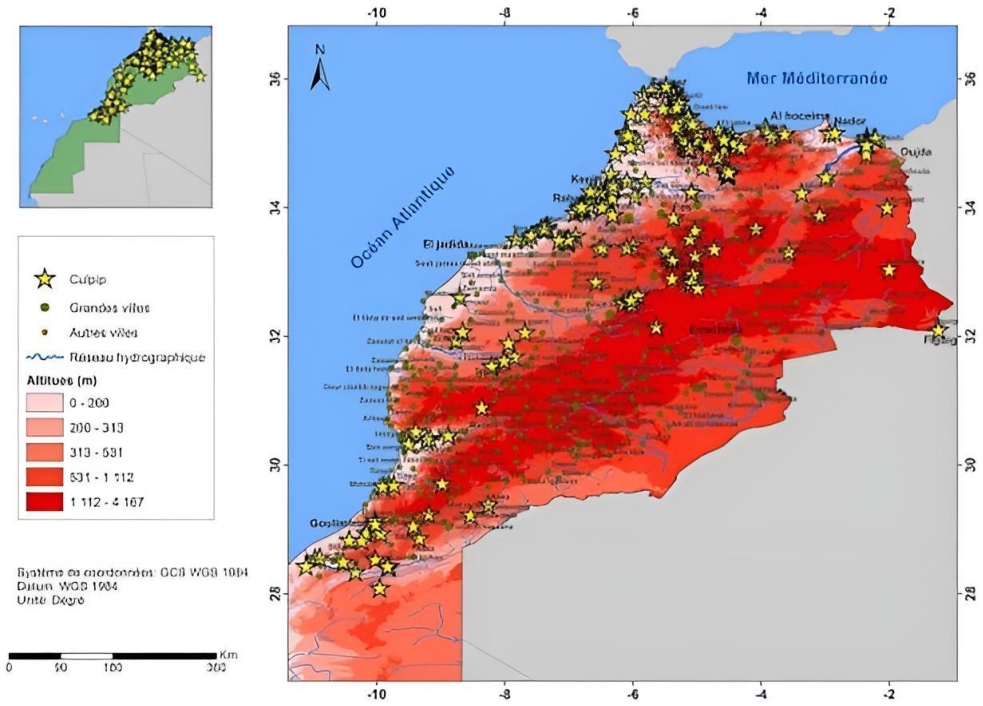


Figure 5. Carte de distribution nationale de *C. pipiens* (Trari, 2017)

I.3.3 Situation épidémiologique

L'intérêt médical du moustique *C. pipiens* réside dans la transmission de plusieurs maladies aussi bien à l'homme et l'animal notamment les chevaux dont les oiseaux constituent généralement le réservoir. *C. pipiens* est un vecteur d'importants arbovirus, notamment le virus du Nil occidental (VNO) qui peut provoquer la fièvre du Nil occidental et, dans certains cas, affecter le système nerveux, entraînant des symptômes graves pouvant entraîner la mort (García-Carrasco et al., 2021). C'est une maladie causée par la transmission d'un Flavivirus (famille des Flaviviridae) qui a été isolé pour la première fois dans le district du Nil occidental en Ouganda en 1937. Le cycle de transmission commence lorsque le moustique (vecteur), pique un oiseau infecté (hôte amplificateur), le virus pénètre dans le flux sanguin du moustique et passe finalement dans ses glandes salivaires. Le moustique infecté pique un animal ou un humain (hôte accidentel) (Figure 6) et donc le virus passe dans la circulation sanguine de l'hôte où il peut provoquer une maladie grave (Mohamed Sayed-Ahmed 2016). Généralement, le moustique *C. pipiens* provoque des réactions allergiques qui comprennent des réactions locales cutanées et systémiques telles que l'œdème et l'urticaire. Selon l'OMS, le virus peut provoquer une maladie neurologique mortelle chez l'homme.

La maladie du VNO s'étend sur plusieurs continents, incluant l'Afrique, l'Europe, le Moyen-Orient, l'Amérique du Nord, et l'Asie occidentale. Les grandes épidémies sont souvent liées aux déplacements migratoires des oiseaux, qui servent de réservoirs naturels pour le

virus. Des foyers significatifs de l'infection ont été recensés en Grèce, en Israël, en Roumanie, en Russie, et aux États-Unis (OMS, 2017a).

Actuellement, le virus du Nil occidental est présent dans plusieurs nations européennes, et son étendue géographique continue de croître. L'émergence du VNO a provoqué un nombre croissant de foyers en Europe, avec une saison de transmission exceptionnelle enregistrée au cours de l'année 2018 (Sambri et al. 2013). En effet, les États membres de l'UE ont rapporté, en 2018, 1460 cas humains dont l'Italie a enregistré le plus grand nombre (550), suivi de la Grèce (307), de la Roumanie (276), de la Hongrie (212), de la Croatie (53), de la France (24), de l'Autriche (19), de la Bulgarie (14), de la Slovénie (3) et de la République tchèque (2) (Chirico and Magnavita, 2019). Récemment, en 2022, 588 cas humains confirmés d'infection par VNO ont été signalés en Italie entre l'été et l'automne dont 76 d'entre eux en Lombardie, avec 7 décès, y compris 26 sous forme neuroinvasive (Fundación iO, 2023).

La présence du VNO a également été signalée dans de nombreux pays de la Méditerranée orientale, y compris le Maroc (Eybpoosh et al. 2019). En effet, des cas infectés par cet arbovirus ont été signalés au Maroc au cours des années 1996, 2003 et 2010. La première épidémie a éclaté en 1996 dans les régions de Benslimane, Larache et Kénitra, entraînant l'infection de 94 équidés, dont 42 étaient morts, avec un seul cas d'encéphalite humaine confirmé dans la région de Rabat. La deuxième flambée a touché la ville de Kénitra en 2003, avec 9 équidés touchés, dont 5 morts. La dernière épidémie par VNO s'est manifestée à Mohammedia en 2010, provoquant la mort de 40 chevaux parmi les 90 cas infectés, ainsi que la mort d'un homme (El Harrak et al., 1997, Fassil, et al., 2012 ; Figuerola et al., 2009). *C. pipiens* est suspecté d'être le moustique responsable de la transmission (Figuerola et al., 2009 ; Calistri et al., 2010) et parce que c'est la seule espèce de moustique qui s'est avérée être infectée par le virus du Nil occidental sur le terrain (ECDPC, 2010).

Il est très probable que ces infections virales par le VNO soient attribuables aux oiseaux migrateurs qui ont transporté le pathogène lors de leur escale sur le littoral marocain pendant leur migration du Sénégal vers l'Europe. La transmission, quant à elle, a été étroitement associée à l'espèce du moustique *C. pipiens* (Faraj et al., 2006 ; Amraoui et al., 2012). Les mouvements de populations, combinés aux effets du réchauffement climatique, ont significativement participé à la propagation de ce moustique à l'échelle mondiale (Trari, 2017).

C. pipiens est aussi connu comme étant vecteur de diverses arboviroses telles que le virus Usutu (Clé et al., 2018, Hernández-Triana et al., 2018), le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (OMS, 2018b), des encéphalites comme l'encéphalite japonaise (OMS, 2019).

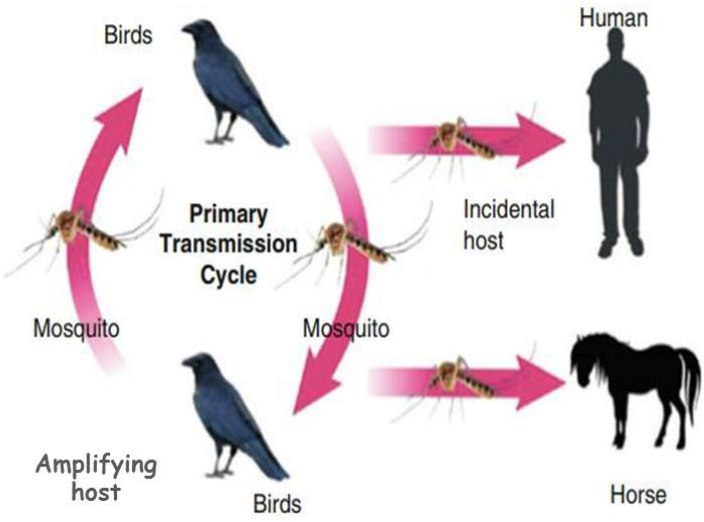


Figure 6. Cycle de transmission de West Nile Virus (Hayes et al., 2005)

I.4 Moyens de lutte contre les larves et les adultes des moustiques

Afin de diminuer la transmission des agents pathogènes par les moustiques et gérer les MTV, des programmes de lutte antivectorielle sont adoptés pour lutter contre : (1) l'agent pathogène (par dépistage des cas, diagnostic au niveau du Laboratoire et traitement préventif), (2) le réservoir, (3) vecteur (Surveillance des gîtes, diagnostic au Laboratoire et traitement par differents moyens de lutte) (OMS, BRE, 2018). Il existe plusieurs méthodes pour contrôler les moustiques tels que la lutte physique, biologique, génétique, et chimique (Fontenille et al., 2009). Selon le Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique (2019), les techniques actuellement employés par les programmes de lutte contre les vecteurs sont les moustiquaires imprégnées d'insecticide à longue durée d'action (MILDA), la pulvérisation intradomiciliaire (PID) d'insecticide à effet rémanent et la lutte antilarvaire.

I.4.1 Lutte physique

La lutte physique, c'est une lutte mécanique anti-larvaire qui permet la destruction des gîtes larvaires potentiels dans lesquels les moustiques peuvent pondre à travers le drainage des gîtes et l'élimination des gîtes anthropiques par exemple les gîtes artificiels créés par l'homme (les pots de fleurs, les récipients ou les pneus usagés) (Darriet, 2014).

I.4.2 Lutte chimique

I.4.2.1 Insecticides chimiques

Cette lutte consiste à utiliser des produits de synthèse, les insecticides chimiques. Il existe de très nombreux composés insecticides qui appartiennent à quatre principales familles :

- **Les insecticides organochlorés**

Ils furent parmi les insecticides chimiques les plus utilisés. Cette famille comprend le DDT, le chlordane, la dieldrine, l'aldrine et bien d'autres. Ces composés chlorés présentent la particularité d'être très peu solubles dans l'eau, mais très solubles dans les lipides. Ils sont tous très peu ou pas biodégradables et donc persistants dans l'environnement. Les insecticides de type DDT agissent au niveau du système nerveux en désactivant les canaux sodiques, au même titre que les pyréthrinoïdes.

- **Les insecticides organophosphorés**

Le développement des organophosphorés (OP) est apparu comme une alternative aux composés organochlorés persistants dans l'environnement et l'organisme humain.

- **Les carbamates**

Les carbamates peuvent être insecticides, herbicides ou fongicides selon leur structure. Les carbamates insecticides sont des inhibiteurs de l'AChE, tout comme les organophosphorés.

- **Les pyréthrinoïdes**

Les pyréthrinoïdes sont également des insecticides neurotoxiques. La pyréthrine est le premier représentant de cette famille commercialisée en 1928. Elle fut extraite d'une variété de chrysanthème (*Chrysanthemum cinerariaefolium*).

- **Résistance des moustiques aux insecticides**

Les principaux mécanismes de résistances relevés chez les insectes sont au nombre de quatre : 1-Résistance comportementale ; 2- Résistance à la pénétration ; 3- Résistance métabolique ; 4- Résistance au niveau du site cible (Figure 7).

La résistance comportementale se manifeste par une modification dans le comportement de l'insecte, lui permettant d'adopter une stratégie visant à échapper au contact

avec l'insecticide, assurant ainsi sa survie après exposition à celui-ci. D'ailleurs, Bogh et al. (1998) ont observé que l'introduction de moustiquaires imprégnées de perméthrine au Kenya a induit un changement de comportement chez les femelles de moustiques. La résistance à la pénétration est un autre mécanisme Afin de se prémunir contre les insecticides chimiques, qui sont généralement hydrophobes et agissent par contact, les moustiques épaississent leur cuticule qui présente des propriétés lipophiles qui réduisent la pénétration des molécules chimiques à l'intérieur de leur organisme. Une recherche a été effectuée sur le moustique *Anopheles funestus*, en mesurant l'épaisseur de la cuticule et a révélé un épaisseur de 10 % de la cuticule chez une variété résistante à la perméthrine (Wood et al., 2010).La résistance métabolique est un processus qui repose sur l'utilisation de la machinerie enzymatique propre aux insectes, qui leur permet de décomposer ou détoxifier les agents insecticides. Il existe diverses familles d'enzymes de détoxification qui jouent un rôle essentiel dans la séquestration et le métabolisme des molécules toxiques, telles que les glutathion S-transférases (GST) et les estérases. En effet, la résistance aux OP chez les moustiques du genre *Culex* peut résulter de la coamplification génique de deux estérases (alpha et bêta estérases) conduisant à une séquestration importante des insecticides (Hemingway et al., 1998, Karunaratne and Hemingway, 2000). Dans la résistance au niveau du site cible, les insecticides agissent principalement sur un site cible spécifique, généralement au niveau du système nerveux (dans le cas des organophosphorés, des carbamates, et des pyréthrinoïdes). Il est possible de modifier le site d'action de manière à ce que l'insecticide ne se lie plus efficacement. Dans la plupart des cas, ce type de résistance s'explique par la présence d'une mutation entraînant la substitution d'un ou de plusieurs acides aminés dans la séquence protéique de la cible de l'insecticide (Ffrench-Constant et al., 2004 ; IRAC, 2017).

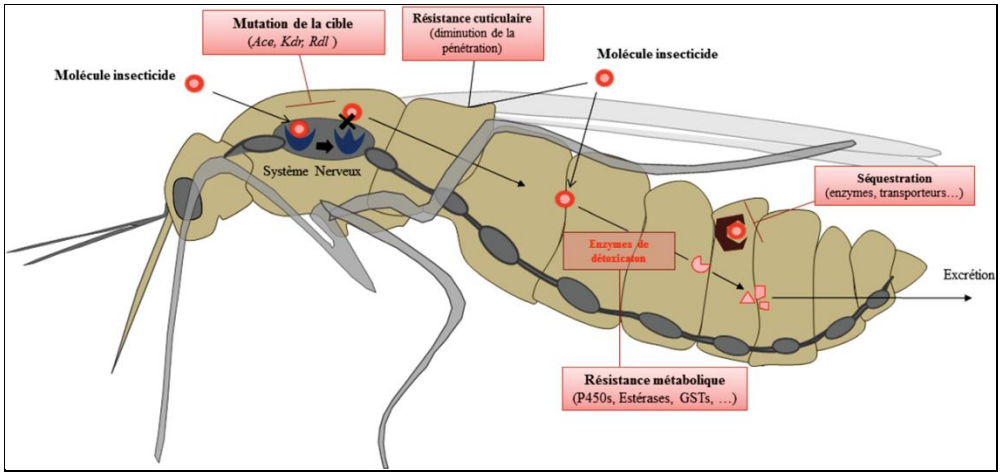


Figure 7. Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez les moustiques (CNEV, 2014)

La pression de sélection importante a conduit à la sélection de plusieurs allèles de résistance de façon indépendante dans plusieurs endroits distincts. Plusieurs travaux ont démontré la résistance des moustiques adultes vis-à-vis les insecticides de synthèse. Selon une étude en France (Weill et al., 2003), *C. pipiens* s'est révélée résistance aux organophosphorés et DDT, carbamates, pyréthrinoïdes. Au Maroc, Faraj et al., en 2008 ont montré que des femelles d'*Anophèles labranchiae* ont été résistantes à des degrés divers au DDT. Larhbali et ses collaborateurs (2010) ont prouvé la résistance des adultes femelles de *Culex pipiens* au DDT. Dans l'étude réalisée au niveau des provinces de Fès, Khémisset, Khouribga, Marrakech, Meknès, Oujda et Tétouan, deux Pyréthrinoïdes (Lambdacyhalothrine et Deltamethrine), un Carbamate (Propoxur) et un Organochloré (DDT) ont été utilisés contre les adultes de *C.pipiens*. La Région de Fès présente une importante résistance du stade adulte de *C. pipiens*, aussi bien aux Pyréthrinoïdes et Carbamates qu'aux Organochlorés, ce qui laisse supposer, chez la souche de Fès, une possible résistance croisée entre les 3 familles chimiques (Trari, 2017). L'étude récente de Tmimi et ses collaborateurs (2018), a montré que des populations sauvages de *C. pipiens* à Mohammedia ont développé une résistance aux différents insecticides: DDT (mortalité de 16%), malathion (mortalité de 52%), bendiocarbe (mortalité de 39%), lambdacyhalothrine (mortalité de 49%), perméthrine (mortalité de 63%).

I.4.2.2 Contexte reglementaire

L'Union européenne a établi un cadre réglementaire pour la commercialisation des produits biocides, visant à garantir un niveau élevé de protection pour l'homme et l'environnement, tout en assurant une harmonisation de la réglementation au sein de l'Union européenne. Pour cela, les substances actives biocides subissent une évaluation portant sur (a) leur toxicité pour la santé humaine, (b) leur écotoxicité, et (b) leur efficacité conformément aux usages envisagés. Les produits biocides contenant ces substances actives nécessitent alors une autorisation de mise sur le marché. Toutefois, les impératifs de sécurité pour l'homme et l'environnement, d'une part, et les coûts associés à une telle évaluation, d'autre part, ont incité les industriels à ne plus appuyer un grand nombre de substances qui étaient ou auraient pu être employées dans la lutte antivectorielle, et le fait de retirer une substance ayant des avantages pour la santé publique pour des raisons purement économiques est regrettable (CNEV, 2014).

Dans ce contexte, l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES) a entrepris une expertise visant à identifier les différentes substances actives potentiellement utilisables en lutte antivectorielle (LAV), tout en présentant un profil toxicologique et écotoxicologique approuvable. Les actions de l'ANSES ont conduit à l'identification de 32 substances actives potentiellement utilisables en

LAV. Afin d'accomplir cette tâche, le groupe de travail "Insecticides de LAV" de l'ANSES a utilisé la méthode SIRIS, qui permet de classifier les substances actives en tenant compte de la probabilité d'exposition et des effets biologiques provoqués par ces molécules (Anses, 2013). Les insecticides larvicides et adulticides comme par exemple Téméphos, Malathion, Déltaméthrine, Fenthion, Bendiocarbe sont parmi les 32 substances identifiées par l'ANSES.

Il est crucial de noter que le domaine de la lutte antivectorielle ne présente pas un attrait majeur pour les entreprises privées spécialisées dans le développement de nouvelles molécules insecticides. Alors que le secteur agricole, et à l'échelle mondiale, domine le marché des insecticides, tandis que la santé publique ne représente qu'une part marginale de 1,3% du marché global des insecticides (Fondation Bill et Melinda Gates et Boston Consulting Group, 2007).

D'un autre coté, l'expertise menée par l'ANSES a identifié plusieurs initiatives visant à répondre à la réduction du nombre de substances actives disponibles dans le domaine de la lutte antivectorielle et qui sont axées sur le développement de nouvelles molécules ou de nouvelles formulations (CNEV, 2014). Ainsi, lorsqu'on utilise ces insecticides dans la lutte intégrée contre les vecteurs d'agents pathogènes, il est impératif d'adopter une approche basée sur le rapport bénéfice/risque. Dans ce sens, les autorités publiques devraient encourager le développement de nouvelles molécules et/ou de nouvelles formulations d'insecticides en tant qu'outil de santé publique et vétérinaire (Miller and Tren, 2012). Cette démarche pourrait impliquer un soutien à l'innovation et aux ajustements dans les procédures réglementaires de mise sur le marché.

I.4.3 Lutte biologique contre les moustiques

Plusieurs agents biologiques ont été confirmés comme étant responsables de la mortalité des moustiques, notamment des oomycètes, des algues, des bactéries (*Bacillus thuringensis var. israelensis* (Bti), *Lysinibacillus sphaericus* des virus pathogènes des nématodes, des insectes prédateurs y compris d'autres moustiques, des copépodes, des poissons et d'autres (Rey et al., 2012). Les poissons prédateurs de moustiques *Gambusia affinis* et *G. holbrooki* représentent les prédateurs les plus couramment utilisés dans la lutte biologique contre les moustiques, mais ils peuvent poser des problèmes s'ils sont introduits en tant que poissons exotiques. Malheureusement, l'introduction de ces espèces là où elles ne sont pas indigènes peut avoir des conséquences dévastatrices sur les systèmes écologiques locaux (Rey et al. 2012). Les plantes aromatiques pourraient être une source alternative pour contrôler les vecteurs. Elles produisent des huiles qui contiennent naturellement une large

gamme de produits chimiques bioactifs ayant des propriétés insecticides (Govindarajan et al. 2013 ; Benelli et al. 2015).

I.4.4 Lutte génétique

C'est une approche de lutte qui vise à éliminer les vecteurs en altérant leurs gènes. Elle est définie comme "l'utilisation de toutes les conditions et méthodes de traitement pouvant réduire le potentiel reproductif des formes nuisibles par une altération ou un remplacement du matériel héréditaire" (Rodhain and Pérez, 1985). La technique de forçage génétique constitue une approche intrigante qui fait appel à la modification de l'ADN du moustique et on parle de la technique de l'insecte stérile (TIS) et qui applique des facteurs endommageant l'ADN (rayon gamma) pour induire des altérations donnat alors des mâles stériles (Alphey, 2014).

Le tableau suivant résume les différentes méthodes adoptées pour lutter contre les moustiques.

Tableau 1. Différentes méthodes adoptées dans la lutte antivectorielle

Méthode	Actions
Lutte physique	• Elimination des eaux stagnantes dans les pots de fleurs, de bouteilles cassées, des récipients… • Renouvèlement fréquents des réserves d'eau • Assèchement des marais, drainage… • Elimination des récipients naturels ou anthropiques. • Couverture des objets entreposés (pneus…)
Lutte chimique	• Utilisation des insecticides chimiques (les organochlorés, les organophosphorés, les Carbamates, les pyréthrinoides de synthèse)
Lutte génétique	• Lâcher des Insectes mâles stériles
Lutte biologique	• Microorganismes entomopathogènes : Bactéries (*Bacillus thuringiensis*), Champignons (Coelomomyces) • Nématodes (Nermithidae). • Poissons larvivores (*Gambusia affinis)* • Extraits végétaux

I.5 Lutte antivectorielle au Maroc

Au Maroc, la Gestion Intégrée de Lutte Antivectorielle (GILAV) représente le cadre d'intervention national et demeure l'outil principal de lutte contre les vecteurs. Depuis 2005, diverses mesures ont été prises pour promouvoir la GILAV en tant que stratégie nationale pour la mise en œuvre de la lutte contre les vecteurs. Un plan d'action visant le développement et le renforcement de la gestion intégrée de la lutte antivectorielle pour la période 2008-2012 a été établi en 2007, fondé sur une analyse de la situation et une évaluation des besoins en matière de lutte contre les vecteurs. Dans ce cadre, plusieurs actions ont été

réalisées, notamment l'institutionnalisation de la GILAV par la signature d'une Décision conjointe impliquant les ministres de la Santé, de l'Intérieur, de l'Agriculture et de l'Environnement. Ainsi, le Maroc a défini trois stratégies essentielles qui forment la base de tous les efforts déployés dans la lutte antivectorielle. Il s'agit du Programme national de lutte contre le paludisme (PLAP), du Programme national de lutte contre les leishmanioses (PNLL) supervisé par le Service des maladies parasitaires (DELM), et enfin du Programme national de lutte contre les vecteurs dirigé par le Service de lutte contre les vecteurs relevant du Ministère de la Santé.

II. Plantes aromatiques et médicinales (PAMs)

II.1 Secteur des PAMs au Maroc

Au Maroc, la filière des plantes médicinales et aromatiques (PAMs) constitue la flore la plus importante en termes de diversité, et cela est attribué à la situation géographique du Maroc et sa variabilité climatique. En effet, il existe 4 200 espèces dont 400 ont des usages médicinaux et/ou aromatiques reconnus, et 250 sont les plus exploitées (El Meskaoui et al., 2008 ; Benlamdini et al., 2014). Des dizaines d'espèces de PAMs existent à l'état spontané (Armoise, Romarin, Menthe Pouliot, Thym, Origan, etc.) ou en culture (Rosier, Verveine, Jasmin, Lavande, Menthe Verte, etc.) (Benayad, 2013). On trouve environ 60 familles des PAMs dont les biens connus sont les Lamiacées comme le romarin, lavande, origan, thym, menthe, salvia..; Les Myrtacées notamment les espèces d'Eucalyptus; les Asteracées comme Ormenis et Artemisia ; les Rutacées en particulier les diverses espèces de citrus et les Apiacées comme *Petroselinum crispum* et *Coriandrum sativum* (Raut and Karuppayil, 2014).

II.2 Importance socio-économique de la filière des PAMs au Maroc

Le Maroc est classé le 12ème exportateur mondial des PAMs, l'analyse économique montre que les quantités exportées en matière de PAMs sont de l'ordre de 52.000 tonnes par an, soit l'équivalent de 615 millions de dirhams en PAMs sous diverses formes et près de 6.805 tonnes d'huiles essentielles et d'extraits divers destinées principalement à l'industrie de la parfumerie et de la cosmétique, ainsi qu'à la préparation de produits hygiéniques et d'arômes (Zrira, 2017). En effet, le Maroc produit annuellement 140 000 tonne des PAMs et cela reflète sa richesse en flore aromatique qui compte environ 4200 espèces avec au moins 500 qui sont potentiellement aromatiques et/ou médicinales, et 250 qui sont exploitées (Benlamdini et al., 2014). Les activités liées au secteur des PAMs permettent de générer des revenus substantiels et la création de milliers de jours de travail (environ 500 000 journées de

travail pour un salaire de 25 millions de dirhams), en particulier pour les communautés rurales, contribuant ainsi à renforcer leur équilibre commercial.

II.3 Techniques d'extraction des huiles essentielles

II.3.1 Méthodes traditionnelles d'extraction des HEs

Ces techniques d'extraction reposent toutes sur le même principe, basé sur l'entraînement des molécules volatiles de la plante par la vapeur d'eau. Le degré de contact entre la plante et l'eau est le seul paramètre qui diffère.

- **Hydrodistillation**

Dans le cas de l'hydrodistillation la plante se trouve dans un réacteur où elle est en contact direct avec l'eau bouillante. Selon la densité ou la quantité de la plante utilisée, elle peut flotter ou être complètement immergée dans l'eau. Elle est généralement conduite à pression atmosphérique. Le chauffage permet l'éclatement et la libération des molécules volatiles contenues dans la matière végétale. La vitesse de vaporisation des composés volatiles des PAM par l'hydodistillation est connue par la variation de leur concentration en fonction de la résistance à la diffusion de l'HE dans les tissus cellulaires et également selon la solubilité des molécules volatiles dans l'eau (Djeddi, 2012 ; Nguemtchouin Mbouga, 2012).

- **Entrainement à la vapeur**

C'est un moyen également très répandu pour extraire les molécules volatiles des PAMs. Le matériel végétal n'est pas en contact avec l'eau bouillante, mais la vapeur d'eau produite par une chaudière est injectée et traverse la matière végétale de bas en haut, éclate les cellules et entraine les molécules volatiles (Liu and Xu, 2012).

II.3.2 Méthodes innovantes d'extraction des HEs

- **Hydrodistillation assistée par ultrasons**

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes ultrasonores et les micros cavitations qui sont générées par les ultrasons. Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également influer sur la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs. Les principaux avantages de ce procédé sont l'accélération de la cinétique d'extraction et l'amélioration du rendement (El Asbahani et al., 2015 ; Ojha et al., 2020).

- **Extraction assistée par micro-ondes**

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle : les molécules volatiles sont entrainées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée. Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile. Les créateurs de ce procédé lui attribuent certains avantages tels que le temps d'extraction (dix à trente fois plus rapide), l'économie d'énergie et une dégradation thermique réduite (Luccehsi, 2005 ; El Asbahani et al., 2015).

II.4 Les huiles essentielles

II.4.1 Généralités

Les huiles essentielles (HEs) sont des composés volatils extraits principalement des feuilles et des parties non ligneuses des plantes. Les huiles essentielles extraites possèdent des composés odorants, notamment des monoterpènes, des sesquiterpènes, des phénols, des oxydes, des esters, des aldéhydes et des cétones (Park et al., 2016). Selon l'Agence française de normalisation : Agence Française de Normalisation (AFNOR), les huiles essentielles peuvent être définies comme suit (NF T 75-006) : L'huile essentielle est le produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation (Hanif et al., 2019). Les HEs peuvent être obtenues à partir de feuilles (*Eucalyptus globulus* L., *Thymus vulgaris* L., *Mentha piperita* L., *Satureja hortensis* L.), de fleurs (*Citrus sinensis* L., *Lavandula dentata* L.), de rhizomes (*Zingiber officinale* L., *Acorus calamus* L.), les graines (*Carum carvi* L., *Coriandrum sativum* L.), les fruits (*Foeniculum vulgare* L., *Pimpinella anisum* L., *Citrus limon* L.) et les bois (*Cinnamomum Cassia presl*., *Santalum album* L.) (Lammari et al., 2020).

II.4.2 Composition chimique des HEs

La composition chimique d'une huile essentielle est très complexe et soumise à de très nombreuses variables. La connaissance avec exactitude des constituants d'une huile essentielle est fondamentale, à la fois pour vérifier sa qualité, expliquer ses propriétés et prévoir sa toxicité potentielle. L'étude de la composition chimique est généralement effectuée par chromatographie en phase gazeuse (GPG) et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Les HEs sont des mélanges complexes contenant plus de 300 composés différents. Ils peuvent être classés en deux catégories :

- Fraction volatile : La fraction volatile représente 90 à 95 % du poids total de l'huile. Elle contient des monoterpènes, des sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés. Les alcools aliphatiques, les esters et les aldéhydes peuvent également être présents dans la fraction volatile. Ces composés organiques sont généralement de faible poids moléculaire.
- Résidu non volatil : Le résidu non volatil représente 1 à 10 % du poids total de l'huile essentielle. Il contient des acides gras, des hydrocarbures, des stérols, des flavonoïdes et des caroténoïdes (Hanif et al., 2019).

En général, une HE contient environ 20 à 60 composants, voire plus de 100 composants individuels, à des concentrations très différentes ; deux ou trois d'entre eux sont des composants majeurs à des concentrations assez élevées (20 à 70 %), tandis que d'autres sont présents à l'état de traces (Jugreet et al., 2020). La variation de la composition chimique de l'huile essentielle peut varier d'une plante à l'autre, même au sein d'une même espèce. Ces changements dans le profil chimique sont associés à de nombreux facteurs tels que : le climat, le pH et la salinité du sol, les organismes du sol et les micro-organismes, le traitement post-récolte, la partie de la plante utilisée, les méthodes d'extraction, et les conditions de conservation (Baptiste et al., 2020 ; Pokajewicz et al., 2021). Les principales classes de composés présents dans les huiles essentielles sont les suivantes :

❖ **Les terpènes :**

Les terpènes sont des composés hydrocarbonés naturels produits par une grande variété de plantes, de structure soit cyclique soit à chaine ouverte et sont connus comme métabolites secondaires. Ils sont regroupés en différents types selon leur structure et leur fonction ; ils sont classés en fonction des unités à cinq carbones (isoprène). Les principaux terpènes sont les monoterpènes (C10) et les sesquiterpènes (C15) ; qui peuvent être des constituants hydrocarbonés ou oxygénés. Cependant, elles peuvent également être dérivées de dérivés aliphatiques ou alicycliques et certaines peuvent avoir des structures aromatiques (Figure 8). Plus de 55 000 molécules de terpènes ont été découvertes à ce jour. La plupart du temps, la bioactivité d'une huile essentielle donnée repose sur ces molécules, mais il arrive que l'activité biologique ne puisse être attribuée à un seul composé (Hanif et al., 2019).

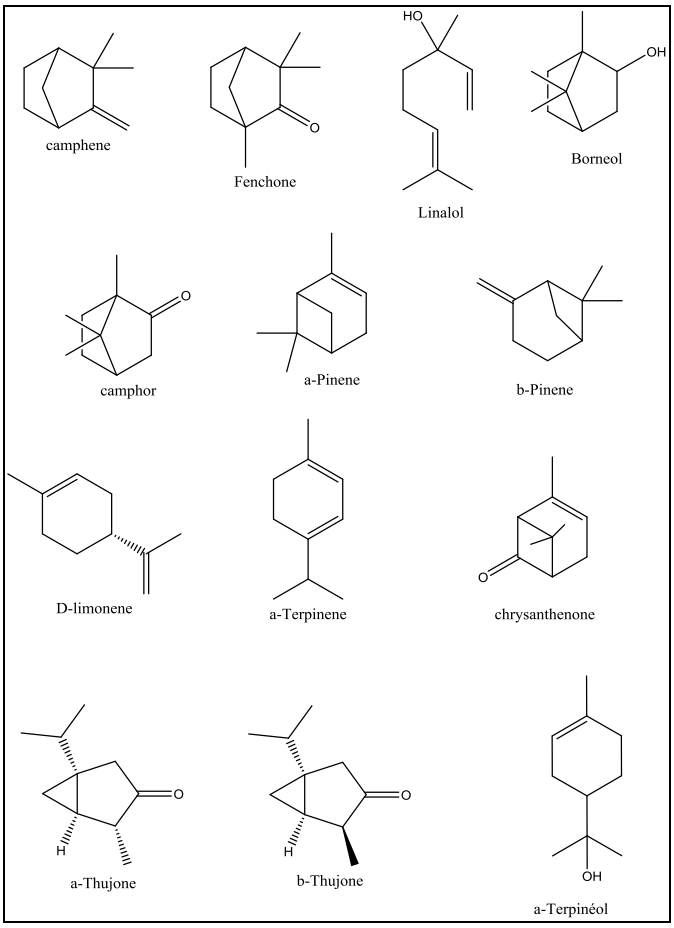


Figure 8. Structures chimiques de certains constituants des HEs (terpènes et terpénoides)

❖ **Les phénylpropanoïdes:**

Les composés aromatiques présents dans les huiles essentielles sont généralement dérivés du phénylpropane et leur concentration est inférieure à celle des terpènes. Les phényl propanoides ou composés phénoliques sont biosynthétisés à partir des acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine et la tyrosine. Ils sont généralement caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. L'eugénol et le cinnamaldéhyde sont les plus étudiés (Hyldgaard et al., 2012).

III. Les HEs en tant que bioinsecticides

III.1 Généralités

De nombreux chercheurs ont étudié les activités insecticides et répulsives de différentes espèces de plantes envers *C. pipiens* et d'autres moustiques. Mansour et al. (2012) ont rapporté l'activité insecticide des HEs de nombreuses espèces végétales telles que *Anethum raveolens, Apium graveolens*, *Carum carvi*, *Curcuma longa*, *Cyminum cyminum, Foeniculum vulgare*, *Melia azedarach, Petroselium crispum*, et *Piper nigrum*, contre les adultes femelles de *C. pipiens*. De plus, l'HE récoltée en Algérie, *Thymus vulgaris*, a montré

un effet insecticide sur les larves de ce moustique (Bouguerra et al., 2017). De même, Aungtikun and Soonwera (2021) ont rapporté l'action insecticide des HEs provenant de différentes espèces de Cinnamomum sur les adultes femelles d'*A. aegypti L.* et l'*A. albopictus*. L'effet répulsif de différentes HEs de citronnelle (*Cymbopogon nardus*), de menthe (*Mentha arvensis*), et du romarin (*R. officinalis L.*) et du clou de girofle (*Eugenia caryophyllata*) a également été évalué sur des adultes femelles d'*A. aegypti* (Alavez-Rosas et al., 2022). Selon une étude réalisée en Egypte; trois huiles essentielles ont été isolées de l'écorce des agrumes de la Famille Rutacées (*Citrus reticulata L., Citrus reticulata chinase Blanco ; Citrus sinensis (L.) Osbeck* et ont été évaluées contre *Culex pipiens L.*1758 par test de fumigation. Zahran et al. (2017) ont mis en évidence l'effet insecticide de différentes HEs ; *Artemisia judaica, Artemisia monosperma, Callistemon viminals, Citrus aurantifolia, C. lemon, C. paradisi, C. sinensis, Cupressus macrocarpa, Cup. sempervirens, Origanum vulgare, Pelargonium graveolens, Rosmarinus officinalis, Syzygium cumini, Schinus molle , S. terebinthifolius, et Thuja occidentalis,* sur *C. pipiens.* Des espèces d'Eucalyptus ont également montré leur efficacité contre *Aedes aegypti* dans une étude menée en Argentine (Lucia et al., 2012). De plus, les HEs d'*ocimum canum Sims,* et d'*Ocimum basilicum L.* du cameroun ont été évaluées contre *Anopheles funestus ss* (Akono Ntonga et al., 2012). L'HE de *Polygonum hydropiper* (Inde) a montré ainsi une activité insecticide sur les adultes *Anopheles stephensi et Culex quinquefasciatus* (Maheswaran et al., 2013). Contre d'autres types d'insectes, Germinara et al. (2017) ont rapporté l'efficacité insecticide par contact et par fumigation et l'activité répulsive de l'HE isolée de *Lavandula angustifolia Miller* contre les adultes du charançon du blé, *Sitophilus granarius*. Contre le charançon du riz, *Sitophilus oryzae L.* (Coleoptera : Curculionidae), l'efficacité insecticide de quatre différentes HEs (*Cymbopogon flexuosus*, *C. winterianus*, *C. martini* et *Pogostemon cablin*) a été également évaluée (Devi et al. 2020). L'efficacité des HEs est attribuée à leur mécanisme d'action, dans le cas les insectes adultes, elles agissant généralement sur le système nerveux par différentes mécanismes (Figure 9). Parmi ces mécanismes, l'inhibition de l'AChE est largement utilisée, car cette enzyme joue un rôle essentiel dans la transmission des signaux nerveux chez les insectes, tant au niveau neuromusculaire que neuronal (Bourguet, 1997). L'inhibition de l'AChE peut induire un effet toxique des neurotransmetteurs chez les insectes nuisibles en perturbant la membrane de la jonction postsynaptique, entraînant une interférence du courant nerveux (Marrs and Maynard, 2013). Par ailleurs, l'octopamine représente une hormone cruciale liée au système nerveux des insectes. Cette neurohormone se présente sous les formes d'octopamine-1 et d'octopamine-2, agissant respectivement en tant que neurotransmetteur et

neuromodulateur chez les insectes. L'inhibition de l'octopamine induit des changements dans la modulation physiologique liée à la jonction musculaire et à l'homéostasie des fluides corporels des insectes, perturbant ainsi leur système nerveux régulé par l'octopamine (Evans, 1981 ; Farooqui, 2007 ; Ohta and Ozoe, 2014). Les HEs possèdent également la capacité d'inhiber les récepteurs GABA présents chez les insectes. Cette action peut entraver la liaison du GABA aux récepteurs GABArs situés dans les membranes synaptiques et extrasynaptiques (Ben-Ari et al., 2012 ; Sigel and Steinmann, 2012).

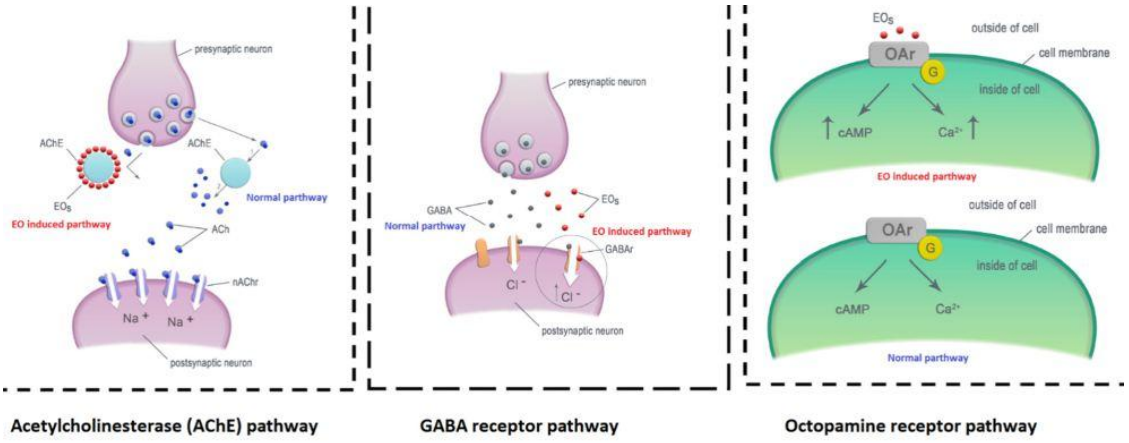


Figure 9. Mécanismes d'action des HEs (Dassanayake et al., 2016)

III.2 Quelques méthodes d'évaluation des activités insecticides des HEs

III.2.1 Activité insecticide par fumigation dans des tubes acryliques transparents

Selon le protocole adopté par Lucia et al. (2009), cette méthode consiste à utiliser un cylindre acrylique placé sur une boîte de Pétri dont l'extrémité a été couverte par un tamis métallique vers le bas et thermostabilisé pendant 10 min à 26-28°C. Des lots de 13 à 15 moustiques adultes d'*Aedes aegypti* ont été recueillis avec un aspirateur à bouche et introduits dans le tube à travers le disque de néoprène situé sur le côté supérieur. De cette façon, les insectes ont été exposés aux vapeurs d'huiles essentielles, mais n'ont pas eu de contact direct avec la source. Le tube a été fermé et soigneusement examiné pour s'assurer que les moustiques transférés étaient en bon état. Le nombre de moustiques renversés a été enregistré toutes les minutes pendant environ 20-30 minutes. Le Knockdown a été considéré comme l'incapacité des moustiques adultes à voler. Le nombre total de moustiques dans chaque tube a été compté après chaque test (Figure 10).

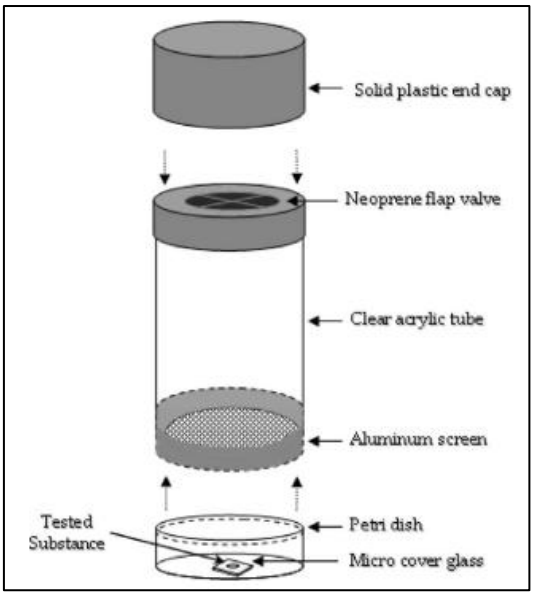


Figure 10. Dispositif de test utilisé pour évaluer l'effet fumigant des HEs d'Eucalyptus contre *Aedes aegypti*

III.2.2 Activité insecticide par fumigation par des cônes

C'est un protocole inspiré de l'OMS, Akono Ntonga et al., 2012 ont utilisé cette méthode pour évaluer l'activité sur les adultes femelles d'*Anopheles funestus* ss. Des concentrations expérimentales ont été préparées à partir des HEs d'*Ocimum canum* Sims et *Ocimum basilicum* L. dans l'acétone. Ensuite, des fragments de moustiquaire ont été découpés à la dimension de 0,03m^2 l'un, et 12 fragments de moustiquaires ont été utilisés en raison de 6 fragments par HE correspondant aux 5 concentrations définies plus le fragment témoin. Chaque solution d'huile essentielle d'une concentration donnée a été préalablement homogénéisée dans un tube à essai puis transvasée dans une boîte de pétri en verre. Chaque fragment de moustiquaire a ensuite été introduit dans la solution, puis au bout de 15 minutes d'imprégnation, il est retiré et étalé sur une paillasse pour séchage et pour évaporer le solvant**.** Le fragment de moustiquaire sec a enfin été fixé sur la base d'un cône OMS (cône de plastique) à l'aide d'un ruban adhésif ou (un bracelet de caoutchouc). Vingt femelles adultes d'*Anopheles funestus* ont été retirées des cages au moyen d'un aspirateur à bouche puis introduites dans chaque cône-OMS dont les ouvertures supérieures ont immédiatement été bouchées par un coton hydrophile afin d'en empêcher la sortie des moustiques. Après 3min du contact avec le fragment de moustiquaire, les femelles du moustique ont été introduites à l'aide d'un aspirateur à bouche dans les gobelets en plastique recouverts de tulles moustiquaires non imprégnés. Ces moustiques y ont été nourris par une solution de sucrose 10% (Figure 11). L'effet knockdown a été apprécié toutes les 10 minutes pendant une heure. Pour chaque concentration d'huile essentielle précise, les tests ont été répétés 7 fois pour

minimiser les erreurs et avoir un effectif statistiquement acceptable. La base du cône considéré comme témoin a été recouverte d'un fragment moustiquaire imprégné uniquement à l'acétone.

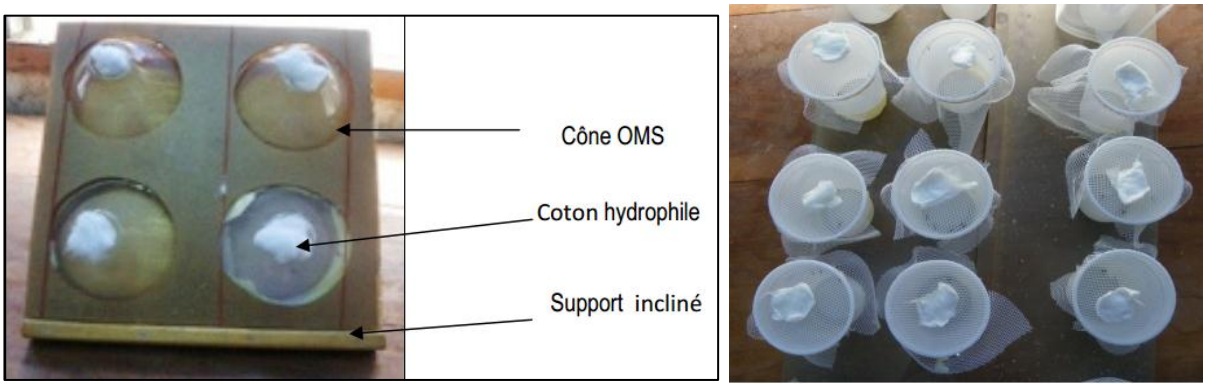


Figure 11. Dispositif du test insecticide (gauche), des moustiques traités introduits dans

III.2.3 Méthode de fumigation

L'action insecticide par fumigation dans des pots en verre a été examinée par Zahran et al. (2011) pour évaluer l'activité insecticide des monoterpènes vis-à-vis de *Culex pipiens* adultes âgés de 2 jours. Des pots en verre de 0,4 l de capacité avec des bouchons à vis ont été utilisés comme chambres d'exposition. Les monoterpènes ont été appliqués sur morceau de papier Whatman no. 1 (3 × 3 cm) attaché à la surface inférieure des bouchons à vis à des concentrations de 10, 50 et 100 mg /l (air). Les monoterpènes ont été dissous dans l'acétone avant de traiter les morceaux de papier filtre et les monoterpènes liquides ont été appliqués directement sur le papier filtre. Après évaporation de l'acétone pendant 2 minutes, les bouchons ont été vissés fermement sur les bocaux contenant 10 moustiques adultes. Un traitement similaire sans monoterpènes a été utilisé comme témoin. Trois répétitions de chaque traitement et contrôle ont été mis en place. Le nombre d'insectes morts et les pourcentages de mortalité ont été déterminés après 24 et 48 h de traitement. Cette méthode a été utilisée par Zahran et al. (2017) pour évaluer l'efficacité des HEs des espèces suivantes sur *C. pipiens* : *Artemisia judaica, A. monosperma, Callistemon viminals, Citrus aurantifolia, C. lemon, C. paradisi, C. sinensis, Cupressus macrocarpa, Cup. sempervirens., Origanum vulgare., Pelargonium graveolens, Rosmarinus officinalis, Syzygium cumini, Schinus molle., S. terebinthifolius* et *Thuja occidentalis*.

IV. Optimisation de l'activité insecticide par les plans d'expériences

IV.1 Plans d'expériences

Le plan d'expériences est une approche mathématique et statistique visant à optimiser les processus expérimentaux tout en adoptant des combinaisons spécifiques de niveaux de

variables (formant une matrice expérimentale) pour extraire des informations sur le système étudié. La méthodologie de la surface de réponse, combinée à la conception des plans d'expériences, peuvent être utilisées pour modéliser le comportement des données obtenues en ajustant de fonctions mathématiques, cela permet d'établir des prédictions statistiques sur les conditions optimales pour mener des expériences (Bezerra et al, 2020). L'approche méthodologique du plan d'expérience comprend cinq étapes principales : Détermination statistique des expériences, Estimation des coefficients d'un modèle mathématique ; Validation du modèle ; Optimisation de la réponse ; Vérification de l'adéquation du modèle (Groupy and Creighton, 2007).

IV.1.1 Plan de mélange

Dans les conceptions d'expériences classiques, les facteurs sont indépendants, cela est différent dans le cas des mélanges dont les réponses sont étudiées en fonction des proportions des composants du mélange, il faut donc bien noter qu'il s'agit d'un plan de mélanges quand la réponse étudiée dépend des proportions des constituants du mélange et non des quantités de mélange utilisées. Cette non-indépendance des facteurs se traduit par la contrainte fondamentale des mélanges où la somme des proportions est toujours égale à 100% (Ouedrihiri, 2017).

IV.1.1.1 Plan à deux constituants

Les points expérimentaux utilisés, pour les deux composants, dans ce type de conception sont représentés par des droites (Figure 12) (Fadil et al., 2015). Certains aspects doivent être pris en compte lors du choix d'une conception de mélange appropriée, notamment le nombre de variables et d'interactions à étudier, l'efficacité de la modélisation des données, la faisabilité et les coûts associés à l'exécution. Les deux types de plans de mélange les plus couramment adoptés sont les plans en réseaux (Simplex lattice design) et les plans centrés augmentés (Augmented Simplex centroid design) (Goupy and Creighton, 2007).

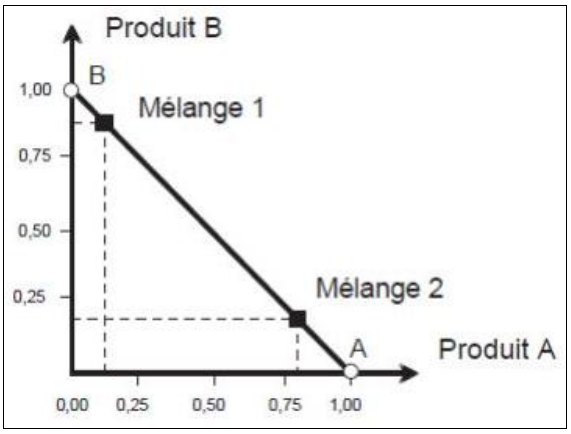


Figure 12. Représentation d'un mélange binaire

IV.1.1.2 Plan de mélange à trois constituants

Géométriquement, le mélange ternaire a la forme d'un triangle équilatéral, avec les produits purs aux sommets du triangle. Alors qu'un mélange binaire est représenté par les côtés d'un triangle, le côté AB du triangle représentant la composition du mélange des produits A et B uniquement (Figure 13). Ces mélanges ne contiennent pas de produit C. Chaque côté du triangle est noté de 0 à 1. Un point sur la face interne du triangle représente un mélange ternaire. La composition de chaque produit est présentée sur le côté du triangle. Le contenu du produit A se lit du côté AB, qui est l'échelle du produit A. Le point M est projeté sur AB parallèlement à BC (en face de A), ainsi que le contenu des autres produits B et C (Goupy and Creighton, 2007).

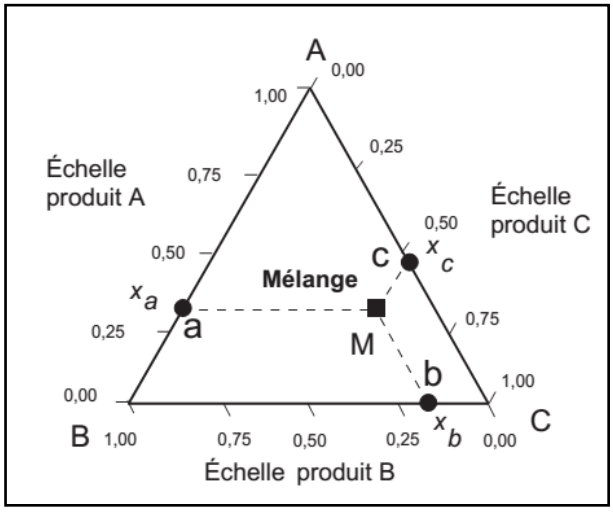


Figure 13. Représentation du mélange ternaire

IV.2 Plan de surface de réponse

La Méthodologie de Surface de Réponse (MSR) est une technique statistique avec laquelle des processus complexes peuvent être optimisé tout en adoptant une approche de

plusieurs facteurs et réponses (Yolmeh and Jafari, 2013). La première étape de cette méthode consiste à déterminer les facteurs qui seront utilisés dans l'étude. Elle peut être effectuée selon un plan fractionné ou le plan de Plackett-Burman ou en se basant sur une étude bibliographique ; cela facilite le choix des facteurs qui ont une influence sur les réponses avec un nombre réduit des essais. On distingue le plan composite centré et le plan de Box-behnken, ce dernier plan permet d'établir directement des modèles du second degré, il est facile à mettre en œuvre et possède la propriété de séquentialité (Fadil, 2015).

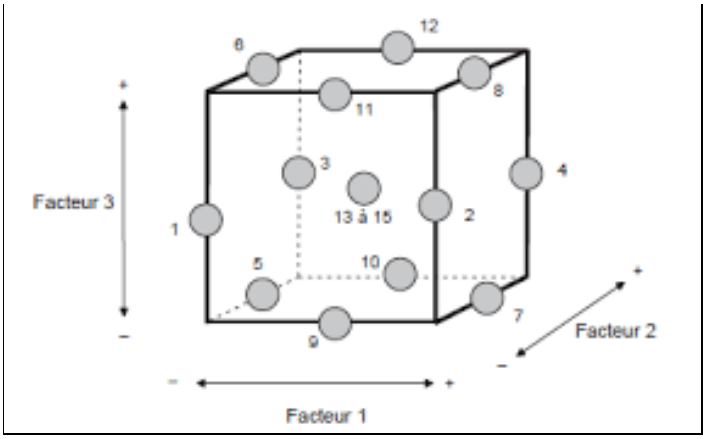


Figure 14. Représentation du plan box-behnken à 3 facteurs

Chapitre II

Détermination des profils aromatiques des huiles essentielles étudiées

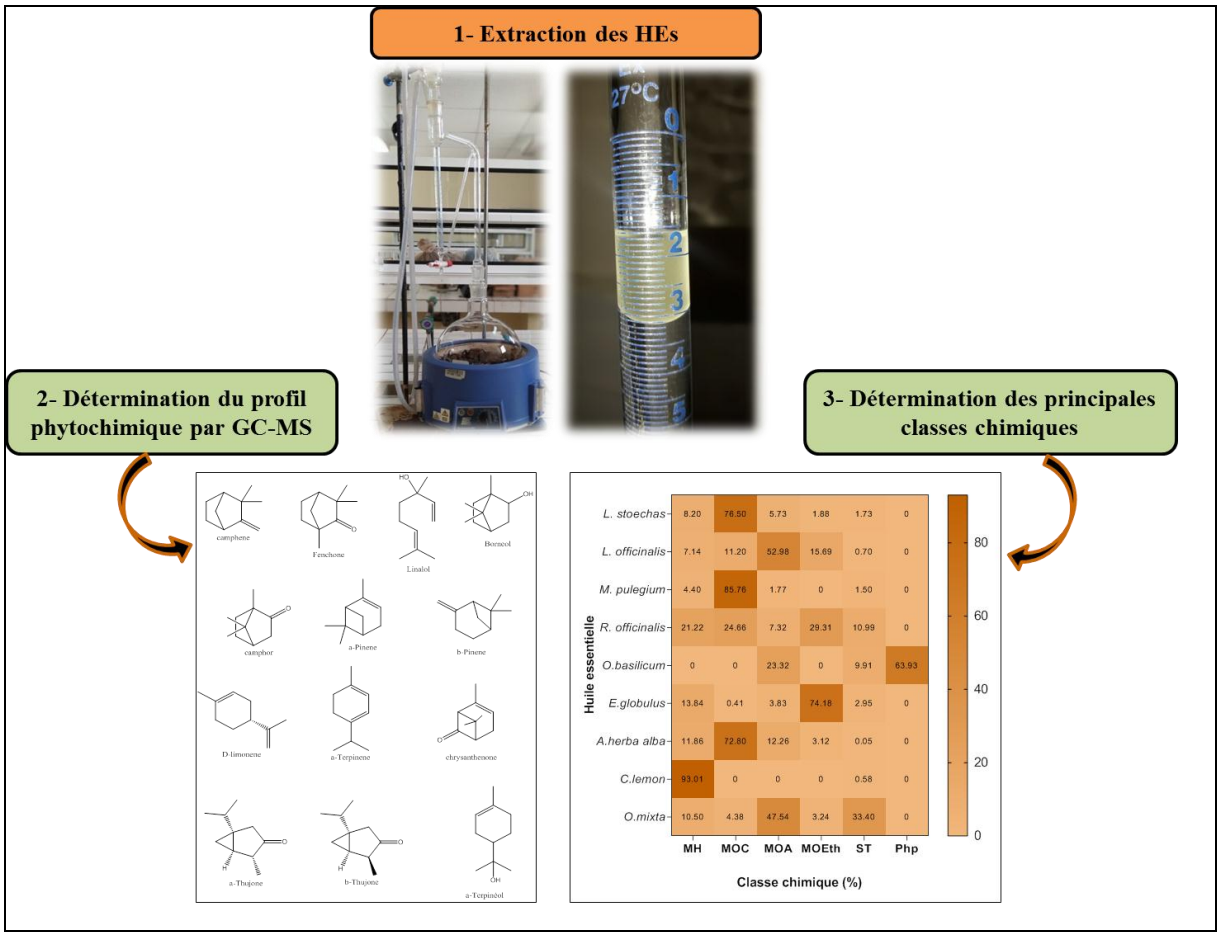


Figure 15. Schèma récapitulatif du Chapitre II

Introduction

Le Maroc est bien connu par sa flore riche et diversifiée, notamment pour le secteur des plantes aromatiques et médicinales (PAMs) tout en révélant l'important endémisme pour plusieurs espèces végétales, et cela grâce, sans aucun doute, à sa situation géographique et sa diversité bioclimatique (El Meskaoui et al, 2008 ; Ghanmi et al., 2011). L'importance accordée à ce secteur n'est pas nouvellement parue, et elle résulte, en fait, de leur implication intéressante dans le domaine socio-économique et de la santé publique. D'où le regain d'intérêt pour étudier tout ce qui concerne les PAMs, de l'origine et la phyto-chimie aux activités biologiques (El Meskaoui et al, 2008 ; Jamaleddine et al., 2019). D'ailleurs, plusieurs recherches scientifiques ont été publiées dans ce contexte tout en valorisant les métabolites secondaires de cette flore, en particulier les HEs, en tant qu'antimicrobiens, antioxydants, antiviraux, anticancers, insecticides, antiparasites, etc., et sans négliger la mise en évidence du profil phytochimique des espèces aromatiques et médicinales étudiées (Bouyahya et al., 2017a; Ez zoubi et al., 2020 ; Jafari et al., 2021 ; Aazza et al., 2016).

En fait, la composition chimique de chaque plante est comme une clé pour avoir accédé à son monde chimique unique, et bien comprendre la propriété biologique qu'elle possède. Alors, l'étude chimique des espèces végétales des PAMs nous a permis de construire une carte spécifique pour chaque plante. En effet, il est actuellement très connu que les HEs issues de la flore aromatique et médicinale constituent un mélange complexe de nombreux constituants phytochimiques tels que les terpènes, les acides, les phénols, etc…, ces divers composants diffèrent dans leurs propriétés chimiques et physiques d'une espèce à l'autre, et d'un organe à l'autre (Pavela, 2006). Chaque huile porte une carte d'identité biochimique appelée le chémotype qui est défini par la nature et la quantité des molécules chimiques identifiées dont généralement les constituants majeurs déterminent le type chimique de chaque espèce, citant à titre d'exemple le 1, 8-cinéole, un monoterpène éther, qui est présent en tant que constituant principal chez plusieurs espèces aromatiques quel que soit la famille botanique, parmi lesquelles on note Eucalyptus, *Eucalyptus globulus* Labill., le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.) et le laurier (*Laurus nobilis L.*) (Benelli et al., 2020).

Généralement, le classement des PAMs dans des familles bien déterminées, à savoir les lamiacées, la famille la plus répondue, astéracées, myrtacées, rutacées, et autres, permet en quelque sorte de prédire les constituants chimiques, ou la classe chimique qui domine chaque plante, néanmoins, cela n'est pas toujours le cas vu l'importante variabilité chimique très remarquée aussi bien pour les espèces différentes appartenant à la même famille, ou même au

sein de la même espèce, ou d'une partie végétale à l'autre. En effet, plusieurs facteurs ont un impact, direct, et/ou indirect, significatif sur la composition qualitative et quantitative des HEs, ils peuvent être divisés en facteurs extrinsèques tels que la localisation géographique, les conditions climatiques, citant par exemple la température, l'humidité relative, la durée d'ensoleillement, le mouvement de l'air et les précipitations pendant le développement de la plante, et les facteurs agronomiques (fertilisation, irrigation), sans oublier les procédés de séchage et les techniques de l'extraction (Msaada et al., 2012 ; Belhattab et al., 2014 ; Essaqui et al., 2016). Alors que les facteurs intrinsèques sont évidemment liés à la plante elle-même, à savoir la partie de la plante d'où extraite l'HE, le stade phénologique de la plante, la période de récolte (Telci et al., 2009 ; Figueiredo et al., 2008). Les altérations génétiques ne doivent pas être ignorées dans l'explication de la variation chimique des HEs (Riahi et al., 2013 ; Li et al., 2020). En outre, les interactions entre les plantes et les micro-organismes, en particulier les micro-organismes bénéfiques, ont une influence sur le métabolisme des plantes et peuvent donc affecter automatiquement le profil chimique (Khan et al., 2019).

Le présent chapitre a porté sur la caractérisation chimique des HEs extraites de plusieurs espèces aromatiques et médicinales appartenant aux différentes familles telles que Lamiacées (*Lavandula stoechas* L., *Lavandula officinalis* L., *Mentha pulegium* L., *Rosmarinus officinalis* L., et *Ocimum basilicum* L.), Myrtacées (*Eucalyptus globulus* Labill), Astéracées (*Artemisia herba alba* et *Ormenis mixta*), et Rutacées (*Citrus limon* L. (Burman f),). Le but était de révéler la variabilité phytochimique et de mettre en évidence les différents chémotypes des plantes étudiées. Cette étude peut ainsi servir comme un chapitre qui résume le profil chimique des HEs couramment utilisé au Maroc dans divers domaines, pharmaceutique, alimentaire, cosmétique, aromathérapie…Cela peut faciliter la tâche pour les chercheurs qui veulent étudier certaines activités tout en cherchant des plantes riches en composés bien déterminés, en monoterpènes, ou en monoterpènoides, alcools, cétones…ou en sesquiterpènes afin de les tester seul ou en combinaison. Par l'information sur les propriétés chimiques des plantes, on peut mieux choisir les espèces dotées de l'activité recherchée et bien interpréter leur effet biologique. Le volet que nous voulons souligner dans les chapitres qui suivent, c'est l'activité insecticide.

Matériel et Méthodes

I. Lieu et période d'étude

L'ensemble des travaux à savoir l'extraction des HEs et les tests insecticides, qui ont été menés pendant la période de 2018- 2022, sont réalisés au sein du Laboratoire de Chimie Organique Appliquée à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès, et du Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu et de l'Institut Supérieur des Professions Infirmières et Techniques de Santé de Fès relevant du Ministre de la santé et de la protection sociale. L'analyse chimique par la Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) est faite au sein de la Cité d'Innovation-Fès.

II. Extraction et composition chimique des PAMs étudiées

II.1 Matériel végétal

Les plantes utilisées dans cette présente recherche sont *Lavandula stoechas L.*, *Lavandula officinalis L.*, *Mentha pulegium L.*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Ocimum basilicum L.*, *Eucalyptus globulus labillardiere*, *Citrus limon L.*, *Artemisia herba Alba* Asso, et *Ormenis mixta var.multicaulis.* Toutes les espèces, sauf les échantillons de la lavande stoechade et officinale, de la menthe et du romarin, sont acquises auprès de la société BioPAM qui se trouve à Taounate et qu'elle est spécialisée dans la production, la transformation et la commercialisation des PAMs. *L. steochas*, *L. officinalis*, *R. officinalis*, et *M. pulegium* sont récoltées, pendant leurs stades de floraison, au niveau de la région de Taounate, dans une zone montagneuse qui est située dans la commune rurale de Timezgana (Nord-Est du Maroc, 34° 34′ 48" Nord, 4° 43′ 48" Ouest), à une altitude d'environ 800 m. L'identification botanique des plantes a été réalisée à l'Institut National des Plantes Aromatiques et Médicinales (ANPAM)-Taounate, de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. La collecte des parties aériennes de chaque plante a été effectuée selon la norme AFNOR (2000) et en suivant le guide publié par Lkhoumsi et al., 2014 sur les directives de bonnes pratiques de collecte relatives aux plantes aromatiques et médicinales au Maroc.

II.2 Extraction des HEs

L'extraction est effectuée pour les plantes récoltées ; *L. steochas*, *L. officinalis*, *M. pulegium.* et *R. officinalis*. D'abord, les parties aériennes (les feuilles, les fleurs et les tiges) sont déshydratées à l'air libre et à température ambiante. 100 grammes (100g) des parties séchées sont ensuite soumis à l'hydrodistillation durant environ 3 heures à l'aide de l'appareil Clevenger selon la méthode décrite par la Pharmacopée européenne (COE, 2007). Après

distillation, les HEs sont récupérées dans des flacons contenant une quantité de sulfate de sodium anhydre (0,5 à 2 g) pour éliminer les traces d'eau résiduelles. Les huiles recueillies sont ultérieurement stockées à 4 °C dans des flacons sombres en verre jusqu'une éventuelle utilisation. Le rendement en HE a été calculé par rapport au poids sec de la plante par la formule suivante :

$$\textbf{\textit{Rendement en HE}}\ (\%) = \frac{Volume\ de\ l'HE(ml)}{Masse\ de\ la\ plante\ sèche\ (g)} * 100$$

II.3 Analyse chimique des HEs

La Chromatographie Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) a été utilisée pour identifier qualitativement et quantitativement les composés chimiques contenus dans les HEs étudiées. L'analyse a été effectuée sur un système GC-MS de la série Shimadzu (TQ-8040) (Tokyo, Japon) équipé d'un auto-injecteur AOC-20i Plus. La colonne utilisée était une colonne capillaire Rxi-5MS (30 m × 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm). La température de four a été programmée à 50 ◦C pendant 5 min et augmentée à 250 ◦C en raison de 4 ◦C/min et maintenue isotherme pendant 10 min. La température du détecteur a été réglée à 280◦C dont le hélium a été utilisé en tant que gaz vecteur avec un débit de 1, 4 ml/min. Le mode d'ionisation est l'impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV avec un volume d'injection de l'ordre de 1 µl. La gestion du système GC-MS, le réglage des paramètres pour la GC et la spectrométrie de masse, ainsi que la réception et le traitement des données ont été effectués à l'aide du logiciel Shimadzu GC-MS solution ver.4 (Tokyo, Japon). Les composés ont été identifiés sur la base d'une comparaison de leurs spectres de masse avec les données de la librairie d'Adams (Adams, 2007), et de la 11eme édition NIST 2017 (National Institute of Standards and Technologies, Mass Spectra Libraries).

Résultats et discussion

I. Rendement en HEs

La distillation des parties aériennes séchées de quatre espèces aromatiques a montré des rendements de l'ordre de 1,29 ± 0,1% pour *L. officinalis,* de 1,7 ± 0,05% pour *L. stoechas*, de 2,26 ± 0,14% pour *M. pulegium* et de 1,96 ± 0,33% pour *R. officinalis.*

II. Détermination du profil chimique des espèces étudiées

Les résultats relatifs au profil chimique de toutes les HEs sont regroupés dans le Tableau 2. L'analyse chimique par GC-MS a montré une forte diversité chimique et nous avons souligné une différence significative en ce qui concerne la nature et les pourcentages des constituants chimiques identifiés pour chaque HE. En effet, la fraction monoterpénique, plus particulièrement celle oxygénée, représente la classe chimique la plus abondante par rapport à la fraction des monoterpènes hydrocarbures et sesquiterpènes (Figure 16).

Tableau 2. Profil phytochimique des HEs analysées par GC-MS

Composé chimique	**IR[a]**	**IR[b]**	**Pourcentage (%)**								
			L.s	**L.o**	**M.p**	**R.o**	**O.b**	**E.g**	**A. h. A**	**C. l**	**O. m**
Santolinatriene	902	907									1,56
Tricyclene	927	923	0,25	tr							
α-Thujene	931	930				0,48		0,12			
α-Pinene	939	932	2,84	2,94	0,42	**12,76**		**8,57**	**6,94**	**4,51**	**4,21**
3-Methyl-cyclohexanone	952	945			0,16						
Camphene	954	946	**4,09**	3,27		2,47		0,51	1,24		
Thuja-2,4(10)-diene	957	960	0,05	0,08		t					
β-Myrcene	958	965				0,08				1,61	tr
β-Phellandrene	964	999								3,04	
Verbenene	967	963									0,32
Sabinene	976	973			0,08						0,24
β-pinene	980	974			0,33	2,89		0,10	3,68	**18,43**	
Myrcène	990	989			0,16	2,54					0,65
3-Octanol	995	993	0,06		1,32						
Yomogi Alcohol	998	996									1,68
δ-2-Carene	1001	998			0,11						
α-Phellandrene	1005	1006				t		0,34			
p-Cymene	1026	1022	0,32	0,45				2,60			0,83
D-Limonene	1032	1024	0,31	0,32	1,34			1,42		**53,45**	1,46
1,8 cinéole	1035	1033	1,42	**15,12**		**29,31**	tr	**74,18**	3,12		3,24
Alcool de santoline	1037	1030									**38,56**
o-Cymene	1042	1041								3,56	
γ-Terpinene	1062	1024	0,34	0,05		t		0,18		**8,50**	1,23
p-Mentha-3,8-diene	1071	1072			2,04						

cis-Linalooloxide (furanoid)	1077	1074	0,41	0,52							
Artemisia alcohol	1084	1083									**4,13**
Camphenilone	1086	1083	0,08								
Fenchone	1088	1087	**30,39**	0,15							
α-Thujone	1089	1090							**20,70**		
β-Thujone	1098	1101							**19,60**		
Chrysanthenone	1105	1104							**24,46**		
Linalool	1101	1099	0,74	**34,32**	t		**23,32**	0,10		tr	
Myrcenol	1118	1113									1,78
Fenchol	1121	1115	1,12	1,14		t		0,11			
α-Campholenal	1130	1125	0,24	0,44							
trans-Verbenol	1130	1133									
trans-pinocarveol	1139	1140						0,54			
Isopulegol	1146	1149						0,09			
Camphre	1147	1143	**43,97**	**10,26**		**24,66**			**7,32**		3,04
cis-Chrysanthenol	1148	1150							0,33		
Menthone	1154	1148			0,13						
Borneol	1165	1166	2,92	**12,93**		5,46		0,30	2,51		0,44
Pinocarvone	1168	1162	0,41	0,44	1,21			0,06			1,34
Menthol	1173	1167			0,45						
(2E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal	1174	1170					0,95			2,96	
Neral	1250	1235					0,55			1,84	
Estragole	1172	1180					**63,93**	tr			
trans-Linalooloxide	1177	1088	0,05	0,05							
Terpinen-4-ol	1181	1174	0,22	2,31		t		0,24	0,37		tr
(Z)-pinocarveol	1183	1182									0,95
p-Cymen-8-ol	1187	1183	0,34	tr				0,08			
α-Terpineol	1193	1186	0,12	2,12		0,63		1,80	**9,05**	tr	
Dihydrocarvone	1194	1191			3,66						
Myrtenol	1194	1194				1,23		0,05			
Myrtenal	1198	1192	0,25	0,22				0,21			
Verbenone	1212	1204	1,08	0,21							
trans-Carveol	1221	1200	0,21	0,12				0,08			
Fenchylacetate (endo)	1224	1219	0,05	0,06							
Nerol	1228	1227						0,21			
Cis-carveol	1230	1229						0,10			
Pulegone	1238	1233			**74,03**						
Carvone	1242	1242	0,12	0,14	**5.45**			0,05			

Acétate de linalyl	1245	1241	3,10	**4,23**							
Piperitone	1252	1253			1,12			0,30			
Geraniol	1255	1254						0,13			
Acétate de bornyl	1289	1283	1,20	1,21		t		tr			
1,3-p-menthadien-7-al	1293	1290	0,07								
Myrtenyl acetate	1322	1324	tr			0,22					
α-Terpinyl acetate	1350	1347						1,20			
α-Cubebene	1351	1345				0,15					
Neryl acetate	1352	1359								0,92	
Geranyl acetate	1352	1379						tr		0,58	
α-Copaene	1381	1374				0,10					
β –Bourbonene	1384	1387				0,16					
β–cubebene	1390	1388									0,32
β-caryophyllene	1418	1417				2,55	tr	0,12			
(E)-Caryophyllene	1418	1419						tr			0,76
cis-α-Bergamotene	1430	1412					1,67				
γ-Elemene	1433	1436									1,68
Aromadendrene	1439	1439						0.42			
(E)-β-Farnesene	1458	1449					0,66				**6,23**
allo-Aromadendrene	1461	1459						0,34			
γ-Gurjunene	1473	1467				0,20					0,32
Germacrene D	1487	1484	tr	0,05	t	0,42	0,91	tr	0,05		3,85
Ledene	1493	1490				2,92					
α-Selinene	1494	1493						0,22			
Bicyclogermacrene	1494	1489									1,65
Caryophyllene	1494	1494			0,35		1,25	tr			
α-Muurolene	1499	1491				0,32					0,44
β-Bisabolene	1500	1499					0,28			0,58	
γ-Cadinene	1513	1505				0,8					0,62
α-Bisabolene	1518	1503					**4,52**				
trans-Calamenene	1527	1450	tr	tr				tr			
Geranyl butyrate	1549	1532	0,05								
(E)-Nerolidol	1564	1560						0,25			0,72
Ledol	1565	1566						0,13			
Germacrene D-4-ol	1574	1575									1,32
Spathulenol	1576	1578						0,50			
α-Humulene	1579	1461					0,62				

Caryophyllene oxide	1581	1580				2,75					0,45
Globulol	1583	1581						0,62			
Copaen-4-α-ol	1584	1590				0,43					
Guaiol	1595	1597						0,21			
Tetradecanal	1611	1612				0,21					
1,10-di-epi Cubenol	1623	1618	1,52								
γ-eudesmol	1630	1630			0,26			0,08			
epi-α-muurolol	1632	1640									**5,23**
Cubénol	1642	1636									1,42
epi-α-Cadinol	1647	1640	tr								
α-Eudesmol	1649	1652			0,44						
β-Eudesmol	1658	1653	0,21					0,06			
α-Cadinol	1661	1653	tr				tr				**4,68**
β-bisabolol	1664	1658									0,54
τ.Cadinol	1653	1654				0,19					
α-bisabolol	1683	1685									0,43
Caryophyllene acetate	1700	1701									2,42
(Z)-β−Santalol acetate	1823	1828									0,32
Monoterpènes hydrocarbures			8,20	7,14	4,40	21,22		13,84	11,86	93,01	10,50
Monoterpènes oxygénés			88,62	86,03	87,53	61,51	24,82	79,83	87,46	6,30	55,16
Sesquiterpènes hydrocarbures				0,07	0,35	7,62	9,91	1,98	0,05	0,58	17,91
Sesquiterpènes oxygénés			1,73		0,70	3,37		0,97			15,49
Phénylpropènes							63,93				
Total			**98,55**	**93,24**	**92,98**	**93,72**	**98,66**	**96,62**	**99,37**	**99,89**	**99,06**

a : Composants identifiés sur la base des spectres de masse et des indices de rétention.
b : Indices de rétention issus de la littérature (Adams 2007 ; Babushok et al. 2011).
L.s : *L. stoechas ;L.o :L. officinalis ; M.p: M. pulegium ; R.o : R. officinalis ; O.m: O. basilicum ; E.g: E. globulus ;A. h.A : A. herba Alba ; C. l :C. limon ; O. m :O. mixta*.. tr : Traces (< à 0,05%).

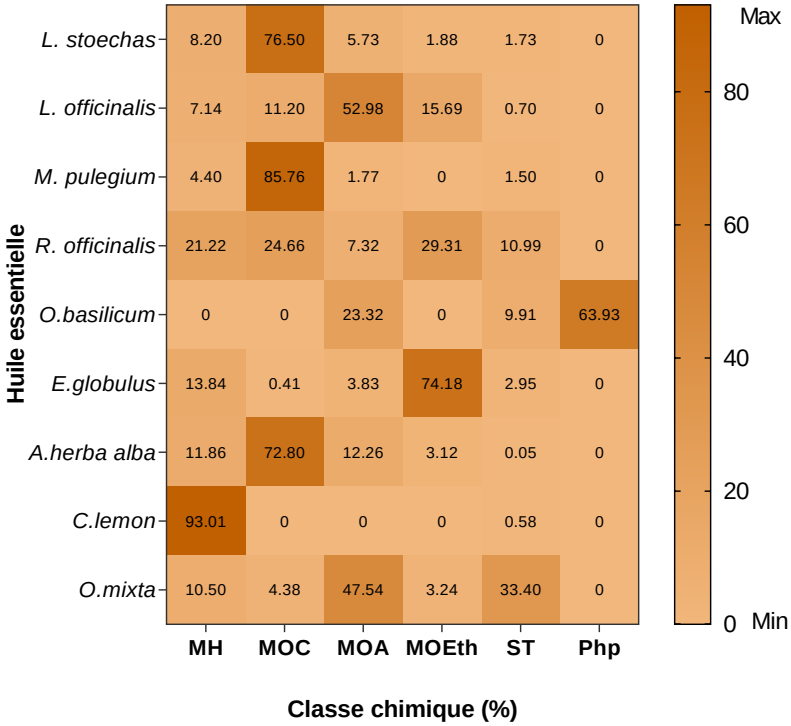


Figure 16. Carte thermiques des principales classes chimiques des HEs analysées.

MH : Monoterpènes Hydrocarbures ; MOC : Monoterpènes oxygénés cétones ; MOA : Monoterpènes oxygénés alcools ; MOEth : Monoterpènes oxygénés éthers ; ST : sesquiterpènes totaux ; PHp : Phénylpropènes.

II.1.1 Profil chimique des PAMs de la famille Lamiacée

II.1.1.1 Composition chimique de l'HE de *L. stoechas*

Les HEs des deux espèces de Lavandula sont très riches en monoterpènes plus particulièrement les constituants oxygénés avec de petites quantités en composés sesquiterpènes. Il est indiqué dans le tableau de la composition chimique (Tableau 1) que 33 constituants correspondant à 98, 55 % sont identifiés pour l'HE extraite de *L. stoechas*. Nous avons remarqué la prédominance des monoterpènes oxygénés (88, 62) particulièrement les cétones (76, 05%), suivis des monoterpènes hydrocarburés (8, 2%), alors que les composés sesquiterpènes représentent seulement 1, 73% de la totalité de l'HE. Cette huile est trouvée riche en camphre (43,97%), fenchone (30,39%), camphène (4,09%), acétate de linalyl (3, 10%), bornéol (2,92%), et l'α-pinène (2,84%) alors que les autres constituants volatils sont détectés à de très faibles valeurs (< à 2% ou traces).

La composition chimique de l'HE de *L. stoechas* a été largement rapportée par d'autres études antérieures. Nos résultats rejoignent parfaitement ceux récemment publiés par Ghalbane et al. (2022), qui ont montré qu'une espèce de *L.* stoechas est caractérisée par des teneurs élevées en camphre (44 %), en camphène (14,8 %), en fenchone (9,1 %) et en 1,10-di-

epi-cubénol (4,6 %), et que ce composé sesquiterpène oxygéné est présent en faible quantité dans notre échantillon (1,52%). Nos résultats sont un peu différents de ceux obtenus par Noureddine et al. (2019) pour l'HE extraite des parties aériennes de *L. stoechas* prélevée d'une forêt naturelle à l'ouest de l'Algérie, ils ont détecté des teneurs élevées en l'α-fenchone (39, 0 %), camphre (18, 5 %), l'acétate de bornyl (7, 79 %) qui ne représente que 1.2% dans l'huile de notre plante, plus le viridiflorol (4, 55 %) que nous n'avons pas observé pour notre lavande. Dans le même sens, l'HE obtenue d'une espèce de *L. stoechas* de la Tunisie a montré une similarité qualitative pour certains constituants alors qu'une différence quantitative est considérablement remarquée au niveau des pourcentages enregistrés. Le premier composé majoritaire était un camphre et il est détecté à un taux inférieur à ce que nous avons trouvé (36, 14%), suivi du 1,8-cinéole (25, 16%) ; ce composé éther est présent à faible teneur dans notre HE (1, 42%), puis le camphène (11, 44%), et la fenchone (9, 08%) (Ben Slimane et al., 2015). Apparemment, le camphre, la fenchone, le bornéol, et le 1,8-cinéole constituent les éléments chimiques les plus représentatifs des HEs issues des espèces de *L. stoechas* étudiées par des chercheurs au Maroc (Ez zoubi et al., 2017, Zrira et al., 2003), et en Tunisie (Messaoud et al., 2012). Néanmoins, il a été montré que l'HE extraite d'une autre espèce de *L. stoechas* provenant de la Tunisie a présenté une quantité significative des esters (64, 45 ± 7, 43 %), et des alcools (31, 93 ± 4, 26 %). L'acétate de linalyl (64, 30 ± 7, 55 %), linalool (20, 25 ± 3, 21 %) et β -thujone (8, 97 ± 0, 99 %) ont été détectés comme les composés majoritaires de cette huile (Msaada et al., 2012).

En revanche, d'autres études ont souligné la variation qualitative et quantitative du profil phytochimique des HEs issues de cette plante fortement aromatique. Par ailleurs, la composition chimique de l'HE de *L. stoechas* du nord du Maroc était marquée par la prédominance de la fraction des sesquiterpènes (63, 99%) par rapport à celle des monoterpènes (19, 35%). Cette huile est caractérisée par la présence de nouvelles molécules à savoir 10s,11shimachala-3(12),4-diène (23, 62%), cubénol (16, 19%), méthyle eugénol (6, 19%), δ-cadinène (5, 31%), et l'acétate de myrtényl (4, 96%) (Cherrat et al., 2013).

Il est ainsi évident de mentionner que la diversité chimique de cette espèce résulte de plusieurs facteurs internes et externes. En effet, Angioni et al. (2006) ont étudié l'influence des parties distillées sur la composition chimique de l'HE de *L. stoechas* de l'Italie et ont démontré que la fenchone et le camphre, les composés majeurs de cette huile, ont présenté, respectivement 59, 48% et 15, 36 % dans les tiges et les feuilles, 72, 97% et 9, 25 % dans les fleurs. De plus, Giray et al. (2008) ont rapporté l'influence de trois méthodes d'extraction

(hydrodistillation, extraction à l'eau subcritique, extraction par solvant organique sous irradiation ultrasonique) sur le profil phytochimique de l'HE extraite des fleurs de *L. stoechas*.

II.1.1.2 Composition chimique de l'HE de *L. officinalis*

Pour l'HE de *L. officinalis*, l'analyse GC-MS a identifié 29 constituants correspondant à un total de 93, 24%, dont les composés monoterpènes oxygénés ont constitué la fraction la plus dominante (86, 03%). Cette huile contient des taux significatifs des monoterpènes alcools (52,98%), des éthers (15, 69%), des cétones (11,2%), puis des monoterpènes hydrocarbures (7,14%), tandis que la fraction des sesquiterpènes est à peine détectée (0,07%). Le linalool (34,32%) est le premier composé majoritaire identifié dans cette huile, suivi du 1,8-cinéole (15,12%), du camphre (10,26%), de l'acétate de linalyl (4, 23%), du camphène (3,27%) et de l'α-pinène (2,94%). D'autres composés sont identifiés à des teneurs entre 0, 12% et 2, 31%. En concordance avec ces résultats, l'HE qui a été obtenue par distillation par entrainement à la vapeur d'eau des parties aériennes fraiches de la lavande officinale récoltée à Azrou au Moyen Atlas du Maroc a montré une dominance de l'acétate de linalyl (44, 96%), de linalool (44, 64%), suivi du caryophyllene oxide (3, 15%), ce composé n'est pas identifié dans notre HE (Talbaoui et al., 2012). De même, l'HE extraite, par la même technique, des fleurs de *L. officinalis* cultivée en France était riche en monoterpènes oxygénés. Elle contenait une quantité significative de l'acétate de linalyl (38 %), linalool (34%), en présence de trans-bêta-ocimene (2%), cis-bêta-ocimene (1, 5%), et l'acétate de lavandulyl (1%) (de Paula Martins et al., 2019). De plus, l'HE distillée à partir des fleurs d'une espèce algérienne de la lavande stoechade a été composée essentiellement de l'acétate de linalyl (15, 26%), le camphre (11, 25%), γ-terpinene (11, 2%), linalool (10, 68%), et le 1,8-cinéole (10, 25%) (Laib, 2012).

Néanmoins, l'HE d'une autre espèce marocaine a montré une différence remarquable de son profil chimique. L'huile extraite a été constituée principalement de monoterpènes comme 3-benzylsulfonyl-2, 6, 6-trimethylbicyclo (3, 1, 1) heptane (23, 61%), l'acétate de linalyl phenyl (15, 98%), campholen aldéhyde (9, 17%), bornéol (9, 3%), 1,8-cinéole (7, 77%), et γ-cadinène (11, 64%) (Chahboun et al., 2015). D'un autre côté, l'effet de deux méthodes d'extractions par hydrodistillation sur la composition chimique des HEs extraites des fleurs d'une espèce de *L. officinalis* L. de la Serbie a été étudié par Stanojević et al., 2011. Bien qu'une différence a été clairement détectée en ce qui concerne la nature et les pourcentages des constituants identifiés d'une méthode à l'autre, l'analyse GC-MS a montré

la dominance du 1,8-cinéole, linalool, camphre, acétate de linalyl, bornéol, et cis-linalool oxide.

En effet, la fraction des monoterpènes oxygénés et qui regroupe linalool, camphre, γ-terpinène, terpinen-4-ol, acétate de linalyl, β-ocimene et 1,8-cinéole a été rapportée comme étant la fraction principale observée dans les HEs extraites des espèces de la lavande officinale (Laib, 2012 ; Diass et al., 2023). Les profils phytochimiques observés pour toutes les HEs de la lavande, officinale ou stoechade, ont montré leurs richesses en divers composés tels que les monoterpènes oxygénés et hydrocarbures en présentant généralement des chimiotypes intéressants ; chimiotype cétone pour l'huile de *L. stoechas* L. et chimiotype alcool pour *L. officinalis* L.

II.1.1.3 Composition chimique de l'HE de *M. pulegium*

La composition chimique de l'HE de *M. pulegium* a révélé l'identification de 19 molécules avec un pourcentage total de 92,98%. L'huile obtenue a montré une dominance des monoterpènes oxygénés (87,53 %), les composés cétones ont constitué la sous-classe la plus abondante (85,76%) dont le pulégone a représenté le pourcentage le plus élevé (74,03%), suivi du carvone (5,45%), dihydrocarvone (3,66%), et p-mentha-3,8-diène (2,04%). Les monoterpènes hydrocarbures sont identifiés uniquement à 5,93%. Alors qu'un total de 1, 05% est enregistré pour les sesquiterpènes. Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par Aimad et al., (2021) qui ont pu identifier 20 composés pour l'HE obtenue par hydrodistillation de *M. pulegium* récoltée à Ouezzane (Nord-Ouest du Maroc), correspondant à 98, 91% de la totalité de l'huile. Cette HE a présenté presque les mêmes constituants majoritaires avec la prédominance du R-(+)-pulégone (76,35%), carvone (5,84%), dihydrocarvone (5,09%), et octan-3-ol (2,25%). Une similarité en certains composants chimiques a été également soulignée pour l'HE distillée des parties aériennes fraiches de *M. pulegium* collectée d'Ait Ourir (Marrakech). Cette huile a été trouvée riche en monoterpènes oxygénés (77,3%) et hydrocarbures (9,2%) dont le pulégone (57,8%) a montré la majeure contribution, suivi du menthone (9,5%), du limonène (4,9%), et de p-menthane-3-ol (3,6%) (Aljaiyash et al., 2018a). De même, Bouyahya et al. (2017a) ont aussi prouvé la dominance des monoterpènes notamment ceux oxygénés (83,86%) au niveau de l'HE de *M. pulegium* sauvage récoltée à Ouezzane (Nord-Ouest du Maroc). Le pulégone était identifié à un taux significatif (40,98%), suivi du menthone (21,16%), de l'α-terpinéol (7,98%), de l'humulène (5,4%), de la verbenone (4,53%), et du 1,8-cinéole (3,82%). Il convient de noter que ces quatre derniers constituants ne sont pas détectés dans le profil chimique de notre HE. Cette

abondance en monoterpènes a été également rapportée par Cherrat et al., (2013) dont 86, 40% des composés volatils étaient identifiés dans l'HE de la menthe qui a été collectée du nord du Maroc et obtenue par entrainement à la vapeur des parties aériennes séchées à température ambiante (15-29C°) et à l'obscurité, avec une teneur élevée en pulégone (33,65%). Cette huile a montré une différence significative pour les autres composés identifiés tels que l'acétate de l'α-terpinényl (24,29%), suivi du bicyclo 3,1,0- hexane, 6-isopropylidene-1-méthyl- (12, 59%), 1,8-cinéole (10,53%), α-humulène (5,58%) qui sont totalement absents dans notre échantillon, ainsi que l'α-pinene (5,34%) qui est présent dans la composition chimique de notre HE, mais à très faible quantité (0,42%). Il est également important de souligner qu'une autre HE de *M. pulegium* collectée au Sud de la Tunisie a montré une variation significative dans sa composition chimique, avec une dominance des composés alcools tels que par exemple le 1,8-cinéole (14,60%), menthol (8,76%), ainsi que des cétones comme p-menthan-3-one (14,9%), et pipéritenone (11,4%) (Ben Chaaban et al., 2019). Cependant, la dominance n'est pas toujours attribuée aux monoterpènes, la récente étude de Yakhlef et al. (2020) a montré l'abondance des composés sesquiterpènes (36,03%) dans l'HE extraite des tiges et feuilles de *M. pulegium* récoltée de son habitat naturel au sud-est de la commune Batna en Algérie, cette huile a été dominée par le pipéritenone oxide (35,49), et le caryophyllene oxide (35,27), suivi de cis-cinérolone (10,95). Malgré cette diversité, les HEs de *M. pulegium* sont considérés en tant que chimiotype pulégone au Maroc (Ait-Ouazzou et al., 2012 ; Zekri et al., 2013 ; Amalich et al., 2016) et à d'autres pays tels que l'Egypte (El-Ghorab, 2006), la Tunisie (Mkaddem et al., 2007) et l'Algérie (Brahmi et al., 2016 ; Abdelli, 2016). L'identification des composés comme majoritaires, autre que le pulégone, a été aussi rapportée par d'autres chercheurs notamment la pipéritone (Derwich et al., 2010).

D'ailleurs, différents facteurs influencent d'une manière ou une autre la composition qualitative et quantitative des HEs obtenues de cette plante aromatique tels que l'effet de la technique du séchage des parties distillées (séchage à l'ombre, au soleil, et au four) dont le séchage a induit une légère augmentation de la teneur en pulégone et en menthone avec une diminution du limonène (Aljaiyash et al., 2018a). En outre, la technique d'extraction constitue un facteur important dans la diversité chimique de cette espèce dont Yasa et al. (2011) ont identifié l'iso-menthone (42,1%) et pulégone (28,9%) comme les constituants majeurs obtenus par la méthode de distillation à la vapeur d'eau. Alors que le pulégone (34,6 %) et pipéritenone (31,4 %) ont été identifiés en tant que principaux constituants dans l'HE extraite par l'hydrodistillation par Clevenger.

II.1.1.4 Profil chimique de *R. officinalis*

Quant à l'HE extraite de *R. officinalis,* les profils chromatographiques nous ont permis d'identifier 24 constituants représentant 93,72% de la totalité de l'huile. Les monoterpènes oxygénés (61,72%) sont les plus abondants avec un taux élevé des composés éthers (29,69%), suivis des cétones (24,86%). Les monoterpènes hydrocarbures ont constitué 21,22%, tandis qu'un pourcentage de 10,99 % est attribué aux sesquiterpènes. Les principaux constituants identifiés sont 1,8-cinéole (29,31%), camphre (24,66%), α-pinène (12,76%), et bornéol (5,46%), et les composants mineurs sont détectés autour de 2% tels que ledene (2, 92%), β-pinène (2,89%), β-caryophyllene (2,55%), myrcène (2,54%), et camphène (2,47%), alors que d'autres molécules sont présentés à des quantités comprises entre 0,2 et 1,23%. Cette composition chimique est presque qualitativement proche, pour la plupart des composés, de celle publiée par Bouyahya et ses collaborateurs (2017a) puisqu'ils ont révélé que l'HE de *R. officinalis L*. appartenant à la province de Ouezzane (Nord-Ouest du Maroc) était riche en composés terpènes notamment ceux oxygénés. Cette huile était caractérisée par la présence du monoterpène éther ; le 1,8-cinéole (23,67%), comme premier constituant majoritaire et qui a été identifié à une teneur plus ou moins inférieure par rapport à ce qui est démontré par notre analyse chimique, de même pour le camphre (18,74%). Alors que le composé alcool, bornéol, a été identifié à un pourcentage trois fois plus élevé (15,46%), puis l'hydrocarbure, α-pinène, avec une quantité légèrement similaire à ce nous avons trouvé (14,07%), suivi du caryophyllene (8,66%), verbénone (4,68%), camphène (2,71%) et l'acétate de bornyl (2,58%). En revanche, nos résultas ne concordent pas avec ceux obtenus pour l'HE d'une autre espèce marocaine du romarin et qui avait comme composés majeurs le (-)-camphre (31, 16%), β-caryophyllene (18,55%), 2,4-hexadiene, 3,4- dimethyl-, (Z, Z) (9,08%), α-fenchene (4,67%), 3-cyclopentene-1-ethanol, 2,2,4-trimethyl- (4,57%), iso-bornéol (4, 37), cis-verbenone (4,33%) et l'acétate de bornyl (3,4%) (Ainane et al., 2019). Le profil phytochimique des HEs de cette plante aromatique a été précédemment rapporté par des études menées dans différentes régions au Maroc (Ait-Ouazzou et al., 2011 ; Talbaoui et al., 2012 ; Fadil et al., 2017), en Tunisie (Ben Slimane et al., 2015), et en Italie (Conti et al., 2010).

En effet, les chercheurs ont mis en évidence les facteurs influençant la composition chimique de cette espèce. Par exemple, Khia et al. (2014) ont étudié l'effet de la provenance sur la composition chimique du romarin et ils ont montré que les HEs de *R. officinalis* proviennent des régions d'Aknoul (Nord-Est du Maroc), Rchida et Berkane (l'oriental du Maroc) sont approximativement similaires en termes des composés majeurs identifiés. Bien

qu'une diversité qualitative a été significativement observée entre les trois provenances, le 1,8-cinéole a constitué le composé majoritaire commun et le plus abondant avec une teneur plus significative pour l'échantillon collecté à Berkane (50,80 %), alors que l'échantillon de la provenance d'Aknoul a été caractérisé par un taux élevé de l'α-pinène (13,98 %). Néanmoins, le taux du camphre a été détecté à 7,36% pour la provenance de Berkine par rapport aux autres provenances; Aknoul (11,94%) et Rchida (11,66%). Pour l'β-pinène, sa teneur a légèrement varié d'une région à l'autre avec des taux de 8,70%, 7,78% et 9,16% pour les HEs de Berkine, Aknoul et Rchida, respectivement. D'autres chercheurs ont également élucidé l'effet de la méthode d'extraction sur l'identification qualitative et quantitative des constituants chimiques des HEs du romarin. Généralement, quoique ça soit la méthode d'extraction utilisée (hydrodistillation, micro-onde hydrodistillation et gravité, micro-onde extraction sans solvant), la sous-classe des monoterpènes hydrocarbures et celle des oxygénés (α-pinène, camphène, limonène, camphre, verbénone, γ-terpinène, α-terpinéol, terpinène-4-ol, linalool, et bornéol) reste la fraction la plus identifiée avec une légère différence qualitative (Bousbia et al., 2009; Tigrine-Kordjani et al., 2012). C'est primordial de souligner que l'hydrodistillation, d'après Tigrine-Kordjani et al. (2012), est la plus convenable pour les plantes à HEs riches en monoterpènes oxygénés, car un temps de 5 min est suffisant pour faire extraire une HE contenant une teneur de 5,57% du linalool, 10,10% du camphre, 39,66% de l'α-Pinene, 3,37% du bornéol, 3% de l'α-terpineol, et 2,5% du verbenone Ces molécules constituent les principaux éléments chimiques du romarin marocain.

L'effet des autres facteurs sur la nature et la teneur en composés volatils de *R. officinalis* a été aussi évoquée en citant par exemple l'origine et la période de récolte (Megzari et al., 2015 ; Annemer et al., 2022 ; Hannour et al., 2017), l'altitude (Sabbahi et al., 2020), le stade végétatif de la plante (Verma et al., 2019), les méthodes de séchage de la plante (à l'ombre ou au soleil) et la partie distillée (Khorshidi et al., 2009 ; Ghanmi et al., 2011). La cultivation influence aussi le profil phytochimique du romarin (Sakar et al., 2023). Généralement, les conditions environnementales (facteurs extrinsèques) et le facteur génétique (intrinsèque) jouent un rôle très important dans la variation de la composition chimique des populations du romarin (Tigrine-Kordjani et al., 2007 ; Zaouali et al., 2010 ; Ismaili et al., 2019). Cependant, c'est très difficile de préciser quel facteur est à l'origine de la variabilité chimique : les facteurs liés à la génétique ou ceux en relation avec l'environnement, vue que la plupart des études ont évalué cette variation tout en faire collecter des échantillons des plantes dans diverses régions qui présentent des conditions climatiques et

édaphiques tout à fait différentes. D'après les travaux réalisés, il s'agit donc une intra-variabilité importante de *R. officinalis* qui constitue un véritable trésor dans le secteur des PAMs marocaines, dont les principaux chimiotypes dévoilés sont : 1,8-cinéole, α-pinène, camphre, β-pinène, camphène, α-terpineol, bornéol, et β-caryophyllene (Andrade et al., 2018 ; Diass et al., 2021).

II.1.1.5 Profil chimique d'*O. basilicum*

Le tableau 2 présente la composition chimique de l'HE d'*O. basilicum*. L'analyse GC-MS a permi l'identification de 11 molécules avec un pourcentage total de 98,66 %. Le groupe phénylpropène est le plus dominant avec le pourcentage total attribué à l'estragole (63,93%), suivi des monoterpènes oxygénés (24,82%) avec la prédominance des alcools (23,32%). On note l'absence totale des monoterpènes hydrocarbures, tandis que la fraction des sesquiterpènes ne présente qu'environ le quart de la totalité des constituants identifiés (9,91%). L'HE analysée est constituée de l'estragole (63,93%), linalool (23,32%), et α-bisabolene (4,52%) comme composés majoritaires. Les autres constituants sont présents à des teneurs plus ou moins faibles, il s'agit, par un ordre décroissant, de cis-α-bergamotène (1,67%), caryophyllene (1,25%), (2E)-3,7-dimethyl-2,6-octadienal (0,95%), germacrene-D (0, 91%), 3-methoxycinnamaldehyde (0,82%), allo-aromadendrene (0,66%), α-humulene (0,62%), néral (0,55%), β-bisabolene (0,28%).

Ces résultats confirment ce que Boulamtat et son groupe (2021) ont obtenu pour l'HE d'*O. basilicum* collectée à l'état sauvage au Moyen Atlas du Maroc. L'analyse chimique a montré qu'un total de 98,33% des composés a été identifié pour cette HE qui est caractérisée par une teneur élevée de l'estragole (78,94%), suivi du linalool (16,61%). Par ailleurs, la quantité des sesquiterpènes a été trouvée inférieure à 2 % notamment l'α-bisabolène (1,59%), et trans-α-bergamotène (0,63%) dont son stéréo-isomère (cis-α-bergamotène) est nettement observé dans notre profil chimique avec une teneur de 1, 67%. Une forte ressemblance a été aussi remarquée pour l'HE hydro-distillée des parties aériennes séchées d'une plante d'*O. basilicum* récoltée du Nord-ouest de la Tunisie. L'HE analysée est caractérisée par une richesse significative en estragole (80,87%), dont le taux est très proche de celui révélé dans notre analyse, en plus du linalool (16,12%), et du cis-α-bisabolène (1,31%) avec des quantités mineures de 1, 8-cinéole (0,46%), de bêta-caryophyllène (0,28), d'α-farnésène (0,68%), et d'α-humulène (0,28%) (Alimi et al., 2022). Le linalool et l'estragole constituent également les principaux constituants identifiés pour une autre huile volatile extraite des plantes d'*O. basilicum* L. collectées de différentes régions (Assiut, Al-Minya et Bénésouef) en Égypte

(Ahmed et al., 2019). Cette HE a été également riche en divers éléments chimiques à savoir le linalool (31,65%), l'estragole (17,37%), suivi du cinnamate de méthyle (15,14%), du bicyclosesquiphellandrène (6,01%) et du 1,8-cinéole (4,04%).

Le profil chimique du basilic a été aussi évoqué par d'autres chercheurs et cette fois-ci en révélant la diversité chimique de cette espèce. Ben chaaban et son équipe (2019) ont montré une variation très significative puisque 40 constituants ont été identifiés pour l'HE d'*O. basilicum* de la Tunisie, cette huile est composée principalement de la fraction des monoterpènes oxygénés (73,9%) dont les cétones ont présenté la sous-classe la plus abondante (43,89%), suivi des sesquiterpènes hydrocarbonés (6,9%), et ceux oxygénés (6,02%), tandis que les monoterpènes hydrocarbures ont été détectés à une teneur moins importante (3,8%). Cet échantillon a aussi montré un pourcentage approximativement similaire de linalool (29,23%), et pourtant une différence importante, qualitative et quantitative, a été clairement observée pour les autres constituants majeurs tels que le cinnamate de méthyle (18,97%), l'eugénol (5,84%), le 1,8-cinéole (5,74%), l'α-cadinol (5,69%), l'estragole (4,72%) et l'α-bergamotène (4,24%). Toutefois, Padalia et al. (2014) ont identifié méthyle chavicol (61,5 -86,3%), linalool (28,6-36,1%), et citral (28,8-65,9%) comme des composés majeurs pour les HEs de 4 variétés de plantes issues d'*O. basilicum* de l'Inde.

La composition chimique d'*O. basilicum* a été précédemment étudiée par de nombreux auteurs (Pripdeevech et al., 2010 ; Shirazi et al., 2014 ; Chenni et al., 2016 ; Cruz et al., 2017). On peut conclure que cette espèce aromatique est considérée comme polymorphe, étant donné la variabilité significative de son profil chimique, cette diversité observée en composés volatils est certainement attribuée aux conditions climatiques et paramètres du sol de la zone géographique où se développe cette espèce (Kwee et al., 2011).

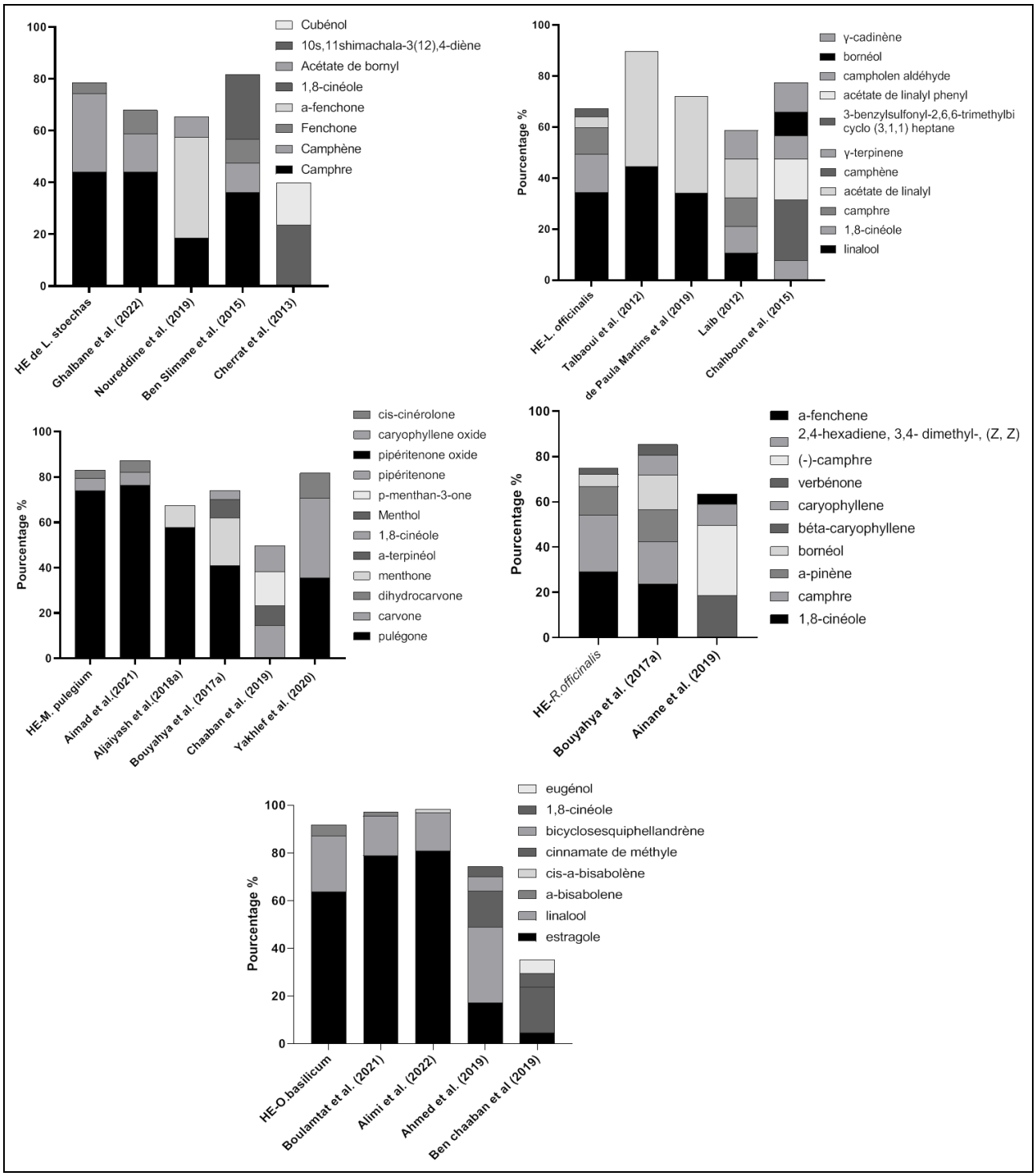


Figure 17. Composition chimique des HEs de la famille Lamiacée de notre étude et de celle de la littérature

II.1.2 Profil chimique des PAMs de la famille Myrtacée

II.1.2.1 Profil chimique d'*E.globulus*

Dans le même contexte, l'analyse GC-MS de l'HE d'*E. globulus* (Tableau 2) a révélé une diversité notable des éléments chimiques ; elle a permis d'identifier 38 constituants correspondant à 96, 62 % de la totalité de l'huile. Il apparaît que cette HE est riche en monoterpènes qui sont présents à de fortes teneurs (93,67 %), environ 46 fois plus que les sesquiterpènes qui sont détectés à des faibles pourcentages (2,95 %), alors qu'un pourcentage de 13, 84 % est enregistré pour les monoterpènes hydrocarbures. On a également constaté que les monoterpènes oxygénés constituent la sous-classe la plus prédominante (79,83 %), notamment la fraction des éthers (74,18 %), suivie de celle des alcools (3, 83%). Cette huile volatile est composée principalement de 1,8-cinéole (74,18), de l'α-pinène (8,57%), suivis de p-cymène (2,60). En outre, les autres constituants sont identifiés à faibles pourcentages allant de 0, 05 à 1,42 % y compris par exemple et en ordre croissant le monoterpène ester, l'acétate d'α-terpinyl (1,20%), le monoterpène hydrocarbure, limonène (1,42%), et le monoterpène alcool, α-terpineol (1,80%). Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux publiés par Luís et al. (2016) pour l'HE extraite d'une espèce d'*E. globulus* originaire de l'Espagne dans laquelle 45 composés ont été identifiés, correspondant à 90,32% de la composition totale de l'huile. Il semble que cette HE a présenté le même ordre des fractions chimiques (monoterpènes oxygénés> monoterpènes hydrocarbures> sesquiterpènes). Quoique la teneur en 1,8-cinéole n'a pas été plus élevée que celle trouvée dans notre échantillon, elle reste importante (63,81%), cependant une quantité appréciable est enregistrée pour l'α-pinène (16,06%), les autres principaux composants étaient le sesquiterpène hydrocarbure, l'aromadendrène (3,68%), et l'isomère, o-cymène (2,35%). En outre, un total de 26 constituants a été identifié pour l'HE obtenue d'une autre plante d'*E. globulus* (Nord-est de l'Algérie), les composés oxygénés ont constitué la fraction la plus abondante (78,58%), parmi lesquelles on note le composé commun, le 1,8-cinéole (55,29%), suivi d'un sesquiterpène alcool, le spathulénol (7,44%) qui est absent dans notre HE, et puis l'α-terpinéol (5,46%), ce dernier composé est détecté, dans la présente recherche en tant que constituant mineur (1,80%) (Harkat-Madouri et al., 2015).

Au contraire, dans l'étude menée par Bey-ouldsisaid et al. (2016), les sesquiterpènes (hydrocarbures et oxygénés) ont représenté la fraction majeure (61,2%). Le sesquiterpène oxygéné, globulol, qui est observé à très faible pourcentage (0,62%) dans notre échantillon était identifié comme constituant majeur (23,6%), suivi de l'aromadendrène (19,7%). Alors

que la fraction des monoterpènes (31,2%) est présenté par le 1,8-cinéole (19,8%), l'α -pinène (3,8%), l'isovaleradehyde (2,4%) et l'α-phellandrène (1,9%).

Il est important de mettre l'accent sur d'autres constituants et qui sont rarement détectés dans les HEs d'*E. globulus* tels que l'estragole, le terpinolène, le 1,4-Hexadiène, le 5-méthyl-3-(1-méthyléthylidène), le linalool et le furfural qui ont atteint un taux plus de 4% (Ainane et al., 2019). Il est important de souligner que les composés ; aromadendrène, l'o-cymène, linalool, terpinen-4-ol, α-terpinéol, l'acétate de l'α-terpinyle, viridoflorol, globulol sont habituellement observés dans les HEs riches en 1,8-cinéole à savoir celles extraites des espèces du genre Eucalyptus, tandis que les monoterpènes hydrocarbures tels que l'α-pinène et γ-terpinène sont souvent présents dans la plupart des huiles volatiles (Mulyaningsih et al., 2011). En effet, plus de 20 constituants ont été identifiés dans les HEs des espèces d'*E. globulus* avec une dominance significative du 1,8-cinéole (Harkat-Madouri et al., 2015 ; Ait-Ouazzou et al., 2011).

Il est aussi très répondu que les huiles extraites des espèces d'Eucalyptus spp. sont apparemment riches en ce composé éther (Farah et al., 2001 ; Ben Hassine et al., 2012 ; Maciel et al., 2010), ce qui est en étroite concordance avec les résultats susmentionnés, et cela nous a donc permis de déduire que les HEs provenant de cette plante aromatique et médicinale de la famille des Myrtacées, malgré sa variation intraspécifique qui a été largement rapportée, sont généralement classées dans le chimiotype : 1,8-cinéole (Almas et al., 2021).

D'autres études ont amplement abordé le profil phytochimique de cette espèce en soulignant soit une parfaite ou légère ressemblance à propos la nature et la teneur des composés volatils identifiés (Djenane et al., 2011 ; Kumar et al., 2012, Topiar et al., 2014 ; Ríos et al., 2017; Boulamtat et al., 2021), ou bien une nette diversité, qualitative et/ou quantitative (Guzmán et al., 2014 ; Bouyahya et al., 2017b; Ghrab et al., 2018).

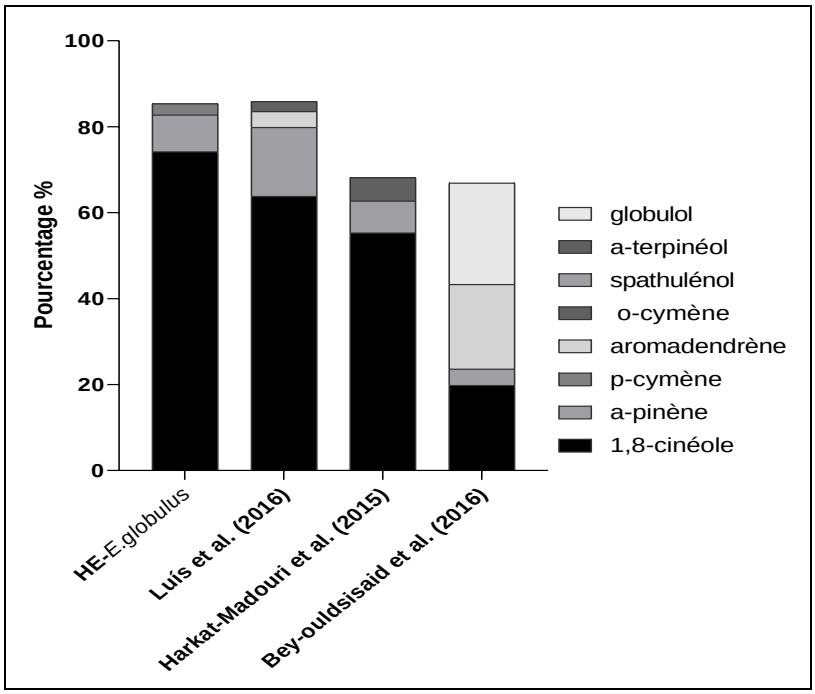


Figure 18. Composition chimique de l'HE d'*E. globulus* (Famille Myrtacée) de notre étude et de celle de la littérature

II.1.3 Profil chimique des PAMs de la famille Astéracée

II.1.3.1 Profil chimique d'*A. herba-Alba* Asso

Le Tableau 2 indique également la composition chimique de l'HE d'*A. herba-Alba* Asso dans laquelle 11 constituants sont identifiés pour un pourcentage total de 99,37%. On a clairement observé la prédominance de la fraction des monoterpènes oxygénés (87,46%) avec des quantités relativement importantes de cétones (72, 08%) suivis des alcools (12,26%). Les monoterpènes hydrocarbonés ne représentent que 11,86% de la totalité de l'huile. Cette HE est particulièrement caractérisée par une forte teneur en chrysanthénone (24,46%), α-thujone (20,70%), β-thujone (19,60%), suivis de l'α-terpinéol (9,05%), du camphre (7,32%), de l'α-pinène (6, 94%) en présence des quantités bien importantes de β-pinène (3,68%), 1,8-cinéole (3,12%), et bornéol (2,51%). Par ailleurs, les autres constituants sont identifiés à de faibles teneurs (entre 0,05 et 1,24 %).

Nos résultats rejoignent ceux publiés par Ez zoubi et al. (2018) pour l'HE distillée à partir des parties aériennes fraiches d'*A. herba Alba* Asso récoltée de la province de Boulemane (Moyen Atlas du Maroc). L'analyse par GC-MS a révélé l'identification de 14 constituants (99,8%), et cette HE a été prédominée par les monoterpènes oxygénés tels que β-thujone (42,93%), chrysanthénone (30,95%), α-terpinéol (9, 69%), α-thujone (5,44%), suivis de l'α-pinène (4,60%), et l'acétate de bornyle (2,38%). De même, l'HE extraite des feuilles

d'*A. herba-Alba* de la Tunisie a également montré une légère ressemblance, et elle était caractérisée par la présence d'une quantité importante de l'α- thujone (45,5%), suivi du β-thujone (11,4%), l'acétate de trans-sabinyle (10,1%), le 1,8-cinéole (7,4%), le camphre (6,8%), et l'isobornéol (3,4%) (Bellili et al., 2017). En outre, l'HE d'une autre espèce d'*A. herba Alba*, récoltée de la région d'Azemmour (Sud-Ouest du Maroc) a présenté une différence, qualitative et quantitaive, significative en éléments chimiques identifiés tels que la *cis*-thujone (25,5%), la *trans*-thujone (17,7%), l'alcool vanillique (11,5%), et la *nor*-davanone (7,8%). D'autres constituants comme la *trans*-arbusculone, le n-butyrate d'isobornyle, les deux dérivés de davanone ; le *cis*, le *thréo*-davanafuran, le *cis*-chrysanthénylacétate et le camphre ont été indiqués à des pourcentages allant de 4 à 5 % (Amor et al., 2019). D'autre part, l'HE obtenue d'une espèce d'*A. herba Alba* Asso., de l'Est de l'Algérie a été touvée riche en cétones à savoir le camphre (50,7%) lequel est détecté, dans notre HE, à 7,32%, d'autres constituants majeurs ont été également détectés en quantité appréciable (l'α-thujone : 12,7% ; la β-thujone : 10% ; le 1,8-cinéole: 8,2% ; la chrysanthénone : 8,19%) (Bertella et al., 2018). De même, le camphre (39,5%) a été identifié comme le premier composé majoritaire pour l'HE d'une autre espèce d'armoise du Sud de l'Alger (Algérie) (Lakehal et al., 2016). Alors que la chrysanthénone ont été identifiés en tant que constituant principal d'une autre espèce d'armoise de la province d'Errachidia (Sud central du Maroc) à une teneur de 47,71% (El Ouahdani et al., 2021). D'autre part, le sesquiterpène oxygéné, davanone, a été identifié en tant que constituant majeur avec un pourcentage atteignant 20% dans une variété d'armoise tunisienne (Haouari and Ferchichi, 2009).

À travers le monde, *A. herba alba* a fait l'objet de plusieurs études, et de nombreux chercheurs ont documenté la variabilité chimique de cette plante nommée l'absinthe du désert (Talbaoui et al., 2012; Mighri et al., 2010, Belhattab et al., 2014, Younsi et al., 2016 ; Fekhar et al., 2017), d'autres ont démontré la variabilité intraspécifique de cette espèce tout en révélant des nouveaux chémotypes tels que *p*-cymene, *cis*-chrysanthenyl acetate, davanone, 1,8-cineole, chrysanthenone, *cis*-chrysanthenol (Salido et al., 2004 ; Paolin et al., 2010 ; Houti et al., 2023). Cela prouve le polymorphisme chimique notable de cette espèce Astéracée, et les travaux précédemment cités plus partiulièrement ceux effectués au Maroc ont dévoilés divers chémotypes et qui sont considérés actuellement comme typiques d'*A. herba Alba* à savoir le chémotype cétone ; -thujone, chrysanthénone, camphre, le chémotype éther ; 1, 8-cinéole ainsi que le chimiotype sesquiterpène davanone.

L'existence d'une telle importante diversité chimiotypique est liée certainement à la fraction majeure des HEs analysées (Mohamed et al., 2010). Généralement les deux isomères : α et β-thujones, chrysanthénone, camphre, 1,8-cinéole, α-pinene, davanone sont les plus identifiés dont la variation quantitative dépend largement de l'origine géographique, le stade végétatif, la période de récolte (Belhattab et al., 2014, Ghanmi et al., 2011). La composition chimique varie également en fonction de la méthode de séchage (Mighri et al., 2009), la méthode d'extraction (Dahmani-Hamzaoui and Baaliouamer, 2010), l'organe de la plante soumis à la distillation (Tilaoui et al., 2015 ; Bellili et al., 2016). La domestication a aussi un effet significatif sur la variabilité chimique des espèces d'Artemisia (Hinane et al., 2020; Aljaiyash et al., 2018b). Néanmoins, et d'après Lamiri et al. (1997), aucune corrélation n'existe entre les chimiotypes d'*Artemisia herba-alba* Asso et sa répartition géographique.

II.1.3.2 Profil chimique d'*O. mixta*

Nos résultats révèlent également la composition chimique de l'HE d'une autre espèce de la famille des Astéracées, *O. mixta (L.) var. multicaulis.* D'après le Tableau 2, 36 constituants sont identifiés correspondant à 99,06%, les monoterpènes constituent la fraction la plus abondante (55,16%), avec une contribution majeure des composants alcooliques (47,54%). Cette HE fait l'exception pour les composés sesquiterpènes dont des quantités significatives sont observées en atteignant un pourcentage de l'ordre de 33,4%, alors que les terpènes hydrocarbonés représentent seulement 10,5% de la totalité de l'huile. La sous-classe des terpènes est dominée par le monoterpene, alcool de santoline, qui représente plus de la moitié de cette fraction 38,56 %, les autres constituants identifiés sont (E)-β-farnésène (6,23), épi-α-muurolol (5,23), α-cadinol (4,68%), α-pinène (4,21), artemisia alcohol (4,13%), d-germacrène (3, 85%), 1,8 cinéole (3,24 %), camphre (3,04%), caryophyllene acetate (2,42%).

D'autres chercheurs ont également rapporté l'alcool de santoline en tant que composé majoritaire dans l'HE qui a été obtenue par hydrodistillation des parties aériennes d'*O. mixta* (L.) dumort. prélevée au stade de floraison dans la forêt de la Maamora (nord-ouest du Maroc), elle a été caractérisée par une richesse en alcool de santoline (37,7 %), l'a-pinène (4,8 %), la camphenilone (4,8 %), l'alcool de yomogi (4,5 %), suivi du germacrene (3,3 %), le 1,8-cinéole (3,2 %) et le cubénol (3,2 %) (Satrani et al., 2007).

Ce profil chimique diffère complètement de celui révélé par Ouedrhiri et al. (2017) dans lequel 61 constituants (91,82%) ont été identifiés pour l'HE d'*O. mixta* (L.) Dumort., collectée dans la région de Taounate, et qui a été riche en d-germacrène et le 1,8-cinéole (11,46 et 10,28%, respectivement), suivi du cis-méthyl isoeugénol (9,04%), l'acide butyrique

(8,54), et le δ-élémène (5,46) et d'autres constituants tels que cis-cadina-1(6),4-diène (3,19), le β-myrcène (2,57), le terpinen-4-ol (2,06%) et le sabinène (2,01). Cependant, les composés tels que alcool de santoline, β-farnésène, l'alcool de yomogi et qui sont généralement considérés comme les plus représentatifs de cette espèce d'armoise n'ont pas été observés dans cette étude.

La variabilité phytochimique d'*O. mixta* a été précédemment évoquée et cette fois-ci en mettant en évidence l'effet de l'origine sur le profil chimique de la plante. D'ailleurs, Zrira et al. (2007) ont étudié la diversité chimique des espèces d'*O. mixta* (L.) Dumort. ssp. multicaulis collectées de différentes régions du Gharb du Maroc, Kénitra et Salé. L'analyse chimique des HEs obtenues à partir des parties aériennes séchées de la plante a révélé qu'elles sont caractérisées par une quantité importance des monoterpénoïdes irréguliers (alcools); et que cette classe phytochimique est la plus fréquente chez la plupart des espèces de la famille des Astéracées et Labiées (Benabdelkader, 2012). En effet, les HEs extraites des plantes de Kénitra ont été riches en alcool de santoline (24,1-47,6 %), qui est associé avec l'alcool de yomogi (1,3-2,2 %), et artemesia alcool (1,2-2,4 %). De même, celles de Salé ont présenté une teneur élevée en alcool de santoline (47.6-55.1 %), suivi de l'alcool de yomogi (4,1-2,2%), et artemesia alcool (1,6-3,0 %). En plus, ces HEs contenaient des quantités moins importantes de composés sesquiterpéniques tels que germacrene D (3,2 et 4,9 %), epi-α-muurolol (5,5 et 5,7 %) et α-cadinol (5,4 et 5,2 %), pour les échantillons de Kénitra et Salé, respectivement. Cette étude a également révélé l'effet de la partie distillée sur la composition chimique, car les HEs extraites des fleurs ont montré une richesse en alcool de santoline (40,2%), un pourcentage de 28,6% a été enregistré pour les feuilles, alors que les tiges n'ont produit que 19% de ce composé. Ce qui montre clairement que les fleurs constituent la partie de la plante qui se caractérise par une accumulation importante de ce monoterpène. Il convient également de souligner que la présence des grandes teneurs en alcool de santoline peut s'expliquer par le fait que toutes ces espèces possèdent éventuellement, en commun, une ou plusieurs enzymes qui sont spécifiquement responsables de la biosynthèse des monoterpènes irréguliers (Zrira et al., 2007). Tous ces travaux ont mis en évidence le polymorphisme chimique important de cette espèce de camomille marocaine dont sa composition qualitative et même quantitative varie essentiellement en fonction de la partie de la plante utilisée (Elouaddari et al. 2015).

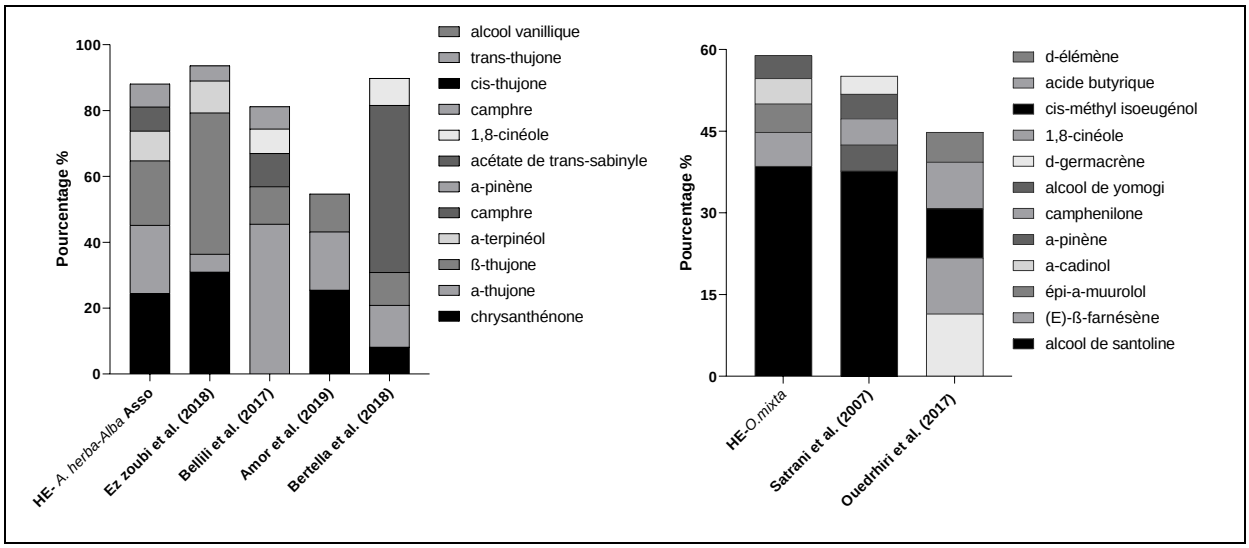


Figure 19. Composition chimique des HEs de la famille Astéracée de notre étude et de celle de la littérature

II.1.4 Profil chimique des PAMs de la famille Rutacée

II.1.4.1 Profil chimique de *C. limon*

Concernant la composition chimique de l'HE du *C. limon* L. (Burman f), 12 constituants sont identifiés représentant un pourcentage total de 99,89% (Tableau 1). Il s'est avéré que cette huile est très riche en composés hydrocarbonés (93,01%), alors qu'une teneur importante est enregistrée pour les terpènes oxygénés (6,3%) dont 4,8% correspondent à des aldéhydes et 1,5% à des esters. La fraction des sesquiterpènes est détectée à très faible quantité (0,58 %). Les principaux composants identifiés sont d-limonène (53,45 %), β-pinène (18,43 %), et γ-terpinène (8,50 %), suivis de l'α-pinène (4,51 %), l'o-cymene (3,56%), β-phellandrène (3,04%), (2E)-3,7-Dimethyl-2,6-octadienal (2,96%). Les autres constituants sont identifiés à des très faibles teneurs à savoir β-myrcène (1,61%), néral (1,84%), l'acétate de neryle (0,92), l'acétate de géranyl (0,58%), et β-bisabolène (0,58%). Cette composition concorde parfaitement avec celle publiée par Michaelakis et al. (2009a) puisque le limonène, β-pinène, γ-terpinène ont été identifiés en tant que principaux composés avec des quantités de 74,3%, 7%, et 6,4%, respectivement, suivi d'une teneur de 1,4% de l'α-pinène et géranial, et 1,2% de néral.

En effet, d-limonène est fréquemment identifié en tant que constituant majoritaire des HEs de cette espèce. Il a été rapporté que ce composé chimique a été le plus abondant dans les HEs issues de l'extraction par distillation à la vapeur d'eau des écorces fraiches des citronniers de Marrakech et de Kenitra (Maroc) avec des teneurs de l'ordre de 39,49 et 29,19%, respectivement, alors qu'il a été détecté à 9, 41% pour l'HE de Taïz (Yémen) (Abdu et al..,

2020). Bien que ce monoterpène hydrocarboné était le principal composé des HEs extraites des espèces de *C. limon* de la Chine et de la Bulgarie (61,72% et 82,96%, respectivement), une grande différence qualitative et quantitative a été soulignée au niveau des autres constituants (majeurs et/ou mineurs) tels que par exemple l'α-pinène (13,97%), 3-carène (13,67%), citral (1,88%), geranial (1,29%) pour HE de la Chine et γ-terpinene (9,91%), β-phellandrene (1,65%), β-pinène (1,50%), α-limonène diepoxide (1,23%) et β-cymene (1,34%) pour HE de la Bulgarie (Guo et al., 2018 ; Denkova-Kostova et al., 2020).

D'un autre côté, le profil de l'HE obtenue de la partie aérienne d'une espèce marocaine de *Citrus limonum* a montré une variabilité chimique très significative. L'HE obtenue par hydrodistillation des parties aériennes séchées (Tiges, feuilles et fleurs) est composée majoritairement de néral (13,60%), l'acétate de néryle (10,77%), le (-)-α-pinène (9,46%), l'isovalérate de géranyle (6,75%), l'oxyde de *cis*-limonène (2,38%) et l'oxyde de *trans*-limonène (6,7%), le β-bisabolène (4,82%), le *trans*-α-bergamotène (3,36%), le limonène-diol (3,22%) et le linalool (2,21%), alors que limonene et β-pinene n'ont présenté que 0,34% et 0,10%, respectivement, de la totalié de l'huile (Ainane et al., 2019). Cela ne correspond pas à nos résultats précités, car aucun composé n'a été observé dans notre HE, à l'exception du β-bisabolène qui a été détecté comme un constituant mineur (0, 58%).

En effet, c'est difficile de préciser les chémotypes où sont classés les éléments chimiques identifiés vu la grande variabilité phytochimique de cette espèce, néanmoins, ce type de citronnier est très connu par le chémotype à limonène. Cette différence très remarquée pour ces métabolites secondaires est probablement due à la partie de la plante utilisée et la méthode d'extraction adoptée et plus précisément le temps auquel la plante est soumise à la distillation pour en extraire le maximum ou la totalité des éléments chimiques. Dans les études mentionées auparavant, nous avons clairement constaté l'apparition de nouveaux constituants notamment les dérivés de limonène ainsi que des composés sesquiterpènes surtout dans l'étude réalisée par Ainane et al. (2019). Ce qui peut être expliqué par les réactions chimiques qui se déroulent durant le processus de l'extraction.

En effet, ce phénomène a été bien étudié par Ellouze and Abderrabba (2014) qui ont en fait suivi la cinétique de l'extraction des HEs issues de *Citrus aurantium* et ont révélé des variations importantes, d'une part, du profil chimique de cette espcèe, et d'autre part, des quantités relatives aux composés majoritaires identifiés tels que linalol, l'acétate de linalyl, caryophyllene oxide et α-terpinéol dont chaque constituant a présenté une cinétique spécifique en fonction du temps d'extraction. D'après ces auteurs, la cinétique d'extraction a permis de

suggérer que les nouveaux composés élués à des temps ultérieurs de l'hydrodistillation font diminuer les teneurs des composés précédents dont les variations observées peuvent être le résultat des réactions chimiques ayant lieu durant d'hydrodistillation. En effet, lors de l'extraction notamment dans les milieux aqueux comme l'hydrodistillation, plusieurs phénomènes chimiques peuvent se produire. Cela a été chimiquement expliqué par le fait que le pH des milieux aqueux varie entre 4 et 7, et au cours de l'extraction, l'acidité de l'eau de distillation influence ainsi le profile chimique de l'huile extraite. Le milieu acide permet donc à diverses réactions chimiques comme l'hydrolyse, cyclisation, etc…de se produire sur les éléments naturels de l'huile. Généralement, les composés monoterpènes hydrocarbonés et ceux oxygénés sont les constituants les plus exposés aux conversions chimiques dont les esters par exemple ont tendance à hydrolyser, les composés monoterpéniques acycliques et les aldéhydes peuvent être polymérisés (Deschepper, 2017).

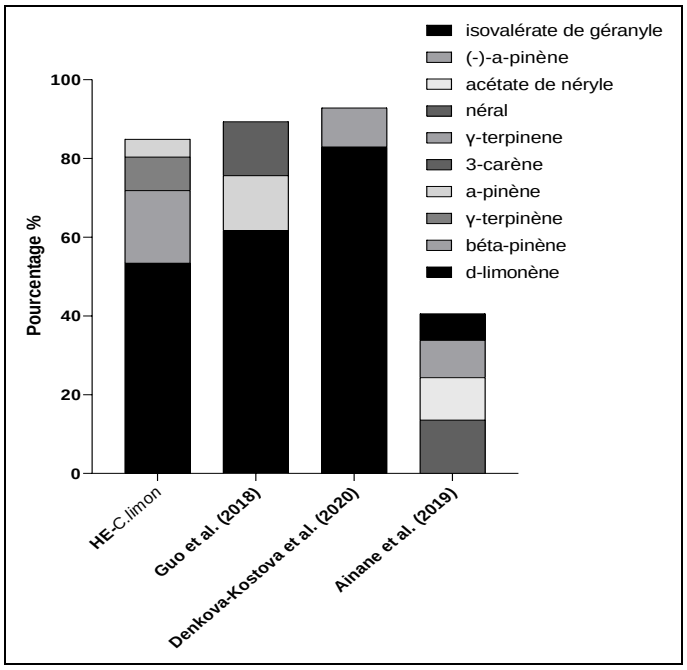


Figure 20. Composition chimique de l'HE de *C. limon* de la famille Rutacée de notre étude et de celle de la littérature

Conclusion chapitre II

La composition chimique des HEs étudiées a montré une variabilité interspécifique importante, qualitative et quantitative, des éléments chimiques identifiés. Les profils phytochimiques nous ont permis de constater la différence significative soit au sein de l'espèce elle-même (un constituant majeur et autre mineur), soit d'une espèce à l'autre dont la différence se situe généralement au niveau des constituants majoritaires qui sont considérés comme représentatifs de chaque HE. L'analyse chimique par GC-MS a montré que la fraction des monoterpènes notamment ceux oxygénés constitue la classe chimique la plus dominante pour toutes les huiles sauf celle issue du *C. limon* qui est marqué par l'abondance des monoterpènes hydrocarbonés (93,01%). Bien que les HEs de *M. pulegium*, de *L. stoechas*, et d'*A. herba Alba* proviennent de deux familles tout à fait différentes, lamiacées et astéracées, elles partagent la prédominance des monoterpènes cétones dont les teneurs sont, respectivement, de l'ordre de 85,76 ; 76,50 ; et 72,80%. Les monoterpènes alcools arrivent en deuxième lieu et les pourcentages les plus élevés sont attribués à *L. officinalis* (52,98%) et *O. mixta* (47,54%), alors que les HEs d'*E. globulus* et *R. officinalis* sont très riches en composés éthérés particulièrement le 1,8-cinéole avec des quantités atteignant 74, 18 et 29, 31%, respectivement. L'HE d'*O.basilicum* fait l'exception puisqu'elle est caractérisée par la présence de fortes teneurs des phénypropènes notamment de l'estragole qui présente la majeure contribution (63,93%). Nous avons également remarqué la faible teneur en constituants sesquiterpènes sauf pour l'huile d'*O.mixta* (33,40%) et même celle du romarin et du basilic qui sont constitué d'une quantité moins importante (10,99 et 9,91%, respectivement). Il convient aussi de souligner que les HEs analysées présentent des chémotypes intéressants ; camphre/ fenchone pour l'HE de la lavande stoechade, linalool pour celle de la lavande officinale, pulégone pour l'huile de la menthe, 1, 8-cinéole/ camphre pour l'HE du romarin et 1, 8-cinéole pour celle d'eucalyptus, alors que estragole/linalool pour le basilic, limonène pour citrus, et chrysanthénone/–thujone pour la camomille. La présente étude a mis en évidence l'hétérogénéité de la composition chimique des espèces étudiées. Le fait qu'une plante peut présenter un chémotype ou plusieurs chémotypes et donc un polymorphisqme chimique important, peut justifier les différentes propriétés biologiques de chaque espèce, d'où l'objectif du chapitre suivant qui consiste à mettre en lumière l'effet insecticide de chaque HE chimiquement analysée.

Chapitre III

Evaluation des effets adulticides des huiles essentielles et de leurs molécules majoritaires sur le moustique *C. pipiens*

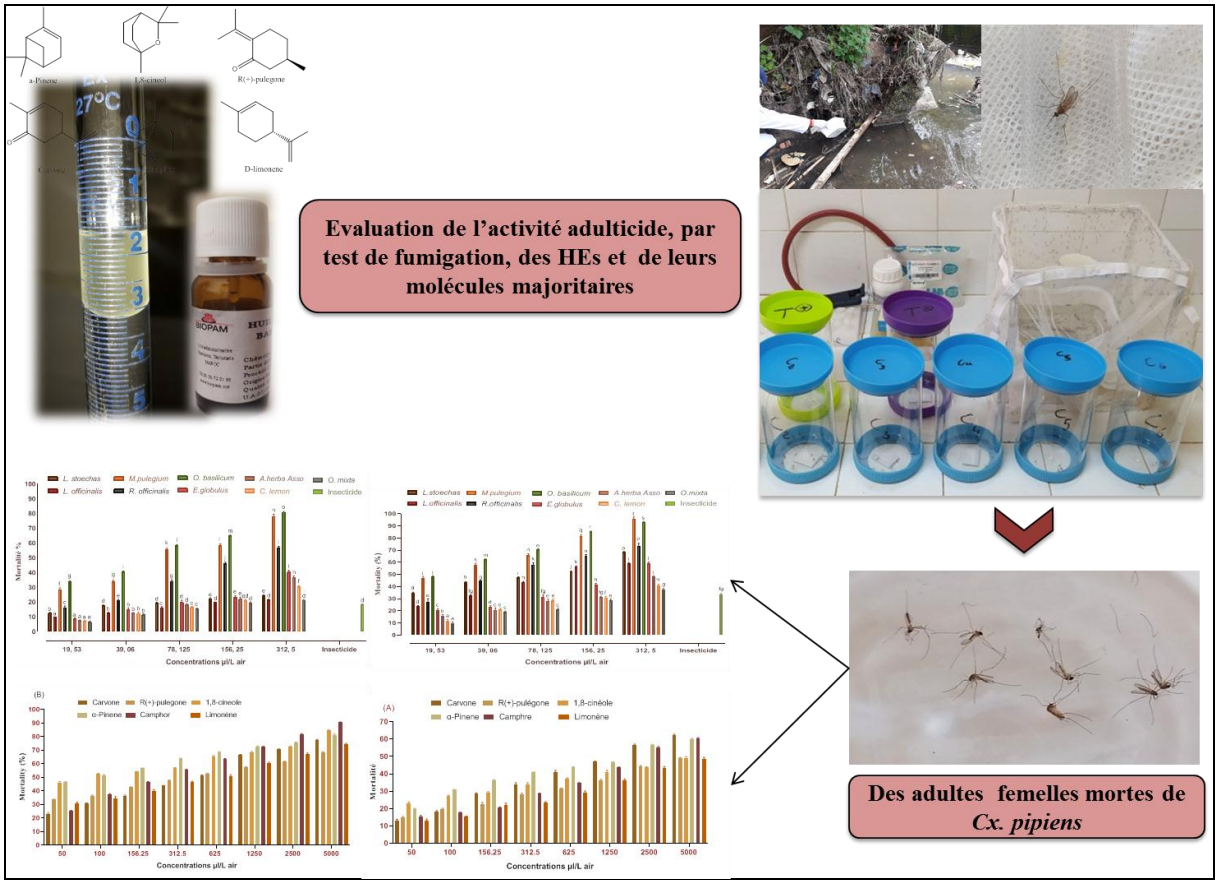


Figure 21. Schèma récapitulatif du Chapitre III

Introduction

L'insecte *C. pipiens L.* est l'un des principaux porteurs des arbovirus qui représentent une menace sérieuse pour la santé publique et animale (Brugman et al., 2018). Il est bien connu et largement signalé en tant que vecteur du virus du Nil occidental et du virus Usutu qui sont largement détectés en Europe et en Afrique (Chirico and Magnavita, 2019 ; Eybpoosh et al., 2019 ; Triana et al., 2018). Ces virus émergents provoquent, dans certains cas, des complications neurologiques graves telles que les méningites, les encéphalites et les méningo-encéphalites (García-Carrasco et al., 2021; Clé et al., 2018).

Dans les programmes de lutte antivectorielle qui visent à prévenir la propagation des moustiques vecteurs et donc à réduire la transmission des maladies, les méthodes chimiques sont les plus adoptées, et l'utilisation des insecticides de synthèse notamment ceux de la famille des pyréthrinoïdes, par exemple deltaméthrine, sont les plus utilisées pour contrôler *C. pipiens* (Tmimi et al., 2018). Cependant, l'usage excessif et irrationnel de ces produits chimiques induit le risque de l'apparition de la résistance chez les populations larvaires et adultes de ce moustique (Jeffrey et al., 2015 ; Aboulfadl et al. 2020), ce qui réduit considérablement l'efficacité du traitement.

Face à cette issue, les chercheurs se focalisent sur le développement des approches alternatives tout en minimisant les effets toxiques des insecticides chimiques sur l'environnement et sur la santé humaine et animale (Pavela et al., 2019). Ainsi, l'OMS (2016) a appuyé le développement des stratégies efficaces et durables de gestion des moustiques. De ce fait, la recherche de nouvelles substances plus puissantes, sûres et écologiques, et surtout ayant un effet insecticide, demeure aujourd'hui une ligne d'étude importante. Les plantes pourraient être considérées comme une excellente source alternative aux insecticides chimiques dangereux; puisqu'elles produisent les HEs qui contiennent naturellement une large gamme d'éléments chimiques bioactifs (Govindarajan et al., 2013 ; Benelli et al., 2015). Ces métabolites secondaires qui sont généralement non toxiques pour les êtres vivants, biodégradables, et disponibles (Pavela, 2016) ont fait l'objet d'une grande attention en tant que composés phytochimiques dotés d'un potentiel insecticide considérable contre plusieurs espèces d'insectes (Pavela, 2015a, Pavela and Giovanni, 2016). En effet, de nombreuses études ont rapporté l'efficacité des HEs contre les moustiques du genre Culex (Koliopoulos et al., 2010 ; Ramar et al., 2014, El-Akhal et al., 2021a; Zahran and Abdelgaleil 2011; Zahran et al., 2017 ; Tabari et al., 2017), alors que les travaux sont très limités en ce qui concerne les molécules pures et leur effet insecticide contre les moustiques Culex est rarement rapporté.

D’après nos connaissances, aucun rapport n'a été documenté au Maroc sur l'activité adulticide des HEs envers des populations adultes du moustique vecteur de "West Nile virus," *C. pipiens*.

Dans ce contexte, l’objectif de ce chapitre est d'évaluer l’efficacité de plusieurs huiles essentielles (HEs) extraites de différentes plantes appartenant à diverses familles botaniques (Lamiacées, Astéracées, Rutacées et Myrtacées) sur ce moustique. Étant donné que l'efficacité des huiles essentielles est probablement liée à la nature des éléments chimiques présents dans chaque huile, dont les composés agissent sur le moustique cible en fonction de leur structure chimique, nous avons opté à étudier l’efficacité insecticide des molécules pures et de mettre en évidence leur potentiel insecticide.

Matériel et Méthodes

I. Choix des HEs

Les plantes utilisées comme substances bio-insecticides sont choisies d'après une étude bibliographique approfondie et selon une étude ethnobotanique (EL-Akhal et al., 2021b) sur l'utilisation traditionnelle des insecticides à base des plantes qui sont couramment utilisées dans la région de Fès pour lutter contre les insectes responsables des maladies à transmission vectorielle, elles sont également sélectionnées selon leur disponibilité. Le Tableau suivant (Tableau 3) résume les HEs testées et leurs chémotypes. De plus, le 1,8-cinéole (99%), α-pinène (98%), Carvone (98%) et R(+)-pulégone (99%), camphre (98%), et D-limonène (97%) sont choisies pour étudier l'effet insecticide vis-à-vis des adultes femelles du moustique *C. pipiens*. Ces molécules constituent certains composés majoritaires des HEs de lavande, de *M. pulegium*, de *R. officinalis* et *E. globulus*, et de *C. limon* et même d'*A. herba Alba* et *O. mixta*.

Tableau 3. Les HEs étudiées et leurs chémotypes.

HE	Famille	Chémotypes
L. stoechas L.	Lamiacée	Camphre, fenchone, α-pinène
L. officinalis L.	Lamiacée	Linalool, 1,8-cinéole, camphre.
M. pulegium L.	Lamiacée	Pulégone, carvone.
R. officinalis L.	Lamiacée	1,8-cineole, camphre, α-pinène
O. basilicum L.	Lamiacée	L'estragole, linalool.
E. globulus labillardiere	Myrtacée	1,8 cinéole, α –pinène, p-cymène
A. herba alba Asso	Astéracée	Thujones, chrysanthénone, camphre
C. limon (L) (Burman f)	Rutacée	Limonène, β-pinène
O. mixta (L) var.multicaulis	Astéracée	Alcool de santoline, β-farnesène, α-pinène

II. Echantillonnage et élevage de la cible biologique (*C. pipiens*)

II.1 Choix du moustique et le gîte larvaire

Plusieurs sorties initiatives et prospectives ont été effectuées aux gîtes larvaires situés dans la ville de Fès (à partir d'Avril-2018). Le gîte permanent nommé Oeud EL Mehraz, localisé dans une région urbaine à Fès (Nord-Est du Maroc ; 34°01′55, 49′′N et 4°59′ 30, 99′′ W) (Figure 22), a été choisi pour la collecte des larves.

Ce site est caractérisé par une eau salée et stagnante, ce qui favorise une forte densité larvaire des culicidés notamment la prolifération des larves de l'espèce *C. pipiens.*

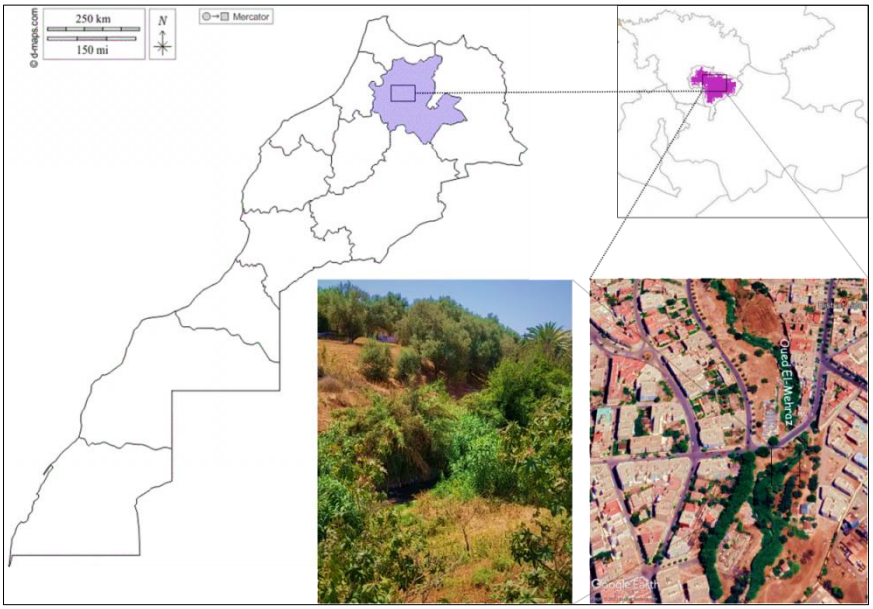


Figure 22. Localisation géographique du site d'échantillonnage (Oued El-Mehraz : Google Earth Pro 2023)

II.2 Echantillonnage quantitatif et élevage des larves du *C. pipiens*

Afin de réaliser les tests insecticides, il était nécessaire d'obtenir un nombre suffisant de moustiques adultes. L'échantillonnage des larves a été donc effectué pendant la saison qui se caractérise par une forte densité larvaire (généralement durant le printemps et l'été). Les larves de troisième et quatrième stades ainsi que les nymphes ont été récoltés à l'aide d'un plateau rectangulaire tout en diversifiant le plus possible les points de prélèvement, et afin d'avoir un échantillonnage représentatif. Le contenu du plateau est versé, à chaque prélèvement, dans des récipients appropriés de manière à assurer la survie des larves qui sont ensuite transportées avec précaution au laboratoire (Figure 23. A).

Une fois arrivées au laboratoire, les larves de moustiques ont été transférées dans des plateaux et élevées dans des cages de forme cubique (24 × 24 × 24 cm) couvertes d'un tissu de tulle, dans des conditions de température moyenne de 22,6±2°C et d'humidité relative de 70% ± 5%. Après leur transformation en adultes, les moustiques ont été nourris d'une solution sucrée déposée sur la face supérieure de la cage de sorte que les femelles puissent piquer le coton imbibé et s'alimenter (Figure 23.B).

II.3 Identification morphologique des moustiques adultes du *C. pipiens*

L'identification des caractères morphologiques des larves et des moustiques adultes est déterminée à l'aide de la Clé d'identification marocaine des culicidés (Himmi et al., 1995), et le logiciel d'identification des moustiques de l'Afrique méditerranéenne (Brunhes et al., 2000) (Figure 23.C).



Figure 23. A: Gîte larvaire ; B: Cage d'élevage ; C: Identification morphologique

III. Evaluation de l'activité insecticide des HEs sur *C. pipiens*

L'activité insecticide est évaluée par le test de fumigation dans des bocaux en verre (1L) (Figure 24) en suivant la méthode décrite par Zahran et al. (2017) et Badawy et al. (2017) avec de légères modifications. Après un criblage de concentration de ½ allant de 250 000 à 9,76 µL/L d'air, une gamme de concentrations comprise entre 19,53 et 312,5 µL/L d'air et de 50 à 5000 µL/L air est adopté pour chaque HE et pour les molécules pures, respectivement. Dans un premier lieu, des papiers-filtres Whatman N°1 (7 cm de diamètre) sont attachés à la surface inférieure des couvercles des bocaux, contenant chacun 20 femelles adultes de 2-3 jours introduites par un aspirateur à bouche, et imprégnés par la suite de 5µl de différentes concentrations préalablement préparées. Des expériences témoins sont également réalisées ; où le DMSO (0,01%) est utilisé comme témoin négatif, alors que l'insecticide chimique «Déltaméthrine » est utilisé à la dose diagnostique suggérée par l'OMS, soit 0,05 %, en tant que témoin positif. Des expériences en triple sont effectuées pour chaque test. Les pourcentages de mortalité des adultes exposés aux HEs et les concentrations létales qui tuent 50% des insectes (CL_{50}) sont déterminés après 24h et 48h de traitement. Le pourcentage (%) de mortalité est calculé en utilisant la formule (1). Si le taux de mortalité chez le témoin

négatif est compris entre 5 et 20%, une correction de mortalité chez les adultes exposées aux HEs doit être effectuée par la formule d'Abbott (Abbot, 1925) (2). Les insectes sont considérés morts lorsqu'ils sont allongés sur le dos pendant une longue durée sans aucun mouvement.

$$Pourcentage\ de\ mortalité = \left[\frac{Nombre\ des\ femelles\ mortes}{Nombre\ des\ femelles\ introduites}\right] \times 100 \quad (1)$$

$$Mortalité\ corrigée\ (\%) = \left[\frac{Mortalité\ Observée\ (\%) - Mortalité\ Témoin(\%)}{100 - Mortalité\ Témoin\ (\%)}\right] \times 100 \quad (2)$$



Figure 24. Présentation de la méthode de fumigation dans des bocaux en verre

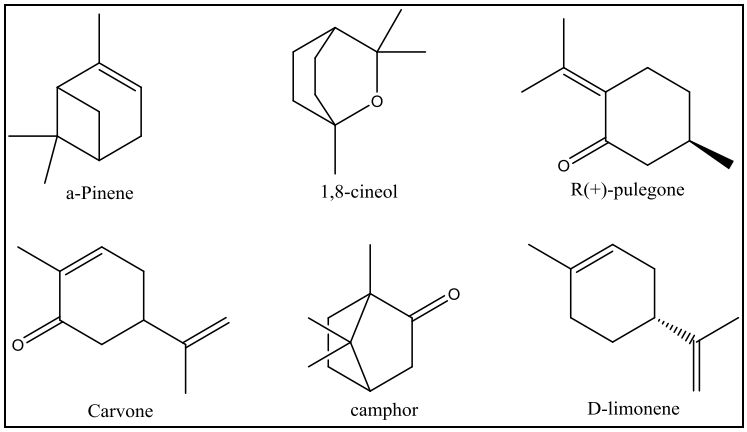


Figure 25. Structures moléculaires des molécules pures étudiées, dessinées par le logiciel professionnel ChemBioDraw (version 16.0).

IV. Analyse statistique

Les taux de mortalités sont corrigés par l'équation d'Abbott (1) et analysés par le logiciel GraphPad Prism 8.0.2 par le test statistique, ANOVA Two-way, en utilisant le test de comparaisons multiples, Post-hoc de Tukey. Les données sont présentées sous forme des moyennes ± SD de trois répétitions avec la probabilité de $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. L'analyse de régression probit est utilisée pour déterminer les valeurs de CL_{50} (Logiciel IBM SPSS 21) selon les méthodes mathématiques de Finney (Finney, 1971).

Résultats et discussion

I. Effet adulticide des HEs étudiées

L'efficacité insecticide des HEs étudiées est représentée par les pourcentages de mortalité et les CL_{50} enregistrées après 24h et 48h de traitement. Les résultats de l'activité insecticide sont présentés dans les figures 26 et 27, et il semble que la mortalité soit variable en fonction de l'espèce végétale d'où l'HE testée a été extraite, de la concentration utilisée et de la durée du traitement.

Après 24h de traitement (Figure 26), il apparaît que l'efficacité des huiles soit proportionnelle à la concentration (Relation dose-effet). En fait, toutes les HEs ont montré une action insecticide vis-à-vis des moustiques de *C. pipiens*, avec une grande différence significative entre les HEs testées et entre les différentes concentrations utilisées à P-value <0, 05.

Les HEs de *M. pulegium L.*, *R. officinalis L.* et *O. basilicum L.* sont les plus efficaces, car elles ont exercé un effet insecticide important et cette efficacité augmente avec les concentrations. La menthe et le basilic ont tué plus de 50% des insectes avec des mortalités de 55,55 ± 0, 10% et 58, 58± 0, 14% à 78, 125µl/L d'air ; de 58, 47%±0,41 et 65, 00±0, 67% à 156, 25µl/L d'air ; et de 78, 94 ± 0, 16% et 81, 02±0, 26% à 312, 5 µl/L d'air, respectivement, alors que le romarin a causé une mortalité de 56,72 ± 1,7% à 312, 5µl/L d'air. Il y a une différence significative notable de l'efficacité insecticide entre ces trois HEs et les autres huiles à toutes les concentrations testées. Les HEs de *L. stoechas L.* et *officinalis L.*, d'*E. globulus labills*, d'*A. herba Alba Asso*, de *C. limon* L. et d'*O. mixta (L.) Dumort* ne présentent pas une grande différence en terme de mortalité au niveau des concentrations 19,53 ; 39,06 ; 78,125 et 156, 25 µl/L d'air, alors qu'une différence hautement significative (P<0,0001) est bien observée à la concentration la plus élevée (312, 5µl/L d'air), et les taux de mortalité enregistrés sont de l'ordre de 24,56 ± 1,04% ; 21,41 ± 0,34% ; 40, 42± 1,01%; 36,72±0,67% ; 30,63±1,05%; 21,33±0,33%, respectivement.

Nous avons également remarqué une différence significative entre certaines HEs étudiées et la Déltaméthrine. L'insecticide chimique a tué seulement 17, 54± 1, 01% des insectes à la dose recommandée par OMS (0, 05%=500 µl/L d'air). Ce taux de mortalité est statistiquement similaire à celui enregistré pour l'HE de la lavande stoechade quand elle est testée à 39, 06 et 78, 125 µl/L d'air, de la lavande officinale (156, 25 et 312, 5 µl/L d'air),

d'Eucalyptus (78, 125 µl/L d'air), de l'armoise blanche (78, 125 µl/L air), du citronnier (156, 25 µl/L d'air) et de la camomille sauvage (156, 25 et 312, 5 µl/L d'air).

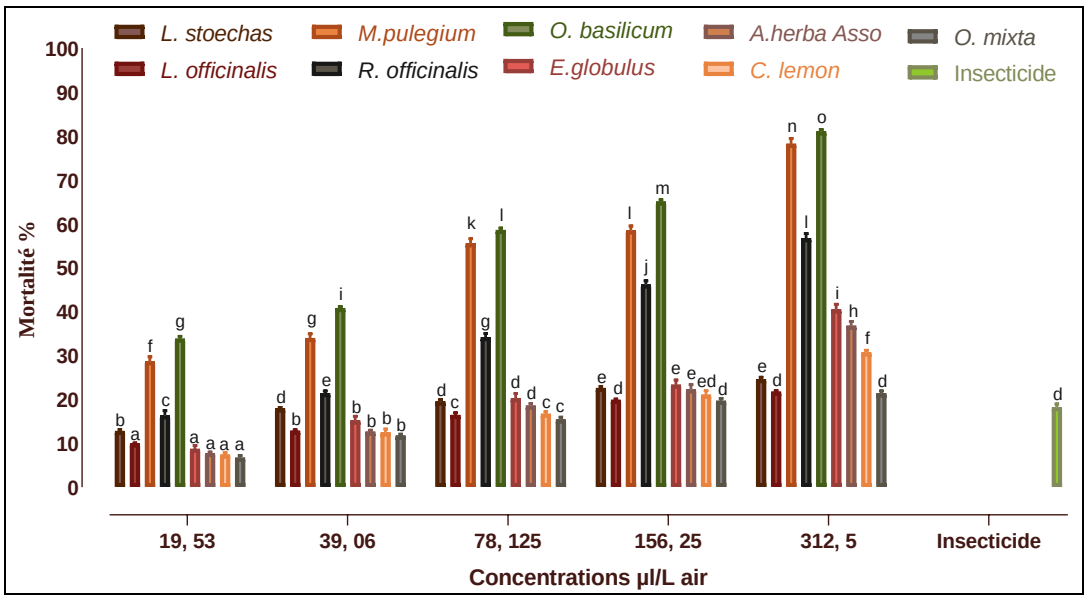


Figure 26. Mortalités des adultes femelles après 24h d'exposition aux HEs étudiées selon différentes concentrations. L'insecticide : Deltaméthrine (0, 05%).

Après 48h de traitement (Figure 27), les neuf HEs ont montré une action accrue sur les insectes. Bien que la majorité des HEs ont provoqué des mortalités importantes, celles de *M. pulegium* et *O. basilicum* restent les plus actives. Elles ont causé des mortalités dépassant 50% dès la concentration 39, 06 µl/L d'air avec des pourcentages de 57,9 ±0,60% et 62, 37±1, 33%, respectivement. Alors que des taux de mortalité de l'ordre de 65, 97±1,67% et 70,62±1, 33% ; 81,86±1, 67% et 85, 40±1,76% sont enregistrés, respectivement, à 78,125 et à 156,25 µl/L d'air, suivi de l'HE de *R. officinalis* qui a tué 57,91±1, 35% des insectes à 78,125 µl/L d'air et 65, 4±0,23% à 156,25 µl/L d'air. Les taux de mortalité sont ainsi élevés pour toutes les HEs à la concentration 312,5 µl/L d'air avec une différence statistique hautement significative (P <0,0001) par rapport à l'insecticide chimique. A cette concentration, la mortalité la plus élevée est provoquée par l'HE de *M. pulegium* (97,71 ±3,03%), suivie de celles d'*O. basilicum* L. (93,73±0,13%), de *R. officinalis* (75,94 ± 1,92%), de *L. stoechas* (68,42 ±1,54%), de *L. officinalis* (59,18 ±0,65%), d'*E. globulus* (59,17±0,79%), tandis qu'*A. herba alba*, *C. lemon*, et *O. mixta* ont tué, respectivement, 48,54±0,29%, 41,07±0,55%, 37, 24±0,72% des adultes femelles de *C. pipiens*. Alors que Deltaméthrine (0, 05%) a montré une mortalité de 33, 33±1,54%, qui est statistiquement non significative à (p<0, 05) avec les HEs de la lavande stoechade (35,08±1,01% à 19,53 µl/L d' air), de la lavande officinale (32,16±0, 58% à 39,06 µl/L d' air), d'Eucalyptus (31,56±1,33% à 78,125 µl/L d'air), d'Artemisia et du Citron à 156,25µl/L d'air (31,31±1,65% et 30, 92± 0,65%, respectivement), et de la

camomille à 312,5µl/L d'air (37,24±0,45%). En effet, selon les critères de l'OMS, une population d'insectes est classée résistante à un insecticide lorsque le pourcentage de mortalité est inférieur à 80%, tandis qu'il y'a une résistance possible qui doit être confirmée par des tests supplémentaires lorsque le taux de mortalité est compris entre 80-97%, et entre 90-98% de mortalité la population est considérée comme sensible vis-à-vis de l'insecticide testé (CNEV, 2014). Dans notre étude, la population testée peut être classée comme résistante.

D'après ces résultats, on peut conclure que les HEs étudiées possèdent soit une mortalité supérieure ou équivalente à celle du produit chimique, ce qui prouve leur potentiel insecticide important à l'égard des insectes adultes de *C. pipiens*. Cela est certainement attribué au profil phytochimique de chaque HE, et il est probable que les concentrations des huiles aient un effet significatif sur la mort des moustiques, puisque l'effet biologique des HEs dépend non seulement de leurs constituants chimiques, mais aussi de leurs concentrations utilisées (Silveira et al., 2012 ; Ringuelet et al., 2014). De plus, les HEs de la menthe, du basilic, du romarin, de la lavande sont les plus efficaces à toutes les concentrations testées.

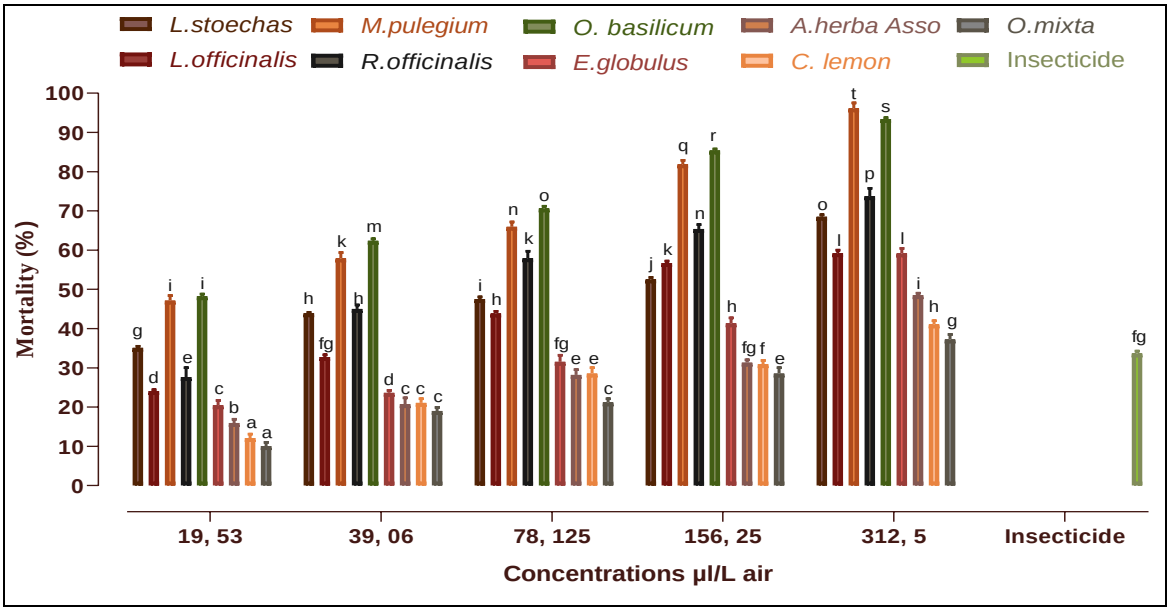


Figure 27. Mortalités des adultes femelles après 24h d'exposition aux HEs étudiées selon différentes concentrations. L'insecticide : Deltaméthrine (0, 05%).

Le traitement statistique a révélé que l'effet insecticide des 9 HEs testées (Après 24h : F=6680, P<0,0001 ; Après 48h : F=4075, P<0,0001 ; ddl = 8), et l'effet des concentrations utilisées (Après 24h : F=6286, P<0,0001 ; Après 48h : F=4075, P<0,0001 ; ddl=4) sont considérés extrêmement significatifs à P≤0,05. Ainsi, l'interaction (HE × concentration) est statistiquement très hautement significative (Après 24h : F=217, 5, P<0,0001 ; Après 48h : F=49,25, P<0,0001 ; ddl = 32). Ce qui signifie que toutes les HEs exercent un effet insecticide

considérablement différent contre les insectes de *C. pipiens* à toutes les concentrations (Tableau 4).

Tableau 4. Résultats du test d'ANOVA après applications des d'HEs contre des adultes de *C. pipiens*

	SC		ddl		MC		F (DFn, DFd)		P value
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h/48h
Interaction*	3822	1891	32	32	119, 5	59,10	F (32, 90) = 217,5	F (32, 90) = 49,25	P<0,0001
HE	29344	39122	8	8	3668	4890	F (8, 90) = 6680	F (8, 90) = 4075	P<0,0001
Concentrations	13807	22521	4	4	3452	5630	F (4, 90) = 6286	F (4, 90) = 4692	P<0,0001
Résiduelle	49,42	108,0	90	90	0, 5491	1,200	F (32, 90) = 217,5	F (32, 90) = 49, 25	
Totale	47 023	63642	134	134					

SC : Somme des carrées ; MC : Carré moyen ; F : Test de Fisher, ddl : Degré de liberté. *Réponse à la question : Est-ce que les HEs possèdent le même effet insecticide à toutes les concentrations ?

Le Tableau 5 résume les valeurs de CL_{50} déterminées par l'analyse probit pour les HEs testées après 24h et 48h de traitement. On remarque que les valeurs les plus faibles sont enregistrées pour les HEs d'*O. basilicum* et *M. pulegium*, elle sont estimées à 57,38 µl/L (39,24-71,47 µl/L) et 72, 94 (60, 34–83, 32) (après 24h) et 24,06 µl/L (12,83-36,29 µl/L) et 25, 43 µl/L (13, 22–38,65 µl/L) (après 48h), respectivement. L'HE de *R. officinalis* a présenté des valeurs de l'ordre de 222, 82 µl/L (210,52-234,29) et 55,79 µl/L (50,77–60,81 µl/L) après 24 et 48 h, respectivement. Des valeurs calculées à 83,99 µl/L air (70,90-98,89), 130,42 (115,27-147,49) et 222,75 µl/L air (213,42-244,11) sont attribuées aux HEs de *L. stoechas*, *L. officinalis*, et *E. globulus* après 48 h, respectivement. Alors que les CL_{50} obtenues pour *A. herba Alba*, *C. limon* et *O. mixta*. sont estimées à des valeurs supérieures à 312,5 µL/L air. Le coefficient de détermination R^2 révèle une corrélation positive très forte entre les mortalités transformées en probits et les concentrations transformées en logarithmes décimaux, et le test est statistiquement significatif à P-value <0,05.

Tableau 5. Valeurs de CL_{50} obtenues après exposition des adultes de *C. pipiens* aux différentes HEs

Espèce végétale	Temps (h)	CL_{50}[a] (µl/L air, 95% CI*)	Slope[b]	Intercept [c]	R^2
L. stoechas	24	>312,5			
	48	83,99 (70,90-98,89)	0,66±0,10	3,73±0,20	0,93
L. officinalis	24	>312,5			
	48	130,42 (115,27-147,49)	0, 87±0, 07	3,15±0,15	0,97
R. officinalis	24	222,82 (210,52- 234, 29)	0, 957 ± 0,	2,753 ± 0,63	0,93
	48	55,79 (50, 77–60, 81)	1, 093 ± 0,	3,091 ± 1,18	0,93
M. pulegium	24	72,94 (60,34–83,32)	1, 146 ± 0,	2,865 ± 0,30	0,94
	48	25,43 (13,22–38,65)	1, 169 ± 0,	3,357 ± 1,23	0,94
O. basilicum	24	57,38 (39,24-71,47)	1, 05±0, 09	3,14±0,18	0,97
	48	24,06 (12,83-36,29)	1, 27±0, 09	3,23±0,18	0,98
E. globulus	24	>312, 5			
	48	222,75 (213,42-244,11)	0,89±0,12	2,89±0,24	0,94
A. herba Alba	24	>312,5			
	48	>312,5			
C. limon	24	>312,5			
	48	>312,5			
O. mixta	24	>312, 5			
	48	>312, 5			

[a] : La concentration létale qui tue 50% des insectes.
[b] : Pente de la droite de régression ± Erreur Standard
[C] : L'ordonnée à l'origine de la droite de régression ± Erreur Standard.
* 95% CI : L'intervalle de confiance à 95% ; R^2 : coefficient de détermination.

L'efficacité insecticide des deux espèces de Lavandula (*L. stoechas* et *officinalis*) n'a pas été largement rapportée sur les adultes de *C. pipiens.* Cependant, Al-Sarar et al. (2015) ont révélé les propriétés insecticides de l'HE isolée d'une plante égyptienne appartenant au même genre, *Lavandula dentata*, sur des insectes femelles. La valeur de la CL_{50} enregistrée est très faible (0,217 µl/L) par rapport à celle obtenue dans notre étude. Cette différence peut être attribuée à la diversité des composés chimiques identifiés dont le camphre (60,39 %) et le fenchone (20, 05 %) sont détectés comme les principaux composants de cette huile. Par ailleurs, l'effet larvicide de *L. stoechas* a été évalué contre le vecteur du paludisme (El Ouali Lalami et al., 2016).

D'un autre côté, des espèces de Lavandula comme *L. angustifolia, L. dentata* et L. *gibsoni* ont été évaluées pour leur effet larvicide contre des populations de *C. pipiens* (Dris et al., 2017a ; EL-Akhal et al., 2021a) et contre d'autres insectes Culicinae (*Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus*) et Anophelinae (*Anopheles stephensi*) (Kulkarni et al., 2013 ; Baranitharan et al., 2021). *L. angustifolia* a exercé aussi un effet insecticide sur ce dernier moustique de Culex avec un pourcentage de répulsion de 85,7 % (Amer and Heinz 2006).

Contre d'autres types d'insectes, l'action insecticide de l'HE de *Lavandula officinalis* a été aussi rapportée contre les adultes de la fameuse espèce de ravageurs des champignons comestibles, *Lycoriella mali* (Choi et al., 2006). *L. stoechas L.* a aussi montré son effet insecticide contre des ravageurs des denrées stockées (*Lasioderma serricorne*, *Rhyzopertha dominica* et *Tribolium castaneum*), avec des pourcentages élevés de mortalité ayant été obtenus après 72 heures de fumigation (Ebadollahi et al., 2010), et contre la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Ghalbane et al., 2022). Cette huile a été également testée pour son activité acaricide contre *Tetranychus cinnabarinus*, l'un des principaux ravageurs agricoles (Sertkaya et al., 2010). Récemment, Abdel-Baki et al. (2023) ont étudié in *vitro*, à différentes concentrations, le potentiel larvicide, adulticide, répulsif de l'HE de *L. steochas subsp. Stoechas* provenant de la Turquie sur les larves et les adultes de l'insecte tique du bétail, *Rhipicephalus annulatus*; et ils ont même évalué l'activité insecticide sur les larves et les nymphes de la mouche domestique, *Mustica domestica.* Cette huile qui était trouvée riche en camphre (58, 38%) a causé à la plus faible concentration testée, 10%, une mortalité de 100±0,00 et 86,67±1,66 % des insectes adultes et larves de *R. annulatus*, dont les valeurs de CL_{50} sont estimées à 2,34% et 9,11 %, respectivement. De plus, 100% de mortalité a été observée chez les larves et les nymphes de *M. domestica* à la même concentration et les valeurs de CL_{50} enregistrées étaient, respectivement 1,79% et 1,51%. Alors que l'insecticide chimique « Deltaméthrine 5% » a montré une mortalité de 26,67 ± 3,33 et 22,66 ± 2,66 à 2 uL/mL, respectivement, contre les adultes et les larves de *R. annulatus,* et aucun effet insecticide n'a été observé sur M. *domestica*.

L'HE de *M. pulegium* est aussi très peu testée contre les femelles adultes de *C. pipiens* cependant d'autres plantes appartenant au même genre comme *M. piperita* de la Chine, *M. microphylla* et *M. longifolia* de l'Égypte ont montré leur efficacité contre les adultes de ce moustique avec des valeurs de CL_{50} enregistrés respectivement après 24h à 0, 6356% (0, 5145–0, 7851%), et à 0,215 µL/L (0, 204- 0, 225 µL/L), et après 30 min à 2,47 µL/L (Yang et al., 2005 ; Al-Sarar et al., 2015 ; El-Aswad et al., 2008). Le Pulégone a constitué l'un des principaux composants identifiés pour ces HEs. De plus, plusieurs études ont évoqué les propriétés larvicides de *M. pulegium* contre différentes espèces de moustiques telles que *C. pipiens*, *Culex quinquefasciatus* et *Aedes caspius P.* (EL-Akhal et al., 2018 ; Pavela et al., 2014 ; Guenez et al., 2014), et contre *Aedes aegypti*, *Anopheles atroparvus*, *Anopheles gambiae*, et *Anopheles stephensi* (Diara Rocha et al., 2015 ; Kazempour et al., 2021). L'effet larvicide de plusieurs HEs y compris celles de *Mentha x piperita L.* a également été évalué

contre *C. pipiens* (Kharoubi et al., 2021). Parallèlement, diverses espèces de Mentha (*M. pulegium*, *M. piperita* and *M. spicata*) ont révélé une efficacité insecticide vis-à-vis de ce moustique commun et la menthe pouliot était trouvée la plus efficace avec CL_{50} égale à 46, 97ppm (Michaelakis et al. 2011). D'un autre côté, l'HE de cette plante aromatique a également exercé une efficacité insecticide contre des insectes adultes de différentes familles tels que des espèces de mouches scatopsides (Gurkan and Fedai, 2013), et des ravageurs de riz, du blè, du niébé, et des argumes à savoir Rhyzopertha *dominica* (F.) (Brahmi et al., 2016), *Sitophilus granarius* (L.) (Abdelli et al., 2016), Callosobruchus *maculatus* (Aimad et al., 2021), *Aphis spiraecola Patch* et *Aphis gossypii Glover* (Behi et al., 2019). De plus, Singh and Pandey (2018) ont mis l'accent sur les diverses propriétés biologiques de *M. pulegium* tout en soulignant le potentiel répulsif, anti-appétissant, et ovicide de cette pennyroyal plante.

Dans le même contexte, les études sur l'effet adulticide de *R. officinalis* à l'égard du moustique *C. pipiens* sont très limitées. Zahran et son équipe (2017) ont mis en évidence le potentiel insecticide de plusieurs HEs extraites de plantes égyptiennes y compris *R. officinalis* et les CL_{50} sont estimées à des valeurs énormément faibles de l'ordre de 0,18 mg/L (0,03-0,41mg/L) et de 0,08 mg/L (0,003-0,28mg/L), respectivement, après 24h et 48h de traitement. L'effet répulsif et larvicide des HEs du Romarin a été aussi évalué sur d'autres moustiques dont à titre d'exemple *Culex quinquefasciatus* (Aisha, 2019), *Aedes aegypti* (Alavez-Rosas 2022), *Anopheles stephensi* (Shooshtari and Ghalandari, 2012), le moustique-tigre *Aedes albopictus* (Conti et al., 2010). Alors que l'effet insecticide a été largement étudié contre les insectes ravageurs des dattes, de la farine et les céréales stockées notamment les adultes d'*Ectomyelois ceratoniae* et d'*Ephestia kuehniella* (Ben Chaaban et al., 2022), de *Tribolium confusum* (Isikber et al., 2006), de *Tribolium castaneum* (Caballero-Gallardo et al., 2011), de *Sitophilus oryzae*, d'*Oryzaephilus surinamensis* (Bhanu Prakash, 2015), de *Calliphora vomitoria L.* (Bedini et al., 2020).

Nos résultats sur l'effet insecticide d'*O. basilicum* concordent parfaitement avec ceux obtenus par Dris et al, (2017b), qui ont étudié l'activité larvicide et non adulticide, et ont montré que cette HE extraite des feuilles du basilic d'Algérie a révélé une action insecticide vis-à-vis du moustique *C. pipiens* alors que la valeur de la CL_{50} a été estimée à 73,45 µl/L après 24h. Cette action peut être due à l'acétate de linalyle (53,89%) et le linalool (22,52%) qui sont identifiés comme les principaux constituants de cette HE. De plus, l'HE isolée des feuilles séchées du basilic turc a prouvé une action répulsive contre les femelles adultes de *C. pipiens* (Erler et al., 2006). Par ailleurs, l'HE d'*O. basilicum* a également démontré son

efficacité insecticide contre les adultes d'*Anopheles funestus* (Anophelinae) avec 100 % de mortalité à 250 µl/L (Akono Ntonga et al., 2012). De même, l'HE d'*O. basilicum* cultivée en Inde, qui est riche en linalool (52,42 %), en méthyle eugénol (18,74 %) et en 1,8-cinéole (5,61 %), a montré un effet toxique significatif contre les larves d'une autre espèce de Culex, *Culex tritaeniorhynchus* (Culicidae), et sur d'autres moustiques comme l'*Aedes albopictus* (Culicidae) et l'*Anopheles subpictus*. Les valeurs de la CL_{50} ont été estimées à 14,01 ; 11,97 et 9,75 ppm, respectivement (Govindarajan et al., 2013). L'activité larvicide de l'HE du basilic peut être attribuée à la présence d'eugénol et de méthyl-chavicol, tandis que l'effet répulsif est probablement lié aux composés d-limonène, myrcène et thymol (Brandão et al., 2022). De plus, Ben Chaaban et al. (2019) ont étudié l'effet insecticide d'*O. basilicum* sur deux insectes destructeurs des dattes à savoir *Ectomyelois ceratoniae* et *Ephestia kuehniella*. Cette huile qui contient des teneurs élevées en linalool (29,23%), cinnamate de méthyle (18,97%) a également exercé un effet insecticide important qui a atteint 88% de mortalité pour *E. ceratoniae* et 100% pour *E. kuehniella* à la concentration la plus élevée (54,54 µL/L d'air) après 48h d'exposition.

En outre, l'activité acaricide d'*O. basilicum* provenant du nord-ouest de la Tunisie a été évaluée contre *Hyalomma scupense* (Alimi et al., 2022). Boulamtat et son groupe (2021) ont aussi étudié l'effet insecticide de l'huile du basilic contre l'un des ravageurs les plus destructeurs, *Helicoverpa armigera*, et ont également identifié l'estragole (78,94 %) et le linalool (16,61 %) comme étant les composants majeurs de cette huile. Malgré la similitude observée entre les constituants chimiques des HEs obtenues dans différentes régions, les deux constituants, linalool et l'estragole, sont les plus importants, et leur quantité a été interprétée comme étant la raison derrière la différence significative révélée pour les effets insecticides.

Il convient également de noter qu'Ebadollahi et son équipe (2020) ont publié leurs travaux sur le potentiel insecticide et acaricide de nombreuses HEs de la famille des Lamiacées, y compris *L.* stoechas L., *M. pulegium L.*, *O. basilicum L.*, et *R. officinalis L.* D'autre part, les HEs de *L. officinalis*, de *R.officinalis* et d'*E. globulus* ont été testées pour son effet répulsif contre des adultes de *C. pipiens* pallens Coquillett avec un taux de protection de 65, 77 et 70 % (Choi et al. 2002). Il est intéressant de noter que les espèces de cette famille sont bien documentées non seulement en tant qu'agents antimicrobiens, anti-inflammatoires, antioxydants, anticancereux (Bouyahya et al., 2017c ; Mamadalieva et al., 2017), mais elles présentent aussi des propriétés insecticides considérables à l'égard de plusieurs espèces de moustiques et insectes ravageurs. Ce potentiel a été démontré par de multiples rapports

scientifiques (Sharma et al., 1992 ; Rozman et al., 2007 ; Yildirim et al., 2011 ; Cruz et al., 2017 ; Giatropoulos et al., 2018 ; Ebadollahi et al., 2020). Ces activités biologiques sont certainement liées à la richesse de ces plantes en extraits biologiquement actifs dont nombreux rapports ont souligné la présence de divers constituants chimiques tels que les terpènes, les iridoids, les flavonoïdes et les composés phénoliques (Andrade et al., 2018).

Pour l'efficacité insecticide d'*E.globulus* de la famille des Myrtacées, Ramar et al. (2014) ont évalué l'action adulticide de 12 HEs provenant de différentes plantes aromatiques, y compris *E. globulus*, sur une autre espèce de Culex, *Culex quinquefasciatus* par la méthode de papiers imprégnés, le temps Knock down (KT_{50}) est enregistré à 14,5± 0,1 min à la plus haute concentration de 5%, contrairement à l'insecticide chimique, deltaméthrine (0,05%), qui a montré un KT_{50} de 11,55 ± 0,2min, et si on analyse ce taux de mortalité, il semble qu'il est statistiquement non significatif à celui prouvé par l'HE, ce qui démontre le potentiel insecticide important de cette espèce.

Une autre étude avait également abordé l'efficacité répulsive d'une espèce d'Eucalyptus, *Eucalyptus camaldulensis,* vis-à-vis des adultes femelles du *C. pipiens* dont 100 % de répulsion a été enregistré à 10µl/ml après un temps d'exposition de 315 secondes (Erler et al., 2006). L'effet répulsif et larvicide de cette plante a été également évoqué à l'égard des autres moustiques et d'autres espèces d'insectes (Choi et al. 2002 ; Traboulsi et al., 2005 ; Park et al., 2011 ; Lucia et al., 2012 ; Kumar et al., 2012 ; Ben Slimane et al., 2014 ; Auysawasdi et al., 2016 ; Ríos et al., 2017 ; Ainane et al., 2019). L'effet insecticide des autres plantes d'Eucalyptus a été également abordé par Pujiarti and Kasmudjo (2016), comme par exemple l'espèce d'*Eucalyptus urophylla* contre le moustique vecteur potentiel de la filariose, *Culex quinquefasciatus*. Cette HE qui avait comme composés majeurs –pinène (11,73%), 1,8-cinéole (49,86%), β-ocimene (6,25%), γ-terpinene (9,11%), et l'acétate de α-terpinyl (7,63%) a exercé une activité larvicide minimale et optimale à 40 ppm et 240ppm avec des pourcentages cumulés de mortalité de 23, 33 et 95, 00%, respectivement, après 24h d'exposition; et la CL_{50} a été calculée à 80,21 ppm. Alors qu'elle a démontré une action répulsive de 100% des adultes femelles à la concentration la plus élevée (8%) après 0 minute et 240 min de contact des moustiques avec l'avant-bras d'un volontaire où l'huile d'*E. urophylla* a été appliquée, contre 62,81% et 70,72% à 2%, respectivement, pendant les mêmes temps, et la concentration inhibitrice (IC_{50}) moyenne enregistrée était de l'ordre de 0,82%, en comparaison avec le produit anti-moustique, N,N-diethyl-metatoluamide (DEET), qui a montré un effet répulsif de 100 % à la dose 15%. Dans cette étude, une différence

significative a été constatée en ce qui concerne le temps du traitement et les concentrations appliquées. Ces résultats rejoignent les nôtres concernant l'effet de la concentration sur la mortalité des moustiques. Il convient aussi de signaler que Lucia et son équipe (2012) ont souligné à travers leurs recherches que l'effet des HEs d'Eucalyptus sur les larves du moustique *Aedes aegypti* pourrait s'expliquer par la présence des quantités relatives de deux principaux constituants, le p-cymène et le 1,8-cinéole, tandis que l'efficacité adulticide pourrait être due à la teneur élevée en 1,8-cinéole. Cette interprétation confirme ce que nous avons obtenu pour ce composé éther qui est présent en teneur élevée dans notre huile d'eucalyptus et qu'il contribuait peut-être directement à l'effet insecticide. Il est important de noter que les espèces de Myrtacées sont dotées des propriétés insecticides importantes, cela est probablement en raison de leur richesse en dérivés terpéniques comme le 1,8-cinéole, le limonène, le linalool, le myrcène, le terpinéol, le thymol et l'α-pinène ; et que ces éléments chimiques ont aussi prouvé leur potentiel insecticide quand ils sont individuellement testés (Cheng et al., 2009 ; Ebadollahi, 2013).

Bien que l'effet adulticide vis-à-vis de *C. pipiens* des HEs d'*A. herba Alba Asso* a été rarement rapporté, d'autres espèces d'Artemisia telles que *A. judaica* et *A. monosperma* ont prouvé leur efficacité insecticide contre les adultes femelles de ce moustique vecteur. Les valeurs de CL_{50} sont estimées à 0,06 mg/L (0,001-0,31 mg/L), et 0,38 mg/L (0,06-0,97 mg/L) après 24h de traitement alors qu'après 48h elles sont de l'ordre de 0,06 mg/L (0,001-0,24 mg/L), et 0,28 mg/L (0,07-0,56 mg/L), respectivement (Zahran et al., 2017). L'HE d'*A. herba Alba* de la Tunisie dans laquelle l'α-thujone et β-thujone sont les composants les plus dominants a montré une action insecticide contre des larves de *C. pipiens* avec une CL_{50} égale à 241,1 ppm (Bellili et al, 2017). Une autre espèce, *Artemisia verlotiorum Lamotte* a révélé un pouvoir répulsif contre un autre moustique de la famille des Culicidae, *Aedes albopictus* (Skuse) (Bedini et al., 2018). D'un autre côté, Fekhar et al. (2017) ont étudié l'effet insecticide de l'HE d'*A. herba-Alba* d'Algérie contre les adultes du ravageur, *Sitophilus Oryzae*, et l'huile était composée principalement des monoterpènes cétones telles que la filifolone, l'α-thujone, la β-thujone et le camphre. Aljaiyash et al. (2018b) ont également mis en évidence les propriétés insecticides de l'HE d'*A. herba Alba* sauvage du Maroc contre l'insecte ravageur communément appelé scarabée de la farine, *Tribolium castaneum* ; et ont rapporté que la chrysanthénone et la trans-thujone ont marqué la prédominance dans cette huile appartenant à la famille des Astéracées. À l'égard de ce même insecte, Eljazi et al. (2020) ont évalué l'effet insecticide de l'HE d'*A. herba-Alba* de la Tunisie qui est riche en β-

thujone (27,79%), camphre (22,65%), chrysanthénone (17,97%) et en α-thujone (13,56%). Les CL_{50} ont été de 42,15% et 59,8%, respectivement, après 30 et 60 jours du stockage.

Nos résultats rejoignent également ceux précédemment publiés par Zahran et ses collaborateurs (2017) étant donné que *C. limon* a montré un excellent effet contre les adultes femelles de *C. pipiens*, avec des valeurs de CL_{50} de l'ordre de 0,19mg/L (0,01-0,43mg/L) et de 0,11 mg/L (0,01-0,32 mg/L), respectivement, après 24h et 48h d'exposition à l'HE. Badawy et al. (2017) ont aussi étudié l'activité insecticide des HEs de trois espèces de Citrus (*C. reticulata*, *C. reticulata* chinase et *C. sinensis*) sur les moustiques adultes de *C. pipiens*. L'HE de *C. reticulata* s'est avéré être le fumigant le plus efficace avec une valeur CL_{50} estimée à 2,74 µL/L d'air. Cette huile de Rutacée s'est trouvée efficace contre deux espèces de Culicidae (*C. quinquefasciatus* et *A. aegypti*) et contre *A. stephensi* (Anophelinae) après 24 heures de traitement (Amer and Mehlhorn, 2006). En outre, l'effet insecticide de *Citrus lemon L. (Burman f*a aussi été évalué contre d'autres insectes, notamment *Tribolium confusum* (Ainane et al., 2019). Il a également été rapporté que d'autres espèces d'agrumes telles que *C. sinensis*, *C. aurantium* et *C. reticulata* ont été testées pour leur activité contre *C. pipiens*, *C. pipiens quinquenfasciatus* et *C. pipiens molestus* (Yang, 2005 ; El-Akhal et al., 2014, Badawy et al., 2017 ; Michaelakis et al., 2009a).

L'HE d'*O. mixta (L.)* Dumort n'a jamais été testée pour son effet insecticide contre les moustiques de *C. pipiens* à l'exception de certains travaux précédemment documentés par Wu et al. (2022), ils ont montré le pouvoir répulsif puissant de l'HE de cette espèce de camomille qui a présenté une teneur considérable en terpinèn-4-ol (32, 6%), en α-terpinéol (12, 4%) et en γ-terpinène (10, 9%) sur des moustiques d'*A. albopictus* avec un taux de répulsion de 47 ± 3% à 10 µg/cm^2 après 30 min d'exposition.

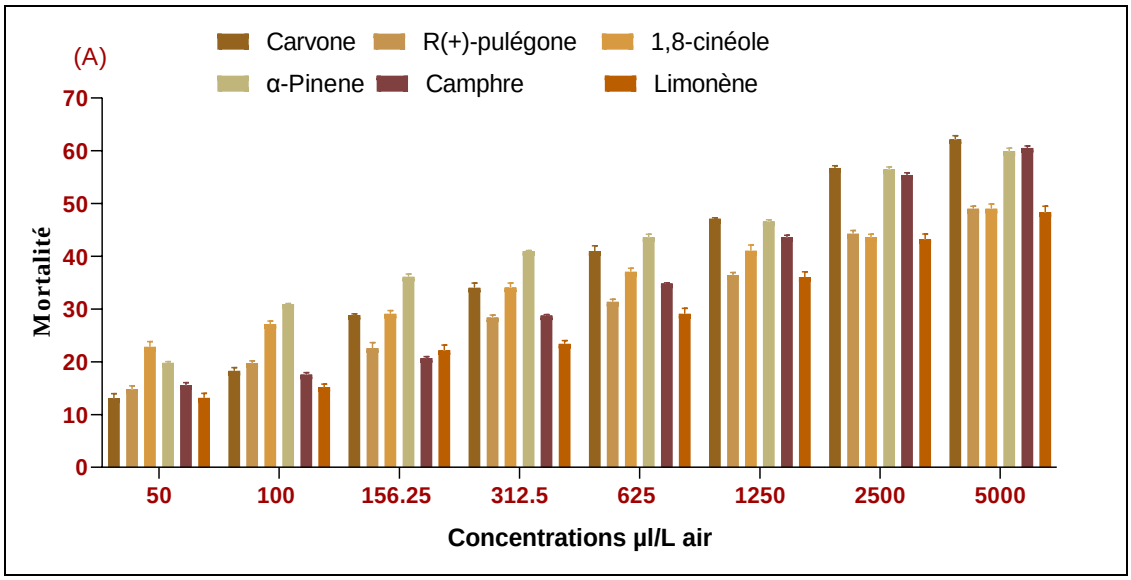
D'après nos résultats, on pourrait dire que les propriétés insecticides des HEs testées peuvent être dues à la variabilité détectée dans le profil phytochimique. Toutes les HEs étudiées ont montré divers chémotypes qui pointent leur polymorphisme chimique important. En effet, l'analyse chimique reste un outil essentiel, qui contribue apparemment à l'explication de l'effet insecticide en identifiant les composés majeurs et mineurs (Cruz et al., 2017). Il est communément connu que les HEs constituent des mélanges complexes de plusieurs substances phytochimiques naturelles, dont les principales classes sont les monoterpènes, les sesquiterpènes et les phénylpropènes (Abdelgaleil et al., 2021). Les HEs étudiées sont riches en composés monoterpènes tels que camphre, fenchone, linalool, 1,8-cinéole, α-pinene, β-pinene, camphène, estragole, pulégone, carvone, d-limonene, o-cymène,

β-thujone, α-terpineol, chrysanthenone. Cette classe chimique est très bien connue et largement rapportée en tant que substances larvicides, adulticides et agents répulsifs contre les moustiques et d'autres espèces d'insectes (Papachristos et Stamopoulos 2002 ; Zahran et al., 2011 ; Ma et al., 2014 ; Abdelgaleil et al., 2021). L'activité biologique des HEs pourrait être attribuée à des composants mineurs ou probablement à l'interaction combinée ou synergique entre de nombreux composants chimiques, sans qu'aucun composé individuel n'apporte une contribution dominante (Isman et al. 2011). En outre, l'effet insecticide pourrait varier en fonction des interactions plante/insecte (da Rocha et al., 2018).

C'est évident de souligner que l'effet insecticide varie en fonction de l'espèce d'insecte et des éléments chimiques de l'HE (Rozman et al. 2007). L'efficacité des HEs est absolument liée à leurs mécanismes d'action sur le moustique cible. Elles agissent par plusieurs mécanismes, affectant les systèmes nerveux et reproductif ainsi que les processus biochimiques qui perturbent spécifiquement l'équilibre endocrinologique des insectes, la perturbation de la croissance des insectes, le blocage de l'oviposition, la réduction de la fertilité et la réduction des paramètres morphométriques (Govindarajan et al. 2016a ; Rattan 2010 ; Dickens and Bohbot, 2013). La nature lipophile des HEs leur permet d'interférer avec les fonctions métaboliques, biochimiques, physiologiques et comportementales de base des insectes cibles (Benelli, 2015 ; Pavela, 2015a).

II. Effet insecticide des molécules majoritaires pures

La figure 28 représente les mortalités exercées par les monoterpènes sur les adultes femelles de *C. pipiens* en fonction de différentes concentrations. Apparemment, l'efficacité varie d'un composé à l'autre et dépend de la concentration appliquée. Généralement, toutes les molécules testées ont montré un effet insecticide avec une différence significative des taux de mortalité enregistrés. À la concentration la plus faible (50 µl/L d'air), le 1,8-cinéole, le camphre et l'α-pinène se sont révélés plus efficaces que les autres composés après 24h d'exposition, alors qu'après 48h, R(+)-pulégone, 1,8-cinéole, et l'α-pinène sont les plus actifs.



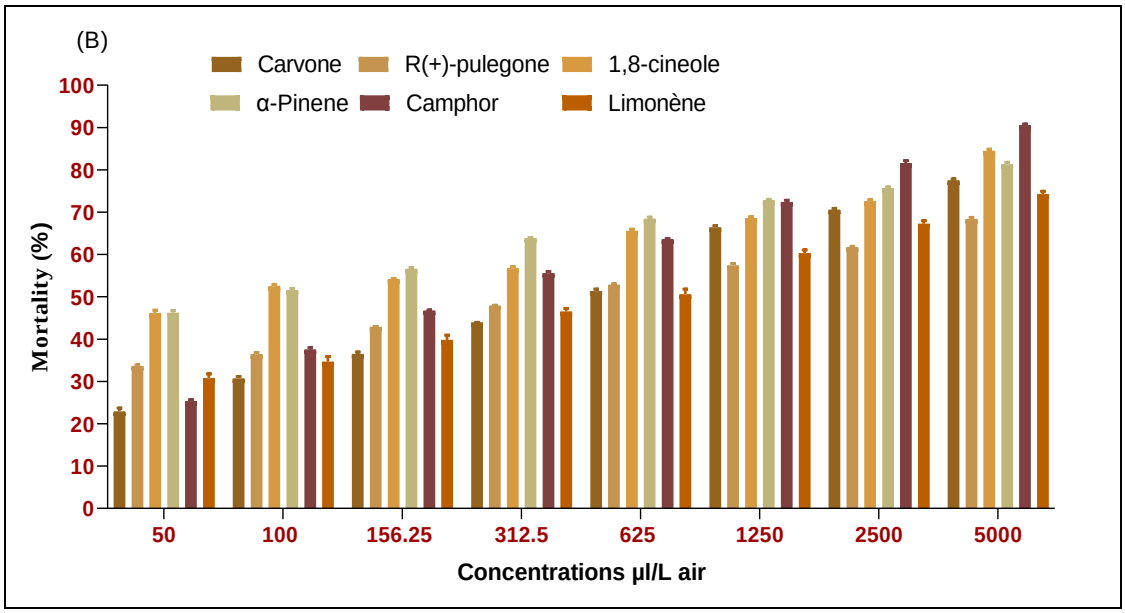


Figure 28. Activité des monoterpènes sur les adultes de *C. pipiens* à différentes concentrations après 24h (A) et 48h (B) de traitement. Les résultats sont des moyennes de trois répétitions (n = 3).

Il semble que l'efficacité augmente tout en augmentant les concentrations, et donc à la concentration la plus élevée (5000 µl/L d'air) tous les composés ont exercé des mortalités atteignant 50% et plus et qui varient entre 48,36±1,3 % et 61,5±0,5 % après 24h et 68,24±0,57 % et 90,55±1,2 % après 48h. Le carvone, le camphre, et l'α-pinène étaient les plus efficaces à cette concentration après 24h avec des taux de mortalités de 62,13±1,33 ; 60,52±1, 2, et 59, 94±0, 81%, respectivement. Après 48h de traitement, il s'avère que tous les composés testés ont montré des mortalités importantes et nous avons remarqué qu'ils ont causé la mort de 50 à 68% des insectes lorsqu'ils sont testés à 625 µl/L d'air, alors qu'à 5000 µl/L d'air, des pourcentages très élevées sont enregistrés et ils sont de l'ordre de 68,38±0,67 ;

74,29±1,3 ; 81,27±1,67 ; 84,33±1,54 ; 77,48±0,60, et 90,55±1,23% pour R(+)-pulégone, limonène, α-pinène, 1,8-cinéole, Carvone, et camphre, respectivement. Ces résultats sont encourageants si on considère les mortalités exercées par l'insecticide chimique, déltamethrine et qui sont de l'ordre de 18,15± 1,12 et 35,30±1,6% après 24h et 48h de traitement.

Le tableau 6 résume les valeurs des CL_{50} calculées pour les six composés testés. Il apparait que l'α-pinène a montré la valeur la plus faible après un temps d'exposition de 24h et qu'elle est de l'ordre de 1294,64 µl/L d'air suivie de carvone (1713,36 µl/L d'air) et du camphre (2269, 64 µl/L d'air), alors que les valeurs de 4684,64 ; 5395,58 et 5395,65 µl/L d'air sont estimées pour le limonène, le R(+)-pulégone et le 1,8-cinéole. Alors que les plus faibles valeurs enregistrées après 48h d'exposition sont attribuées au 1,8-cinéole (84,96 µl/L d'air), puis l'α-pinène (85,74 µl/L d'air), suivi du camphre (205,38 µl/L d'air), de carvone (538,96 µl/L d'air), de R(+)-pulégone (578,84 µl/L d'air) et limonène (619,20 µl/L d'air).

Tableau 6. Valeurs de CL_{50} enregistrées pour les composés purs

Molécule	Temps (h)	CL_{50} (µl/L air) (95% IC)	Slope	Intercept	R^2
Carvone	24	1713,36 (1703,33-1723,36)	0,774±0,04	2,497±0,12	0,96
	48	538,96 (512,84-568,36)	0,827±0,02	2,741± 0,07	0,99
R(+)-Pulégone	24	5395,58 (5295,58-5494,68)	0,515±0,01	3,078±0,02	0,99
	48	578,84 (578,24-597,64)	0,577±0,05	3,406±0,14	0,93
1,8-Cinèole	24	5395,65 (5282,45-5486,55)	0,362±0,01	3,649±0,03	0,98
	48	84,96 (75,8-95,26)	0,537±0,05	3,964±0,14	0,90
Camphre	24	2269,64 (2190,41-2354.45)	0,663±0,01	2,775±0,04	0,98
	48	205,38 (167.83-300,51)	1,027±0,08	2,625±0,22	0,94
α-Pinène	24	1294,64 (1230,17-1345,14)	0,642±0,06	3,002±0,16	0,92
	48	85,74 (74,04-98,21)	0,509±0,01	4,016±0,04	0,99
D-Limonène	24	4684,64 (4590,45-4795,50)	0,665±0,07	2,559±0,19	0,91
	48	619,20 (576,90-680,20)	0,759±0,08	2,881±0,18	0,93

Les résultats obtenus pour les tests insecticides des molécules pures ont aussi montré leurs efficacités envers les moustiques de *C. pipiens* dont l'effet s'améliore avec le temps d'exposition et les concentrations testées. La diversité s'apparente au niveau de la mortalité causée par les monoterpènes et que certains sont plus efficaces que d'autres, même s'ils sont testés à la même concentration peut s'expliquer par le fait qu'ils n'appartiennent pas à la même classe chimique, et même si le cas, ils sont structuralement différents. Si nous prenons par exemple le cas de carvone et camphre ils sont tous des cétones, mais la carvone s'est avérée plus efficace après une durée de traitement de 24h alors que le camphre a exercé la

mortalité la plus élevée à 48h. De même, pour limonène et α-pinène qui sont tous les deux classés dans les monoterpènes hydrocarbures, mais leur activité insecticide est totalement différente dont α-pinène s'est apparu plus efficace après 24h et 48h. Cependant, tous les composés possèdent un potentiel insecticide important en comparaison avec l'insecticide de synthèse. Cette variabilité de la mortalité dépend non seulement au composé testé, mais aussi à la cible biologique dont toute une interaction complexe se déroule entre les moustiques et les agents insecticides, relation insecte/molécule. En effet, nos résultats sont en accord avec ceux de Zahran et al (2011) qui ont évalué l'effet adulticide de douze monoterpènes contre les adultes du *C. pipiens*; ils ont également constaté que la mortalité était concentration et temps-réponse. Les monoterpènes ; (R)-carvone, (R)-camphre, (S)-limonene, ont provoqué des mortalités supérieures à 50 % à la concentration la plus faible (10 mg/l) après 24h et 48h d'exposition avec des pourcentages de l'ordre de 73,3±6,71, 53,3±8,88 et 60±5,81%, respectivement. Alors que 1,8-cinéole et (R)-linalool ont tué seulement 13,3±3,36 et 16,7±8, 88% des insectes à la même concentration. À 100 mg/L d'air, la mortalité s'est augmenté à 100% pour la (R)-carvone après 24h et 48h, à 90±5,81 et 96,7±3, 36 % pour (R)-camphre, à 96,7±3,36 et 100% pour (S)-limonène, et à 43,3±6,71 et 56,7±8,88% pour linalool. D'autres constituants ont été aussi testés à savoir camphène, (S)-fenchone qui constituent généralement les composés majeurs de *L. stoechas*, et ils ont aussi prouvé leur potentiel insecticide dans cette étude.

L'effet insecticide de nombreux monoterpènes a également été démontré à l'égard des adultes de *C. pipiens* pallens dont α-pinène a tué 30,0±5,8 des moustiques à 0,6 mg/L air après 24h, son isomère (β-pinène) a causé 20,0±4,1% de mortalité, cependant, linalool a exercé une très faible mortalité (8,8±2,5%) (Ma et al., 2014). Le 1,8-cinéole, camphène, 3-carene, (+)-borneol, (-)-borneol, (+)-α-terpineol, (-)-α-terpineol ont également montré leur efficacité vis-à-vis les larves de ce moustique (Kim et al., 2008). De même, l'action larvicide des énantiomères de α- et β-pinène a été aussi étudié sur *C. pipiens* de biotype molestus dont la forme (1 S)-(-) du β-pinène a révélé une forte activité et a enregistré, parmi les autres composés, les plus faibles valeurs de CL_{50} et CL_{90} (36,53 et 76,27 mg/L, respectivement) (Michaelakis et al., 2009a). Contre ce moustique molestus, l'effet insecticide et répulsif de plusieurs molécules pures a été étudié dont les formes énantiomères (1R)-(+)- α-pinène et (1S)-(-)- β-pinene, 1,8-cinéole, et linalool ont montré leur efficacité envers les larves de *C. pipiens*. Le 1,8-cinéole s'est avéré le plus efficace contre les piqûres de *Culex pipiens* molestus en montrant une protection complète pendant 2 heures (Traboulsi et al 2002, 2005).

L'effet répulsif a aussi été étudié par cinq monoterpènes contre *C. pipiens pallens*, dont linalool et a-terpinène ont montré un taux de répulsion de 89% et 97% après une heure d'exposition par rapport au produit chimique de répulsion, N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide, qui a révélé un pourcentage de 88% (Choi et al., 2002).

D'autre part, le pulégone et la pipéritone qui sont les chémotypes les plus connus de certaines espèces de la menthe ont également testé sur le moustique *Culex pipiens pallens* dont le pulégone était 5 fois plus active que la pipéritone et il a montré une valeur de CL_{50} de 27,23 mg/1 (Michaelakis et al., 2011 ; Guenez et al., 2014). Cette différenciation de l'activité, d'après ces auteurs, peut se justifier par l'emplacement de la double liaison C=C que possèdent ces deux molécules, ils ont supposé que la position de la double liaison C=C sur le groupe de la chaîne (isopropylidène contre groupe isopropyle) pour la pulégone augmente l'efficacité. Yuan et al. (2019) ont par ailleurs confirmé le potentiel insecticide de certains composés purs y compris α–pinène, β–pinène, 1,8-cinéole, eugénol contre d'autres genres de Culex, *Culex quinquefasciatus*, dont le monoterpène éther, 1,8-cinéole, a montré une mortalité de 89,19% à 24,2µL/L, et 58,86% à 3µL/L après un temps de 24h, alors que les hydrocarbures, α et β pinènes, qui sont présents dans la plupart des HEs lamiacées, myrtacées, rutacées, astéracées ont causé des mortalités inférieures à 40% à 24,2µL/L après la même durée de traitement. L'autre composé à double liaison exocyclique, eugénol, s'est avéré le plus efficace avec 99,57% et 100% des adultes morts à 24,2 µL/L et 3µL/L, respectivement. Dans une autre étude, 1,8-cinéole a prouvé son effet larvicide et répulsif envers ce même moustique (Pujiarti and Kasmudjo, 2016). De plus, l'effet insecticide de 30 molécules pures a été évalué contre cette même espèce dont la plupart des monoterpènes ont causé des mortalités atteignant 100% à 250 mg /L comme c'était le cas par exemple pour (R)-(+)-limonene et L-carvone (Pavela, 2015b).

Contre d'autres moustiques, Park et al. (2011) a évalué l'efficacité insecticide de plusieurs constituants contre les larves d'*Aedes aegypti*, les composés monoterpènes hydrocarbures tels que l'α-terpinène, p-cymène, les deux énantiomères de limonène, (+)-limonène et (-)-limonène, gamma-terpinène, et le composé sesquiterpène (E)-nérolidol ont montré des mortalités atteignant 95 et 100% à la concentration la plus élevée 0,1 mg/ml après une période d'exposition de 48 h, sachant que (E)-nérolidol a présenté en tant que composé mineur dans notre huile d'*E. globulus*. Les constituants α-pinène, β-pinène, β-myrcène, β-phellandrène ont exercé des mortalités entre 35,5 et 57,5%, alors qu'aucune mortalité n'est observé pour le linalool, 1,8-cinéole et terpinene-4-ol. Contre le même moustique, le linalool

a aussi montré son efficacité avec 88,8±11,1% à 400 µg/ml après 24h (Fujiwara et al., 2017). De plus, 12 composés volatils y compris 1,8-cinèole, limonène, a-pinène, p-cymène, gamma-terpinène, terpinolène ont également prouvé leur potentiel larvicide envers deux espèces Aedes, *A. aegypti* et *A. albopictus* (Cheng et al., 2009). Dans le même contexte, α-humulène, présent comme composé minoritaire dans notre HE du basilic, et β-élemène dont sa forme isomère (gamma-elemene) est présente en faible teneur dans notre huile de la camomille, de plus, l'α-pinène, l'eugénol et β-caryophyllène se sont avérés efficaces contre le vecteur du paludisme, *Anopheles subpictus*, le vecteur de la dengue, *Aedes albopictus* et le vecteur de l'encéphalite japonaise *Culex tritaeniorhynchus* (Govindarajan and Benelli, 2016 ; Govindarajan et al., 2016b). Les sesquiterpènes hydrocarbures, (E)-β-Farnesene, germacrene-D qui ont constitué l'un des composés majeurs de notre HE d'*O. mixta* ont causé 100% et 97,4 ±1,4% à 15 µg/mL après 24h contre les vecteurs d'*Aedes vittatus* et *Anopheles subpictus* (Al-Ghanim et al., 2023).

De plus, les composés purs des HEs se sont révélés efficaces contre d'autres types d'insectes, Rozman et al. (2007) ont étudié l'effet insecticide de nombreux constituants naturels tels que le 1,8-cinéole, le camphre, l'eugénol, le linalool, le carvacrol, le thymol, le bornéol, l'acétate de bornyle et l'acétate de linalyle qui sont largement présentés en forte teneur dans les HEs des espèces lamiacées y compris la lavande et le romarin. L'étude a prouvé l'efficacité de tous les composés notamment le monoterpène éthéré, 1,8-cinéole qui s'est révélé très actif vis-à-vis les adultes de *Sitophilus oryzae* avec 100% à la concentration la plus faible (0,1 µl/720 ml de volume) après 24 heures d'exposition, tandis que le monoterpène cétone, camphre, et alcool, linalool se sont avérés plus efficace contre les adultes de *Rhyzopertha dominica* en causant la mort de 100 % des insectes à la même concentration. De plus, 1,8-cinéole, limonène, α-pinène, linalool, thujone, a-terpinène, a-terpinéol, terpinen-4-ol, eugénol ont démontré leur effet insecticide envers le stade adulte *Sitophilus oryzae* (Lee et al., 2001). Le pulégone a montré aussi son potentiel insecticide contre Scatopse spp. en tuant 100% des insectes après seulement un temps d'exposition de 4 h (Gurkan and Fedai, 2013).

Dans une récente étude, Chen et al. (2021) ont rapporté le potentiel insecticide de quinze composés purs incluant le (+)-camphre et le 1,8-cinéole sur les larves de la chenille légionnaire de la betterave *Spodoptera exigua* et qui ont montré des valeurs CL_{50} de 161,22 (154,48- 168,24) et 104,17 (98,71- 109,94) µg/ insecte, respectivement. D'autres molécules pures comme β-thujone qui est représentative des espèces d'Artemisia a démontré une action insecticide contre les mâles et les femelles de la blatte germanique, *Blattella germanica*

notamment, la β-thujone avait exercé 100% de mortalité chez les deux sexes à 20 mg/papier-filtre après 48 h (Yeom et al., 2015). L'eugénol et l'estragole qui sont considérés les composés les plus actifs chez les espèces d'*O. basilicm* ont également montré leur efficacité envers un large spectre des insectes. En fait, l'estragole est bien documenté en tant que candidat potentiel de l'effet en question (Al-Harbi et al., 2021), d'ailleurs il a été montré que ce composé phénylpropène avait exercé une action insecticide vis-à-vis différents insectes ravageurs à titre d'exemple le ravageur de la vigne *Callosobruchus maculatus* (Kéita et al., 2001), et la blatte germanique, *Blattella germanica* (Yeom et al., 2015). De point de vue mécanisme d'action, ce composé est un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AchE) ; il agit sur le système nerveux des insectes par l'inhibition de l'action de l'AchE (Keane et Ryan, 1999 ; Abdelgaleil et al., 2016 ; Farag et al., 2016). La pipéritone qui constitue un composé typique de certaines espèces de Mentha a prouvé également leur efficacité insecticide contre l'insecte *Spodoptera littoralis* (Abdelgaleil et al., 2008).

D'après tous ces travaux, on peut constater que l'efficacité dépend de la nature de la molécule testée, sa concentration, la durée de traitement, aussi de l'insecte cible, et on remarque clairement que certains phyto-constituants sont plus efficaces que d'autres même s'ils sont testés aux mêmes conditions et sur le même insecte, cela dépends de la structure chimique de chaque composé volatil. Il a été rapporté que les cétones par exemple la carvone et le pulégone se sont apparu très efficaces que les alcools Rice and Coats (1994). Lee et al., (2003) ont également prouvé que les composés cétones sont plus actifs que les monoterpènoides. Yildirim et al., 2013 ont aussi confirmé ces résultats tout en révélant que cétone comme camphre, carvone, fenchone et menthone et des dérivés époxydes des monoterpénoïdes (tels que le 1,8-cinéole et l'oxyde de limonène) se sont trouvés plus actifs que les groupes des alcools et esters (tels que le bornéol, le linalool et menthol). Cependant, Zahran et al. (2011) ont rapporté que le menthol (alcool monoterpénique dérivé du menthane) avait une activité adulticide plus importante que le camphre (cétone monoterpénique) et le camphène (hydrocarbure monoterpénique). De plus, l'énantiosélectivité peut jouer un rôle important dans l'activité envers les insectes, et cela a été déjà signalé par Michaelakis et ses collaborateurs dans des travaux de recherche antérieurs (2008, 2009a, 2009b, 2011) et Melliou et al. (2009) notamment pour les constituants pinènes, limonène, linalool et l'acétate de linalyl contre le moustique *C. pipiens*.

En effet, les chercheurs ont tenté de comprendre la relation insecte/ molécule en faisant des tests enzymatiques et biochimiques, par exemple Ryan et Byrne en 1988 ont étudié

la relation entre les effets insecticides et l'efficacité des monoterpènes, et ils ont indiqué que ces constituants agissent sur le système cholinergique par l'inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE), et ceci est en accord avec la recherche d'Enan (2001) qui a rapporté que les composants des HEs exercent une action neurotoxique, et cette action est liée au système nerveux plus précisément, neurohormone octopamine, chez les insectes, dont les symptômes les plus importants sont l'hyperactivité suivie d'une hyper excitation entraînant un renversement rapide et une immobilisation. Lee et al. 2003 ont aussi expliqué le mécanisme par le fait que les monoterpènes et par sa nature volatile et lipophile peut pénétrer par la respiration et interférer d'une façon rapide avec les fonctions physiologiques de l'insecte, comme ils peuvent agir d'une manière directe sur le système nerveux tout en inhibant l'action de l' AChE ou les récepteurs de l'octopamine. D'autres études ont également prouvé l'effet des phyto-molécules citant par exemple pulegone-1,2-epoxide, 1,8-cinéole (-)-limonène, and (L)- fenchone, (-)-carvone, β-phellandrène sur l'activité de l'AChE (Grundy and Still, 1985; Abdelgaleil et al., 2009 ; Yeom et al., 2015). Alors que De-Oliveira et al., 1997 ont suggéré que l'activité insecticide exercée par les composés terpéniques n'était pas nécessairement corrélée avec la capacité d'inhiber l'action de l'AChE, et que les composés monoterpéniques pourraient être responsables de l'inhibition des monooxygénases dépendantes du cytochrome P450. Dernièrement, une étude menée par Gaire et al., 2019 ont étudié les effets neurophysiologiques de certains monoterpènes tels que par exemple camphre, linalool et ils ont montré l'apparition des symptômes chez les adultes de l'insecte punaise du lit, *Cimex lectularius L*. dont les insectes présentent soit des mouvements ou locomotion non coordonnés (hyperactivité) ou ils sont incapables de marcher ou incapables de se redresser lorsqu'ils sont renversés (paralysie), ou ils sont allongés sur le dos et montrent des contractions involontaires au niveau des pattes. Il est intéressant de noter que ces résultats sont parfaitement en accord par rapport à ce nous avons remarqué, dans notre étude, pour les moustiques traités et qui ils ont montré les mêmes situations de paralysie quand ils sont traités par les HEs ou leurs dérivés. En outre, dans le but de déterminer les caractéristiques structurales et moléculaires qui accordent une activité insecticide aux monoterpènes, et en construisant de nouvelles approches via des modèles de Relation quantitative structure-activité (QSAR), et de l'approche d'amarrage moléculaire sur (AChE) chez l'insecte *Ae. aegypti*, Castillo et al. (2023) ont pu montrer que les groupes époxydes dans la structure des terpènes empêchent l'activité, tandis que le caractère lipophile de ces composés les rend plus efficaces. Les molécules pures peuvent aussi agir sur les récepteurs GABA (GABArs) chez

l'insecte traité comme elles peuvent agir sur le neurotransmetteur, octopamine (Jankowska et al., 2017).

En prenant en compte l'émergence de la résistance chez les moustiques en général, et plus spécifiquement chez les adultes de *C. pipiens* face à de nombreux groupes d'insecticides synthétiques, nos résultats sont jugés pertinents. À l'échelle mondiale, des études antérieures ont mis en évidence le niveau de résistance des moustiques adultes de *C. pipiens* (Weill et al., 2003 ; Zayed et al., 2006 ; Scott et al., 2015 ; Kioulos et al., 2014). Au Maroc, plusieurs rapports ont prouvé la résistance de ce moustique à divers insecticides chimiques pyréthrinoïdes (Lambda-cyhalothrine, Perméthrine, Deltaméthrine), organochlorés (DDT), carbamates (Bendiocarb, Propoxur) et organophosphorés (Malathion) (Larhbali et al. 2010 ; Trari 2017 ; Tmimi et al. 2018). En effet, Trari (2017) a signalé l'importante résistance des populations de *C. pipiens* (stade adulte) collectés dans la ville de Fès aux pyréthrinoïdes (Deltaméthrine (0,05%), Lambdacyhalothrine (0,05%)), carbamates (Propoxur (0,1%)) et Organochlorines (DDT(4%)). L'apparition de la résistance chez d'autres espèces du genre Culex, *Culex quinquefasciatus*, a également été signalée (Yuan et al. 2019). Alors qu'aucun développement de résistance contre les plantes n'a encore été signalé (Sharma et al. 1992).

Conclusion Chapitre III

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence l'efficacité de neuf HEs et certaines de leurs molécules majoritaires pures sur les adultes femelles de *C. pipiens.* Toutes les huiles possèdent une efficacité adulticide qui varie en fonction de la nature de l'HE testée et sa concentration appliquée. Nous avons aussi constaté que les huiles de la menthe, du basilic, du romarin, de la lavande et même de l'Eucalyptus sont plus actives à toutes les concentrations, après 24h et 48h de traitement, par rapport aux autres huiles et par rapport à la Deltaméthrine (0,05%). À la plus grande concentration appliquée (312,5µl/L d'air), les pourcentages de mortalités corrigées sont enregistrés après 24h à 81,02±0,26% ; 78,94 ± 0,16% ; 56,72 ± 1,7% ; 24,56 ± 1, 04% ; 21,41 ±0,34% ; 40,42± 1,01% ; 36,72±0,67% ; 30,63±% ; 21, 33±0,33%, respectivement, pour les HEs d'*O. basilicum*, de *M. pulegium*, *R. officinalis*, *L. stoechas* et *officinalis*, *E. globulus A. herba Alba*, *C. limon* et d'*O. mixta*. Alors qu'après 48h, l'HE de *M. pulegium* a montré la mortalité la plus élevée (97,71 ± 3,03%), suivie de celle d'*O. basilicum* (93,73±0,13%), de *R. officinalis* (75,94 ±1,92%), de *L. stoechas* (68,42 ±1,54%), de *L. officinalis* (59,18 ±0,65%), d'*E. globulus* tandis que les HEs d'*A. herba*, *C. lemon*, et *O. mixta* ont prouvé, respectivement, 48,54±0,29%, 41,07±0,55%, 37,24±0,72% de mortalités. Les valeurs de CL_{50} les plus faibles sont attribuées à l'HE du

basilic et de la menthe (après 24h : 57,38 µl/L et 72,94 µl/L ; après 48h : 24,06 µl/L et 25,43 µl/L, respectivement), suivie de celle du romarin (222,82 µl/L et 55,79 µl/L après 24 et 48 h, respectivement). Pour les HEs de *L. stoechas*, *L. officinalis*, et *E. globulus*, les valeurs de CL_{50} sont enregistrées à 83,99 µl/L air, 130,42 µl/L air et 222,75 µl/L air, respectivement, après 48 h de traitement. Cependant, les CL_{50} estimées pour les HEs d'*A. herba Alba*, *C. limon* et *O. mixta* sont toutes supérieures à 312,5 µL/L d'air. Les mortalités induites par l'insecticide chimique (17,54± 0, 01% et 33,33±1,54%, après 24h et 48h) quand il est appliqué à la dose recommandée par OMS (0, 05%) ne sont pas statistiquement différentes à celles montrées par les HEs des lavandes, d'Eucalyptus, de Citrus, de l'armoise herbe blanche, et de la camomille sauvage lorsqu'elles sont utilisées à certaines concentrations. Pour les composés purs, ils ont tous montré un potentiel insecticide envers les moustiques de *C. pipiens.* Il semble que les monoterpènes cétones ; carvone et camphre, et le monoterpène hydrocarbure ; α-pinène sont les plus efficaces après 24h avec 62,13±1, 33%; 60,52±1,2%, et 59,94±0,81%, respectivement, de mortalité à la concentration la plus élevée (5000 µl/L d'air). Alors qu'après 48, tous les composés sont efficaces à la même concentration tout en donnant des mortalités supérieures à 50 % avec des pourcentages de l'ordre de 90,55±1,23% pour le camphre ; 84,33±1,54% pour 1,8-cinéole ; 81,27±1,67% pour α-pinène, 77,48±0,60% pour carvone, 77,29±1,3% pour limonène et 68, 38±0,67% pour R(+)-pulégone. L'α-pinène a montré la valeur de CL_{50} la plus faible après 24h (1294,64 µl/L), suivie de carvone (1713,36 µl/L d'air) et du camphre (2269,64 µl/L d'air), alors que 1,8-cinéole (84,96 µl/L d'air), l'α-pinène (85,74 µl/L d'air), et le camphre (205,38 µl/L d'air) ont montré les plus faibles valeurs après 48h.

Ces résultats nous ont permis de conclure que les HEs testées et leurs dérivés naturels possèdent des propriétés insecticides similaires ou plus importantes que la Deltaméthrine, et elles pourraient donc être utilisées à la place de ce produit de synthèse. Par conséquent, nos résultats suggèrent forcément l'utilisation de ces métabolites secondaires notamment ceux extraits des espèces de Lamiacées et Myrtacées ainsi que les phyto-constituants et qui pourraient être adopté en tant qu'agents bio-insecticides alternatifs aux insecticides chimiques dans les programmes de gestion intégrée des moustiques vecteurs des arbovirus. Il est aussi intéressant de souligner qu'il est possible d'augmenter l'efficacité de ces substances insecticides tout en recherchant une formulation insecticide optimale via des tests de combinaisons binaires ou ternaires d'où l'objectif principal du chapitre suivant.

Chapitre IV

Optimisation de l'activité insecticide par les plans de mélanges

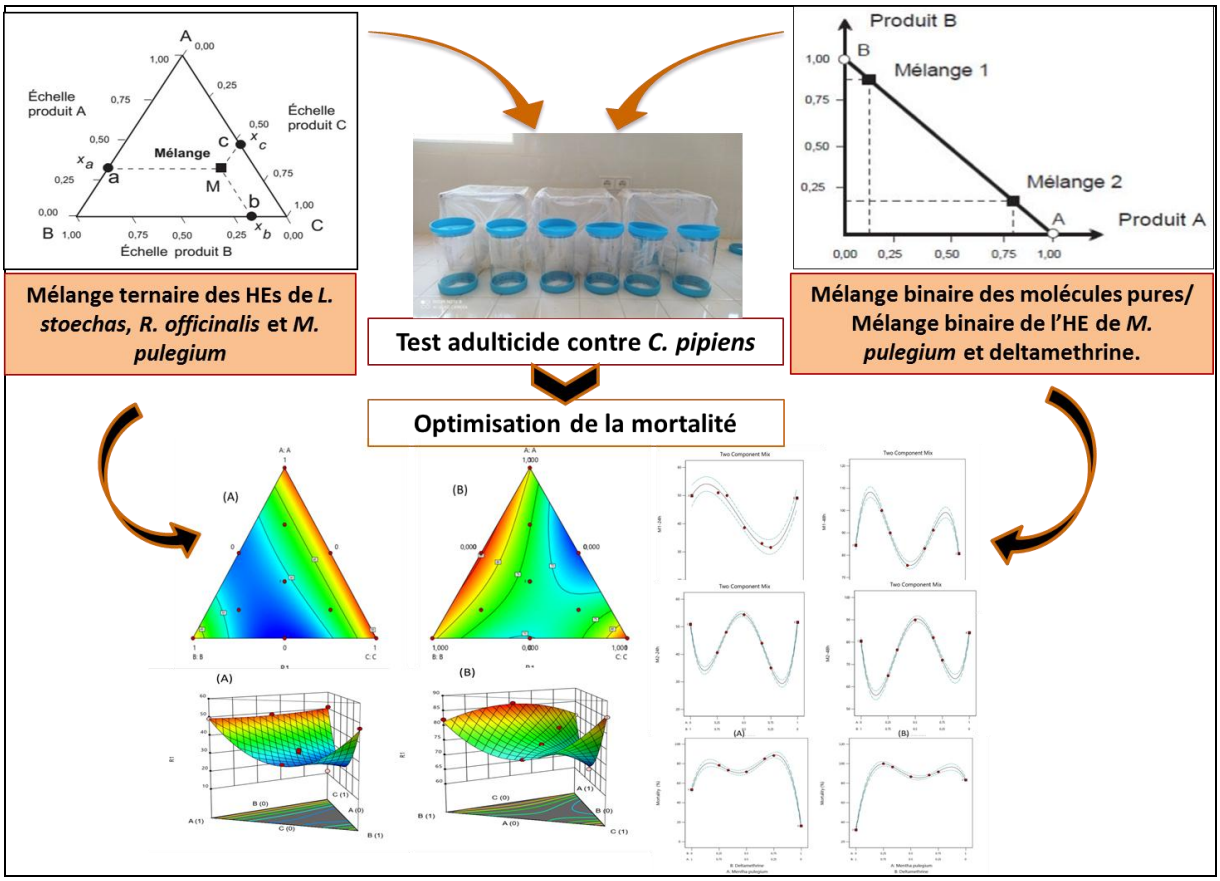


Figure 29. Schéma récapitulatif du chapitre IV

Introduction

Les inquiétudes relatives à la santé publique et la sécurité environnementale se sont intensifiées, ces derniers temps, en raison de plusieurs facteurs qui émergent et perturbent l'équilibre de l'écosystème et des êtres vivants, parmi ces raisons, on trouve le risque lié à l'utilisation intensive des produits chimiques, d'une part, et les maladies transmissibles par les moustiques d'autre part. Ces insectes à part leur forte nuisance, constituent le groupe le plus dangereux, sur le plan médical, des arthropodes vecteurs des arbovirus et d'autres, pathogènes, plus particulièrement ceux appartenant à la famille des Culicidés (Mint et al. 2017, Alavez-Rosas 2022). En outre, l'émergence de la résistance aux insecticides chimiques, en particulier aux pyréthrinoïdes tels que la déltaméthrine, qui est l'un des plus largement utilisés pour lutter contre les moustiques, suscite l'alarme. L'aspect le plus crucial de la gestion de la résistance est de prévenir ou d'entraver son apparition en agissant de manière efficace sur les facteurs impliqués dans son développement (Murugan, 2015 ; Yuan et al., 2019). Dans ce contexte, les études s'intéressent à la recherche d'alternatives aux insecticides de synthèse tout en portant des innovations qui pourraient répondre à la problématique de résistance et en renforçant les mesures de lutte contre les maladies transmissibles à travers le contrôle des vecteurs par des formulations efficaces (Maggi and Benelli 2018 ; Alavez- Rosas 2022). Ainsi, le but de notre étude s'intègre dans ce contexte, et nous avons pensé à renforcer l'efficacité des HEs et leurs molécules pures *via* des combinaisons binaires et ternaires en adoptant les plans d'expériences en particulier l'approche de plan de mélange. En effet, cette méthodologie a été utilisée pour trouver une formulation optimale en minimisant le nombre d'expériences. Cette stratégie permet de trouver la relation existant entre les variables et les réponses expérimentales mesurées. Le plan le plus simple à mettre en place lorsque les variables du processus sont des ingrédients ou des proportions est le plan de mélange (Khmiri et al., 2012).

Etant donné les résultats pertinents obtenus dans le chapitre III sur l'effet insecticide des HEs de la menthe, du romarin et de la lavande, ainsi que certains de leurs constituants purs, il nous a semblé intéressant d'étudier leur activité en mélange binaire et ternaire, et aussi en mélange avec l'insecticide chimique, ainsi que des mélanges binaires de quelques constituants purs. L'objectif principal était de trouver les proportions qui vont donner les meilleures combinaisons possibles et donc avoir une activité insecticide plus élevée tout en maximisant la mortalité. Les principaux axes de ce chapitre s'articulent sur :

-L’évaluation de l’activité insecticide des mélanges de trois HEs, de *L. stoechas, R. officinalis, M. pulegium.*

-L’évaluation de l’activité insecticide des mélanges binaires de monoterpènes purs, carvone + R(+)-pulégone et 1, 8-cinéole+ α-pinène.

- L’évaluation de l’activité insecticide d’une formulation à la base de l’HE de *M. pulegium* et deltaméthrine.

Matériel et Méthodes

I. Matériel

Afin de renforcer l’activité insecticide et de trouver une formulation optimale qui peut tuer un nombre important des moustiques, plusieurs combinaisons binaires et ternaires sont réalisées par les HEs et les molécules pures en adoptant la méthodologie de plan de mélange. Dans un premier temps, les trois HEs de *L. stoechas, R. officinalis* et *M. pulegium* sont choisies pour évaluer leur efficacité dans un mélange ternaire puisqu’elles ont montré un effet insecticide important sur les adultes femelles de *C. pipiens* lorsqu’elles sont individuellement testées. Dans un deuxième temps, des mélanges binaires des molécules pures tels que 1,8-cinéole+α-pinene, carvone+ R(+)-pulégone, sont préparés pour tester leur activité insecticide. Ces constituants se sont révélés très efficaces dans les tests adulticides individuels et ils constituent les composés majoritaires des HEs de *R. officinalis* et *M. pulegium,* respectivement. De plus, l’effet insecticide d’une formation à la base de l’HE de *M. pulegium* et deltaméthrine (0,05%) est aussi étudié envers ce moustique.

II. Méthodes

II.1 Préparation des mélanges par la méthodologie de plan de mélange

II.1.1 Mélange ternaire par les HEs de *L. stoechas, R. officinalis* et *M. pulegium*

i. Composition chimique

L’identification quantitative et qualitative des éléments chimiques des mélanges des HEs est réalisée à l’unité réservée pour l’analyse GC-MS au centre de recherche et d’innovation (CURIE) selon le même protocole décrit dans le chapitre II (Paragraphe : L’analyse chimique des HEs, Page 37).

ii. Plan de mélange

a) Plan de mélange adopté et matrice d'expériences

En se basant sur les valeurs de CL_{50} enregistrées après 24h d'exposition pour chaque HE individuellement appliquée 19 000 (16 300, 29 - 23 806, 91) µl/L d'air pour *L. stoechas,* 222, 82 (210,52- 234, 29) µl/L d'air pour *R. officinalis,* et 72, 94 (60, 34–83, 32) µl/L d'air pour *M. pulegium,* des combinaisons ternaires sont préparées tout en adoptant un plan de mélange pour l'optimisation de la réponse qui est la mortalité des insectes.

Le plan choisi est un plan de mélange centré augmenté qui se compose d'une matrice de 12 expériences (10 expériences plus 2 répétitions dans l'expérience 7) comme c'est décrit dans le tableau7.

Tableau 7. Expériences sélectionnées pour chaque combinaison

N° de l'expérience	*L. stoechas*	*R. officinalis*	*M. pulegium*
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,33	0,33	0,33
8	0,33	0,33	0,33
9	0,33	0,33	0,33
10	0,67	0,17	0,17
11	0,17	0,67	0,17
12	0,17	0,17	0,67

b) Modèle mathématique

Afin d'exprimer les réponses en fonction des variables indépendantes basées sur la méthodologie du mélange, nous avons utilisé le modèle de régression cubique incomplet (Formule 1).

$$Y = a_1x_1 + a_2x_2 + a_3x_3 + \mathbf{a_{12}}\,\mathbf{x_1x_2} + a_{13}\,x_1x_3 + a_{23}\,x_2x_3 + a_{123}\,x_1x_2x_3 + \varepsilon \quad \textbf{(1)}$$

Avec Y= la réponse (la mortalité) exprimée en % ; α1, α2, α3 sont les coefficients des termes linéaires ; α12, α13, α23, sont les coefficients des termes binaires ; α123, Coefficient du terme ternaire ; ε est un terme d'erreur.

II.1.2 Mélange binaire des molécules bioactives et mélange de l'HE de *M. pulegium* et Deltaméthrine

II.1.2.1 Plan de mélange adopté

Sept combinaisons binaires sont préparées pour le mélange des molécules pures ainsi que pour le mélange de l'HE de la menthe et l'insecticide chimique, déltamethrine. Pour les mélanges des constituants purs tels que le 1,8-cinéole + α-pinène et la carvone + R (+)-pulégone, nous avons effectué les combinaisons tout en se basant sur les valeurs CL_{50} obtenues après 24h de traitement pour chaque composé isolément testé et qui sont; 5395, 65 (5282, 45-5486, 55) µl/L air et 1294, 64 (1230, 17-1345, 14) µl/L air pour le 1,8-cinéole et α-pinène, respectivement et 1713, 36 (1703, 33-1723, 36) µl/L air et 5395, 58 (5295, 58- 5494, 68) µl/L air pour carvone et R (+)-pulégone. Les mélanges pour l'HE et l'insecticide sont réalisés de la même manière en utilisant la CL_{50} de la menthe (72, 94 (60, 34–83, 32) µl/L air après 24h). Pour chaque expérience, les deux constituants de chaque mélange sont combinés en utilisant différentes proportions qui se réfèrent au volume (Tableau 8).

Tableau 8. Sept expériences sélectionnées pour chaque mélange binaire

Mélange	constituant	
	A	B
1	0	1
2	0,75	0,25
3	0,25	0,75
4	0,33	0,67
5	1	0
6	0,67	0,33
7	0,5	0,5

II.1.2.2 Modèle mathématique adopté

Afin de réaliser cette partie, un plan simplex-lattice à deux composés est sélectionné. Ce plan de mélange est composé de sept expériences dont deux pour les composés purs (expériences 1 et 5), le mélange 0,5-0,5 (expérience 7), des points axiaux (expériences 2 et 3) et deux mélanges (0,6-0,3) des deux constituants.

Le modèle mathématique proposé est un modèle quadratique de Scheffe comme indiqué dans l'équation (2) ci-dessous :

$$\mathbf{Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + \varepsilon} \quad (2)$$

Y représente la réponse (Mortalité en %) ; b1, b2, b12 sont les coefficients des termes linéaires et quadratiques respectivement, Xi est la proportion de chaque composé, et ε est un terme d'erreur. Toutefois, il existe une restriction dans les combinaisons sélectionnées, à savoir que la quantité de chaque composé pur doit varier de 0 à 1 et que la totalité de tous les composants utilisés dans le mélange doit être égale à 1, comme indiqué dans la formule (3).

$$\sum_{i=1}^{i=n} \boldsymbol{X_i = 1} \quad (3)$$

II.1.2.3 Evaluation de l'activité insecticide

Dans le but de tester l'effet insecticide sur les moustiques adultes femelles de *C. pipiens*, nous avons mis en œuvre toutes les combinaisons réalisées pour les mélanges ternaires et binaires. Pour cela, nous avons appliqué la méthode des papiers filtres imprégnés que nous avons décrite et détaillée dans la partie précédente (Chapitre III, paragraphe 3, page 67).

II.1.2.4 Traitement statistique

Pour l'analyse statistique des données obtenues pour les mélanges ternaires et binaires, nous avons utilisé le logiciel destiné au traitement des plans d'expériences, DESIGN EXPERT version 12 (Stat-Ease society, (Minneapolis, MN, USA). Les résultats obtenus ont été analysés par l'analyse de la variance pour tester la signification des modèles postulés. Tous les tests ont été effectués à un niveau de signification de 95 %.

Résultats et discussion

I. Mélange ternaire des HEs de *L. stoechas, R. officinalis* et *M. pulegium*

I.1 Profil phytochimique des mélanges des HEs de *L. stoechas, R. officinalis, M. pulegium*

Afin de détecter l'effet des combinaisons des HEs sur la composition chimique des mélanges préparés, à différentes proportions, par les HEs de *L. stoechas,* de *R. officinalis* et *de M. pulegium*, l'analyse GC-MS a été réalisée, et les profils phytochimiques obtenus pour toutes les combinaisons effectuées sont présentés dans le Tableau 9. On a clairement constaté

que les profils chimiques des mélanges varient de manière significative par rapport à ceux obtenus pour chaque HE individuellement analysée, des constituants disparaissent et autres apparaissent (Figure 30).

Tableau 9. Composition chimique de mélanges des HEs de *L. stoechas, R. officinalis, M. pulegium*

Composé	IR	M4	M5	M6	M7	M10	M11	M12
2-Pentanone	845					0,82		
(+)-Camphene	943					1,42		1,95
α-pinène	948	30,68	17,70	27,57	26,59	17,81	33,25	22,34
3-Carene	948		2,20					
camphene	954	9,21	11,40	7,96	10,66	8,47	7,57	10,49
β-pinène	980	0,94		0,78			1,11	
2-pinen-4-one	1119					3,41		
D-Limonene	1032	3,54	1,41	3,14	2,61	1,80	3, 91	1,75
1,8-Cinéole	1033	1,23		0,65			1, 10	
o-Cymene	1042	1,95		1,77	1,37		2, 21	0,89
Isoterpinene	1052	0,46						
Linalool	1082	3,93	3,60	4,01	4,02	3,77	4, 08	4,10
Fenchone	1121	6,94	15,08	8,40	10,20	13,03	6, 27	12,61
Camphre	1147	19,21	35,82	23,84	28,33	37,81	19, 00	31,86
Terpinen-4-ol	1137	0,89		3,26				
α-Terpineol	1137	1,51		1,42			1, 71	
Endo-bornéol	1138	3,24	2,92	3,26	3,15	3,16	3, 48	2,96
Verbenone	1212	7,98		1,42	5,52		9, 58	2,96
Bornyl acetate	1277	1,84	0,80	1,70	1,49	1,64	2, 08	1,19
Myrtenyl formate	1312						1, 17	
Caryophyllene	1494	1,21		1,02	0,75		1, 46	
β-Bisabolene	1500	0,39						
Eudesma-3,7(11)-diene	1507					2,72		
Selina-3,7(11)-diene	1507	1,24	3,02	2,66	1,88			2,49
cis-Calamenène	1537	0,55	0,78					
α-Humulene	1579	0,82		0,61				
Di-épi-1,10-cubénol	1623	2,25	5,27	1,45	3,43	4,12	2,03	4,46
Pourcentage total		99,99	99,95	98,42	100	99,98	99,98	99,97
Nombres des composés		21	12	19	13	13	16	13

Les composés sont listés dans l'ordre de leur temps de rétention. **M4** : *L. steochas* (0, 5) *+R. officinalis (0,5)* ; **M5**: *L. stoechas (0,5) + M. pulegium (0,5) ; **M6**: R. officinalis (0,5) + M. pulegium(0,5) ; **M7**: L. stoechas (0,33) +R. officinalis (0,33)+ M. pulegium(0,33) ; **M10**: L. steochas* (0,67) *+R. officinalis (0,17) + M. pulegium (0,17); **M11**: L. steochas* (0,17) *+R. officinalis (0,67) + M. pulegium* (0,17) ; **M12** : *L. steochas* (0,17) *+R. officinalis* (0,17) *+ M. pulegium* (0,67).

L'analyse chimique a permis de détecter un total de 21 constituants pour le mélange M4, 18 pour M6, 16 pour M11, 13 pour M7, M10 et M12, et 12 pour M5, représentant tous un pourcentage total de plus de 99%. Comme s'est illustré dans la figure 18, le mélange 6 qui contient la proportion 50%-50% de *R. officinalis* et la *M. pulegium* a montré le pourcentage le

plus élevé des nouveaux composés identifiés (54,11%), suivi du mélange binaire (M4) de *L. stoechas* et *R. officinalis* (40,56%), alors que le mélange qui contient 50% de l'HE de *L. stoechas* et 50% de *M. pulegium* a constitué d'un pourcentage total de 26,62% des nouveaux constituants. Les mélanges M7, M10, M11, et M12 qui contiennent les trois HEs avec différentes proportions ont présenté, respectivement, 32,99 ; 29,34 ; 40,11 et 30,63% des nouveaux constituants. Les éléments précédemment détectés dans les profils chimiques des HEs individuelles ont présenté des pourcentages totaux élevés, mais il est important de souligner que la plupart des constituants sont présents avec des teneurs complètement différentes par rapport à celles trouvées dans les compositions individuelles.

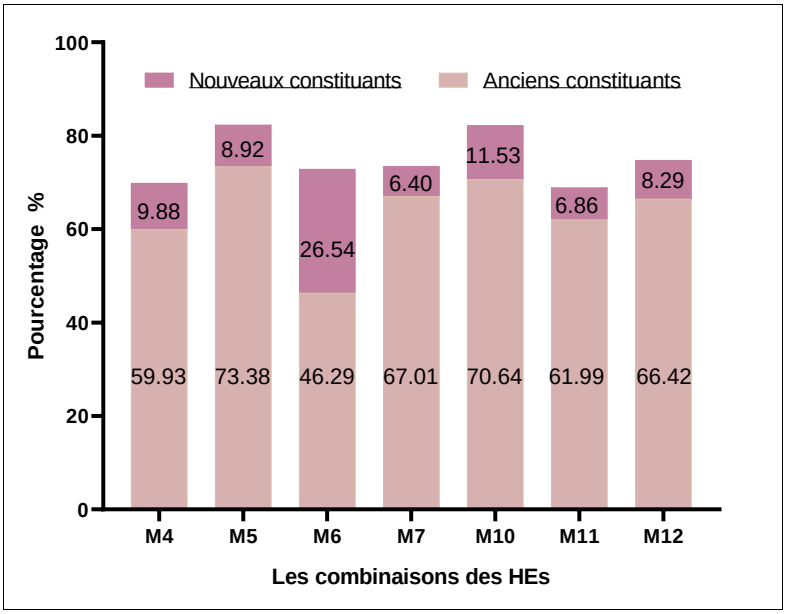


Figure 30. Variations de la composition chimique des HEs dans les différents mélanges

Le tableau 9 montre également que, dans toutes les combinaisons réalisées, de nouveaux constituants sont apparus. Le monoterpène, α-pinène, est apparu dans tous les mélanges, avec une majeure proportion dans les mélanges M4 (30,68%), M6 (27,57%), M7 (26,59%), et M11 (33,25%), alors qu'il est présent en deuxième position en termes de quantité dans les mélanges M5 (17,70%), M10 (17,81%), et M12 (22,34%). En outre, les combinaisons sont également caractérisées par la présence de quantités élevées des monoterpènes cétones tels que le camphre et la fenchone, et aussi du camphène notamment les combinaisons qui contiennent l'HE de *L. stoechas* car ces constituants représentent les éléments chimiques les plus identifiés dans le profil chimique individuel de cette huile. Cependant, le fenchone est présent dans le mélange 6 qui contient les deux HEs de romarin et la menthe, alors que ce composé n'est pas détecté dans le profil chimique de ces huiles. On constate l'apparition d'un nouveau constituant, 2-pinen-4-one, qui est identifié dans le

mélange M10 (3,41 %). De plus, on a remarqué l'identification de la forme isomère, (+)-camphène, dans le mélange M10 (1,42%) et M 12 (1,95%). De même, le monoterpenoide bicyclique, myrtenyl formate, est détecté dans le mélange M11 avec un pourcentage de 1,17%. Il apparaît également que le verbenone est identifié dans la plupart des mélanges (entre 1 et 9%) alors qu'il est observé à faible teneur dans l'huile de lavande stoechade séparément analysée (1,08%). Le composé, o-cymène, est nouvellement identifié en tant que composé mineur dans la plupart des mélanges alors que son isomère p-cymène a été observé dans l'HE de la lavande. Le composé, 3-carène, est apparu dans le mélange 5 (2,20%) mais il est absent dans les deux HEs de la lavande et la menthe, et seule la forme d-2-carène était présente dans l'huile de la menthe qui constitue la moitié de ce mélange. Le composé, isoterpinène, est aussi apparu dans le mélange 1 (0,46%). Le linalool est aussi identifié dans le mélange de *R. officinalis* et *M. pulegium* tandis qu'il n'est pas détecté dans ces huiles individuelles. On note aussi l'apparition de l'endo-bornéole dans tous les mélanges avec des quantités bien moins importantes entre 2 et 3%. Le terpinen-4-ol et l'acétate de bornyle sont aussi détectés dans le mélange 6 qui contient l'HE de romarin et la menthe alors qu'ils ne sont pas observés dans la composition chimique de ces huiles individuelles. Le constituants, 2-pentanone, qui est absent dans le profil chimique des trois HEs est identifié dans le mélange 10. Le sesquiterpène hydrocarbure, α-Humulene qui n'est pas identifié ni dans l'HE de la lavande, ni de celle du romarin, ni de l'huile de la menthe est détecté dans le mélange 4 et 6. Le mélange 4 contient aussi β-bisabolène qui n'est pas identifié dans la composition des huiles de la lavande ou le romarin. Le sesquiterpene, cis- calamenène est aussi nouvellement identifié dans les combinaisons 4 et 5, alors que sa forme isomère tans- calamenène est détectée en trace dans l'HE de la lavande qui est présente dans ces deux mélanges. Les sesquiterpenoides, Selina-3,7(11)-diene et Di-epi-1,10-cubenol sont aussi apparus dans tous les mélanges. Ce dernier composé est présent seulement dans l'HE individuelle de la lavande. Eudesma-3,7(11)-diene est aussi nouvellement identifié dans le mélange 10. Il convient de noter que le pulégone et carvone qui sont les constituants exclusifs de la menthe ne sont pas identifiés dans les mélanges qui contiennent cette HE.

Cette variation observée au niveau de la composition chimique des mélanges préparés par les HEs de la lavande, du romarin, de la menthe par rapport aux profils orignaux résulte de l'apparition de certains composés monoterpéniques ou sesquiterpéniques, majeurs ou mineurs avec une différence qualitative et quantitative tels que 2-pinen-4-one ; 3-carène ; (+)-camphène, o-cymène, myrtenyl formate, endo-bornéol, isoterpinene, cis-calamenène...etc. En

outre, d'autres composés présents à forte teneur dans les profils des HEs individuelles ont disparu dans les mélanges, par exemple pulégone, carvone, dihydrocarvone, et bornéol. De plus, les pourcentages des constituants détectés dans chaque HE individuelle, en particulier les majoritaires, sont totalement différents dans la plupart des combinaisons effectuées comme c'est le cas de la fenchone, 1,8-cinéole qui sont présents en quantités moins importantes dans les mélanges des HEs.

D'après nos connaissances, aucune étude n'a été rapportée en révélant la composition chimique du mélange de ces trois plantes, toutefois, d'autres études ont prouvé la modification du profil chimique des combinaisons binaires ou même ternaires des HEs. En accord avec nos résultats, Boukraa et al. (2022) ont montré la variation de la composition chimique des HEs d'*Artemisia herba alba*, de *Juniperus phoenicea* et de *Rormarinus officinalis*, ils ont identifié de nouveaux constituants majeurs et mineurs qui n'étaient pas présents dans les profils individuels, et ont remarqué la disparition d'autres composés. De même, Mahanta et Khanikor (2021) ont également détecté la différence dans la composition chimique du mélange d'HE d'*Allium sativum* et de *Citrus paradisi*. De plus, Muturi et al. (2017) ont révélé l'identification de nouveaux constituants et la disparition d'autres dans les combinaisons binaires et ternaires des HEs de *Syzygium aromaticum, Leptospermum scoparium* et *Origanum vulgare.* Wangrawa et al. (2022) ont aussi démontré que la pipéritone (33,42 %) et le 2-carène (14,17 %) ont été identifiés comme de nouveaux constituants majeurs dans le mélange de l'HE de *Lantana camara* et celle de *Cymbopogon schoenanthus*. Ces changements pourraient être liés à une nouvelle distribution basée sur la solubilité et les nouveaux composants qui peuvent être générer pendant le mélange (Wangrawa et al., 2022). En effet, plusieurs réactions chimiques peuvent avoir lieu dans les mélanges comme des réactions d'isomérisation intramoléculaire catalysées par la photochimie, notamment les conversions trans/cis ou la cyclo- addition de divers monoterpenoids (Pfau, 1972). La réaction d'isomérisation est probablement la réaction qui s'est produite dans les mélanges qui se caractérisent par l'apparition de nouveaux composés isomères. De plus, les HEs sont connus par leur non-stabilité vis-à-vis des facteurs externes tels que la température, les rayons UV, la lumière, donc elles peuvent subir par exemple des dégradations thermiques ou oxydatives face à ces conditions physico-chimiques (Misharina and Polshkov, 2005 ; Turek and Stintzing, 2013).

I.2 Mortalités enregistrées par les mélanges ternaires

Les pourcentages de mortalité calculés après 24 et 48h d'application de toutes les combinaisons réalisées à partir des trois HEs sur les adultes de *C. pipiens* sont regroupés dans le Tableau 10. On constate que des mortalitéss importantes, supérieures à 50%, sont enregistrées après 48h de l'application de différentes proportions des HEs, avec la mortalité la plus élevée qui est enregistrée pour le mélange binaire 50%-50% de l'HE de *L. stoechas* et *R. officinalis* (86,96±1,78). Les autres mélanges 50%-50% de *L. steochas* et *M. pulegium* ainsi que de *R. officinalis* et *M. pulegium* ont causé, respectivement, 67,91±0,18 et 70,17±1,12% de mortalité. Le mélange constitué de 33% de chaque HE a montré une mortalité d'environ 73%, alors les combinaisons contenant différentes proportions de trois HEs ont montré des mortalités entre 74 et 77%. L'insecticide chimique, déltamethrine (0,05%) a montré des mortalités de 20,29±1,21% et 35,05±1,20%, respectivement, après 24h et 48h.

Tableau 10. Mortalités enregistrées après application des mélanges des trois HEs

Ordre de l'expérience	*L. steochas* (LC_{50})	*R. officinalis* (LC_{50})	*M. pulegium* (LC_{50})	Mortalité ± SD	
				24h	48h
2	0	1	0	48,35±2,31b	82,72±1,33b
10	0,666667	0,166667	0,166667	35,33 ± 1,2c	77,45±0,57c
7	0,333333	0,333333	0,333333	30,56±1,19d	73,67±1,20cd
3	0	0	1	51,89±0,56a	85,45±1,23a
4	0,5	0,5	0	26,82±1,45d	86,96±1,78a
11	0,166667	0,666667	0,166667	22,35±1,10e	75,43±1,15c
5	0,5	0	0,5	49,12±1,09a	67,91±0,18e
6	0	0,5	0,5	23,56±1,22e	70,17±1,12d
12	0,166667	0,166667	0,666667	32,33±0,78d	74,43±0,89cd
1	1	0	0	49,71±1,67a	80,71±1,16b
8	0,333333	0,333333	0,333333	29,65±2,3d	72,43±0,68d
9	0,333333	0,333333	0,333333	31,45±0,8d	73,68±1,10cd
Déltamethrine (0,05%) ; 24h : 20,29±1,21% **; 48h** : 35,05±1,20%					

I.3 Traitement de la conception du mélange

I.3.1 Validation statistique du modèle choisi

D'après les résultats de l'analyse de la variance (Tableau 11), nous pouvons remarquer qu'il existe un effet principal significatif de la régression quel que soit la durée de l'exposition, car les probabilités de la valeur p-value de signification du risque sont inférieures à 0,05 au niveau de confiance de 95 % (P= 0,0022 après 24h ; P=0,0018 après 48h). Les coefficients de détermination (R^2) sont déterminés à 96%, ce qui indique la bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites du modèle.

La figure 31 confirme ces résultats puisque les courbes des valeurs observées en fonction des valeurs réelles présentent parfaitement une forme linéaire.

Tableau 11. Analyse de la variance (ANOVA Two-way) pour le modèle adopté.

Source d'ANOVA	Temps (h)	SC	ddl	MC	F-value	P-value	
Régression	24	1221,18	6	203,53	20,56	0,0022	Significatif
	48	436,93	6	72,82	22,78	0,0018	Significatif
Résidus	24	49,49	5	9,90			
	48	15,98	5	3,20			
Total	24	1270,67	11				
	48	452,92	11				
R^2	24	0,96					
	48	0,96					

SC : Somme des carrées ; **MC :** Carré moyen; **ddl :** Degré de liberté ; **F** : Test de Fisher

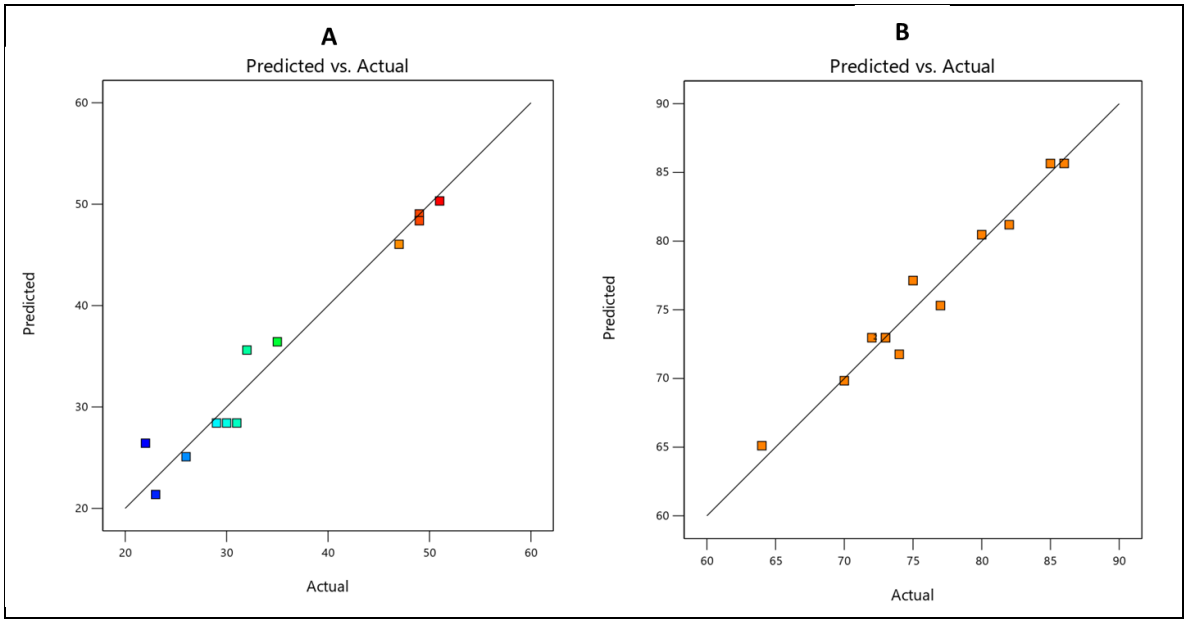


Figure 31. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles après 24h et 48h de traitement

I.3.2 Coefficients des mélanges ternaires

Les effets des combinaisons ternaires ainsi que les valeurs statistiques sont présentés dans le tableau 12. L'estimation du coefficient représente la variation attendue de la réponse par unité de variation de la valeur du facteur lorsque tous les autres facteurs sont maintenus constants. L'ordonnée à l'origine dans un plan orthogonal est la réponse moyenne globale de toutes les séries. Les coefficients sont des ajustements autour de cette moyenne en fonction des paramètres des facteurs. Des VIF (Variance Inflation Factor) supérieurs à 1 indiquent une

multicolinéarité ; plus le VIF est élevé, plus la corrélation des facteurs est importante. Dans notre cas, tous les VIF sont supérieurs à 1 ce qui indique la forte relation de dépendance linéaire entre les variables étudiées, et donc une forte corrélation.

Tableau 12. Coefficients de régression estimés pour le modèle de régression cubique incomplet

	Temps (h)	**Coefficient**	**Estimation± SE**	**VIF**
L. Stoechas	24	b1	49,05±3,04	2,18
	48	b1	80,46±1,73	2,18
R. officinalis	24	b2	46,05±3,04	2,18
	48	b2	81,19±1,73	2,18
M. pulegium	24	b12	50,32±3,04	2,18
	48	b12	85,65±1,73	2,18
L. Stoechas+ R. officinalis	24	b1	-89,80±15,30	2,96
	48	b1	19,31±8,70	2,96
L. Stoechas+ M. pulegium	24	b2	-5,26±15,30	2,96
	48	b2	-71,78±8,70	2,96
R. officinalis+ M. pulegium	24	b12	-107,26±15,30	2,96
	48	b12	-54,33±8,70	2,96
L. stoechas +R. officinalis+ M. pulegium	24	b123	65,52±83,22	3,60
	48	b123	64,80 ±47,30	3,60

I.3.3 Optimisation de la formulation (Réponse= Mortalité)

Cette partie répond à l'objectif de la maximisation de la réponse (la mortalité des moustiques). Les deux figures (32 et 33) montrent clairement les proportions qui conduisent à une mortalité optimale. On constate que les proportions 100% de *L. stoechas*, et 100% de *M. pulegium* et le mélange 50%-50% de *L. stoechas* et *M. pulegium* sont les plus suggérés pour obtenir une mortalité optimale après 24h. Alors que les mélanges 50%-50% de *L. stoechas* et *R. officinalis* et la proportion de 100% de *M. pulegium* peuvent maximiser la réponse après 48h. Le fait que les trois possibilités déterminées par le modèle pour une mortalité optimale après 24h de traitement sont celles de *L.* stoechas seule, ou *M. pulegium* seule ou la combinaison de 50% pour chacune peut s'expliquer par leur richesse en monoterpenoids cétones (fenchone, camphre, pulégone, carvone) qui sont dotés d'un potentiel insecticide important par rapport aux autres classes chimiques, et cela est bien prouvé par le test insecticide individuel de ces composés (Chapitre III, partie des molécules pures).

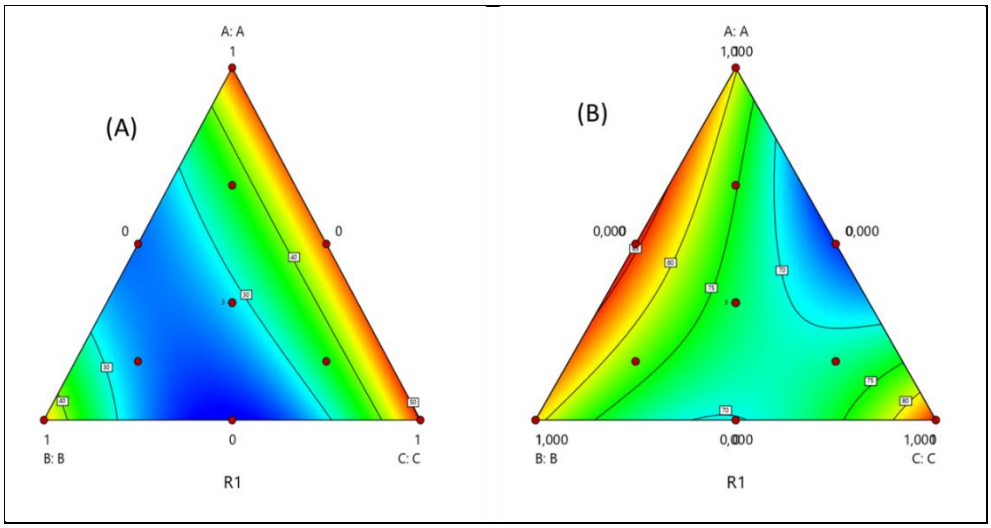


Figure 32. Profile de mélange 2D montrant la zone de l'optimisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) en fonction des trois HEs (A : *L. stoechas*, B : *R. officinalis* ; C : *M. pulegium*)

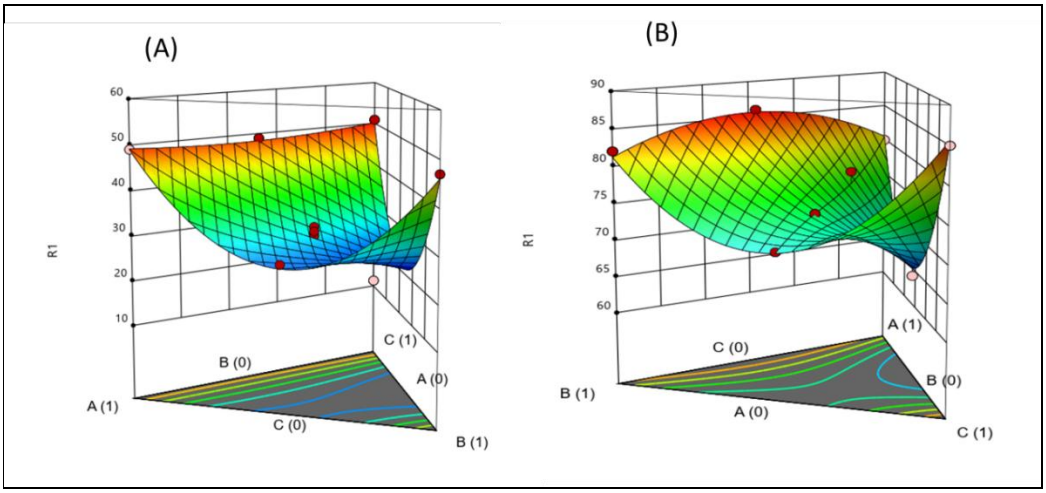


Figure 33. Représentation 3D montrant la zone de maximisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) de l'application du mélange des trois HEs (A : *L. stoechas*, B : *R. officinalis* ; C : *M. pulegium*)

L'effet insecticide des combinaisons peut être attribué aux nouveaux composés produits lors du mélange des HEs. En prenant par exemple le mélange 4 (50% de *L. stoechas* + 50% de *R. officinalis*) qui a donné la mortalité la plus élevée (86,96%) après 48h, on remarque l'apparition de divers constituants tels l'endo-bornéol, l'o-cymène, et autres avec une majeure contribution du camphre (19,21%) qui a montré un excellent effet insecticide quand il est testé séparément. De même pour les mélanges ternaires 10, 11 et 12, contenant différentes proportions des trois HEs, qui ont exercé des mortalités de 77,45%, 75,43% et 74,43%, respectivement. Cela peut être expliqué par l'apparition de certains éléments comme (+)-camphène, endo-bornéol, 2-pinen-4-one, myrtenyl formate, selina-3,7(11)-diene, o-cymène, eudesma-3,7(11)-diene et autres. En effet, il a été démontré que les composés énantiomères possèdent un potentiel insecticide envers *C. pipiens* lorsqu'ils ont été testés seuls (Michaelakis et al., 2009a). Il a été également prouvé que les composants des HEs,

notamment les terpènes, sont connus pour se convertir facilement et fréquemment les uns aux autres en raison de leur relation structurale au sein du même groupe chimique, ce qui génère de nouveaux composés par cyclization, oxydation, déshydrogénation ou isomérisation (Turek and Stintzing, 2013). Cela peut s'expliquer par le fait que les processus de réaction au sein des mélanges, comme dans le cas des HEs, ont été décrits comme se développant différemment des substances individuelles. Ainsi, les réactions qui se produisent dans chaque molécule peuvent influencer le comportement d'autres molécules, comme les effets pro ou antioxydants (Guenther, 1948 ; Gracza et Ruff, 1981 ; Gopalakrishnan, 1994).

Peu de recherches ont été réalisées dans le contexte de l'évaluation de l'effet insecticide du mélange ternaire des HEs, et d'après nos connaissances aucun travail n'a été effectué par la méthodologie des plans d'expériences, plan de mélange, pour évaluer l'effet insecticide de différentes HEs en combinaison ternaire sur les adultes femelles de *C. pipiens*. Par ailleurs, l'étude menée par Traboulsi et al. (2002) a montré l'effet insecticide contre *Culex pipiens molestus* de plusieurs combinaisons binaires parmi lesquelles des combinaisons contenant l'HE de *L. stoechas* et une autre espèce de la menthe, *M. microphilla ;* un taux de mortalité a été enregistré à 83, 8% quand ces deux HEs étaient mélangées à des valeurs de CL_{50} de l'ordre de 89 et 39mg/ L, respectivement, pour la lavande et la menthe. Une autre étude a aussi révélé un effet de synergie notable pour le ménage binaire l'HE de *Cinnamomum camphora* et *Cinnamomum pedunculatum* sur les adultes de *C. pipiens quinquefasciatus* (Yu Kai et al., 2014). L'effet du mélange a été aussi étudié à l'égard d'autres espèces de moustiques culicidés par Wangrawa et al., (2022) qui ont montré des effets de synergie pour les combinaisons des HEs de *Lippia chevalieri* et *Lantana camara*, pour *Lippia chevalieri* et *Cymbopogon schoenanthus*, ainsi que pour *Lippia multiflora* et *Lippia chevalieri* contre *Culex quinquefasciatus* alors que le mélange de *Cymbopogon schoenanthus et Lippia multiflora* a montré une synergie contre *Anopheles funestus*. De même, Benelli et al. (2017a,b) ont également rapporté l'effet des combinaisons binaires des HEs de différentes familles (*Trachyspermum ammi, Smyrnium olusatrum, Pimpinella anisum* et *Helosciadium nodiflorum, Pinus nigra, Hyssopus officinalis, Satureja montana, Aloysia citrodora et Pelargonium graveolens*) sur le moustique de la filariose, *Culex quinquefasciatus*. Récemment, Mahanta et al. (2021) ont mis en évidence l'effet insecticide, contre ce moustique, de plusieurs combinaisons binaires, dont le mélange binaire d'une espèce de la menthe, *M. piperita* et une espèce de citrus, *C. paradisi* a montré une synergie à toutes les proportions de CL_{10} testées (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, et 3:1 par volume). L'HE de *R. officinalis* a été

testée en mélange binaire, ternaire, et quaternaire avec les HEs de citronnelle (*Cymbopogon nardus*), de la menthe (*Mentha arvensis*), et de la girofle (*Eugenia caryophyllata*) contre les adultes femelles du moustique vecteur de la dengue, *Aedes aegypti* (Alavez-Rosas et al., 2022), ainsi qu'en mélange ternaire avec l'HE d'*Artemisia herba alba* Asso et *Juniperus phoenicea* pour l'activité adulticide et répulsive contre l'insecte *Tribolium castaneum* (Boukraa et al., 2022). Cette HE était aussi sujet d'étude pour évaluer l'activité adulticide contre le moustique de *C. pipiens* dans un mélange binaire avec l'HE d'*Eucalyptus globulus* (Zibaee and Khorram, 2016). L'HE de *M. pulegium* a été également testée pour l'activité insecticide en combinaison avec *Mentha piperita L*. contre l'insecte *Aphis gossypii Glover* (Ebadollahi et al., 2017).

D'autres études ont également évalué l'effet des combinaisons binaires des HEs de *Callistemon rigidus* et *Eucalyptus camaldulensis* contre *Anopheles gambiae* (Younoussa et al., 2020), des mélanges des HEs de *Thymus vulgaris, Salvia officinalis, Lippia origanoides, Eucalyptus globulus, Cymbopogon nardus, Cymbopogon martinii, Lippia alba, Pelargonium graveolens, Turnera diffusa,* et *Swinglea glutinosa* contre *Aedes aegypti (Stegomyia*) (Ríos et al., 2017).

II. Mélanges binaires des molécules bioactives

II.1 Effet insecticide des mélanges binaires

Le tableau 13 présente les résultats obtenus pour les mélanges binaires 1,8-cinéole+α-pinène ainsi que carvone + R (+)-pulégone. On constate que tous les monoterpènes sélectionnés présentent une efficacité insecticide contre les adultes de *C. pipiens* pour toutes les combinaisons testées. Pour la combinaison binaire 1,8-cinéole+α-pinène, les résultats ont révélé que les expériences 1, 3, 4 et 5 se sont avérées plus efficaces que les autres tests après 24 heures, alors que les mortalités étaient d'environ 50 %. En revanche, les expériences 2, 3 et 4 ont donné des mortalités élevées après 48h avec des valeurs comprises entre 90,00±0,70% et 100,00±0,70%. Pour le mélange de Carvone et de R (+)-pulégone, il semble que les deux composés agissent ensemble, surtout si l'on considère l'expérience 7 (0,5/0,5), car les mortalités ont augmenté et ont été enregistrées à 54, 35 ± 0,75% après 24h et 89,96 ± 0,14% après 48h. Toutefois, l'insecticide de synthèse a montré une faible mortalité (19,29±0,01% après 24h et 34,05± 1,01% après 48h) en comparaison avec les deux mélanges de monoterpènes.

Tableau 13. Efficacité insecticide des deux mélanges contre les femelles adultes de *C. pipiens*

Mélange (A+B) (CL_{50}+CL_{50})		Mortalité % ± SE [a]			
		1,8-cineole + α-pinene		Carvone + R (+)-pulegone	
		(24h)	(48h)	(24h)	(48h)
0	1	50,01± 1,18	84,45±0,11	50,87± 0,81	80,45 ±0,10
0,75	0,25	31,57±0,18	91,22±0,11	35,08± 0,60	71,92± 0,70
0,25	0,75	51,00±0,86	100,00±0,00	40,59± 0,41	64,91±0,75
0,33	0,67	50,00±0,84	90,00 ±0,70	48,00± 0,63	76,54± 0,67
1	0	49,12±1,01	80,69±0,10	51,63± 0,85	84,21± 0,11
0,67	0,33	33,00±0,16	83,00±0,10	44,00± 0,71	82,00± 0,10
0,5	0,5	38,59± 0,47	75,43± 0,51	54,35±0,75	89,96±0,14
Deltaméthrine (0,05%) 24h : 19,29±0,01% ; 48h : 34,05±1,01%					

a : Les taux de mortalité sont présentés sous forme de moyennes ± SE (n = 3).

II.2 Traitement de la conception du mélange

II.2.1 Validation statistique du modèle sélectionné

L'analyse de la variance (tableau 14) a montré qu'il existe un effet principal significatif de la régression pour tous les mélanges sélectionnés quel que soit le temps d'exposition puisque les probabilités de la signification à P-value sont inférieures à 0,05 au niveau de confiance de 95%. Pour les deux mélanges, les coefficients de détermination sont égaux à 99% ; cette valeur montre un bon ajustement du modèle ce qui signifie une bonne concordance entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites du modèle adopté. La figure 34 confirme ces résultats puisque les courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles présentent une forme linéaire.

Tableau 14. Analyse de la variance du modèle adopté pour tous les mélanges sélectionnés

Source	Mixture	Temps (h)	SC	DF	MC	F-value	P-value
Régression	M1	24	444,65	3	148,22	103,76	0,001
		48	389,04	4	97,26	466,30	0,002
	M2	24	281,09	4	70,27	1062,82	0,000
		48	411,49	4	102,87	703,49	0,001
Résidus	M1	24	4,29	3	1,43		
		48	0,417	2	0,20		
	M2	24	0,1322	2	0,0661		
		48	0,2925	2	0,1462		
Total	M1	24	468,94	6			
		48	389,46	6			
	M2	24	281,22	6			
		48	411,78	6			
R^2	M1	24	0,99				
		48	0,99				
	M2	24	0,99				
		48	0,99				

M1 : Mélange 1 (1,8-cinéole+ α-pinène) ; M2 : Mélange 2 (carvone+ R (+)-pulegone) ; SC, somme des carrés ; ddl, degrés de liberté ; MC : Carré moyen; R^2 : coefficient de détermination.

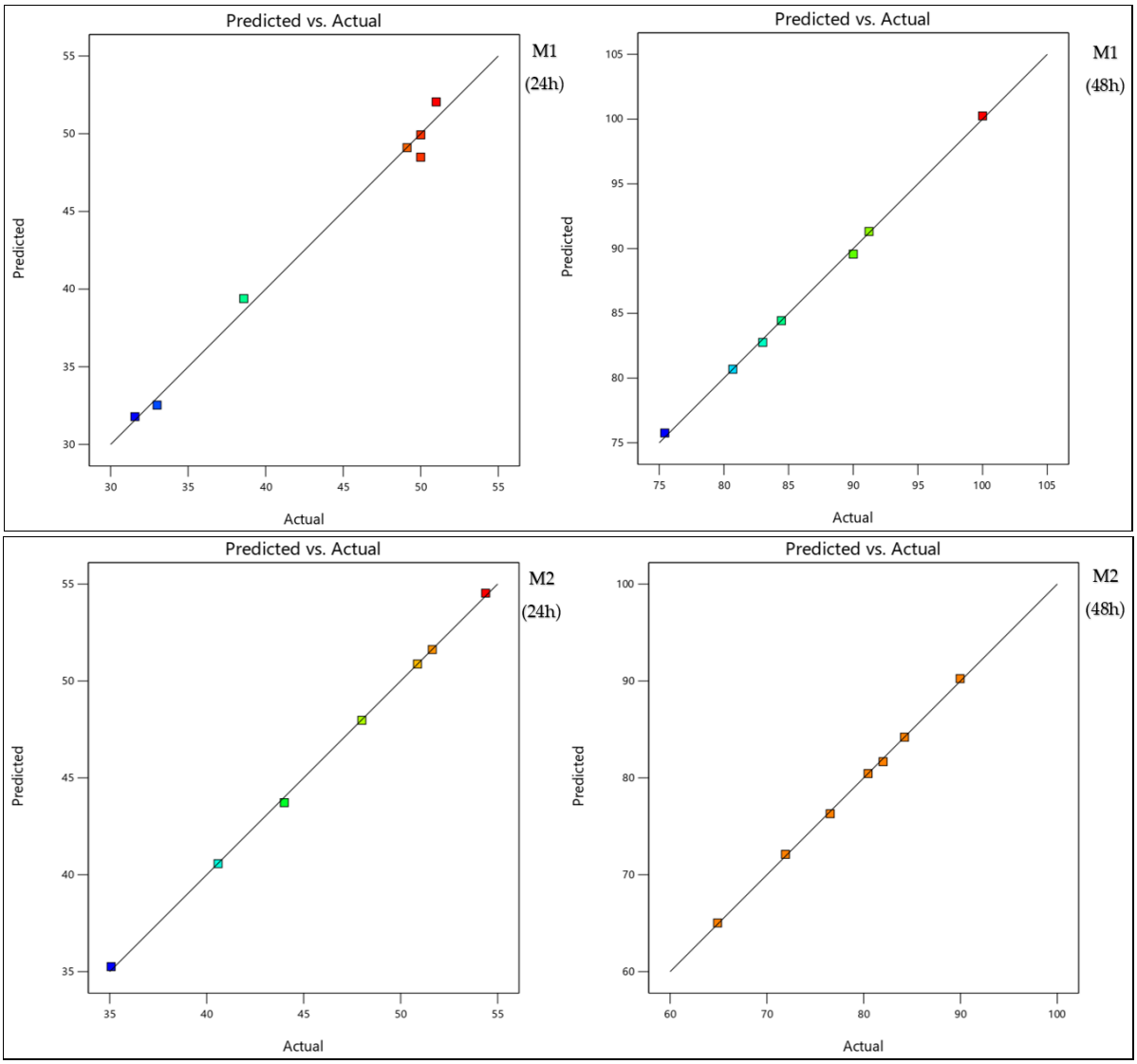


Figure 34. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles pour les deux mélanges binaires. M1 : 1,8-cinéole+ α-pinène ; M2 : carvone+ R (+)-pulegone

II.2.2 Coefficients des mélanges binaires

Les effets des deux combinaisons binaires (1,8-cinéole+ α-pinène ; carvone+ R (+)-pulégone) ainsi que les valeurs statistiques du t-student et la probabilité observée (p-value) sont représentés dans le tableau 15. Il semble que tous les coefficients du modèle soient statistiquement significatifs puisque leur valeur p est inférieure à 5 %. Par conséquent, tous ces coefficients doivent être conservés dans le modèle proposé.

Tableau 15. Coefficients de régression estimés pour le modèle choisi

	Time (h)	Coefficient	Estimation± SE	t-student	p-value
1,8-cinéole	24	b1	49,10±1,20	41,42	<0,001*
	48	b1	80,69±0,45	42,59	<0,001*
α-pinène	24	b2	49,93±1,20	42,11	<0,001*
	48	b2	84,44± 0,45	40,94	<0,001*
1,8-cinéole + α-pinene	24	b12	-40,51± 4,58	-18,85	0,0030*
	48	b12	-27,22± 2,01	-13,53	0,0050*
Carvone	24	b1	51,62±0,26	-59,07	<0,001*
	48	b1	84,20±0,38	-49,53	<0,001*
R (+)-pulégone	24	b2	50,87±0,26	48,11	<0,001*
	48	b2	80,45±0,38	52,53	<0,001*
Carvone + R (+)-pulégone	24	b12	13,14±1,13	11,60	0,0070*
	48	b12	31,67±1,68	18,80	0,0030*

*: Statistically significant at P-value <0.05.

Un plan de simplex lattice a été adopté pour prédire la modélisation de la mortalité en fonction des variables présentées par les équations suivantes :

-Pour le mélange 1 à 24 heures :

$Y1 = 49,10\ X1 + 49,93\ X2 – 40,51\ X1X2 + \varepsilon$ (4)

-Pour le mélange 1 à 48 heures :

$Y2 = 80,69\ X1 + 84,44\ X2 - 27,22\ X1X2 + \varepsilon$ (5)

-Pour le mélange 2 à 24h :

$Y3 = 51,62\ X1 + 50,87\ X2 + 13,14\ X1X2 + \varepsilon$ (6)

-Pour le mélange 1 à 48 heures :

$Y4 = 84,20\ X1 + 80,45\ X2 + 31,67\ X1X2 + \varepsilon$ (7)

II.2.3 Zones de réponses maximales (Isoresponses)

La figure 35 montre la variation des pourcentages de mortalité en fonction des proportions des composés sélectionnés. Le profil du mélange montre qu'une activité insecticide souhaitable (>50%) est possible lorsque la ligne (mortalité) augmente. Pour le mélange 1 (1,8 cinéole+α-pinène), le taux de mortalité maximal a été obtenu dans les intervalles 0/1 et 0,25/0,75 à 24 et 48h. En revanche, dans le cas du mélange 2 (Carvone + R(+)-pulegone), la mortalité optimale se situait entre 0,25/0,75 et 0,75/0,25 après 24h et 48h de traitement.

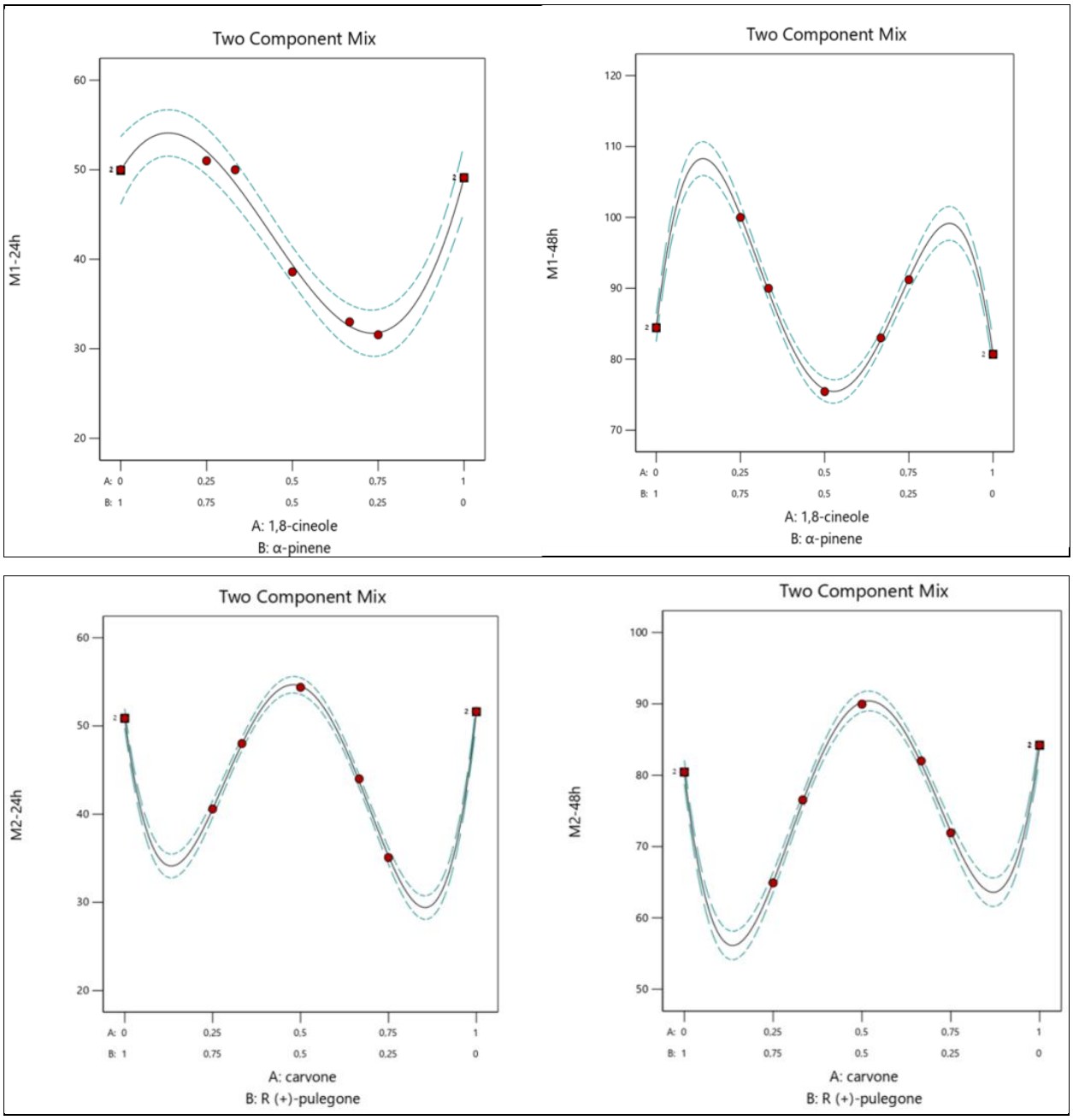


Figure 35. Graphique de combinaison binaire montrant la zone de maximisation de la réponse étudiée en fonction de la proportion des composés. M1 (1,8-cinéole+ α-pinène) ; M2 (carvone+ R(+)-pulégone)

II.2.4 Fonction de désirabilité (Mortalité optimale)

Afin d'atteindre la valeur maximale possible pour la réponse étudiée (Mortalité %), la fonction de désirabilité a été réalisée. Les figures 36 et 37 représentent le diagramme de désirabilité qui pourrait être atteint par le modèle validé pour la mortalité des deux mélanges à 24 h et 48 h. La figure 36 (a) montre que la valeur maximale du pourcentage de mortalité obtenue par le mélange M1 à 24 h est égale à 51,44 % lorsque les proportions de 1,8-cinéole et d'α-pinène sont égales à 0,27 et 0,73, respectivement. La figure 36 (b) montre que la mortalité atteint sa valeur maximale de 100,24% pour le mélange M1 à 48h lorsque les

proportions de 1,8-cinéole et d'α-pinène atteignent des valeurs de 0,25 et 0,75, respectivement. La figure 37 (a) indique que la mortalité atteint sa valeur maximale de 54,67% pour le mélange M2 à 24h lorsque les proportions de carvone et de R(+)-pulégone sont égales à 0,48 et 0,52, respectivement. La figure 37 (b) présente la valeur maximale du taux de mortalité trouvée pour le mélange M2 à 48 h et qui est égale à 89,99% lorsque les proportions de Carvone et de R(+)-pulégone atteignent des valeurs de 0,55 et 0,45, respectivement. D'après tous les résultats susmentionnés, on constate que le mélange de 1,8-cinéole et d'α-pinène était plus actif sur les moustiques femelles que le mélange de Carvone et de R(+)-pulégone.

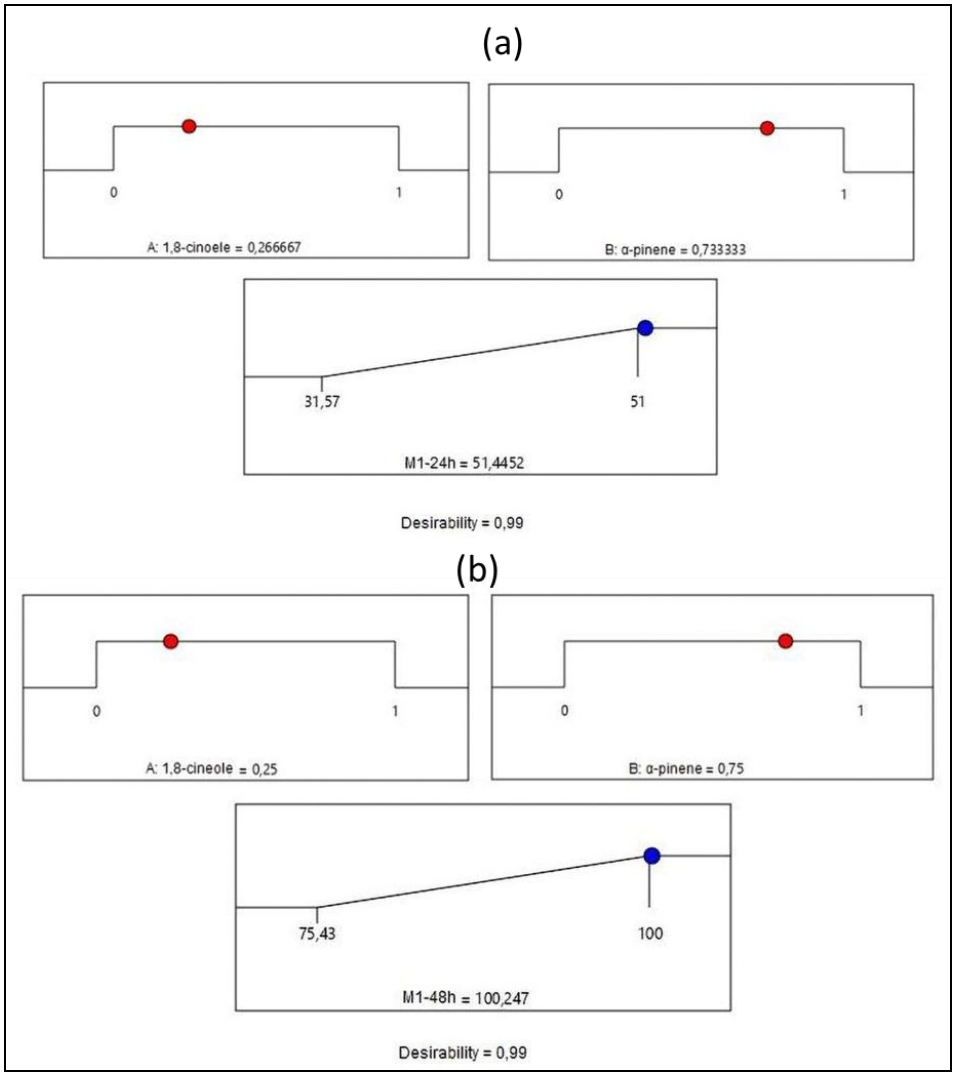


Figure 36. Profil de désirabilité des conditions optimales pour maximiser le taux de mortalité pour le mélange 1 (a) à 24h et (b) à 48h

.

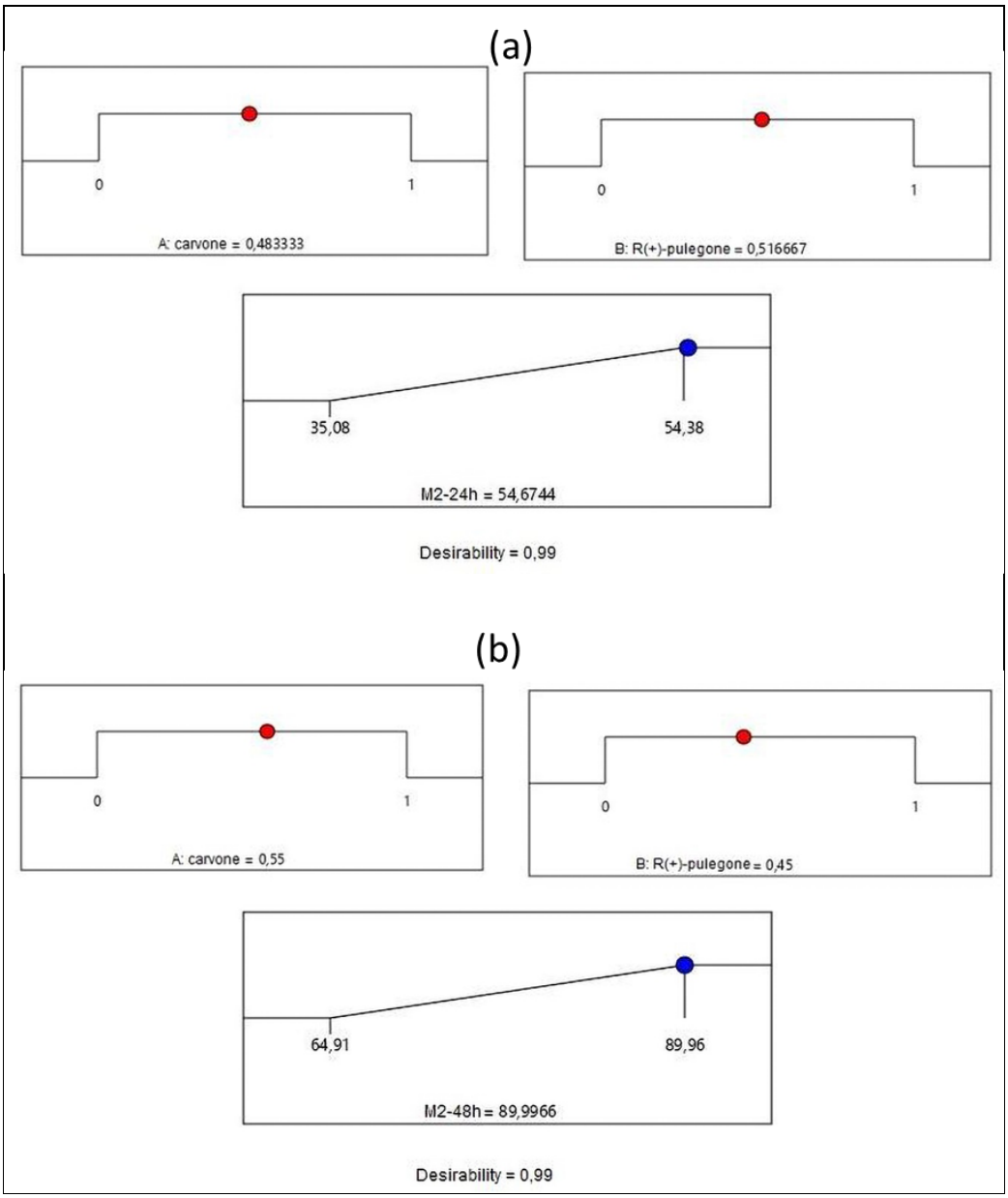


Figure 37. Profil de désirabilité des conditions optimales pour maximiser le taux de mortalité pour le mélange 2 (a) à 24h et (b) à 48h.

Dans cette étude, les deux mélanges binaires ont montré une efficacité remarquable contre les adultes de *C. pipiens*, l'effet exercé varie en fonction des proportions de chaque constituant. La combinaison 1,8-cinéole+ α-pinène s'est avérée plus efficace que le mélange carvone +R (+)-pulégone. En général, les deux mélanges binaires ont montré un potentiel insecticide significatif contre les adultes femelles de *C. pipiens*, supérieur à celui observé pour l'insecticide chimique. Les quatre monoterpènes évalués dans les mélanges binaires de notre étude sont les principaux constituants de nombreuses HEs telles que *R. officinalis*, *M. pulegium* et la lavande (El-Akhal et al., 2021 ; Ez zoubi et al., 2017 ; Bouyahya et al., 2017). Ils ont prouvé un effet insecticide important quand ils sont individuellement testés. D'ailleurs,

l’effet combiné des composés d'HEs issues des plantes sur les moustiques adultes femelles n'a pas été largement rapporté alors que les études contre les larves de moustiques et contre d'autres espèces d'insectes sont largement évoquées. En effet, Badawy et al. (2016) ont évalué l’activité insecticide des mélanges de monoterpènes en utilisant différentes classes chimiques, y compris celles appartenant aux composés cétones et alcools; et ont conclu que le mélange préparé avec du camphre, de la menthone, de la carvone et de la fenchone sur des disques de papier s’est avéré le plus efficace contre les adultes de *C. pipiens*. De plus, Yuan et al. (2019) ont étudié l’effet insecticide de 1,8-cinéole en combinaison binaire avec l’eugénol et le trans-cinnamaldehyde sur les adultes de *Culex quinquefasciatus* montrant des interactions synergétiques. Le 1,8-cinéole a été aussi évalué en combinaison binaire et ternaire avec le thymol et le carvacrol contre le ravageur *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), dont des interactions de synergie ont été enregistrées pour les mélanges contenant ce monoterpène éther après 24h et 48h de traitement (Lima et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec ceux de Ma et al. (2014) qui ont étudié l’effet du mélange de certains composés des HEs par des tests de fumigation contre les adultes de *C. pipiens pallens*. En effet, ils ont démontré que le mélange de carvacrol et de thymol avait présenté une forte activité avec un effet synergique et un facteur de co-toxicité de 83,1. Par ailleurs, d'autres monoterpènes comme thymol, carvacrol, linalool, cinnamate de méthyle ont également été évalués, en combinaison, contre les larves de *C. pipiens* et d'autres espèces de moustiques (Youssefi et al., 2019 ; Fujiwara et al., 2017). Certains de ces monoterpènes ont également été évalués dans un mélange contre d'autres espèces d'insectes (Masoumi et al., 2016 ; Coelho et al., 2019). En outre, Sarma et al. (2019) ont testé les effets synergiques et antagonistes de nombreux composés naturels contre les larves et les adultes du moustique de la famille des Culicidae, *Aedes aegypti*, où la combinaison de carvone et de limonène a montré la meilleure action adulticide présentant un effet synergique (X2=17,72). Contre d'autres genres d'insectes, Choi et al. (2006) ont révélé que la combinaison de α et β-pinène avait présenté une efficacité importante contre les adultes de la mouche du champignon par rapport les composés de pinène seuls. Tous ces rapports scientifiques ont prouvé l'effet insecticide des mélanges de molécules bioactives des HEs sur plusieurs insectes appartenant à différentes familles d'arthropodes. L'activité insecticide pourrait être attribuée à l'interaction entre les différents composants (Isman et al., 2011).

III. Mélange binaire de l'HE de *M. pulegium* et Déltamethrine

III.1 Effet insecticide des mélanges binaires testés

Le tableau 16 montre les taux de mortalité enregistrés après 24 et 48h de l'exposition des moustiques à la formulation insecticide en HE de la menthe et l'insecticide chimique suivant les différentes combinaisons binaires sélectionnées. L'efficacité insecticide varie en fonction des proportions binaires appliquées et le temps de l'exposition. Il semble que le mélange binaire qui contient 25% de l'HE de la menthe et 75% de la Deltaméthrine est le plus efficace sur les insectes adultes car des taux de mortalité sont enregistrés à 88, 33±1,89 et 100% après 24h et 48 de traitement, respectivement, suivi du mélange 4 (33% de l'HE+ 67% de l'insecticide) avec 85,15±1,16 et 96,66±1, 45% des moustiques morts. On constate que les mélanges qui contiennent des proportions élevées de l'insecticide exercent des mortalités importantes alors que ce produit de synthèse lorsqu'il est utilisé seul (100%) et à sa dose diagnostique (0,05%) n'a montré que 19,45± 1,25 et 35,67±1,30% après une durée 24 et 48h en contact avec les moustiques, respectivement.

Tableau 16. Efficacité insecticide des mélanges binaires de l'HE de la menthe et l'insecticide

Expérience	Mélange *M. pulegium* + Deltaméthrine		Mortalité % ± SE [a]	
			(24h)	(48h)
1	0	1	19,45± 1,25f	35,67±1,30e
2	0,75	0,25	71,66± 1,22d	86,66±0,46d
3	0,25	0,75	88,33±1,89a	100±0,0a
4	0,333333	0,666667	85,15±1,16a	96,66±1,45b
5	1	0	51,89±0,56e	85,45±1,23d
6	0,666667	0,333333	78,33± 0,67c	91,66±0,98c
7	0,5	0,5	75,33±0,97c	93,54±0,92c

[a]: Les taux de mortalité sont présentés sous forme des moyens ± Erreur Standard (n = 3).

III.2 Traitement de la conception du mélange binaire de l'HE et Déltamethrine

III.2.1 Validation statistique du modèle choisi

Les résultats de l'analyse de la variance (Tableau 17) ont montré un effet principal significatif de la régression après 24 et 48h de l'application de différentes proportions du mélange de l'HE et l'insecticide, avec des probabilités de la valeur p-value de signification du risque inférieures à 0,05 au niveau de confiance de 95 % (P= 0, 0006 après 24h ; P=0, 0005 après 48h). Les coefficients de détermination (R^2) sont enregistrés à 99%, ce qui indique la bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et prédites du modèle. Les figures 38 (A et

B) confirment cette corrélation puisque les courbes des valeurs observées en fonction des valeurs réelles présentent une forme parfaitement linéaire.

Tableau 17. Analyse de la variance (ANOVA Two-way) pour le modèle adopté

Source d'ANOVA	Temps (h)	SC	ddf	MC	F-value	P-value	
Factorielle	24	3731,39	4	932,85	1730,91	0,0006	significant
	48	3177,73	4	794,43	1964,45	0,0005	significant
Résiduelle	24	1,08	2	0,5389			
	48	0,8088	2	0,4044			
Total	24	3732,47	6				
	48	3178,54	6				
R^2	24	0,99					
	48	0,99					

SC : Somme des carrées ; MC : carré moyen ; ddl : Degré de liberté ; F : Test de Fisher.

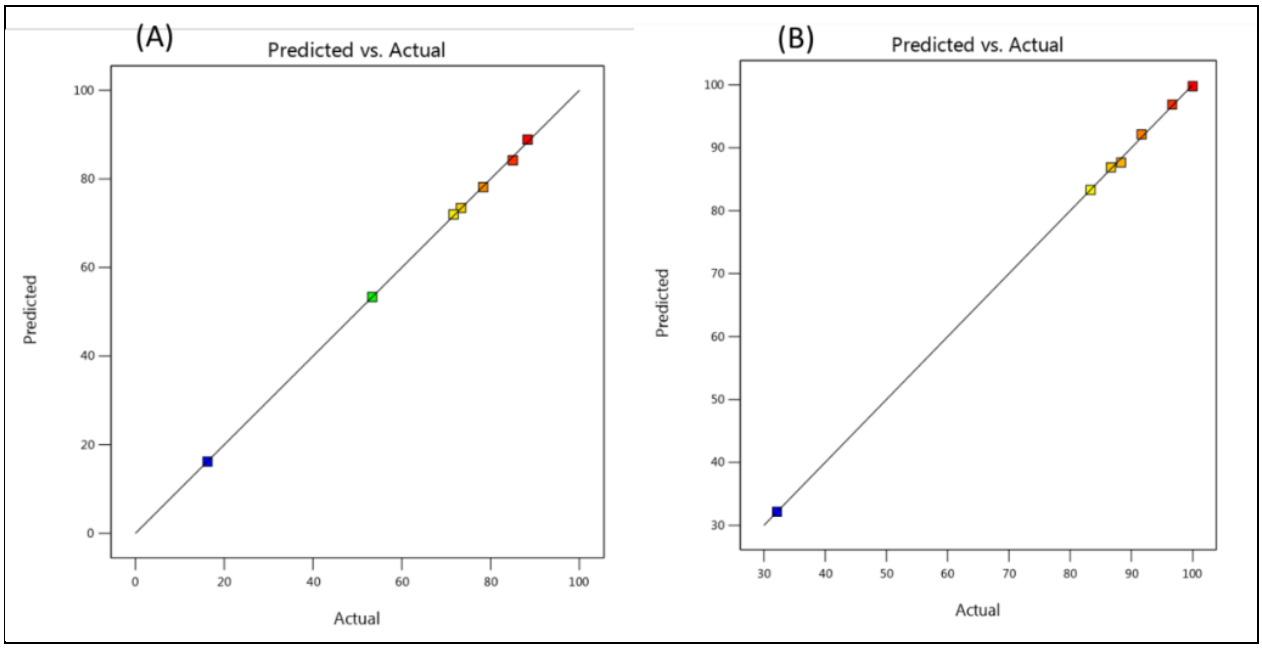


Figure 38. Courbes des valeurs prédites en fonction des valeurs réelles après 24h (A) et 48h (B) de traitement

III.2.2 Coefficients des mélanges binaires

Le Tableau 18 indique les effets des combinaisons binaires ainsi que les valeurs de la probabilité observée (p-value). Il semble que tous les coefficients du modèle sont statistiquement significatifs car leurs valeurs de p-value sont largement inférieures à 5%. Alors, tous les coefficients doivent être gardé dans le modèle proposé.

Tableau 18. Coefficients de régression estimés par le modèle choisi

	Time (h)	Coefficient	Estimation± SE	p-value
M. pulegium	24	b1	53,35±0,73	<0,001**
	48	b1	83,30±0,63	<0,001**
Deltaméthrine	24	b2	16,19±0,73	<,0001***
	48	b2	32,16±0,63	<0,001**
HE + Deltaméthrine	24	b12	148,89± 3,23	0,0030*
	48	b12	116,64±2,80	0,0050*

III.2.3 Zones de réponses maximales (Isoresponses)

La figure 39 montre les zones de maximisation de la mortalité en fonction de la proportion de chaque constituant. Le profil du mélange montre qu'une activité insecticide souhaitable (>50%) est possible lorsque la ligne (mortalité) augmente. On remarque que les zones de maximisation de la mortalité après 24 et même après 48h sont situées dans l'intervalle de 0, 25/0, 75 du mélange binaire de l'HE de la menthe et de la deltaméthrine (0,05%).

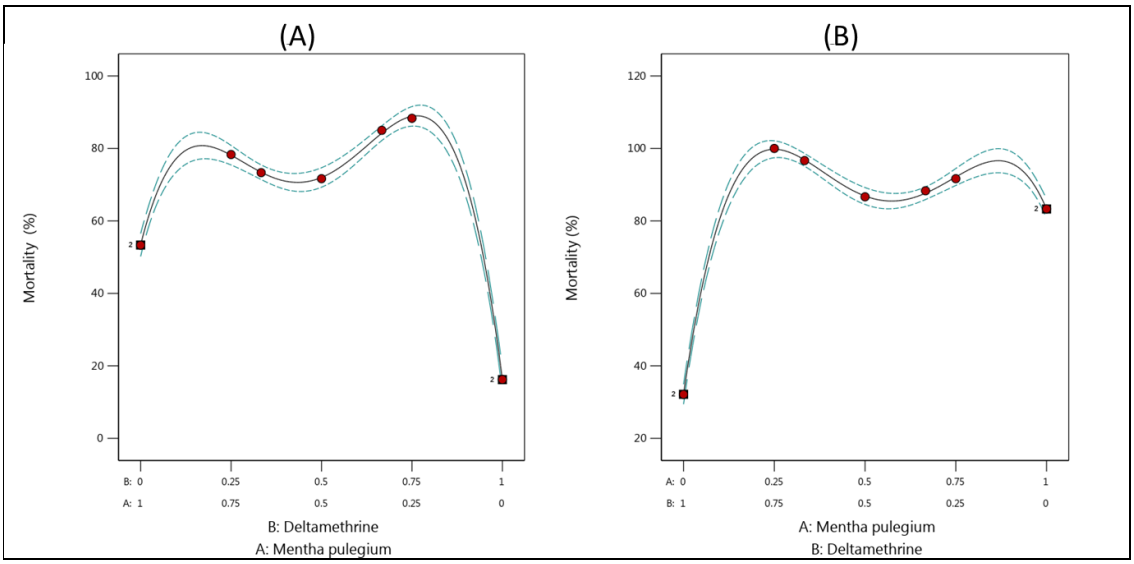


Figure 39. Graphique de combinaison binaire montrant la zone de maximisation de la mortalité après 24h (A) et 48h (B) en fonction de la proportion de l'HE et l'insecticide

Nos résultats montrent que l'effet insecticide du mélange binaire de l'HE et deltaméthrine est plus important que l'effet individuel de ces deux substances à toutes les combinaisons effectuées avec des mortalités atteignant 90-100%. Cela prouve le potentiel insecticide de l'HE de la menthe qui a renforcé l'activité insecticide de Deltamethrine quand ils sont mélangés sachant que l'insecticide a montré des mortalités inférieurs à 50 lorsqu'il est utilisé seul. Aucune étude n'a été rapportée dans ce contexte en évaluant l'effet insecticide des

mélanges de l'HE et l'insecticide chimique par le plan de mélange sur les adultes femelles de moustique, *C. pipiens*. En outre, la recherche menée par Yuan et al. (2019) a mis en évidence l'efficacité d'un mélange ternaire entre des composés purs 1,8-cinéole et trans-cinnamaldéhyde plus l'insecticide chimique, dimefluthrine (0, 02%), contre des populations adultes, de terrain, de *Culex quinquefasciatus* en utilisant une méthode de la maison simulée, et elle a révélé l'effet synergique après application du mélange de trois constituants. Contre ce moustique, Mahanta et al. (2021) ont montré l'efficacité insecticide de plusieurs combinaisons binaires des HEs avec l'insecticide chimique, Malathion. Dans une autre étude, deltaméthrine a été ainsi étudié en combinaison avec des HEs de *Cymbopogon citratus* et *Cinnamonum camphora* contre des populations sensibles et résistantes du ravageur des produits stockés, *Trogoderma granarium (Everts)*, les mélanges binaires et ternaires effectuées se sont révélés efficaces avec des interactions synergiques à toutes les proportions réalisées (Feroz, 2020).

Conclusion Chapitre IV

Les résultats des mélanges ternaires ont montré que la mortalité la plus élevée a été enregistrée pour le mélange binaire 50%-50% de l'HE de *L. stoechas* et *R. officinalis* (86, 96±1,78), alors que les autres mélanges 50%-50% de *L. steochas* et *M. pulegium* ainsi que de *R. officinalis* et *M. pulegium* ont entrainé des mortalités de 67,91±0,18 et 70,17±1,12%, respectivement. Le mélange constitué de 33% de chaque HE a causé une mortalité atteignant 73%, tandis que les mélanges contenant différentes proportions de trois HEs ont montré des mortalités entre 74 et 77%. Les résultats obtenus pour les mélanges binaires 1,8-cinéole+α-pinène et carvone + R (+)-pulégone ont démontré que ces mélanges ont présenté une efficacité insecticide contre les adultes de *C. pipiens*. Pour la combinaison binaire 1,8-cinéole+α-pinène, les résultats ont prouvé que certaines expériences (1, 3, 4 et 5) se sont avérées plus efficaces que les autres après 24 heures (environ 50% de mortalité) alors que les expériences 2, 3 et 4 ont montré des taux élevés de mortalité après 48h avec des valeurs comprises entre 90,00±0,70% et 100,00±0,70%. Pour le mélange de carvone et de R (+)-pulégone, l'expérience 7 (0,5/0,5) a montré des mortalités élevées qui ont été enregistrées à 54,35 ± 0,75% après 24h et 89,96 ± 0,14% après 48h. Par ailleurs, l'insecticide de synthèse a montré une faible mortalité (19,29±0,01% après 24h et 34,05±1,01% après 48h) en comparaison avec les deux mélanges binaires. Les résultats des mélanges binaires entre l'HE de la menthe et l'insecticide ont montré des mortalités importantes envers les adultes femelles de *C. pipiens*. La mortalité la plus élevée a été enregistrée à 88, 33±1, 89 et 100±0,0% après

24h et 48h de traitement lorsqu'on a utilisé une proportion de 0,25 de l'HE de la menthe et 0, 75 de l'insecticide. Les autres proportions ont aussi causé des mortalités allant de 71,66± 1, 22 à 85,15±1,16% après 24h et entre 86,66±0,46 et 96,66±1,45% après 48h. Ces résultats prouvent le potentiel insecticide de l'HE de la menthe même s'elle est utilisée à faible concentration (CL_{50}), et ce qui répond à l'objectif de cette étude qui consiste à renforcer l'effet insecticide tout en réduisant les concentrations testées.

Chapitre V

Effet de la distillation simultanée de Lavandula officinalis sur l'activité insecticide

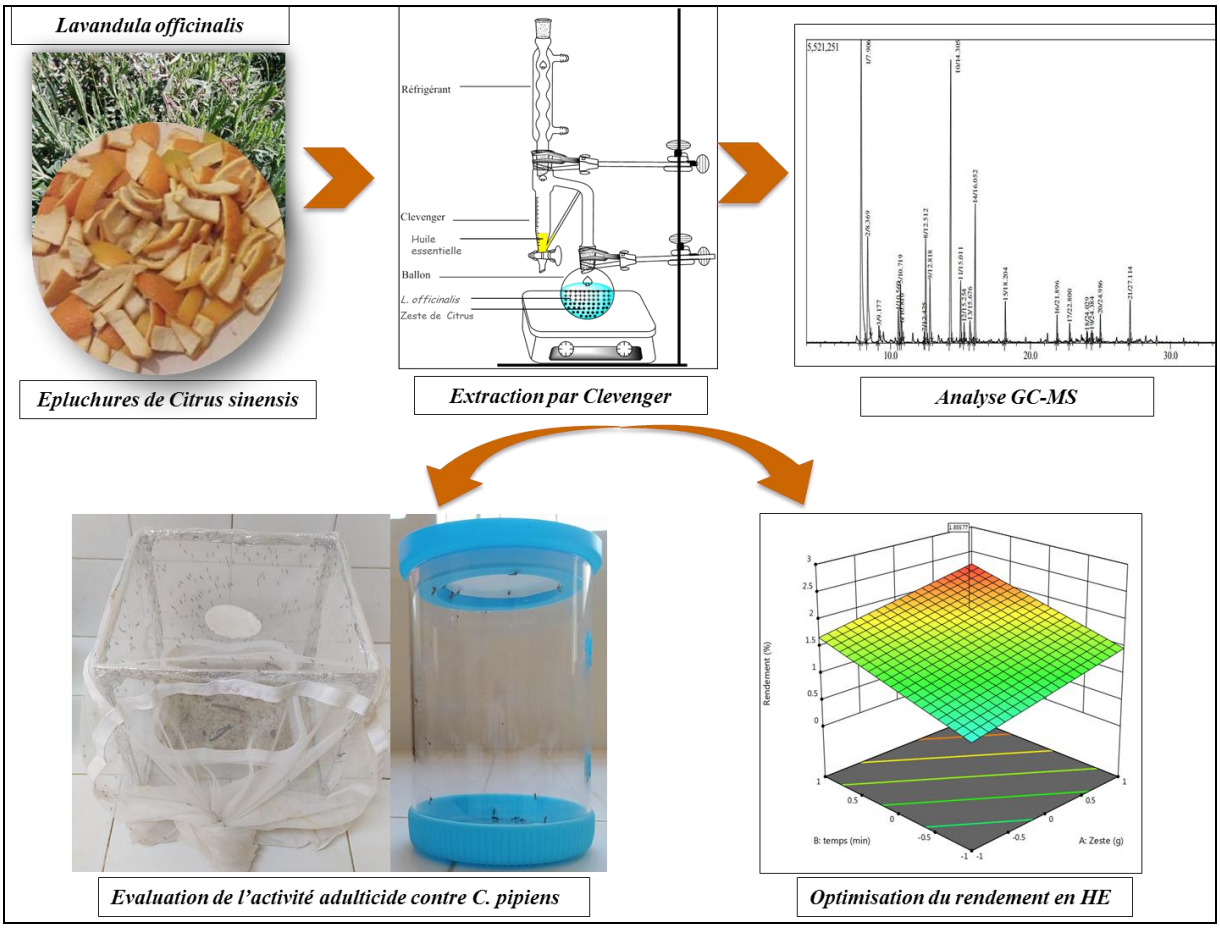


Figure 40. Schèma récapitulatif du Chapitre V

Introduction

L'hydrodistillation, qui peut durer jusqu'à 3 heures, ainsi que l'acidité du milieu d'extraction, peuvent provoquer diverses réactions telles que l'hydrolyse des esters, la polymérisation des aldéhydes ou la décomposition d'autres composés (Nguemtchouin Mbouga, 2012) ; ce qui incite à rechercher des alternatives. En effet, d'autres études ont utilisé du limonène pur pour extraire des produits naturels (Chemat et al., 2012 ; Golmakani et al., 2014 ; Adam et al., 2012 ; Dejouj tanzi, 2013 ; Liu et al., 2005 ; Lupresto et al., 2014 ; Virot, 2008). Cependant, ces méthodes nécessitent des quantités importantes de limonène, ce qui rend son obtention difficile. En revanche, les écorces de Citrus, qui sont disponibles en grande quantité, peuvent être considérées comme un co-solvant, car elles contiennent une forte teneur en limonène (>90%). Cela permet à la fois de valoriser ces écorces et d'optimiser le rendement en HEs des plantes distillées. Cette étude avait deux objectifs. Tout d'abord, optimiser le rendement de *Lavandula officinalis* en utilisant la distillation simultanée tout en valorisant les écorces de *Citrus sinensis* L. Pour atteindre cet objectif, un plan de surface de réponse a été adopté. Ensuite, l'étude visait à évaluer l'effet insecticide des HEs, obtenues à partir de différentes expériences proposées par le modèle choisi, contre le moustique *C. pipiens.*

Matériel et Méthodes

I. Matériel végétal

Afin de mettre en pratique l'objectif de ce chapitre, l'espèce végétale de *Lavandula officinalis* à l'état séché a subi une hydrodistillation en utilisant les écorces du *Citrus sinensis* fraiches et séchées à l'ombre à et à température ambiante.

II. Extraction des HEs de *L. officinalis*

L'extraction des HEs des parties aériennes (les feuilles, les fleurs et les tiges) de *L. officinalis* en présence des pelures découpées de *Citrus sinensis* a été réalisée par l'appareil d'hydrodistillation de type Clevenger. Les deux plantes ont été disposées en deux parties de sorte que les écorces sont placées en bas du ballon de distillation et la lavande était en haut comme le montre le schéma ci-dessous (Figure 41). L'extraction a été effectuée tout en fixant la quantité de la lavande à 100 g et en variant les trois facteurs à savoir la quantité et la période de séchage des écorces, ainsi que le temps de l'extraction à travers un plan de surface de réponse comme nous allons détailler dans les paragraphes suivants. Le mélange est soumis à l'extraction, dans un ballon de distillation (5L) contenant deux litres d'eau distillée, pendant

le temps fixé par le plan d'expérimentation adopté. Les HEs ont été ensuite récupérées et séchées avec du sulfate de sodium anhydre, Na_2SO_4, et ont été conservées par la suite à 4°C dans des flacons opaques et hermétiquement fermés jusqu'à une éventuelle utilisation. Toutes les expériences ont été répétées trois fois pour obtenir des rendements moyens en HEs.

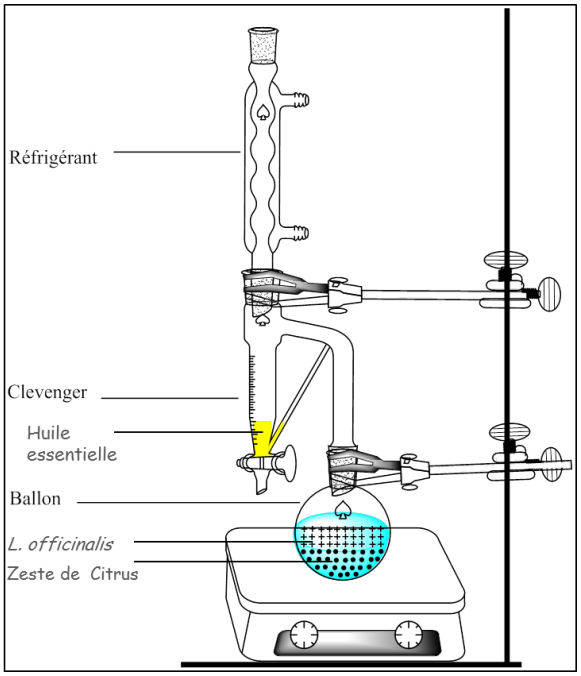


Figure 41. Montage de l'hydrodistillation par co-solvant

III. Analyse chromatographique

Les HEs obtenues à partir de toutes les expériences réalisées ont été analysées par GC-MS dont le protocole est précédemment décrit dans la partie Matériel et Méthodes du chapitre II de l'étude chimique (paragraphe 3 : Analyse chimique des HEs, Page 37).

IV. Plan d'optimisation adopté

Pour réaliser cette partie, nous avons choisi le plan surface de réponse de type Box-Behnken qui permet d'établir directement des modèles de second degré et qui ne repose pas sur des plans factoriels complets ou fractionnaires. Ainsi, ce plan ne comporte pas de points axiaux en dehors du "cube" ce qui garantit que tous les points se situent dans la zone du domaine d'étude. De plus, il assure que tous les facteurs ne sont pas fixés, en même temps, à leurs niveaux élevés.

IV.1 Identification des facteurs

Nous nous sommes concentrés sur les facteurs susceptibles d'affecter la réponse recherchée en se basant sur les données de la littérature en ce qui concerne les conditions de

l'hydrodistillation. Les facteurs étudiés sont tous des facteurs quantitatifs tels que la quantité des écorces utilisée et qui est comprise entre 5 et 35 g avec un pas de variation égale à 15, le temps de l'extraction qui varie entre 60 et 140min avec un pas de variation de 40 min pour ce facteur, ainsi que la durée de séchage des écorces de Citrus qui est comprise entre 0 et 4 jours avec un pas de variation de 2 jours. Le tableau ci-dessous, Tableau 19, résume les domaines expérimentaux des facteurs étudiés.

Tableau 19. Domaines expérimentaux des facteurs étudiés

Facteurs	Facteur codé	Unité	Min	Centre	Max
Quantité des zestes	X1	gramme	5	20	35
Le temps de la distillation	X2	min	60	100	140
La durée de séchage	X3	jrs	0	2	4

IV.2 Définition de la réponse

La réponse étudiée est le rendement en HEs qui est exprimé par la formule suivante :

$$\textbf{Rendement en HE}\ (\%) = \frac{\text{Volume de l'HE(ml)}}{\text{Masse de la plante sèche (g)}} * 100$$

IV.3 Matrice d'expérimentations

Le plan d'expérimentation de type Box-Behnken impliquant trois facteurs X1, X2 ; et X3, chacun ayant trois niveaux (- 1, 0, et 1) a été conçu en utilisant 12 expériences situées aux points médians des arrêts du cube avec 3 répétitions au centre dans le but de déterminer l'erreur pure comme indiqué dans le tableau 20 qui présente la matrice d'expériences générée par le plan choisi.

Tableau 20. Matrice expérimentale de Box-Behnken

N° d'expériences	Quantité du zeste (g)	Temps (min)	Séchage (jrs)
1	5	60	2
2	20	140	0
3	20	140	4
4	35	140	2
5	5	140	2
6	35	60	2
7	5	100	4
8	5	100	0
9	35	100	0
10	20	60	0
11	20	100	2
12	35	100	4
13	20	100	2
14	20	60	4
15	20	100	2

IV.4 Modèle mathématique

Les résultats du nombre limité d'expériences ont fourni un modèle statistique quadratique, polynôme d'ordre 2,

L'équation ci-dessous illustre la relation entre les trois variables étudiés.

$Y= \beta_0+ \beta_1X_1+ \beta_2X_2+ \beta_3X_3+ \beta_{11} X_1^2+ \beta_{22} X_2^2+ \beta_{33} X_3^2+ \beta_{12}X_1X_2+, \beta_{13}X_1X_3+ \beta_{23}X_2X_3+ \varepsilon$

Avec Y c'est le rendement, exprimée en % (la réponse).

β_0 c'est la valeur moyenne de la réponse

$\beta_1, \beta_2, \beta_3,$ représentent les coefficients des termes linéaires ;

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$, représentent les coefficients des termes quadratiques;

$\beta_{12}, \beta_{23}, \beta_{23}$, représentent les coefficients des termes d'interactions ;

ε c'est le terme d'erreur.

V. Test insecticide

L'activité insecticide des HEs obtenues des expériences donnant des rendements optimaux et des profils chimiques riches a été étudiée à l'égard des moustiques adultes femelles de *C. pipiens* selon le même protocole expérimental cité précédemment dans le Chapitre III (paragraphe 3, page 67).

VI. Analyses statistique et optimisation

Pour l'étude de l'optimisation de la réponse, le logiciel Design Expert 13 a été utilisé, cet outil statistique permet de tracer les courbes d'Isoréponses afin de déterminer précisément les zones de maximisation de la réponse recherchée, ainsi ce logiciel permet de spécifier le réglage de la fonction de désirabilité qui donne le réglage maximal exact avec un pourcentage entre 0 et 1 dont la valeur 0 est affichée si les facteurs donnent une réponse non désirable, alors que celle de 1 est attribuée si la réponse représente la performance maximale désirée par les facteurs considérés.

Résultats et discussion

I. Plan d'expérimentation et rendement

D'après les données du Tableau 21, on constate que les trois facteurs étudiés affectent de manière significative les rendements en HE. D'ailleurs, le rendement augmente avec l'augmentation de la quantité des écorces de Citrus et de la durée de séchage. Le temps de la distillation joue aussi un rôle important dans le rendement de l'extraction, plus le temps est long, plus le rendement est élevé.

Tableau 21. Rendements en HEs obtenus dans les différentes expériences

N° d'expériences Ordre	Quantité du zeste (g)	temps (min)	Séchage (jrs)	X1	X2	X3	R %
1	5	60	2	-1	-1	0	0, 73±0, 34
2	20	140	0	0	1	-1	1, 33±0,65
3	20	140	4	0	1	1	2, 25±0, 93
4	35	140	2	1	1	0	2, 27 ±0, 98
5	5	140	2	-1	1	0	1, 20±0, 71
6	35	60	2	1	-1	0	1, 23±0, 90
7	5	100	4	-1	0	1	1, 14±0, 13
8	5	100	0	-1	0	-1	0, 96±0, 17
9	35	100	0	1	0	-1	1, 03±0, 79
10	20	60	0	0	-1	-1	0, 33±0, 14
11	20	100	2	0	0	0	1, 41±0, 23
12	35	100	4	1	0	1	1, 85±1, 10
13	20	100	2	0	0	0	1, 42±0, 25
14	20	60	4	0	-1	1	1, 61±0, 09
15	20	100	2	0	0	0	1, 43±0, 21

Pour les expériences 7 et 8, malgré que la quantité des écorces et le temps de l'extraction sont les mêmes, le rendement obtenu varie légèrement en fonction de la période de séchage. On observe également que le rendement maximal (2, 27 ±0, 98%) est atteint lorsque la quantité des écorces est de 35g, séchée pendant 2 jours, avec une durée d'extraction de 140min. De même, le rendement en HE est de 2, 25±0, 93% lorsqu'on a utilisé 20g séchés pendant 4jrs avec la même durée de distillation.

II. Validation statistique du modèle adopté

D'après le tableau de l'analyse de la variance, nous pouvons conclure que l'effet principal de la régression est significatif puisque la p-value de la régression est inférieure à 0,05.

Tableau 22. Analyse de la variance du modèle adopté

Source	SC	ddl	MC	F-value	p-value	
Régression	3,21	3	1,07	21,85	< 0,0001	significant
Résidus	0,5387	11	0,0490			
Total	3,75	14				
R^2	0,99					

SC : Somme des carrées ; MC : carré moyen ; ddl : Degré de liberté ; F : Test de Fisher.

Les coefficients sont des ajustements autour de la moyenne en fonction des paramètres des facteurs. Des VIF (Variance Inflation Factor) supérieurs à 1 indiquent une multicolinéarité ; plus le VIF est élevé, plus la corrélation des facteurs est importante. Dans notre cas, tous les VIF sont supérieurs à 1 ce qui indique la forte relation de dépendance linéaire entre les variables étudiées, et montre qu'une forte corrélation existe entre les différents facteurs étudiés.

Tableau 23. Coefficients de régression estimés par le modèle choisi

Facteurs	Estimation des coefficients	ddl	Écart-type	95% CI Inférieur	95% CI supérieur	VIF
Constante	1,35	1	0,0571	1,22	1,47	
A-Zeste	0,2937	1	0,0782	0,1215	0,4660	1,0000
B-temps	0,3937	1	0,0782	0,2215	0,5660	1,0000
C-séchage	0,4000	1	0,0782	0,2278	0,5722	1,0000
AB	0,0675	1	0,0136	0,0325	0,1025	1,0000
AC	0,1445	1	0,0136	0,1095	0,1795	1,0000
BC	-0,0056	1	0,0136	-0,0406	0,0294	1,0000
A^2	-0,1079	1	0,0142	-0,1443	-0,0714	1,01
B^2	-0,0030	1	0,0142	-0,0394	0,0335	1,01
C^2	-0,0860	1	0,0142	-0,1224	-0,0495	1,01

Après avoir validé le modèle obtenu par la méthode de surface de réponse, nous nous sommes ensuite concentrés sur l'optimisation des trois facteurs pour atteindre un rendement élevé. Les effets des facteurs étudiés sur le rendement sont représentés dans la figure 29. Les zones de maximisation de la réponse se trouvent dans la partie rouge du cube, ce qui indique que pour obtenir un rendement optimal, il est nécessaire d'augmenter les facteurs de temps (jusqu'à 140 min) et de quantité (35g), ainsi que le facteur de durée de séchage (4 jrs).

La figure 42 représente le profil de prévision des conditions des trois facteurs pour une réponse maximale (profil de la désirabilité). Pour obtenir un rendement optimal (2, 43%), un réglage optimum de maximisation des facteurs étudiés est nécessaire, et donc les valeurs exactes sont de l'ordre 35g pour le facteur quantité de séchage (codé pour 1), 140 min pour le facteur temps (codé aussi pour 1), et pour le facteur du séchage doit être fixé à 4jrs. Ces résultats sont obtenus avec une désirabilité de l'ordre de 99%.

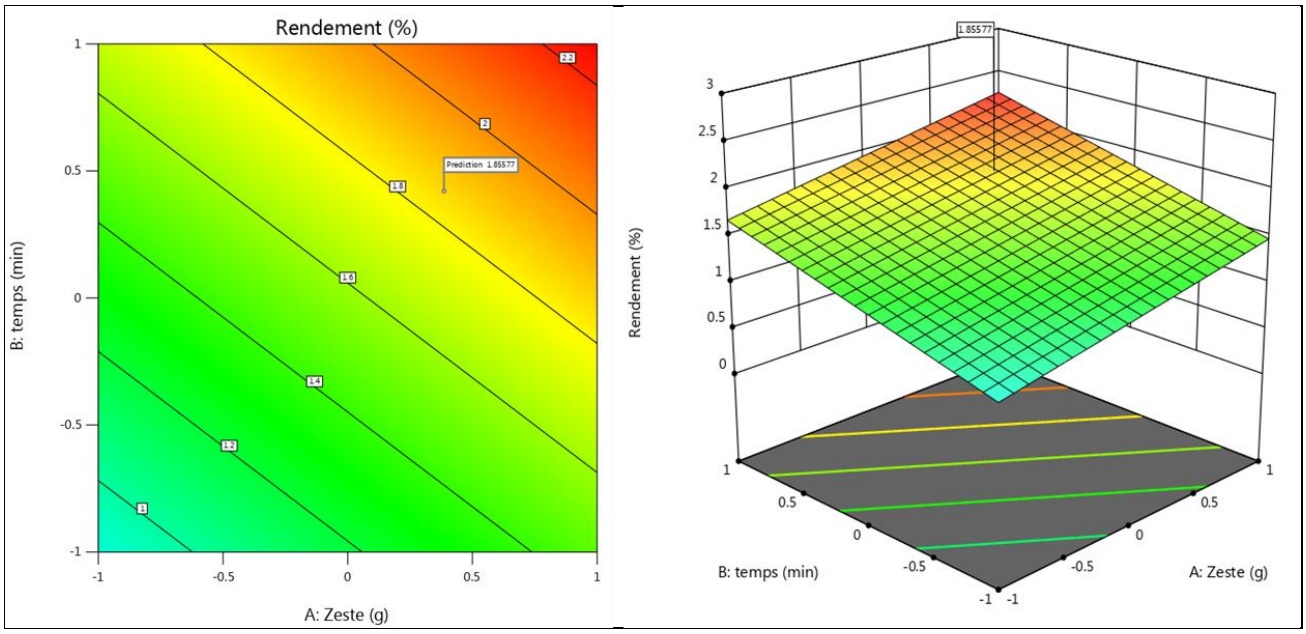


Figure 42. Représentation 2D (a) et 3D (b) des paramètres conduisant à un rendement optimal

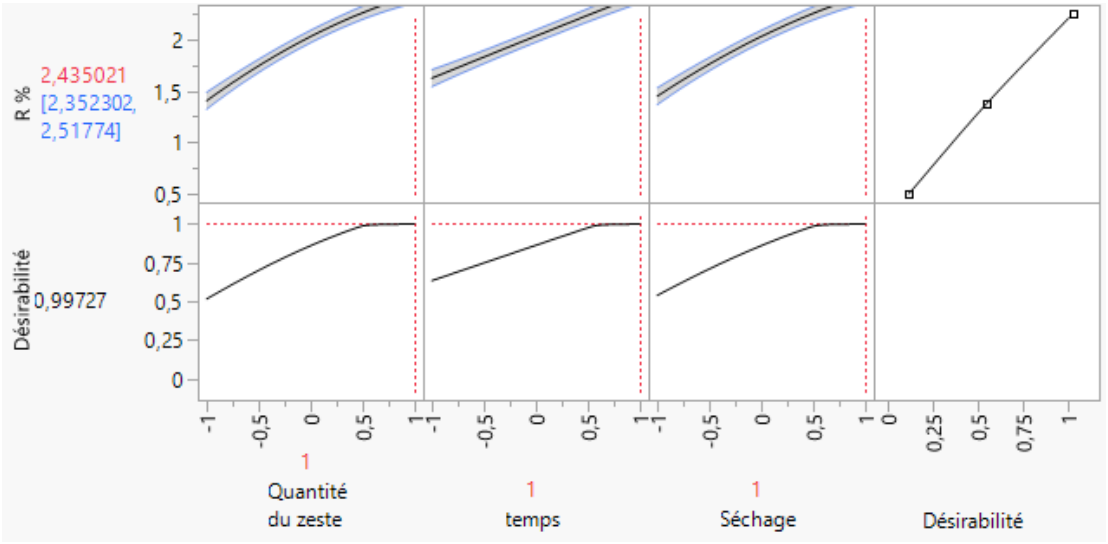


Figure 41 : Le profil de prévision des conditions optimales pour la réponse (Rendement)

III. Composition chimique

Le tableau 24 présenté ci-dessous affiche la composition chimique des HEs obtenues lors des expériences réalisées. Le nombre de composés identifiés dans chaque essai varie en fonction des trois facteurs étudiés : la quantité du zeste, le temps de distillation et la durée de séchage. Il est remarqué que ces facteurs ont une influence sur la composition chimique des HEs extraites. En effet, un plus grand nombre de composés a été identifié lorsque la durée de séchage des zestes était de 2 jours ou 4 jours.

Des nouveaux composés apparaissent, tels que (-)-terpinen-4-ol, (+-)-cryptone, 2-pinen-4-one, (-)-carvone, cis-carvéol, alpha.-bisabolol, delta.-terpinéol. Les composés 2-pinen-4-one et cis-carvéol sont apparus uniquement dans les expériences 9, 10, 11, 12 et 13 lorsque la quantité de zeste est entre 20 et 35g. Le linalool, qui a été détecté dans l'HE de la lavande officinale à 34, 32%, est observé uniquement dans les expériences 9, 10, 11, 12 et 13 mais à des teneurs inférieures à 1%. En revanche, le 1, 8-cinéole qui était présent à un pourcentage de 15, 12%, est identifié à de fortes teneurs allant jusqu'à 60% dans l'expérience 4 qui contient 35g de zeste séché durant 2jrs avec un temps de distillation de 140min. Le camphre est aussi détecté à des pourcentages significatifs atteignant 20% dans l'expérience 12. Cependant, le d-limonène qui a été identifié à une grande quantité dans l'HE des zestes de Citrus (98%), est observée à des quantités bien moins importantes (entre 1 et 3%) à l'exception des expériences 6 et 8 qui ont montré des teneurs supérieures à 3% (3, 89 et 3, 15 %, respectivement).

Figure 43 Composition chimique des HEs obtenues pour toutes les expériences réalisées

Constituant	Expérience												
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**
Méthyl-cyclopentane	0,83	0,79									0,56		
α-Pinène	1,38		0,73	0,68		0,60					1,07		
β-Phellandrene	0,87								0,60		0,72		
β-Pinene	2,80		1,83	1,48		1,13			0,90	1,01	2,38		
D-Limonène	0,89	2,90	1,60	2,10	1,17	3,89	1,78	3,15	1,10	1,89	1,60	2,67	2,14
1,8-Cinéole	40,08	40,59	44,31	60,02	47,96	45,17	4,65	54,75	39,45	49,69	39,48	39,16	43,45
Linalool									0,24	0,53	0,65	0,88	0,76
Camphre	13,67	16,34	17,12	17,08	14,64	13,10	14,37	19,95	16,10	17,09	13,62	20,42	15,23
Pinocarvone			0,95	0,79		0,11	0,94		0,34	0,85	1,01	1,56	1,02
δ-Terpinéol	2,74	4,23		2,41	2,40	2,93	2,58	2,01	2,17	2,83	3,31	5,60	4,15
Bornéol	6,03	9,92	10,99	6,52		4,15	6,90	4,54	5,67	7,15	6,05	6,40	5,57
(-)-Terpinen-4-ol	1,35	1,58	1,04	1,38		1,02	1,07		0,96	1,00	1,77	1,89	
(+-)-Cryptone	1,42	2,55	2,59	1,83		1,46	1,83	1,59	1,45	1,83	1,89	1,90	2,19
α-Terpineol	4,00	4,85	3,77	4,32	3,72	3,05	3,79	3,77	3,10	3,34	4,88	3,10	3,89
2-Pinen-4-one									0,62	0,78	0,57	0,90	0,89
α-Bisabolol	1,49	4,22	4,68	5,73	5,53	3,10	8,71	5,53	3,40	3,48	7,19	6,19	6,90
Verbenone		0,99	1,25	0,68		0,20							
Cis-carvéol									0,10	0,16	0,52	0,89	0,45
(-)-Carvone		1,89							1,40	1,48	1,90	0,93	
p-Cymen-7-ol		0,92	1,42	1,29			1,49		0,35	0,77	0,95	1,83	0,67
o-Cymene			0,74						0,10		0,81		1,78
Caryophyllene oxide		2,10	1,94	1,33		1,13	1,49		1,13	1,84	2,04	1,98	1,76
.tau.-Cadinol		2,33	2,50	2,32	2,38	1,23	3,86	2,38	1,3	1,86	3,42	2,10	1,50
α-Bisabolol oxide		2,61	2,86	2,42	2,58	1,30	4,24	2,58	2,67	2,14	2,64	1,20	1,06
(+)-Nopinone				0,68						0,86			
Cumaldehyde			1,99	1,51			1,66				0,58		
2(10)-Pinen-3-ol, (1S,3R,5S)-(-)-				1,31		0,67	0,98	0,89			0,13		

IV. Evaluation de l'activité insecticide contre *C. pipiens*

Les résultats des tests insecticides sont regroupés dans les tableaux 25 et 26. On constate que les HEs obtenus pour les trois expériences 4, 8, et 12 ont montré un potentiel insecticide important contre les moustiques femelles de *C. pipiens*. La mortalité a augmenté en augmentant les concentrations et la durée de traitement. A la concentration la plus élevée (312, 5 µl/L), les 3 HEs ont exercé des mortalités entre 64 et 77% après 24h et entre 70 et

85% après 48h. Alors que l'insecticide chimique, déltamethrine a causé des mortalités de 20,30% et 36,45 % après 24h et 48h, respectivement.

Tableau 24. Pourcentages de mortalités calculés pour les trois expériences après 24h et 48h d'exposition des adultes femelles de *C. pipiens* à différentes concentrations

Essai	**19,53µl/L**		**39,06 µl/L**		**78,125 µl/L**		**156,25 µl/L**		**312,5 µl/L**	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
4	19,19 ±1,59	27,80 ±1,67	33,33 ±1,45	42,19 ±1,78	45,61 ±1,30	59,80 ±1,45	59,46 ±1,41	65,73 ±1,25	68,42 ±1,10	85,21± 1, 89
8	17,54 ±1,89	22,67 ±1,92	30,67 ±0,56	42,59 ±1,05	35,89 ±1,10	46,29 ±0,45	56,60 ±0,56	62,28 ±1,20	77,19 ±1,29	85,43± 1,89
12	15,10 ±1,30	20,29 ±0,78	21,05 ±1,42	30,24 ±1,23	34,69 ±1,31	44,56 ±0,16	42,70 ±1,19	56,45 ±1,32	64,90 ±1,66	70,17 ±1,54
Deltaméthrine :					**24h** : 20,30 ± 0,12% ; **48h** : 36,45± 0,29%					

L'HE issue de l'expérience 4 était plus efficace sur les insectes adultes (Tableau 26) et a montré la valeur la plus faible de CL_{50}, 106,58 µl/L après 24h et 57,75 µl/L après 48h, alors que les autres HEs des expériences 8 et 12 ont montré des valeurs de l'ordre de 108,08 et 179,25 après 24h et 81,17 µl/L et 110,31 µl/L après 48h. Une bonne corrélation a été observée pour toutes les valeurs obtenues dont R^2 tends vers 1. L'effet insecticide de ces HEs est certainement attribué à leur composition chimique ; elles sont toutes caractérisées par une richesse en monoterpènes notamment que 1,8-cinéole, camphre, bornéol, d-limonène, α-terpinéol, ainsi que des sesquiterpènes comme α-bisabolol, α-bisabolol oxide, .tau.-cadinol. C'est évident de noter que le 1,8-cinéole, le camphre, et le d-limonène ont démontré un potentiel adulticide important quand ils sont testés isolément.

Tableau 25. Valeurs de CL_{50} enregistrées pour 3 expériences

Essai	**Temps (h)**	**CL_{50} (µl/L air) (95% IC)**	**Slope**	**Intercept**	**R^2**
4	24	106,58 (99,14-111,34)	1,11±0,06	2,73±0,12	0,98
	48	57,75 (53,12-61,50)	1,29±0,12	2,72±0,23	0,97
8	24	108,08 (100,23-115,17)	1,34±0,14	2,265±0,27	0,96
	48	81,17 (80,67-89,78)	1,12±0,11	2,85±0,22	0,96
12	24	179,25 (171,45-83,46)	1,15±0,11	2,40±2,22	0,97
	48	110,31 (101,23-117,16)	1,12±0,01	2,70±0,03	0,99

A notre conaissance, aucune étude n'a été rapporté, jusqu'à maintenant, dans le contexte d'utilisation des écorces du citrus dans le processus d'extraction des HEs et l'évaluation des propriétés biologiques des huiles extraites. Cependant plusieurs travaux ont abordé cette nouvelle approche qui consiste à adopter de nouveaux solvants pour l'extraction des lipides et des huiles végétales. Ces rapports ont montré l'intérêt du limonene ainsi que d'autres terpènes (alpha-pinène et p-cymène) en tant que bio-solvants dans le cadre de la chimie verte, en mettant en évidence le concept de « green extraction » (Chemat et al., 2012; Chemat Smain et al., 2012 ; Zheng Li 2015; Perino and Chemat 2019 ; Ozturk et al., 2019 ; Pagliaro et al., 2023). D'ailleurs, de nombreux chercheurs ont utilisé d-limonène en tant que solvant alternatif à l'hexane dans le processus d'extraction des huiles d'olive *via* l'extraction conventionnelle par Soxhlet (Chemat Smain et al., 2012), ou l'extraction par Soxhlet combinée aux micro-ondes, suivie d'une distillation par Clevenger assistée aux micro-ondes (Virot et al., 2008). Le D-limonène, extrait des zestes de *Citrus sinensis L.* par la méthode de distillation à la vapeur d'eau, a été ainsi utilisé pour extraire des caroténoïdes, notamment le lycopene, à partir des tomates (Chemat-Djenni et al., 2010). De manière similaire, d-limonène issu des pelures de *Citrus sinensis* L. Osbeck par extraction par micro-ondes sans solvant a été utilisé pour l'extraction des caroténoïdes à partir des carottes, des huiles de colza et des terpènes des graines de carvi en utilisant la technique d'extraction solide-liquide (Aissou et al., 2016). Cette étude a montré que le d-limonène est un bon solvant pour l'extraction de la plupart des constituants, tels que les caroténoïdes (α et β carotènes, luttein, lycopene), les monoterpènes hydrocarbures comme le sabinène, α-terpinène, β-myrcène, δ-3-carene), et certaines monoterpènes oxygénés notamment le linalool, ainsi que des composés sesquiterpenes (β caryophyllene et β-caryophyllene oxide).

D'autres chercheurs ont utilisé le limonène pour extraire des lipides de differentes microalgues à savoir Spirulina, *Phormidium*, *Anabaena* et *Stigeoclonium*, *Nannochloropsis oculata* et *Dunaliella salina* en ayant recours à diverses techniques d'extraction ; extraction accélérée par solvant (Golmakani et al., 2014), extraction par soxhlet en combinaison avec un processus de distillation et d'extraction simultanés (Dejoye Tanji et al., 2010, 2013), ainsi que l'extraction assistée par ultrasons (Adam et al., 2012). Il convient de noter que l'étude d'Adam et de son équipe a adopté la méthodologie de plan de surface, un plan composite centré communément appelé plan de Box-Wilson, afin de déterminer l'effet de chaque facteur, tels que la puissance des ultrasons (w), le temps d'extraction (s) et la teneur en poids sec de la biomasse (%). D'un autre côté, Liu et Mamidipally (2004 et 2005), dans une tentative de

développer une application industrielle du d-limonène, ont réussi à démontrer que l'extraction de l'huile du son de riz a été possible en utilisant du d-limonène au lieu du n-hexane et en adoptant une extraction solide-liquide. L'ensemble de ces études s'inscrit, d'une part, dans le cadre du développement d'approches axées sur l'utilisation de solvants alternatifs aux solvants organiques d'origine pétrolière, notamment l'hexane et le dichlorométhane, qui sont couramment employés pour l'extraction de produits naturels (Smain Chemat, 2012), et d'autre part ces travaux s'inscrivent dans l'objectif de la valorisation des déchets des agrumes, en particulier les pelures qui représentent environ la moitié de la masse des déchets issus de de l'industrie des agrumes. Ces déchets sont produits en quantités considérables, atteignant des milliers de tonnes par les unités industrielles (Siddiqui et al., 2022). Ainsi, ces écorces sont valorisées de plusieurs manières. D'une part, leurs HEs sont évaluées en tant qu'agents antifongiques (Sayah et al., 2013). D'autre part, la méthode d'extraction des HEs de ces écorces est optimisée *via* l'utilisation des méthodes d'extraction innovantes alignées au concept de "Green extraction" (Sahraoui et al., 2011 ; Aboudaou et al., 2018 ; Lupreso et al., 2014) et cela en vue d'exploiter de leur molécules d'intérêt dans divers domaines ; dans l'industrie alimentaire en tant qu'agents aromatisants (Negro 2018) et en tant que conservateurs naturels (Aboudaou et al., 2018), comme ils peuvent également être utilisé dans le secteur cosmétique et en aromathérapie en raison de leur fragrance intense (Ali et al., 2015).

Conclusion Chapitre V

Les travaux de recherche réalisés dans ce chapitre de thèse sont dirigés vers deux principaux volets:

- L'utilisation d'une méthode d'extraction par co-solvant, les pelures de Citrus, afin d'optimiser le rendement de l'HE de *Lavandula officinalis.* Cela a été réalisé en utilisant l'approche de plan de surface de réponse qui consiste à varier les facteurs jugées influents sur le rendement de la distillation, et à déterminer les zones de compromis de la réponse souhaitée (maximisation du rendement) après une validation statistique du modèle.
- Identification des constituants chimiques des HEs extraites, et évaluation de l'activité insecticide des HEs issues des expériences ayant donné une réponse optimale envers les moustiques adultes de *C. pipiens*

Les résultats de l'extraction ont démontré que les facteurs étudiés influencent le rendement en HEs de la lavande. Plus la quantité et la durée de séchage des écorces augmentent, plus que le rendement est élevé. Le rendement maximal (2,27 ±0,98) est obtenu lorsque la quantité des zestes est de 35g, séchée durant 2jrs, avec un temps d'extraction de 140min. La composition chimique est différente de celle de la lavande officinale et le zeste de citrus individuels. Nous avons constaté l'apparition de nouveaux composés énantiomères tels que (-)-terpinen-4-ol, (+-)-cryptone, (-)-Carvone, alors que les composés détectés dans l'HE individuelle de la lavande tels que le 1,8-cinéole et le camphre sont identifiés à des fortes teneurs, le d-limonene qui est détecté en grande quantité dans l'HE de citrus seule est présent à des quantités plus ou moins faibles. D'autres constituants ont été observés uniquement dans certaines expériences comme le 2-Pinen-4-one et le cis-carvéol. Les HEs issues des expériences 4, 8 et 12 qui se sont révélées riches en éléments chimiques, ont montré un une forte activité insecticide sur les adultes femelles de *C. pipiens*, notamment à la concentration la plus élevée de 312,5 µl/L et après un traitement de 48h. On peut conclure que la distillation réalisée dans cette étude a influencé le profil chimique, et par conséquent, l'activité insecticide des HEs testées.

Conclusion générale et Perspectives

Le regain d'intérêt que nous constatons actuellement envers tout ce qui est naturel, écologique, moins toxique pour l'être humain en général et pour les êtres vivants en particulier nous ont poussés, en tant que chercheurs connaissant bien que la santé humaine soit une priorité absolue, à penser à une solution alternative aux insecticides chimiques pour lutter contrôler les moustiques vecteurs de maladies transmissibles. Nous avons sélectionné les HEs provenant des PAMs et qui ont des propriétés biologiques intéressantes en tant que solution alternative dans le but de répondre à la problématique posée au début et cela par l'évaluation de leur activité insecticide à l'égard des populations adultes femelles du moustique vecteur d'importantes maladies, *C. pipiens*. D'après nos connaissances, aucune étude n'a été menée au Maroc sur cette thématique. Les travaux réalisés dans ce sens sont focalisés en premier temps de mettre en lumière la diversité phytochimique de plusieurs espèces aromatiques et médicinales afin d'identifier leurs constituants mineurs et majeurs tout en mettant en évidence leur diversité chimique, et en deuxième temps de valoriser les métabolites secondaires de ces plantes tout en évaluant leur effet insecticide ainsi que certaines de leurs molécules bioactives.

L'analyse par GC-MS a montré une grande variabilité chimique des espèces étudiées même pour celles appartenant à la même famille comme les Lamiacées. Différentes classes et sous-classes chimiques sont identifiées, les monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés, les phenylpropènes, et les sesquiterpènes. La fraction des monoterpènes, notamment celle oxygénée, était la plus dominante. En effet, les HEs de *M. pulegium*, de *L. stoechas*, et d'*A. herba Alba* sont regroupées en groupe riche en monoterpènes cétones (85,76, 76,50, et 72,80%, respectivement) tels que le camphre, fenchone, carvone, pulégone, chrysanthénone, α et β-thujone, alors que les HEs de *L. officinalis* et *O. mixta* sont dominées par les composés alcools à savoir linalool (52,98%) et l'alcool de santoline (38,56%), celles d'*E. globulus* et *R. officinalis* sont très riches en composés éthérés dont le 1,8-cinéole représente la majeure contribution (74,18% et 29,31%, respectivement). Cependant, l'HE de *C. limon* était trouvée riche en composés hydrocarbonés notamment D-limonène (53,45%), celle d'*Ocimum basilicum* est caractérisée par une forte teneur en phénypropènes (Estragole= 63,93%). Cette étude phytochimique peut apporter une contribution aux chercheurs intéressés par la recherche d'un composé pur ou une classe chimique spécifique, ainsi qu'à ceux intéressés par l'étude des plantes contenant des niveaux élevés d'une classe chimique quelconque.

Après la détermination qualitative et quantitative des éléments chimiques de toutes les HEs analysées, nous avons évalué leur activité insecticide ainsi que certaines de leurs

molécules bioactives. Les résultats obtenus ont montré le potentiel insecticide de toutes les substances naturelles testées avec une différence significative de mortalité d'une plante à l'autre et d'une molécule pure à l'autre. D'ailleurs, la mortalité était dépendante de la concentration et le temps d'exposition. Les HEs issues des PAMs de *M. pulegium, d'O. basilicum,* de *R. officinalis*, des espèces de Lavandula et même de l'Eucalyptus se sont révélées plus efficaces que les autres HEs de Citrus, de l'armoise, de la camomille à toutes les concentrations, après 24h et 48h d'exposition. De même pour les molécules bioactives, elles possèdent toutes un potentiel insecticide sur les adultes de *C. pipiens* qui varie en fonction des concentrations testées et la durée de traitement. Généralement, les monoterpènes oxygénés, notamment les cétones telles que carvone et camphre, sont les plus efficaces après 24h alors qu'après 48h. Tous les composés ont exercé des mortalités plus que 50% dont le camphre, le 1,8-cinéole, l'α-pinène, et la carvone sont les premiers qui aient montré des pourcentages de mortalité très élevés. Il est intéressant de mentionner que les HEs et leurs dérivés étaient plus actifs que l'insecticide chimique dont la mortalité n'a pas dépassé les 20% après 24h et 35 % après 48h.

Etant donné les résultats encourageants pour les HEs et les molécules bioactives en termes d'efficacité insecticide envers les insectes du *C. pipiens* nous avons opté à l'optimisation de la mortalité tout en pensant à la méthodologie de plan de mélange. Cette approche qui permet à travers des outils statistiques de suggérer des essais expérimentaux pouvant améliorer et maximiser la réponse souhaitée qui constitue pour nous une mortalité supérieure à 50% ou qui atteint 100%. Nous avons réalisé des mélanges ternaires des HEs ayant exercé des mortalités élevées quand elles sont téstées seules ; *L. stoechas*, *R. officinalis* et *M. pulegium*, ainsi que des mélanges binaires de quelques molécules bioactives. Ensuite, nous avons envisagé de développer une formulation insecticide basée sur l'HE de la menthe et la Déltaméthrine. Les profils phytochimiques obtenus pour les mélanges ternaires des HEs ont montré une richesse en éléments chimiques. Généralement, le profil chimique diffère de celui obtenu pour chaque HE analysée individuellement et nous avons constaté l'apparition de certains constituants comme 2-pinen-4-one ; 3-carene ; (+)-camphène, o-cymène, myrtenyl formate, endo-bornéol, isoterpinène, cis-calamenène et autre. Alors que les composés tels que pulégone, carvone, dihydrocarvone, et bornéol et qui sont identifiés en grande quantité dans les HEs seules n'ont pas été figurés dans le mélange ternaire. Après application des mélanges des trois HEs sur les adultes du *C. pipiens*, les pourcentages des mortalités les plus élevées sont enregistrés après 48h de traitement par le mélange binaire 50%-50% de l'HE de *L.*

stoechas et *R. officinalis* (86,96±1,78) qui était le plus efficace. Le mélange ternaire qui représente 33% de chaque HE a révélé une mortalité d'environ 73%, tandis que les combinaisons qui contiennent différentes proportions de trois HEs ont causé des mortalités entre 74 et 77%. Pour une mortalité optimale, le mélange 50%-50% de *L. stoechas* et *M. pulegium* est le plus suggéré après 24h, alors que le mélange binaire de *L. stoechas* et *R. officinalis* est le plus probable à maximiser la mortalité après une durée d'exposition de 48h. Pour les combinaisons effectuées par les molécules bioactives, la combinaison 1,8-cinéole+ α-pinène a montré une mortalité plus élevée que le mélange carvone +R (+)-pulégone surtout après 48h de traitement avec les proportions de 0, 75/0,25, 0, 25/0,75 et 0,33/0,67 qui ont exercé des mortalités élevées (entre 90 et 100 %). Pour la formulation insecticide, la mortalité la plus élevée a été enregistrée à 88,33±1,89 et 100±0,0 après 24h et 48h de traitement quand la proportion de l'HE de la menthe est 25% et celle de l'insecticide est de 75%. Il convient aussi de souligner que les résultats des mélanges ont montré des mortalités importantes par rapport à la déltamethrine qui n'a même pas causé 50% de mortalité après un temps de traitement de 48h. Toutes ces formulations peuvent être utilisées en alternance avec les produits chimiques dans l'objectif d'éviter ou retarder l'apparition des moustiques résistants aux insecticides.

Les résultats de la distillation des HEs de *L. officinalis* par co-solvant en adoptant l'approche du plan de surface de réponse ont montré que le rendement en HE augmente tout en augmentant la quantité des zestes et leur durée de séchage ; et que le meilleur rendement (2,27 ±0,98) est obtenu quand la quantité des zestes utilisée est de 35 g, séchée pendant 2 jrs, avec un temps d'extraction de 140 min. La composition chimique était différente de celle des HEs de la lavande et les écorces de citrus seuls et elle a montré l'apparition de nouveaux constituants tels que (-)-terpinen-4-ol, (+-)-cryptone, (-)-Carvone. Le 1,8-cinéole et le camphre qui ont représenté les constituants majoritaires de la lavande sont identifiés en plus grandes quantités que dans l'HE extraite par l'hydrodistillation classique, néanmoins, le d-limonene qui a été identifié à forte teneur dans l'HE de citrus seule est observé à des quantités plus ou moins faibles. Les HEs testées pour l'activité insecticide ont montré une efficacité importante, par rapport au déltamethrine et par rapport à l'HE de la lavande individuellement testée, envers les adultes femelles de *C. pipiens* notamment à la concentration la plus élevée 312,5 µl/L et après 48h de traitement. Ce qui confirme l'effet de la méthode de distillation effectuée sur le profil chimique et l'activité biologique en question.

Les résultats prometteurs obtenus dans notre étude, fournissent des données préliminaires pour développer et élaborer des produits anti-moustiques à base des HEs, leurs dérivés, et en combinaison avec les insecticides ; comme par exemples des sprays anti-moustiques, l'imprégnation des moustiquaires, élaborer des pièges à moustiques pour les adultes, des diffuseurs électriques anti- moustiques, des produits de répulsion…etc. Cette solution en produits naturels pourrait être utilisée dans les programmes de la gestion intégrée des vecteurs (IVM) en particulier compte tenu de l'émergence de la résistance des moustiques aux insecticides synthétiques et en prenant en considération les recommandations de l'OMS concernant le développement d'insecticides à base de produits naturels. Les résultats de cette présente étude ouvrent de nombreuses perspectives afin de poursuivre cette recherche :

- Effectuer des tests de toxicité des substances naturelles testées sur des oiseaux, par exemple, afin d'évaluer leur sécurité pour les êtres humains.
- La réalisation de tests enzymatiques, tels que l'inhibition de l'acétylcholinestérase, permettrait d'étudier en détail les mécanismes d'action des HEs et de leurs dérivés.
- Tester ces produits naturels seuls ou en combinaison avec l'insecticide chimique sur des populations de moustiques en conditions réelles (in vivo) sur le terrain.
- Etendre l'étude de l'activité insecticide à d'autres espèces de moustiques, ainsi que de rendre l'étude nationale plutôt que limitée à une région spécifique.

Néanmoins, notre objectif de contrôler la propagation des moustiques et par conséquent de prévenir la transmission des maladies vectorielles ne peut être accompli qu'après la coordination des efforts de recherche entre les services de santé, les laboratoires et les institutions publiques responsables de la surveillance et du contrôle des vecteurs, les communautés et les opérateurs publics de contrôle des moustiques, et toutes les autorités concernées dans les programmes de lutte antivectorielle.

Références bibliographiques

Aazza S., Lyoussi, B., Miguel, M.G., 2016. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. Molecules. 16: 7672-7690. https://doi.org/1010.3390/molecules16097672.

Abbot, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. JEcon Entomol. 18:265Ŕ66.

Abdelli, M., Moghrani, H., Aboun, A., Maachi, R., 2016. Algerian *Mentha pulegium* L. leaves essential oil: Chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities. Ind. Crop. Prod. 94, 197–205.

Abdel-Baki, A.A.S., Aboelhadid, S.M., Al-Quraishy, S., Hassan, A.O., Daferera, D., Sokmen, A., Kamel, A.A., 2012. Cytotoxic, scolicidal, and insecticidal activities of *Lavandula stoechas* Essential Oil. Separations. 10, 100. https:// doi.org/10.3390/separations10020100.

Abdelgaleil, S. A. M., Al-Nagar, N.M.A., Abou-Taleb, H.K., Shawir, M.S., 2021. Effect of monoterpenes, phenylpropenes and sesquiterpenes on development, fecundity and fertility of *Spodoptera littoralis* (Boisduval). International Journal of Tropical Insect Science. https://doi.org/10.1007/s42690-021-00539-y.

Abdelgaleil S. A.M, Magdy IE M., Shawir S.M., Abou-Taleb K. H., 2016. Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, Sitophilus oryzae L. Journal of Pest Science. Volume 89. pp: 219-229.

Abdelgaleil, S. A. M., Mohamed, M.I.E., Badawy, M.E.I., El-Arami, S.A.A., 2009. Fumigant and contact toxicities of monoterpenes to *Sitophilus oryzae* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) and their inhibitory effects on acetylcholinesterase activity. J. Chem. Ecol. 2009, 35, 518–525.

Abdelgaleil, S. A. M., Abbassy, M.A., Belal, A.S-H., b, Abdel Rasoul, M.A.A., 2008. Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. Bioresource Technology 99. : 5947–5950.

Abdu K., Erahioui R., Moutawalli A., Zahidi, A., Khedid, K., Ibn Ahmed S., 2020. Evaluation of antioxidant activity of fresh lemon (*Citrus lemon* L.) peel in Marrakech, Kenitra cities of Morocco and Taiz of Yemen. Mediterranean Journal of Chemistry. 10(6): 585-594.

Aboudaou, M., Ferhat, M.A., Hazzit, M., Ariño, A., Djenane, D., 2018. Solvent free-microwave green extraction of essential oil from orange peel (*Citrus sinensis* L.): effects on shelf life of flavored liquid whole eggs during storage under commercial retail conditions. Preprints. 2018010055. https://doi.org/10.20944/preprints201801.0055.v1.

Aboulfadl, S., Mellouki, F., Aouinty, B., Faraj, C., 2020. Susceptibility status of *Culex pipiens* larvae (Diptera: Culicidae) to the main insecticides used in larval control in the regions of Rabat and Casablanca in Morocco. Int J Pest Manage 1–7.

Adams, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th ed.; Allured Pub Corp: Carol Stream, IL, USA, 2007.

Adja, A.M., N'goran, E.K., Koudou, B.G., Dia, I., Kengne, P., Fontenille, D., Chandre, F., 2011. Contribution of *Anopheles funestus*, An. gambiae and An. nili (Diptera: Culicidae) to the perennial malaria transmission in the southern and western forest areas of Côte d'Ivoire. Ann Trop Med Parasitol. 105 (1):13-24. https://doi.org/10.1179/136485910X12851868780388.

AFNOR, 2000. Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse (Tome 1) – Monographies relatives aux huiles essentielles (Tome 2. Volumes 1 et 2).

Ahmed, A.F., Attia, F.A., Liu, Z., Li, C., Wei, J., Kang, W., 2019. Antioxidant activity and total phenolic content of essential oils and extracts of Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. Food Sci. Hum. Wellness. 8, 299–305.

Aimad, A., Sanae, R., Anas, F., Abdelfattah, E.M., Bourhia, M., Mohammad Salamatullah, A., Alzahrani, A., Alyahya, H.K., Albadr, N.A., Abdelkrim, A., EL Barnossi, A., Eloutassi, N., 2021. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and insecticidal properties of essential oil from *Mentha pulegium* L. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2021, 2021, 1108133.

Ainane, A., Khammour, F., Charaf, S., . Elabboubi, M., Elkouali, M., Talbi, M., Benhima, R., Cherroud, S., Ainane, T., 2019. Chemical composition and insecticidal activity of five essential oils: *Cedrus atlantica*, *Citrus limonum*, *Rosmarinus officinalis*, *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globules*. Materials Today: Proceedings 13: 474–485.

Aisha S., 2019. A novel approach in creating a bioinsecticidal repellent using Cymbopogon, *Lavandula*, and *Rosmarinus officinalis* essential oils (Eos) with an attractive Sugar Bait. South Carolina Junior Academy of Science. 35.

Aissou M., Chemat-Djenni, Z., Yara-Varón, E., Fabiano-Tixier, A-S., Chemat, F., 2017. Limonene as an agro-chemical building block for the synthesis and extraction of bioactive compounds. Comptes Rendus Chimie 20 (4) : 346-358. https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.05.018.

Aïssaoui L., 2014. Etude écophysiologique et systématique des Culicidae dans la région de Tébessa et lutte biologique. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Badji Mokhtar –ANNABA. pp 99.

Ait-Ouazzou A., Lorán S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R., Conchello P., 2012. Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. Food Res. Int. 45 (1): 313–319.

Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R., Conchello, P., 2011 Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. J Sci Food Agric. 91(14) :2643-51. doi: 10.1002/jsfa.4505.

Akono, N.P., Belong, P., Tchoumbougnang, F., Fils, E-M, B., Fankem, H., 2012: Composition chimique et effets insecticides des huiles essentielles des feuilles fraîches d'*Ocimum canum* Sims et d'*Ocimum basilicum* L. sur les adultes d'Anopheles funestus ss, vecteur du paludisme au Cameroun. Journal of Applied Biosciences. 59: 4340– 4348.

Alavez-Rosas, D., Socorro-Benitez, C., Cruz-Esteban, S., 2022. Repellent and adulticidal effect of essential oils mixtures on *Aedes aegypti* females. International Journal of Tropical Insect Science. https://doi.org/10.1007/s42690-021-00716-z.

Alphey, L. Genetic Control of Mosquitoes. Annual Review of Entomology 2014, 59, 205–224, doi:10.1146/annurev-ento-011613-162002.

Al-Ghanim, K.A., Krishnappa, K., Pandiyan, J., Nicoletti, M., Gurunathan, B., Govindarajan, M., 2023. Insecticidal potential of *Matricaria chamomilla's* essential oil and its components (E)-β-Farnesene, Germacrene D, and α-Bisabolol Oxide A against agricultural pests, Malaria, and Zika virus vectors. Agriculture. 13, 779. https://doi.org/10.3390/agriculture13040779.

Al-Harbi, N.A., Al Attar, N.M., Hikal, D.M., Mohamed, S.E., Abdel Latef, A.A.H., Ibrahim, A.A., Abdein, M.A., 2021. Evaluation of insecticidal effects of plants essential oils extracted from Basil, black seeds and lavender against *Sitophilus oryzae*. Plants. 10, 829.

Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., Anwar, F., 2015. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 5, 601–611.

Alimi, D., Hajri, A., Jallouli, S., Sebai., H., 2022. Acaricidal and anthelmintic efficacy of *Ocimum basilicum* essential oil and its major constituents estragole and linalool, with insights on acetylcholinesterase inhibition. Veterinary Parasitology. 309:109743.

Aljaiyash, A., Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Labiad, H., Chaouch, A., 2018a. Effect of drying methods on yield, chemical composition and bioactivities of essential oil obtained from Moroccan *Mentha pulegium* L. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 16: 638–643.

Aljaiyash A., Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., Chaouch, A., 2018b. Effect of cultivation on chemical composition and bioactivities of essential oils from *Artemisia herba-alba* Asso grown in Morocco. Biochemical Systematics and Ecology 81: 74–79.

Almas, I., Innocent, E., Machumi, F., Kisinza., 2021. Chemical composition of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus maculata* grown in Tanzania. Scientific African. 12: e00758.

Al-Sarar, A.S., Hussein, H.I., Abobakr, Y., 2015. Chemical composition, adulticidal and repellent activity of essential oils from *Mentha longifolia* L. and *Lavandula dentata* L. against *Culex pipiens* L. J. Plant Prot. Path. Mansoura Univ. 5, 817–826.

Amalich, S., Zerkani, H., Cherrat, A., Dédianhoua, N., Soro, K., Bourakhouadar, M., Mahjoubi1, M., Hilali, E.L., Zair, T, F., 2016. Study on *Mentha pulegium* L. from M'rirt (Morocco): antibacterial and antifungal activities of a pulegone-rich essential oil. J. Chem. Pharm. Res. 8 (5), 363–370.

Amara Korba R, Alayat MS, Bouiba L, Boudrissa A, Bouslama Z, Boukraa S, Francis F, Failloux AB, Boubidi SC. Ecological differentiation of members of the *Culex pipiens* complex, potential vectors of West Nile virus and Rift Valley fever virus in Algeria. Parasit Vectors. 2016 Aug 17;9:455. doi: 10.1186/s13071-016-1725-9.

AMCA, 2012: American Mosquito Control Association . Best Practices for Integrated Mosquito Management. American Mosquito Control Association. Sacramento, CA.

Amer A., Mehlhorn, H., 2006. Larvicidal effects of various essential oils against Aedes, Anopheles, and Culex larvae (Diptera, Culicidae). Parasitol. Res. 99 (4): 466–472.

Amor G., Caputo, L., La Storia, A., De Feo, V., Mauriello, G., Fechtali, T., 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-Alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. Molecules. 2 : 402. https://doi.org/10.3390/molecules24224021.

Amraoui F., Krida G., Bouattour A., Rhim A., Daaboub J., Harrat Z., Boubidi S-C., Tijane M., Sarih M., Failloux AB., et al. (2012). *Culex pipiens*, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley Fever viruses in the Maghreb region. PLoS One. 7(5):e36757.

Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P., Rijo, P., 2018. *Rosmarinus Officinalis L.*: An update review of its phytochemistry and biological activity. *Futur. Sci. OA*, *4*, doi:10.4155/fsoa-2017-0124.

Angioni A., Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. stoechas essential oils from stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem. 54, 4364-4370.

Annemer, S., Farah, A., Stambouli, H., Assouguem, A., Almutairi, M.H., Sayed, A.A., Peluso, I., Bouayoun, T., Talaat Nouh, N.A.T., El Ouali Lalami, A., Ez zoubi, Y., 2022. Antimicrobial activity and chemometric investigation of the main components and the yield variation of *Salvia rosmarinus* Spenn essential oils. Molecules. 27, 2914. https://doi.org/10.3390/molecules27092914.

Anses, 2013. Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail. Hiérarchisation des insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle (LAV). Avis de l'Anses et Rapport d'expertise collective. Edition scientifique.

AMSE : Association des médecins de santé étrangers. 2018. Fiebre Chikungunya - Epidemiología y situación mundial. https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/658-fiebre-chikungunya (consulté le 03 Novembre 2023).

Asgharian H., Chang P.L., Lysenkov S., Scobeyeva V.A., Reisen W.K., Nuzhdin S.V., 2015. Evolutionary genomics of *Culex pipiens*: global and local adaptations associated with climate, life-history traits and anthropogenic factors. Proceeding of the Royal Society B. 1-10, http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2015.0728.

Aungtikun, J., Soonwera M., 2021. Improved adulticidal activity against *Aedes Aegypti* (L.) and *Aedes Albopictus* (Skuse) from synergy between *Cinnamomum* Spp. essential Oils. Scientific Reports. 11 (1): 1–12.

Auysawasdi, N., Chuntranuluck, S., Phasomkusolsil, S., Keeratinijakal, V., 2016. Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). Parasitol. Res. 115(1) : 99-106. http://dx.doi.org/10.1007/s00436-015-4725-3.

Babushok, V.I., Linstrom, P.J., Zenkevich, I.G., 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. J. Phys. Chem. Ref. Data. 40, 043101.

Badawy, M. E. I., Taktak, N. E. M., El-Aswad, A.F., 2017. Chemical composition of the essential oils isolated from peel of three citrus species and their mosquitocidal activity against *Culex Pipiens*. Nat Prod Res 32(23): 2829–2834.

Badawy, M.E., Taktak, N.E., Awad, O.M., Elfiki, S.A., Abou El-Ela, N.E., 2016. Preparation of ecofriendly formulations containing biologically active monoterpenes with their fumigant and residual toxicities against adults of *Culex pipiens*. J Trop Med. 2016:8540830. https://doi.org/10.1155/2016/8540830.

Baptiste, J.H.F., P. Michel Jazet Dongmo, F. Fekam Boyom,. 2020. Essential oil's chemical composition and pharmacological properties, In book: Essential Oils - Oils of Nature. pp. 1–23.

Baranitharan, M., Gokulakrishnan, J., Krishnappa, K., Pandiyan, J., Elumalai, K., 2021. *Lavandula angustifolia* essential oil phyto-compounds as leads to potential mosquitocides. International Journal of Atmospheric and Oceanic Sciences. 5(1):6.

Bedini, S., Guarino, S., Echeverria, C.M., Flamini, G., Ascrizzi, R., Loni, A., Conti, B., 2020. *Allium sativum*, *Rosmarinus officinalis*, and *Salvia officinalis* essential oils: A spiced shield against blowflies. Insects. 11(3):1–18.

Bedini, S., Flamini, G., Ascrizzi, R., Venturi, F., Ferroni, G., Bader, A., Girardi, J., Conti, B., 2018. Essential oils sensory quality and their bioactivity against the mosquito *Aedes albopictus*. Scientific Reports. 8:17857.

Behi, F., Bachrouch, O., Boukhris-Bouhachem, S., 2019. Insecticidal activities of *Mentha pulegium* L., and *Pistacia lentiscus* L. essential oils against two *Citrus Aphids* Aphis spiraecola Patch and *Aphis gossypii* Glover. TEOP. 22 (2):516 – 525.

Belhattab, R., Amor, L., Jose, G., Barroso, L., Pedro, G., Figueiredo, C.A., 2014. Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey Arabian Journal of Chemistry.7, 243–251.

Bellili, S., Jazia, S., Hrira, M.Y., Lamari, A., Dhifi, W., Fethi Diouani, M., Araujo, M.E., Cioni, P.L., Flamini, G., Cherif, A., and Mnif, W., 2017. Phytochemical identification of volatile fraction, essential oil and screening of antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal potential from *Artemisia herba-alba* leaves. Main Group Chemistry. 16: 95–109.

Bellili, S., Dhifi, W., Ben Khsif Al-Garni, A., Flaminie, G., Mnif, W., 2016. Essential oil composition and variability of *Artemisia herba-alba Asso.* growing in Tunisia: Comparison and chemometric investigation of different plant organs. J. Appl. Pharm. Sci. 6, 038–042.

Benayad, N., 2013. Évaluation de l'activité insecticide et antibactérienne des plantes aromatiques et médicinales Marocaines. Extraction de métabolites secondaires des champignons endophytiques isolés de plantes Marocaines et activité anticancéreuse. Faculté des Sciences de Rabat.

Ben-Ari, Y.; Khalilov, I.; Kahle, K.; Cherubini, E. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. Neuroscientist 2012, 18, 467–486.

Ben Chaaban S., Haouel-Hamdi, S., Bachrouch, O., Mahjoubi, K., Mediouni Ben Jemâa, J., 2022. Fumigant toxicity of four essential oils against the carob moth *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella*. Int J Environ Health Res. 4: 1-13. https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2152431.

Ben Chaaban, S., Haouel Hamdi, S., Mahjoubi, K., Mediouni Ben Jemâa, J., 2019. Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois ceratoniae Zeller and Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Plant Diseases and Protection. https://doi.org/10.1007/s41348-019-00218-8.

Bendali-Saoudi F., 2006. Etude bioécologique, systématique et biochimique des Culicidae (Diptera- Nematocera) de la région d'Annaba. Lutte Biologique anticulicidiènne. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Badji Mokhtar.

Benelli G., Pavela R., Rakotosaona R., Nzekoue F.K., Canale A., Nicoletti M., Maggi F., 2020. Insecticidal and mosquito repellent efficacy of the essential oils from stem bark and wood of Hazomalania voyronii. Journal of Ethnopharmacology, Volume 248. 112-333. https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112333.

Benelli, G., Duggan, M. F., 2018. Management of arthropod vector data – Social and ecological dynamics facing the One Health perspective. Acta Trop.182: 80–91,.

Benelli, G., Beier, J.C., 2017. Current Vector Control Challenges in the Fight against Malaria. Acta Trop. 174:91–96.

Benelli, G., Romano, D., 2017. Mosquito vectors of *Zika* virus. Entomol. Gen. 36 (4): 309–318.

Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F., 2017a. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: synergistic and antagonistic effects. Parasitol. Int. 66 : 166–171.

Benelli, G., Pavela, R., Iannarelli, R., Petrelli, R., Cappellacci, L., Cianfaglione, K., Afshar, F.H., Nicoletti, M., Canale, A., Maggi, F., 2017b. Synergized mixtures of Apiaceae essential oils and related plant-borne compounds: larvicidal effectiveness on the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* Say. Ind. Crop. Prod. 96, 186–195.

Benelli, G., Mehlhorn, H., 2016. Declining malaria, rising of dengue and *Zika* virus: insights for mosquito vector control. Parasitol. Res.115 (5): 1747–1754.

Benelli, G., 2015. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. Parasitol. Res. 114 (8): 2801–2805.

Benelli, G., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Luigi Cioni, P., Amira, S., Benchikh, F., Laouer, H., Di Giuseppe, G., Conti, B., 2015. Mediterranean essential oils as effective weapons against the West Nile vector *Culex pipiens* and the echinostoma intermediate host *Physella acuta*: what happens around? An acute toxicity survey on non-target mayflies. Parasitol Res. 114(3) :1011–1021.

Ben Hassine D., Abderrabba, M., Yvon, Y., Lebrihi, A., Mathieu, F., Couderc, F., Bouajila, J., 2012. Chemical composition and in vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. Molecules. 17 : 9540-9558. doi:10.3390/molecules17089540.

Benlamdini, N., Elhafian, M., Rochdi, A., Zidane, L., 2014. Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya). J. Appl. Biosci. 78, 6771. https://doi.org/10.4314/jab.v78i1.17.

Ben Slimane, B., Ezzine, O., Dhahri, S., Chograni, H., Ben Jamaa, M. L, 2015. Chemical composition of *Rosmarinus* and *Lavandula* essential oils and their insecticidal effects on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). Asian Pacificjournal of Tropical Medicine. 98-103.

Ben Slimane, B., Ezzine, O., Dhahri, S., Ben Jamaa, M. L., 2014. Essential oils from two *Eucalyptu*s from Tunisia and their insecticidal action on *Orgyia trigotephras* (Lepidotera, Lyrnantriidae). Biol Res. 47:29. https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-29.

Berchi, S., 2000. Bio écologie de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttes. Thèse de doctorat, Université de Constantine, Algérie : p .133.

Bertella, A., Benlahcen, K., Abouamama, S., Pinto, C.G.A., Maamar, K., Kihal, M., Silva, A.M.S., 2018. *Artemisia herba-Alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. Industrial Crops & Products. 116: 137–143.

Bey-ouldsisaid et al. 2016. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruit. Industrial Crops and Products. 89:167–175.

Bezerra, M.A., Lemos, V.A., Novaes, C.G., de Jesus, R.M., Souza Filho H.R., Araújo, S.A., Alves, J.P.S., 2020. Application of mixture design in analytical chemistry, Microchem. J. 152: 104336.

Bhanu Prakash K. S., 2015. Toxicity and biochemical efficacy of chemically characterized *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Sitophilus oryzae* and *Oryzaephilus surinamensis*. Industrial Crops and Products. 74: 817–823.

Bill and Melinda Gates Foundation and Boston Consulting Group. 2007. Report: Market Assessment for Public Health Pesticide Products.

Bogh C., Pedersen E. M., Mukoko D. A., and Ouma J. H. (1998). Permethrin-impregnated bednet effects on resting and feeding behaviour of lymphatic filariasis vector mosquitoes in Kenya. Medical and Veterinary Entomology. 12: 52-59.

Bouguerra, N., Tine Djebbar, F., Soltani, N., 2017. Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. International Journal of Mosquito Research. 4(1): 37-42.

Boukraa S., Dekoninck W., Versteirt V., Schaffner F., Coosemans M., Haubruge E. & Francis F. (2015). Updated checklist of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Belgium. Journal of Vector Ecology, 40 (2), 398-407.

Boukraa, N., Ladjela, S., Benlamoudid, W., Goudjila, M.B., Berrekbiad, M., Eddoud, A., 2022. Insecticidal and repellent activities of *Artemisia herba alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L and *Rosmarinus officinalis* L essential oils in synergized combinations against adults of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 45: 102513.

Boulamtat, R., Mesfioui, A., El-Fakhouri, K., Oubayoucef, A., Sabraoui, A., Aasfar, A., El-Bouhssini, M., 2021. Chemical composition, and insecticidal activities of four plant essential oils from Morocco against larvae of *Helicoverpa armigera* (Hub.) under field and laboratory conditions. Crop Protection. 144:105607.

Bousses P., Dehecq J. S , Fontenille D., 2022. Les moustiques de l'île de la réunion/ Chapitre

7. Caractères diagnostiques des genres présents à La Réunion. IRD Éditions. p. 85-105.

Bousbia, N., Vian, M.A., Ferhat, M.A., Petitcolas, E., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2009. Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. Food Chemistry. 114 (1): 355-362, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Ahmed, T., Fellah, H., Abrini, J., Dakka, N., 2017a. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microbial Pathogenesis. https://doi: 10.1016/ j.micpath.2017.08.015.

Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., El Yahyaoui, A., El Idrissi Abrini, J., Dakka, N., 2017b. In vitro screening of antibacterial and antioxidant activities of essential oils from four Moroccan medicinal plants. Microbiology Research Journal International. 18(4): 1-10.

Bouyahya, A., Bakri, Y., El Ouardy, K., Edaoudi, F., Talbaoui, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Dakka, N, 2017c. Antibacterial, antioxidant and antitumor properties of Moroccan medicinal plants: A review. Asian Pac J Trop Dis. 7(1): 57-64.

Bourguet, D., Roig, A., Toutant, J., Arpagaus, M., 1997. Analysis of molecular forms and pharmacological properties of acetylcholinesterase in several mosquito species. Neurochem. Int., 31, 65–72.

Bueno-Marí R., Bernués Bañeres A. & Jiménez-Peydró R. (2012). Updated checklist and distribution maps of mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Spain. European Mosquito Bulletin [Journal of the European Mosquito Control Association], 30, 91-126.

Bueno-Marí R., Bernués Bañeres A. & Jiménez-Peydró R. (2014). Biodiversity and Larval Habitat Heterogeneity of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Northern Spain. Acta Zoologica Bulgarica, 66 (4), 547-554.

Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique, 2016. A Technical Report: Zika Virus Risk Assessment in the WHO African region, WHO Regional Office for Africa. WHOAFRO.

Bureau régional de l'OMS pour l'Afrique, 2019 : Cadre de mise en œuvre de l'action mondiale pour lutter contre les vecteurs dans la région africaine de l'OMS. Soixante-neuvième session brazzaville, république du congo. Comité Régional de L'afrique. AFR/RC69/9.

BRMO, 2017 : Bureau Régional de la Méditerranée orientale. Le paludisme au Maroc-Une lutte sans relâche, une perspective d'élimination. Organisation mondiale de la santé (WHO-EM/MAL/345/F).

Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Falconieri, D., Yalaoui Guellal, D., Elsebai, M.F., Madani, K., Chibane, M., 2016. Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. Ind. Crops Prod. 88: 96–105. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.002.

Brandão, L.B., Santos, L.L., Martins, R.L., Rodrigues, A.B.L., Costa, A.L.P., Faustino, C.G., Almeida, S.S.M.S., 2022. The potential effects of species *Ocimum basilicum* L. on health: A Review of the chemical and biological studies. Pharmacog Rev.16(31):22-6.

Brown, C.R. and O'Brien, V.A., 2011. Are wild birds important in the transport of Arthropod-borne viruses? Ornithol. Monogr., 71: 48p.

Brunhes J, Rhaim A, Geoffroy B, Hervy JP (2000) Mosquitoes of the Mediterranean Africa: Software Identification and Education, IRD & IPT, CD-ROM (Didactiques), IRDIRD editions, Paris.

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E.E.,2011. Repellent activity of essential oils and some of their individual constituents against *Tribolium castaneum* Herbst. J. Agric. Food Chem. 59: 1690–1696.

Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., et al. 2010 : Epidemiology of west Nile in Europe and in the Mediterranean basin. Open Virol J. 4: 29-37.

CDC. 2023 : Centres pour le contrôle et la prévention des maladies des États-Unis. Malaria : Une première propagation au pays en 20 ans. https://www.lapresse.ca/international/etats-unis/2023-06-26/malaria/une-premiere-propagation-au-pays-en-20-ans.php (Consulté 3/11/2023).

CDCP: Centers for Disease Control and Prevention, 2020. Malaria's Impact Worldwide https://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/impact.html (Consulté le 1/11/2023).

Chahboun, N., Esmail, A., Abed, H., Barrahi, M., Amiyare, R., Berrabeh, M.H., 2015. Evaluation de l ' activité bactériostatique d ' huile essentielle de la *Lavandula Officinalis* vis-à- vis des souches d ' origine clinique résistantes aux antibiotiques. Jme. 6 (4): 1186–119.

Chemat, F., Vian, M.A., Cravotto, G., 2012. Green extraction of natural products: Concept and principles.
International Journal of Molecular Sciences; 13 (7): 8615-8627.

Chemat, S., Tomao, V., Chemat, F., 2012. Limonene as green solvent for extraction of natural products. Chapter 5. A. Mohammad and Inamuddin (eds.), Green Solvents I: Properties 175 and Applications in Chemistry, https://doi.org/10.1007/978-94-007-1712-1_5.

Chemat-Djenni, Z., Ferhat, M.A., Tomao, V., Chemat, F., 2010. Carotenoid extraction from tomato using a green solvent resulting from orange processing waste. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 13:2, 139-147, https://doi.org/10.1080/0972060X.2010.10643803.

Chen, Y., Luo, J., Zhang, N., Yu, W., Jiang, J., Dai, G., 2021. Insecticidal activities of *Salvia hispanica* L. essential oil and combinations of their main compounds against the beet armyworm *Spodoptera exigua*). Ind. Crop. Prod. 162, 113271.

Cheng, S.S., Huang, C.G., Chen, Y.J., Yu, J.J., Chen, W.J., Chang, S.T., 2009. Chemical composition and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. Bioresour Technol. 100 (1):452–56.

Chenni, M., El Abed, D., Rakotomanomana, N., Fernandez, X., Chemat, F., 2016. Comparative study of essential oils extracted from Egyptian basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) using hydro-distillation and solvent-free microwave extraction. Molecules. 21(1):E113.

Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pag´an, R., Laglaoui, A., Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes, Innovative Food Science and Emerging Technologies. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.016.

Chirico, F., Magnavita, N., 2019. West Nile virus infection in Europe: need for an integration of occupational health practice and public health activities. Ann Ist Super Sanità. 55 (1): 3-5.

Choi, W.S., Park, B.S., Lee, Y.H., Jang, D.Y., Yoon, H.Y., Lee, S.H., 2006. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. J Crop Prot. 25(4):398–401

Choi, W.S., Park, B.S., Ku, S.K., Lee, S.E., 200. Repellent activities of essential oils and monoterpenes. J Am Mosq Control Assoc. 18(4):348–351.

Clé, M., Salinas, S., Lecollinet, S., Beck C., Gutierrez, S., Baldet, T., Philippe, P.V., Foulongne, V., Simonin, V., 2018. Le virus Usutu : la menace fantôme. médecine/sciences. 34:709-16.

COE: Council of Europe. European Directorate for the Quality of Medicines., 2007. European Pharmacopoeia, 6th ed. COE, Strasbourg.

Coelho, L., de Paula, L.G.F., das Grac¸as Alecrim Alves, S., Sampaio, A.L.N., Bezerra, G.P., Vilela, F.M.P., da Silva Matos, R., Zeringota, V., Borges, L.M.F., Monteiro, C., 2019. Combination

of thymol and eugenol for the control of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato: Evaluation of synergism on immature stages and formulation development. Vet. Parasitol. 277: 108989.

Conti, B., Canale, A., Bertoli, A., Gozzini, F., Pistelli, L., 2010. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 107: 1455–1461.

CNEV. 2014. National Center of Expertise on Vectors, "Use of insecticides and resistance management", p. 10-70.

Cruz-Castillo, A.U., Rodríguez-Valdez, L.M., Correa-Basurto, J., Nogueda-Torres, B., Andrade-Ochoa, S., Nevárez-Moorillón, G.V., 2023. Terpenic constituents of essential oils with larvicidal activity against *Aedes Aegypti*: A QSAR and docking molecular study. Molecules. 28: 2454. https://doi.org/10.3390/ molecules28062454.

Cruz Glaucilane, S., Wanderley-Teixeira, V., da Silva, L.M., Dutra, K.A., Guedes, C.A., de Oliveira, J.V., Navarro, D.M.A.F., Araújo, B.C., Teixeira, A.A.C., 2017. Chemical composition and insecticidal activity of the essential oils of *Foeniculumvulgare* Mill., *Ocimum basilicum* L., *Eucalyptusstaigeriana* F. Muell. ex Bailey, *Eucalyptuscitriodora* Hook and *Ocimum gratissimum* L. and their major components on *Spodopterafrugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Essential Oil Bearing Plants. 20 (5): 1360-1369. https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1383192.

Dahchar, Z., 2017. Inventaire des Culicidae de la région Ouest de la ville d'Annaba. Etude bio-écologique, systématique des espèces les plus abondantes. Lutte biologique anti larvaire par les extraits aqueux de quelques plantes (Médicinales et toxiques) et le Bacillus thuringiensis israelensis H14. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba pages 1-17.

Dahmani-Hamzaoui, N., Baaliouamer, A., 2010. Chemical composition of Algerian *Artemisia herbaalba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. Journal of Essential Oil Research. 22(6):514-517. https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700386.

Da Rocha, G.D.V., dos Santos, D.L., Lima, J.A., dos Santos, C.L.K., Lima, J.P.B., dos Santos, A.L.L., 2018. Evaluation of larvicidal, adulticidal, and anticholinesterase activities of essential oils of *Illicium verum* hook. F., pimenta dioica (l.) merr., and *Myristica fragrans* houtt. against *Zika* virus vectors. Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (23): 22541–51.

Dejoye Tanzi, C., Abert Vian, M., Ginies, C., Elmaataoui, M., Chemat, F., 2012. Terpenes as green solvents for extraction of oil from microalgae. Molecules. 9:17 (7): 8196-205. https://doi.org/10.3390/molecules17078196.

Denkova-Kostova, R., Teneva, D., Tomova, T., Goranov, B., Denkova, Z., Shopska, V., Slavchev, A., Hristova-Ivanova, Y., 2020. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of essential oils from tangerine (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.), lemon (*Citrus lemon* L.) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume). Z. Naturforsch. 76(5–6)c: 175–185.

De Paula Martins P., Gomes R. A.S., Malpass, A.C.G., Hitomi Okura, M., 2019. Chemical characterization of *Lavandula dentata* L. essential oils grown in Uberaba-MG. Ciencia Rural. 49 (8).

Darriet F. (2014). Des moustiques et des hommes : Chronique d'une pullulation annoncée. IRD Édition, Collection didactiques. Marseille.

Dassanayake, M.K.; Chong, C.H.; Khoo, T.-J.; Figiel, A.; Szumny, A.; Choo, C.M. Synergistic Field Crop Pest Management Properties of Plant-Derived Essential Oils in Combination with Synthetic Pesticides and Bioactive Molecules: A Review. Foods 2021, 10, 2016. https:// doi.org/10.3390/foods10092016.

Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A., 2010. GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 6 : 191-198.

Deschepper. R., 2017. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Sciences pharmaceutiques. Thèse de doctorat en Pharmacie. ffdumas-01515314.

Devi, M.A., Nameirakpam, B., Devi, T.B., et el. 2020. Chemical compositions and insecticidal efficacies of four aromatic essential oils on rice weevil *Sitophilus oryzae L.* International Journal of Tropical Insect Science.

Diara, R., Novo, M., Matos, O., Figueiredo, A.C., Delgado, M., Marilene, M.D., Cabral, Liberato, M., Moiteiro,C., 2015. Potential of *Mentha pulegium* for mosquito control Potencialidade da Menta pulegium no 145onfide de mosquitos Revista de Ciências Agrárias. 38(2): 155-165.

Diass, K., Brahmi, F., Mokhtari, O., Abdellaoui, S., Hammouti, B., 2021. Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. Materials Today: Proceedings. 45: 7768–7773.

Diass, K., Merzouki, M., Elfazazi, K., Azzouzi, H., Challioui, A., Azzaoui, K., Hammouti, B., Touzani, R., Depeint, F., Ayerdi Gotor, A., et al. 2023. Essential oil of *Lavandula officinalis*: Chemical composition and antibacterial activities. Plants, 12, 1571. https://doi.org/10.3390/ plants12071571

Diaz, L.A., Flores, F.S., Quaglia, A., Contigiani,. M.S., 2013. Intertwined arbovirus transmission activity: Reassessing the transmission cycle paradigm. Front. Physiol. 3:1–7.

Dickens, J.C., Bohbot, J.D., 2013. Mini Review: Mode of action of mosquito repellents. Pestic Biochem Physiol. 106(3):149–155.

Di Luca M, Toma L, Boccolini D, Severini F, La Rosa G, Minelli G, et al. (2016) Ecological Distribution and CQ11 Genetic Structure of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) in Italy. PLoS ONE 11(1): e0146476. doi:10.1371/journal. pone.0146476

Djeddi, S., 2012. Méthodes d'extractions des huiles essentielles In : Les huiles essentielles ''des Mystérieux métabolites secondaires'' Manuel de formation destiné aux étudiants de Master. Editeur : Presse Académiques Francophones est une marque déposée de Sudwestdeu Tscher Verlag Fur Hochshulschriften GmbH & Co.KG. Collections du savoir. Pp 57.

Djenane, D., Lefsih, K., Yangüela, J., Roncalés, P., 2011. Composition chimique et activité anti-*Salmonella enteritidis* CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, de *Lavandula angustifolia* et de *Satureja hortensis*. Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C. Phytothérapie. 9: 343–353.

Dris, D., Tine-Djebbar, F.,Soltani, N., 2017a. *Lavandula dentate* essential oils: chemical composition and larvicidal activity against *Culiseta longiareolata* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). African Entomology. 25 (2): 387–394.

Dris, D., Tine-Djebbar, F., Bouabida, H., Soltani, N., 2017b. Chemical composition and activity of an *Ocimum basilicum* essential oil on *Culex pipiens larvae*: Toxicological, biometrical and biochemical aspects. South African Journal of Botany. 113: 362–369.

DuRose R., 2023: Half the world is at risk of dengue. Why is there no universal way to prevent it? https://www.vox.com/platform/amp/future-perfect/2023/5/18/23724011/dengue-fever-mosquitos-virus-vaccines (consulté le 3 novembre 2023).

Ebadollahi, A., Ziaee, M., Palla, F., 2020. Essential oils extracted from different species of the Lamiaceae plant family as prospective bioagents against several detrimental pests. Molecules. 28, 25(7) :1556. https://doi.org/10.3390/molecules25071556.

Ebadollahi, A., Davari, M., Razmjou, J., Naseri, B., 2017. Separate and combined effects of *Mentha piperata* and *Mentha pulegium* essential oils and a pathogenic fungus *Lecanicillium muscarium* against *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). J. Econ. Entomol. 110: 1025–1030.

Ebadollahi, A., 2013. Essential oils isolated from Myrtaceae family as natural insecticides. Ann. Rev. Res. Biol., 3: 148–175.

ECDPC. 2010: European Centre for Disease Prevention and Control, "Consultation on mosquito-borne disease transmission risk in Europe," no. November, pp. 1–9, 2010.

ECDPC. 2018. European Centre for Disease Prevention and Control. Dengue. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm.

El-Akhal, F., Ramzi, A., Farah, A., Ez Zoubi, Y., Benboubker, M., Taghzouti, K., El Ouali Lalami, A., 2021a. Chemical composition and larvicidal activity of *Lavandula angustifolia* subsp. *angustifolia* and *Lavandula dentata* spp. *dentata* essential oils against *Culex pipiens* larvae, vector of West Nile virus. Psyche J. Entomol. 2021.

EL-Akhal, F., Guemmouh, R., Ez zoubi, Y., Fadil, M., El Ouali Lalami, A., 2021b. Survey on plants used by the population of Fez City (central Morocco) as bioinsecticides in the control of insects responsible for vector-borne diseases. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 11(02): 106-113.

El-Akhal F., Ezzoubi,Y., Taghzouti, K., El Ouali Lalami, A., 2018. Chemical composition and larvicidal activity of *Mentha pulegium* essential oil from Central Morocco against larvae of mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research. 9(7): 1011-1016.

El-Akhal, F., Saad., M., Adlaoui, E. B., et al. 2016. Resistance of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to organophosphate insecticides in Centeral Morocc. International Journal of Toxicological and Pharmacological Research. 8 (4): 263–568.

EL-Akhal, F., Guemmouh, R., Greche, H., El Ouali Lalami, A., 2014. Valorization as a bio-insecticide of essential oils of *Citrus sinensis* and *Citrus aurantium* cultivated in center of Morocco. J Mater Environ Sci. 5(S1):2319–2324.

El Asbahani, A., Jilale, A., Voisin, S.N., Aït Addi, E. habib, Casabianca, H., El Mousadik, A., Hartmann, D.J., Renaud, F.N.R., 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of nine essential oils obtained by steam distillation of plants from the Souss-Massa Region (Morocco). J. Essent. Oil Res. 27, 34–44. https://doi.org/10.1080/10412905.2014.964426.

El-Aswad, A.F., Abdelgaleil, S.A.M., 2008. Insecticidal, antifeedant and molluscicidal potential of essential oils extracted from Egyptian plants. J. Egypt. Soc. Toxicol, 38, 81–91.

El-Ghorab, A. H., 2006. The chemical composition of the *Mentha pulegium* L. essential oil from egypt and its antioxidant activity. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 9:2.

El Harrak M., Le Guenno B., & Gounon P. (1997). Isolement du virus West Nile au Maroc. *Virologie*, 1 (3), 248-249.

Eljazi Jazia Sriti, Zarroug, Y., Aouini, J., Salem, N., Bachrouch, O., Boushih, E., Selim, J., Médiouni Ben Jemâa, J., Limam, F., 2020. Insecticidal activity of Artemisia herba-Alba and effects on wheat flour quality in storage. Journal of Plant Diseases and Protection. 2020.

El Joubari, M., Faraj, C., Louah, A., Himmi, O., 2015. Sensibilité des moustiques *Anopheles labranchiae*, *Culex pipiens*, *Ochlerotatus detritus* et *Ochlerotatus caspius* de la région de Smir (Nord-Ouest du Maroc) aux organophosphores utilisées en santé publique. Environnement, Risques & Santé. 14 (1) : 72–79.

Ellouze, M.A., 2014. Kinetics of extraction of *Citrus aurantium* essential oil by hydrodistillation: influence on the yield and the chemical composition. J. Mater. Environ. Sci. 5 (3):841-848.

Elouaddari, A., El Amrani, A., Jamal Eddine., J., 2015. Effect of the parts of plant material (Flowers and Leaves) on essential oil chemical composition of *Ormenis mixta* from Morocco. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 18:2, 398-408. https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.935022.

El Meskaoui, A., Bousta, D., Dahchour, A., Greche, H., Harki, E., Farah, A., Ennablli, A., 2008. Plantes medicinales et aromatiques Marocaines: opportunites et défis. revue afn maroc n°: 2-3.

El Ouahdani, K., Es-Safi, I., Mechchate, H., Al-Zahrani, M., Qurtam, A.A., Aleissa, M., Bari, A., Bousta, D., 2021. *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba-alba* essential oils: Chemical analysis, antioxidant potential and in-vivo anti Inflammatory, analgesic activities, and acute toxicity. Molecules. 26 (22):6780.

El Ouali Lalami, A., EL-Akhal, F., Maniar, S., Ezzoubi, Y., Taghzouti, K., 2016. Chemical constituents and larvicidal activity of essential oil of Lavandula stoechas (Lamiaceae) from Morocco against the malaria vector *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae). Inter. J Pharm Phytochem Res. 8(3): 505-511.

El Ouali Lalami, A., El Hilali, O., Benlamlih M., Merzouki, M., Raiss, N., Ibnsouda Koraichi, S., Himmi, O., 2010. Etude entomologique, physicochimique et bactériologique des gîtes larvaires de localités à risque potentiel pour le paludisme dans la ville de Fès. Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie, n°32 (2), 119-127.

Enan E., 2001. Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 130 (3): pp. 325–337.

Erler, F., Ulug, I., Yalcinkaya, B., 2006. Repellent activity of five essential oils against *Culex pipiens*. Fitoterapia. 77: 491–494.

Essaqui, A., Khoudali, S., Es seddiki, S., 2016. Drying effect on yield and chemical composition of essential Oils of *Warionia saharae* from Morocco. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 19:4, 1031-1036. https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1024442.

Evans, P.D., 1981. Multiple receptor types for octopamine in the locust. J. Physiol., 318, 99–122.

Eybpoosh, S., Fazlalipour, M., Baniasadi, V., Pouriayevali, M.H., Sadeghi, F., Vasmehjani, A.H., Niya, M.H.K., Hewson, R., Salehi-Vaziri, M., 2019. Epidemiology of West Nile virus in the Eastern Mediterranean region: A systematic review. PLOS Negl. Trop. Dis. 13 (1).

Ez zoubi, Y., Bousta, D., Farah., A., 2020. A Phytopharmacological review of a Mediterranean plant: Lavandula stoechas L. Clinical Phytoscience. 6:9.

Ez zoubi, Y., Lairini S., Farah., A., Taghzouti, K., El Ouali Lalami., A., 2018. Antioxidant and antibacterial activities of *Artemisia herba-Alba* Asso essential oil from Middle Atlas, Morocco. Phytothérapie. https://doi.org/10.3166/phyto-2018-0057.

Ez zoubi, Y., El Ouali Lalami, A., Bousta, D., Polissiou, M., Daferera, D., Lachkar, M., El Khanchoufi, A., Farah, A., 2017. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and its fractions of *Lavandula stoechas* L. from Morocco. Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res. *8*, 60–67.

Fadil M., Fikri-Benbrahim, K., Rachiq, S., Ihssane, B., Lebrazi, S., Chraibi, M., Haloui, T., Farah, A., 2017 Combined treatment of *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Myrtus communis* L. essential oils against *Salmonella typhimurium*: Optimization of antibacterial activity by mixture design methodology. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb. 2017.06.002.

Fadil, 2015. Etude chimiométrique pour l'optimisation de l'extraction et la formation des huiles essentielles par la méthodologie des plans d'expériences et analyse des l'individualité par ACP et RLM : Cas de Thymus vulgaris L., Rosmarinus officinalis L., et Myrtus communis L. Thèse de Doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah.

Fadil M., Farah, A., Haloui, T., Rachiq, S., 2015. Optimisation des paramètres influençant l'hydrodistillation de *Rosmarinus officinalis* L. par la méthodologie de surface de réponse ;

Optimization of parameters influencing the hydrodistillation of Rosmarinus officinalis L. by response surface methodology, J. Mater. Environ. Sci. 6: 2346–2357.

Fanny, A., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F., 2012. Solvent-free ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process. Bioresource Technology. 114:457-465, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.096.

Farag, M.A, Ezzat, S.M., Salama, M.M., Tadros, M.G., 2016. Antiacetylcholinesterase potential and metabolome classification of 4 *Ocimum* species as determined via UPLC/qTOF/MS and chemometric tools. J Pharm Biomed Anal. 125 (Suppl C):292-302.

Farah, A., Satrani, B., Fechtal, M., Chaouch, A., Talbi, M., 2001. Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). Acta Botanica Gallica. 148:3, 183-190, https://doi.org/10.1080/12538078.2001.10515886.

Faraj, C., Adlaoui, E., Brengues, C., Fontenille, D., Lyagoubi, M., 2008. Résistance d'*Anopheles labranchiae* au DDT au Maroc : identification des mécanismes et choix d'un insecticide de remplacement. La Revue de Santé de la Méditerranée orientale. 14 (4).

Faraj, C., Adlaoui E., Rhajaoui M., Lyagoubi M., 2003. Estimation of malaria transmission in high-risk provinces of Morocco. East. Mediterr. Health J. 9 : 21-26.

Faraj, C., Elkohli. Lyagoubi, M., 2006. Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. Entomologie Médicale. Vol. 99, n° 2, p.119-121.

Faraj C, Ameur B, Himmi O, Sarih M, Herrak T, Harrak R, Ouahabi S, Mustapha K, Wahabi R, Maaroufi A. (2018). Enquête entomologique sur les vecteurs des arbovirus: Zika, Dengue et Chikungunya au Maroc, 2016-2017. *Bulletin d'Epidémiologie et de Santé Publique*, Volume 56, N 76).

Farooqui, T. Octopamine-mediated neuromodulation of insect senses. Neurochem. Res. 2007, 32, 1511–1529.

Fassil, H., E. H. M, and M. J.-L., 2012. "Aspects épidémiologiques de l'infection à virus West-Nile au Maroc," pp. 123–125.

Fekhar, N., Boutoumi, H., Krea, M., Moulay, S., Drioueche, A., Benmaamar, Z., 2017. Thionation of essential oils from Algerian *Artemisia Herba-Alba* L. and *Ruta Montana* L.: Impact on their antimicrobial and insecticidal activities. Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry. 12(2): 50-57.

Fernandes, J.N., Moise, I.K., Maranto, G.L., Beier, G.C., 2018. Revamping mosquito-borne disease control to tackle future threats. Trends Parasitol. 34(5):359–368.

Feroz, A., 2020. Efficacy and cytotoxic potential of deltamethrin, essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Cinnamonum camphora* and their synergistic combinations against stored product pest, *Trogoderma granarium* (Everts). J. Stored Prod. Res. 87, 101614. https://doi.org/10.1016/j.jspr.2020.101614.

Figueiredo, C.A., Barroso, J.G., Pedro, L.G., Scheffer, J.J.C.. 2008. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. Flavour and Fragrance Journal. 23 (4) : 213-226.

Figuerola, J., Baouab, R.E., Soriguer, R., Fassi-Fihri, O., Llorente, F., Jímenez-Clavero, M.A., 2009. West Nile virus antibodies in wild birds, Morocco, 2008. Emerg Infect Dis. 15(10):1651-3. https://doi.org/10.3201/eid1510.090340.

Finney, D., 1971. Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press, Cambridge.

Fontenille D., 2009. Maladies Vectorielles et Moustiques Vecteurs : Actualités et prévention sur le Littoral Méditerranéen. Journée d'information, 12 mai 2009, CRDP, Montpellier, France.

Ffrench-Constant RH, Daborn PJ., Le Goff G., 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. Trends Genet. 20:163– 170.

Franklinos, L. H. V., Jones, K. E., Redding, D. W., Abubakar, I., 2019. The effect of global change on mosquito-borne disease. The Lancet Infectious Diseases. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30161-6.

Fujiwara, G.M., Annies, V., de Oliveira, C.F., Lara, R.A., Gabriel, M.M., Betim, F.C., Nadal, J.M., Farago, P.V., Dias, J.F., Miguel, O.G., et al. 2017. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 139: 238–244.

Fundación, iO., 2023 : Junio 2023. Riesgo de West Nile virus en Italia. https://fundacionio.com/west-nile-virus-en-italia-3/; consulté le 6 juillet 2023.

Gaire, S., Scharf, M.E., Gondhalekar, A.D., 2019. Toxicity and neurophysiological impacts of plant essential oil components on bed bugs (Cimicidae: Hemiptera). Sci. Rep. 9: 3961.

García-Carrasco, J.M., Muñoz, A.R., Olivero, J., Segura, M., Real, R., 2021. Predicting the spatio-temporal spread of West Nile virus in Europe. PLOS Negl. Trop. Dis. 15 (1).

Germinara, G.S., Di Stefano, M.G., De Acutis, L., Pati, S., Delfine, S., De Cristofaro, A., Rotundo, G., 2017. Bioactivities of *Lavandula angustifolia* essential oil against the stored grain pest *Sitophilus 149onfidenc*. Bull Insectol 70(1):129–138.

Ghalbane, I., Alahyane, H., Aboussaid, H., Chouikh, N., Costa, J., Romane, A., El Messoussi, S., 2022.Chemical composition and insecticidal properties of Moroccan *Lavandula dentata* and *Lavandula stoechas* essential oils against Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. Neotropical Entomology. 51: 628–636.

Ghanmi, M., Satrani, B., Aberchane, M., Rchid, M.I., Aafi, A., El abid., A., 2011. Plantes aromatiques et médicinales au Maroc : Les milles et une vertus, centre de recherche forestier Maroc, haut-commissariat aux eaux et forêts et lutte contre la désertification, Edition collection Maroc Nature, P 310.

Ghrab, S., Sébastien, B., Marc, C., Bouaziz, S., Benzina, M., 2018. Adsorption of terpenes from *Eucalyptus globulus* onto modified beidellite. Applied Clay Science. 156:169–177.

Giray, S., E., Saliha, K., Alpaslan, K.D., Murat, T., Zgür, S., Memet, I., 2008. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. Talanta. 74: 930–5.

Giatropoulos, A., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D.P., Polissiou, M.G., Emmanouel, N., 2018. Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. Parasitol. Res. 117, 1953–1964. https://doi.org/10.1007/s00436-018-5892-9.

Golmakani, M.T., Mendiola, J.A., Rezaei, K., Iba´nez, E., 2014. Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of ˜ lipids from marine microorganisms, The Journal of Supercritical Fluids. http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.05.001.

Gopalakrishnan, N., 1994. Studies on the storage quality of CO2-extracted cardamom and clove bud oils. J. Agric. Food Chem. 42, 796–798. https://doi.org/10.1021/ jf00039a039.

Goupy, J., Creighton, L., 2007. Mixture Designs, Introd. to Des. Exp. Cary, NC Sas Inst. Inc. 287–306. https://doi.org/10.4236/am.2014.519298.

Govindarajan, M., Benelli, G., 2016. α-Humulene and β-elemene from *Syzygium zeylanicum* (Myrtaceae) essential oil: highly effective and eco-friendly larvicides against *Anopheles*

subpictus, Aedes albopictus, and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5025-2.

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S.L., Benelli, G., 2016a. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). Res Vet Sci. 104:77–82.

Govindarajan, M., Rajeswary, M., Hoti, S.L., Bhattacharyya, A., Benelli, G., 2016b. Eugenol, α-pinene and β-caryophyllene from *Plectranthus barbatus* essential oil as eco-friendly larvicides against malaria, dengue and Japanese encephalitis mosquito vectors. Parasitol. Res. 115: 807–815.

Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., Yogalakshmi, K., 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, Aedes albopictus and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). Experimental Parasitology. 134: 7–11.

Gracza, L., Ruff, P., 1981. The light–stability of trans-isoasarone and related compounds. Dtsch. Apoth. Ztg. 121, 2541–2544.

Grundy, D.L., Still, C.C., 1985. Inhibition of acetyl-cholinesterase by pulegone-1,2-epoxide. Pesticide Biochemistry and Physiology 23: 383–388.

Guenez, K., Tine-Djebbar, F., Tine, S., Soltani, N., 2014. Larvicidal Efficacy of *Mentha Pulegium* essential oil against *Culex Pipiens* L. and *Aedes Caspius* P. Larvae. World Journal of Environmental Biosciences. 7 (1): 1-7.

Guenther, E., 1948. Appendix II. Storage of essential oils. In: Guenther, E. (Ed.), The Essential Oils Vol. I: History – Origin in Plants – Production – Analysis. D. Van Nostrand, Toronto, New York, London, pp. 377–379.

Gurkan, B., Fedai, E., 2013. Evaluation of some essential oils and their major components against mushroom scatopsid flies as fumigants. Fresenius Environ. Bull. 22, 3170–3178.

Guzmán, P., Fernández, V., Graça, J., Cabral, V., Kayali, N., Khayet, M., Gil, L., 2014. Chemical and structural analysis of *Eucalyptus globulus* and *E. camaldulensis* leaf cuticles: A lipidized cell wall region. Frontiers in Plant Science. 2014:5.

Hamaidia H. Berchi S., 2018. Etude systématique et écologique des Moustiques (Diptera: Culicidae) dans la région de Souk-Ahras (Algérie). Volume 71. DOI: 10.25518/2030-6318.4052.

Hanif, M.A., Nisar, S., Khan, G.S., Mushtaq, Z., Zubair, M., 2019. Chapter 1: Essential Oils: Essential oil research trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production. pp. 3–17.

Hannour, K., Boughdad, A., Maataoui, A., Bouchelta, A., 2017. Chemical composition and toxicity of Moroccan *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) essential oils against the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) Zeller (Lepidoptera, Gelechiidae) JMES, Volume 8, Issue 2, Page 758-769.

Haouari, M., Ferchichi, A., 2009. Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. Molecules. 14, 1585-1594. https://doi.org/10.3390/molecules14041585.

Harbach, R.E., 2011. Classification within the cosmopolitan genus *Culex* (Diptera: Culicidae): the foundation for molecular systematics and phylogenetic research. Acta Tropica. 120: 1–14.

Harbach RE., 2012. *Culex pipiens*: Species versus species complex – Taxonomic history and perspective. J Am Mosq Control Assoc. 28(4s):10-23.

Harbach R.E., 2023. Mosquito Taxonomic Inventory. https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info//valid-species-list (consulté 10 novembre 2023)

Harkat-Madouri, et al., 2015. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. L. Industrial Crops and Products. 78: 148–153.

Hayes, E.B., Komar, N., Nasci, R.S., Montgomery, S., O'Leary, D.R., Campbell, G.L., 2005. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. CDC Emerg Infect Dis. 11(8): 1167–1173.

Hemingway J., Hawkes N., Prapanthadara L. A., Jayawardenal K. G. I., and Ranson H., 1998. The role of gene splicing, gene amplification and regulation in mosquito insecticide resistance. Philosophical Transactions of the Royal Society of London; *Series B-Biological Sciences.* 353: 1695-1699.

Hernández-Triana, L. M., de Marco, M.F, Karen, L., Thorne, M.L., Lumley, S., Marston, D., Fooks, A.A., Johnson, N., 2018. Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. Parasites & Vectors. 11:381.

Himmi, O., 2007. Les Culicides (Insectes, Diptères) au Maroc: Systématique, écologique et études épidémiologiques pilotes. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mohammed V, Rabat, pp 56.

Himmi, O., Dakki, M., Trari, B., 1995. Les Culicidae du Maroc: Clés d'identification, avec données biologiques et écologiques. Travaux de l'institut Scientifique Série Zoologie N° 44.

Hinane, D., Oubaha, S., Satrani, B., Ghanmi, M., Bourkhiss, B., 2020. Domestication of the endemic plant of Morocco and high added value: *Artemisia herba alba*. J. Mater. Environ. Sci. 11 (2): 283-292.

Houti, H., Ghanmi, M., Satrani, B., Mansouri, F.E., Cacciola, F., Sadiki, M., Boukir, A., 2023. Moroccan endemic *Artemisia herba-alba* Essential Oil: GC-MS analysis and antibacterial and antifungal investigation. *Separations*. 10(1):59. https://doi.org/10.3390/separations10010059.

Huang, Y.J.S., Higgs, S., Van Landingham, D.L., 2016. Biological control strategies for mosquito vectors of arboviruses. Insects. 8(1):21. https://doi.org/10.3390/insects8010021.

Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Front. Microbiol. 3. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, Volume 12, Issue 2, 2011, Pages 163-170. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.02.002.

Isikber, A.A., Alma, M.H., Kanat, M., Karci, A., 2006. Fumigant toxicity of essential oils from *Laurus nobilis* and *Rosmarinus officinalis* against all life stages of *Tribolium confusum*. Phytoparasitica. 34 : 167–177.

Ismaili, M. R., Ramzi, H., Fidah, A., Rahouti, M., Kabouchi, B., Aberchane, M., 2019. Chemical variability and acaricidal activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. Moroccan Journal of Chemistry. 4: 636-65. https://revues.imist.ma/?journal=morjchem&page=login..

Isman, M.B., Miresmailli, S., Machial, C., 2011. Commercial opportunities for pesticides based on plant essential oils in agriculture, industry and consumer products. Phytochem. Rev. 10: 197–204.

IRAC. 2017. Insecticide Résistance Action Commitee. Résistance mechanisms. http://www.iraconline.org/about/resistance/mechanisms (Consulté le 5 Novembre 2023).

Jafari, F., Ramezani, M., Nomani, H., Sadegh Amiri, M., Tafazoli Moghadam, A., Sahebkar, A., Emami, S.A.,

Hooshang Mohammadpour, A., 2021. Therapeutic effect, chemical composition, ethnobotanical profile of *Eucalyptus globulus*: A Review. Letters in Organic Chemistry. 18: 419-452 .

Jamaleddine, M., El Oualidi, J., Taleb, M.S., El Alaoui-Faris, F.E., Benzine, A., 2019. Les plantes aromatiques et médicinales au Maroc : statut, endémisme, chorologie et bioclimat. Mt. 25 (3) : 185-191. https://doi.org/10.1684/met.2019.0776.

Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszkowska, J., 2018. Stankiewicz, M. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—A Review. Molecules. 23: 34.

Jugreet, B.S., Suroowan, S., Rengasamy, R.R.K., Mahomoodally, M.F., 2020. Trends Food Sci. Technol., 101, 89–105.

Kéita, S.M., Vincent, C., Schmit, J.P., Arnason, J.T., Bélanger, A., 2001. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. J. Stored Prod. Res. 37: 339–349.

Kettani, K., Ebejer, J.M., Ackland, D. M., 2022. Catalogue of the Diptera (Insecta) of Morocco—an annotated checklist, with distributions and a bibliography. ZooKeys. 1094: 1–466.

Khan, M.U., Li, P., Amjad, H., Khan, A.Q., Arafat, Y., Waqas, M., Li, Z., Noman, A., Islam, W., Wu, L., 2019. Exploring the potential of overexpressed OsCIPK2 rice as a nitrogen utilization efficient crop and analysis of its associated rhizo-compartmental microbial communities. Int. J. Mol. Sci. 20: 3636.

Kharoubi R., Rehimi, N., Khaldi, R., Haouari Abderrahim, J., Soltani, N., 2021. Phytochemical Screening and insecticidal activities of essential oil of *Menthaxpiperita* L. (Lamiales: Lamiaceae) and their enzymatic properties against mosquito *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Journal of Essential Oil Bearing Plants. 24:1, 134-146,

Khia A., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A., Aberchane M., Quaboul B., Chaouch A., Amusant N., Charrouf Z.. 2014. Effet de la provenance sur la qualité chimique et microbiologique des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L. du Maroc. Phytothérapie. 12 (6) : 341-347.

Khmiri, A., Samet, B., Chaabouni, M., 2012. A cross mixture design to optimise the formulation of a ground waste glass blended cement, Constr. Build. Mater. 28:680–686.

Khorshidi, J., Rahmat, M., Fakhr Tabatabaei, M., Himan, N., 2009. Influence of Drying Methods, Extraction Time, and Organ Type on Essential Oil Content of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Nature and Science. 7 (11).

Kim, N.J., Byun, S.G., Cho, J.E., Chung, K., Ahn, Y.J., 2008. Larvicidal activity of *Kaempferia galangal* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. Pest Manag. Sci. 64 : 857–862.

Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., Vontas, J., 2014. Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. Pest Manag Sci. 70(4):623-7. https://doi.org/10.1002/ps.3595. Epub 2013 Jul 30.

Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A., Tzakou, O., 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha salvia* and *melissa* essential oils against the west nile virus mosquito *Culex pipiens*. Parasitol Res. 107(2):327–335.

Kulkarni, R.R., Pawar, P.V., Joseph, M.P., Akulwad, A.K., Sen, A., Joshi, S.P., 2013. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. J. Pest Sci. 86, 713–718. https://doi.org/10.1007/s10340-013-0502-1.

Kwee, E.M., Niemeyer, E.D., 2011. Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. Food Chem. 128 (4):1044-50.

Karunaratne S., and Hemingway J., 2000. Insecticide resistance spectra and resistance mechanisms in populations of Japanese encephalitis vector mosquitoes, *Culex tritaeniorhynchus* and *Cx. gelidus*, in Sri Lanka. *Medical and Veterinary Entomology.* 14: 430-436.

Kazempoura, S., Shayeghia, M., Abaia, M.R., Vatandoost, H., Pirmohammadi, M., 2021. Larvicidal activities of essential oils of indigenous medicinal plants, *Mentha pulegium* L., *Satureja hortensis* L., and *Thymus vulgaris* L. against malaria vector, *Anopheles stephensi*. South African Journal of Botany 139 (2021) 3841.

Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M.R., Wu, H., 2020. The Effect of Developmental and Environmental Factors on Secondary Metabolites in Medicinal Plants. Plant Physiol. Biochem. 148, 80–89. 29.

Lkhoumsi, D., Chafai Elalaoui, A., Guermal, A., Bachar, M., Boukil, M. Guide des bonnes pratiques de collecte des plantes aromatiques et médicinales du Maroc. Projet PAM « Intégration de la biodiversité dans les chaînes de valeurs des plantes aromatiques et médicinales méditerranéennes du Maroc ». 2014.

Kumar P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2012. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulu*s (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). Acta Trop. (2):212-8.

Laib I., 2012. Etude des activités antioxydante et antifongique de l' huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : application aux moisissures des légumes secs. J. Ethnopharmacol. 4 (2) : 44–52.

Lakehal, S., Meliani, A., Benmimoune, S., Bensouna, S.N., Benrebiha, F.Z, et al. 2016. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba–alba Asso* Grown in Algeria. Med chem (Los Angeles) 6: 435-439. https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000382.

Lamiri, A., Belanger, A., Berrada, M., Ismaili-Alaoui, M.M., Benjilali, B., 1997. Origin of chemical polymorphism of Moroccan *Artemisia herba-alba* Asso (in French); *Rabat: Morocco*, 81-92.

Lammari, N., Louaer, O., Meniai, A.H., Elaissari, A., 2020. Encapsulation of essential oils via nanoprecipitation process: Overview, progress, challenges and prospects. Pharmaceutics. 7; 12(5):431. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12050431.

Larhbali, Y., Belghyti, D., El guamri, Y., Lahlou, O., El kharrim, K., Khamri, Z., El madhi, Y., 2010. Sensibilité de deux moustiques culicidés (*Anopheles labranchiae* et *Culex pipiens*) aux insecticides. Bull Soc Pharm Bordeaux 149:33–42.

Lee, B.H., Choi, W.S., Lee, S.E., Park, B.S., 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, Sitophilus oryzae (L.). Crop Prot. 20: 317–320.

Lee, S., Peterson, C., Coats, J., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. J. Stored Prod. Res. 39: 77–85.

Li C., Sarangapani S., Wang Q., Nadimuthu K., Sarojam R., 2020. Metabolic engineering of the native monoterpene pathway in spearmint for production of heterologous monoterpenes reveals complex metabolism and pathway interactions. Int. J. Mol. Sci. 21:6164. 10.3390/ijms21176164.

Lima R. K., Maria das Graças Cardoso2, Jair Campos Moraes, Stephan Malfitano Carvalho4, Vanessa Gregório Rodrigues5, Luiz Gustavo Lima Guimarães. 2011. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE). Ciênc. agrotec. Lavras. 35 (4): 664-671.

Liu, R., Xu, B., 2012. Characterization of essential oil in pine nut shells from commodity waste in China by steam distillation and GC-MS. Food Anal. Methods. 5: 435–440. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9264-7.

Liu Sean., X., Mamidipally Pavan, K., 2005. Quality comparison of rice bran pil extracted with d-limonene and hexane. Cereal Chem. 82(2):209–215.

Longbottom, J., Browne, A.J., Pigott, D.M., Sinka, M.E., Golding, N., Hay, S.I., Moyes, K.L., Shearer, F.M., 2017. Mapping the spatial distribution of the Japanese encephalitis vector, *Culex tritaeniorhynchus* Giles, 1901 (Diptera: Culicidae) within areas of Japanese encephalitis risk. Parasit Vectors. 10: 148.

Lopresto, C.G., Petrillo, F., Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Perego, P., Calabrò, V., 2014. A nonconventional method to extract d-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional soxhlet extraction, Separation and Purification Technology. 137, 13-20. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.09.015.

Luccehsi, M-E., 2005. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université de la réunion Faculté des Sciences et Technologies. pp.143.

Lucia et al., 2009: Sensitivity of aedes aegypti adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* essential oils. Bioresource Technology. 100: 6083–6087.

Lucia, A., Juan, L.W., Zerba, E.N., Harrand, L., Marcó, M., Masuh, H.M., 2012. Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of Eucalyptus essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Parasitol Res. 110 (5):1675-86. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2685-9.

Luís, A., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F., Duarte, A.P., 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiate* essential oils. Industrial Crops and Products. 79: 274–282.

Ma, W. B., Feng, J.T., Jiang, Z.L., Wu, H., Ma, Z.Q., Zhang, X., 2014. Fumigant activity of eleven essential oil compounds and their selected binary mixtures against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 113, 3631–3637. https://doi.org/10.1007/s00436-014-4028-0.

Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M.L., Silva, R.A., Barros, R.S., Sousa, R.N., 2010. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. Vet. Parasitol. 167, 1–7.

Maggi F., and Benelli G., 2018. Essential oils from aromatic and medicinal plants as effective weapons against mosquito vectors of public health importance. In: Benelli G., Mehlhorn H. (eds) Mosquitoborne diseases. Parasitology Research Monographs 10. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-94075-5_6.

Mahanta, S., Khanikor, B., 2021. Mosquitocidal activity of twenty-eight plant essential oils and their binary mixtures against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Heliyon. 7: e06128.

Maheswaran, R., Ignacimuthu, S., 2013. Bioefficacy of essential oil from Polygonum hydropiper L. against mosquitoes, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. Ecotoxicol Environ Saf. 97:26-31. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.06.028.

Mamadalieva, N.Z., Akramov, D.K., Ovidi, E., Tiezzi, A., Nahar, L., Azimova, S.S., Sarker, S.D., 2017. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: Ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. Medicines. 4: 8.

Mamidipally Pavan, K., Liu Sean, X., 2004. First approach on rice bran oil extraction using limonene. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 106: 122–125. https://doi.org/10.1002/ejlt.200300891.

Mansour, S.A., Foda, M.S., Aly, A.R., 2012. Mosquitocidal activity of two *Bacillus* bacterial endotoxins combined with plant oils and conventional insecticides. Ind Crops Prod. 35(1):44–52.

Maquart, P.O., Sokha, C., Boyer, S., 2021. Mosquito diversity (Diptera: Culicidae) and medical importance, in a bird sanctuary inside the flooded forest of prek toal, cambodia, Journal of Asia-Pacific Entomology. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2021.08.001.

Martinet J.P., 2021. Les moustiques de la région Grand-Est : biodiversité et compétence vectorielle pour des virus zoonotiques. Thèse de Doctorat.

Marrs, T., Maynard, R., 2013. Neurotranmission systems as targets for toxicants: A review. Cell Biol. Toxicol. 29, 381–396.

Masoumi, F., Youssefi, M.R., Tabari, M.A., 2016. Combination of carvacrol and thymol against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). Parasitol. Res. 115: 4239–4243.

Mayer, S. V., Tesh, R.B., Vasilakis, N., 2016. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. Acta Trop.166: 155–163.

Megzari, A., Farah, A., Houssaini, M.I., EL Hadrami, E.M., 2015. Provenance Effect on the yield, chemical composition and antibacterial activity of Moroccan rosemary essential oils. Der Pharma Chem. *7*: 9–22.

Melliou, E., Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Skaltsounis, A. and Magiatis, P. 2009. High quality bergamot oil from Greece: chemical analysis using enantiomeric GC-MS and larvicidal activity against the West Nile virus vector. Molecules. 14: 839-849.

Messaoud, C., Chograni, H., Boussaid, M., 2012. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula L*. species. Nat Prod Res. 26(21) :1976–84.

Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Polissiou, M., 2011. Larvicidal evaluation of three Mentha species essential oils and their isolated major components against the West Nile virus mosquito. Hell Plant Protec J. 4: 35-43.

Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A., Polissiou, M.G., 2009a. Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Parasitol. Res. 105: 769–773.

Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Stroggilos, A., Bouzas, E. and Couladouros, E., 2009b. Larvicidal activity of naturally occurring naphthoquinones and derivatives against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. Parasitology Research. 104:57-662.

Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Milonas, P., Kontodimas, D., Polissiou, M., Kimbaris, A. and Papachristos, D. 2008. Activity of non-oxygenated versus oxygenated monoterpenes against mosquitoes. An attempt to correlate toxicity with chemical structure. In: A 7th Joint meeting of AFERP, GA, PSE & SIF. Natural products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agochemical interest, Athens.

Mighri, H., Akrout, A., El-jeni, H., Zaidi, S., Tomi, F., Casanova, J., Neffati, M., 2010. Composition and intraspecific chemical variability of the essential oil from *Artemisia herba-Alba* growing wild in a Tunisian arid zone. Chemistry & Biodevirsity, Vol. 7.

Mighri, H., Akrout, A., Casanova, J., Tomi, F., Neffati, M., 2009. Influence of drying time and process on *Artemisia herba-alba Asso* essential oil yield and composition. J Essent Oil Bea Plants 12:358–364.

Miller MW, Tren R., 2012. Implications of public-health insecticide resistance and replacement costs for malaria control: challenges and policy options for endemic countries and donors. Res Rep Trop Med. 3:1–19.

Mint Mohamed Lemine A., Ould Lemrabott M. A., Hasni Ebou M., Lekweiry K., Ould Ahmedou Salem M. S., Ould Brahim K., Ouldabdallahi Moukah M., Ould Bouraya I. N., Brengues Cécile, Trape Jean-François, Basco Leonardo, Bogreau H., Simard Frédéric, Faye O., Ould Mohamed Salem Boukhary A. (2017). Mosquitoes (Diptera : Culicidae) in Mauritania : a

review of their biodiversity, distribution and medical importance. Parasites and Vectors, 10, p. art. 35 [13 p.]. ISSN 1756-3305.

Misharina, T.A., Polshkov, A.N., 2005. Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from laurel and fennel and effects of mixing with essential oil from coriander. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 41 (6): 693–702.

Mkaddem, M., Boussaid, M., Ben Fadhel, N., 2007. Variability of Volatiles in Tunisian *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae). Journal of Essential Oil Research, 19 (3): 211-214.

Mohamed A. E.H. H., El-Sayed, M.A., Hegazy, M.E., Helaly, S.E., Esmail, A.M., Mohamed, N.S., 2010. Chemical constituents and biological activities of *Artemisia herba-alba*. Rec. Nat. Prod., vol. 4, no 1, p. 1.

Mouatassem TF, Lalami AEO, Faraj C, Rais N, Guemmouh R., 2021. Les Larves de Culicidae et Leur Dynamique Saisonnière dans la Région de Fès-Meknès, Maroc [Culicidae Larvae and Their Seasonal Dynamics in the Region of Fez-Meknes, Morocco]. Med Trop Sante Int. 12;1(2).

Msaada, K., Salem, N., Tammar, S., Hammami, M., Saharkhiz, M.J., Debiche, N., Limam, F., Marzouk., B., 2012. Essential oil composition of *Lavandula dentata*, L. stoechas and *L. multifida* cultivated in Tunisia. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 15 (6): 1030-1039. https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10662608.

MSPS, 2022 : Ministré de la Santé et de la Protection Sociale. Journée mondiale du Paludisme sous le thème : « Innover pour sauver des vies et réduire la charge de morbidité du paludisme » https://www.sante.gov.ma/Pages/communiqu%C3%A9s.aspx?communiqueID=413 (consulté le 4 novembre 2023).

Mulyaningsih, S., Sporer, F., Reichling, J., Wink, M., 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Pharm. Biol. 49: 893–899.

Murugan, J. M., Ramkumar, G., Shivakumar, M.S., 2015. Insecticidal potential of *Ocimum canum* plant extracts against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* larval and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae), Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters. https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1046069.

Muturi, E.J., Ramirez, J.L., Doll, K.M., Bowman, M.J., 2017. Combined toxicity of three essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. J. Med. Entomol. 54 (6): 1684–1691. https://doi.org/10.1093/JME/TJX168.

Negro, V., Mancini, G., Ruggeri, B., Fino, D., 2016. Citrus waste as feedstock for bio-based products recovery: review on limonene case study and energy valorization. Bioresource Technology. http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.006.

Nguemtchouin Mbouga M.G., 2012. Formulation d'insecticides en poudre par adsorption des huiles essentielles de Xylopia aethiopica et de Ocimum gratissimum sur des argiles camerounaises modifiées. Thèse de Doctorat. Université de Ngaoundere.

Noureddine, A., Gherib, A., Bakchiche, B., Carbonell-Barrachina, A.A., Cano-Lamadrid, M., Noguera-Artiaga, L., 2019. Chemical composition, mineral content and antioxidant capacity of phenolic extracts and essential oils of *Lavandula stoechas* l. scientific study & research. 20 (3): 423 – 437.

Ohta, H., Ozoe, Y., 2014. Molecular signalling, pharmacology, and physiology of octopamine and tyramine receptors as potential insect pest control targets. Adv. Insect Physiol. 46, 73–166.

Ojha, K.S., Aznar, R., O'Donnell, C., Tiwari, B.K., 2020. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. TrAC Trends Anal. Chem. 122, 115663. https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115663.

OMS, 2014. Organisation mondiale de la santé. Un dossier mondial sur les maladies à transmission vectorielle. Genève. https://apps.who.int/iris/handle/10665/111008 (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, 2016. Oranisation mondiale de la santé "Global Vector Control Response 2017–2030, WHO, Geneva, Switzerland.

OMS, 2017a. Organisation modiale de la santé « Virus du Nil Occidental », WHO, Geneva, Switzerland", https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ west-nile-virus.

OMS, 2017b : Organisation mondiale de la santé. Contrôle des vecteurs. Genève https://www.who.int/vector-control/publications/global-control-response/en/ (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, 2017c. Organisation mondiale de la santé. Chikungunya. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya (Consulté le 1/11/2023).

OMS, 2018a. Organisation mondiale de la santé. Virus Zika ; https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus (Consulté le 1/11/2023).

OMS, 2018b. Organisation mondiale de la santé. Fièvre de la vallée du Rift. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rift-valley-fever (Consulté le 1/11/2023).

OMS. 2019. Organisation mondiale de la santé. Encéphalite japonaise. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis (Consulté le 1/11/2023).

OMS, 2020a. Organisation mondiale de la santé. Maladies à transmission vectorielle. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, 2020b. Maladies à transmission vectorielle, Malaria. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/malaria (Consulté le 1/11/2023).

OMS, 2020c. Organisation mondiale de la santé. Dengue et dengue grave. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, 2020d. Organisation mondiale de la santé. Filariose lymphatique. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, 2023. Filariose lymphatique. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis (consulté le 3 novembre 2023).

OMS, BRE, 2018. Cadre régional pour la surveillance et la lutte contre les moustiques invasifs et vecteurs de maladies et les maladies réémergentes à transmission vectorielle. Comité régional de l'europe Soixante-troisième Session.

OPS. 2016. Organisation Panaméricaine de la Santé. Zika epidemiological update, Washington (DC): Pan America Health Organization/World Health Organization.

OPS. 2023. Organisation Panaméricaine de la Santé. Zika : Un virus silencieux nécessitant une surveillance et un contrôle renforcés.https://www.paho.org/fr/nouvelles/1-9-2023-zika-virus-silencieux-necessitant-une-surveillance-et-controle-renforces#:~:text=Les%20donn%C3%A9es%20de%20l'Organisation,seulement%2027%20000%20cas%20au (consulté le 3 novembre 2023).

Ouedrhiri, W., Balouiri, M., Bouhdid, S., Harki, E.H., Moja, S., Greche, H., 2017. Antioxidant and antibacterial activities of *Pelargonium asperum* and *Ormenis mixta* essential oils and their synergistic antibacterial effect. Environ Sci Pollut Res Int. 25(30): 29860-29867. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9739-1.

Ozturk, B., Winterburn, J., Gonzalez-Miquel, M., 2019. Orange peel waste valorisation through limonene extraction using bio-based solvents. Biochemical Engineering Journal. 151: 107298. https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107298.

Padalia, R.C., Verma, R.S., Chauhan, A., Goswami, P., Chanotiya, C.S., Saroj, A., Samad, A., and Khaliq, A., 2014. Compositional variability and antifungal potentials of *Ocimum basilicum*, *O. tenuiflorum*, *O. gratissimum* and O. *kilimandscharicum* essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Choanephora cucurbitarum*. 9(10):1507-10.

Pagliaro, M., Fabiano-Tixier, A.S., Ciriminna, R., 2023. Limonene as a natural product extraction solvent. Green Chem.25: 6108.

Paixão, E.S., Teixeira, M.G., Rodrigues, L.C., 2017. Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases. BMJ Glob Heal. 2017; 2: e000530.

Paolini, J., El Ouariachi, E.M., Bouyanzer, A., Hammouti, B., Desjobert, J.M., Costa, J., Muselli, A., 2010. Chemical variability of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from East Morocco. Chem. Pap. 64, 550–556. https://doi.org/10.2478/s11696-010-0051-5.

Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2002. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on Acanthoscelides obtectus (say) (Coleoptera: Bruchidae). J Stored Prod Res. 38(2):117–128.

Park, Y., Tak, J., Virginia, W., 2016. Essential oils for arthropod pest management in agricultural production systems, in: Essent. Oils Food Preserv. Flavor Saf., Elsevier Inc. 61–70.

Park, H.M., Kim, J., Chang, K.S., Kim, B.S., Yang, Y.J., Kim, G.H., Shin, S.C., P, I.K., 2011. Larvicidal activity of Myrtaceae essential oils and their components again st *Aedes aegypti*, acute toxicity on *Daphnia magna*, and aqueous residue. J Med Entomo l. 48(2):405–10.

Pavela, R., Pavoni, L., Bonacucina, G., Cespi., M., Cappellacci, L., Petrelli, R., Spinozzi, E., Aguzzi, C., Zeppa, L., Ubaldi, M., Desneux, N., Canale, A., Maggi, F., Benelli, G., 2021. Encapsulation of *Carlina acaulis* essential oil and carlina oxide to develop long-lasting mosquito larvicides: microemulsions versus nanoemulsions. Journal of Pest Science https://doi.org/10.1007/s10340-020-01327-2.

Pavela, R., Maggi, F., Petrelli, R., Cappellacci, L., Buccioni, M., Palmieri, A., Canale, A., Benelli, G., 2020. Outstanding insecticidal activity and sublethal effects of *Carlina acaulis* root essential oil on the housefly, *Musca domestica*, with insights on its toxicity on human cells. Food Chem Toxicol. 136:111037.

Pavela, R., Maggi, F., Iannarelli, R., Benelli, G., 2019. Plant extracts for developing mosquito larvicides: from laboratory to the field, with insights on the modes of action. Acta Tropica. 193: 236–271.

Pavela, R., Benelli, G., 2016. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. Trends Plant Sci. 21: 1000–1007.

Pavela, R., 2015a. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. Ind Crops Prod 76:174–187.

Pavela, R., 2015b., Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against Culex quinquefasciatus Say larvae. Parasitology Research. 114 (10): 3835–3853.

Pavela, R., Kaffková, K., Kumšta, M., 2014. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Plant Prot. Sci. 50: 36–41. https://doi.org/10.17221/48/2013-PPS.

Pavela, R., 2006. Insecticidal activity of essential oils against cabbage aphid brevicoryne brassicae. J. Essent. Oil-Bearing Plants. 9: 99–106.

Perino, S., Chemat, F., 2019. Green process intensification techniques for bio-refinery, Current Opinion in Food Sciences. 25: 8-13. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.12.004.

Pfau, M., 1972. Photochemistry in the field of monoterpenes and related compounds. Flavour. Ind. 3, 89–103.

PNUD. 2017. Programme des Nations Unies pour le Développement. Une évaluation de l'impact socio-économique du virus Zika en Amérique latine et dans les Caraïbes : avec un accent sur le Brésil, la Colombie et le Suriname.

Pokajewicz, K., Białon, M., Svydenko, L., Fedin, R., Hudz, N., 2021. Chemical composition of the essential oil of the new cultivars of *Lavandula angustifolia* Mill. Bred in Ukraine. Molecules 2021, 26, 5681. https:// doi.org/10.3390/.

Pripdeevech, P., Chumpolsri, W., Suttiarporn, P., Wongpornchai, S., 2010. The chemical composition and antioxidant activities of basil from Thailand using retention indices and comprehensive two-dimensional gas chromatography. J Serb Chem Soc. 75(11):1503-13. doi: 10.2298/JSC100203125P.

Pujiarti, R., Kasmudjo, K., 2016 .Chemical composition and insecticidal activity of *Eucalyptus urophylla* essential oil against *Culex quinquefasciatus* mosquito. J. Korean Wood Sci. Technol. 44(4): 494~504.

Ramar, M., Ignacimuthu, S., Gabriel Paulraj, M., 2014. Mosquito knock-down and adulticidal activities of essential oils by vaporizer, impregnated filter paper and aerosol methods. International Journal of Mosquito Research. 1 (3): 26-32 e-ISSN.

Rattan, R.S., 2010. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. Crop Prot 29(9):913–920.

Raut, J.S., Karuppayil, S.M., 2014. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind. Crops Prod. 62, 250–264. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055.

Rey, J.R., Walton, W.E., Wolfe, R.J., Connelly, C.R., O'Connell, S.M., Berg, J., Sakolsky-Hoopes, G.E., Laderman, A.D., 2012. North American wetlands and mosquito control. Int J Environ Res Public Health. 10;9(12):4537-605. https://doi.org/10.3390/ijerph9124537.

Riahi, L., Chograni, H., Elferchichi, M., Zaouali, Y., Zoghlami, N., Mliki, A., 2013. Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. Ind. Crops Prod. 46: 290–296.

Rice, P.J., Coats, J.R., 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the housefly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera : Tenebrionidae) and southern corn root-worm (Coleoptera : Chrysomelidae). J. Econ. Entomol.87: 1172–1179.

Ringuelet, J., Ocampo, R., Henning, C., Padín, S., Urrutia, M. I., & Dal Bello, G., 2014. Insecticidal activity of the essential oil of Lippia alba (Mill.) N. E. Brown on Tribolium castaneum Herbst. in stored wheat grains. Revista Brasileira de Agroecologia, Pelotas, v. 9, n. 2, p. 214-222.

Ríos, N., Stashenko, E.E., Duque, J.E., 2017. Evaluation of the insecticidal activity of essential oils and their mixtures against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Revista Brasileira de Entomologia. 61 : 307–311.

Rizzo, C., Napoli, C., Venturi, G., Pupella, S., Lombardini, L., Calistri, P., Monaco, F., Cagarelli, R., Angelini, P., Bellini, R., Tamba, M., Piatti, A., Russo, F., Palù., G., Chiari, M., Lavazza, A., Bella, A., 2016. West Nile virus transmission: Results from the integrated surveillance system in Italy, 2008 to 2015," Eurosurveillance. 21 (37): 1–8.

Rodhain F. & Perez C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. *Maloine Editions*, Paris, 458 pp.

Rodolphe, P., 2011. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. Biodiversité. Université de Grenoble.

Rozman, V., Kalinovic, I., Korunic, Z., 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored product insects. J Stored Prod Res. 43(4):349–355.

Ryan, M. F., Byrne, O., 1988. Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. J. Chem. Ecol. 14 (10): 1965–1975.

Sabbahi, M., El-Hassouni, A., Tahani, A., El-Bachiri, A., 2020. Altitude effect on the chemical composition and antioxidant activity of rosemary in the region of Talsint (Morocco). Mor. J. Chem. 8 (4): 866-875.

Sahraoui, N., Vian, M.A., El Maataoui M., Boutekedjiret, C., Chemat, F., 2011. Valorization of citrus by-products using Microwave Steam Distillation (MSD). Innovative Food Science & Emerging Technologies. 12 (2) : 163-170.

Sakar, E.H., Zeroual, A., Kasrati, A., Gharby, S., 2023. Combined effects of domestication and extraction technique on essential oil yield, chemical profiling, and antioxidant and antimicrobial activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Journal of Food Biochemistry. Volume 2023, Article ID 6308773, 13 pages. https://doi.org/10.1155/2023/6308773.

Salido, S., Valenzuela, L.R., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A., Cano, E., 2004. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain, Biochemical Systematics and Ecology.32, 3. https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.09.002.

Sambri, V., Capobianchi, M., Charrel, R., Fyodorova, M., Gaibani, P., Gould, E., Niedrig, M., 2013. West Nile Virus in Europe: Emergence epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. Clin Microbiol Infect 19(8):699–704.

Sarma, R., Adhikari, K., Mahanta, S., Khanikor, B., 2019. Combinations of plant essential oil based terpene compounds as larvicidal and adulticidal Agent against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Sci. Rep. 2019, 9, 9471.

Sayah, M.Y., Taouda, H., Chabir, R., Yousfi, L.K., Derwich, E., Kandri Rodi, Y., Ouazzani Chahid, F., Errachidi F., 2013. Valorisation des déchets industriels d'agrumes par l'extraction des huiles essentielles. Gestion et Protection de l'Environnement Proceedings G-ENVIRON-5. 3: 124-129.

Sayed-Ahmed M., 2016. Incidence history of West Nile virus in Africa and Middle East, with an emphasis on Egypt: A Review. J. Dairy, Vet. Anim. Res. 3 (3): 101–104.

SCIAMA, Y., 2006. Moustiques, la grande menace. Sciences et Vie, pp. 62-80.

Scott Jeffrey, G., Yoshimizu, M.H., Kasai, S., 2015. Pyrethroid Resistance in Culex pipiens Mosquitoes. Pestic Biochem Phys. 120:68–76

Sertkaya, E., Kaya, K., Soylu, S., 2010. Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* boisd.) (Acarina: Tetranychidae). Ind Crops Prod. 31 (1): 107–12.

Sharma, R.N., Gupta, A.S., Patwardhan, S.A., Hebbal-ker, D.S., Tare, V., Bhonde, S.B., 1992. Bioactivity of Lamiaceae plants against insects. Ind J Exp Biol. 30: 244–246.

Shaukat, M.A., Ali, S., Saddiq, B., Hassan, M.W., Ahmad, A., Kamran, M., 2019. Effective Mechanisms to Control Mosquito Borne Diseases: A Review. Am. J. Clin. Neurol. Neurosurg. 4 (1): 21–30.

Shirazi, M.T., Gholami, H., Kavoosi, G., Rowshan, V., Tafsiry, A., 2014. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. Food Sci Nutr. 2(2):146-55. https://doi.org/10.1002/fsn3.85.

Siddiqui, S., Pahmeyer, M.J., Assadpour, E., Jafari, S.M., 2022. Extraction and purification of d-limonene from orange peel wastes: Recent advances, Industrial Crops and Products. 177: 114484. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114484.

Silveira S.M.; Cunha Júnior A., Neudí Scheuermann G., Luiz Secchi F., Werneck Vieira c.R.,. 2012. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and foodborne pathogens. Ciência Rural, Santa Maria, v.42, n.7, p.1300-1306.

Singh, P., Pandey, A.K., 2018. Prospective of essential oils of the genus Mentha as biopesticides: A review. Front. Plant Sci. 9, 1295.

Shooshtari, M., Barat, R., Ghalandari., 2012. Comparative study on repellent effect of extracts and essential oils of *Melissa officinalis* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. against main malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 27 (4): 606-614.

Sigel, E.; Steinmann, M. Structure, function, and modulation of GABAA receptors. J. Biol. Chem. 2012, 287, 40224–40231.

Soni, S., Sing Gill V, J., Anusheel, Singh, J., Chhabra, J., Sing Gill, G. J., Bakshi, R., 2023. Dengue, Chikungunya, and Zika: The Causes and Threats of Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases. Cureus. 15(7): e41717. https://doi.org/10.7759/cureus.41717.

Stanojević, L., Stanković, M., Cakić, M., Nikolić, V., Nikolić, L., Ilić, D., Radulović, N., 2011. The effect of hydrodistillation techniques on yield, kinetics, composition and antimicrobial activity of essential oils from flowers of *Lavandula officinalis* L. Hem. ind. 65 (4): 455–463.

Sy O, Sarr PC, Assogba BS, Nourdine MA, Ndiaye A, Konaté L, Faye O, Donnelly MJ, Gaye O, Weetman D, Niang EA., 2023. Residual malaria transmission and the role of Anopheles arabiensis and Anopheles melas in central Senegal. J Med Entomol. 12;60(3):546-553.

Tabari, M.A;, Youssefi, M.R., Esfandiari, A., Benelli, G., 2017. Toxicity of β-Citronellol, geraniol and linalool from *Pelargonium roseum* essential oil against the West Nile and Filariasis vector *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Res Vet Sci. 114:36–40

Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M., Idrissi, A., Bouksaim, M., Gmouh, S., Amzazi, S., El Moussaouiti, M., Benjouad, A., Bakri, Y., 2012. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. Journal of Medicinal Plants Research. 6(31): 4593-4600.

Telci, I., Demirtas, I., Sahin, A., 2009. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (Foeniculum vulgare Mill.) fruits during stages of maturity, Industrial Crops and Products. 30,1: 126-130.

Terrien, V., 2008. Les culicidés : Transmission vectorielle des infections et parasitoses à l'Homme. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Nantes

Tigrine-Kordjani, N., Chemat, F., Meklati, B.Y., Tuduri, L., Giraudel, J.L., Montury, M., 2007. Relative characterization of rosemary samples according to their geographical origins using microwave-accelerated distillation, solid-phase microextraction and Kohonen self-organizing maps. Anal. Bioanal. Chem. 389, 631–641. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1441-6.

Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Jaafari, A., Zyad, A., 2015. Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of *Artemisia Herba-Alba* and their cytotoxic effect on eancer cells. PloS One. 10(7):e0131799.

Tjaden, N.B., Suk, J.E., Fischer, D., Thomas, S.M., Beierkuhnlein, C., Semenza, J.C., 2017. Modelling the effects of global climate change on Chikungunya transmission in the 21st century. Sci Rep. 7: 3813.

Tmimi, F.Z., Faraj, C., Bkhache, M., Mounaji, K., Failloux, A.B., Sarih, M., 2018. Insecticide resistance and target site mutations (G119S ace-1 and L1014F kdr) of *Culex pipiens* in Morocco. Parasites Vectors. 11, 1–9.

Topiar M. M. Sajfrtova R. Pavela Z. Machalova Comparison of Fractionation Techniques of CO2 Extracts from Eucalyptus Globulus - Composition, Insecticidal Activity. The Journal of Supercritical Fluids (2014), http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.002 .

Török, E., Hochkirch, A., Soltész, Z., Tscharntke, T., Batáry, P., 2020. Unmeasured side effects of mosquito control on biodiversity. European Journal of Ecology, 6(1): 71–76. https://doi.org/10.17161/eurojecol.v6i1.13855.

Toussaint, J.F., Kerkhofs, P., De Clercq, K., 2006. Influence des changements climatiques globaux sur la progression des arboviroses. Ann. Med. Vet. 150: 56–63.

Traboulsi A.F., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Abi Nader, N., Mrad, A., 2005. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci. 61:597–604.

Traboulsi A. F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal. S., 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito Culex pipiens molestus (Diptera: Culicidae). Pest Manag Sci. 58(5):491-5. https://doi.org/10.1002/ps.486.

Trari, B., 2017. Les Moustiques (Insectes, Diptères) Du Maroc: Atlas De Répartition Et Études Épidémiologiques, Thèse de doctorat d'état. Université Mohammed V, pp 24.

Trari, B., 2019. Les moustiques vecteurs d'arbovirus au Maroc : l'exemple du virus West Nile. Conference: Wild birds and zoonotic emerging diseases. Contribution of Eco-epidemiology in the framework of the one health concept. Faculté des Sciences-Rabat.

Turek, C., Stintzing, F.C., 2013. Stability of essential oils: a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12 (1), 40–53. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006.

Verma, R.S., Padalia, R.C., Chauhan, A., Upadhyay, R.K., Singh, V.R., 2019. Productivity and essential oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) harvested at different growth stages under the subtropical region of North India. J. Essent. Oil Res. 32: 144–149. https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1684391.

Brugman V.A., Hernández-Triana L.M., Medlock J.M., Fooks A.R., Carpenter C., Nicholas J., 2018. The role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in virus transmission in Europe. Int. J. Environ. Res. Public Health. 15, 389.

Virot, M., Tomao, V., Ginies, C., Chemat, F., 2008. Total lipid extraction of food using d-Limonene as an alternative to n-Hexane. Chromatographia. 68. 3/4. https://doi.org/10.1365/s10337-008-0696-1.

Wangrawa Dimitri, W., Kosgei,J., Machani, M., Opala, J., Agumba, S., Yaméogo, F., Borovsky, D., Ochomo, E., 2022. Larvicidal activities and synergistic effects of essential oils against *Anopheles funestus* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Kisumu, Kenya", Psyche: A Journal of Entomology, vol. 2022, Article ID 8302696, 13 pages, 2022. https://doi.org/10.1155/2022/8302696.

Weill, M., Duron, O., Labbé, P., Berthomieu, A., Raymond, M., 2003. La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides. Medecine/ sciences. 19(12):1190–1192.

Wood O., Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer LI, Brooke Bd, 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. Parasit Vectors. 3:67.

Wu, W., Yang, Y., Feng, Y., Ren, X., Li, Y., Li, W., Huang, J., Kong, L., Chen, X., Lin, Z., et al. 2022. Study of the repellent activity of 60 essential oils and their main constituents against *Aedes albopictus* and nano-formulation development. Insects. 13, 1077.

Yakhlef, G., Hambaba, L., Pinto D.C.G.A., Silva, A.M.S., 2020. Chemical composition and insecticidal, repellent and antifungal activities of essential oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. Industrial Crops & Products. 158, 112988.

Yang, P., Ma, Y., Zheng, S., 2005. Adulticidal activity of five essential oils against *Culex pipiens quinquefasciatus*. J. Pestic. Sci.30: 84–89.

Yasa, H., Onar, H.Ç., Yusufoğlu, A.S., 2011. Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Bodrum, Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 15(6):1040-1043.

Yeom, H.J., Jung, C.S., Kang, J.S., Kim, J., Lee, J.H., Kim, D.S., Kim, H.S., Park, P.S., Kang, K.S., Park, I.K., 2015. Insecticidal and acetylcholine esterase inhibition activity of Asteraceae plant essential oils and their constituents against adults of the German cockroach (*Blattella germanica*). J. Agric. Food Chem. 63: 2241–2248.

Yildirim, E., Kordali S., Yazi G., 2011. Insecticidal effects of essential oils of eleven plant species from Lamiaceae on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). Romanian Biotechnological Letters. 16, 6.

Yildirim, E., Emsen, B., Kordali, S., 2013. Insecticidal effects of monoterpenes on *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). J. Appl. Bot. Food Qual. 86: 198–204.

Yolmeh, M., Jafari, S.M., 2017. Applications of response surface methodology in the food industry processes. Food Bioprocess Technol. 10: 413–433. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2.

Younoussa, L., Kenmoe, F., Oumarou, M.K., Sengue Batti, A.C., Tamesse, J.L., Nukenine, E.N., 2020. Combined effect of methanol extracts and essential oils of *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) and *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) against *Anopheles gambiae* Giles larvae (Diptera: Culicidae)", International Journal of Zoology, vol. 2020, Article ID 4952041, 9 pages. https://doi.org/10.1155/2020/4952041

Younsi, F., Trimech, R., Boulila, A., Ezzine, O., Dhahri, S., Boussaid, M., Messaoud, C., 2016. Essential oil and phenolic compounds of *Artemisia herba-alba* (Asso.): Composition, antioxidant, antiacetylcholinesterase, and antibacterial activities. International Journal of Food Properties, 19:7, 1425-1438, https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1079789.

Youssefi, M.R., Tabari, M.A., Esfandiari, A., Kazemi, S., Moghadamnia, A.A., Sut, S., Dall'Acqua, S., Benelli, G., Maggi, F., 2019. Efficacy of two monoterpenoids, carvacrol and thymol, and their combinations against eggs and larvae of the west nile vector *Culex pipiens*. Molecules. 24, 1867.

Yuan, L., Yang, X.,Yu, X., Wu, Y., Jiang, D., 2019. Resistance to insecticides and synergistic and antagonistic effects of essential oils on dimefluthrin toxicity in a field population of *Culex quinquefasciatus* Say. Ecotoxicology and Environmental Safety. 169: 928–936.

Yuki H., McBride L., 2022. Origin and status of Culex pipiens mosquito ecotypes, Current Biology, Volume 32, Issue 5, Pages R237-R246, https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.01.062.

YU Kai, Yinghui, P., Ge, S., Yuduo, L., Min, L., Li, W.. 2014. Fumigation activity of three plant essential oils against Culex pipiens quinquefasciatus and synergistic effects of their mixtures[J]. Chinese Journal of Pesticide Science. 16(2): 132-137. https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-7303.2014.02.04.

Zahran, H., Abou-Taleb, H.K., Abdelgaleil, S.A.M.,2 017. Adulticidal, larvicidal and biochemical properties of essential oils against *Culex pipiens* L. J Asia-Pac Entomol. 20(1):133–139.

Zahran, H. E. D. M., Abdelgaleil, S. A. M., 2011. Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae). Journal of Asia-Pacific Entomology. 14 (1): 46–51.

Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M., 2010. Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food Chem Toxicol. 48 (11):3144-52. https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.010.

Zayed, A.B., Szumlas, D.E., Hanafi, H.A., Fryauff, D.J., Mostafa, A.A., Allam, K.M., Brogdon, W.G., 2006. Use of bioassay and microplate assay to detect and measure insecticide resistance in

field populations of *Culex pipiens* from filariasis endemic areas of Egypt. J Am Mosq Control Assoc. 22(3):473-82. doi: 10.2987/8756-971X(2006)22[473:UOBAMA]2.0.CO;2.

Zekri, N., Amalich, S., Boughdad, A., Alaoui, M., El Belghiti, M.A, Zai, T., 2013. Phytochemical study and insecticidal activity of Mentha pulegium L. oils from Morocco against *Sitophilus oryzae*. Mediterranean Journal of Chemistry, 2(4), 607-619.

Zheng Li, Kathryn H. Smith, Stevens, G.W., 2015. The use of environmentally sustainable bio-derived solvents in solvent extraction applications—a review. https://doi.org/10.1016/j.cjche.2015.07.021.

Zibaee Idin, Pooyabahari Khorram (2016) Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knockdown effects, against mosquitos, cockroaches and housefly; Arthropods. 4(4): 107-123.

Zrira, S, Benjilali B., 2003. The constituents of the oils of *Lavandula stoechas* L. ssp. atlantica Br.-Bl. and L. stoechas ssp. stoechas from Morocco. J Essent Oil Res.15:68–9.

Zrira, S., Menut, C., Bessiere, J.M., Benjilalii, B., 2007. Chemical Composition of the Essential Oils of Moroccan Ormenis mixta (L.) Dumort. ssp. Multicaulis , Journal of Essential Oil Bearing Plants. 10 (5): 378-385, https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643570.

Zrira, S., 2017. Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco. Med. Aromat. Plants World – Africa. 3: 91–125. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1120-1_5.