

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Thèse

Présentée par :

Mlle Boukraa Naima

Pour l'obtention du Diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Appliquée

Thème

Contribution à l'élaboration de bio-insecticides à base des huiles essentielles

d'*Artemisia herba alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L. et *Rosmarinus officinalis* L., contre *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera :

Tenebrionidae).

Soutenue publiquement :

Le : 04/07/2023

Devant le jury :

OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Pr.	Univ. Ouargla	Président
LADJEL Segni	Pr.	Univ. Ouargla	Promoteur
ZELLAGUI Amar	Pr.	Univ. Oum El Bouaghi	Rapporteur
GHERRAF Noureddine	Pr.	Univ. Oum El Bouaghi	Rapporteur
SEKOUR Makhlouf	Pr	Univ. Ouargla	Rapporteur
HAMMOUDI Roukia	MCA	Univ. Ouargla	Rapporteur

Année Universitaire : 2022/2023.

Remerciements

Au terme de cette étude, j'exprime ma profonde gratitude à mon Directeur de Thèse **Monsieur LADJEL Segni** pour sa grande bienveillance, ses précieux conseils, ses encouragements et pour le temps qu'il m'a consacré pour la réalisation de ce travail.

Ma reconnaissance et mes remerciements s'adressent également à **Madame OULD EL HADJ-KHELIL Aminata**, qui a bien voulu de présider ce jury et en faire partie.

J'adresse également mes sincères remerciements à **Mr. ZELLAGUI Amar, Mr. GHERRAF Noureddine, Mr. SEKOUR Makhlof** et **Madame HAMMOUDI Roukia**. Qu'ils trouvent ici mon grand respect. Je vous suis énormément reconnaissante de bien vouloir porter intérêt à ce travail.

Je remercie également, **Madame MAFLEH Sihem**, Ingénieur de Laboratoire Génie des Procédés de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, de m'avoir aidé pour la réalisation de ce travail et pour sa compréhension et son aide.

Je remercie également **Dr DRAHMANI Abd Elmalek** directeur du laboratoire des analyses médicales au niveau de centre de médecine de travail Sonatrach région Hassi Messaoud pour son accueil et de m'avoir ouvert ses portes durant la réalisation de l'expérimentation.

Il m'est particulièrement agréable d'exprimer toute ma gratitude à **Dr. BENLAMOUDI Wiam** pour le partage de ses connaissances et expériences dans le domaine statistique. Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

Mes vifs remerciements vont également à **Mr ADDOUD Ammar** pour son orientation.

Je tiens à remercier également toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce modeste travail.

Listes des abréviations

°C : Degré Celsius

Å : Angström

AANAT : Arylalkylamine N-acyltransferase.

AHC : Analyse Hiérarchique des Composés.

ANOVA : Analyse de variance.

ATCC: American Type Culture Collection

C : Concentration.

CI: Concentration Inhibitrice.

cm : Centimètre

CO₂: Dioxyde de Carbone.

D : densité.

DL : Dose Léthale.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO : Dimethylsulfoxyde

DR : Dose Répulsive.

EAG : Électroantennographique

ES : erreur standard.

eV: électron volt

FDA: U.S. Food and Drug Administration

g : gramme

g/mol: gramme par mole

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

GRAS: Generally Recognized as Safe

h: heure

HE : Huile Essentielle

HR : Humidité Relative

IR : indice de réfraction.

IRD : indices de réduction de dose

l: litre

m: mètre

MCF 10A: Human Breast Epithelial.

MCF-7: breast cancer cell line.

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

mM : millimole

mmHg : millimètre de mercure.

nl : nanolitre

nm : nanomètre

p : probabilité.

PBS : tampon phosphate saline

PDB : Protein Data Bank

PE : point d'ébullition.

PM : pourcentage de mortalité.

PM : poids moléculaire.

PR : pourcentage de répulsion

PSM : post de sécurité microbiologique classe II.

RCSB: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics

rpm : rotations par minute

SF : facteurs synergiques et

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences.

SRB : Sulforodamine B

TCA : Acide trichloracétique.

TL : temps léthale.

TR : temps de rétention.

USA : United States

UV : ultraviolet

v/p : volume/poids

µl: microlitre.

µm : micromètre

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Cycle de développement de <i>Tribolium</i> rouge de la farine, <i>T. castaneum</i> .	10
02	Dimorphismes sexuels chez la puppe et le mâle de <i>T. castaneum</i> A : puppe femelle, B : puppe male, C : adulte femelle D. adulte male.	12
03	Adultes de <i>T. castaneum</i> (a) élevés dans une étuve de laboratoire (b).	13
04	Morphologie générale de plante d' <i>A. herba-alba</i> Asso.	15
05	<i>J. phoenicea</i>	17
06	Morphologie générale de plante de <i>R. officinalis</i> .	19
07	Localisation géographique de la région d'étude.	21
08	Plantes lors de la récolte.	22
09	Procédure de réalisation de de test de toxicité par inhalation vis-à-vis des adultes de <i>T. castaneum</i> .	26
10	Diagramme explicatif de mode opératoire du test de répulsion	28
11	Étapes de synthèse des précurseurs de tannage cuticulaire par l'intervention de l'AANAT.	31
12	Éclosion des œufs d' <i>A. salina</i> pour donner des larves.	40
13	a. Montage pour élevage des larves d' <i>A. salina</i> , b. Plaques de 24 puits utilisés lors du test de létalité des larves d' <i>A. salina</i> .	42
14	Diagramme explicatif de la procédure de culture des cellules MCF 10A.	45
15	Cellules MCF 10A en phase exponentielle de croissance sous microscope.	46
16	Traitement des cellules MCF 10A dans une microplaque de 96 puits, par les différentes concentrations des HEs ou de leurs mélanges.	49
17	Procédure de réalisation du test SRB pour la détermination de l'effet antiprolifératif des HEs ainsi que leurs mélanges contre les cellules MCF 10A.	50

18	Dendrogramme en Ward basé sur les similitudes des compositions chimiques des HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> , <i>R. officinalis</i> avec leurs mélanges.	60
19	Taux de mortalités (moyenne ± ES) des adultes <i>T. castaneum</i> traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 µL/L air ; C2 = 83,33 µL/L air ; C3 = 166,67 µL/L air ; C4 = 333,33 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons, après 24 h.	62
20	Taux de mortalités (moyenne ± ES) des adultes <i>T. castaneum</i> traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 µL/L air ; C2 = 83,33 µL/L air ; C3 = 166,67 µL/L air ; C4 = 333,33 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons, après 48 h.	63
21	Taux de mortalités (moyenne ± ES) des adultes <i>T. castaneum</i> traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 µL/L air ; C2 = 83,33 µL/L air ; C3 = 166,67 µL/L air ; C4 = 333,33 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons, après 72 h.	64
22	Taux de mortalités (moyenne ± ES) des adultes <i>T. castaneum</i> traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 µL/L air ; C2 = 83,33 µL/L air ; C3 = 166,67 µL/L air ; C4 = 333,33 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons, après 96 h.	65
23	Taux de mortalités (moyenne ± SE) des adultes <i>T. castaneum</i> après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C1 = 41,67 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons.	72
24	Taux de mortalités (moyenne ± SE) des adultes <i>T. castaneum</i> après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C2 = 83,33 µL/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons.	73
25	Taux de mortalités (moyenne ± SE) des adultes <i>T. castaneum</i> après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C3 = 166,67 µL/L	74

	air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons.	
26	Taux de mortalités (moyenne \pm SE) des adultes <i>T. castaneum</i> après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C4 = 333,33 μ L/L air) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons.	75
27	Taux de répulsion (moyenne \pm ES) des adultes de <i>T. castaneum</i> après 30 min d'exposition à différentes concentrations (C) d'HEs et leurs mélanges.	82
28	Interactions intermoléculaires en 3D (à gauche), représenté en 2D (à droite), obtenues par docking moléculaire entre l'enzyme AANAT de <i>T. castaneum</i> (6V3T.pdb) et 08 molécules sélectionnées.	90
29	Taux de mortalité (moyenne \pm ES) des larves d' <i>A. salina</i> après 24h de traitement par différentes concentrations (C) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs mélanges.	95
30	Taux de viabilité (moyenne \pm ES) des cellules MCF 10A après 24h de traitement par différentes concentrations (C) de tamoxifène.	101
31	Taux de viabilité (moyenne \pm ES) des cellules MCF 10A après 24 heures de traitement par différentes concentrations (C) d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> et leurs mélanges.	102

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Listes des appareils utilisés lors des expérimentations	6
02	Listes des réactifs utilisés lors des expérimentations.	6
03	Compositions des combinaisons préparées à partir d'HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i>	23
04	Noms, numéros de CAS, formules chimiques, propriétés physico-chimiques et structures bidimensionnelles des composés chimiques utilisés comme ligands lors du docking.	34
05	Compositions chimiques d'HE d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> avec leurs mélanges.	53
06	Valeurs des DL ₅₀ et DL ₉₀ observées ainsi que celles des DL ₅₀ théoriques (µg/ml) ; les limites inférieures et supérieures des DL ₅₀ et CL ₉₀ à 95 % ; les facteurs synergiques (SF) ; les indices de réduction de dose (IRD) des HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> avec leurs combinaisons contre les adultes de <i>T. castaneum</i> .	68
07	Les valeurs calculées des TL ₅₀ et TL ₉₀ ainsi que les limites inférieures et supérieures des TL ₅₀ et les TL ₉₀ à 95 %, des HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs mélanges contre les adultes de <i>T. castaneum</i> à une concentration de 41,67 µL/L d'air de chaque échantillon.	76
08	Les valeurs des DR ₅₀ et DR ₉₀ observées, DR ₅₀ théoriques (nl/cm ²), les limites inférieures et supérieures des DR ₅₀ et les DR ₉₀ à 95 %, les facteurs synergiques (SF) des HEs d' <i>A. herba-alba</i> , <i>J. phoenicea</i> et <i>R. officinalis</i> ainsi que leurs combinaisons contre les adultes de <i>T. castaneum</i> .	84
09	Corrélations (coefficient de corrélation rho de Spearman) des activités insecticide et répulsif avec les taux des cinq principaux composés de chaque d'HE et de leurs mélanges.	88
10	Energies de liaisons entre chaque ligand et l'enzyme AANAT de <i>T. castaneum</i>	89

- 11 Valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ observées et celles des DL₅₀ théoriques **97**
(mg/l), ainsi que les limites inférieures et supérieures des DL₅₀ et des CL₉₀ à 95 % ; facteurs synergiques (SF) et indices de réduction de dose (IRD) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons à l'égard des larves d'*A. salina*.
- 12 Valeurs des CI₅₀ et CI₉₀ observées et celles des CI₅₀ théoriques **104**
(mg/L), ainsi que les limites inférieures et supérieures des CI₅₀ et les CI₉₀ à 95 % ; facteurs synergiques (SF) et indices de réduction de dose (IRD) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons à l'égard des cellules MCF 10A.
-

Table de matière

Titre	Page
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Table de matière	
Introduction	01
Chapitre I.- Méthodologie du travail	
I.1. Matériel de laboratoire	06
I.1.1. Appareils et Réactifs	06
I.1.2. Matériel biologique	07
I.2. Choix de l'insecte, <i>Tribolium</i> rouge de la farine, <i>Tribolium castaneum</i> Herbst (1797)	07
I.2.1. Position systématique	08
I.2.2. Cycle de vie, morphologie et bio-écologie de <i>T. castaneum</i>	09
I.2.3. Distribution de <i>T. castaneum</i>	12
I.2.4. Identification morphologique et élevage de <i>T. castaneum</i>	12
I.3. Choix des plantes	14
I.3.1. <i>Artemisia herba-alba</i> Asso (1779).	14
I.3.1.1. Noms vernaculaires	14
I.3.1.2. Position systématique	14
I.3.1.3. Description botanique	15
I.3.1.4. Répartition géographique	15
I.3.1.5. Intérêts socioéconomiques	16
I.3.2. <i>Juniperus phoenicea</i> L., (1753)	16
I.3.2.1. Noms vernaculaires	16
I.3.2.2. Position systématique	16
I.3.2.3. Description botanique	17
I.3.2.4. Répartition géographique	17
I.3.2.5. Intérêts socioéconomiques	18

I.3.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (1753)	18
I.3.3.1. Noms vernaculaires	18
I.3.3.2. Position systématique	18
I.3.3.3. Description botanique	19
I.3.3.4. Répartition géographique	20
I.3.3.5. Intérêts socioéconomiques	20
I.4. Préparation de matériel végétal	20
I.4.1. Présentation de la région d'étude	20
I.4.2. Récolte, identification et conservation des plantes	22
I.5. Extraction des HEs et préparation des mélanges	22
I.5.1. Principe de l'hydrodistillation	22
I.5.2. Mode opératoire	23
I.6. Identification des compositions chimiques des HEs et leurs mélanges	23
I.6.1. Principe de la GC-MS	24
I.6.2. Mode opératoire	24
I.7. Activités biologiques des HEs vis-à-vis des adultes de <i>T. castaneum</i>	24
I.7.1. Effet insecticide des HEs et leurs mélanges par inhalation	24
I.7.1.1. Principe	24
I.7.1.2. Mode opératoire	25
I.7.2. Effet répulsif des HEs et leurs combinaisons	27
I.7.2.1. Principe	27
I.7.2.2. Mode opératoire	27
I.8. Pouvoir inhibiteur des composants des HEs à l'égard de l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase enquêté par docking moléculaire	29
I.8.1. Choix de l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase comme cible moléculaire	29
I.8.2. Principe du docking moléculaire	31
I.8.3. Mode opératoire	32
I.9. Etude de l'écotoxicité et de l'effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges	40
I.9.1. Ecotoxicité des HEs et leurs mélanges contre les larves d' <i>Artemia salina</i>	40
I.9.1.1. Choix d' <i>A. salina</i> comme un organisme modèle pour l'étude de l'écotoxicité	40
I.9.1.2. Principe du test de mortalité des larves d' <i>A. salina</i>	41

I.9.1.3. Mode opératoire	41
I.9.2. Effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges contre les cellules MCF 10A	43
I.9.2.1. Choix des cellules MCF 10A	43
I.9.2.2. Préparation des réactifs	43
I.9.2.3. Culture cellulaire des cellules MCF 10A	44
I.9.2.4. Principe de test SRB	46
I.9.2.5. Mode opératoire	47
I.9.2.5.1. Ensemencement des cellules	47
I.9.2.5.2. Traitement des cellules MCF 10A	48
I.9.2.5.3. Coloration par SRB et détermination de taux de viabilités	49
I.10. Analyses statistiques	51
Chapitre I.- Résultats et discussion	
II.1. Rendements et compositions chimiques des HEs	52
II.2. Pouvoir insecticide des HEs et leurs mélanges contre les adultes de <i>T. castaneum</i>	61
II.3. Effets répulsifs des HEs et leurs mélanges	81
II.4. Corrélation entre les activités biologiques des HEs et leurs mélanges avec les composés majoritaires	87
II.5. Effet inhibiteur des composants d'HEs et leurs mélanges vis-à-vis l'AANAT de <i>T. castaneum</i>	89
II.6. Toxicité des HEs et leurs mélanges contre les larves d' <i>A. salina</i>	94
II.7. Effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges contre les cellules MCF 10A	101
Conclusions	108
Références	111
Résumés	
Annexe	
Publications	

● ● ● ———

Introduction

———— ● ● ●

Les céréales stockées et leurs sous-produits transformés sont des sources alimentaires primordiales dans le monde ; par conséquent, il est crucial de maintenir une conservation efficace de cette ressource afin d'assurer la subsistance de l'humanité (Stejskal et *al.*, 2015). Le maïs, le riz et le blé sont les grains les plus consommés, sur ceux s'ajoute le pois chiche satisfaisant les besoins alimentaires mondiaux tout en constituant davantage une source nutritive importante pour les animaux (Wondatir et *al.*, 2015).

En effet, les récoltes des céréales sont stockées pendant une période pouvant atteindre un an, puis le passage à la commercialisation sur le marché. Cependant, l'entreposage prolongé de ces aliments occasionnent des dégâts sérieux en se traduisant dans des pertes tant quantitatives (variant de 10 à 40 %) que qualitatives, dont les infestations d'insectes ravageurs occupent le premier rang (Ahmad et *al.*, 2019). De nombreux insectes s'attaquant aux denrées entreposées dont les prédominants sont les coléoptères et les lépidoptères (Jerraya, 2003). Toutefois, les espèces qui attaquent les grains entiers et sains, qualifiées en tant que ravageurs primaires, sont peu nombreuses à savoir : *Sitophilus zeamais* et *Prostephanus truncatus* qui s'attaquent au Maïs (Suthisut et *al.*, 2011), *Rhyzopertha dominica* et *Trogoderma granarium* qui ciblent essentiellement le blé (Khan et *al.*, 2019) et *Sitotroga cerealella* qui infeste des différentes poacées telles que : le blé, l'orge, le maïs et le sorgho (Arthur, 2019). Une fois l'infestation établie, les ravageurs primaires cèdent la place aux secondaires qui sont incapables de percer l'enveloppe dure des grains sains, c'est pourquoi ils visent uniquement les grains endommagés (Ncibi, 2020). Parmi ceux-ci, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera : Tenebrionidae), communément appelé le Tribolium rouge de la farine, peut entraîner une réduction de 40 % du poids du grain (Rees, 2007).

En réalité, *T. castaneum* est un ravageur extrêmement nuisible en raison de son large distribution, nature cosmopolite et grande variété d'aliments qu'il peut infester. Il est connu pour infester aussi bien les farines des produits céréaliers, blé concassé ou endommagé, mil, maïs, noix, arachides, cacao, fruits secs et parfois les légumineuses (Bell, 2014). D'après les données expérimentales concrètes, il est démontré que les odeurs de farine n'exercent qu'une attractivité marginale sur ladite espèce (Campbell, 2013). Cependant, l'étude approfondie des composants individuels du grain de blé a révélé que les composés volatils présents dans le germe, à l'intérieur du grain, sont plus attrayants pour *T. castaneum* par rapport aux substances volatiles de l'endosperme externe ou des portions de son (Seifelnasr et *al.*, 1982). Cela explique les préférences alimentaires de *T. castaneum*, en tant que ravageur secondaire des produits stockés, qui sont penchées vers les grains déjà endommagés suite à une infestation primaire, pourris ou

transformés (Trematerra et Sciarretta, 2004). De ce fait, les composés volatils issus de germes de blé qui sont présents près de l'insecte pourraient être un indicateur potentiel signalant à ce coléoptère que les grains sont dans un état approprié et prêts à être consommables. Outre, *T. castaneum* s'attirent fortement aux odeurs fongiques, en particulier les molécules volatiles des champignons associées aux fibres de coton, qu'à celles de sources alimentaires conventionnelles telles que les sous-produits du blé. Il est opportun d'ajouter que ledit insecte accompagne le plus souvent les charançons du genre *Sitophilus* pour s'en profiter de leurs dégâts sur les farines et les grains endommagés (Cruz et al., 1988).

Les infestations dues à ce coléoptère sont particulièrement dommageables car il pond ses œufs sur des sources nutritives afin de se développer (Dooley, 2020). En sus, *T. castaneum* sécrète des benzoquinones toxiques et d'autres produits chimiques (2- méthoxybenzoquinone, éthyl-1,4-benzoquinone « EBQ » et méthyl-1,4-benzoquinone « MBQ ») dans les aliments qu'ils infestent à partir de glandes puantes sur leur prothorax et abdomen postérieur (Li et al., 2013). Il convient de mentionner que les benzoquinones, produits par les insectes, sont parmi les composés les plus offensifs en raison de leur toxicité et volatilité élevée (Weatherston, 1967). Une fois sécrétés, ces toxines ont de larges propriétés antimicrobiennes, étant efficaces pour réduire le taux de croissance d'une large gamme de bactéries associées à la farine (Yezerski et al., 2007). Ils se sont révélés toxiques également aux mêmes coléoptères, ainsi qu'aux d'autres espèces, en cas de manque de matière alimentaire qui sera suffisante à absorber leurs sécrétions (Lis et al., 2011). Ces sécrétions nauséabondes épuisent la valeur nutritive des sous-produits à travers l'accumulation de débris larvaires et individus morts dans les moulages, ce qui les rendent désagréables pour la consommation humaine, sans faire mentionner la forte dépréciation des denrées alimentaires en donnant une odeur âcre aux produits, notamment les plus infestés, (Cruz et al., 1988). Par ailleurs, l'activité de l'insecte entraîne un dégagement de chaleur dans les céréales et une humidification du grain, favorisant d'une part le développement des microorganismes, qui contribuent à leur tour à la détérioration de la denrée en produisant les mycotoxines (Guenha et al., 2014), et en créant en d'autre part un support nutritif pour un grand nombre d'acariens saprophytes à l'image de l'*Acarus siro* L. (ciron de la farine) qui se développe aux dépend du germe des grains humides en détruisant davantage leur faculté germinative (Jerraya, 2003).

En raison de la législation de l'exportation encourageant la zéro tolérance des insectes vivants dans les produits commerciaux, l'utilisation massive d'insecticides synthétiques est fortement répandue afin d'éliminer les infestations de ce ravageur dans les lots alimentaires

(Ebadollahi et *al.*, 2017). Cependant, il est maintenant bien établi que ces produits sont dangereux en entraînant divers inconvénients, entre autres : le développement de la résistance aux insecticides qui mène à la résurgence de ces ravageurs (Sheng et *al.*, 2020), les dysfonctionnements des écosystèmes (Brito et *al.*, 2021), les préoccupations à la santé humaine ainsi que leur toxicité envers les organismes non ciblés (Ebadollahi et *al.*, 2017). De tels effets néfastes incitent à l'évaluation de composés naturels efficaces qui peuvent être largement utilisés sans menacer la santé humaine ni détériorer la qualité des grains (Sheng et *al.*, 2020).

À cet égard, les composés d'origine végétale sont naturels et organiques, constituant un point de départ de nombreuses découvertes. Les huiles essentielles (HEs) ont suscité l'intention de plusieurs études qui ont montré l'efficacité insecticide de ces substances dans les systèmes céréaliers entreposés (Tatun et *al.*, 2014). En réalité, les HEs sont des liquides aromatiques volatiles et concentrés. Elles sont des dérivées de plantes pouvant être extraits de leurs fleurs, feuilles, graines, pelures, branches, écorce, bois, racines ou tiges (Soliman et *al.*, 2022). Il s'agit d'un ensemble de métabolites secondaires bioactifs qui aident la plante à interagir avec d'autres espèces et /ou stimuler sa croissance. Elles sont synthétisées par plusieurs familles botaniques aromatiques à savoir : myrtacées, apiacées, méliacées, lamiacées, astéracées, rutacées et apiacées ...etc. (Kheloul et *al.*, 2021). Au niveau des cellules végétales, ces composés bioactifs sont synthétisés dans le cytoplasme et les plastes par différentes voies : l'acide malonique, l'acide mévalonique et du méthyl-D-érythrol-4-phosphate (MEP) pour être enfin stockés dans les trichomes glandulaires, les cavités sécrétoires, les canaux résinifères ou les cellules épidermiques des plantes (Da silva., 2021). Les HEs sont généralement constitués d'une multitude de composants ayant des structures souvent proches (Turek et Stintzing. 2012). Chaque huile est composée de certaines substances ou d'un mélange très complexe de plus de 100 constituants lipophiles non polaires et/ ou semi-polaires de faible poids moléculaire, présents à des concentrations variées, dont deux ou trois représentent les composants majoritaires (Da silva et *al.*, 2021).

Les terpènes sont considérés comme étant la catégorie de molécules chimiques la plus caractéristiques des HEs (Da silva et *al.*, 2021). Sur le plan structurel ces molécules organiques constituent le groupe le plus diversifié de substances naturelles issues de plantes avec plus de 40000 différents composés ; identifiés jusqu'à présent, tout en notant que de nouveaux terpénoïdes, résultant de modifications enzymatiques des terpènes, s'identifieront chaque année. Dans le même contexte, les terpènes sont formés par des combinaisons de molécules d'isoprène

(2-méthylbuta-1,3- diène) à cinq atomes de carbone, dont la formule générale est $[C_5H_8]_n$. Selon le nombre d'unités qui forment leur molécule, ils se classent en monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (Ramsey et *al.*, 2020).

En outre, les monoterpènes sont des hydrocarbures aliphatiques, saturés ou insaturés. Ils peuvent être non cycliques (myrcène, ocimène), cycliques (pinènes, camphène) ou même aromatiques (p-cymène). Bien que les terpènes, au sens strict, ne soient que des hydrocarbures, il existe de nombreux dérivés possédant une ou plusieurs fonctions (Bhavaniramy et *al.*, 2019). Ils peuvent inclure : des alcools acycliques (linalol), monocycliques (menthol) ou bicycliques (bornéol), des aldéhydes (citral et cinnamaldéhyde), des cétones (camphre ; thujone), des esters (acétate de linalyle), des éthers ou oxydes (1,8-cinéole), des phénols (thymol, carvacrol), des peroxydes (ascaridole) et des lactones (népétalactone). Il convient de mentionner que ces fonctions chimiques peuvent s'exprimer dans les sesquiterpènes et les autres terpènes. Cependant, les phénylpropanoïdes, synthétisés dans les plantes à partir de la phénylalanine et les lipides et provenant le plus souvent de la dégradation de molécules peu ou non volatiles (les acides gras et les terpènes), ne font qu'une petite partie des HEs (Hyldgaard et *al.*, 2012)

Les chercheurs se sont longtemps interrogés sur la contribution individuelle réelle de chaque ingrédient dans la bio-activité d'une HE. Certains rapports ont signalé que l'efficacité d'une HE est probablement attribuée à ses principaux composants (Kim et *al.*, 2016 ; Brito et *al.*, 2021). Néanmoins, d'autres ont remarqué à plusieurs reprises que l'HE totale est plus efficace que ses composants agissant séparément (Tak et Isman, 2016), ceci qui signifie que les bio-activités des molécules individuelles ne se réfèrent pas à celles de l'huile entière (Pandiyan et *al.*, 2019 ; Brito et *al.*, 2021).

À cet égard, de nombreuses hypothèses ont été émises dont la plus intensément étudiée est celle qui démontre que les interactions entre les composés chimiques individuels peuvent créer différents effets (notamment additifs) sur un insecte, une fois que la somme des activités des molécules individuelles est équivalente à l'activité de leur mélange; antagoniste, lorsque l'activité des produits chimiques mis en commun est considérablement inférieure à celle résultante d'un effet additif ; ou synergique, si l'activité des molécules couplées est significativement supérieure à celle résultant d'un effet additif (Kim et *al.*, 2016 ; Olszowy-Tomeczyk, 2020 ; Brito et *al.*, 2021). Pour pallier les effets indésirables des insecticides de synthèse, une stratégie suggère de mélanger les HEs aux insecticides de synthèse (Chansang et *al.*, 2018 ; Sheng et *al.*, 2020) ou aux terpènes (Hategekimana et Erler, 2020) ; insecticides

synthétiques avec des terpénoïdes (Isman, 2020); terpénoïdes entre eux (Hategekimana et Erler, 2020), exploitant ainsi leurs interactions synergiques probables. Ces constatations se sont avérées avoir des activités insecticide, répulsive, antipathisante et ovicides (Kheloul et *al.*, 2020 ; Badji et *al.*, 2021 ; Brito et *al.*, 2021). La synergie entre ces produits suit de nombreuses considérations importantes : (1) augmentation de l'efficacité grâce aux effets synergiques ; (2) lutte contre la résistance aux insecticides ; (3) réduction des doses et répercussions indésirables et toxiques ; (4) élargissement du spectre d'efficacité (Pavela et Benelli, 2016 ; Pandiyan et *al.*, 2019 ; Féroz, 2020). D'autre part, peu d'informations sont actuellement connues sur les combinaisons d'HEs qui conduisent à des effets synergiques, additifs ou antagonistes ou même sur leurs compositions chimiques. Les connaissances requises en ce domaine contribueront certainement à la conception de nouvelles formulations insecticides et répulsives vis-à-vis les insectes (Pandiyan et *al.*, 2019).

Ce travail explore, pour la première fois, les HEs des plantes, précédemment mentionnées ainsi que leurs combinaisons. L'identification des compositions chimiques de ces mélanges a été effectuée à l'aide d'une chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), sur cela s'ensuit une analyse hiérarchique des composés (AHC) pour déterminer les similitudes entre les compositions chimiques de tous les échantillons. Leurs efficacités insecticide et répulsive ont été ensuite évaluées contre les adultes de *T. castaneum*. L'analyse de corrélation a servi ultérieurement à examiner la relation entre les activités biologiques et les principaux composants de chaque échantillon. Par la suite une analyse de docking a été effectuée dont le but est de déterminer l'effet inhibiteur des composants des HEs et leurs mélanges sur l'enzyme arylalkylamine N-acyltransférase (AANAT) de *T. castaneum*. Enfin, la cytotoxicité et l'écotoxicité des HEs et leurs mélanges ont été vérifiées à l'égard des cellules MCF 10A ainsi que l' crustacé aquatique *Artemia salina*, respectivement.

Le présent manuscrit comporte deux chapitres dont le premier est consacré à la présentation de la méthodologie adoptée pour la partie expérimentale. Il porte sur les principes adoptés dans cette étude (choix de l'insecte, choix des espèces végétales, le protocole suivi pour l'extraction des HEs et la préparation des leurs mélanges, les applications dans les tests biologiques) ainsi que la façon à exploiter les résultats. Le second chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus qui seraient suivis d'une interprétation et une discussion. Une conclusion générale renfermant l'ensemble de réflexions achevait ce travail.

Chapitre I



Méthodologie de travail

Chapitre I.- Méthodologie du travail

Ce chapitre renferme, le matériel utilisé, l'extraction des HEs, la préparation des combinaisons d'HEs. Sur cela s'ensuit l'identification des profils chimiques des HEs et leurs mélanges ainsi que l'étude de leurs activités insecticide et répulsive contre les adultes de *T. castaneum*. Également, l'étude *In silico* via le docking moléculaire de l'enzyme AANAT de *T. castaneum* avec quelques composés chimiques identifiés dans les HEs et leurs combinaisons. Ce chapitre comporte aussi une évaluation de la cytotoxicité et l'écotoxicité de tous les échantillons ainsi que les analyses statistiques des résultats.

I.1. Matériel de laboratoire

I.1.1. Appareils et Réactifs

Les tableaux 01 et 02 présentent les appareils et réactifs utilisés lors de cette étude.

Tableau 01 : Listes des appareils utilisés lors des expérimentations

Appareil	Modèle
Incubateur pour l'élevage de l'insecte	JOUAN EB115
Loupe binoculaire (WF 15X)	/
Centrifugeuse	Thermo scientific Heraeus Megafuge 16 centrifuge
Poste de sécurité biologique classe II	Laboconco/A2
Compteur des cellules	BioRAD TC10
Incubateur à CO ₂	Thermo scientific Heraeus BB 15
Microscope pour les larves	Olympus SZ X10
Agitateur de microplaques	IKA MS3 digital
Congélateur	Haier/H-DW-40L626
Bain-marie	Memmert
Balance de précision	SHIMADZU A UW220D

Tableau 02 : Listes des réactifs utilisés lors des expérimentations

Réactifs	Marques
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Paisley, Royaume-Uni
Sérum de cheval	Gibco, Paisley, Royaume-Uni
Facteur de croissance épidermique	Gibco, Paisley, Royaume-Uni

Hydrocortisone	Gibco, Paisley, Royaume-Uni
Insuline	Gibco, Paisley, Royaume-Uni
PenStrep	Gibco, Paisley, Royaume-Uni
Bleu de Trypan	/
Trypsine	/

I.1.2. Matériel biologique

Les matériaux biologiques ont été utilisés au cours de cette expérimentation à savoir :

- **Adultes de *T. castaneum*** : ceux-ci ont été issus d'un élevage de masse réalisé au niveau de laboratoire des analyses médicales au niveau du service de santé de la société nationale SONATRACH, région Hassi Messaoud-Ouargla (Algérie) ;
- **Plantes de différentes familles botaniques** : connues pour leurs qualités insecticide et insectifuge. Il s'agit d'*Artemisia herba-alba*, *Juniperus phoenicea* et *Rosmarinus officinalis*.
- **Cellules MCF 10A** : elles sont importées de American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia, United State ;
- **Œufs d'*Artemia salina*** : ils ont été obtenus à partir de laboratoire integrative medicine à Advanced Medical and Dental Institute, Universiti Sains Malaysia, Bertam.

I.2. Choix de l'insecte, *Tribolium* rouge de la farine, *Tribolium castaneum* Herbst (1797)

À mesure que nombreuses études de laboratoire dans les domaines de l'écologie, l'évolution, la biologie du développement et du comportement animal ont considéré les différents coléoptères du genre *Tribolium* en tant qu'organisme modèle (Sokoloff, 1972, 1975, 1978), le présent travail porte également sur l'étude d'une espèce appartenant au même genre à savoir : *T. castaneum*. En effet, ladite espèce est considéré également comme un modèle génétique prometteur pour identifier de nouvelles cibles pour la lutte antiparasitaire ou/ et l'exploration des modes d'action des insecticides (Pai et Bucher, 2019). Rosner et *al.* (2020) ont indiqué qu'en raison de la facilité et la rentabilité de sa sélection, ainsi que la disponibilité de son génome entièrement annoté et séquencé avec plus d'outils génétiques performants, il serait donc très intéressant de l'exploiter pour le développement de nouveaux insecticides.

Ce ravageur, comme de nombreuses espèces nuisibles, a une capacité de reproduction élevée perpétuellement étalée tout au long de l'année. Non seulement les mâles et les femelles qui s'accouplent facilement au sein du laboratoire, mais également, les adultes ont une longue

durée de vie où une seule femelle peut produire des centaines d'œufs, ce qui permet de faire plusieurs essais expérimentaux (Pai et Bucher, 2019).

En raison de son affinité pour les produits céréaliers entreposés, il est facile d'apercevoir *T. castaneum* et de le recueillir dans les moulins, les entrepôts d'aliments, les silos, etc... À ces endroits, cet insecte est facilement détectable car il laisse des traces en forme de petits tunnels sur la poussière de farine. Une fois ramenés au laboratoire, les individus de *T. castaneum* n'exigent pas un grand espace et peuvent être stockés aisément dans des flacons ou bocaux en verre, en raison de leur petite taille. En outre, l'élevage de l'insecte ne nécessite pas un entretien particulier parce que les conditions optimales de développement de ce coléoptère sont facilement maintenues ainsi que tous ses stades de vie se nourrissent du même matériel (Ncibi, 2020). En vérité, les individus peuvent être élevés à peu de frais dans un milieu de farine du blé enrichi à la levure de boulanger. Par ailleurs, l'élevage se maintient indéfiniment dans des conditions sombres. Cette tolérance à l'obscurité facilite leur vie en tant que ravageur des produits céréaliers (Pai et Bucher, 2019).

Outre, la séparation facile des stades de vie de ce coléoptère facilite ainsi l'expérimentation. Les œufs et les larves sont nettement plus petits que les pupes et les adultes et peuvent être facilement séparés les uns aux autres à l'aide d'un tamis à différentes tailles de mailles. Bien que les pupes et les adultes soient de taille claire et similaire, leur trie devient aussi facile en profitant davantage de l'immobilité des pupes. De ce fait, une pléthore d'informations rendant l'insecte en question robuste et facile à être manipulé lors des expérimentations au laboratoire (Pai et Bucher, 2019 ; Ncibi, 2020).

I.2.1. Position systématique

Selon Weidner et Rack. (1984) *T. castaneum* présente une systématique qui est comme suit :

Règne : animalia ;

Embranchement : Arthropoda;

Classe : Insecta ;

Ordre : Coleoptera ;

Famille : Tenebrionidae ;

Genre : *Tribolium* ;

Espèce : *Tribolium castaneum* Herbst (1797).

I.2.2. Cycle de vie, morphologie et bio-écologie de *T. castaneum*

Les individus de *T. castaneum* sont lucifuges, se cachant dans les coins les plus obscurs tels que les fissures dans les murs. Les conditions optimales de développement de cet insecte, pour accomplir un cycle de vie au bout de 30 jours, sont une température de 30 °C une HR de 75% (Pai et Bucher, 2019 ; Ncibi, 2020). Selon Jerraya (2003), les températures limites de leur survie sont celles -6 et celles +50 °C. En outre, son développement cesse au-dessous de 22°C (Camara, 2009). *T. castaneum* est très résistant à la sécheresse et capable de survivre à un jeûne de 25 à 45 jours. Les adultes peuvent vivre plus de 3 ans, bien qu'une durée de vie de 1 à 6 mois soit plus typique dans les conditions de laboratoire (Bonneton, 2010 ; Pai et Bucher, 2019). En somme, le cycle de vie dudit insecte passe par quatre stades à savoir (**Fig.01**) :

- **Œuf**

Durant sa vie la femelle pond entre 500 et 1000 œufs de taille microscopique à l'intérieur des récipients ou directement dans la nourriture (Jerraya, 2003). Ils ont une forme ovoïde de couleur blanchâtre à incolore, recouvert d'un enduit visqueux qui rend sa surface collante en agglutinant les grains de farine et/ ou de poussières (Dia, 2019 ; Jerraya, 2003). Ils sont déposés en vrac ce qui les rend difficiles à déceler. En outre la production d'œufs diminue après 3 à 4 mois pour se cesser définitivement. L'embryogenèse dure généralement 3,5 à 5 jours dans des conditions idéales de laboratoire (Pai et *al.*, 2019). A une température allant de 22 à 27°C les œufs s'éclosent en 6 à 14 jours (Dia, 2019).

- **Larve**

Cet insecte passe par un moyen de 4 à 12 stades larvaires (Jerraya, 2003). Les larves de *T. castaneum* sont vermiformes, elles ont un corps mou couvert de petits poils qui se terminent par deux petites pointes. Elles ont six pattes, avec deux projections pointues vers l'extrémité caudale (Diome, 2014). La larve peut atteindre 5 à 6 mm de longueur avec une couleur blanchâtre à jaune brun. La tête et l'extrémité inférieure du corps sont plus foncés allant vers le rougeâtre. A ce stade, l'insecte est très actif et se déplace librement en creusant des galeries sinueuses dans la masse de la farine (Jerraya, 2003). Dans des conditions optimales, le stade larvaire dure généralement environ 2 à 3 semaines pour qu'il se développe en nymphe sans cocon (Dia, 2019 ; Pai et Bucher, 2019).

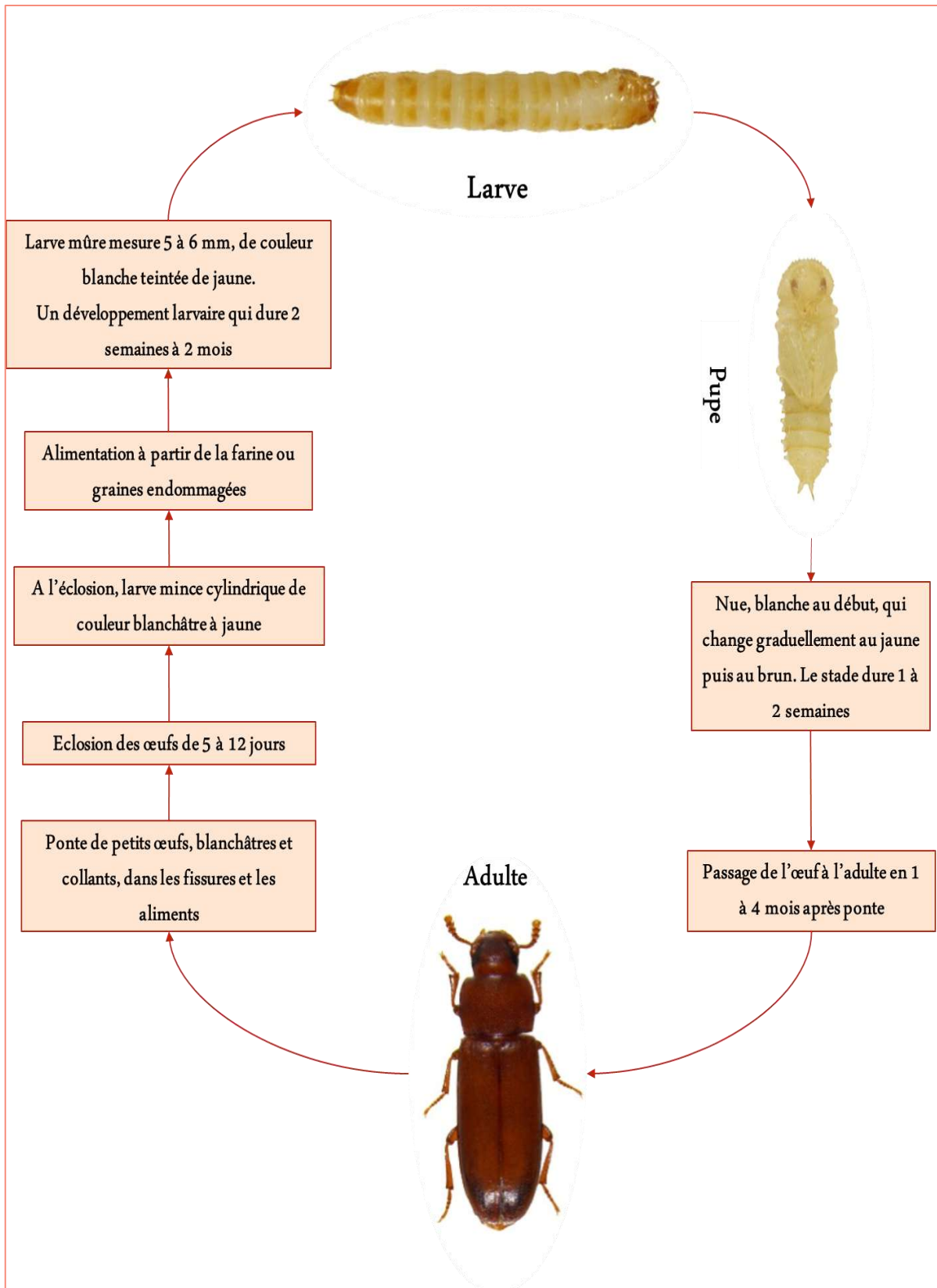


Figure 01 : Cycle de développement de *Tribolium* rouge de la farine, *T. castaneum* (Boles, 2011 ; Khan et al., 2016).

- **Nymphe (pupe)**

La nymphe est nue de couleur blanche, avec un abdomen portant latéralement des lames rectangulaires à bords crénelés (Jerraya, 2003). Les pupes ne sont pas capables de locomotion bien qu'elles puissent se tortiller (le mouvement provenant de l'abdomen). Dans un environnement favorable, le stade nymphal peut durer 5 à 6 jours (Pai et Bucher, 2019).

- **Adulte**

C'est un petit coléoptère qui mesure 4 à 5 mm, de couleur brun roux et de forme allongée étroite (Dai, 2019). Il est nettement reconnaissable en raison de la distinction de trois parties du corps (tête, thorax et abdomen) et des antennes courtes moniliformes. Celles-ci possèdent trois derniers articles élargis formant une massue terminale et un chaperon qui ne dépasse pas l'œil latéralement. Il a une tête large et plate dépourvue de rostre ainsi qu'un thorax sans dents latérales. Le pronotum est rectangulaire, plus large que long, finement ponctué (Jerraya, 2003 ; Janovy et al.,2007). *T. castaneum* présente aussi des yeux ovales et non surmontés d'un bourrelet semblable à une paupière et des élytres avec des lignées longitudinales pointillées incapables de voler (Camara, 2009).

T. castaneum présente un dimorphisme sexuel aussi bien au stade nymphal qu'au stade adulte (**Fig. 02**). Cependant, il est plus facile de distinguer les sexes chez les nymphes que chez les adultes. Mâle ou femelle, l'abdomen de la pupe se termine par deux urogomphes. Chez les femelles, les papilles génitales (situées juste en avant des urogomphes) sont nettement plus développées que celles chez les mâles. Autrement dit, les urogomphes des pupes mâles sont beaucoup plus petits et ressemblent beaucoup plus à du bout des doigts plutôt qu'à des doigts entiers (Dia. 2019).

Au stade adulte, les mâles montrent un petit lopin de poils courts sur le côté antérieur de la première paire de jambes (à 1/3 de la distance de la base) plus précisément au niveau du fémur de la première paire de pattes, alors que ces poils sont absents chez les femelles (Dia. 2019).

Plusieurs facteurs influencent le développement de cet insecte tels que la génétique des souches au sein de même espèce ainsi que les facteurs environnementaux à l'image de la température, l'humidité et la nourriture (Diome, 2014 ; Pai et Bucher, 2019).

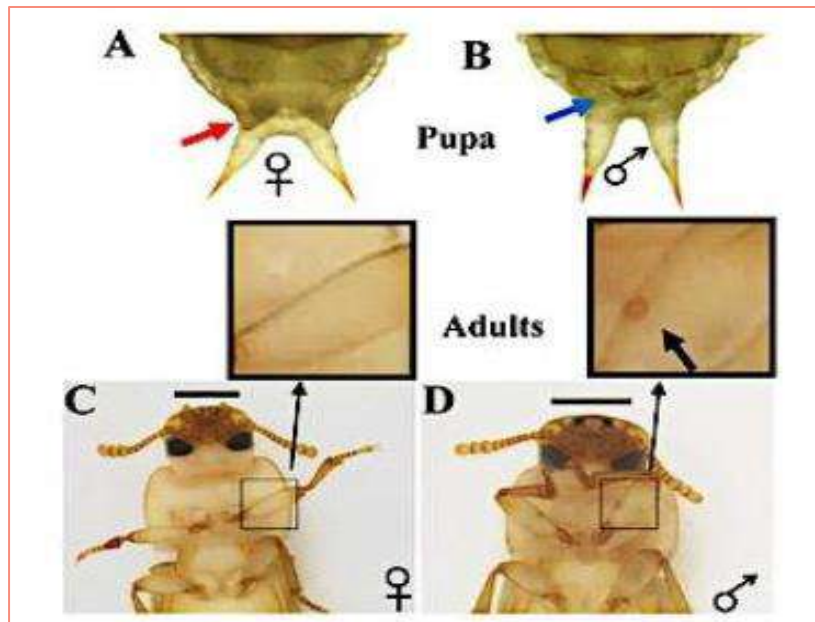


Figure 02 : Dimorphismes sexuels chez la pupa et le mâle de *T. castaneum* A : pupa femelle, B : pupa male, C : adulte femelle D. adulte male (Shukla et Palli, 2012).

I.2.3. Distribution de *T. castaneum*

Le *T. castaneum* est une espèce cosmopolite, il se rencontre presque partout dans le monde, sous des latitudes fraîches de l'Amérique, l'Europe, l'Afrique, l'Asie et dans les régions méditerranéennes. (Jerraya, 2003).

I.2.4. Identification morphologique et élevage de *T. castaneum*

L'objectif de cette étape est d'obtenir une population suffisante des adultes de *T. castaneum* pour la réalisation des expérimentations biologiques. La souche originale de *T. castaneum* a été recueillie, en Octobre 2017, dans des sachets en plastique à partir d'une semoule infestée provenant d'un magasin des produits céréaliers au niveau du marché de Souk Elhadjer, situé au centre de la wilaya de Ouargla (Algérie). Lors du transfert des échantillons, les sachets doivent être fermés hermétiquement et temporairement pour empêcher tout échappement de l'insecte vers l'extérieur. Ensuite, l'espèce est identifiée macroscopiquement, à l'aide d'une loupe binoculaire, par Pr. Sekour Makhoulf, le zoologiste affilié au département des Sciences Agronomiques à l'université Kasdi Merbah, Ouargla (Algérie). Ultérieurement, les individus ont été dirigés au laboratoire où s'est déroulé l'élevage de masse suivant la méthode de Liang et al. (2017). Au laboratoire, les échantillons ont été transférés dans des cristallisoirs de 2 à 3 L contenant la farine de blé dur qui est enrichi de la levure de boulanger, à base de *Saccharomyces cerevisiae*, à un rapport de poids égale à 10 : 1. De plus, les récipients

ont été pas recouverts afin d'offrir un système d'aération à ladite population, et au même temps, le niveau de la matière alimentaire ne doit pas dépasser la moitié de volume des boucaux de peur que les adultes émergents vont quitter l'élevage après maturation. Plus tard, l'insecte a été maintenu à l'intérieur d'un incubateur, réglé à 29 ± 1 °C et à $70 \pm 8\%$ d'HR dans des conditions d'obscurité (Fig. 03).



Figure 03 : Adultes de *T. castaneum* (a) élevés dans une étuve de laboratoire (b).

Les différents stades de l'insecte sont séparés en utilisant une passoire en inox de 15 cm de diamètre (à usage ordinaire dans la cuisine) dont le principe est même de celui de tamisage où les mailles permettent le passage des petites larves ainsi que les œufs contenus dans le milieu nutritionnel. La part tamisée a été utilisée pour lancer une nouvelle culture du quelle des pupes et des adultes ont été obtenus à une période de temps. Ceux-ci avec les larves, en stades avancées, ont été récupérés sur la passoire d'où les pupes ont été séparées des autres stades en utilisant une petite pince en acier, en profitant de leur immobilité caractéristique. Les pupes isolées ont été ensuite mises dans une boîte de Pétri en verre où se déroule une étape de détermination sexuelle de chaque pupa à l'aide d'une loupe binoculaire, en se basant sur les différences morphologiques précédemment détaillées. Durant cette étape, les pupes mâles et femelles ont été disposées dans deux boîtes de Pétri distinctes qui ne contiennent aucun substrat alimentaire. Les jeunes adultes, de zéro à sept jours, émergents à partir des pupes isolées ont été utilisés dans les essais biologiques. En outre, le renouvellement du support alimentaire a été effectué périodiquement à cause de l'épuisement du milieu nutritif et des déchets résultants de

l'élevage. A leur tour, les adultes et les larves issus de la deuxième séparation ont été déposés dans un nouveau cristalliseur contenant un nouveau substrat alimentaire convenable au développement de l'insecte.

I.3. Choix des plantes

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales à multiples usages grâce à sa grande surface et diversité géo-climatique, dont le nord est caractérisé par un climat méditerranéen, les hauts plateaux se distinguent par un climat semi-aride, tandis que la plateforme saharienne a un climat aride (Hamza et al., 2019). Diverses espèces végétales sont utilisées pour des fins médicinales dans différentes régions d'Algérie y compris celles récoltées des chaînes montagneuses des Aurès (Hamza et al., 2019). Un nombre de 167 plantes médicinales, réparties en 59 familles, a été identifié par Adouane (2015) qui a mené une étude ethnobotanique, dont les plus couramment utilisées sont : *Rosmarinus officinalis* L., *Artemisia herba-alba* Asso, *Mentha spicata* L., *Thymus vulgaris* L., *Juniperus phoenicea* L., *Lavandula officinalis* Chaix, *Pimpinella anisum* L., *Cuminum cyminum* L., et *Peganum harmala* L. Ainsi, la présente étude se focalise sur *Artemisia herba-alba*, *Juniperus phoenicea* et *Rosmarinus officinalis* pour se servir de leurs HEs ainsi que leurs mélanges dérivés dans la réalisation de différents essais biologiques.

I.3.1. *Artemisia herba-alba* Asso (1779).

I.3.1.1. Noms vernaculaires

La plante, est appelée armoise blanche en français, white wormwood en anglais, est connue sous différentes appellations en arabe à savoir : Chih, Chiha, Chiba ou azir (Quezel et Santa., 1963 ; Bendjilali et al., 1984 ; Marc et al., 2004).

I.3.1.2. Position systématique

A. herba-alba se classifie systématiquement comme suit :

- **Embranchement** : Spermaphytes ou spermatophytes ;
- **Sous embranchement** : Angiospermes ;
- **Classe** : Dicotylédones ;
- **Sous Classe** : Gamopétales ;
- **Ordre** : Astérales ;
- **Famille** : Composées ;

- **Sous famille :** Radiées ;
- **Genre :** *Artemisia* ;
- **Espèce:** *Artemisia herba-alba*, Asso (1779) (Deysson, 1976).

I.3.1.3. Description botanique

L'Armoise blanche est une plante herbacée à tiges ligneuses de 30 à 50cm, ramifiées, très feuillées (**Fig. 04**). Ces feuilles sont petites, sessiles et pubescentes à aspect argenté. Les fleurs sont groupées en grappes à capitules ovoïdes et très petites (3/ 1,5 mm). L'involucre est à bractées imbriquées avec des externes orbiculaires et pubescentes. Le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs hermaphrodites jaunâtres/ capitule (Pottier, 1981).

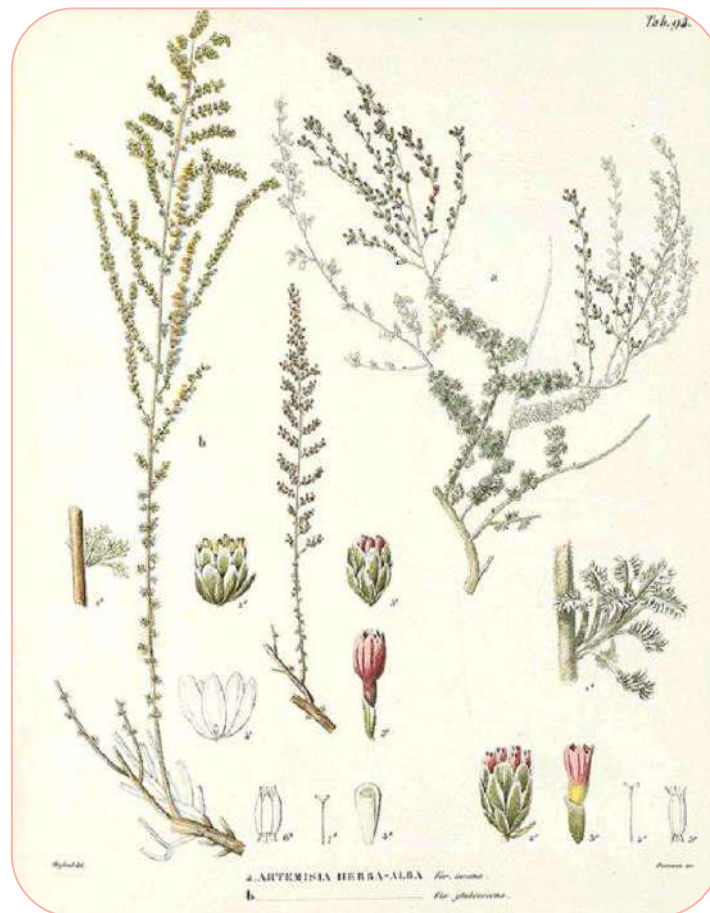


Figure 04 : Morphologie générale de plante d'*A. herba-alba* Asso (Bouafia, 2022)

I.3.1.4. Répartition géographique

Cette plante pousse à l'état sauvage aussi bien dans les régions arides du bassin méditerranéen que dans le nord-ouest de l'Himalaya. Elle est abondante dans la péninsule

ibérique atteignant la population la plus élevée dans le centre de l'Espagne puis s'étendant sur l'est, le sud-est et le sud de l'Espagne (Gacem et al., 2020).

I.3.1.5. Intérêts socioéconomiques

Depuis l'antiquité, l'extrait végétal d'*A. herba-alba* a été utilisé en médecine traditionnelle dans de nombreuses cultures parce qu'il a de nombreuses activités pharmacologiques et biologiques en particulier antidiabétiques, antimicrobiens, antitumoraux, antipaludiques, antioxydants, insecticides et neurologiques (Mo-hamed et al., 2010 ; Mohamed., 2019 ; Iriadam et al., 2006 ; Mighri et al., 2010 ; Essid et al., 2015 ; Hatimi et al., 2001 ; Cheraif et al., 2020). Au Maroc, cette plante a été utilisée comme une tisane pour traiter l'hypertension et les troubles gastriques (Laid et al., 2008). En Algérie, cette plante est utilisée comme fourrage pour l'agneau et d'autres animaux d'élevage (Bouazza et al., 2019 ; Gacem et al., 2020 ; Ghanai et al., 2018). Au cours des dernières décennies, de nombreuses études internationales ont effectué des analyses phytochimiques sur *A. herba-alba* en rapportant essentiellement que les terpénoïdes sesquiterpène, principalement présents dans les parties aériennes d'*A. herba-alba*, sont responsables de ses propriétés médicinales (Younsi et al., 2016 ; Tilaoui et al., 2015 ; Abood et al., 2017 ; Bourgou et al., 2017).

I.3.2. *Juniperus phoenicea* L., (1753)

I.3.2.1. Noms vernaculaires

La plante, nommée genévrier de phénicie en français, phoenician cedar ou berry bearing cedar en anglais, est appelée autrement en arabe à savoir : Arar عرعار (Quezel et Santa, 1962).

I.3.2.2. Position systématique

Selon Haluk et Roussel. (2000) la classification botanique de cette plante est comme suite :

- **Embranchement** : Spermaphytes ;
- **Sous-embranchement** : Gymnospermes ;
- **Classe** : Coniferopsides ;
- **Sous classe** : Coniferiidae ;
- **Ordre** : Cupressales ;
- **Famille** : Cupressacée ;
- **Sous famille** : Cupressoïdées ;
- **Genre** : *Juniperus* ;

- **Espèce :** *Juniperus phoenicea* L., 1753.

I.3.2.3. Description botanique

Le genévrier de Phénicie est un arbuste à feuillage persistant qui peut atteindre 5 à 8 m avec un tronc mesurant de 1 à 2 m de diamètre (**Fig. 05**). La forme arbustive développe plusieurs tiges près du sol (Brill et Leiden. 2010). La cime est dense d'âge irrégulier, d'abord conique puis s'élargissant, avec des branches ascendantes souvent recourbées (Eckenwalder, 2009 ; Brill et Leiden. 2010). L'écorce est brune grisâtre foncée s'exfoliant en bandes étroites (Eckenwalder, 2009). Sur les jeunes plantes, les feuilles ressemblent à des aiguilles, d'environ 1 mm de large et 5 à 14 mm de long, avec 2 bandes stomatiques se situant dans les deux faces foliaires (Amaral Franco et al., 1993). Le genévrier est principalement monoïque, mais il peut apparaître toujours dioïque dans certaines populations (Jordano, 1991 ; Brill et Leiden. 2010).



Figure 05: *J. phoenicea* (Site Elec 01)

I.3.2.4. Répartition géographique

La répartition du genévrier phénicien couvre, avec des petites populations dispersées, toute la zone de bassin méditerranéen, sur les côtes atlantiques et les montagnes de l'Atlas Africain à l'ouest, la Jordanie, la péninsule du Sinaï, le long de la mer Rouge à l'est de l'Arabie saoudite. Il est également présent à Madère et aux îles Canaries (Pardos et *al.*, 2000 ; Brill et Leiden. 2010 ; Amaral Franco, 1993 ; Farjon et Filer, 2013). Il peut pousser sur des altitudes de

2400 m dans la chaîne montagneuse de l'Atlas et celle de l'Asir (Arabie Saoudite) (Pardos et al., 2000 ; Farjon et Filer. 2013 ; Farjon, 2013).

I.3.2.5. Intérêts socioéconomiques

Juniperus est considéré comme le plus important genre dans la famille des Cupressaceae. Les baies de *J. phoenicea* ont été trouvées dans les tombes égyptiennes antiques (El-Sawi et al., 2014) paraissant en Sinaï et la région méditerranéenne (Aljaiyash et al., 2014). L'examen phytochimique des feuilles et des fruits de la plante a montré qu'elle est riche en HEs, glucides et/ ou glycosides, stérols et/ ou triterpènes ainsi que flavonoïdes (Tavares et al., 2012). En fait, tous les extraits alcooliques issus des parties aériennes de *J. phoenicea* possèdent de fortes activités cytotoxique et antibactérienne (Eissa et al., 2014). L'effet des baies de genévrier a été amplement utilisé comme remède potentiel au diabète accompagnant un régime alimentaire (Tavares et al., 2012). Le broyat de ses feuilles s'avère efficace comme diurétique ou contre les maladies des bronches. De plus, le goudron de cette espèce est utilisé comme remède intestinal pour les enfants en alternative au riz de Barbarie (Eissa et al., 2014) ; le broyat de ses fruits séchés est utilisé pour guérir les abcès et les ulcères de la peau tandis que le mélange de feuilles et fruits de *J. phoenicea* est utilisé comme agent hypoglycémique oral (Amer et al., 1994). De même, son bois sert également dans la menuiserie en Algérie et en Tunisie ainsi pour la production de charbon et de combustible dans toute l'Afrique (Pardos et al., 2000 ; Farjon et al., 2013). Pareillement, l'utilisation médicinale des plantes de *Juniperus* en Arabie saoudite, Liban, Bosnie et Turquie est répandue selon la médecine populaire ; avec lesquelles ils traitent les rhumatismes, les calculs biliaires, les troubles urinaires ainsi que les maladies des voies respiratoires et de la peau (Öztürk et al., 2011)

I.3.3. *Rosmarinus officinalis* L. (1753)

I.3.3.1. Noms vernaculaires

La plante est populairement connue sous le nom de إكليل الجبل en arabe, rosemary en anglais, alecrim en portugais et romero en espagnol (Muñoz-Centeno, 2002).

I.3.3.2. Position systématique

La systématique du romarin est décrite Quezel et Santa (1963) comme suivant :

- **Règne** : Plantae ;
- **Phylum** : Magnoliophyta ;

- **Classe** : Magnoliopsida ;
- **Ordre** : Lamiales ;
- **Famille** : Lamiaceae ;
- **Genre** : *Rosmarinus* ;
- **Espèce** : *Rosmarinus officinalis* L., 1753.

I.3.3.3. Description botanique

C'est un arbuste qui pousse jusqu'à 2 m de haut ayant des feuilles vertes vivaces (**Fig. 06**) (Ribeiro-Santos et al., 2015 ; Kokkini et al., 2003). *R. officinalis* a des branches brunes, dressées et rarement rampantes avec des feuilles linéaires en vert foncé. Ses fleurs sont petites disposées en verticillaire axillaires, à corolle légèrement blanche à violet. Elles possèdent deux étamines latérales qui sont nettement exposées formant l'androcée, avec une petite dent latérale sur ses filaments (Ribeiro-Santos et al., 2015 ; Kokkini et al., 2003 ; Tawfik et al., 1998).



Figure 06 : : Morphologie générale de plante de *R. officinalis* (Site Elec 02).

I.3.3.4. Répartition géographique

Le romarin est une plante spontanée sur toute la région méditerranéenne (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye, France, Espagne, Portugal, Grèce, Turquie et Italie). Cependant, on le retrouve dans de nombreux pays d'Europe et d'Asie notamment l'Inde, les Philippines, les Antilles, l'Australie, les Etats-Unis et le Mexique, étant donné qu'il est cultivé depuis l'antiquité (Outaleb, 2016).

I.3.3.5. Intérêts socioéconomiques

R. officinalis est utilisé en médecine traditionnelle pour soulager plusieurs douleurs, y compris celles rhumatismales, les maux de tête, la dysménorrhée, l'épilepsie et les spasmes ; ainsi pour traiter d'autres troubles à l'image de l'amélioration de la mémoire, l'hystérie, la dépression ainsi que la fatigue physique et mentale (Duke, 2000 ; Heinrich et *al.*, 2006). Récemment, un intérêt scientifique notable a été accordé à différents types d'extraits de cette plante grâce à ses propriétés thérapeutiques bénéfiques et ses principaux constituants, notamment l'acide carnosique, carnosol, acide rosmarinique, etc.... De plus, un nombre important d'études a été évoqué sur des modèles animaux ou sur des cellules cultivées concernant son large éventail de caractéristiques médicinales anti-inflammatoires (Beninca et *al.*, 2011 ; Kayashima et Matsubara. 2012), antioxydants (Bakirel et *al.*, 2008), antinociceptifs (González-Trujano et *al.*, 2007), neuroprotecteurs (Hou et *al.*, 2012), antidépresseurs et pour l'amélioration de la mémoire et la fatigue mentale (Hosseinzadeh et *al.*, 2004 ; Sasaki et *al.*, 2013). Le romarin est classé comme étant « généralement sûr » ou GRAS (CFR182.10 ; 182.20) par la FDA en Amérique (Aguilar et *al.*, 2017). L'acide rosmarinique présente une toxicité très faible chez la souris (Tal Friedman, 2015).

I.4. Préparation de matériel végétal

I.4.1. Présentation de la région d'étude

La zone d'étude est bien la région des Aurès (**Fig. 07**), clairement décrite par Baghami (2013). Les Aurès se situent à l'extrême Nord-est de l'Algérie en constituant une entité géographique qui appartient au domaine de l'Atlas saharien. Ils forment une partie de l'Atlas présaharien dont son point culminant est le mont Chelia (2328 m d'altitude). Cette entité est une sorte de barrière biogéographique contre l'avancée du désert, représentée en un îlot vert qui est encerclé par des terrains désertiques ou en voie de désertification. Cette région se divise en trois zones : les hautes plaines de l'Atlas tellien (Souk-Ahras), les hauts plateaux de l'Atlas

saharien (Tébessa, Sétif, Khenchela, Batna, Oum El Bouaghi) et le Sahara (Biskra) (Meharzi, 2010). Les plantes qui ont fait l'objet de la présente étude ont été récolté de trois différentes zones qui se situent au sud de la wilaya de Khenchela, dont les caractéristiques géo-climatiques sont : une température moyenne annuelle de 15,48°C, un taux de précipitations annuelles de 514,89 mm, une altitude de 1152 m, une latitude de 35°28' N et une longitude de 7°05' E avec un climat semi-aride à hiver froid (Maghni et *al.*, 2017).

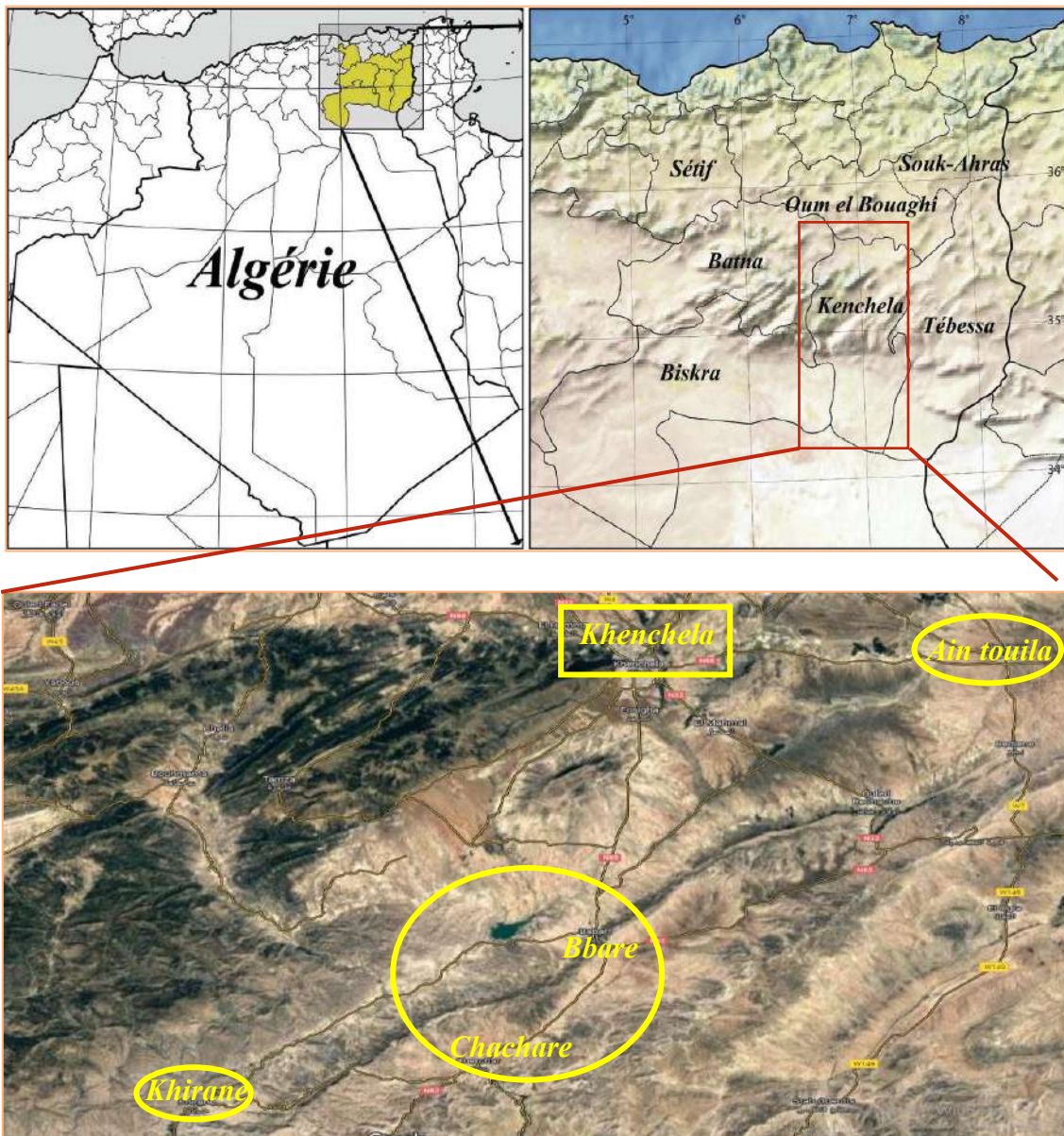


Figure 07 : Localisation géographique de la région d'étude (Maghni et *al.*, 2017 ; Site Elec 03)

I.4.2. Récolte, identification et conservation des plantes

Cette opération a été effectuée en septembre 2017 où *R. officinalis* a été récolté de la zone de Fedj Elharath, situant dans la commune de Ain touila, *A. herba-alba* a été collecté sur une zone qui se localise entre les communes de Babar et Chachare, Alors que *J. phoenicea* a été échantillonné de la zone de Khirane (**Fig. 07 ; 08**). Les parties aériennes des plantes ont été découpées par un sécateur métallique sans arracher leurs racines. Le matériel végétal a été transporté séparément dans des sachets, puis séché pendant 5 à 7 jours dans un endroit aéré à l'abri du soleil et d'humidité. Les fleurs et les feuilles de chaque plante ont été séparées des tiges, ensuite conservées dans des boîtes en plastique dans des conditions pareilles à celles de séchage. Quelques spécimens végétaux ont été prélevés, séchés en les pressant contre des papiers afin de se servir comme support physique à l'identification taxonomique des trois plantes. Ceci a été réalisé par les botanistes du département des sciences agronomiques, de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie.



Figure 08 : Plantes lors de la récolte **a** : *A. herba-alba* ; **b** : *R. officinalis*.

I.5. Extraction des HEs et préparation des mélanges

I.5.1. Principe de l'hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode souvent adoptée pour l'extraction des HEs. Elle est considérée comme étant la plus simple technique utilisée pour obtenir des HEs à partir du matériel végétal suite à l'immersion de sa biomasse dans l'eau bouillante. L'huile contenue dans les cellules des tissus végétales se diffuse par osmose dans l'eau bouillante qui, par son évaporation, transporte les vapeurs d'huile dans un condenseur d'où elle est enfin séparée de l'eau par décantation (Campolo et al., 2018).

I.5.2. Mode opératoire

Les HEs ont été extraites par hydrodistillation pendant 3 h à l'aide d'un appareil de type Clevenger équipé d'un réfrigérateur pour minimiser les effets de surchauffage, en suivant la méthode de la Pharmacopée Européenne. Une quantité de 400 g du matériel végétal a été transférée dans un ballon de 2 l dont les 2/3 ont été remplis d'eau de robinet. Après l'ébullition de l'ensemble et en raison de différence de densité, une ampoule à décanter a été utilisée pour isoler les HEs entraînées par la vapeur d'eau. Enfin, une quantité du sulfate de sodium anhydre a été ajoutée pour éliminer l'eau supplémentaire. Les HEs ont été conservées dans des flacons hermétiques en verre à l'abri de la lumière à 4 °C. Ensuite, neuf mélanges binaires ont été préparés en combinant à chaque fois deux HEs à différents rapports, pareillement, une combinaison ternaire a été préparée de trois HEs à un rapport 1 :1 :1 d'HEs (**Tab. 03**).

Tableau 03 : Compositions des combinaisons préparées à partir d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis*

Mélanges	Rapport	Quantité des composants de mélange (vol/vol)		
		<i>A. herba-alba</i> (A)	<i>J. phoenicea</i> (B)	<i>R. officinalis</i> (C)
D	3 : 1	6 ml	2 ml	/
E	1 : 3	2 ml	6 ml	/
F	1 : 1	4 ml	4 ml	/
G	3 : 1	6 ml	/	2 ml
H	1 : 3	2 ml	/	6 ml
I	1 : 1	4 ml	/	4 ml
J	3 : 1	/	6 ml	2 ml
K	1 : 3	/	2 ml	6 ml
L	1 : 1	/	4 ml	4 ml
M	1 : 1 : 1	2 ml	2 ml	2 ml

I.6. Identification des compositions chimiques des HEs et leurs mélanges

La méthode de Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse a été utilisée (GC-MS) dont le but de déterminer les compositions chimiques des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs mélanges.

I.6.1. Principe de la GC-MS

C'est une technique de référence dans le secteur particulier des HEs. L'idée de coupler une autre méthode physique d'investigation après séparation chromatographique, s'est concrétisée dès 1960, dont le but est d'ajouter à la chromatographie une deuxième dimension analytique (De Maack et Sablier, 1994).

Le principe de cette méthode consiste à transférer par le gaz vecteur (phase mobile) les composés séparés par chromatographie en phase gazeuse dans le spectromètre de masse au niveau duquel, ils vont être fragmentés en ions de masse variables dont la séparation sera en fonction de leurs masses. La comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence permet son identification à condition que la similitude des spectres, inconnus et référence, soit suffisante et que les indices de rétention soient identiques, dans des conditions opératoires comparables (Desjobert et *al.*, 1997 ; Bruneton, 1999).

I.6.2. Mode opératoire

La détermination des compositions chimiques des HEs ainsi que leurs mélanges a été effectuée au niveau de laboratoire de génie des procédés à l'université d'Ouargla, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de type Bruker SCION 436 GC (USA) qui a été équipée d'un détecteur sélectif de masse de type VARIAN-Ion Trap Saturn II (70 eV) avec une source d'ions à 230 °C. La colonne utilisée a été HP-5MS de 15 m × 0,25 mm × 0,25 µm de dimensions. Cependant, la phase stationnaire de la colonne a été constituée de 5 % de phényle et de 95 % de diméthylpolysiloxane. Les conditions chromatographiques ont été paramétrées comme suit : l'hélium est le gaz vecteur sous un débit de 1,5 ml/min ; le volume d'injection est 1 µl de solution (dilué dans l'hexane à 1 %) ; la température d'injection est 250 °C en mode split 1 :50 ; la température initiale de la colonne est de 70 °C avec une augmentation de 10 °C/ min jusqu'à une température 300 °C. Enfin, les compositions des échantillons ont été identifiées à l'aide de la bibliothèque en ligne NIST (Standard Reference Data, Gaithersburg, MD, USA) et le taux relatif (%) de chaque composant a été déterminé en faisant la moyenne de la surface du pic GC-MS.

I.7. Activités biologiques des HEs vis-à-vis des adultes de *T. castaneum*

I.7.1. Effet insecticide des HEs et leurs mélanges par inhalation

I.7.1.1. Principe

La toxicité par inhalation est une méthode trop efficace pour se contourner de pertes causées par les insectes sur les produits alimentaires stockés. Cette méthode vise à éliminer les insectes ou à limiter leurs infestations directes sur les produits dont le principe est basé essentiellement sur l'utilisation des produits dites volatils, qui se définissent comme étant des substances à pouvoir évaporatoire à une température supérieure à 5°C. Celles-ci agissent dans un système fermé en phase gazeuse ou vapeur, sur les ravageurs cibles avec une capacité de pénétration élevée. En phase vapeur, les composés organiques volatils d'origine végétale peuvent pénétrer le système respiratoire de l'insecte et présenter leur effet toxique. Actuellement, différentes HEs avec leurs composés bioactifs sont fortement appréciés et recommandés en tant qu'insecticides appliqués par inhalation en raison de leur forte volatilité et bio-activité prouvées contre une large gamme d'insectes (Chaudhari et *al.*, 2021 ; Singh et *al.*, 2021).

I.7.1.2. Mode opératoire

Ce test consiste à évaluer l'effet insecticide des trois HEs ainsi que leurs combinaisons contre les adultes des *T. castaneum* par inhalation, en suivant la méthode modifiée de Papachristos et Stamopoulos (2001). Les essais ont été menés dans des flacons en verre (60 ml) ayant des couvercles à vis. Dans chaque lot, vingt adultes (10 males et autant femelles) ont été directement déposés dans un conteneur vide. Ensuite, des masses de coton ont été fixés à l'aide des fils de coton à la face intérieur des couvercles puis imprégnés, selon le lot de traitement, de 2,5, 05, 10 et 20 µl d'HEs ou de leurs mélanges, correspondant aux concentrations calculées de 41,67, 83,33, 166,67 et 333,33 µl/l d'air, respectivement. Enfin, les flacons ont été fermés hermétiquement par leurs couvercles sellés par des bandes adhésives de parafilm pour empêcher l'effet de l'air. Le témoin négatif consiste en même protocole sauf que la masse cotonnée est exempte de traitement (HEs ou mélanges). Trois répétitions ont été retenues pour chaque traitement, y compris le témoin. L'essai a été réalisé à une température de 25 ± 5 °C où les taux de mortalités ont été enregistrés après 24, 48, 72 et 96h de traitement (**Fig. 09**). Les insectes ont été considérés comme morts si aucun mouvement des antennes ou des pattes n'a été observé. Le pourcentage de mortalité (PM) a été calculé en utilisant la formule adoptée par Abbott. (1925) :

$$PM (\%) = \frac{(Nc - Nt)}{Nc} \times 100$$

Nc : nombre d'individus vivants présents dans le lot témoin négatif ;

Nn : nombre d'individus vivants présents dans le lot traité.

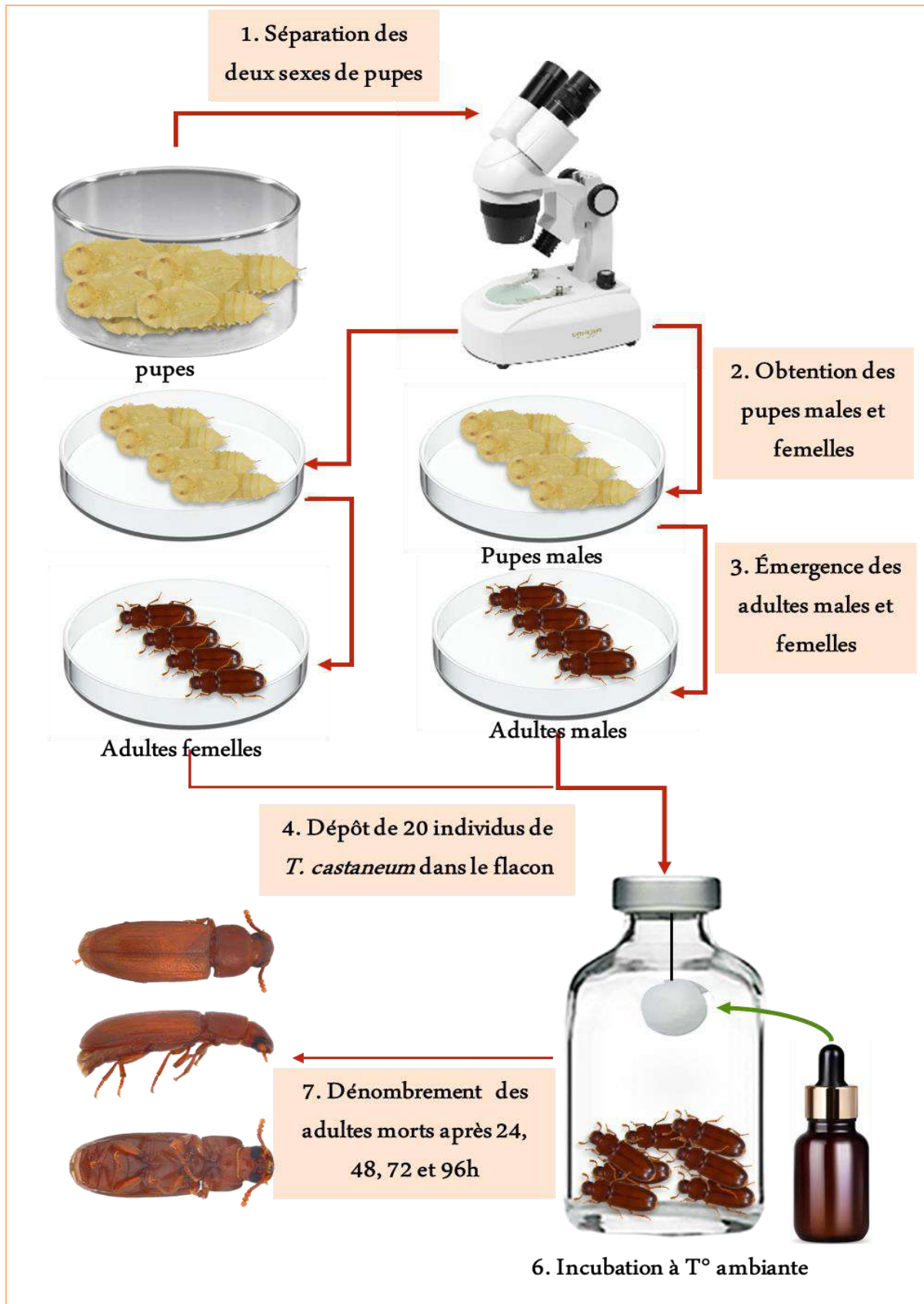


Figure 09 : Procédure de réalisation de de test de toxicité par inhalation vis-à-vis des adultes de *T. castaneum*.

I.7.2. Effet répulsif des HEs et leurs combinaisons

I.7.2.1. Principe

La répulsion se base sur le pouvoir insectifuge de certaines substances chimiques, émettes de végétaux, à protéger les produits céréaliers entreposés contre les dégâts causés par les insectes nuisibles. La méthode consiste à rendre les aliments stockés peu attrayants, désagréables ou offensants pour ces ravageurs. Leurs modes d'action se présentent comme un empêchement de l'insecte d'atterrir à la surface des aliments en agissant en tant qu'agents pare-vapeur. Ces derniers affectent principalement les coléoptères adultes qui fuient les grains traités. Les propriétés de répulsion des HEs possèdent un impact important sur le système traditionnel de stockage post-récolte (Chaudhari et *al.*, 2021 ; Singh et *al.*, 2021).

I.7.2.2. Mode opératoire

L'effet répulsif des HEs ainsi que leurs combinaisons à l'égard des adultes de *T. castaneum* a été évalué sur papier filtre en utilisant la méthode de la zone préférentielle, décrite par Jilani et Saxena. (1990). Il s'agit de :

Un volume de 4 µl de chaque échantillon a été introduit dans un tube à essai contenant 1000 µl d'acétone. Puis, des dilutions demi-en-demi ont été préparées pour avoir les concentrations suivantes : 2, 1, 0.5 et 0.25 µl/500 µl d'acétone, ce qui pourcentage sont équivalent à 1,96 ; 3,93 ; 7,86 et 15,72 nl/cm², respectivement. Ensuite, des disques de 9 cm de diamètre de papier filtre ont été coupés en deux. 500 µl de chacune des doses des solutions préparées, ont été étalées uniformément sur une seule moitié du papier filtre tandis que l'autre moitié n'a rien reçu, lequel a été considéré un témoin. Après 15 min d'évaporation complète de l'acétone, les demi-disques ont été symétriquement adhésés l'un à l'autre et mis au fond des boîtes de Pétri. Ensuite, dix couples d'adultes de *T. castaneum* ont été déposées au centre de chaque disque sur un seul fond de boîte. Chaque lot a été établi en triplicata à une température de 25 ± 5 °C. Le nombre d'insectes qui ont été manifestés sur la partie témoin (Nc) et la partie traitée (Nt) a été compté après 30 min de début de test (**Fig. 10**). Le pourcentage de répulsion (PR) a été calculé en utilisant la formule de Mc Donald et *al.* (1970) :

$$\text{PR (\%)} = [(Nc - Nt) / (Nc + Nt)] \times 100$$

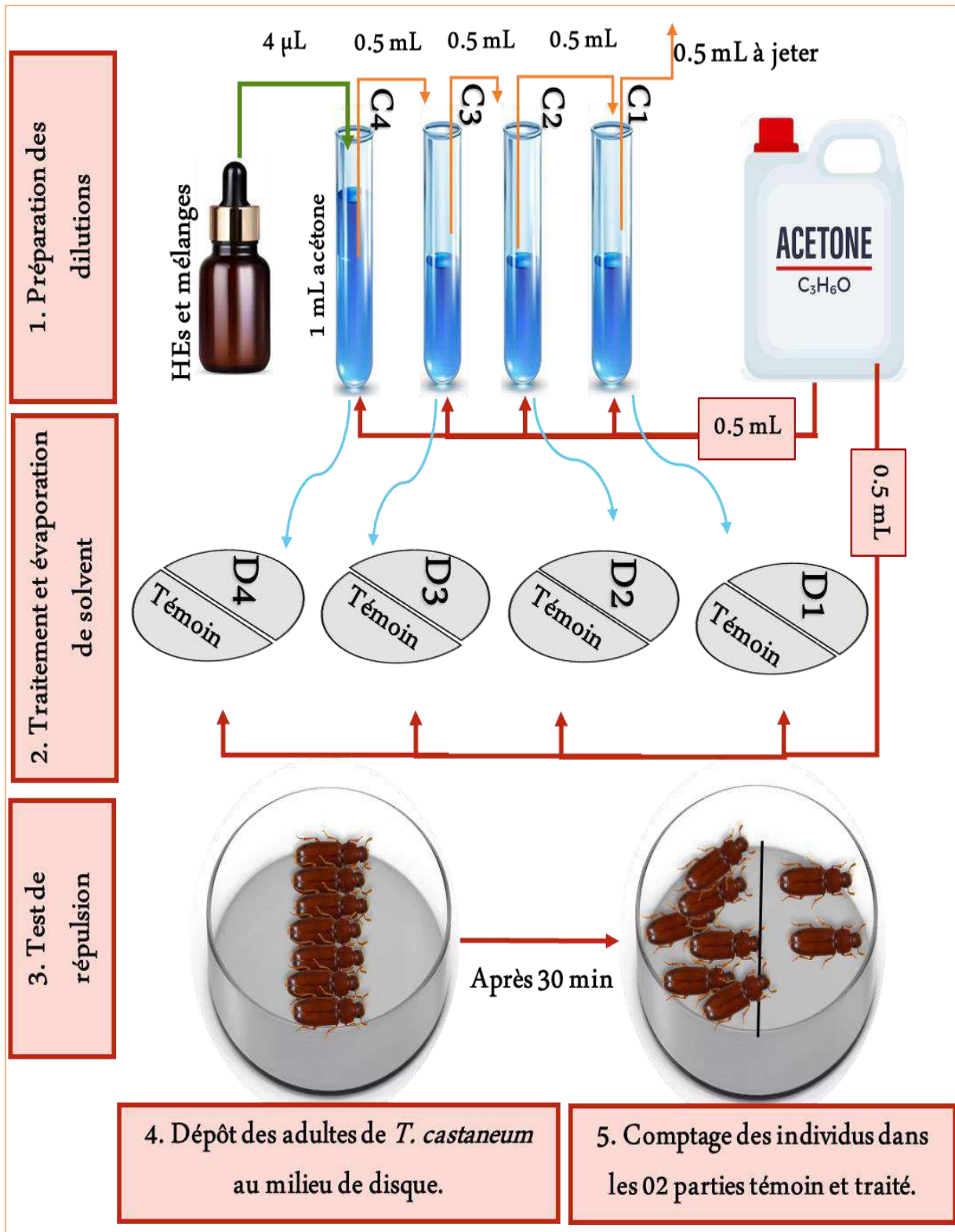


Figure 10 : Diagramme explicatif de mode opératoire du test de répulsion

C1 : 0,25 ; C2 : 0,5 ; C3 : 1 ; C4 : 2 µl/500 µl acétone

D1 : 1,96 ; D2 : 3,93 ; D3 : 7,86 ; D4 : 15,72 nl/cm²

I.8. Pouvoir inhibiteur des composants des HEs à l'égard de l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase enquêté par docking moléculaire

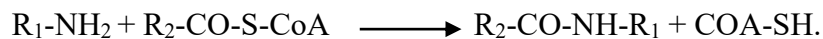
Une des stratégies prometteuses pour surmonter le problème de résistance aux insecticides, est d'identifier de nouvelles cibles enzymatiques potentielles chez les insectes nuisibles. En effet, la compréhension approfondie du mécanisme d'action de ces cibles permettra de mettre au point des substances qui inhibent l'insecte ou un groupe d'enzymes restreint chez lui (Singh et Prakash, 2013). D'autre part, l'efficacité inhibitrice des constituants des HEs vis-à-vis plusieurs enzymes cibles a été prouvée par une pléthore d'études *In silico*, *In vitro* et *In vivo* (Isman, 2019).

Etant donné que l'approche de cette étude est basée sur l'usage des HEs et leurs mélanges pour la lutte contre les adultes de *T. castaneum*, cette partie s'intéresse donc à la détermination du pouvoir inhibiteur de 24 composés chimiques, préalablement identifiés dans les HEs et leurs mélanges, vis-à-vis de l'AANAT de *T. castaneum*, via une analyse *In silico* réalisée par un docking moléculaire.

I.8.1. Choix de l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase comme cible moléculaire

Chez les adultes de *T. castaneum*, la cuticule joue le rôle d'une barrière efficace pour protéger l'insecte contre la dessiccation, les micro-organismes et les prédateurs, dont en tant qu'exosquelette, elle fournit des sites d'attachement pour les muscles (Andersen. 2012 ; Noh et al., 2016). L'élytre dorsale, la paroi thoracique ainsi que la jambe présentent des cuticules fortement épaisses, rigides (sclérifiées) et foncées (tannées), contrairement aux autres zones anatomiques qui sont couvertes de cuticules molles, souples et moins pigmentées comme celles trouvées sur l'abdomen dorsal, l'élytre ventral et l'aile postérieure (Arakane et al., 2016 ; Noh et al., 2016). Le durcissement de la cuticule est induit par la sclérisation, qui fait référence à un processus métabolique par lequel certaines zones de la cuticule de l'insecte sont transformées irréversiblement d'un matériau souple en une structure plus rigide et dure, pour rendre la matrice protéique de la cuticule plus stable, insoluble et résistante à l'hydrolyse enzymatique (Klowden. 2007 ; Rubin et al., 2010 ; Andersen. 2012). Ce processus est accompagné par celui de pigmentation, au cours duquel la couleur de la cuticule devient plus foncée (Andersen. 2012). Les précurseurs de la sclérisation sont dérivés de la tyrosine suite à plusieurs réactions enzymatiques. D'abord, la tyrosine est hydroxylée en 3,4 dihydroxyphénylalanine (DOPA) qui est ensuite décarboxylée en dopamine dont le groupe amino-dopamine se passe par une acylation avec de l'acétate ou de l'alanine pour former ainsi

les catécholamines N-acétyldopamine (NADA) ou N-β alanyldopamine (NBAD). Ensuite, l'oxydation de NADA et NBAD résulte la NADA-quinone et la NBAD-quinone, respectivement, qui suite à leurs polymérisations forment des pigments correspondants. Les quinones subissent en outre une isomérisation en donnant des quinone méthides, ainsi que des réactions de réticulation avec les chaînes latérales des protéines cuticulaires pour produire une sclérisation des cuticules (Klowden. 2007 ; Arakane et *al.*, 2016). Autrement, l'assombrissement de la cuticule se produit quand une partie de la dopamine se canalise dans la voie de production de mélanine (mélanisme) qui intervient dans le tannage de la cuticule de l'insecte. Il est à noter que la conversion du NBAD en dopamine par NBAD-hydrolase fournit de plus en plus de dopamine pour cette voie (Arakane et *al.* 2009 ; Simon et *al.* 2009 ; Arakane et *al.*, 2016). La réaction d'acétylation de la dopamine en NADA est assurée par l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransférase (**Fig. 11**) dont la structure cristalline est identifiée en 2020 par O'Flynn et ces collaborateurs. Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupe acyl d'un donneur d'acyl-CoA vers un accepteur d'amine primaire selon la réaction suivante :



En vérité, l'AANAT fait partie d'un groupe d'enzymes proposées pour jouer le rôle de monoamine oxydase, une enzyme régulatrice qui facilite l'inactivation et l'excrétion des neurotransmetteurs monoamines, tels que la dopamine et la noradrénaline, chez les insectes manquant de cette enzyme (Arakane et *al.*, 2016 ; O'Flynn et *al.*, 2020). Dans ce contexte, des études récentes ont rapporté l'importance de l'enzyme AANAT (souvent appelée arylalkylamine N-acétyltransférase) chez les coléoptères, notamment *T. castaneum*, comme une cible prometteuse des insecticides synthétiques (O'Flynn et *al.*, 2020). Subséquemment, l'inhibition de l'AANAT chez *T. castaneum* induit la perturbation de plusieurs processus métaboliques notamment la sclérisation et le mélanisme de la cuticule (O'Flynn et *al.*, 2020).

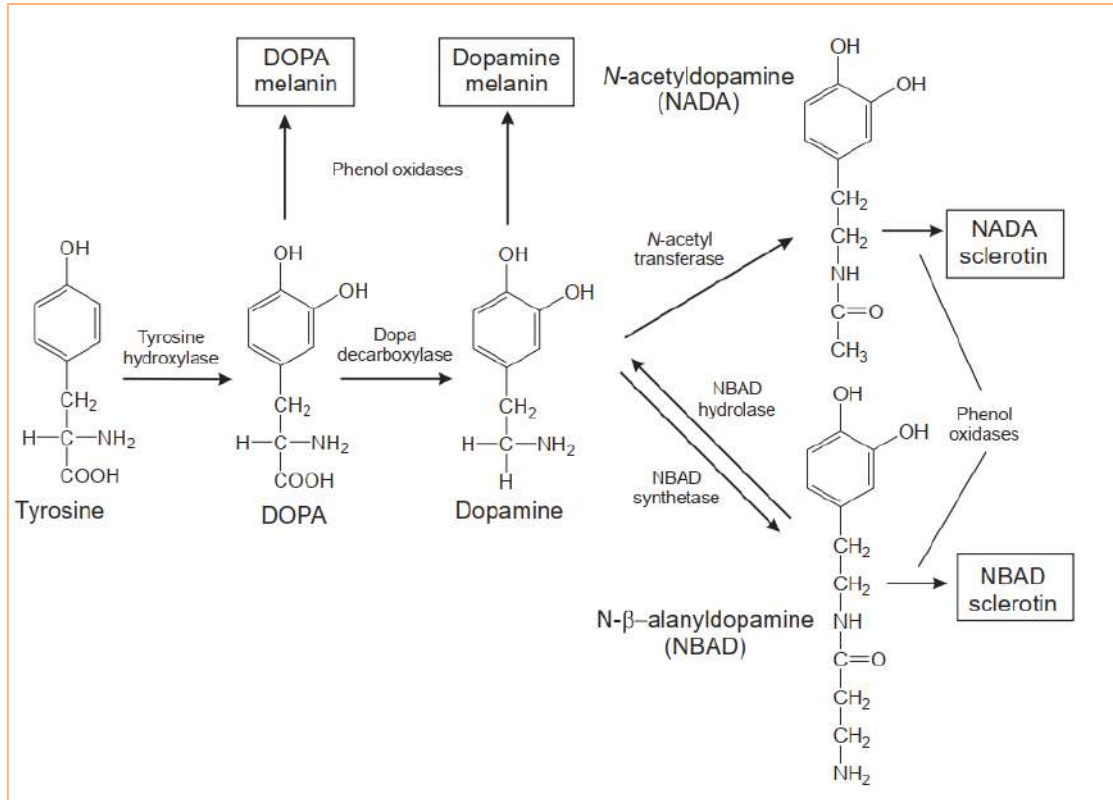


Figure 11 : Etapes de synthèse des précurseurs de tannage cuticulaire par l'intervention de l'AANAT (Klowden. 2007)

I.8.2. Principe du docking moléculaire

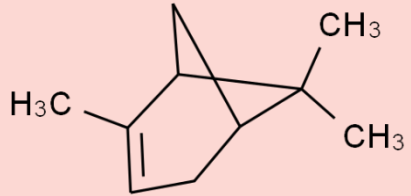
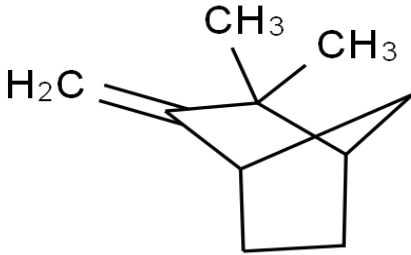
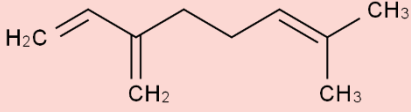
La technologie du docking moléculaire est une méthode de simulation informatique (*In-silico*) utilisée dans la découverte et le dépistage des médicaments, insecticides et herbicides etc... (Abdolmaleki et al., 2017 ; Duhovny et al., 2002). C'est une technique prometteuse qui se base sur l'étude approfondie du processus de formation d'un complexe stable avec une énergie libre minimale entre un ligand (substance active) et une cible moléculaire (enzyme potentiel) de nature protéique, selon le principe d'association « clé et serrure » (Fischer, 1894 ; Singh et al., 2019). Elle permet ainsi de mettre en évidence la structure tridimensionnelle de ce complexe et l'identification du site actif de la cible au niveau duquel l'interaction protéine récepteur-ligand est enfin formée. La conformation de cette liaison avec la combinaison la plus appropriée peut être recherchée via les structures de ce complexe au sein des bases de données, puis soumises par la suite à l'algorithme des logiciels (Alfaro et al., 2020 ; Li et al., 2019 ; Li et al., 2022).

En docking moléculaire, le plus important aspect est le calcul de l'énergie de la liaison obtenue d'un ligand adapté à un site actif. Le principe général de "l'énergie de liaison/ affinité de liaison" consiste en : plus l'énergie est négative, mieux le ligand est (Singh et *al.*, 2019).


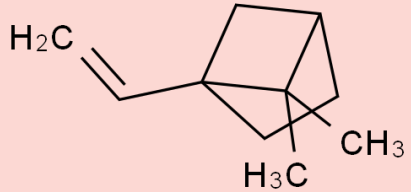
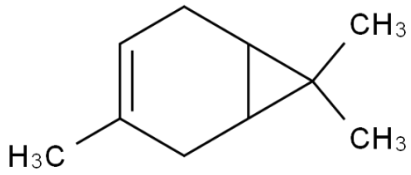
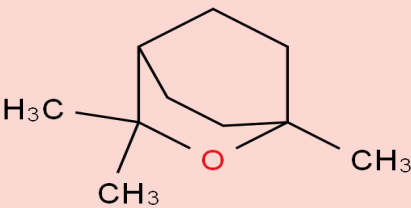
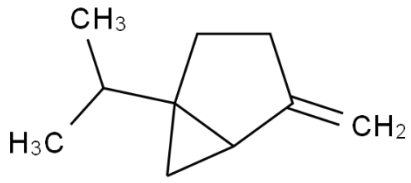
I.8.3. Mode opératoire

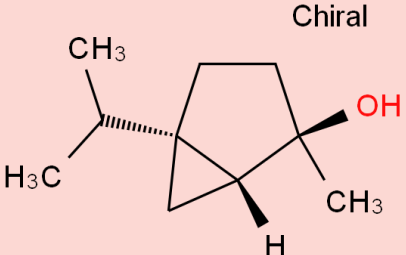
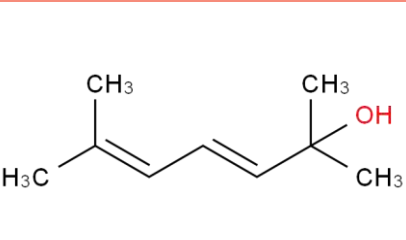
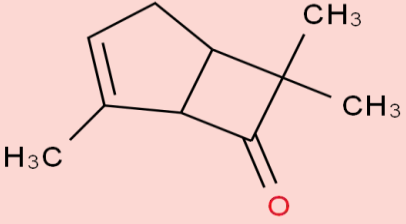
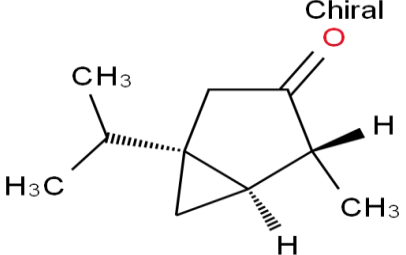
Les analyses de docking moléculaire entre l'AANAT et 24 ligands (**Tab. 04**) ont été effectuées à l'aide du logiciel Autodock Vina (Trott et Olson, 2010). La structure enzymatique (PDB ID : 6V3T) a été téléchargée à partir de la Protein Data Bank du RCSB. Après avoir éliminé les molécules d'eau et tous les ligands intrus, des atomes d'hydrogène ont été ajoutés afin d'équilibrer la structure. Le centre et les dimensions de la boîte de la grille ont été fixés à (69, -3, 231) ainsi que (20, 20, 24, Å³). Les molécules étudiées ont été modélisées avec ChemSketch (ACD/ChemSketch, 2009) puis optimisées au niveau du calcul DFT/B3LYP/6-31G (d,p) à l'aide du package Gaussian 09 (Frisch et *al.*, 2016). Tous les ligands et les enzymes ont été convertis au format pdbqt par AutoDockTools-1.5.6. Les ligands ont été considérés comme flexibles lors des calculs. Enfin, les interactions résultantes entre l'enzyme et chaque molécule ont été analysées par Discovery Studio Visualizer 2021 (Biovia, 2021).

Tableau 04 : Noms, numéros de CAS, formules chimiques, propriétés physico-chimiques et structures bidimensionnelles des composés chimiques utilisés comme ligands lors du docking (Site Elec 04 et 05).

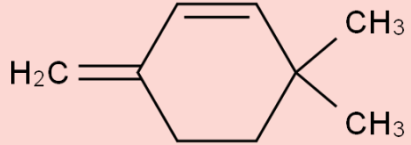
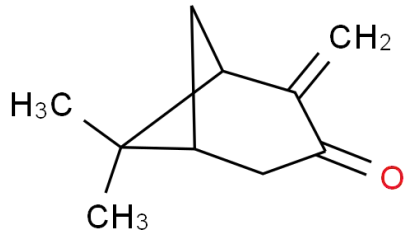
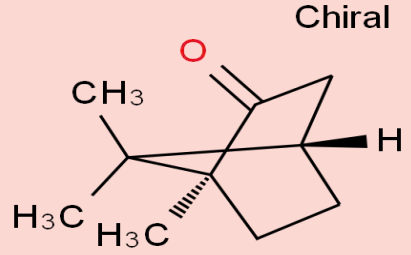
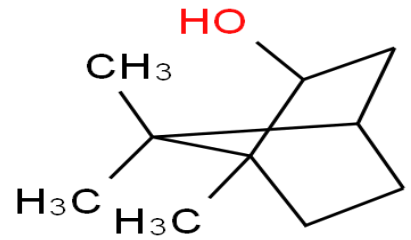
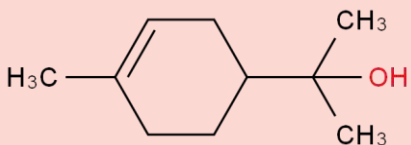
Numéro	Noms des composés	Formules chimiques	Propriétés physico-chimiques	Structures bidimensionnelles
1	α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	PM ^a = 136,23400 g/mol D ^b = 0,858 g/ml à 25°C PE ^c = 155-156°C IR ^d = 1,465	
2	Camphene	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,23400 g/mol D= 0,85 g/ml à 25°C PE= 159-160°C IR= 1,4551	
3	β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,23404 g/mol D= 0,795 PE= 165°C IR= 1,466-1,472	

Chapitre I.- Méthodologie du travail

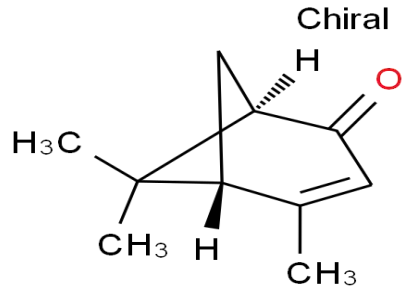
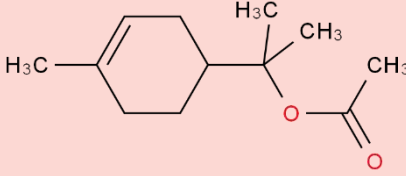
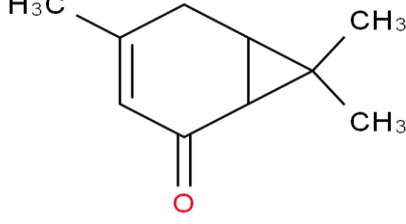
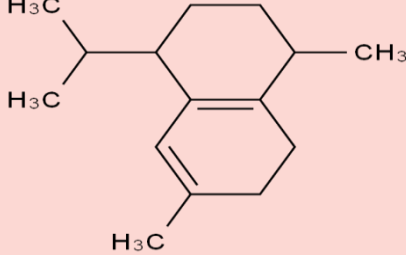
4	β -Pinene	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,23404 g/mol D= 0,859 PE= 167 °C IR= 1,4782	
5	5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,234 g/mol	
6	3-Carene	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,23404 g/mol D= 0,857 g/ml à 25 °C PE= 168-169 °C/705 mm Hg IR= 1,474	
7	Eucalyptol	$C_{10}H_{18}O$	PM= 154,24932 g/mol D= 0,9225 PE= 176-177°C IR= 1,455-1,46	
8	Sabinen	$C_{10}H_{16}$	PM= 136,238 g/mol D= 0,88 PE= 164°C à 760mmHg IR= 1,483	

9	4-Thujanol **	$C_{10}H_{18}O$	PM= 154,253 g/mol D= 1,03 PE= 201,7°C à 760 mmHg IR= 1,522	
10	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	$C_9H_{16}O$	PM= 140,223 g/mol D= 0,9±0,1 g/cm ³ PE= 204,4±9,0 °C à 760 mmHg IR= 1,471	
11	Filifolone	$C_{10}H_{14}O$	PM= 150,22 g/mol	
12	Thujone	$C_{10}H_{16}O$	PM= 152,23300 g/mol D= 0,914 g/ml à 20°C PE= 84-86°C 17 mm Hg IR= 1,450	

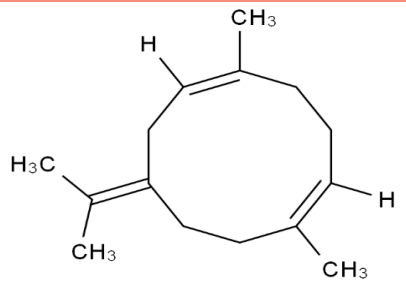
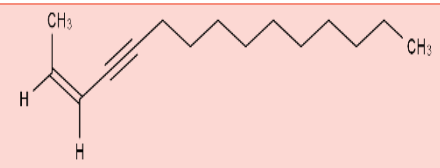
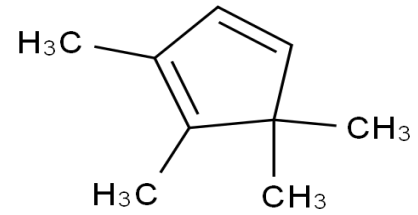
Chapitre I.- Méthodologie du travail

13	3,3-Dimethyl-6-methylenecyclohexene e **	C_9H_{14}	PM= 122,20700 g/mol	
14	pinocavrone	$C_{10}H_{14}O$	PM= 150,21756 g/mol D= 0,99 PE= 217,9°C à 760 mmHg IR= 1,495	
15	(-)-Camphor	$C_{10}H_{16}O$	PM= 152,237 g/mol D= 0,982 PE= 204°C IR= -44 °	Chiral 
16	Borneol	$C_{10}H_{18}O$	PM= 154,253 g/mol D= 1,011 PE= 212 °C à 760 mmHg IR= 1,532	
17	Terpineol	$C_{10}H_{18}O$	PM= 154,24900 g/mol D= 0,937 PE= 214-224°C	

Chapitre I.- Méthodologie du travail

			IR= 1,481-1,486	
18	D-Verbenone	C ₁₀ H ₁₄ O	PM= 150,21800 g/mol D= 0,992g/cm ³ PE= 227,5°C à 760mmHg IR= 1,494	
19	α-Terpinyl acetate	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	PM= 196,29 g/mol D= 0,953 g/ml à 25 °C PE= 220 °C IR= 1,465	
20	Car-3-en-5-one	C ₁₀ H ₁₄ O	PM= 150,22 g/mol	
21	Cadina-1(6),4-diene	C ₁₅ H ₂₄	PM= 204,35 g/mol D= 0,90±0,1 g/cm ³ PE= 107 °C	

Chapitre I.- Méthodologie du travail

22	β -Germacrene	$C_{15}H_{24}$	PM= 204,35 g/mol D= 0,844 PE= 287,2°C à 760 mmHg IR= 1,475	
23	2-Pentadecen-4-yne, (Z)-	$C_{15}H_{26}$	PM= 206,37g/mol	
24	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl	C_9H_{14}	PM= 122,211 g/mol D= 0,816±0,06 g/cm ³ PE= 135,9±7,0 °C	

^aPM : poids moléculaire ; ^bD : densité ; ^cPE : point d'ébullition ; ^dIR= indice de réfraction.

I.9. Etude de l'écotoxicité et de l'effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges

Malgré la sécurité associée aux produits issus de espèces botaniques, certaines HEs et leurs composés bioactifs à activité insecticide et répulsive sont souvent associés à une toxicité vis-à-vis au moins d'un groupe d'organismes non cibles. Seules quelques recherches ont vérifié la toxicité (aiguë ou chronique) des HEs et/ ou de leurs composés bioactifs sur ces organismes, alors que cette mesure est cruciale pour le développement de pesticides botaniques standardisés (Benelli et *al.* 2019). Dans ce contexte, des nauplii d'*Artemia salina* et des cellules MCF 10A ont été sélectionnées afin d'évaluer les effets écotoxique et antiprolifératif des HEs respectifs sur les échantillons mentionnés.

I.9.1. Ecotoxicité des HEs et leurs mélanges contre les larves d'*Artemia salina*

I.9.1.1. Choix d'*A. salina* comme un organisme modèle pour l'étude de l'écotoxicité

L'*A. salina* est l'un des organismes d'eau salée (**Fig. 12**). Ce crustacé zooplanctonique est présent dans divers systèmes d'eau de mer dont il peut filtrer une grande quantité d'eau en une heure (Àes et *al.*, 2013 a,b,c). Les individus de ce genre ont un cycle de vie court, une grande souplesse face aux conditions environnementales défavorables, une fécondité élevée, une stratégie de reproduction bisexuelle/ parthénogénétique, une petite taille corporelle et une adaptabilité à diverses ressources nutritives, car ils sont des organismes filtreurs-mangeurs non sélectifs (Nunes et *al.*, 2006). De plus, ils ont une adaptabilité à des larges intervalles salins (5-300 g/l) et thermiques (6-40°C) (USEPA, 2002).



Figure 12 : Éclosion des œufs d'*A. salina* pour donner des larves (Site Eelc 06).

L'utilisation d'*Artemia* spp. dans les bio-essais est l'une des approches les plus utilisées dans les études toxicologiques et éco-toxicologiques en raison de plusieurs caractéristiques aisées telles que : grande disponibilité dans le marché, abondance de kystes, simple manipulation et possibilité d'entretien en conditions de laboratoire. De même, plusieurs paramètres physiologiques de cet être-vivant peuvent réussir la manipulation comme le taux d'éclosion des kystes, le succès de reproduction, la vitesse de nage, la survie et l'expression génétique des gènes clés impliqués dans la réponse au stress et à la mue, qui s'interfèrent facilement par plusieurs contaminants largement trouvés dans les environnements naturels (Albarano et al., 2022). Ces caractères biologiques font d'*Artemia* spp. un organisme véritablement approprié dans les essais d'écotoxicité en considérant sa mortalité et sa croissance comme principaux paramètres à étudier (Sarabia et al., 1998 ; Libralão, 2014).

I.9.1.2. Principe du test de mortalité des larves d'*A. salina*

Parmi les études éco-toxicologiques, le taux de mortalité représente le paramètre le plus utilisé puisqu'il fournit des résultats extrêmement simples et rapides pour évaluer la toxicité aiguë des composés analysés. En fait, l'*A. salina* peut-être facilement exposée à un certain agent stressant, et les données de toxicité sont ensuite obtenues en 24 h à 48 h en visant certains signes de toxicité, y compris le calcul de la dose létale 50. Parmi les substances toxiques, plusieurs biocides (pesticides, désinfectants, etc...) ont été étudiés car leur présence dans le milieu aquatique a été dénoncée à l'échelle mondiale en raison de leur utilisation extensive dans les domaines de l'agriculture, la médecine et l'industrie (de Campos et al., 2021). Ce test a été donc utile pour signaler autant la toxicité des métabolites secondaires extraits des espèces végétales, tels que, les HEs extraites de différentes parties de plantes (Qin et al., 2009 ; Adeogun et al., 2018 ; Magalhaes et al., 2021 ; Hafiz et al., 2019 ; Khaleel, 2019 ; Àchou et al., 2021).

I.9.1.3. Mode opératoire

La mortalité de d'*A. salina* sous l'effet des trois HEs ainsi que leurs combinaisons a été suivie conformément au protocole de Meyer et al. (1982). Cette méthode estime la létalité *In vivo* des nauplii d'*A. salina*. Les œufs ont été placés dans un petit réservoir en plastique puis incubés dans de l'eau de mer artificiellement préparée, en dissolvant 38 g de chlorure de sodium dans 1 L d'eau distillée, pour l'éclosion de nauplii, à une température ambiante de 28 à 30 °C avec un apport continu d'oxygène et de lumière. Au-delà de 48 heures, les cystes ont devenu des larves prêtes à être utilisés dans les tests de toxicité qui poursuivent.

Les essais de toxicité ont été réalisés dans des plaques de 24 puits. Des solutions mères (20 g/l) ont été préparées en dissolvant nos échantillons dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO). De chaque solution stock dans l'eau de mer artificielle, des dilutions en série ont été d'abord réalisées immédiatement afin d'atteindre les concentrations requises (200, 100, 50, 25, 12,5, 6.25 et 3.125 mg/l). Dans chaque puits un volume de 2 ml de dilution a été retenu contenant 1% de DMSO. Ensuite, les larves ont été comptées sous une loupe binoculaire, puis transférés à l'aide d'une micropipette à raison de 10 larves/ puits. Les lots témoins ont été dotés de 10 larves immergées dans l'eau de mer artificielle à 1 % de DMSO. Les essais ont été effectués à raison de trois répétitions/ traitement. Les plaques ont été finalement incubées à la température ambiante pendant 24 h (**Fig. 13**). Les larves qui n'ont montré aucun mouvement sous la loupe binoculaire, pendant 10 secondes du suivi, sont censées être mortes. De ce fait, le taux de mortalité est calculé selon la formule d'Abbott (1925) :

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = [(Mtr - Mt) / Mt] \times 100$$

Mt : nombre des individus vivants dans le puit témoin ;

Mtr : nombre des individus vivants dans le puit traité.

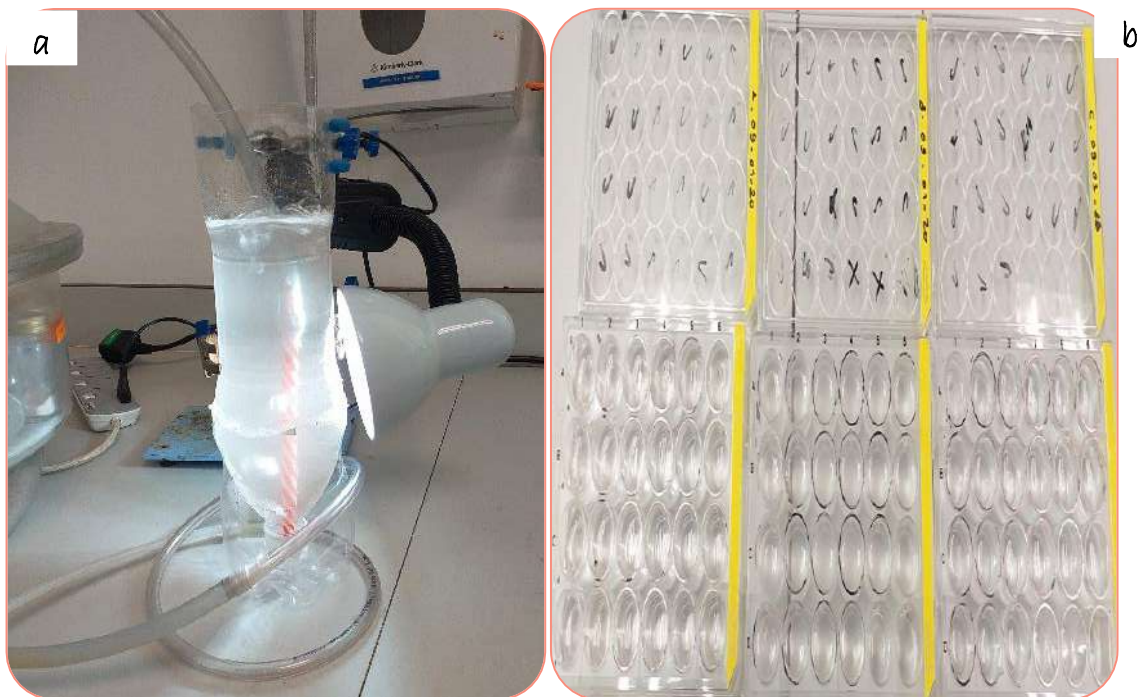


Figure 13 : **a.** Montage pour élevage des larves d'*A. salina*, **b.** Plaques de 24 puits utilisés lors du test de létalité des larves d'*A. salina*.

I.9.2. Effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges contre les cellules MCF 10A

Les méthodes de caractérisation de la toxicité *In vitro* des HEs sont normalisés à l'aide de divers types de cultures cellulaires de mammifères. Ces tests de cytotoxicité consistent à mettre ces produits directement ou indirectement en contact avec une cellule, en vérifiant les changements cellulaires par différents mécanismes, y compris l'incorporation de colorants ou l'inhibition de la formation des colonies cellulaires. Le paramètre le plus utilisé pour évaluer la toxicité et la détermination de la viabilité cellulaire à l'aide des colorant vitaux (Andreani et al., 2017).

Les méthodes *In vitro* présentent des avantages qui pourraient limiter le nombre de variables expérimentales, afin d'obtenir plus facilement des données significatives au-delà de la période d'essai, qui est dans la plupart des cas plus courte. Des études utilisant ces méthodes ont montré que les tests avec des cultures cellulaires peuvent être utilisés avec succès, car ils sont reproductibles, rapides, sensibles et préférables pour la mise en œuvre d'une étude de biocompatibilité *In vitro* (Andreani et al., 2017). Il existe de nombreux exemples de cellules mammaliennes signalées dans la littérature pour tester la toxicité induite par l'exposition aux HEs et leurs composants et compris les cellules MCF 10A.

I.9.2.1. Choix des cellules MCF 10A

Les cellules MCF 10A sont la lignée cellulaire la plus couramment utilisée comme modèle aux cellules mammaires humaines normales adhérentes. Étant donné que leurs caractéristiques sont très semblables à celles de l'épithélium mammaire humain normal, les cellules MCF 10A sont largement utilisées dans les études de cytotoxicité comme témoins pour évaluer l'innocuité de différents composés, en les comparant avec les lignées cellulaires des tumeurs mammaires, comme le MCF-7 ou le MDA-MB-231. Ces études comprennent l'évaluation des molécules naturelles comme les HEs et leurs constituants pour évaluer la biosécurité et la biocompatibilité de ces bioproduits (Vale et al., 2021).

I.9.2.2. Préparation des réactifs

- **Milieu de culture pour les cellules MCF 10A**

Un volume de 500 ml du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a été additionné aux produits suivants : 25 ml de sérum du cheval à 5 %, 1 ml du facteur de croissance épidermique à 20 mg/ ml, 0.25 ml d'hydrocortisone à 0,5 mg/ ml, 0.5 ml d'insuline à 10µg/ ml et 5 ml de l'antibiotique Procaine penicillin G.

- **Acide trichloracétique (TCA) à 50%**

Une quantité de 25 g de TCA a été pesée à l'aide d'une balance, mise dans une éprouvette de 100 ml puis ajustée jusqu'à 50 ml par l'eau distillée. La solution obtenue a été bien agitée pour bien dissoudre la préparation.

- **Acide acétique à 1%**

Pour préparer un volume de 1L d'acide acétique, 10 ml de ce dernier (99-100%) a été dissous dans 990 ml de l'eau distillée.

- **Sulforodamine B (SRB) à 0.4%**

Une quantité de 0,4 de la SRB a été pesée à l'aide d'une balance puis agitée pour être dissoute dans 100 ml d'acide acétique à 1%.

- **Tampon Tris à 10 mM**

Une masse de 0.2 g du tampon tris a été pesée à l'aide d'une balance puis dissoute dans 100 ml d'eau distillée.

I.9.2.3. Culture cellulaire des cellules MCF 10A

Avant d'effectuer la culture cellulaire, tous les consommables nécessaires pour cette étape ont été placés dans le post de sécurité microbiologique classe II (PSM) puis stérilisé par l'ultra-violet pendant 30 min. Entre-temps le cryotube, contenant les cellules MCF 10A, congelées dans le DMSO, a été retiré de congélateur (-20°C) puis déposé dans un bain-marie à 37 °C pour décongeler les cellules. Le couvercle de cryotube doit être gardé au-dessus de la surface de l'eau pour réduire les risques de contamination (**Fig. 14**).

Dès que la stérilisation est achevée, le cryotube a été transféré vers le PSM. Sa surface extérieure a été essuyée avec de l'éthanol (70 %) et son couvercle a été retiré. Afin d'éliminer l'agent cryo-conservateur (DMSO), la suspension cellulaire a été retirée soigneusement à l'aide d'une micropipette de 2 ml, puis un volume de 15 ml contenant 3 ml du milieu de DMEM a été mis dans un flacon-tube. L'ensemble a été centrifugé pendant 5 min à 1000 rpm à une température ambiante d'où le surnageant a été aspiré délicatement à l'aide d'une pipette graduée. Les cellules ont été ensuite remises en suspension par l'ajout de 12 ml du milieu de culture DMEM suivi d'un pipetage délicat haut/ bas. Le dénombrement des cellules et la détermination de leur viabilité ont été réalisés en introduisant une diapositive contenant un mélange de 10µl de la suspension et 1µl de bleu de Trypan (incubé pendant 3 min) dans un compteur de cellules automatisé. Ensuite, une autre suspension cellulaire de 4000 cellules / ml a été préparée dans un tube contenant 10 ml de DMEM à partir de celle initiale.

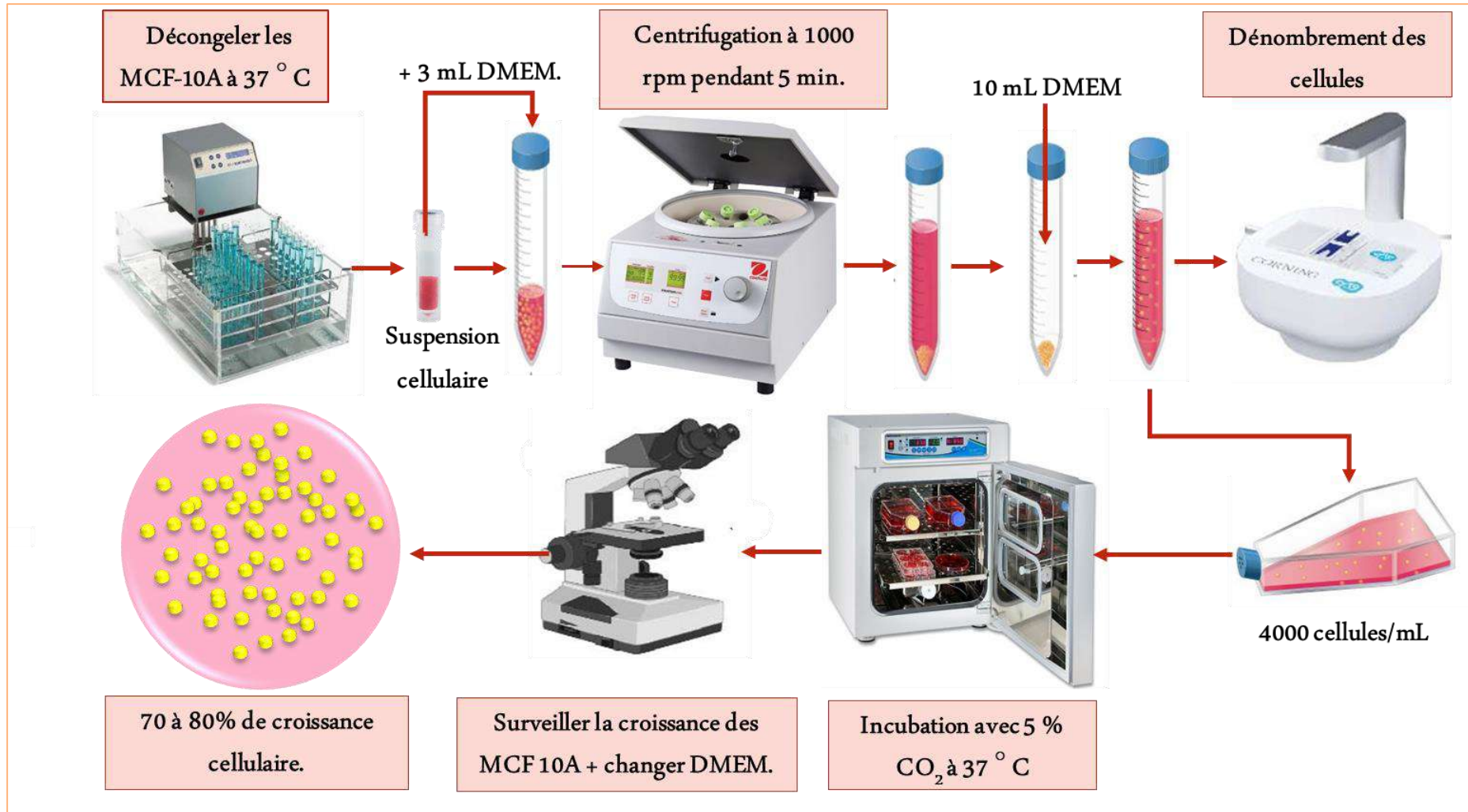


Figure 14 : Diagramme explicatif de la procédure de culture des cellules MCF 10A.

La préparation a été étalée dans un flacon de culture cellulaire de 75cm³ puis incubée à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂.

Le milieu de culture a été renouvelé tous les 3 jours où la croissance cellulaire a été suivie d'une façon quotidienne sous un microscope inversé. Le DMEM a été mis dans un bain-marie à 37 °C pendant 30 min alors que l'ancien milieu a été aspiré de tube-flacon de la culture et renouvelé immédiatement de la même façon. Ensuite, les cellules ont été réincubées jusqu'à ce qu'elles atteignent la phase de croissance exponentielle (70 à 80% de croissance), la période où elles seraient prêtes à être sous-cultivées (**Fig. 15**).

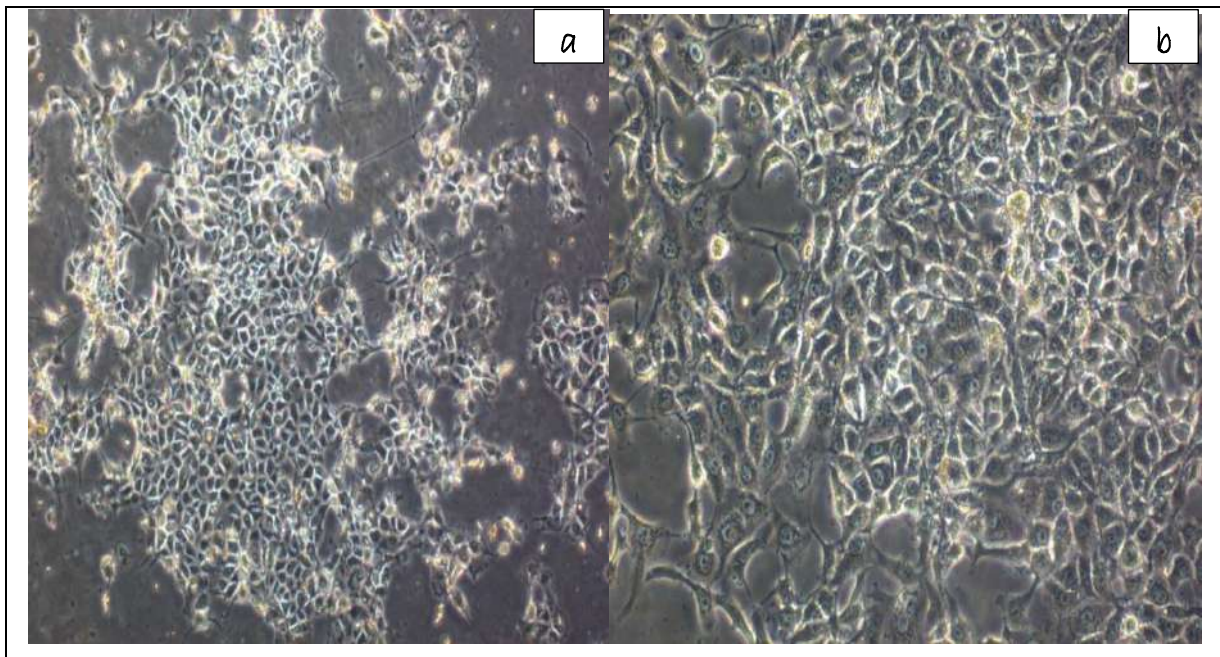


Figure 15 : Cellules MCF 10A en phase exponentielle de croissance sous microscope a : Gx100 ; b : Gx400.

I.9.2.4. Principe de test SRB

Le test de sulforhodamine B (SRB) est l'un des tests souvent utilisés pour mesurer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité induite par des substances chimiques d'origine synthétique ou naturelle. Le principe de fonctionnement concerne un colorant aminoxanthène rose vif appelé SRB, qui a la capacité de se lier stoechiométriquement, dans des conditions légèrement acides, aux résidus basiques des acides aminés issus de protéines cellulaires, ou se dissocier dans des conditions basiques. Après lavage, le colorant incorporé se libère des cellules permettant ainsi l'évaluation colorimétrique de la masse totale de protéines qui est liée au nombre de cellules vivantes. Ce test a été largement utilisé pour le dépistage *In vitro* de la toxicité des médicaments contre différents types de lignées cellulaires cancéreuses et non

cancéreuses. De plus, il est indépendant de l'activité métabolique cellulaire et doit donc montrer moins d'interférence par les composés testés. Le test possède également une meilleure linéarité, une sensibilité plus élevée ainsi qu'il est moins coûteux (Kuetze et al., 2017 ; Zhao et al., 2022).

I.9.2.5. Mode opératoire

Les effets des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs mélanges sur la viabilité des cellules MCF 10A ont été vérifiés à l'aide du dosage de la sulforhodamine B (SRB), comme décrit par Skehan et al. (1990), avec quelques modifications. Ce test a été réalisé en trois étapes :

I.9.2.5.1.ensemencement des cellules

Dès que les cellules arrivent à la phase exponentielle de croissance, le flacon de culture cellulaire a été récupéré de l'incubateur. Le milieu de culture contenant dans le flacon tube a été doucement aspiré par une pipette. Les cellules ont été ensuite lavées deux fois avec 7 ml d'une solution du tampon phosphate saline (PBS) pour assurer l'élimination de toutes les cellules mortes et tout résidu du milieu de culture déjà usé. Les cellules ont été détachées en ajoutant 500 µl de trypsine (0.25%) et incubées à l'incubateur à 5% de CO₂ pendant 5 min à 37 °C. Le but de cette étape a été de dégager les liaisons entre les cellules et le support de culture. Ce processus a été amélioré en tapotant doucement le ballon à quelques reprises. Une fois que les cellules ont apparues arrondies et simples sous microscope inversé, 4 ml du milieu ont été ajoutés aux cellules pour inactiver la trypsine. La suspension cellulaire a été transférée dans un tube de 15 ml puis centrifugée à 1000 rpm pendant 5 min. Ensuite, un volume de 7,5 ml du milieu de culture a été ajouté au flacon de culture. Le contenant du flacon a été transféré après dans un tube-flacon de 15 ml et centrifugé à 1000 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été doucement aspiré par une pipette puis les cellules ont été remises en suspension en ajoutant 1 ml du milieu de culture. Le dénombrement des cellules a été effectué par un compteur automatisé d'où une suspension cellulaire de 10⁴ cellules/ml a été préparée. Ensuite, un volume de 100 µl de la suspension cellulaire a été ensemencé dans chaque puits de microplaque tandis que le même volume de DMDE à 3% de DMSO a été ajouté aux trois puits (exemptes de la suspension cellulaire) de la 1^{ère} colonne de chaque microplaque. Les microplaques ont été ensuite incubées à 5 % de CO₂ dans un incubateur à 37°C pendant 24 h.

I.9.2.5.2. Traitement des cellules MCF 10A

Les HEs et leurs mélanges ont été dissouts dans le DMSO pour avoir des solutions mères de 10 g/l. En bref, des dilutions en série ont été réalisées de chaque échantillon à partir des solutions mères, en obtenant des concentrations de : 300, 150, 75, 37,5, 18.75 et 9.38 µg/ml. Celles-ci ont eu 0,3% de DMSO qui est dans la limite acceptable (0,1 à 0,5 %). Au-delà de 24 d'incubation des cellules, le milieu de culture utilisé a été aspiré par une pipette Pasteur attachée à un aspirateur qui a été à son tour lié au PSM pour assurer le dégagement sécurisé des rejets de culture. D'autre part, les solutions mères d'HEs et leurs mélanges ont été dissous dans le DMSO pour avoir une solution mère de 10 g/l d'où une 2^{ème} a été préparée dans le DMEM pour avoir une solution de 600 µg/l à 0.3 % de DMSO. À la fin de traitement, chaque microplaque a été divisée en (**Fig. 16**) :

- **Blanc** : Il consiste en 100µl de DMEM à 3% de DMSO dans la 1^{ère} colonne ainsi que les 3 puits des lignes A, B et C ;
- **Contrôle négatif** : Il est représenté de cellulesensemencées + 100µl de DMEM à 3% de DMSO mis dans la 2^{ème} colonne ainsi que les 3 puits des lignes A, B et C ;
- **Traitements** : Ils comportent 100µl de DMEM à 3% de DMSO contenant 300 ; 150 ; 75 ; 37,5 ; 18,75 et 9,37 µg/ml d'HEs ou leurs mélanges + les cellulesensemencées+ 100 ml de DMEM à 3% de DMSO, dans les colonnes 4, 5, 6, 7 et 8 ainsi que les 3 puits des lignes A, B et C. De la même façon, les traitements de 2 à 13 ont été poursuivis dans le reste des colonnes et lignes, en gardant les positions du blanc et du contrôle négatif dans chaque plaque.

D'autre part, les cellules du contrôle positif ont impliqué du tamoxifène à différentes concentrations à savoir : (10 ; 5 ; 2,5 ; 1,25 ; 0,62 et 0,31 mg/l). Les plaques ont été ensuite incubées à 37 °C et 5% CO₂ pendant 24 h.

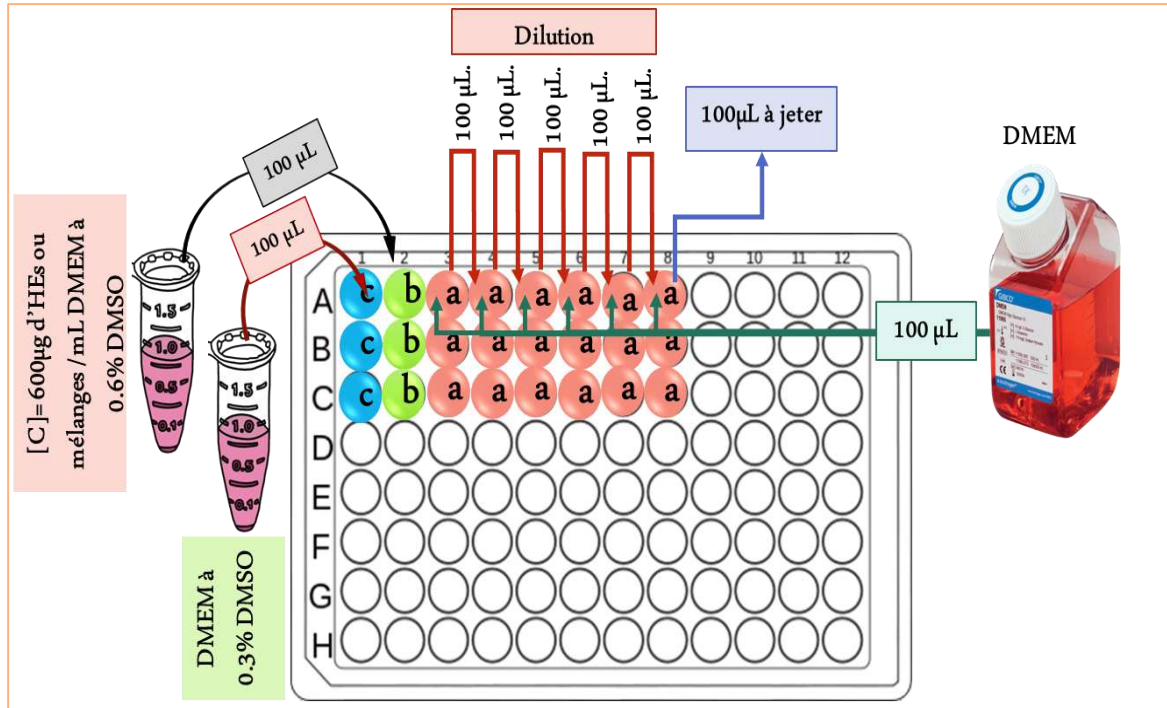


Figure 16 : Traitement des cellules MCF 10A dans une microplaque de 96 puits, par les différentes concentrations des HEs ou de leurs mélanges. **a** : MCF 10A + 100 µl de DMEM à 0.3% DMSO + HEs ou mélanges; **b** : DMEM à 0.3% DMSO + MCF 10A ; **c** : DMEM à 0.3% DMSO.

I.9.2.5.3. Coloration par SRB et détermination de taux de viabilités

En termes de la période d'incubation, les cellules ont été fixées avec 50 µl d'acide trichloracétique froid à 50 % pendant 30 min à température ambiante, suivi d'un lavage doux à l'eau du robinet puis un séchage. Les cellules ont été ensuite colorées avec 100 µl de SRB à 0,4 % déjà préparé dans l'acide acétique à 1 % pendant 30 min et lavé avec de l'acide acétique à 1 %. La dernière étape a permis la dissociation de la SRB lié aux protéines cellulaires. En poursuivant, chaque microplaque a été lavée et séchée dont un volume 100 µl du tampon Tris à 10 mM a été ensuite ajouté en chaque puit et la plaque a été agitée pendant 5 min en utilisant un agitateur de microplaques (**Fig. 17**). La viabilité cellulaire relative a été donc mesurée par balayage à 570 nm sur un lecteur de microplaque et la cytotoxicité a été déterminée en utilisant la formule précédemment rapportée par Bendale *et al.* (2017) :

$$\text{Taux de viabilité}(\%) = \left[\text{densité optique de } \frac{(\text{échantillon} - \text{blanc})}{(\text{contrôle négatif} - \text{blanc})} \right] \times 100$$

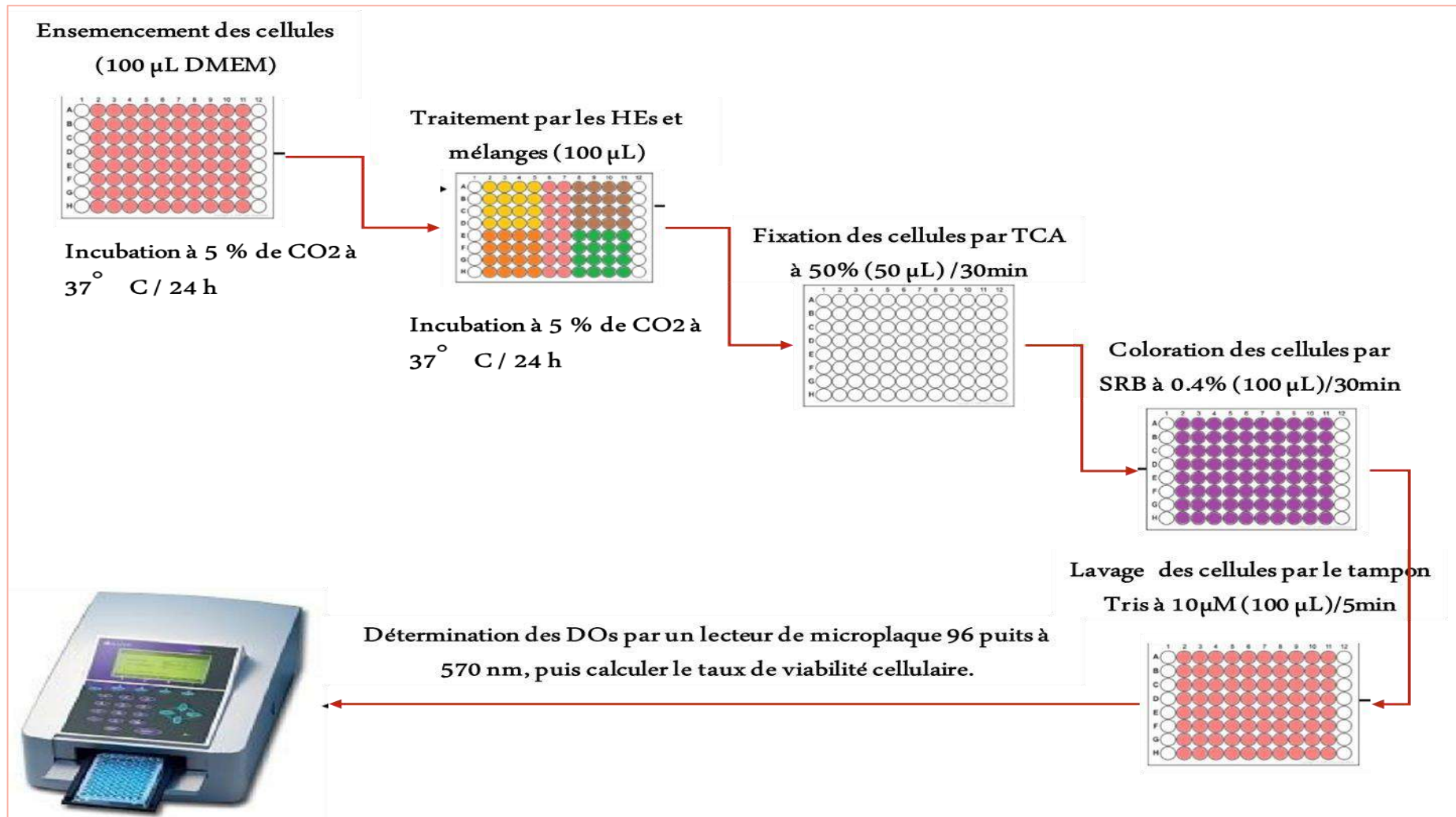


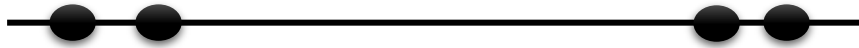
Figure 17 : Procédure de réalisation du test SRB pour la détermination de l'effet antiprolifératif des HEs ainsi que leurs mélanges contre les cellules MCF 10A.

I.10. Analyses statistiques

Toutes les données ont été analysées à l'aide du programme statistique (SPSS) v.20.0. Suite à la vérification de la normalité de la distribution des données à l'aide d'un test de Shapiro-Wilk, à un niveau de signification ($p \geq 0,05$), la comparaison des valeurs a été faite avec des tests ANOVA ou Kruskal-Wallis à un niveau de signification ($p \leq 0,05$). Quelquefois, un test de Levène a été appliqué, à un niveau de signification de ($p \geq 0,05$), afin de faire ressortir les groupes homogènes des traitements. Ensuite, les taux de mortalité obtenus avec toutes les combinaisons insecticides d'HEs, assumant une distribution normale ou non normale, ont fait l'objet d'un traçage de droites linéaires à l'aide du Probit ou Logit respectivement, afin de déduire les doses létales, DL_{50} et DL_{90} , à des limites de confiance de 95%.

Outre, une analyse hiérarchique de regroupement a été réalisée en dendrogramme afin de concevoir les similarités de compositions chimiques (obtenus en GC-MS) entre les trois HEs ainsi que leurs mélanges, en créant des groupes de traitements plus typiques suivant la méthode de critère de WARD. Les rapports des effets insecticide et répulsif des mélanges d'HEs avec les quantités de cinq composés majoritaires ont été également expliqués suite à une corrélation de Spearman, à un niveau significatif de $p < 0,05$ et $p < 0,01$, dont un coefficient de corrélation égal ou ≈ 1 a été considéré comme une relation trop forte tandis que les valeurs presque nulles n'ont présenté aucune relation linéaire entre les variables déjà définis.

Chapitre II



Résultats et discussions.



Chapitre I.- Résultats et discussion

Ce chapitre consiste les résultats détaillés de cette étude, en plus d'une discussion approfondie des données obtenus.

II.1. Rendements et compositions chimiques des HEs et leurs mélanges

L'hydrodistillation des parties aériennes sèches d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* a donné des HEs avec des rendements respectifs de 0,88, 0,99 et 0,4% (v/p). Les compositions des HEs et leurs mélanges ont été résumés dans le tableau 05.

Au total, 65 constituants ont été identifiés sur les trois HEs et leurs mélanges représentant de 68,6 à 87,59 % de la totalité des échantillons (**Tab. 05**). Il a été constaté que l'HE d'*A. herba-alba* de Khenchela possède un nouveau chimiotype avec Car-3-en-5-one comme constituant principal (12,51 %), suivi de camphre (12,18 %) et 1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl) ethanol (8,08 %). Ces résultats sont comparés à d'autres obtenus en Algérie, qui ont avancé que l'HE d'*A. herba-alba* récoltée dans la région de Tamanrasset figure le chimiotype Davanon (Goudjil et al., 2016). Tandis que l'HE de la même plante récoltée à Saida et Djelfa dispose du chimiotype camphre (Bouzidi et al., 2016 ; Lakehal et al., 2016). Par ailleurs, Badreddine et Baouindi. (2016), Qnais et al. (2016) ainsi que Sharifian et al. (2012) ont rapporté que les HEs d'*A. herba-alba* de Tunisie, Jordanie et Iran, présentent le chimiotype β -thujone ; alors que celle originaire du Maroc résulte α -terpineol (Ouaritini et al., 2016).

En outre, les composants majoritaires de l'HE de *J. phoenicea* sont l' α -pinène (15,49 %), l' α -terpinyl acetate (9,54 %) et le 3-carène (9,63 %). Ces résultats ne vont pas dans le sens de ceux obtenus par Ramdani et al. (2013) sur l'HE de *J. phoenicea* appartenant à différentes régions en Algérie, où le terpinolène (0-13%), le Δ^3 -Karen (0-1 2,4%) et le β -phellandrene (0-7,3%) ont été identifiés comme des composants prédominants. De plus, l' α -pinène a été détecté comme constituant principal des HEs de la même plante répartie dans le monde (El-Sawi et al., 2007 ; Adams et al., 2014 ; Alfitori et al., 2014 ; Aljaiyash et al., 2016)

Par ailleurs l'HE de *R. officinalis* est composé de camphre (34,37%) comme composant principal, ainsi que l'eucalyptol (14,46%) et l' α -pinène (12,94%). Tous ces composés ont été auparavant détectés comme constituants majoritaires sur l'HE de *R. officinalis* de Tunisie (Kadri et al., 2011), d'Espagne (Santoyo et al., 2005) et même de Chine (Wang et al., 2012), avec des proportions différentes.

Chapitre II : Résultats et discussions

Tableau 05 : Compositions chimiques d'HE d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* avec leurs mélanges.

TR	Composés	Surface de pique (%)												
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1,496	Santolina triene	1,11	–	–	–	–	–	1,08	–	–	–	–	–	–
1,829	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene,3,6,6-trimethy***	1,41	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2,01	a-Pinene	–	<u>15,49*</u>	<u>12,94*</u>	4,3	<u>11,17*</u>	<u>7,71*</u>	3,19	7,33	4,97	<u>14,96*</u>	<u>13,39*</u>	<u>13,62*</u>	8,36
2,087	Bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3 me***	–	1,54	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2,181	Camphene	2,28	–	11,89	1,85	1,8	1,87	3,85	<u>7,75*</u>	5,51	3,07	8,51	6,97	4,09
2,517	b,-Myrcene	–	–	1,74	–	–	–	–	1,44	–	–	–	2,31	1,93
2,531	b-Pinene	–	1,68	1,18	1,88	3,73	3,02	–	–	–	1,52	3,42	1,33	–
2,538	5,5-Dimethyl-1vinylbicyclo[2,1,1]hexane	–	3,38	–	–	–	–	–	–	–	3,05	–	–	–
2,9	3-Carene	–	<u>9,63*</u>	–	2,68	<u>6,79*</u>	4,75	–	–	–	8,33	4,31	5,16	3,9
2,955	3,7,7-Trimethyl-1,3,5-cycloheptariene***	1,11	–	1,68	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3,187	exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2,2,1]heptan- **	–	–	–	–	–	<u>7,82*</u>	–	–	–	–	–	–	–
3,219	Eucalyptol	6	–	<u>14,46*</u>	<u>5,4*</u>	–	–	8,44	<u>10,26*</u>	9	–	–	–	–
3,23	Sabinen	1,24	9,51	–	–	<u>8,4*</u>	–	–	–	–	<u>9,95*</u>	–	–	–
3,231	4-Thujanol **	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	<u>12,96*</u>	<u>12,07*</u>	<u>9,02</u>
3,32	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	–	–	–	4,51	–	–	<u>10,29*</u>	3,1	2,16	–	–	–	1,06
3,837	α -Terpinolene	–	1,53	–	–	–	–	–	–	–	1,25	–	1,41	1,01
4,02	2-Pentadecen-4-yne, (Z)-***	2,18	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4,048	Linalool	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1,13	–	–	–
4,146	Filifolone	6,44	–	–	4,58	1,56	2,82	–	1,04	–	–	–	–	1,7
4,149	Thujone	3,66	–	–	3,02	2,4	2,94	1,91	7,48	6,54	–	–	–	3,19

Chapitre II : Résultats et discussions

4,165	(3E,6E)-Nona-3,6-dienyl 2,2,3,3,4,4,4-he **	-	-	-	-	-	-	6,49	-	-	-	-	-	-
4,428	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	2,03	-	-	-	-	-	1,58	-	9,53*	-	-	-	7.03
4,448	3,3-Dimethyl-6- methylenecyclohexene **	-	-	-	-	2,28	-	-	-	-	-	-	-	-
4,554	1-(2-Ethyl-3- cyclohexenyl)ethanol	8,08*	-	-	4,22	3,11	5,36	-	-	-	-	-	-	-
4,641	1,3-Cyclopentadiene, tetramethyl	1,2,5,5- 2,17	-	-	-	-	1,94	-	-	-	-	-	-	-
4,698	trans-Verbenol***	-	1,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,081	pinocavrone **	-	-	-	2,19	1,05	2,05	2,01	-	1,14	-	-	-	-
5,113	Bicyclo[5.1.0]octane, methylethylid	8-(1- -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.06
5,142	Camphor	12,18	-	34,37*	10,6	5,38	7,48	15,72	24,47	19,38	7,32	24,46	20,94	13,95
		*		*	*		*	*	*	*		*	*	*
5,147	2-Furoic acid, tridec-2-ynyl ester **	-	-	-	-	1,28	-	-	-	-	-	-	-	-
5,25	Isoborneol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2.19
5,29	Crypton***	-	1,21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,313	endo-Borneol	3,42	-	4,11	2,24	-	1,78	3,29	3,36	3,29	1,27	2,94	2,44	-
5,346	m-Cymen-8-ol	-	-	-	-	1,08	-	-	-	-	-	-	-	-
5,377	L-4-terpinenol	-	-	2,4	1,56	1,21	1,38	-	1,84	-	1,11	1,73	1,72	-
5,385	Terpinen-4-ol	1,57	-	-	-	-	-	1,3	-	1,67	-	-	-	1.56
5,463	Ethanone,1-(6,6- dimethylbicyclo[3,1,0]h	1,2	-	-	1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,502	a-Terpineol	1,18	-	-	1,12	1,28	1,21	-	-	-	-	-	-	-
5,558	Terpineol	-	1,47	2,82	-	-	-	1,41	2,07	1,68	1,59	2,22	2,09	1.49
5,715	E-Piperitol	1,52	-	-	-	1,52	1,11	1,32	-	-	-	-	-	-
6,105	(E)-Ocimenone	1,55	-	-	1,31	-	-	1,24	-	-	-	-	-	-
6,215	Linalyl acétate	-	1,23	-	-	1,06	-	-	-	-	1,19	-	-	-
6,315	trans-Chrysanthenyl acetate	1,44	-	-	1,53	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-
6,525	2-Cyclohexen-1-one,3-methyl-6- (1-meth	1,89	-	-	1,55	-	-	1,5	-	1,09	-	-	-	-

Chapitre II : Résultats et discussions

6,64	Bornyl acétate	1,08	1,23	–	–	1,02	–	–	–	–	1,12	–	–	–
7,018	D-Verbenone **	–	–	–	3,39	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7,18	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-	–	–	–	1,66	–	1,39	–	–	–	–	–	–	–
7,659	Neoisothujyl acétate **	–	–	–	–	6,78	–	–	–	–	–	–	–	4,36
7,672	a-Terpinyl acétate	–	9,54*	–	4,02	–	5,19	–	–	–	8,4*	4,01	5,19	–
7,894	Isogermacrene D***	1,39	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
7,999	Chrysanthemic acid **	–	–	–	–	–	–	–	1,02	–	–	–	–	–
8,061	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(**	–	–	–	–	–	1,05	–	–	–	–	–	–	–
8,139	1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-me	–	–	–	–	–	–	2,06	–	–	–	–	–	–
8,149	5-Isopropenyl-2-methylcyclopent-1-enec	2,55	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8,424	Car-3-en-5-one	12,51*	–	–	9,67*	4,34	6,11	10,26*	5,6	10,25*	–	–	–	4,8
8,451	Caryophyllene	–	1,56	–	–	1,21	–	–	–	–	1,4	–	–	–
9,194	3,5-Heptadienal, 2-ethylidene-6-methyl-	–	–	–	–	–	–	1,17	–	–	–	–	–	–
9,218	β-copaene **	–	–	–	–	1,01	1,16	–	–	–	1,28	1,09	–	–
9,339	cis-Muurolo-4(15),5-diene	–	1,34	–	–	1,01	–	–	–	–	1,57	–	–	–
9,69	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-he **	–	2,57	–	–	1,84	–	–	–	–	–	1,28	–	–
9,7	Cadina-1(6),4-diene**	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2,85	–	1,89	9,7
10,13	β-Germacrene	–	2,5	–	–	–	1,04	–	–	–	2,13	–	1,16	–
6														
10,38	(-)-spathulenol	1,11	–	–	1,24	–	–	1,04	–	–	–	–	–	–
8														
10,40	Caryophyllene oxide	–	1,05	–	1,26	1,18	1,23	–	1,06	–	–	–	–	–
2														
10,93	Epicubenol	–	1,13	–	–	–	–	–	–	–	1,02	–	–	–
4														

Chapitre II : Résultats et discussions

<i>Pourcentage des composés</i>	82,22	68,6	87,59	77,0	73,49	70,4	80,35	77,82	76,21	75,51	80,32	78,3	80,4
				4		1							
<i>Nombre des composés</i>	26	20	10	24	25	22	21	14	13	21	12	14	18

Les composés sont répertoriés dans l'ordre de la valeur TR (temps de rétention). Les constituants représentant moins de 1 % ne sont pas répertoriés dans ce tableau.

* Composés majeurs.

** De nouveaux composés par rapport aux compositions d'HEs d'origine.

*** Des composés disparus par rapport aux compositions d'HEs d'origine.

La fluctuation importante en qualité et quantité entre les HEs extraites de la même espèce de plante réparties dans diverses régions du monde peut s'expliquer à la fois par la variation des paramètres de l'environnement qui, selon Emberger (1966), incluent les précipitations annuelles et la différence entre les températures maximales des mois les plus chauds et celles minimales des mois les plus froids. Bien que d'autres facteurs environnementaux (topographie, altitude, distribution saisonnière des précipitations, etc...) ont beaucoup à voir avec la variation des composés chimiques des HEs (Nevo. 1988 ; Prober et Brown, 1994 ; Zaouali et Boussaid, 2007). De plus, la variabilité chimique peut s'expliquer par des facteurs abiotiques locaux caractéristiques de la zone et/ou des facteurs biotiques sélectifs tels que la faune et la flore (Ben El Hadj Ali et *al.*, 2012). Les conditions édaphiques jouent également un rôle important dans la modification de ces composés (Zaouali et *al.*, 2005). Il convient également de noter que la zone topographique de tous les pays méditerranéens, y compris l'Algérie, est caractérisée par des reliefs variables tels que les grandes chaînes de montagnes relativement proches de la mer. En conséquence, des différences climatiques existent entre les régions voisines, principalement en raison des différences d'altitude reflétées dans la différenciation du bioclimat local (Nevo. 1988 ; Ben El Hadj Ali et *al.*, 2012). Cependant, la variation des taux de terpène entre les populations peut être également résulter de l'influence de facteurs génétiques propres à la plante, qui sont étroitement liés aux modes de reproduction de la plante (Chouaieb et *al.*, 2012 ; Boulila et *al.*, 2015). En outre, l'effet de l'interaction génotype-milieu peut jouer un rôle crucial dans cette variation (Guedri Mkaddem et *al.*, 2022)

L'Analyse par GC/MS des combinaisons préparées, à partir de différents rapports des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea*, et *R. officinalis*, a été réalisée dans la présente étude car cette technique sert à détecter l'influence des mélanges des HEs sur les compositions chimiques. Selon les analyses chromatographiques, le car-3-en-5-one (9,67 %) a une contribution majeure à l'échantillon D. Alors que l' α - pinène est le constituant le plus important dans les mélanges E (11,17 %) et J (14,96 %). De même, l'échantillon F est caractérisé par une présence majeure d'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1] heptan- (7,82%). De plus, les combinaisons G, H, I, K, L et M sont dominées par le camphre avec des taux respectifs de 15,7, 24,47, 19,38, 24,46, 20,94 et 13.95%. Les compositions chimiques des mélanges ont changé considérablement de celles des HEs originales, ce qui est le résultat de l'apparition de certains composés comme ingrédients majeurs ou mineurs, avec des différentes quantités entre les mélanges qui sont de nature terpénique (4-Thujanol...) ou autres tels que le 1-(2-éthyl-3-cyclohexényl)éthanol,1,6-

diméthylhepta-1,3,5-triène et 2,6,6-triméthylbicyclo[3.2.0]hept-2-en- 7...etc. Cependant, plusieurs composés tels que Bicyclo[3.1.1]hept-2-ène, 3,6,6-triméthyl ; Nonane, 2,5-diméthyl-; et Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-diméthyl-3-me qui ont été présents dans les HEs d'origine ont été disparus après avoir mélangé les HEs. De plus, les proportions des composants détectés en une seule HE ont été modifiées sur toutes les combinaisons suite à l'augmentation ou à la diminution de leurs quantités.

En accord avec nos constatations, Mahanta et Khanikor (2021) ont observé des changements dans la composition chimique des d'HEs mélangées de bulbes et de feuilles d'*Allium sativum* et *Citrus paradisi*, respectivement. Toutefois, Muturi et al. (2017) ont détecté peu de composés dans des mélanges binaires d'HEs de *Syzygium aromaticum*, *Leptospermum scoparium* et *Origanum vulgare* que ceux détectés sur les HEs brutes. Plus précisément, Wangrawa et al. (2022) ont présenté la pipéritone (33,42%) et le 2-carène (14,17%) comme des nouveaux constituants majeurs suite à une combinaison des HEs de *Lantana camara* avec *Cymbopogon schoenanthus* ainsi que les quantités de carvacrol qui s'augmentent dans les mélanges binaires d'HEs de *Lippia multiflora* et *Lantana camara* ou *Lippia chevalieri*. Dans ce contexte, ces altérations peuvent être liées à une distribution de composés volatiles qui est basée sur la solubilité des extraits et les nouveaux composants résultants lors du mélange (Wangrawa et al., 2022). Il est également à mentionner que les HEs sont connues par leur instabilité vis-à-vis les conditions physico-chimiques qui les entourent (Turek et Stintzing, 2013). Pfau (1972) a décrit une série de réactions d'isomérisation intramoléculaire catalysées photo-chimiquement, telles que les conversions trans/cis ou la cycloaddition de divers monoterpénoïdes. D'autres travaux ont indiqué qu'une isomérisation de trans-anéthole à cis-anéthole a été détectée suite à l'exposition des HEs de *Foeniculum vulgare* aux rayons UV ou aux hautes températures (Braun et Franz, 1999). De plus, le trans-anéthol dans le même type d'huile a été totalement isomérisé en cis-anéthol ou oxydé en anisaldéhyde après une période de stockage sous lumière à température ambiante (Misharina et Polshkov, 2005). En réalité, plusieurs compositions chimiques d'HEs ont été modifiées après le stockage de celles-ci à la lumière, avec des quantités décroissantes d'acétate d'eugényle, d'estragole, trans-anéthole et de nombreux monoterpènes, tandis que le p-cymène, l'eugénol et l'anisaldéhyde ont augmenté (Turek et Stintzing, 2013). Il a été signalé davantage que l'augmentation de température a augmenté les quantités de certains produits de polymérisation non identifiés dérivés du myrcène (Turek et Stintzing, 2013). Une explication possible à ceci peut résider dans les processus de réaction au sein des mélanges, tant avec les HEs, en se développent 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 (Günther, 1948 ; Graza et Ruff, 1981 ; Gopalakrishnan, 1994). En médecine traditionnelle, Lau et al. (2012) et Shaw et al. (2012) ont suggéré que les effets synergiques des formulations à base de plantes peuvent être attribués à de nouveaux composés créés pendant le processus d'ébullition à la suite d'interactions entre les ingrédients végétaux dans le milieu de décoction. Dans ce contexte, les composants des HEs (en particulier les terpènes) sont connus pour se convertir facilement et fréquemment en raison de leur relation structurelle au sein d'un même groupe phytochimique, ce qui génère de nouveaux composés par cyclisation, oxydation, déshydrogénation ou isomérisation (Turek et Stintzing, 2013). A titre d'exemple, le 4-thujanol (hydrate de sabinen) a été l'un des constituants les plus répandus dans les mélanges K, L et M. Ce monoterpène oxygéné a été synthétisé, en tant que stéréosélective et asymétrique, à partir de (-) sabinen dans les travaux de Schiebe et al. (2019) et Ganji et al. (2020) respectivement. D'autre part, le sabinen a été détecté comme l'un des principaux ingrédients de l'HE de *J. phoenicea*. Alors que d'après les résultats actuels, ce composant n'a pas présenté dans les mélanges K et L qui ont été préparés à partir des HEs de *J. phoenicea* et *R. officinalis* avec des rapports de volume de 1:1 et 1:3, respectivement. De plus, le mélange J, qui comprend les mêmes huiles (3:1), a été apparu dépourvu de 4-thujanol, tandis que le sabinen a présenté une majorité de 9,53 % dans le même mélange. Il semble être que le 4-thujanol identifié dans les échantillons K et L dérive du sabinen, qui a préexisté dans l'HE de *J. phoenicea*. L'hypothèse précédente soutient fortement nos résultats concernant les modifications des compositions chimiques de tous les mélanges.

Les profils chimiques obtenus (HEs et dix mélanges) ont ensuite été soumis à une analyse hiérarchique de regroupement en fonction de la méthode de critère de WARD, pour évaluer leurs similitudes en termes de composition chimiques (**Fig. 18**). Avec une dissimilarité de 8, l'analyse a révélé cinq groupes uniques, G1, G2, G3, G4 et G5 où le G1 (K, L et M) a été identifié par la présence d' α -pinène (8,36–13,62%), camphre (13,95–24,46%) et 4-thujanol (9,02–12,96%) comme des composants principaux. Alors que le G2 (A et D) a exhibé une abondance de 1-(2- Ethyl-3 cyclohexényl) éthanol (4,22–8,08%), camphre (10,6–12,18%), 2,6,6 triméthylbicyclo[3.2.0]hept- 2-en-7 (4,58–6,44 %) et car-3-en-5-one (9,67– 12,51 %). D'autre part, à une dissimilarité > 6, le G3 a été divisé en deux sous-groupes supplémentaires (SG3a et SG3b). D'abord, le SG3a, contenant de l'HE de romarin et le mélange H, est caractérisé par la présence d' α -pinène (7,33–12,94%), de camphre (24,47–34,37%) et d'eucalyptol (10,26–

14,46%) comme principaux ingrédients. Alors que le SG3b (G et I) présente une majorité du camphre (15,72–19,38%) et de car-3-en-5-one (10,25–10,26%). En suivant, le G4 (B et J) comprend le α -pinène (14,96–15,49%), α -terpinyl acétate (8,4–9,54%), 3-carène (8,33–9,56%) et sabinen (9,51– 9,95%). Enfin, le G5 (E et F) contient de l' α -pinène (7,71–11,17 %) et du camphre (5,38–7,55 %).

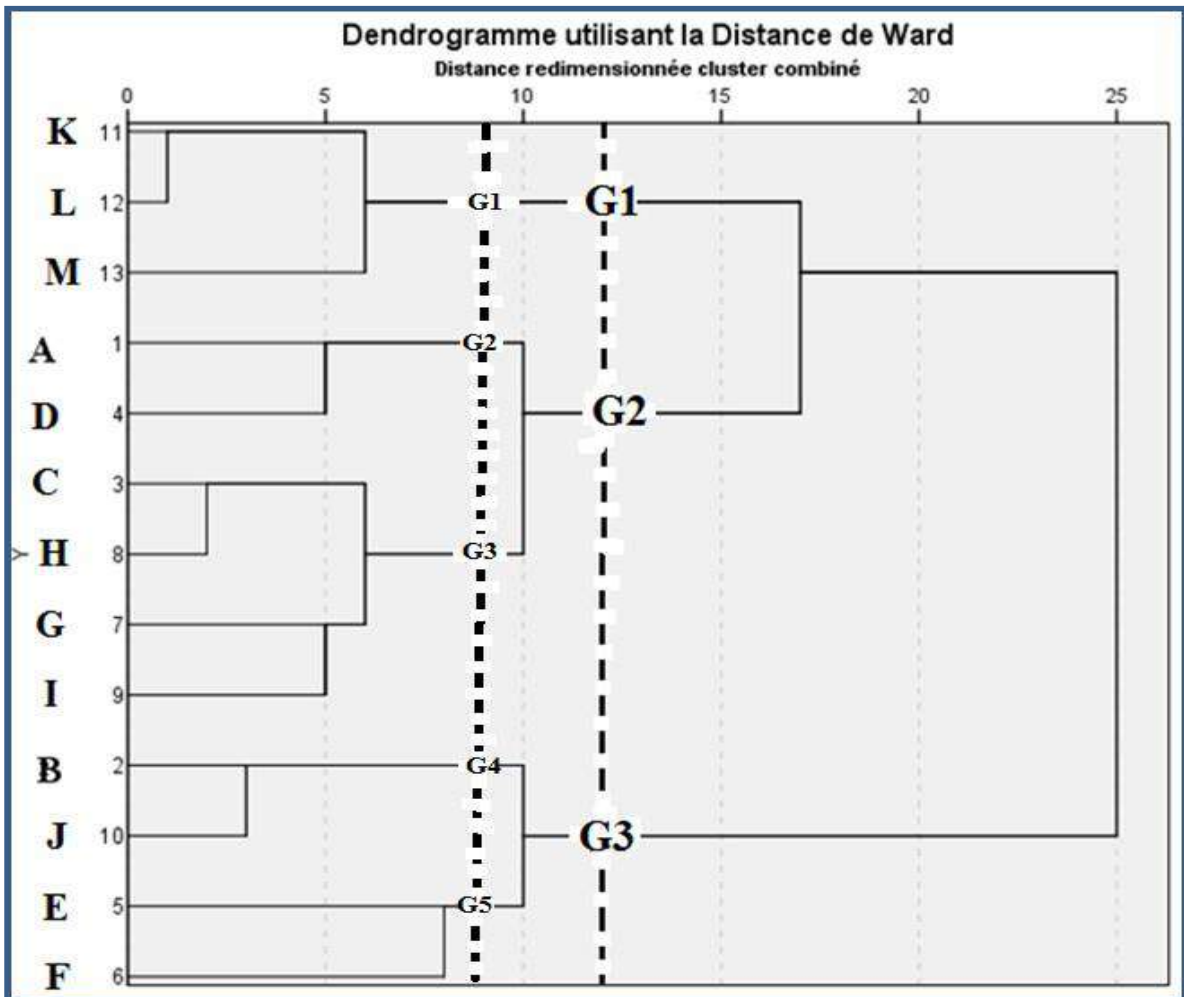


Figure 18 : Dendrogramme en Ward basé sur les similitudes des compositions chimiques des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* avec leurs mélanges.

Comme mentionné précédemment, les mélanges D, H et J appartiennent aux mêmes groupes hiérarchiques que les HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea*, et *R. officinalis*, respectivement. Cette situation s'explique par la forte concentration de chaque huile dans le mélange auquel elle ressemble. Nos résultats ont également montré que les compositions chimiques se varient en fonction des proportions d'huiles dans chaque échantillon. Ainsi, une

même constitution dans différents mélanges de HEs n'implique pas forcément des profils chimiques identiques. A cet égard, les combinaisons J, K et L, qui contiennent des HEs de genévrier et de romarin, avec des rapports respectifs de 3:1, 1:3 et 1:1, les mélanges K et L appartiennent à G1 car leurs compositions chimiques sont très similaires, tandis que J appartient à G4, avec une composition dissemblable.

II.2. Pouvoir insecticide des HEs et leurs mélanges contre les adultes de *T. castaneum*

L'utilisation des mélanges d'HEs, avec des taux réduits de produits en combinaison, pour augmenter leur efficacité individuelle a aidé à diminuer la résistance des insectes aux insecticides synthétiques. Ces outils biologiques peuvent même être une méthode complémentaire ou alternative pour minimiser l'utilisation des insecticides chimiques, contribuant ainsi à limiter leurs effets négatifs (Gross et *al.*, 2017 ; Chansang et *al.*, 2018 ; Isman, 2020 ; Sheng et *al.*, 2020).

L'évaluation de la toxicité de divers échantillons a été assurée, en quatre jours, en appliquant des concentrations croissantes de bioinsecticides contre les adultes de *T. castaneum*. Aucune mortalité n'a été enregistrée dans le groupe témoin. Les résultats illustrés dans les **Figures 19, 20, 21 et 22** démontrent que toutes les HEs ainsi que leurs mélanges ont présenté une toxicité significative envers les insectes traités. L'estimation des valeurs DL₅₀ et DL₉₀ (**Tab. 06**) a révélé une disparité dans la toxicité des échantillons. De plus, l'analyse de variance a montré que la toxicité est généralement dépendante de la dose appliquée ($p < 0,05$) que du temps ($p > 0,05$).

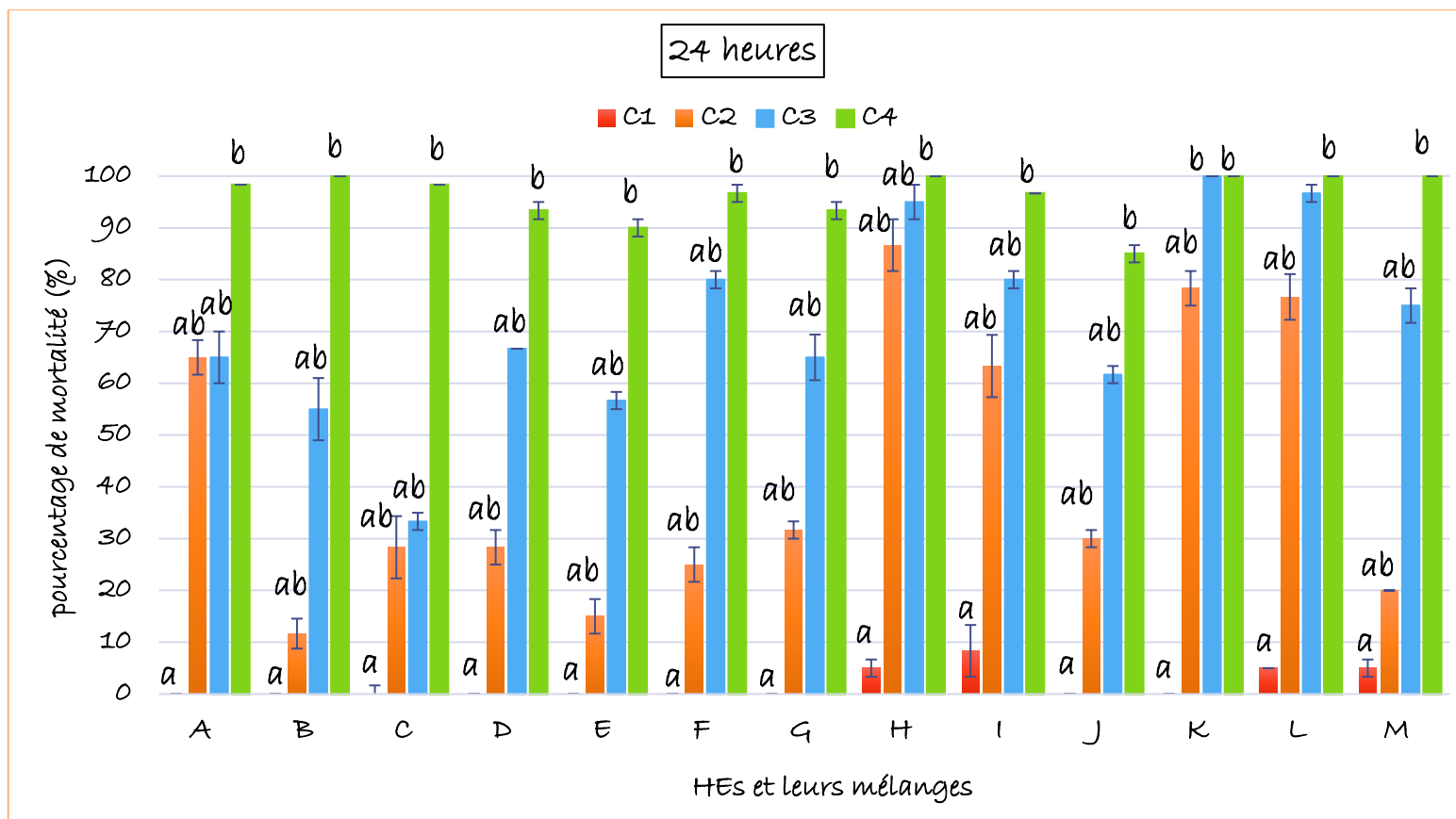


Figure 19 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 μ l/l air ; C2 = 83,33 μ l/l air ; C3 = 166,67 μ l/l air ; C4 = 333,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons, après 24 h. La comparaison des moyennes est effectuée en utilisant le test ANOVA suivi de test de Tukey pour les données normales ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifièrent que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), alors que le cas contraire génère des différences significatives entre les mortalités ($P < 0,05$).

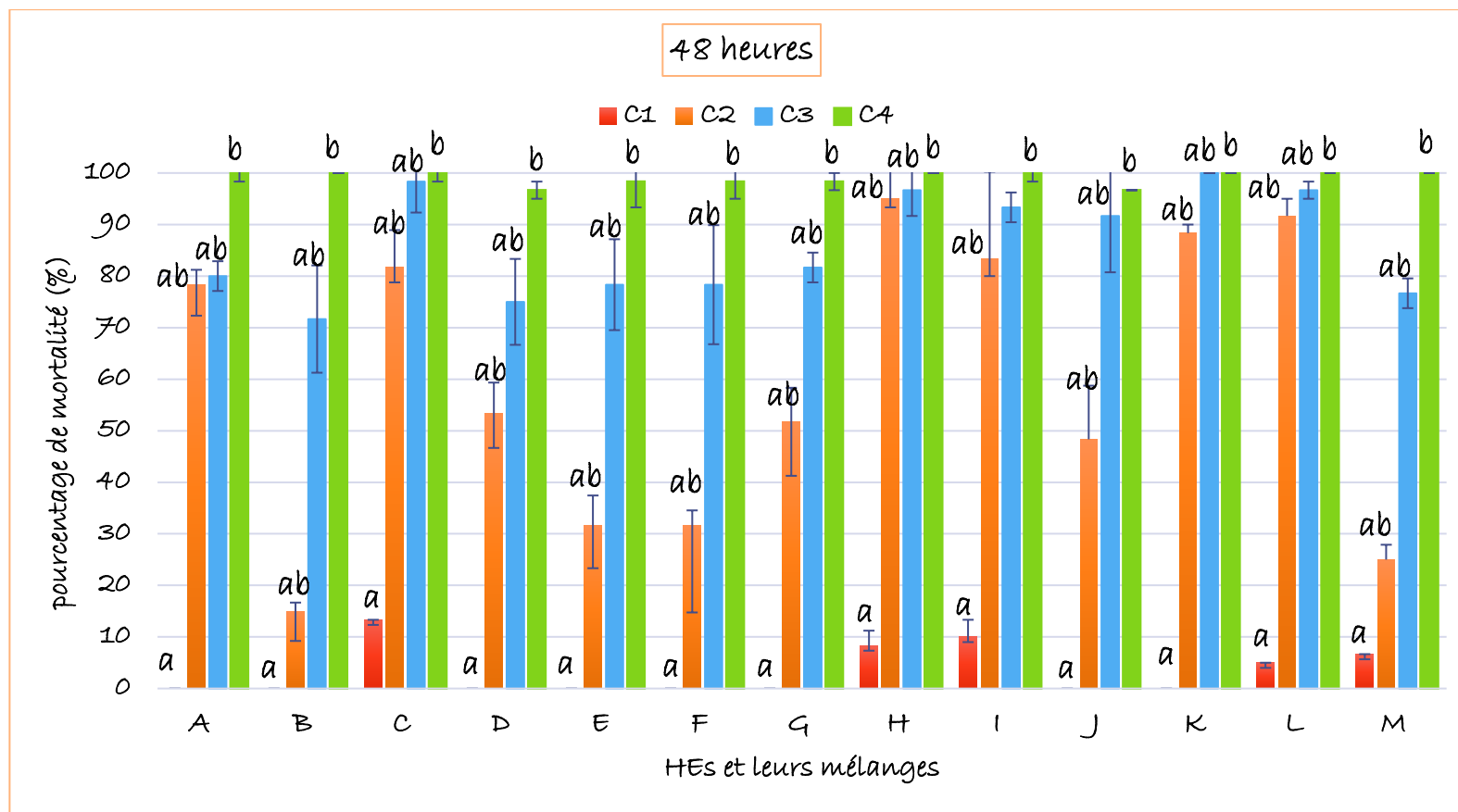


Figure 20 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 μ l/l air ; C2 = 83,33 μ l/l air ; C3 = 166,67 μ l/l air ; C4 = 333,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons, après 48 h. La comparaison des moyennes est effectuée en utilisant le test ANOVA suivi de test de Tukey pour les données normales ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifié que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), alors que le cas contraire génère des différences significatives entre les mortalités ($P < 0,05$).

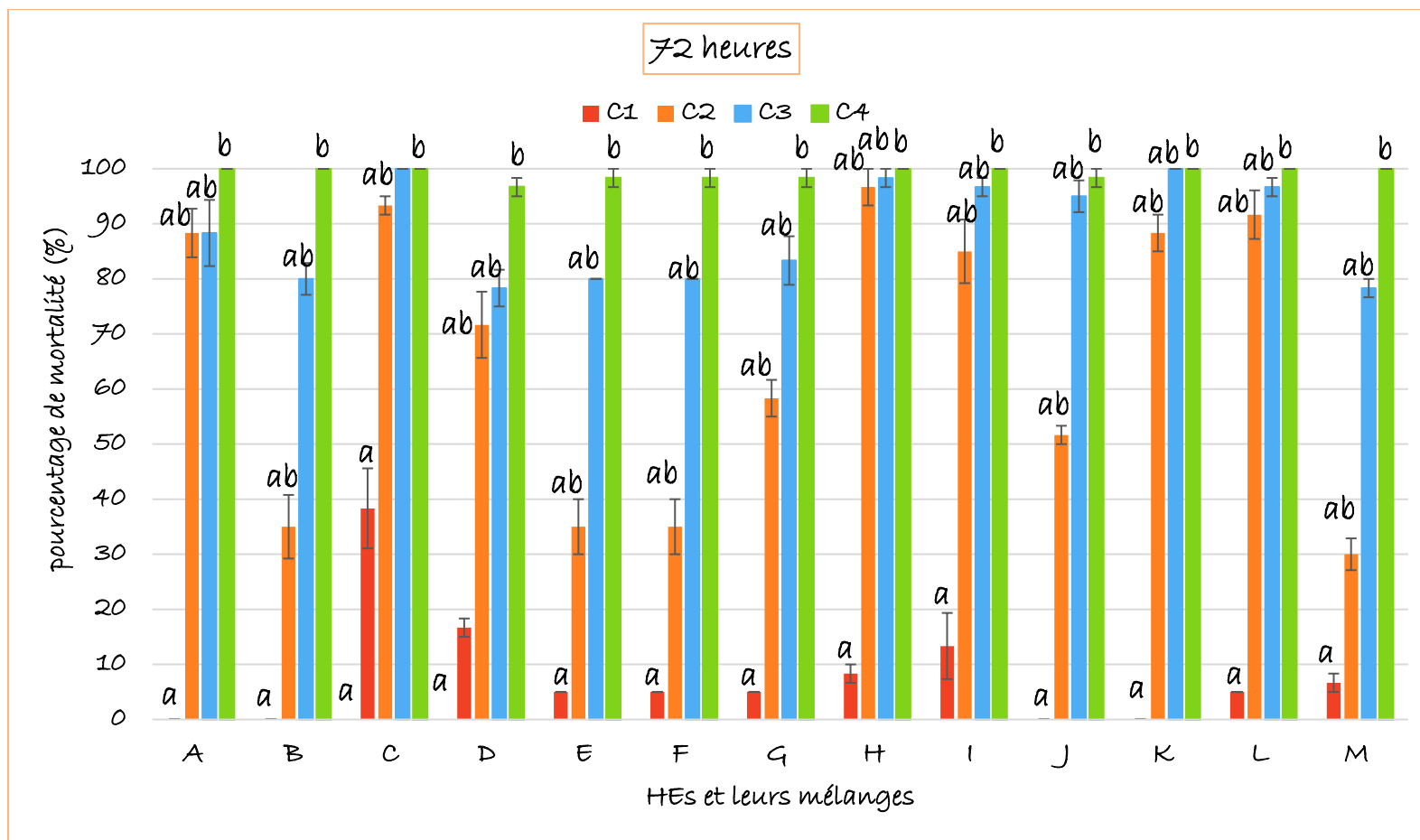


Figure 21 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 μ l/l air ; C2 = 83,33 μ l/l air ; C3 = 166,67 μ l/l air ; C4 = 333,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons, après 72 h. La comparaison des moyennes est effectuée en utilisant le test ANOVA suivi de test de Tukey pour les données normales ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifié que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$), alors que le cas contraire génère des différences significatives entre les mortalités ($P < 0,05$).

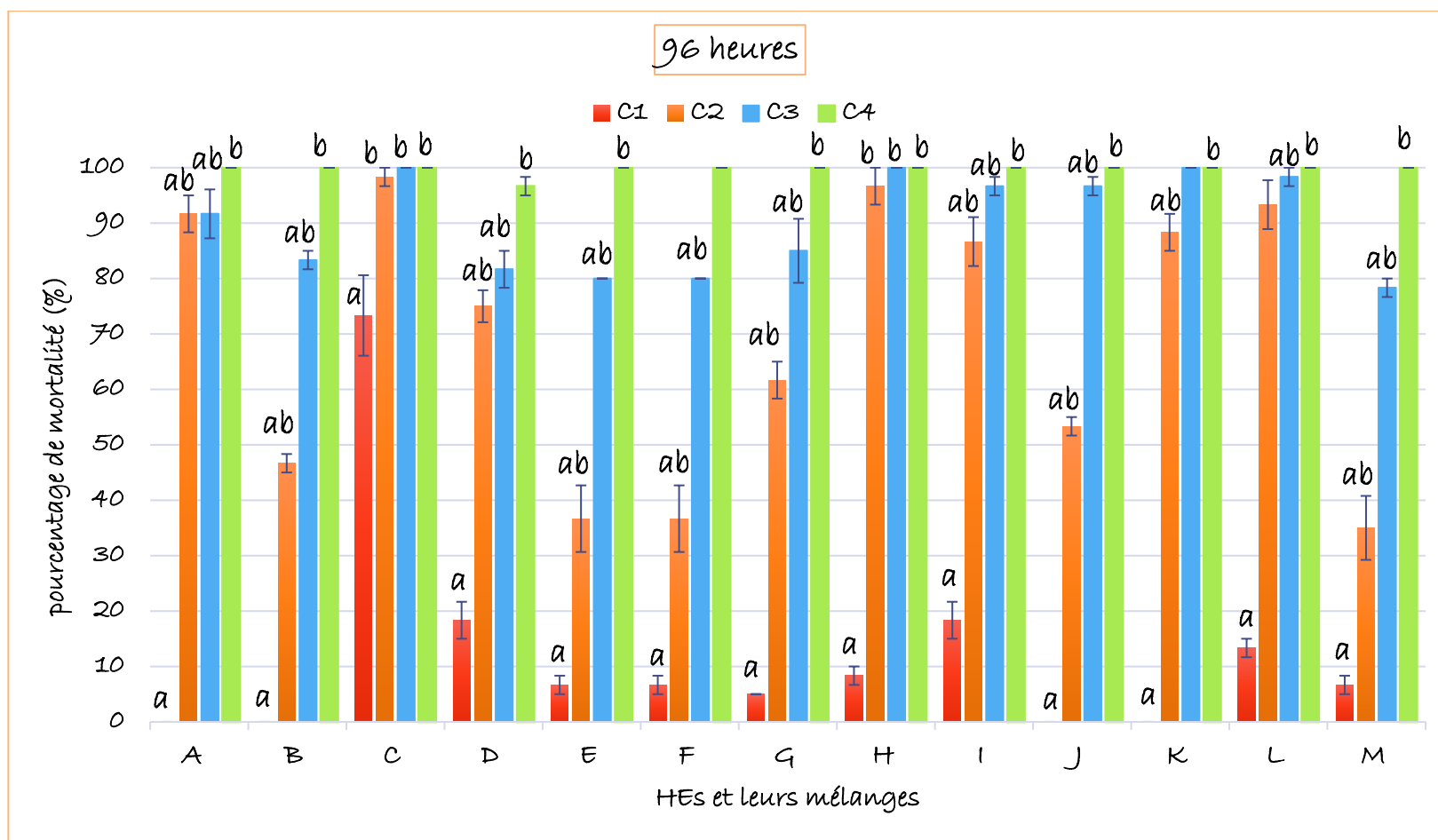


Figure 22 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* traités avec différentes concentrations : (C1 = 41,67 μ l/l air ; C2 = 83,33 μ l/l air ; C3 = 166,67 μ l/l air ; C4 = 333,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons, après 96 h. La comparaison des moyennes est effectuée en utilisant le test ANOVA suivi de test de Tukey pour les données normales ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifié que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), alors que le cas contraire génère des différences significatives entre les mortalités ($P < 0,05$).

Les analyses de Probit et Logit ont montré qu'après 24 h de traitement, l'HE d'*A. herba-alba* a été très toxique contre les adultes *T. castaneum* avec une valeur de DL₅₀ de 107,199 µl/L d'air. Cependant, les HEs de *J. phoenicea* et *R. officinalis* ont été moins efficaces, avec des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 155,724 et 156,589 µl/L d'air, respectivement. Au-delà de 96 h de traitement, les valeurs DL₅₀ correspondantes ont été de 66,45, 74,38 et 97,83 µl/l d'air pour les HEs de *R. officinalis*, *A. herba-alba* et *J. phoenicea*, respectivement.

Après 24 h d'exposition, le mélange H a enregistré la toxicité la plus élevée (DL₅₀ = 64,99 ; DL₉₀ = 99,52 µl/l d'air), suivi de L (DL₅₀ = 68,98 ; DL₉₀ = 106,27 µl/l d'air), K (DL₅₀ = 74,76, DL₉₀ = 89,64 µl/l air), et I (DL₅₀ = 82,58 ; DL₉₀ = 196,24 µl/l d'air). De plus, les mélanges F, G, D et M ont présenté une toxicité modérée avec des valeurs de DL₅₀ de 116,46, 126,64, 128,4, 131,6 et 219,127 µl/l air et des valeurs de DL₉₀ de 209,54, 277,31 et 271,20 µl/l d'air, respectivement. Contrairement aux mélanges J et E qui ont montré des valeurs de DL₅₀ de 140,19 et 154,84 µl/l air, accompagnées de valeurs de DL₉₀ de l'ordre de 356,02 et 316,15 µl/l d'air, respectivement. Les valeurs des FSs des combinaisons L, H, K, I, J, F et M ont été supérieures à 1, indiquant que ces mélanges ont donc un effet synergique. Il a également été montré que les mélanges des HEs de *R. officinalis* + *A. herba-alba* (3 :1) et HEs de *J. phoenicea* + *R. officinalis* dans des rapports de 1 :3 et 1 :1 ont montré une synergie considérable, avec des valeurs de FSs de 2,22, 2,26 et 2,09, respectivement. Dans ce cas, l'impact synergique a considérablement réduit les doses de bioinsecticide (DRI = 2,41, 2,27 et 2,09, respectivement). Contrairement à ceux précédemment décrits, les mélanges D, E et G ont été antagonistes.

Des toxicités très élevées des mélanges H, I et L ont été détectées après 96 h de traitement, avec des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 55,6, 57,63 et 58,46 µl/l air ainsi que celle de DL₉₀ de 72,27, 97,24 et 82,68 µl/l d'air, respectivement. Les valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ pour le reste des combinaisons sont comprises entre 67,8 et 99,85 et 83,12 et 199,75 µl/l d'air, respectivement. Dans le même intervalle du temps, les mélanges F et M ont été antagonistes, le mélange E a été synergique, tandis que les autres combinaisons ont maintenu leurs effets antagoniste ou synergique précédemment examinés. De plus, à mesure que le temps d'exposition s'écoule, une diminution de leurs effets synergiques ainsi que les valeurs de leur DL₅₀ a été notée.

Des toxicités très élevées des mélanges H, I et L ont été détectées après 96 h de traitement, avec des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 55,6, 57,63 et 58,46 µl/l air ainsi que celle

de DL₉₀ de 72,27, 97,24 et 82,68 µl/l d'air, respectivement. Les valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ pour le reste des combinaisons sont comprises entre 67,8 et 99,85 et 83,12 et 199,75 µl/l d'air, respectivement.

Chapitre II : Résultats et discussions

Tableau 06 : Valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ observées ainsi que celles des DL₅₀ théoriques (µg/ml) ; les limites inférieures et supérieures des DL₅₀ et CL₉₀ à 95 % ; les facteurs synergiques (SF) ; les indices de réduction de dose (IRD) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* avec leurs combinaisons contre les adultes de *T. castaneum*.

<i>HEs et leurs combinaisons</i>	<i>DL₅₀ Observée (µ/L d'air)</i>	<i>Limites inférieures et supérieures des DL₅₀ à 95% (µ/L d'air)</i>	<i>DL₉₀ Observée (µ/L d'air)</i>	<i>Limites inférieures et supérieures des DL₉₀ à 95% (µ/L d'air)</i>	<i>DL₅₀ Théorique (µ/L d'air) a</i>	<i>Facteur de synergie (FS) b</i>	<i>Indice de Réduction de Dose (IRD) c</i>
Après 24 heures							
<i>A</i>	107,20	(81,70-138,30)	226,93	(158,42–540,05)	/	/	/
<i>B</i>	155,70	(125,60-197,70)	249,41	(213,03–322,64)	/	/	/
<i>C</i>	156,60	(119,30-214,80)	344,38	(241,22–841,17)	/	/	/
<i>D</i>	128,11	(109,99–149,44)	271,20	(219,82–377,88)	119,32	0,93	0,84
<i>E</i>	154,84	(131,90–182,88)	316,11	(253,25–458,56)	143,58	0,93	1
<i>F</i>	116,46	(96,40–140,73)	209,54	(167,76–316,79)	131,45	1,13	1,34
<i>G</i>	126,64	(109,74–146,33)	277,31	(226,30–378,04)	119,55	0,94	0,85
<i>H</i>	64,99	(39,40–93,58)	99,52	(74,98–376,37)	144,25	2,22	2,41
<i>I</i>	82,58	(61,83–106,62)	196,24	(142,95–384,3)	131,90	1,6	1,9
<i>J</i>	140,19	(110,56–180,21)	356,02	(255,79–682,24)	155,92	1,11	1,11
<i>K</i>	74,76	(68,25–77,64)	89,64	(86,93–96,05)	156,38	2,09	2,09
<i>L</i>	68,98	(62,36–75,69)	106,27	(94,61–126,64)	156,15	2,26	2,27
<i>M</i>	131,6	(112,1-155,4)	219,086	(193,15-259,28)	138,43	1,17	1,19
Après 48 heures							
<i>A</i>	85,4	(63,40-110,00)	150,91	(110,27–360,08)	/	/	/
<i>B</i>	135,6	(113,00-163,00)	212,68	(190,01–248,19)	/	/	/
<i>C</i>	75,9	(62,90-88,80)	98,69	(87,24–118,22)	/	/	/
<i>D</i>	98,5	(79,97–110,66)	211,50	(166,85–317,66)	97,95	0,99	0,88
<i>E</i>	111,09	(20,42–146,45)	203,33	(177,40–245,68)	123,05	1,11	1,22
<i>F</i>	111,92	(53,71–75,71)	203,33	(177,4–245,68)	110,5	0,99	0,76

Chapitre II : Résultats et discussions

G	94,21	(79,97–110,66)	181,07	(147,31–256,72)	83,02	0,88	0,91
H	58,82	(20,42–146,45)	85,19	(60,68–24882,53)	78,28	1,33	1,29
I	64,3	(53,71–75,71)	109,92	(90,57–157,97)	80,65	1,25	1,18
J	91,07	(77,20–107,34)	161,30	(131,82–232,75)	120,68	1,32	1,49
K	68,5	(64,07–71,65)	83,12	(80,42–86,18)	90,82	1,32	1,11
L	62,2	(46,18–79,49)	89,32	(71,63–161,45)	105,75	1,7	1,22
M	119	(102,3 – 138,8)	216,9	(188,92-261,58)	97,977	0,82	0,64
Après 72 heures							
A	76,8	(55,70-99,90)	113,84	(82,86–680,01)	/	/	/
B	115,4	(96,20-138,20)	187,60	(161,76–233,06)	/	/	/
C	70,5	(54,60-77,90)	74,28	(69,25–81,25)	/	/	/
D	72,17	(56,67–88,34)	200,96	(151,77–330,61)	86,45	1,2	1,06
E	103,46	(98,01–109,18)	207,38	(190,94–228,65)	105,75	1,02	1,11
F	103,46	(103,46–98,01)	207,38	(190,94–228,65)	96,1	0,93	0,74
G	85,47	(73,23–99,08)	176,40	(144,56–242,13)	75,22	0,88	0,90
H	57,05	(27,46–174,96)	78,04	(56,46–11204,24)	72,08	1,26	1,24
I	60,73	(52,38–69,71)	98,98	(83,9–131,45)	73,65	1,21	1,16
J	86,04	(69,07–107,36)	138,59	(110,21–254,78)	104,18	1,21	1,34
K	68,5	(64,07–71,65)	83,12	(80,42–86,18)	81,72	1,19	1,03
L	62,2	(46,18–79,49)	89,32	(71,63–161,45)	92,95	1,49	1,13
M	114	(97,8 - 133)	209,299	(185,11-245,58)	86,691	0,76	0,62
Après 96 heures							
A	74,4	(53,8-96,8)	100,79	(73,06–15065,86)	/	/	/
B	97,8	(88,2-108,3)	170,37	(146,25–214,04)	/	/	/
C	66,4	(56,0-73,0)	77,33	(55,56–137,41)	/	/	/
D	67,8	(53,67–82,20)	183,55	(103,16–174,55)	80,25	1,18	1,1
E	99,85	(91,05–109,41)	199,75	(174,96–238,27)	91,95	0,92	0,98
F	99,85	(91,05–109,41)	199,75	(174,96–238,27)	82,1	0,82	0,98
G	81,78	(69,26–95,80)	158,30	(129,06–224,06)	72,4	0,88	0,91
H	55,6	(51,74–60,27)	72,28	(65,94–82,21)	68,4	1,23	1,19
I	57,63	(50,92–64,72)	97,24	(83,83–122,87)	70,4	1,22	1,15
J	83,32	(78,14–88,82)	120,86	(109,94–140,17)	89,95	1,08	1,17

Chapitre II : Résultats et discussions

K	68,5	(64,07–71,65)	83,12	(80,42–86,18)	74,25	1,08	0,97
L	58,46	(46,11–69,66)	82,68	(67,54–131,78)	82,1	1,4	1,13
M	109,127	(93,9 – 126,9)	206,324	(179,51-248,91)	78,74	0,72	0,61

a DL50 théorique = [(Proportion de l'HE1 x DL50 de l'HE1) + (Proportion d'HE1 x DL50 d'HE2) + ...]

b FS = (DL50 théorique)/(DL 50 observée) ; FS = 1 (additif). <1 (antagoniste). >1 (synergique) (Feroz, 2020).

c L'IRD est une mesure de l'étendue de la réduction de la dose d'un toxique spécifique à une combinaison synergique, calculé par la formule suivante : **IRD = Dx1/D1** (Chou, 2010). Dx1 indique la valeur de DL₅₀ des HEs incluses dans le mélange ; tandis que D1 est la DL₅₀ de la combinaison synergique qui contient ces HEs. IRD= 1 (pas de réduction de dose) ; IRD <1 (réduction de dose défavorable) ; IRD >1 (réduction de dose favorable).

IRDs pour les échantillons D, F (après 48, 72 et 96 h) et G ont été calculés correspondent à la DL₅₀ de l'HE d'*A. herba-alba*

IRDs pour les échantillons, F (après 24 h), E et J, ont été calculés correspondent à la DL₅₀ de l'HE de *J. phoenicea*. Les IRDs pour le reste des échantillons à différentes périodes de traitement ont été calculés correspondent à la DL₅₀ de l'HE de *R. officinalis*.

En effet, l'effet des HEs et leurs mélanges sur la longévité des adultes a été toujours dépendant de la dose appliquée (**Fig. 23, 24, 25 et 26**). À la concentration la plus faible (C 1 = 41,67 µl/l d'air), aucune mortalité n'a été détectée pour les échantillons J et K pendant quatre jours. De plus, les mélanges D, E, F et G n'ont présenté aucune mortalité après 48 h d'exposition ainsi que les taux de mortalité ont été inférieurs à 10 %, au-delà de cette période. De même, les combinaisons L, I et H ont entraîné des taux de mortalité très faibles pendant les quatre jours de traitement.

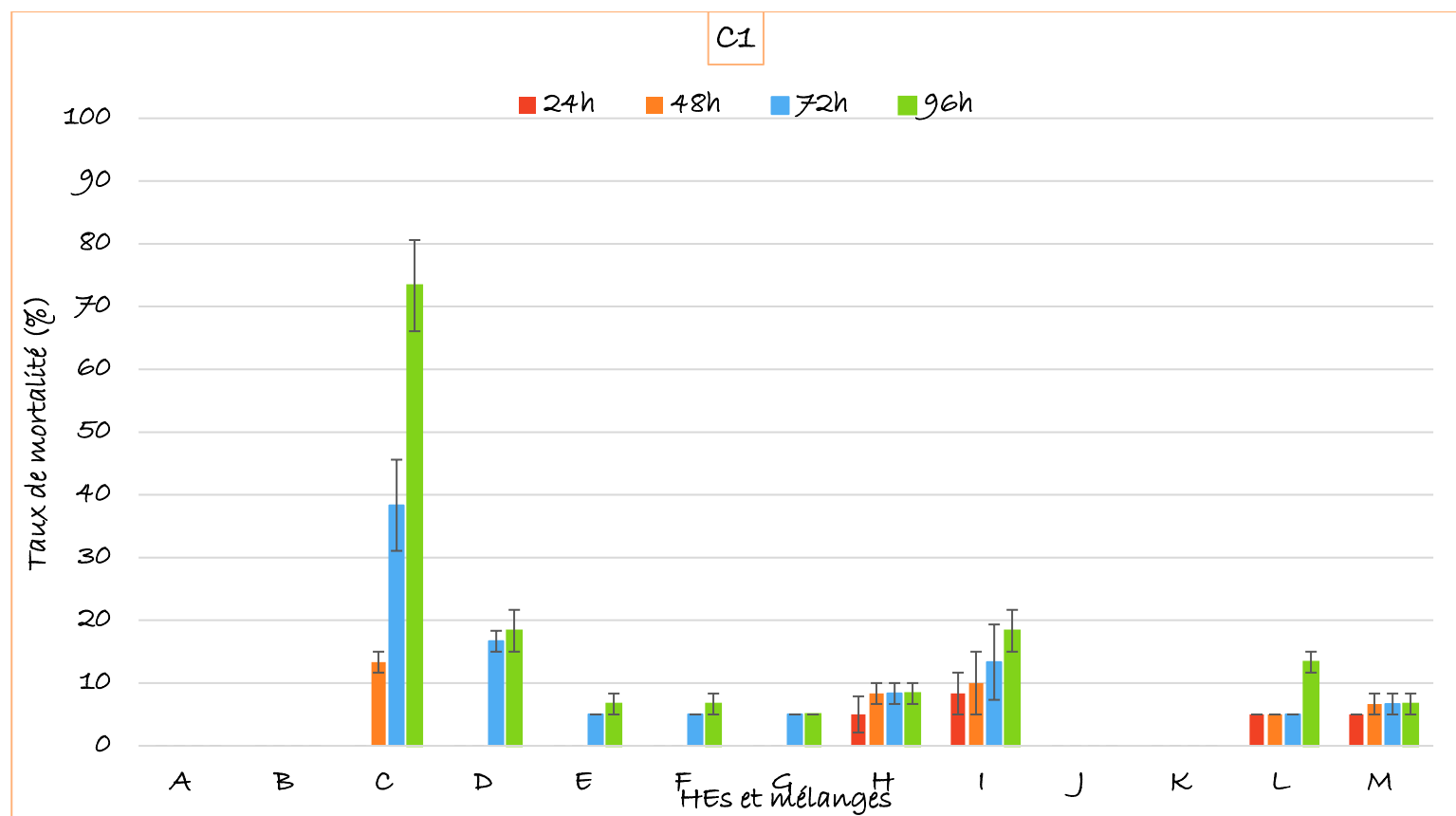


Figure 23 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C1 = 41,67 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons. La comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant le test ANOVA suivi du test de Tukey pour les données normales, ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les taux de mortalités ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), alors que le cas contraire reflète des différences significatives entre ledit facteur ($P < 0,05$).

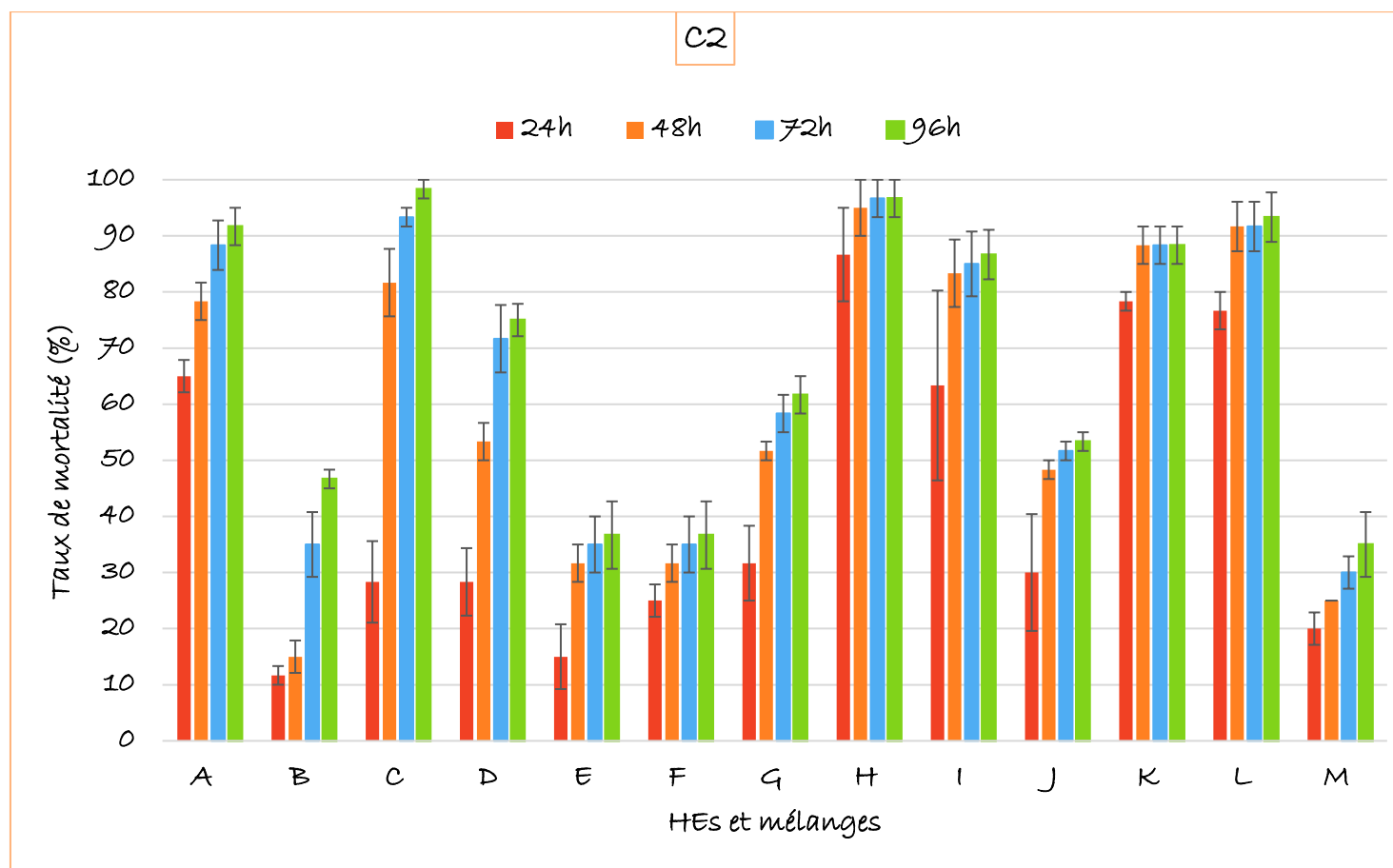


Figure 24 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C2 = 83,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons. La comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant le test ANOVA suivi du test de Tukey pour les données normales, ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les taux de mortalités ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), alors que le cas contraire reflète des différences significatives entre ledit facteur ($P < 0,05$).

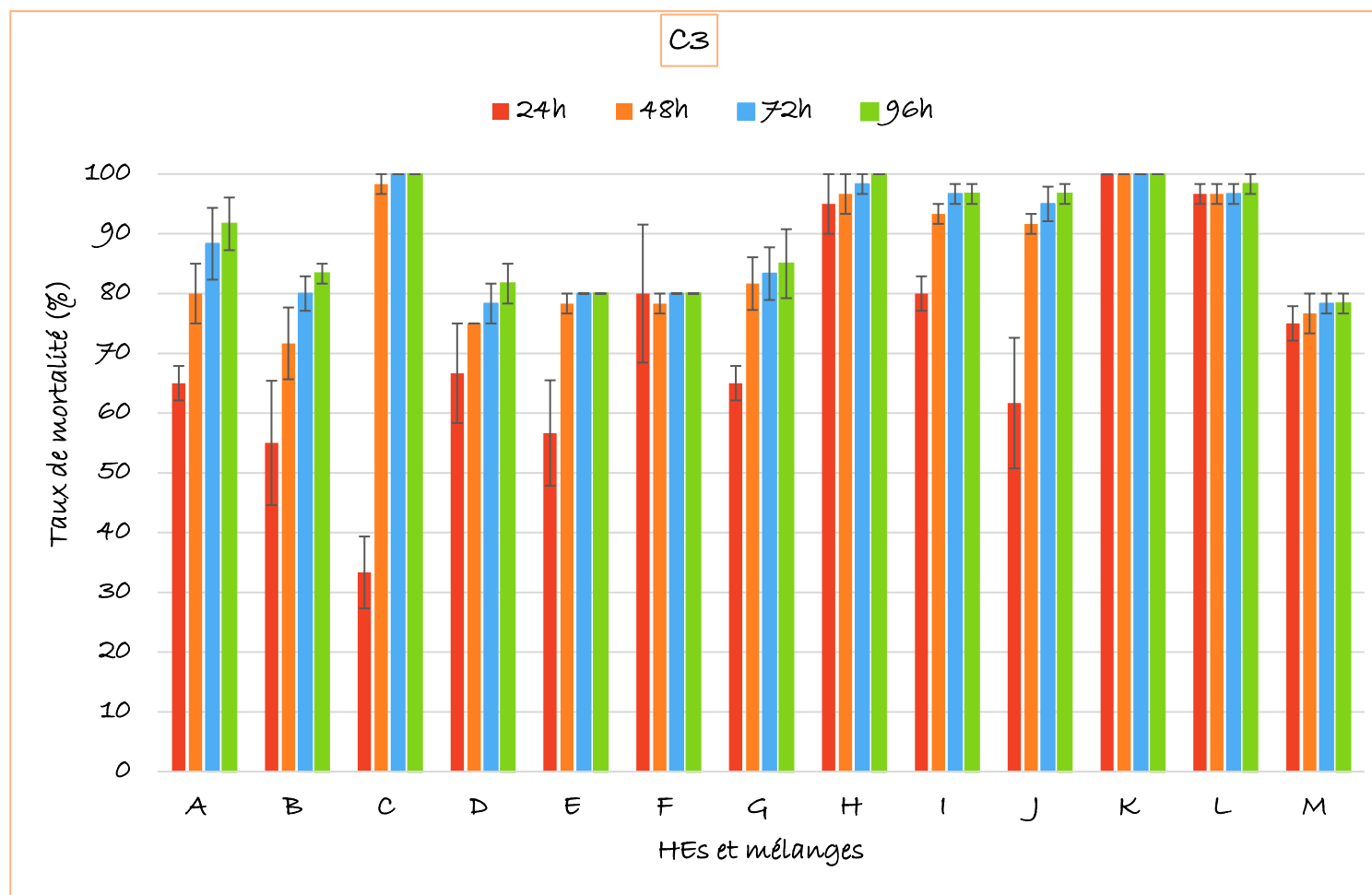


Figure 25 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations ($C_3 = 166,67 \mu\text{l/l}$ air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons. La comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant le test ANOVA suivi du test de Tukey pour les données normales, ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les taux de mortalités ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), alors que le cas contraire reflète des différences significatives entre ledit facteur ($P < 0,05$).

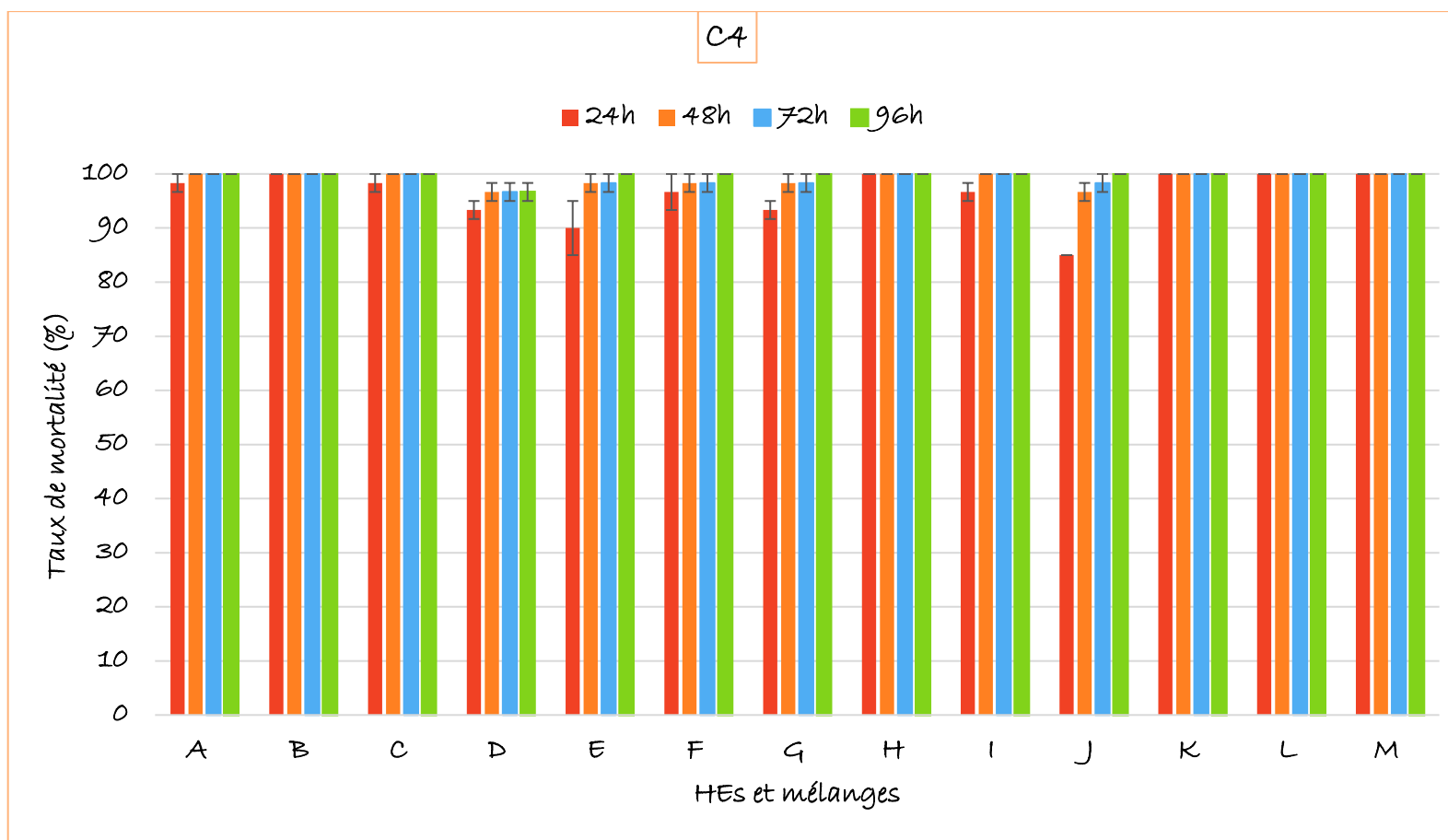


Figure 26 : Taux de mortalités (moyenne \pm ES) des adultes *T. castaneum* après 24, 48, 72 et 96 h à différentes concentrations (C4 = 333,33 μ l/l air) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons. La comparaison des moyennes a été effectuée en utilisant le test ANOVA suivi du test de Tukey pour les données normales, ou Kruskal-Wallis pour les données anormales. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les taux de mortalités ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), alors que le cas contraire reflète des différences significatives entre ledit facteur ($P < 0,05$).

En revanche, l'exposition de l'insecte à la dose la plus élevée (333,33 µl/l air) a entraîné des mortalités proches ou égales à 100% tout au long du traitement. Les valeurs de TL₅₀ et TL₉₀ pour une concentration de 83,33 µl/l d'air ont révélé que les mélanges L, I et K ont entraîné des mortalités relativement importantes (> 60 %) après 24 h d'exposition, rendant impossible la détermination des valeurs de TL₅₀ pour ces échantillons. De plus, les échantillons L, K et I ont présenté les valeurs de TL₉₀ les plus basses, qui ont été de 2,60, 3,97 et 4,15 h, respectivement. Les combinaisons J, E et F ont dévoilé les effets les plus faibles sur la longévité des insectes, avec des valeurs de TL₅₀ de l'ordre de 10,40, 11,73 et 19,20 h, respectivement (**Tab. 07**).

Tableau 07 : Les valeurs calculées des TL₅₀ et TL₉₀ ainsi que les limites inférieures et supérieures des TL₅₀ et les TL₉₀ à 95 %, des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs mélanges contre les adultes de *T. castaneum* à une concentration de 41,67 µl/l d'air de chaque échantillon.

<i>HEs et leurs combinaisons</i>	<i>TL₅₀ (h)</i>	<i>Limites inférieures et supérieures des TL₅₀ à 95% (h)</i>	<i>TL₉₀ (h)</i>	<i>Limites inférieures et supérieures des TL₉₀ à 95% (h)</i>
A	a	/	3,47	(2,90–4,70)
B	4,129	(3,72–4,79)	7,32	(6,24–9,29)
C	1,404	(1,07–1,66)	2,58	(2,24–3,18)
D	2,031	(1,54–2,42)	5,17	(4,35–6,84)
E	5,174	(3,85–16,64)	11,73	(7,60–52,60)
F	6,778	/	19,20	/
G	2,412	(1,75–3,02)	7,94	(6,08–13,38)
H	2,412	(1,75–3,02)	7,94	(6,08–13,38)
I	a	/	4,15	/
J	3,072	(2,14–5,89)	10,399	(6,85–41,25)
K	a	/	3,970	/
L	a	(-83,97–0,28)	2,595	(1,46–15,99)
M	6.502	(5.21 - 9.80)	14.96	(11.08-25.21)

a Les taux de mortalités après 24 h de traitement sont < 50 %.

D'autres enquêtes menées sur le même type d'HEs que nos mélanges actuels ont signalé l'efficacité insecticide et répulsive de celles-ci contre de nombreux insectes ravageurs de produits stockés (Giatropoulos *et al.*, 2013 ; Cetin et Gudek., 2020). La quasi-totalité de ces essais ont prouvé l'efficacité des HEs sélectionnées en une application individuelle, non en combinaison. Dans ce contexte, Sharifian *et al.* (2012) et Badreddine et Baouindi. (2016) ont démontré les effets insecticide et insectifuge de l'HE d'*A. herba-alba* contre les adultes de *T.*

castaneum, *C. maculatus*, *R. dominica* et *Trogoderma granarium*. De même, plusieurs enquêtes ont rapporté l'efficacité des HEs extraites de différentes espèces appartenant au même genre d'*Artemisia* à savoir : *A. maritima* Linn, *A. anethoides* et *A. dubia*, en profitant de leurs pouvoirs insecticide et répulsif comme agent de lutte biologique contre les adultes de *T. castaneum* (Brari et Thakur, 2017 ; Liang et al., 2017, 2018). Dans le même contexte, l'étude réalisée par Hashemi et Rostaefar (2014), a montré que l'HE de *Juniperus communis* a révélé un potentiel insecticide vis-à-vis des individus de *T. castaneum* et *R. dominica*. En outre, Mahmoudvand et al. (2011) ont révélé le pouvoir toxique par inhalation de l'HE de romarin contre les adultes de *T. castaneum*, *Sitophilus granarius*, *Callosobruchus maculatus* et *Plodia interpunctella*, confirmant ainsi les résultats obtenus par Sener et al. (2009) qui ont déjà recommandée la même HE comme une source potentielle d'insecticide botanique, respectueuse de l'environnement, pour le contrôle de *T. castaneum*. D'ailleurs, certains composés identifiés dans les HEs mentionnées en cette étude ont déjà exercé une efficacité directe contre de nombreux insectes, à savoir l' α -pinene et l'eucalyptol qui ont donné une forte toxicité suite à leur usage contre les adultes et les larves de *T. castaneum* et *T. confusum*, respectivement (Sener et al., 2009 ; Chaubey, 2012).

De nombreuses études antérieures ont confirmé les activités biologiques des HEs associées à d'autres molécules bioactives. Benelli et al. (2017) ont montré que le mélange d'HE de *Satureja montana* L avec l'HE d'*Aloysia citriodora* (1 :1) a présenté une toxicité larvicide extrêmement forte contre *Culex quinquefasciatus* avec une DL₅₀ de 18,3 μ l/l d'air. Alors que la combinaison des HEs de *Satureja montana* et *Pinus nigra* (1 :1) a eu un effet antagoniste envers les mêmes larves. Par ailleurs, Pandiyan et al. (2019) ont vérifié les toxicités indépendantes et synergique de mélanges binaires (1:1) des HEs de *Syzygium aromaticum* (Myrtacées), *Illicium verum* (Schisandracées) et *Trachyspermum ammi* (Apiaceae) contre les larves d'*Aedes aegypti*. Les résultats de mêmes auteurs ont indiqué que les HEs ont présenté une efficacité larvicide synergique contre les moustiques. Actuellement, certains bioinsecticides commerciaux contiennent des mélanges d'HEs dont Isman (2020) a mentionné EcotrolMT (10% d'HE de *R. officinalis*, 2% d'HE de *Mentha piperita* et 5% d'HE géraniol) ainsi que TetraCURB MT (50% d'HE de *R. officinalis*, 3 % d'HE de *Syzygium aromaticum* et 1,95 % d'HE de *Mentha piperita*).

D'autres études ont combiné certains terpènes entre eux. Selon Koul et al. (2013), l'association du thymol au linalol ou à l'eucalyptol améliore sa toxicité contre les larves de *Chilo partellus* Swinhoe, *Spodoptera litura* et *Helicoverpa armigera*. En complément

explicatif, l'efficacité de thymol combiné à l'anéthole contre *C. partellus* et *H. armigera*, a eu un effet antagoniste au moment où les deux ont démontré une interaction synergique envers *S. litura*. En addition aux détails, le carvacrol a été toujours antagoniste contre toutes les espèces avec toutes les combinaisons. Novato et al. (2015) ont évalué la toxicité du thymol couplée à celles du carvacrol et (E)-cinnamaldéhyde sur les larves de *Amblyomma sculptum* et *Dermacentor nitens*. Les résultats ont montré que seuls les mélanges de carvacrol au thymol (DL₅₀) et carvacrol au (E)-cinnamaldéhyde (1/4 DL₅₀) ont montré un effet synergique. Le mélange de carvacrol au thymol a montré davantage un effet synergique contre les larves de *D. nitens*, pendant que les autres combinaisons ont exprimé des effets additifs ou antagonistes.

Des études récentes ont démontré l'efficacité des HEs et des monoterpènes en association avec des insecticides de synthèse. Féroz (2020) a examiné la toxicité de la deltaméthrine ajoutée aux HEs de *Cymbopogon citratus* et *Cinnamomum camphora*, à la fois indépendamment ou combinées, contre deux populations résistantes de larves de *Trogoderma granuloma*. Ils ont signalé que tous les différents mélanges ont eu des effets synergiques contre les deux lots. A leur tour, Yuan et al. (2019) ont autant mélangé l'eucalyptol, trans-cinnamaldéhyde, et l'eugénol avec dimefluthrin contre une souche résistante de *Culex quinquefasciatus*. Dans l'ensemble, les échantillons les plus synergiques ont été l'eucalyptol + l'eugénol (9:1), l'eucalyptol + le trans-cinnamaldéhyde (1:1), et le trans-cinnamaldéhyde + l'eugénol (9:1) associé à la dimefluthrine (10:1). Ces résultats ont mis en évidence le potentiel prometteur de ces terpènes en tant que synergistes naturels afin d'améliorer l'efficacité de la dimefluthrine. De même, Brito et al. (2021) ont réduit la quantité recommandée d'insecticide de synthèse via l'utilisation du mélange des HEs de *Pimenta racemosa* et *Citrus sinensis* associées au chlorpyrifos, ce qui a créé une alternative intéressante pour contrôler *S. zeamais*. Cela indique que différentes espèces d'insectes peuvent répondre distinctement aux combinaisons d'HEs ou de leurs composants, de sorte qu'un effet observé sur un organisme ne peut pas être généralisé sur d'autres. Ces variations peuvent être attribuées aux méthodes d'analyse, aux concentrations utilisées d'HEs ainsi qu'à l'origine des substances (Novato et al., 2015).

Outre, Harris (2002) a expliqué que les combinaisons d'une HE sont difficiles à évaluer scientifiquement car il est rare de prouver que chaque composant biologique a activement contribué dans l'effet global de la préparation. Bien que certaines publications aient signalé l'effet synergique des HEs en tant qu'insecticides, le mécanisme de la synergie proprement dite ne soit pas souvent assez clair. Selon des rapports récents, l'efficacité des combinaisons

d'HEs en tant qu'insecticides peut être attribuée à leur teneur élevée en monoterpènes qui ont un fort potentiel de pénétration à travers la cuticule, les systèmes respiratoire et digestif des insectes (Lee et *al.*, 2004 ; Rozman et *al.*, 2007 ; Gnankiné et Bassolé, 2017 ; Brito et *al.*, 2021).

Selon d'autres recherches, l'effet synergique des mélanges d'HEs sur les insectes peut être lié à l'action mutuelle de leurs ingrédients majeurs et mineurs puisque certains de ceux-ci sont principaux ayant une capacité de faciliter l'absorption d'autres bioactifs mineurs (Tak et Isman, 2015, 2016, 2017a ; Messaoudi Moussii et *al.*, 2020). Cela a été prouvé dans d'autre étude, où l'eucalyptol, l'un des constituants majeurs du mélange de HEs, a augmenté la solubilité ainsi que la capacité d'étalement des insecticides de synthèse sur la couche lipidique de la cuticule de l'insecte en raison de sa propriété lipophile (Tak et Isman, 2015, 2017b ; Yuan et *al.*, 2019). De ce fait, on peut en déduire que l'eucalyptol a agi de la même manière sur *T. castaneum* dans cette étude. En outre, Yang et *al.* (2014) et Sheng et *al.* (2020) ont suggéré l'effet multi-cible comme un mode de synergie probable puisque les mélanges d'HEs contiennent plusieurs composés et montrent probablement une efficacité synergique en impliquant simultanément plusieurs sites cibles sur l'insecte. En effet, les HEs ont été rapportées comme des substances provoquant une perturbation physiologique générale qui cible différents sites du système nerveux central de *T. castaneum*, comme les récepteurs d'acide γ -aminobutyrique et d'acétylcholine qui agissent sur le système neuromusculaire provoquant une dérégulation de l'activité motrice de l'insecte (Tong et Manteaux, 2010 ; Waliwitiya et *al.*, 2010 ; Novato et *al.*, 2015 ; Sheng et *al.*, 2020 ; Isman, 2020), ainsi que les récepteurs de l'octopamine qui provoquent la rupture de la membrane cellulaire et compromettent la trachée (Isman et *al.*, 2007 ; Khanikor et *al.*, 2013 ; Yang et *al.*, 2014 ; Novato et *al.*, 2015 ; Jankowska et *al.*, 2018 ; Brito et *al.*, 2021). En outre, Féroz (2020) a montré que tous les mélanges d'HEs ont réduit de manière significative la viabilité des hémocytes, la prolifération cellulaire et l'activité de la déshydrogénase mitochondriale dans les populations résistantes des larves de *Trogoderma granarium*, au moment que l'activité lactate déshydrogénase a augmenté et celle phénoloxydase a diminué.

De plus, Arafa et *al.* (2020) a argumenté une corrélation directe entre l'action toxique du mélange de thymol et d'HE d'eucalyptus sur *Rhipicephalus annulatus* et l'inhibition des activités enzymatiques de l'acétylcholinestérase, de la glutathion peroxydase et de catalase, accompagnée d'une augmentation de la peroxydation lipidique. Ces observations nous amènent à déduire qu'un des modes de synergie entre les HEs est bien l'inhibition des enzymes

métaboliques de détoxification des insecticides sur *T. castaneum*, telles que les glutathion S-transférases, les monooxygénases du cytochrome P450 et les carboxylestérases (Tong et Bloomquist, 2013 ; Gross et *al.*, 2017 ; Norris et *al.*, 2018 ; Sheng et *al.*, 2020). Néanmoins, différents agents peuvent contrôler la même cible et donc coopérer de manière agoniste et synergique (Yang et *al.*, 2014). Les chercheurs ont précédemment suggéré que la rupture de la membrane a été le principal mécanisme d'action des monoterpènes, tels que l' α -pinène (Abraham et *al.*, 2003 ; Yuan et *al.*, 2019), l'un des principaux constituants de la plupart des mélanges utilisés en cette étude. De même, Jankowska et *al.* (2017) ainsi que Arafa et *al.* (2020) ont avancé que les groupes hydroxyles de ces molécules bioactives aient pu modifier la perméabilité des membranes cellulaires. Il est également à noter que lors des interactions entre les différents constituants d'HEs, l'effet antagoniste de certains échantillons est fortement lié à la formation de nouveaux produits chimiques biologiquement inactifs. Dans ce contexte, Novato et *al.* (2015) ont supposé que l'origine de l'effet antagoniste du (E)-cinnamaldéhyde (aldéhyde) associé au thymol et au carvacrol (alcool phénolique) a été la réaction de ces trois composés (formant un hémiacétal ou un acétal) qui sont biologiquement inertes en raison de l'absence d'un groupe fonctionnel actif (phénol et énone) dans les deux composés. D'autre part, l'antagonisme a été référé à la dilution des composés d'HEs les plus efficaces dans le mélange, donc au changement de leurs concentrations, par conséquent leur pouvoir (Hategekimana et Erler, 2020). Ceci a été confirmé également dans les travaux de Féroz (2020) qui a présumé que l'efficacité des combinaisons d'HEs a été attribuée à l'augmentation ou à la diminution de la quantité des ingrédients les plus puissants. Des études supplémentaires seraient donc nécessaires pour déterminer les substances actives dans les mélanges d'HEs qui ont un effet synergique en parallèle avec les mécanismes qui en résultent (Sheng et *al.*, 2020).

II.3. Effets répulsifs des HEs et leurs mélanges

La répulsion est le terme utilisé pour décrire le mouvement dirigé d'un organisme loin d'un stimulus. L'évaluation du comportement des insectes envers les HEs a révélé que tous les échantillons ont présenté une efficacité répulsive contre les adultes de *T. castaneum* (Fig. 27). Les résultats ont montré que parmi les trois HEs, celle d'*A. herba-alba* a réveillé la meilleure activité insectifuge à l'égard des individus de *T. castaneum* avec une valeur de PR de l'ordre de $80,00 \pm 10,00$ % à la plus faible concentration ($1,97 \text{ nl/cm}^2$), en temps qu'en les HEs de *J. Phoenicea* et *R. officinalis* ont eu un effet répulsif faible avec des valeurs de PR égal à $23,33 \pm 2,89$ et $25,00 \pm 8,66$ %, respectivement. Avec la concentration la plus élevée ($15,73 \text{ nl/cm}^2$), les HEs d'*A. herba-alba* et *J. phoenicea* ont montré un pouvoir répulsif proportionnellement très important ($PR = 100,00 \pm 0,00$ et $90,00 \pm 10,00$ %, respectivement), tandis que l'HE de *R. officinalis* a montré un effet modéré ($PR = 41,67 \pm 10,41$ %). Les analyses de Probit et de Logit ont mis en évidence le pouvoir répulsif de l'HE d'*A. herba-alba* qui a présenté une valeur de DR_{90} de l'ordre de $2,68 \text{ nl/cm}^2$. Cependant les HEs de *J. phoenicea* et *R. officinalis* ont enregistré une efficacité moins importante en termes de ce paramètre à savoir : $DR_{50} = 2,14$; $DR_{90} = 4,27$ et $DR_{50} = 4,90$; $DR_{90} = 10,58 \text{ nl/cm}^2$, respectivement.

Outre, les mélanges D, E et F ont montré des valeurs de PR respectives de 66,67, 53,33 et 88,33 % à la dose la plus faible ($1,97 \text{ nl/cm}^2$) où H et I ont contrairement montré l'efficacité la plus réduite soient des chiffres de 18,33 et 28,33 % obtenus respectivement. A la dose $15,73 \text{ nl/cm}^2$, les mélanges D, E et F ont été extrêmement répulsifs en enregistrant une valeur de PR de 100 %, alors que celles de H et I ont été de 65 et 93 %, respectivement. Bien que de nombreux mélanges aient montré des effets répulsifs puissants, ces résultats n'ont été pas statistiquement significatives ($P > 0,05$).

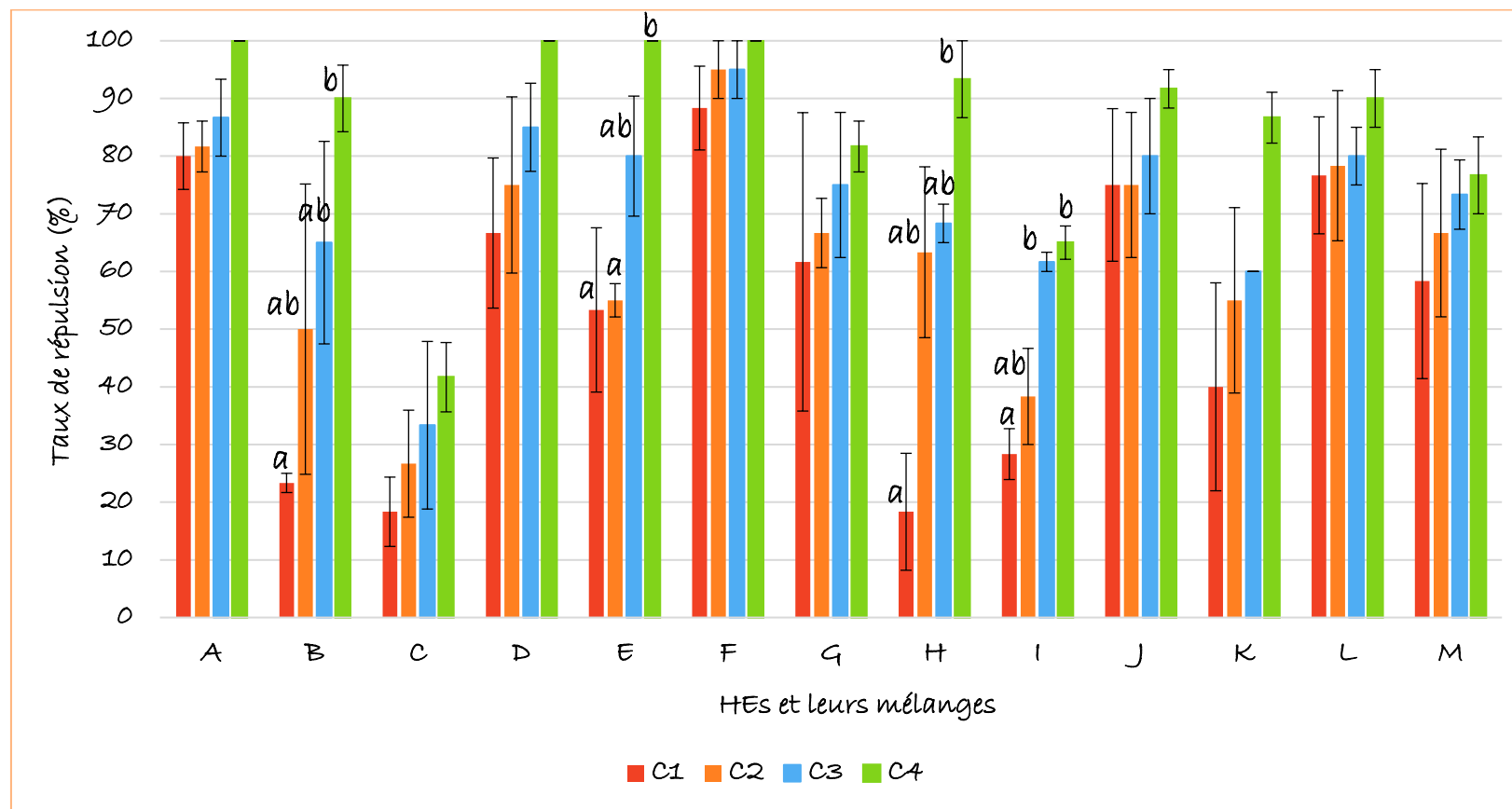


Figure 27 : Taux de répulsion (moyenne \pm ES) des adultes de *T. castaneum* après 30 min d'exposition à différentes concentrations (C) d'HEs et leurs mélanges. C1 = 1,97 nl/cm²; C2 = 3,93 nl/cm²; C3 = 7,86 nl/cm²; C4 = 15,73 nl/cm². Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les taux de répulsion ne sont pas significativement différents ($P > 0,05$), et vice versa.

Les valeurs des DR₅₀ et DR₉₀ ainsi que les FSs des mélanges étudiés sont affichées ci-dessous (**Tab. 08**). Les combinaisons L, J, F, G et M ont été extrêmement puissantes en tant que répulsifs ayant des PRs supérieurs à 50 %. Par conséquent, les valeurs de DR₅₀ n'ont été pas déterminées pour ces échantillons. Selon les valeurs de DR₉₀, la combinaison F avec une dose de 1,25 nl/cm² a présenté l'activité la plus répulsive, où le mélange M a affiché la plus faible (DR₉₀=7,26 nl/cm²). Sur la base des valeurs des FSs, la plupart des combinaisons binaires ont révélé des effets synergiques (FS > 1), à l'exception des combinaisons I et G, qui ont respectivement présenté des effets à la fois additifs (FS = 1) et antagonistes (FS > 1).

Tableau 08 : Les valeurs des DR₅₀ et DR₉₀ observées, DR₅₀ théoriques (nl/cm²), les limites inférieures et supérieures des DR₅₀ et les DR₉₀ à 95 %, les facteurs synergiques (SF) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons contre les adultes de *T. castaneum*.

HEs et leurs combinaisons	DR ₅₀ Observée (nl/cm ²)	Limites inférieures et supérieures des DR ₅₀ à 95% (nl/cm ²)	DR ₉₀ Observée (nl/cm ²)	Limites inférieures et supérieures des DCR ₉₀ à 95% (nl/cm ²)	DR ₉₀ Théorique (nl/cm ²) b	Facteur de synergie (FS) c
<i>A</i>	a	/	2,68	(1,74-10,52)	/	/
<i>B</i>	2,14	(0,70-3,06)	4,27	(3,25-10,23)	/	/
<i>C</i>	4,899	/	10,58	/	/	/
<i>D</i>	0,37	/	3,00	(2,10-12,55)	3,23	1,08
<i>E</i>	1,27	(-0,46-1,90)	3,46	(2,73-5,92)	4,34	1,26
<i>F</i>	a	/	1,25	/	3,78	3,04
<i>G</i>	a	/	5,95	/	4,65	0,78
<i>H</i>	1,98	(1,21-2,54)	3,83	(3,10-5,96)	8,60	2,25
<i>I</i>	2,63	(2,17-3,14)	6,54	(5,32-9,34)	6,63	1,0
<i>J</i>	a	/	4,55	/	5,85	1,28
<i>K</i>	1,77	/	4,96	(3,63-5,77)	9,00	1,82
<i>L</i>	a	/	5,02	/	7,42	1,48
<i>M</i>	a	/	7,26	/	5,78	0.80

a DR₅₀ < 0;

b DR₅₀ théorique = [(Proportion de l'HE1 x DR₅₀ de l'HE1) + (Proportion d'HE1 x DR₅₀ d'HE2) ...] ;

c FS = (DR₅₀ théorique)/(DR 50 observée) ; FS = 1 (additif). <1 (Antagoniste). >1 (Synergique) (Feroz, 2020).

Aussi bien pour les faibles concentrations, Noosidum et *al.* (2014) ont constaté que des combinaisons binaires d'HEs isolées de *Litsea cubeba*, *Litsea salicifolia* et *Melaleuca leucadendron* ont induit une forte irritation en contact avec une répulsion sans contact contre des individus du moustique tropical de la fièvre jaune *Ae. aegypti*. Le même insecte s'est révélé sensible aux combinaisons binaires des HEs de *Cinnamomum cassia*, *Cymbopogon citratus* et *R. officinalis* qui ont présenté une efficacité répulsive améliorée par rapport à celle de leurs combinaisons ternaires et sans combinaison (Pêche et *al.*, 2019). Des résultats similaires obtenus par Hategekimana et Erler (2020) qui ont révélé que tous les mélanges binaires (1:1) et ternaires (1:1:1) des essences de *Pimpinella anisum*, *Eucalyptus camaldulensis* et *Mentha piperita* et/ ou leurs principaux composants (trans-anéthole, eucalyptol et L-menthol, respectivement) ont amélioré le potentiel répulsif des HEs contre *Sitophilus oryzae* en générant des composés majeurs efficaces, en sus. Dans ce contexte, Arafa et *al.* (2020) ont également dévoilé l'importance de la combinaison en prouvant que les mélanges d'HE d'eucalyptus et le thymol ont eu des activités ovicides et répulsives plus importantes contre des individus phénotypiquement résistants de *Rhipicephalus annulatus* par rapport au thymol appliqué seul.

En fait, les HEs sont des mélanges complexes de composés organiques volatils provenant de plantes dont les poils sensoriels des antennes insectes peuvent en détecter en entraînant diverses réponses comportementales (Abd El-Ghany et Abd El-Aziz, 2017 ; Romani et *al.*, 2019 ; Brito et *al.*, 2021) tel que l'effet répulsif rapporté dans la présente étude. Ce comportement a été la conséquence des interactions des monoterpénoïdes, sesquiterpènes et alcools avec les récepteurs olfactifs des insectes (Sathantriphop et *al.*, 2015 ; Arafa et *al.*, 2020). Ces constatations ont été prouvées par Schiebe et *al.* (2019) qui ont mesuré la sensibilité olfactive de *Sitophilus oryzae* à une gamme de terpènes en utilisant la détection électroantennographique (EAG). L' α -pinène, le 4-thujanol, le β -pinène, le 3-carene, le myrcène, l'eucalyptol et le camphre ont été parmi les terpènes qui ont suscité les réponses olfactives les plus élevées dont certains ont été détectés comme des composés majoritaires dans nos échantillons. Cependant, certains composés n'ont présenté aucun effet, tel que le (\pm)-sabinen. Ceci explique la raison pour laquelle le même insecte peut répondre distinctement aux HEs ou à leurs constituants. Ces résultats coïncident exactement ceux obtenus des effets répulsifs des mélanges utilisés dans cette étude.

Néanmoins, Bruce et *al.* (2005) et Badji et *al.* (2021) ont noté que la détection de composants végétaux ou de phéromones via les récepteurs olfactifs des insectes phytophages ne s'impliquent pas qu'avec des signaux jouant un rôle important dans les réactions d'attraction ou de répulsion. Ces avancés ont été confirmées dans un test comportemental (en utilisant l'EAG) rapporté par Badji et *al.* (2021) où le caryophyllène, malgré son effet répulsif

faible, a été détecté chez *Tribolium confusum* aussi bien comme l'anéthole qui a un effet répulsif très important. De même, Hieu et al. (2014) ont constaté que le limonène, le nérol et le citronellol ont induit différentes réponses EAG chez les mouches stables, avec une faible répulsion.

En somme, nos données soutiennent la théorie qui déploie que les cibles moléculaires de l'effet par inhalation sont différentes de celles de l'effet répulsif et c'est bien la raison de différentes réponses engendrées par les adultes de *T. castaneum* au même échantillon. Par exemple, la combinaison F a été à la fois un insectifuge très efficace et un insecticide de faible pouvoir. Une autre découverte importante prévoit que la convergence des compositions chimiques de certains échantillons a conduit à des activités biologiques très similaires, le cas observé pour les mélanges K et L de notre étude. De son côté, le mélange H a présenté un effet insectifuge puissant par rapport à l'HEs de romarin, bien qu'ils les deux appartiennent au même groupe hiérarchique (G3) et referment les mêmes composés majoritaires (α -pinène, camphre et eucalyptol). Cette incohérence fait référer d'une part à l'interaction de tous les composants chimiques de l'échantillon ainsi qu'à la physiologie et le comportement de l'insecte d'autre part (Benelli et al., 2017). Par conséquent, l'efficacité des combinaisons en tant qu'insecticides ou répulsifs a été contrôlée par des paramètres spécifiques, à titre d'exemple les proportions variables des mélanges G, H et I qui se composent des HEs d'*A. herba-alba* et *J. phoenicea*. Suite aux traitements par inhalation, le mélange G a été modérément toxique et antagoniste, tandis que ceux de H et I ont dévoilé une toxicité extrêmement élevée envers *T. castaneum* avec des évidences d'une interaction synergique. De telles observations ont été attendues, car Feng et al. (2020) ont évalué la toxicité par contact de mélanges binaires de camphène et de bornyl acétate à différents rapports, contre le même insecte, dont trois mélanges ont été antagonistes (1:1, 1:3.5 et 1:4.4) contre un additif (3.5:1) et un autre synergique (4.4:1). Katik et al. (2017) ont testé l'activité anthelminthique de certains monoterpènes mixés dans des associations binaires, ternaires et quaternaires en rapportant que les combinaisons binaires ont été les plus efficaces. Loin des bioinsecticides, dans la médecine traditionnelle chinoise, l'utilisation de mélanges d'herbes à base d'*Astragalus Radix* et *Rehmanniae Radix*, dans un rapport de 2:1, a pu diminuer la surface des plaies diabétiques chez un groupe de rats par rapport à ceux traités avec chaque plante toxique en individuelle (Rotenberg et al., 1991). Ces résultats indiquent que les quantités d'HE dans chaque combinaison peuvent influencer leur potentiel ainsi que le type d'interaction induite (synergie, antagonisme ou additivité) entre leurs composants. De ce fait, nos résultats servent à la sélection du meilleur rapport de mélange

afin de préparer des formulations insecticides et insectifuges dans des investigations ultérieures.

II.4. Corrélation entre les activités biologiques des HEs et leurs mélanges avec les composés majoritaires

Une analyse de corrélation a été effectuée pour déterminer la relation entre les activités biologiques (insecticides et répulsives) ainsi que la quantité (%) des cinq principaux composants de chaque échantillon à différentes concentrations (**Tab. 09**). Dans l'ensemble, les activités biologiques étudiées n'a pas figurée dépendantes des principaux ingrédients (Coef $r < 0,5$), à l'exception de quelques cas à certaines concentrations où les deux effets biologiques ont augmenté en présence de composés particuliers (Coef $r > 0,5$), notamment : 1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene, 4-Thujanol, camphor, camphene et endo-Borneol en effet insecticide, ainsi que 1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol et 2,6,6-trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7 en effet répulsif. En revanche, le sabinen a réduit les taux de mortalités chez les insectes (Coef $r > -0,5$) à 166,67 et 333,33 $\mu\text{l/l}$ d'air. A leur tour, le camphène et le terpinéol ont exercé un effet répulsif minime (Coef $r > -0,5$). Les résultats de l'analyse de corrélation obtenus par Hategekimana et Erler (2020), ont également démontré que les composants mineurs des HEs ont eu une importance significative dans la régulation de l'efficacité répulsive, soulignant l'importance de la complexité de la composition chimique des HEs dans l'expression de la répulsion. De la même manière, Feng et *al.* (2020) ont souligné que ces constituants mineurs ont pu jouer un rôle crucial dans la toxicité en contact de *T. castaneum*.

Tableau 09 : Corrélations (coefficient de corrélation rho de Spearman) des activités insecticide et répulsif avec les taux des cinq principaux composés de chaque d'HE et de leurs mélanges.

Composés		C1f	C2f	C3f	C4f	C1r	C2r	C3r	C4r
Acétate de néoisothujyle	C1	0,11	-0,52	-0,19	-0,10	-0,06	-0,13	0,07	0,07
(3E.6E)-Nona-3.6-diényl 2.2.3.3.4.4.4-he α -	C2	-0,19	0,08	-0,12	-0,28	0,08	0,04	0	-0,24
Pinène	C3	-0,08	-0,25	-0,14	0,25	-0,22	-0,27	-0,34	-0,21
Acétate d' α -terpinyle	C4	-0,35	-0,24	-0,08	0,03	0,23	0,2	0,13	0,16
1-(2-éthyl-3-cyclohexényl)éthanol	C5	-0,43	-0,21	-0,10	-0,36	0,60*	0,57*	0,78**	0,80**
1,6-diméthylhepta-1,3,5-triène	C6	0,58*	0,24	0,18	0,12	-0,08	-0,05	-0,11	-0,32
2.6.6-Triméthylbicyclo[3.2.0]hept-2-ène-7	C7	-0,13	-0,19	0,04	-0,12	0,46	0,56*	0,69**	0,70**
3,5-heptadiène-2-ol. 2,6-diméthyl-3-	C8	0,25	0,07	0,12	-0,28	-0,02	0,07	0,19	0,12
Carène	C9	-0,21	-0,48	-0,10	-0,13	0,28	0,13	0,23	0,25
Voiture-3-en-5-a	C10	0,03	0	-0,06	-0,35	0,27	0,28	0,41	0,27
5,5-diméthyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane 4-	C11	-0,28	-0,37	-0,46	-0,07	-0,09	-0,11	-0,08	0,02
Thujanol	C12	0,3	0,31	0,61*	0,60*	0,08	0,08	-0,22	-0,30
Camphre	C13	0,43	0,70**	0,45	0,46	-0,39	-0,28	-0,55	-0,55
Sabine	C14	-0,48	-0,54	-0,59*	-0,57*	0,3	0,22	0,49	0,51
Camphène	C15	0,43	0,67*	0,43	0,43	-0,38	-0,30	-0,61*	-0,64*
endo-Borneol	C16	0,1	0,69**	0,13	0,13	-0,19	-0,11	-0,26	-0,25
Eucalyptol	C17	0,19	0,38	-0,12	-0,04	-0,45	-0,35	-0,34	-0,31
exo-2.7.7-triméthylbicyclo[2.2.1]heptan-	C18	-0,19	-0,23	0,19	-0,12	0,05	0,46	0,47	0,35
Terpinéol	C19	0,4	0,49	0,27	0,5	-0,55	-0,50	-	-
Thujone	C20	0,46	0,1	0,22	0,04	-0,05	0,1	0,2	0,25

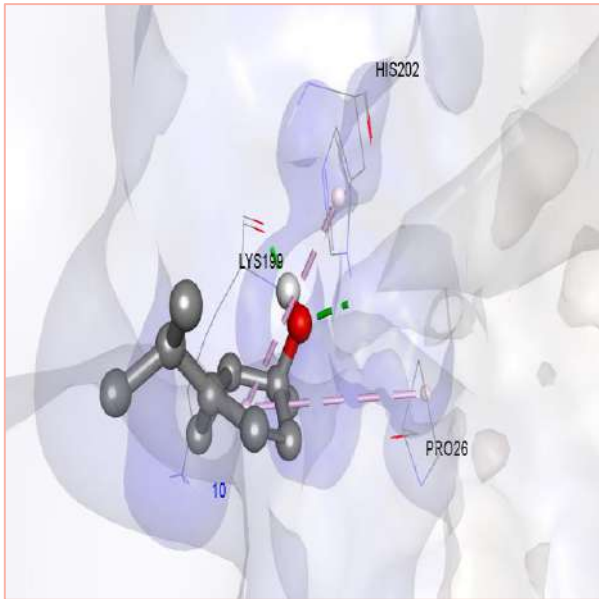
* et ** la corrélation est significative (bilatérale) au niveau de 5% ou 1%, respectivement ; rS positif : les effets insecticide et répulsif augmentent en présence de composé ; rS négatif : les deux effets diminuent en présence du composé. C1f = 41,67 μ l/l d'air ; C2f = 83,33 μ l/l d'air ; C3f = 166,67 μ l/l d'air ; C4f = 333,33 μ l/l d'air ; C1r = 7,86 nl/cm² ; C2r = 15,73 nl/cm² ; C3r = 31,45 nl/cm² ; C4r = 62,91 nl/cm².

II.5. Effet inhibiteur des composants d'HEs et leurs mélanges vis-à-vis l'AANAT de *T. castaneum*

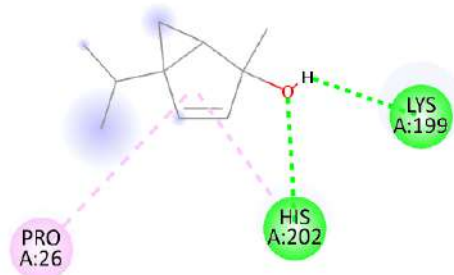
Les valeurs des énergies libres de liaison (ΔG) de toutes les molécules ont été dans la même gamme (Tab. 10). D'une part, la molécule Cadina-1(6),4-diene a donné le meilleur score de -5.0 kcal/mol avec la formation d'une liaison de type pi-sigma avec l'acide aminé histidine 202. D'autre part, elle a formé des liaisons pi-alkyl avec les acides aminés phénylalanine 166, proline 26 et alanine 29. Concernant les autres composés, les complexes enzyme-ligand obtenus ont été stabilisés par des liaisons hydrogène, pi-sigma, pi-alkyl et Van der Waals (Fig. 28).

Tableau 10 : Energies de liaisons entre chaque ligand et l'enzyme AANAT de *T. castaneum*

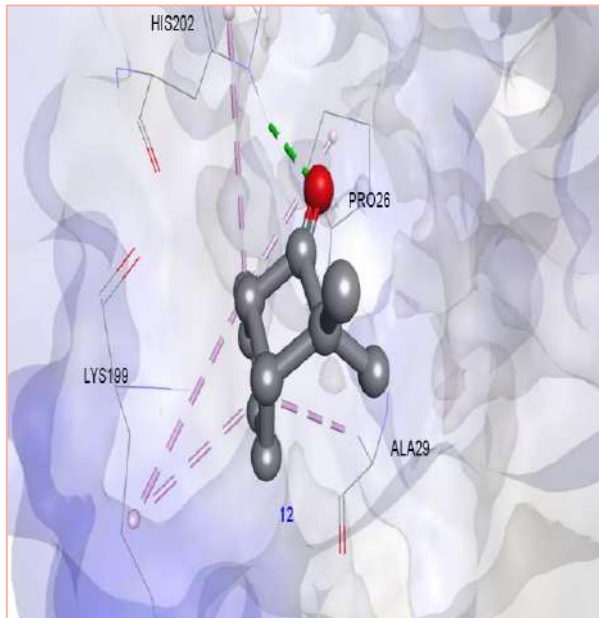
Nom de composé	α -Pinene	Camphene	β -Myrcene	β -Pinene
ΔG (kcal/mol)	-4,2	-4,0	-4,3	-4,2
Nom de composé	4-Thujanol **	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	Filifolone	Thujone
ΔG (kcal/mol)	-4,2	-4,2	-4,3	-4,1
Nom de composé	Terpineol	D-Verbenone	α -Terpinyl acetate	Car-3-en-5-one
ΔG (kcal/mol)	-4,4	-4,4	-4,6	-4,2
Nom de composé	5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	3-Carene	Eucalyptol	Sabinen
ΔG (kcal/mol)	-3,9	-4,0	-4,1	-4,0
Nom de composé	3,3-Dimethyl-6-methylenecyclohexene	pinocavrone	(-)-Camphor	Borneol
ΔG (kcal/mol)	-4,2	-4,6	-4,3	-4,5
Nom de composé	Cadina-1(6),4-diene	β -Germacrene	2-Pentadecen-4-yne, (Z)-	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl
ΔG (kcal/mol)	-5,0	-4,9	-3,5	-4,3



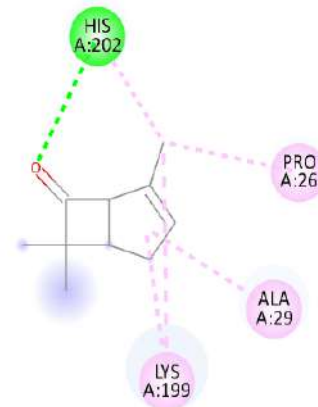
4-Thujanol



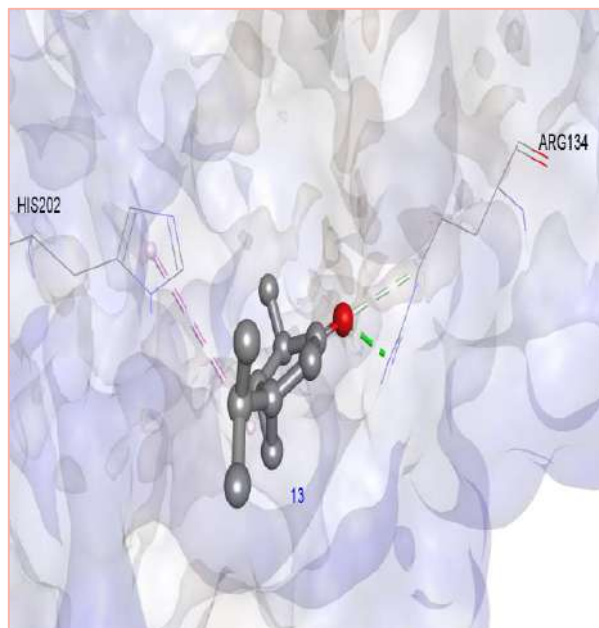
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Alkyl
 Pi-Alkyl



Filifolone



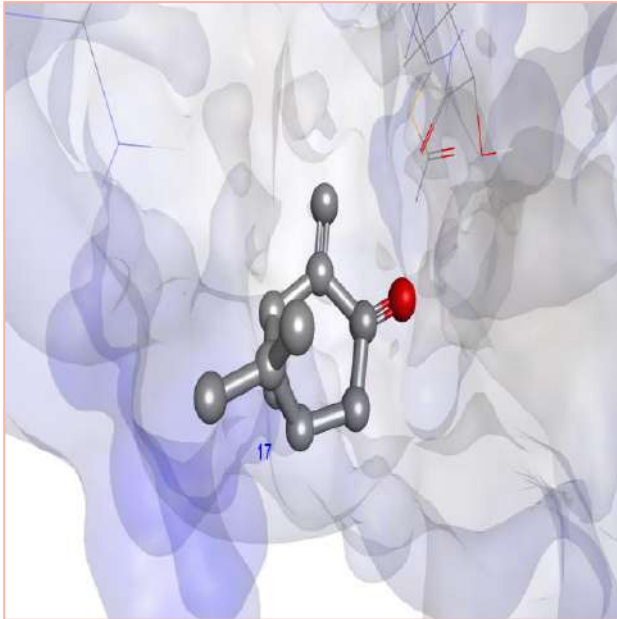
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Alkyl
 Pi-Alkyl



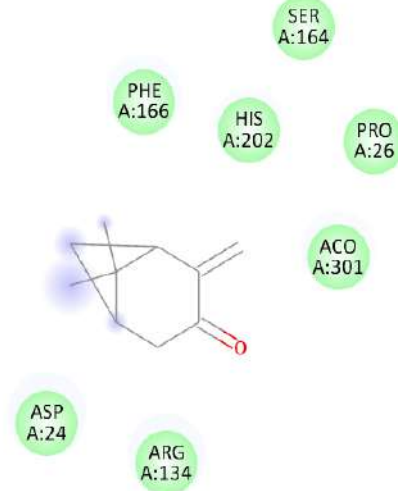
Thujone



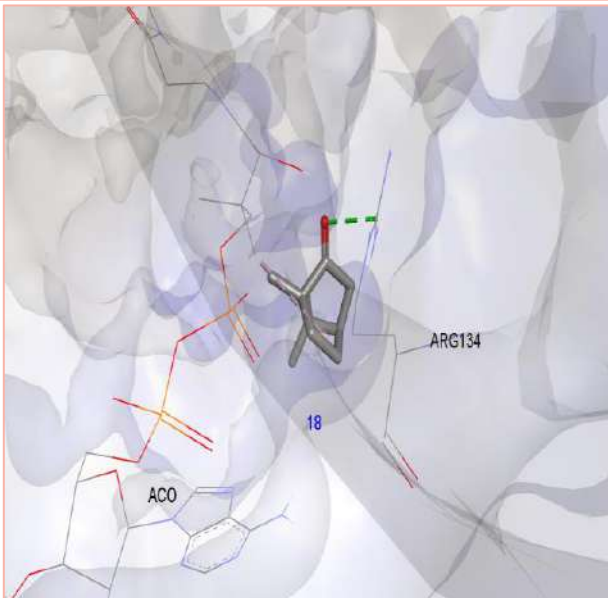
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Carbon Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl



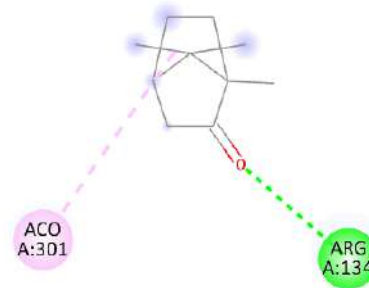
pinocavrone



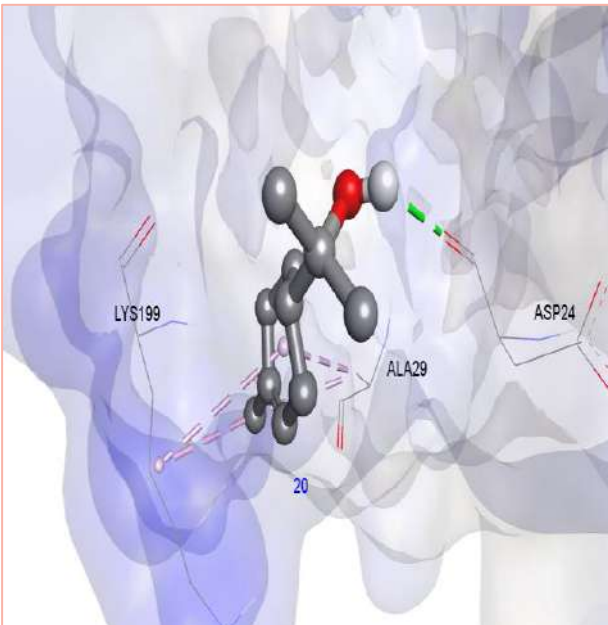
Interactions
■ van der Waals



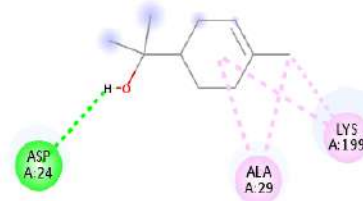
(-)-Camphor



Interactions
■ Conventional Hydrogen Bond ■ Alkyl



Terpineol



Interactions
■ Conventional Hydrogen Bond ■ Alkyl

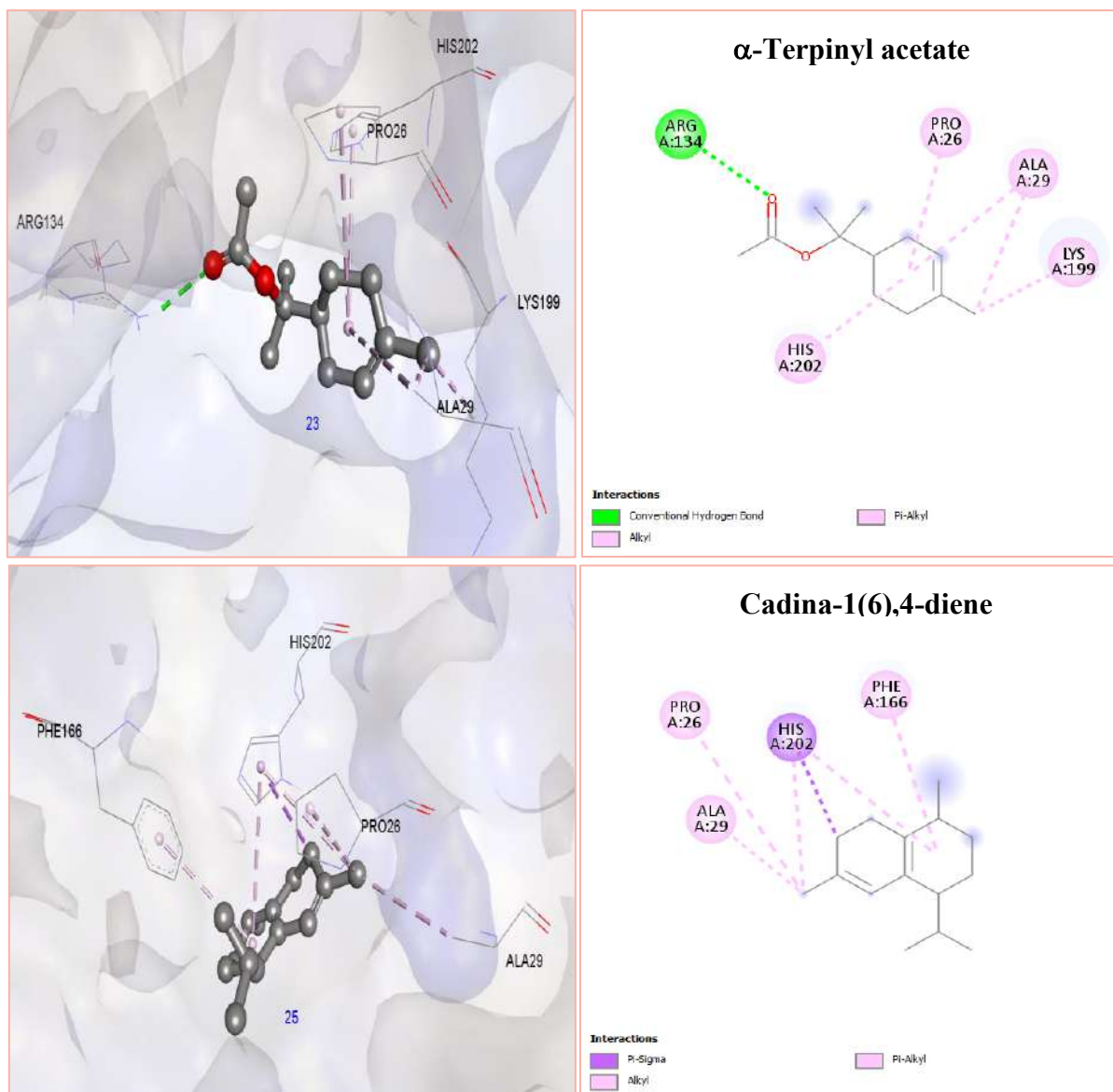


Figure 28 : Interactions intermoléculaires en 3D (à gauche), représenté en 2D (à droite), obtenues par docking moléculaire entre l’enzyme AANAT de *T. castaneum* (6V3T.pdb) et 08 molécules sélectionnées. (Discovery studio, 2021).

Vue que sa structure cristalline a été récemment déterminé par O’Flynn et *al.*, (2020), des études *In vivo*, *In vitro* et *In silico* sont en cours de réalisation pour mieux comprendre la cinétique enzymatique d’AANAT de *T. castaneum*, ainsi le développement des inhibiteurs d’origine synthétique ou botanique sera plus accessible. Au meilleur de nos connaissances, cette étude est la première qui vise le pouvoir inhibiteur des terpènes vis-à-vis l’AANAT des insectes en générale, et de *T. castaneum* en particulier. En outre, des études *In vitro* ont indiqué que les composants d’HEs produisent des effets inhibiteurs vis-à-vis de plusieurs enzymes d’insectes, qui est un processus interprété par docking moléculaire (De Sena Filho

et *al.*, 2022). Dans ce cadre, Andrade-Ochoa et *al.* (2018) ont évalué l'effet larvicide de 50 constituants d'HEs incluant des terpènes, des terpénoïdes et des molécules de phénylpropanoïdes contre *Culex quinquefasciatus*. Ces auteurs ont ensuite fait un docking moléculaire dans le but de déterminer les mécanismes d'action possibles de ces composés sur la protéine porteuse de stérol-2 (SCP-2) comme cible. Les résultats ont montré que les monoterpènes et les monoterpénoïdes ayant l'activité larvicide la plus élevée ont été également les composés ayant de meilleures valeurs énergétiques de liaison dont le carvacrol a été le plus actif suivi de α -terpinène et de terpinolène. Une telle efficacité a été donc attribuée à la présence des groupes hydroxyles et phénoliques dans les composés d'HEs, entre autres, le groupe hydroxyle du thymol et du menthol qui se sont présentés capable de former des liaisons hydrogènes avec les groupes amines des résidus aminoacides, ayant davantage une position pertinente dans le groupe phénolique. De Sena Filho et *al.* (2022) ont également examiné le mode d'action de 27 monoterpènes de la famille des Lamiacées (même famille de *R. officinalis*) sur l'acétylcholinestérase de *Drosophila melanogaster*, en déclarant que les monoterpénoïdes qui possèdent des groupes méthyliques (le carvacrol, le linalol, le α -terpineol, l'acétate de bornyle et le terpine-4-ol) ont été fortement liés à au site actif de cette enzyme avec des valeurs de ΔG allant jusqu'à -40 kcal/mol. A la fin de leur investigation, ces chercheurs ont recommandé la biosynthèse du terpène, par conséquent, le potentiel de production biotechnologique des monoterpènes bioactifs serait amélioré, offrant des alternatives durables aux pesticides synthétiques. En sus, ils ont suggéré de d'approfondir les recherches en appliquant à la fois des monoterpènes isolés puis en combinaison pour évaluer la synergie ainsi que l'antagonisme afin de repérer la meilleure combinaison au développement de nouveaux pesticides efficaces.

Il fait intéressant à noter que chaque isoforme caractérisée d'AANAT sur les différents organismes a indiqué la présence d'une diversité relativement interspécifique. Ceci résulte donc un fort potentiel de sélectivité des insecticides d'où il est enfin possible d'élaborer des composés appartenant à une famille d'insectes (diptères ou des coléoptères) ayant des AANATs spécifiques. De ce fait, les insectes utiles non ciblés, tels que les abeilles, seraient protégés (O'Flynn et *al.*, 2018 ; O'Flynn et *al.*, 2020)

En somme, les résultats obtenus dans la présente recherche ne constituent qu'une initiation concernant l'efficacité inhibitrice des composés d'HEs ainsi que leurs mélanges contre l'AANAT de *T. castaneum* et d'autres tests *In vitro* et *In vivo* semblent être nécessaires pour confirmer nos données.

II.6. Toxicité des HEs et leurs mélanges contre les larves d'*A. salina*

Après 24 heures de traitement des larves d'*A. salina* par les HEs ainsi que leurs mélanges, les résultats ont montré que tous les traitements à différentes concentrations ont été toxiques contre cet organisme par différents niveaux (**Fig. 29**). Alors qu'aucune mortalité n'a été observée dans le témoin négatif.

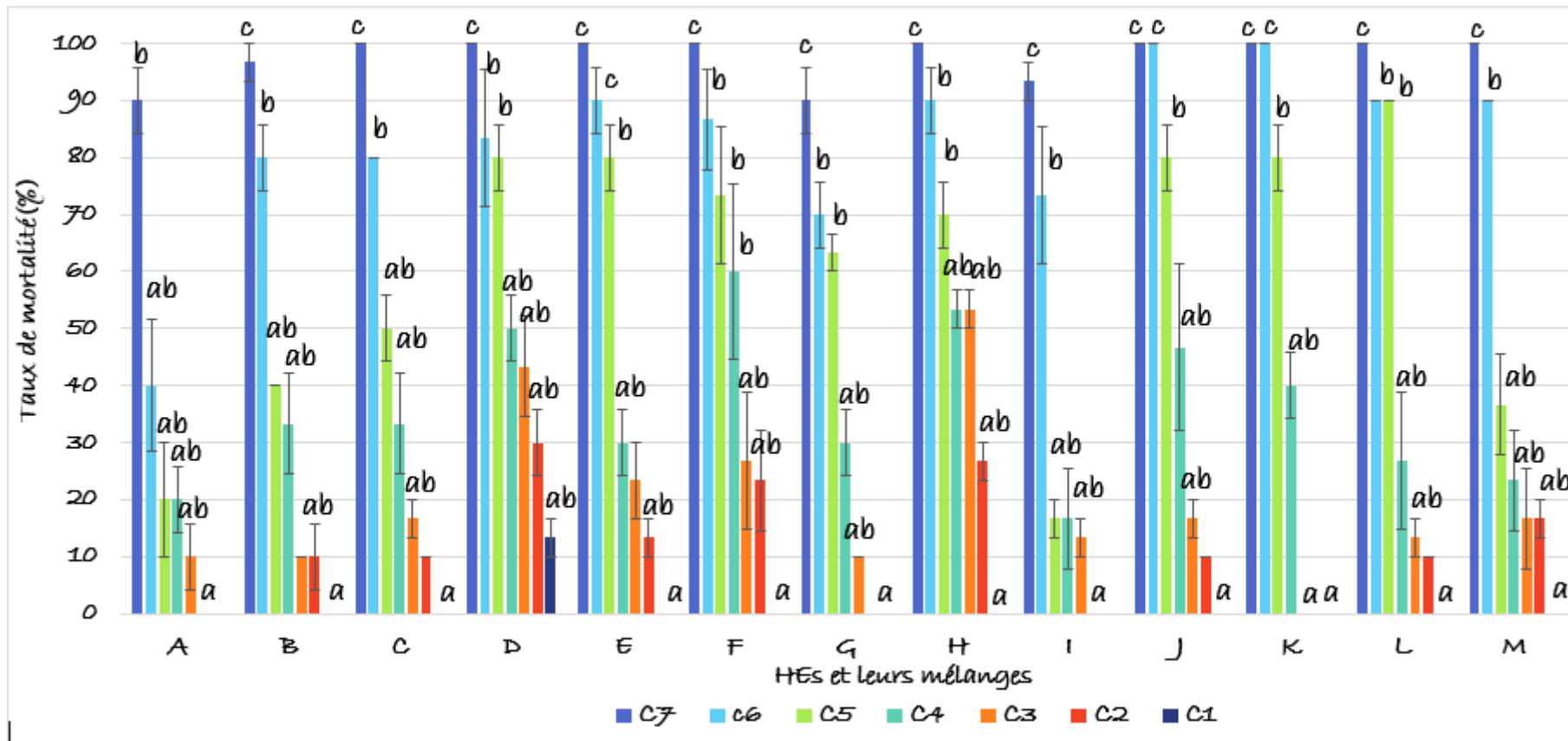


Figure 29 : Taux de mortalité (moyenne \pm ES) des larves d'*A. salina* après 24h de traitement par différentes concentrations (C) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs mélanges. C7 = 200 mg/l ; C6 = 5 mg/l ; C4 = 2,5 mg/l ; C3 = 1,25 mg/l ; C2 = 0.625 mg/l ; C1 = 0.312 mg/l. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), et vice versa.

Ensuite, les valeurs de DL₅₀ déterminées par Probit ou Logit (**Tab. 11**) ont confirmé que l'huile de romarin est la plus toxique (38,6 mg/l) vis-à-vis les larves d'*A. salina*, par rapport à celles de genévrier et d'armoise qui ont présenté des chiffres de 44,71 et 89,53 mg/l, respectivement.

En outre, les mélanges D et H ont figuré fortement toxiques contre l'organisme aquatique suite à l'enregistrement des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 16,81 et 18,05 mg/l, respectivement. Tandis qu'une efficacité moins importante a été signalée dans le cas des échantillons J, E, L et K, avec des valeurs de DL₅₀ allant de 24,42 jusqu'à 30,76 mg/l, contrairement aux combinaisons M, G et I qui ont montré une toxicité relativement faible, avec des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 40,58, 46,73 et 66,65 mg/l, respectivement.

En outre, une augmentation considérable de la toxicité vis-à-vis des larves d'*A. salina* a été observée en appliquant les combinaisons des HEs. Les valeurs des FSs ont clairement démontré que tous les mélanges ont été synergistes les uns aux autres à l'exception de la préparation I qui se présente antagoniste. Dans ce contexte, les échantillons D et F ont été les plus synergistes de fait que les valeurs des FSs ont respectivement atteint 4,66 et 3,11 ce qui a induit une réduction considérable des doses de chacun (D=5,33 et F=4.96). En revanche, l'échantillon K a montré l'effet synergique le plus faible (FS = 1,3 et IRD =1,45).

Chapitre II : Résultats et discussions

Tableau 11 : Valeurs des DL₅₀ et DL₉₀ observées et celles des DL₅₀ théoriques (mg/l), ainsi que les limites inférieures et supérieures des DL₅₀ et des DL₉₀ à 95 % ; facteurs synergiques (SF) et indices de réduction de dose (IRD) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons à l'égard des larves d'*A. salina*.

HEs et leurs mélanges	DL ₅₀ observée (mg/L)	Limites inférieures et supérieures des DL ₅₀ à 95% (mg/L)	DL ₉₀ observée (mg/L)	Limites inférieures et supérieures des DL ₉₀ à 95% (mg/L)	DL ₅₀ théorique (mg/L) a	SF b	IRD c
A	89,53	(65,43-133,25)	375,55	(221,8-1033,44)	/	/	/
B	44,71	(35,08-57,77)	179,86	(124,12-319,12)	/	/	/
C	38,6	(32,24-46,46)	153,86	(115,96-226,83)	/	/	/
D	16,81	(11,89-23,18)	121,01	(74,02-270,51)	78,33	4,66	5,33
E	27,48	(22,14-34,15)	93,29	(68,9-145,77)	55,92	2,03	3,26
F	21,6	(14,97-30,93)	95,47	(59,28-224,47)	67,12	3,11	4,14
G	46,73	(39,1-56,26)	176,28	(132,91-260,83)	76,8	1,64	1,92
H	18,05	(13,78-23,38)	95,66	(65,05-171,09)	51,33	2,84	4,96
I	66,65	(50,78-90,13)	219,24	(146,94-445,22)	64,07	0,96	0,58
J	24,42	(20,61-28,94)	64,55	(51,24-89,54)	43,18	1,77	1,83
K	30,76	(27,99-33,83)	55,01	(48,36-65,52)	40,13	1,3	1,45
L	28,75	(23,54-35,15)	78,98	(60,38-117,95)	41,66	1,45	1,56
M	40,58	(29-58,05)	165,51	(103,13-389,65)	57,04	1,41	2,21

a DL50 théorique = [(Proportion de l'HE1 x DL50 de l'HE1) + (Proportion d'HE1 x DL50 d'HE2)]

b FS = (DL50 théorique)/(DL 50 observée) ; FS = 1 (additif). <1 (Antagoniste). >1 (Synergique) (Feroz, 2020).

c L'**IRD** est une mesure de l'étendue de la réduction de la dose d'un toxique spécifique à une combinaison synergique, il a été calculé par la formule suivante : **IRD = Dx1/D1** (Chou, 2010). Dx1 indique **DL₅₀** d'une des HEs incluses dans le mélange ; tandis que D1 est la **DL₅₀** de la combinaison synergique qui contient ces HEs. IRD= 1 (pas de réduction de dose) ; IRD <1 (Réduction de dose défavorable) ; IRD >1 (Réduction de dose favorable).

Les IRDs pour les échantillons D E, F, G, H, et M ont été calculés correspondent à la **DL₅₀** de l'HE d'*A. herba-alba*

Les IRDs pour le reste des échantillons ont été calculés correspondent à la **DL₅₀** de l'HE de *J. phoenicea*.

Ramos et al. (2009) a classé la toxicité d'une HE selon son DL₅₀ à savoir : toxique (≤ 80 mg/l), modérément toxique (80 et 250 mg/l) et non toxique/ légèrement toxique (≥ 250 mg/l). En prenant en considération ces données, tous les échantillons testés dans la présente étude ont été considérés très toxiques pour les larves d'*A. salina*, à l'exception de celui d'*A. herba-alba* qui a été modérément toxique.

Jusqu'à présent, peu d'informations sont disponibles concernant l'écotoxicité des HEs extraites des trois plantes étudiées contre les micro-crustacés en générale et l'*A. salina* en particulier. Cependant, il a été constaté récemment que les HEs de *R. officinalis*, *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Ocimum basilicum*, *Lavandula spica*, *Zingiber officinale*, *Salvia sclarea*, *Juniperus virginiana* et *Mentha piperita* n'ont aucune toxicité à l'égard des larves d'*A. salina* à une concentration de 1000 mg/l, tandis que la même concentration de dichromate de potassium s'est révélée mortelle en enregistrant un taux de 99.95 (± 0.03) % de toute la population (Leigh-de Rapper et al., 2021). D'après l'enquête menée par Ivănescu et al. (2021), les biopesticides dérivés du genre *Artemisia* ont été les plus susceptibles d'avoir une certaine toxicité pour les organismes non cibles, par conséquent, des études ultérieures s'avèrent nécessaires pour évaluer le risque sur les écosystèmes naturels et agricoles afin d'assurer son utilisation sûre. A leur tour, Ferraz et al. (2022) ont déclaré que les HEs ont eu tendance à avoir des effets toxiques, contre plusieurs espèces de crustacées, à des concentrations plus faibles par rapports aux extraits de plantes en comparant les valeurs de DL₅₀ enregistrées après 24, 48, 72 et 96 h.

Leigh-de Rapper et al., (2021) ont également évalué la toxicité de 49 HEs et 369 combinaisons binaires préparées à partir de ces HEs, contre l'*A. salina*. Après 48h de traitement, les auteurs ont rapporté qu'environ 31,0 % des combinaisons étudiées ont démontré des effets non toxiques aux individus, bien que le reste des combinaisons (69%) a été toxique. Ces données confirment nos constatations concernant le potentiel toxique des HEs une fois leurs métabolites ont été combinés. D'après les mêmes chercheurs, il semble que cet organisme aquatique répond distinctement à différentes combinaisons d'HEs extraites des plantes appartenant à diverses familles botaniques.

Outre, certaines combinaisons ont présenté un effet antagoniste et non toxique ce qui induit une diminution du potentiel toxique des HEs en individuelle, par exemple les HEs de *Syzygium caryophylla* (clou de girofle) et *Cymbopogon citratus* (citronnelle) ont donné des mortalités de l'ordre de 99.57 (± 0.74) et 100 (± 0.00) en individuelle, respectivement, alors

que leur mélange binaire (1 :1) a donné une mortalité égale à 2.30 (± 1.24). Pareillement, les combinaisons des HE de *Syzygium caryophylla* avec celles de *Thymus vulgaris* (thym) d'une part, et *Cinnamomum zeylanicum* (cannelle) d'autre part, ont été antagonistes et non toxiques. En revanche, certaines combinaisons ont montré une interaction synergique mais avec un effet non toxique, le cas de celles de *Ferula galbaniflua* et *Zingiber officinale* avec celle de *Laurus nobilis* et d'*Eucalyptus globulus*. D'autres mélanges ont été à la fois synergistes et toxiques avec une mortalité combinée supérieure à 50% (HEs de *Salvia sclarea* et *Citrus aurantifolia*).

Certaines études ont mis l'accent sur les perturbations physiologiques chez les individus d'*A. salina* qui sont issues des traitements par différentes HEs. Barbosa et al. (2018) ont signalé que l'HE de *Myrciaria floribunda* a présenté une activité inhibitrice élevée de l'enzyme acétylcholinestérase, la principale cible chez les microcrustacés. De même, Lima et al. (2021) ont indiqué que les HEs du géranium et du copaïba ont présenté une toxicité très élevée contre l'*A. salina* accompagnée d'une action inhibitrice contre la même enzyme. Par ailleurs, l'évaluation écotoxicologique des HEs extraites des feuilles fraîches et séchées de *Lavandula javanica*, a montré que le nombre d'œufs éclos a été diminué en fonction de la dose, en n'atteignant que 10 % du succès d'éclosion après 12h à 0,5 mg/l (Adeogun et al., 2018).

En outre, Il n'est pas surprenant d'enregistrer de telles toxicité contre l'*A. salina* dans la présente étude de fait que d'autres HEs ont été classées comme des ingrédients toxiques contre le microcrustacé *Daphnia magna*, recommandé par des organisations internationales en tant que model expérimental pour la vérification de l'écotoxicité de produits chimiques et d'autres substances (ASTM, 1997 ; OCDE, 2004). A titre d'exemple, les HEs de *Trachyspermum ammi*, *Myroxylon pereira*, *Melaleuca linariiflora* et *Melaleuca quinquenervia* ont montré une toxicité aigüe avec des DL₅₀ allant de 2 mg/l à 15 mg/l, en comparant avec la DL₅₀ (≤ 1 mg/l) des insecticides synthétiques, souvent utilisés en agriculture (Diazinon, Heptachlor...), qui ont été extrêmement toxiques pour *Daphnia magna* (Ferraz et al., 2022).

Actuellement, l'usage des insecticides synthétiques reste une solution pour résoudre le problème des insectes nuisibles, malgré les inconvénients précédemment décrits. De même, la toxicité des HEs appliquées dans cette étude à l'égard du microcrustacé testé n'empêche pas la continuité de valorisation de leurs pouvoirs insecticide et insectifuge, en suivant des procédures servant à minimiser leur écotoxicité et maintenant leur bioefficacité vis-à-vis les insectes cibles.

II.7. Effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges contre les cellules MCF 10A

L'activité antiprolifératives des HEs et leurs mélanges a été testée sur les cellules MCF 10A afin de déterminer leur effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire. L'effet antiprolifératif de diverses concentrations d'échantillons testés est dose-dépendant (Fig. 30 ; 31). Le tamoxifène a été utilisé comme témoin positif et ces CI_{50} et CI_{90} pour les cellules MCF 10A ont été de 4,16 et 7,41 mg/l, respectivement.

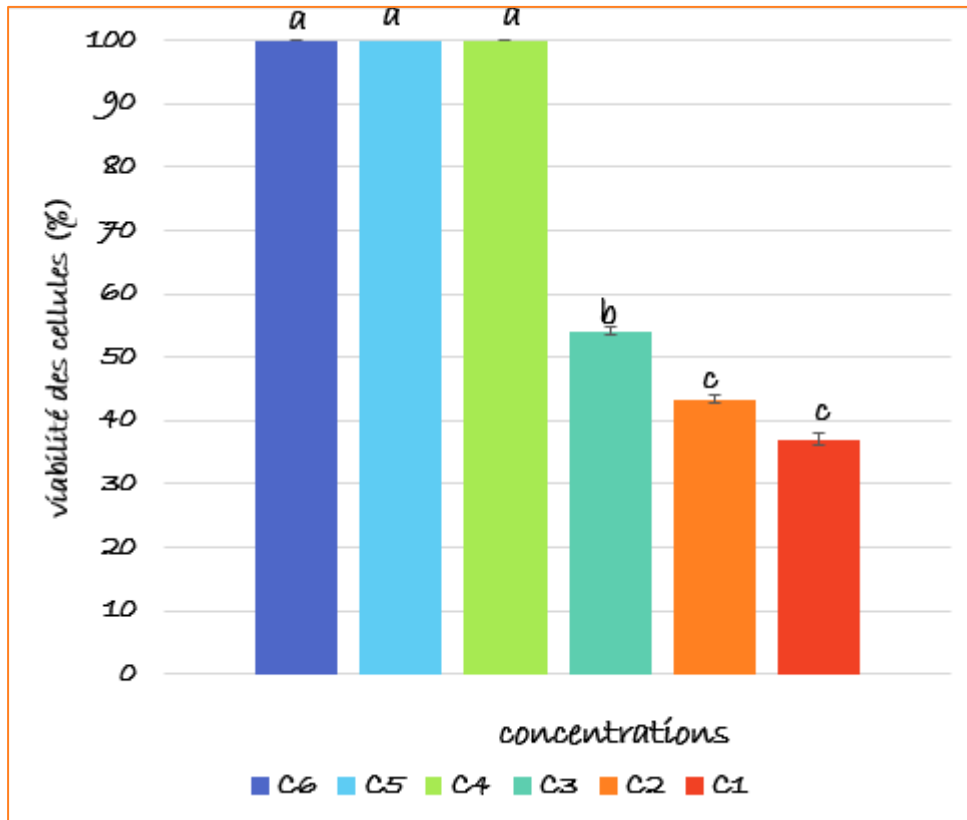


Figure 30 : Taux de viabilité (moyenne \pm ES) des cellules MCF 10A après 24h de traitement par différentes concentrations (C) de tamoxifène. C1 = 10 mg/l; C2 = 5 mg/l; C3 = 2,5 mg/l; C4 = 1,25 mg/l; C5 = 0.625 mg/l; C6 = 0.312 mg/l. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), et vice versa.

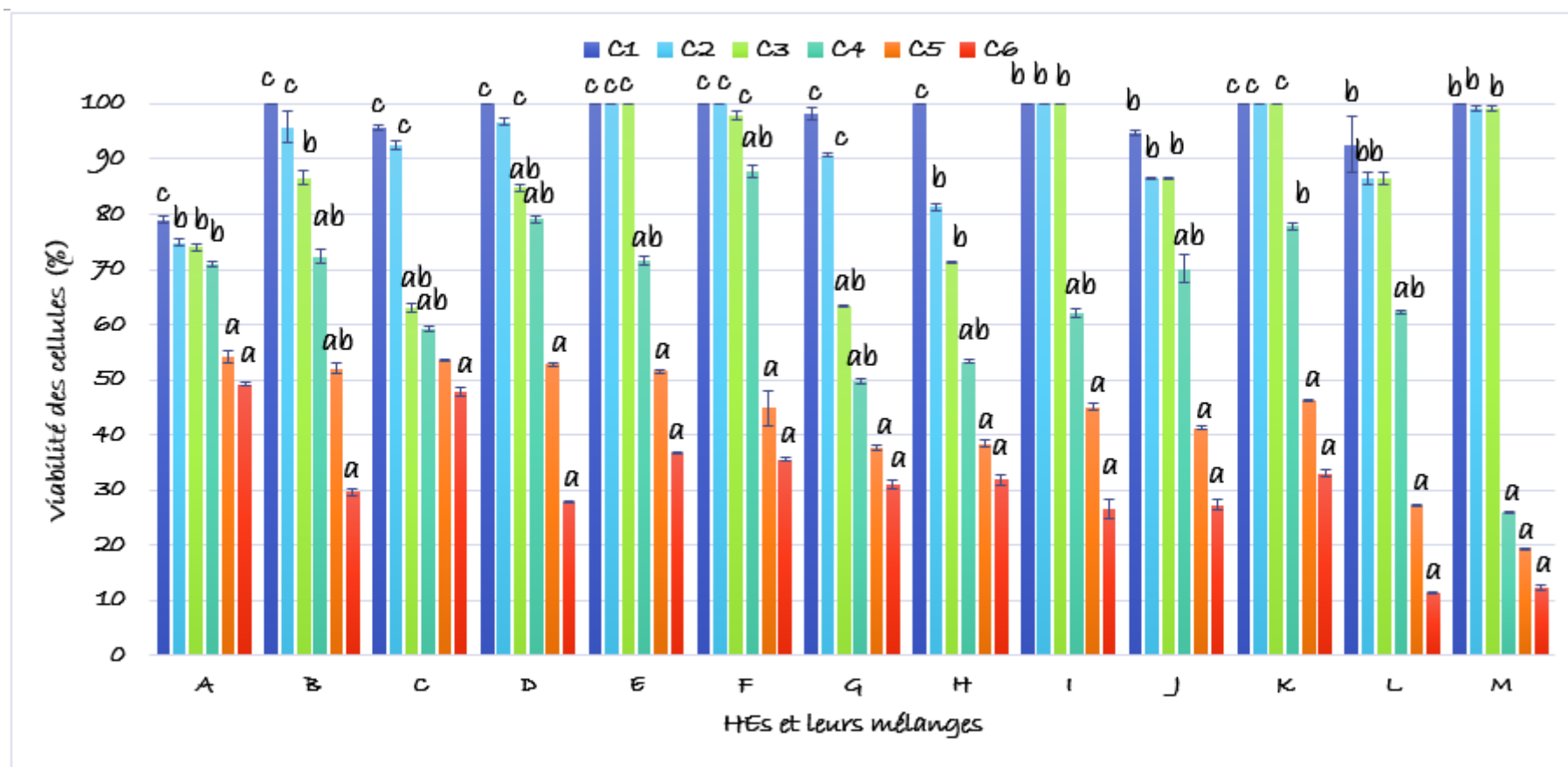


Figure 31 : Taux de viabilité (moyenne \pm ES) des cellules MCF 10A après 24 heures de traitement par différentes concentrations (C) d'HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* et leurs mélanges. C1 = 300 mg/l ; C2 = 150 mg/l ; C3 = 75 mg/l ; C4 = 37,5 mg/l ; C5= 18,75 mg/l; C6= 9,375 mg/l. La comparaison des moyennes est effectuée en utilisant le test ANOVA suivi de test de Tukey. Dans la même colonne, les barres avec la même lettre signifient que les mortalités ne sont pas significativement différentes ($P > 0,05$), et vice versa.

Parmi les trois HEs, celle de *R. officinalis* a eu l'effet inhibiteur le plus important sur les cellules MCF 10A, avec une CI_{50} de 155,61 mg/l, suivie des HEs de *J. phoenicea* ($CI_{50} = 176,25$ mg/l) et d'*A. herba-alba* ($CI_{50} = 337,82$ mg/l).

La présente étude a montré également que le mélange M est le plus inhibiteur de la prolifération cellulaire ($CI_{50} = 57,39$ mg/l), suivi des mélanges L ($CI_{50} = 83,35$ mg/l) et G ($CI_{50} = 97,88$ mg/l). En outre, un pouvoir inhibiteur modéré a été enregistré pour les mélanges H, J et I ($CI_{50} = 104,10, 121,81$ et $126,08$ mg/l, respectivement). Tandis que, les mélanges D, K, E et F ont s'avérés moins efficaces avec des valeurs de CI_{50s} variant de 159,29 à 180,87 mg/l. D'autre part, les valeurs des CI_{90s} ont dépassé le seuil de 500 mg/l pour la majorité des échantillons.

Le calcul des FSs a permis de détecter la possibilité d'une action synergique entre les trois HEs en combinaisons binaires et ternaire. Toutes les combinaisons ont montré des interactions synergiques qui a conduit à une réduction des doses en assurant les effets équivalents à celles des HEs en individuelle. Les mélanges M et G ont été considérés comme étant les agents toxiques les plus synergistes, affichant ainsi les valeurs de FSs= respectives de 3,85 et 3,04 et celles d'IRDs= de 5,89 et 3,45. Alors que le potentiel synergique du reste des échantillons a varié de modéré à faible, ainsi ses valeurs d'IRDs.

Une HE est considérée non toxique si la valeur de CI_{50} est inférieure à 100 μ g/ml, l'équivalent de 100 mg/ml (Sandasi et al., 2023). Par conséquent, les mélanges M, L et G ont été révélés toxiques vis-à-vis les cellules MCF 10A, alors que le reste des échantillons ont été non toxiques malgré leur effet antiprolifératif (**Tab. 12**).

Chapitre II : Résultats et discussions

Tableau 12 : Valeurs des CI₅₀ et CI₉₀ observées et celles des CI₅₀ théoriques (mg/l), ainsi que les limites inférieures et supérieures des CI₅₀ et les CI₉₀ à 95 % ; facteurs synergiques (SF) et indices de réduction de dose (IRD) des HEs d'*A. herba-alba*, *J. phoenicea* et *R. officinalis* ainsi que leurs combinaisons à l'égard des cellules MCF 10A.

HEs et leurs mélanges	CI ₅₀ observée (mg/L)	Limites inférieures et supérieures des CI ₅₀ à 95% (mg/L)	CI ₉₀ observée (mg/L)	Limites inférieures et supérieures des CI ₉₀ à 95% (mg/L)	CI ₅₀ théorique (mg/L) a	FS <u>b</u>	IDR <u>c</u>
<i>A</i>	337,82	(231,7-578,19)	58788,77	(17406,3-374720,1)	/	/	/
<i>B</i>	155,61	(141,51-172,62)	722,15	(595,38-908,08)	/	/	/
<i>C</i>	176,25	(126,38-283,22)	2648,27	(1179,04-10404,56)	/	/	/
<i>D</i>	159,25	(145,09-176,28)	598,67	(448,05-905,06)	292,27	1,84	2,12
<i>E</i>	177,22	(151,98-212,42)	536,17	(424,38-738,3)	201,16	1,14	1,91
<i>F</i>	180,87	(159,32-209,02)	598,67	(448,05-905,06)	246,72	1,36	1,87
<i>G</i>	97,88	(80,7-121,5)	681,14	(460,3-1176,62)	297,43	3,04	3,45
<i>H</i>	104,1	(87,16-127,13)	796,2	(545,13-1329,2)	116,71	1,12	3,25
<i>I</i>	126,08	(109,1-148,07)	545,41	(414,95-781,66)	257,04	2,04	2,68
<i>J</i>	121,81	(108,91-137,64)	915,22	(714,67-1230,67)	160,77	1,32	1,45
<i>K</i>	160,19	(146,8-176,11)	638,13	(536,55-783,79)	171,09	1,07	1,1
<i>L</i>	83,35	(68,1-103,99)	404,21	(284,56-663,61)	165,93	1,99	2,11
<i>M</i>	57,39	(44,35-73,68)	204,68	(146,59- 339,53)	220,99	3,85	5,89
<i>Tamoxifène</i>	4,16	(3,14-6,68)	7,41	(5,51-15,21)	/	/	/

a CI50 théorique = [(Proportion de l'HE1 x CI50 de l'HE1) + (Proportion d'HE1 x CI50 d'HE2)]

b FS = (CI50 théorique)/(CI50 observée) ; FS = 1 (additif). FS <1 (Antagoniste). FS >1 (Synergique) (Feroz, 2020).

c L'IRD est une mesure de l'étendue de la réduction de la dose d'un toxique spécifique à une combinaison synergique, il a été calculé par la formule suivante : $IRD = D_{x1}/D_1$ (Chou, 2010). D_{x1} indique CI₅₀ d'une des HEs incluses dans le mélange ; tandis que D_1 est la CI₅₀ de combinaison synergique qui contient ces HEs. IRD= 1 (pas de réduction de dose) ; IRD <1 (Réduction de dose défavorable) ; IRD >1 (Réduction de dose favorable).

Les IRDs pour les échantillons D E, F, G, H, I et M ont été calculés correspondent à la CI₅₀ de l'HE d'*A. herba alba*

Les IRDs pour le reste des échantillons sont calculés correspondent à la CI₅₀ de l'HE de *R. officinalis*.

Selon Sharma et *al.*, (2022), les HEs ont pu exercer un effet antiprolifératif par de multiples mécanismes à savoir : la perturbation de la membrane cellulaire (dépolarisation, augmentation de la perméabilité de la membrane ou réduction de l'activité des enzymes liées à la membrane) et l'induction de l'apoptose. En outre, certaines HEs ont induit une apoptose par l'activation des caspases et un arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S.

En effet, l'effet antiprolifératif des HEs et leurs mélanges, réveillé dans le présent travail, n'a pas impliqué la toxicité des bioproduits vis-à-vis les êtres humains. Cependant, les HEs de *R. officinalis* a eu l'effet antiprolifératif le plus important parmi les trois testés sur les cellules MCF 10A. Ces HEs ont fait l'objet de plusieurs études *In vivo* pour déterminer sa toxicité vis-à-vis l'ensemble des organismes vivants. Dans ce contexte, Faria et *al.* (2011) ont testé des doses d'HE de romarin pouvant atteindre 2000 mg/kg pendant sept jours chez des souris pour calculer la DL₅₀. Aucun décès ni symptôme stéréotypé de toxicité aiguë des individus n'ont été survenus après l'administration de l'échantillon. Les auteurs ont conclu que la dose létale médiane a été supérieure à 2000 mg/kg où la plupart des composés abondants de l'huile utilisée ont été l'eucalyptol (28,1 %), α -pinène (17,4 %) avec un terpène non identifié (23,9 %). En dépit de sa composition principalement de myrcène (24,6 %) et eucalyptol (19,8 %), aucune létalité ni toxicité n'ont été observées de l'HE de romarin, par voie intrapéritonéale (jusqu'à 1000 mg/kg) et orale (3000 mg/kg), sur les souris (Takaki et *al.*, 2008). Selon les rapports de Baker et Grant (2018), la toxicité orale aiguë de l'HE de *R. officinalis* a été de 5 ml/kg chez le rat tandis que la toxicité cutanée aiguë a été supérieure à 10 ml/Kg chez le lapin. L'irritation cutanée aiguë modérée a survenu seulement après 24h de contact direct dès que la sensibilisation cutanée a été négative. Pour mettre en évidence ce phénomène, Gupta et *al.* (2022) ont déclaré que les modes de toxicité *In vitro* ont eu certaines limites en dépit de leurs avantages, car ils ont été confrontés à des problèmes de modélisation de la toxicité chronique. Il est à mentionner que suite à son exposition à une substance toxique à long terme, l'ensemble du corps se recrée en engageant des fonctions biologiques complexes comme réponse, tandis que celui testé *In vitro* ne fournit qu'une partie des cellules ou tissus humains. De manière plus approfondie, Walkey et *al.* (2014) ont expliqué qu'en raison des différences de phénotype cellulaire, microenvironnement et signalisation intracellulaire, les modèles *In vitro* ne prédisent pas les phénomènes réels avec précision lors d'une exposition *In vivo*. Par exemple, on ne peut pas déduire qu'une formulation qui a été responsable de déclencher l'apoptose dans les hépatocytes de culture a été nécessairement hépatotoxique. Bref, les modèles appliqués sur les petits animaux représentent la « norme d'excellence » pour les essais de toxicité parce qu'ils

prédisent la toxicité d'un composé chez les humains de manière précise (Fischer et Chan, 2007). Ainsi des futures études *In vivo* seraient nécessaires pour avoir des données plus précises avant la commercialisation de ces bioinsecticides.

Les résultats de ce travail ont montré davantage que parmi tous les échantillons, le mélange M a exercé le fort effet antiprolifératif pourtant son efficacité a été 13 fois inférieure à celle de tamoxifène (contrôle positif) et que ce dernier, a été approuvé par la FDA des États-Unis en 1984 jusqu'à présent pour le traitement et la prévention du cancer du sein et autres types de cancer chez les hommes et les femmes (Tsai-Turton, 2014). De ce fait, un rappel de la fameuse citation de médecin et alchimiste suisse **Paracelsus** a fait proclamer "**tout est poison, rien n'est poison : c'est la dose qui fait le poison**".

● ● ● —————

Conclusions

————— ● ● ●

L'étude des HEs de quelques espèces végétales spontanées à caractère médicinal, a porté sur trois plantes souvent utilisées dans la région des Aurès. Elle concerne l'*Artemisia herba-alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L. et *Rosmarinus officinalis* L. Des combinaisons binaires à différents rapports et une combinaison ternaire ont été préparé à partir des trois HEs.

L'indentification des compositions chimiques par GC-MS a déterminé un total de 311 constituants dans les trois HEs et leurs mélanges représentant de 96,7 à 99,8% de la totalité des échantillons. Il a été constaté que l'HE d'*A. herba-alba* de Khenchela possède un nouveau chimiotype avec Car-3-en-5-one comme constituant principal (12,51 %). En outre, les composants majoritaires de l'HE de *J. phoenicea* sont l' α -pinène (15,49 %), l' α -terpinyl acetate (9,54 %) et le 3-carène (9,63 %). Par ailleurs l'HE de *R. officinalis* est composé de camphre (34,37%) comme composant principal, ainsi que l'eucalyptol (14,46%) et l' α -pinène (12,94%).

La GC-MS a montré aussi que le car-3-en-5-one (9,67 %) a une contribution majeure à l'échantillon D. Alors que l' α - pinène est le constituant le plus important dans les mélanges E (11,17 %) et J (14,96 %). De même, l'échantillon F est caractérisé par une présence majeure d'exo-2,7,7-triméthylbicyclo[2.2.1] heptan- (7,82%). De plus, les combinaisons G, H, I, K, L et M sont dominées par le camphre avec des taux respectifs de 15,7, 24,47, 19,38, 24,46, 20,94 et 13.95%.

Les compositions chimiques des mélanges ont changé considérablement différents de celles des HEs originales, ce qui est le résultat de l'apparition de certains composés comme ingrédients majeurs ou mineurs, avec des différentes quantités entre les mélanges. Cependant, plusieurs composés ont été présents dans les HEs d'origine ont été disparus après avoir mélanger les HEs. De plus, les proportions des composants détectés en une seule HE ont été modifiées sur toutes les combinaisons suite à l'augmentation ou à la diminution de leurs quantités.

Après 24 h traitement par inhalation, l'HE d'*A. herba-alba* a été très toxique contre les adultes de *T. castaneum*, suivie de celles de *J. phoenicea* et *R. officinalis*. Cependant, le mélange H a enregistré la toxicité la plus élevée ($DL_{50} = 64,99$; $DL_{90} = 99,52$ μ l/l d'air), suivi de L ($DL_{50} = 68,98$; $DL_{90} = 106,27$ μ l/l d'air), K ($DL_{50} = 74,76$, $DL_{90} = 89,64$ μ l/l air), et I ($DL_{50} = 82,58$; $DL_{90} = 196,24$ μ l/l d'air). Les combinaisons L, H, K, I, J, F et M ont montré des effets synergiques. Il a également été montré que les mélanges des HEs de *R. officinalis* + *A. herba-alba* (3:1) et HEs de *J. phoenicea* + *R. officinalis* dans des rapports de 1:3 et 1:1 ont montré une synergie considérable, avec des valeurs de FSs de 2,22, 2,26 et 2,09, respectivement.

Dans ce cas, l'impact synergique a considérablement réduit les doses de bioinsecticide (DRI = 2,41, 2,27 et 2,09, respectivement). La toxicité est généralement dépendante de la dose appliquée que du temps.

Les valeurs de TL₅₀ et TL₉₀ pour une concentration de 83,33 µl/l d'air ont révélé que les mélanges L, I et K ont entraîné des mortalités relativement importantes (> 60 %) après 24 h d'exposition, rendant impossible la détermination des valeurs de TL₅₀ pour ces échantillons. De plus, les échantillons L, K et I ont présenté les valeurs de TL₉₀ les plus basses, qui ont été de 2,60, 3,97 et 4,15 h, respectivement.

L'HE d'*A. herba-alba* qui a présenté une valeur de DR₉₀ de l'ordre de 2,68 nl/cm². Cependant les HEs de *J. phoenicea* et *R. officinalis* ont enregistré une efficacité moins importante en termes de ce paramètre à savoir : DR₅₀=2,14 ; DR₉₀=4,27 et DR₅₀=4,90 ; DR₉₀=10,58 nl/cm², respectivement. Les combinaisons L, J, F, G et M ont été extrêmement puissantes en tant que répulsifs ayant des PRs supérieurs à 50 %. En outre, la combinaison F avec une dose de 1,25 nl/cm² a présenté l'activité la plus répulsive. Sur la base des valeurs des FSs, la plupart des combinaisons ont révélé des effets synergiques, à l'exception des combinaisons I et G, qui ont respectivement présenté des effets à la fois additifs et antagonistes.

D'après les analyses de docking moléculaire, les valeurs des énergies libres de liaison (ΔG) de toutes les molécules ont été dans la même gamme. La molécule Cadina-1(6),4-diene a donné le meilleur score de -5.0 kcal/mol avec la formation d'une liaison de type pi-sigma avec l'acide aminé histidine 202 de l'AANAT de *T. castaneum*. D'autre part, elle a formé des liaisons pi-alkyl avec les acides aminées phénylalanine 166, proline 26 et alanine 29 avec la même enzyme.

L'huile de romarin est la plus toxique (DL₅₀= 38,6 mg/l) vis-à-vis les larves d'*A. salina*, par rapport avec celles de genévrier et d'armoise qui ont présenté des chiffres de DL₅₀= 44,71 et 89,53 mg/l, respectivement. En outre, les mélanges D et H ont figuré fortement toxiques contre l'organisme aquatique suite à l'enregistrement des valeurs de DL₅₀ de l'ordre de 16,81 et 18,05 mg/l, respectivement. Tous les échantillons testés dans la présente étude ont été considérés très toxiques pour les larves d'*A. salina*, à l'exception de celui d'*A. herba-alba* qui a été modérément toxique.

Parmi les trois HEs, celle de *R. officinalis* a eu l'effet inhibiteur le plus important sur la prolifération des cellules MCF 10A, avec une CI₅₀ de 155,61 mg/l, suivie des HEs de *J.*

phoenicea ($CI_{50} = 176,25$ mg/l) et d'*A. herba-alba* ($CI_{50} = 337,82$ mg/l). La présente étude a montré également que le mélange M est le plus inhibiteur de la prolifération cellulaire ($CI_{50} = 57,39$ mg/l), suivi des mélanges L ($CI_{50} = 83,35$ mg/l) et G ($CI_{50} = 97,88$ mg/l). Les mélanges M, L et G ont été révélés toxiques vis-à-vis les cellules MCF 10A, alors que le reste des échantillons ont été non toxiques malgré leurs effets antiprolifératifs.

Sur la base de ces résultats, les HEs des plantes ainsi que leurs mélanges qui ont montré, d'une part, des effets répulsifs et insecticides très importants, et des effets écotoxique et cytotoxique très faible, d'une autre part, vont servir comme alternatif pour la lutte contre les adultes de *T. castaneum*.

Liste des références



Références bibliographiques

- Abad, M. J., Bedoya, L. M., Apaza, L., & Bermejo, P. (2012). The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules*, *17*(3), 2542-2566.
- Abd El-Ghany, N. M., & Abd El-Aziz, S. E. (2017). External morphology of antennae and mouthpart sensillae of the granary weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science*, *52*(1), 29-38.
- Abood, S., Eichelbaum, S., Mustafi, S., Veisaga, M. L., Lopez, L. A., & Barbieri, M. (2017). Biomedical properties and origins of sesquiterpene lactones, with a focus on dehydroleucodine. *Natural Product Communications*, *12*(6), 1934578X1701200638.
- Abraham, D., Francischini, A. C., Pergo, E. M., Kelmer-Bracht, A. M., & Ishii-Iwamoto, E. L. (2003). Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *41*(11-12), 985-991.
- Adams, R. P., Altarejos, J., & Arista Palmero, M. (2014). Geographic variation in the volatile leaf oils *J. phoenicea* var. *phoenicea* from throughout its range. *Phytologia*, *96* (2), 110-116.
- Adeogun, O. O., Maroyi, A., & Afolayan, A. J. (2018). Comparative evaluation of essential oils from *Lippia javanica* L leaf obtained by two methods and their effect on *Artemia salina* L. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(1), 105-115.
- Adeogun, O. O., Maroyi, A., & Afolayan, A. J. (2018). Comparative evaluation of essential oils from *Lippia javanica* L leaf obtained by two methods and their effect on *Artemia salina* L. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *17*(1), 105-115.
- Adouane, S., 2015. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques. Université Mohamed Khider- Biskra, faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, 196. Full text available at: <http://thesis.univ-biskra.dz/2548/>
- Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Dekant, W., ... & Toldrá, F. (2008). Use of rosemary extracts as a food additive-Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *EFSA J*, *721*, 1-29.

- Ahmad, F., Iqbal, N., Zaka, S. M., Qureshi, M. K., Saeed, Q., Khan, K. A., ... & Awar, M. B. (2019). Comparative insecticidal activity of different plant materials from six common plant species against *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1804-1808.
- Albarano, L., Ruocco, N., Lofrano, G., Guida, M., & Libralato, G. (2022). Genotoxicity in *Artemia* spp.: an old model with new sensitive endpoints. *Aquatic Toxicology*, 106320.
- Alfitori, M. O., Lamloom, S. H., & Aly, H. M. (2014). Essential oil composition of leaves of *Juniperus phoenicea* grown at Al-Jabel Al-Akhdar Region, Libya. *Middle East J Sci Res*, 22, 368-370.
- Aljaiyash, A. A., Gonaid, M. H., Islam, M., & Chaouch, A. (2014). Antibacterial and cytotoxic activities of some Libyan medicinal plants. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4(2), 43-51.
- Aljaiyash, A., Ghanmi, M., Satrani, B., Labiad, H., Echchelh, A., & Chaouch, A. (2016). Chemical Composition of Essential Oils of Ripe and Unripe Berries and Leaves of *Juniperus Phoenicea* L. and determination of their Antimicrobial Activities. *International Journal*, 7.
- Andrade-Ochoa, S., Correa-Basurto, J., Rodríguez-Valdez, L. M., Sánchez-Torres, L. E., Noguera-Torres, B., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2018). In vitro and in silico studies of terpenes, terpenoids and related compounds with larvicidal and pupaecidal activity against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Chemistry Central Journal*, 12(1), 1-21.
- Andreani, T., Severino, P., de Hollanda, L. M., Vazzana, M., Souto, S. B., Santini, A., ... & Souto, E. B. (2017). Cancer therapies: Applications, nanomedicines and nanotoxicology. In *Nanostructures for Cancer Therapy* (pp. 241-260). Elsevier.
- Arafa, W. M., Aboelhadid, S. M., Moawad, A., Shokeir, K. M., & Ahmed, O. (2020). Toxicity, repellency and anti-cholinesterase activities of thymol-eucalyptus combinations against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 81, 265-277.

- Arthur, F. H. (2019). Residual efficacy of a deltamethrin emulsifiable concentrate formulation against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Sitotroga cerealella* (Oliver) after partial treatment of brown rice. *Insects*, 10(4), 95.
- ASTM, 1997. ASTM E1193-97, Standard Guide for Conducting Daphnia Magna Life-Cycle Toxicity Tests. ASTM International. www.astm.org
- Atchou, K., Lawson-Evi, P., Diallo, A., & Eklou-Gadegbeku, K. (2021). Toxicological evaluation of the dried hydroethanolic extract of *Amaranthus spinosus* L. roots in *Artemia salina* larvae and Sprague Dawley rats. *Clinical Phytoscience*, 7, 1-9.
- Baccari, W., Znati, M., Zardi-Bergaoui, A., Chaieb, I., Flamini, G., Ascriczzi, R., & Jannet, H. B. (2020). Composition and insecticide potential against *Tribolium castaneum* of the fractionated essential oil from the flowers of the Tunisian endemic plant *Ferula tunetana* Pomel ex Batt. *Industrial crops and products*, 143, 111888.
- Badji, C. A., Dorland, J., Kheloul, L., Bréard, D., Richomme, P., Kellouche, A., ... & Anton, S. (2021). Behavioral and Antennal Responses of *Tribolium confusum* to *Varronia globosa* Essential Oil and Its Main Constituents: Perspective for Their Use as Repellent. *Molecules*, 26(15), 4393.
- Badreddine, B. S., & Baouindi, M. (2016). Effects of *Artemisia herba-alba* essential oils on survival stored cereal pests: *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera, Tenebrionidae) and *Trogoderma granarium* (Everst)(Coleoptera, Dermestidae). *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(5), 390-394.
- Baghami, Y. (2013). Écologie et dynamique de la végétation de l'Aurès. [Thèse de doctorat en Sciences agronomiques], 214.
- Baker, B. P., & Grant, J. A. (2018). Rosemary & Rosemary Oil Profile.
- Bakırel, T., Bakırel, U., Keleş, O. Ü., Ülgen, S. G., & Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of ethnopharmacology*, 116(1), 64-73.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Balachowsky, A. S. (1962). Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome I. Coléoptères. Premier volume. Entomologie appliquée à l'agriculture. Tome I. Coléoptères. Premier volume.

- Barbosa, D.C.; Holandada Silva, V.N.; de Assis, C.R.D., de Oliveira Farias, J. C. R., Henrique do Nascimento, P., da Silva, W. V., ... & dos Santos Correia, M. T. (2020). Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory potential, in silico, of Myrciaria floribunda (H. West ex Willd.) O. Berg fruit peel essential oil. *Industrial crops and products*, 151, 112372.
- Bell, C. H. (2014). A review of insect responses to variations encountered in the managed storage environment. *Journal of Stored Products Research*, 59, 260-274.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., ... & Maggi, F. (2017). 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. *Parasitology international*, 66(2), 166-171.
- Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Wandjou, J. G. N., Koné-Bamba, D., Sagratini, G., ... & Caprioli, G. (2019). Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from Ocimum gratissimum grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. *Industrial Crops and Products*, 132, 377-385.
- Benincá, J. P., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., & Fröde, T. S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of Rosmarinus officinalis L. in mice. *Food chemistry*, 124(2), 468-475.
- Benjlali, B., Richard, H., & Liddle, P. (1985). Chémotypes d'Armoise blanche du Maroc Artemisia herba-alba. *Federagrario Torino*, 62, 69-74.
- Berkane, A., & Yahiaou, A. (2007). L'érosion dans les Aurès. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 18(3), 213-216.
- Bhavaniramy, S., Vishnupriya, S., Al-Aboody, M. S., Vijayakumar, R., & Baskaran, D. (2019). Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & oil science and technology*, 2(2), 49-55.
- Boles, P., 2011. Tribolium castaneum (Herbst, 1797) – Red Flour Beetle. Agricultural Research Service, United States, Departement of Agriculture.
- Bonnetone, F. 2010. Quand Tribolium complémente la génétique de la drosophile. *Medecine/Sciences*, 26 : 7p.

- Bouafia, A. (2022). *Optimisation de biosynthèse des nanoparticules d'oxyde de fer par l'utilisation de différents extraits des plantes et évaluation de leur activité biologique* (Doctoral dissertation, University of Eloued جامعة الشهيد حمه لخضر).
- Bouazza, L., Boufennara, S., Bensaada, M., Zeraib, A., Rahal, K., Saro, C., ... & López, S. (2020). In vitro screening of Algerian steppe browse plants for digestibility, rumen fermentation profile and methane mitigation. *Agroforestry Systems*, 94(4), 1433-1443.
- Boulila, A., Sanaa, A., Salem, I. B., Rokbeni, N., M'rabet, Y., Hosni, K., & Fernandez, X. (2015). Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 76, 616-622.
- Božović, M., Navarra, A., Garzoli, S., Pepi, F., & Ragno, R. (2017). Essential oils extraction: A 24-hour steam distillation systematic methodology. *Natural product research*, 31(20), 2387-2396.
- Brari, J., & Thakur, D. R. (2017). Fumigation and repellent potential of four essential oils against major coleopteran pests of stored grain. *International Journal of Advance Agricultural Research*, 5, 40-51.
- Braun, M., & Franz, G. (1999). Quality criteria of bitter fennel oil in the German pharmacopoeia. *Pharmaceutical and pharmacological letters*, 9, 48-51.
- Brito, V. D., Achimón, F., Pizzolitto, R. P., Ramírez Sánchez, A., Gómez Torres, E. A., Zygadlo, J. A., & Zunino, M. P. (2021). An alternative to reduce the use of the synthetic insecticide against the maize weevil *Sitophilus zeamais* through the synergistic action of *Pimenta racemosa* and *Citrus sinensis* essential oils with chlorpyrifos. *Journal of Pest Science*, 94, 409-421.
- Bruce, T. J., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2005). Insect host location: a volatile situation. *Trends in plant science*, 10(6), 269-274.
- Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3ème éd. *Lavoisier, Paris, 1120*.
- Camara A. 2009. Lutte contre *Sitophilus orizea* L. (Coléoptères curculionidae) et *Tribolium castaneum* Herbst (Coléoptère Ténébrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'élevage traditionnelle pratiquée en Basse Guinée et utilisation des huiles

essentielles végétales. Thèse d'obtention du titre de Docteur en Science de l'environnement, Université du Québec à Montréal. 173p.

- Campbell, J. F. (2013). Influence of landscape pattern in flour residue amount and distribution on *Tribolium castaneum* (Herbst) response to traps baited with pheromone and kairomone. *Journal of stored products research*, 52, 112-117.
- Campolo, O., Giunti, G., Russo, A., Palmeri, V., & Zappalà, L. (2018). Essential oils in stored product insect pest control. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-18.
- Çetin, H., & Güdek, M. (2020). Effect of Essential Oil from the Leaves of Rosemary Used in the Control of *Callosobruchus maculatus* (F.) on the Hydration Coefficient, Cookability, Taste and Color of the Edible Chickpea. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(2), 301-310.
- Chansang, A., Champakaew, D., Junkum, A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, A. K., ... & Pitasawat, B. (2018). Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *Parasites & vectors*, 11(1), 1-16.
- Chaubey, M. K. (2012). Acute, lethal and synergistic effects of some terpenes against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Ecologia Balkanica*, 4(1).
- Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Kedia, A., Das, S., & Dubey, N. K. (2021). Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 18918-18940.
- Cheraif, K., Bakchiche, B., Gherib, A., Bardaweel, S. K., Çol Ayvaz, M., Flamini, G., ... & Ghareeb, M. A. (2020). Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants. *Molecules*, 25(7), 1710.
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method synergy quantification method. *Cancer research*, 70(2), 440-446.
- Chouaieb, H., Ayadi, I., Zouari, S., Fakhfakh, N., Zaidi, S., & Zouari, N. (2012). Effect of phenological stage and geographical location on antioxidant activities of tunisian

horehound: *Marrubium vulgare* L.(Lamiaceae). *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 2(4), 232-238.

- Cruz, J. F., Troude, F., Griffon, D., & Hebert, J. P. (1988). Conservation des grains en régions chaudes-Techniques rurales en Afrique. *Ministère de la Coopération et du Développement (2. ed)*, F. Paillart Abbeville, Paris (France), 1-545.
- da Silva, L. E., & Dotto, A. R. F. (2022). Herbal oils in healthcare: a review. *Brazilian Journal of Science*, 1(4), 18-33.
- De Campos, B. G., Figueiredo, J., Perina, F., Abessa, D. M. D. S., Loureiro, S., & Martins, R. (2022). Occurrence, effects and environmental risk of antifouling biocides (EU PT21): Are marine ecosystems threatened? *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(18), 3179-3210.
- De Moraes, Â. A. B., Ferreira, O. O., da Costa, L. S., Almeida, L. Q., Varela, E. L. P., Cascaes, M. M., ... & Andrade, E. H. D. A. (2022). Phytochemical Profile, Preliminary Toxicity, and Antioxidant Capacity of the Essential Oils of *Myrciaria floribunda* (H. West ex Willd.) O. Berg. and *Myrcia sylvatica* (G. Mey) D C.(Myrtaceae). *Antioxidants*, 11(10), 2076.
- de Sena Filho, J. G., de Almeida, A. S., Pinto-Zevallos, D., Barreto, I. C., de Holanda Cavalcanti, S. C., Nunes, R., ... & Durringer, J. M. (2022). From plant scent defense to biopesticide discovery: Evaluation of toxicity and acetylcholinesterase docking properties for Lamiaceae monoterpenes. *Crop Protection*, 106126.
- Desjobert, J. M., Bianchini, A., Tomi, P., Costa, J., & Bernardini, A. F. (1997). Etude d'huiles essentielles par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. Application à la valorisation des plantes de la flore corse. *Analisis*, 6(25), 13-16.
- Deysson, G. (1976). *La cellule végétale: structure et fonctionnement*. SEDES.
- Dia, C. A. K. M. (2019). *Caractérisation morphogénétique des populations Ouest-africaines de *Tribolium castaneum* Herbst, ravageur des céréales stockées: différenciation en races hôtes et écotypes* (Doctoral dissertation, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal).

- Diome T. 2014. Biodémographie et diversité génétique des populations de *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera, Tenebrionidae) ravageur des grains de mil (*Pennisetum glaucum* Brown) en stock au Sénégal. Thèse de Doctorat unique en Génétique des populations, Université Cheikh Anta DIOP de Dakar. 103p.
- Dooley, M. R. (2020). *The attraction of the red flour beetle Tribolium castaneum to common environmental volatile compounds and its application to the management of stored product pests* (Doctoral dissertation, University of Leeds).
- Duke, J. A. (2002). *Handbook of medicinal herbs*. CRC press.
- 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). *Journal of economic entomology*, 110(3), 1025-1030.
- Eissa, T. A. F., Palomino, O. M., Carretero, M. E., & Gómez-Serranillos, M. P. (2014). Ethnopharmacological study of medicinal plants used in the treatment of CNS disorders in Sinai Peninsula, Egypt. *Journal of ethnopharmacology*, 151(1), 317-332.
- El Hadj Ali, I. B., Guetat, A., & Boussaid, M. (2012). Genetic diversity and structure of wild Tunisian *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. et Link.(Lamiaceae) assessed using isozyme markers. *African Journal of Ecology*, 50(2), 140-151.
- El-Naggar, S. A., Abdel-Farid, I. B., Germoush, M. O., Elgebaly, H. A., & Alm-Eldeen, A. A. (2016). Efficacy of *Rosmarinus officinalis* leaves extract against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2007-2016.
- El-Sawi, S. A., Motawae, H. M., & Ali, A. M. (2007). Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(4), 417-426.
- El-Sawi, S. A., Motawae, H. M., Sleem, M. A. F., El-Shabrawy, A. R. O., Sleem, A., & Ismail, M. A. N. (2014). Phytochemical screening, investigation of carbohydrate contents, and antiviral activity of *Juniperus phoenicea* L. growing in Egypt. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 20(1), 83-91.

- Emberger, L. (1955). Une classification biogéographique des climats. *Recueil Trav. Lab. Bot. Geol. Zool. Univ. Fac. Sci. Montpellier*, 7(3.43).
- Essid, R., Rahali, F. Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., ... & Limam, F. (2015). Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 77, 795-802.
- Faria, L. R. D., Lima, C. S., Perazzo, F. F., & Carvalho, J. C. T. (2011). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae). *Int J Pharm Sci Rev Res*, 7(2), 1-8.
- Farjon, A. (2013). The IUCN Red List of Threatened Species. *The International Union for Conservation of Nature (IUCN): Gland, Switzerland*, 42244.
- Feillet, P. (2000). *Le grain de blé: composition et utilisation*. Editions Quae.
- Feng, Y. X., Wang, Y., Geng, Z. F., Zhang, D., Almaz, B., & Du, S. S. (2020). Contact toxicity and repellent efficacy of Valerianaceae spp. to three stored-product insects and synergistic interactions between two major compounds camphene and bornyl acetate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 190, 110106.
- Feroz, A. (2020). Efficacy and cytotoxic potential of deltamethrin, essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Cinnamomum camphora* and their synergistic combinations against stored product pest, *Trogoderma granarium* (Everts). *Journal of stored products research*, 87, 101614.
- Fischer, H. C., & Chan, W. C. (2007). Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current opinion in biotechnology*, 18(6), 565-571.
- Friedman, T. (2015). The effect of rosmarinic acid on immunological and neurological systems: a basic science and clinical review. *Journal of Restorative Medicine*, 4(1), 50.
- Gacem, M. A., Ould El Hadj-Khelil, A., Boudjemaa, B., & Gacem, H. (2020). Phytochemistry, Toxicity and Pharmacology of *Pistacia lentiscus*, *Artemisia herba-alba* and *Citrullus colocynthis*. *Sustainable Agriculture Reviews* 39, 57-93.
- Ganji, S., Svensson, F. G., & Unelius, C. R. (2020). Asymmetric synthesis of oxygenated monoterpenoids of importance for bark beetle ecology. *Journal of Natural Products*, 83(11), 3332-3337.

- Ghanai, R., Houmani, Z., & Houmani, N. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* (J. Gay) Batt. and *A. judaica* ssp. *sahariensis* (Chev.) species endemic to the Algerian Sahara. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(3), 779-788.
- Giatropoulos, A., Pitarokili, D., Papaioannou, F., Papachristos, D. P., Koliopoulos, G., Emmanouel, N., ... & Michaelakis, A. (2013). Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology research*, 112, 1113-1123.
- Gnankiné, O., & Bassolé, I. H. N. (2017). Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against *Anopheles* species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules*, 22(10), 1321.
- González-Trujano, M. E., Peña, E. I., Martínez, A. L., Moreno, J., Guevara-Fefer, P., Deciga-Campos, M., & López-Muñoz, F. J. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of ethnopharmacology*, 111(3), 476-482.
- Gopalakrishnan, N. (1994). Studies on the storage quality of carbon dioxide-extracted cardamom and clove bud oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(3), 796-798.
- Goudjil, M. B., Ladjel, S., Bencheikh, S. E., Hammoya, F., Bensaci, M. B., Zighmi, S., & Mehani, M. (2016). Bioactivity of *Artemisia herba alba* essential oil against plant pathogenic fungi. *Der Pharma Chemica*, 8(3), 46-52.
- Gracza, L., & Ruff, P. (1981). The light-stability of trans-isoasarone and related compounds. *Dtsch Apoth Ztg*, 121, 2541-4.
- Gross, A. D., Norris, E. J., Kimber, M. J., Bartholomay, L. C., & Coats, J. R. (2017). Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 31(1), 55-62.
- Guedri Mkaddem, M., Zrig, A., Ben Abdallah, M., Romdhane, M., Okla, M. K., Al-Hashimi, A., ... & AbdElgawad, H. (2022). Variation of the Chemical Composition of Essential Oils and Total Phenols Content in Natural Populations of *Marrubium vulgare* L. *Plants*, 11(5), 612.

- Guenha, R., das Virtudes Salvador, B., Rickman, J., Goulao, L. F., Muocha, I. M., & Carvalho, M. O. (2014). Hermetic storage with plastic sealing to reduce insect infestation and secure paddy seed quality: A powerful strategy for rice farmers in Mozambique. *Journal of Stored Products Research*, 59, 275-281.
- Guenther, E., & Althausen, D. (1948). *The essential oils* (Vol. 1, p. 81). New York: Van Nostrand.
- Gupta, R., Rajpoot, K., Tekade, M., Sharma, M. C., & Tekade, R. K. (2022). Methods and models for in vitro toxicity. In *Pharmacokinetics and Toxicokinetic Considerations* (pp. 145-174). Academic Press.
- Gwinner, J., Harnish, R. et MÜch, O., 1996. Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte. Projet de protection des stocks et des récoltes, D-65726 Eschborn, R.F.A., 388p.
- Hafiz, I., Fitri, K., & Helvin, S. J. (2019). The phytochemical screening and assesment of bioactivity of pagoda flower (*Clerodendrum paniculatum* L.) using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(3), 10-13.
- Haluk, J. P., & Roussel, C. (2000). Caractérisation et origine des tropolones responsables de la durabilité naturelle des Cupressacées. Application potentielle en préservation du bois. *Annals of forest science*, 57(8), 819-829.
- Hamza, N., Berke, B., Umar, A., Cheze, C., Gin, H., & Moore, N. (2019). A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *Journal of ethnopharmacology*, 238, 111841.
- Harris, R. (2002). Synergism in the essential oil world. *International Journal of Aromatherapy*, 12(4), 179-186.
- Hashemi, S. M., & Rostaefar, A. (2014). Insecticidal Activity of Essential Oil from *Juniperus communis* L. subsp. *hemisphaerica* (Presl) Nyman against Two Stored Product Beetles. *Ecologia Balkanica*, 6(1) : 87-93.
- Hategekimana, A., & Erler, F. (2020). Comparative repellent activity of single, binary and ternary combinations of plant essential oils and their major components against

- Sitophilus oryzae L.(Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(6), 873-881.
- Hatimi, S., Boudouma, M., Bichichi, M., Chaib, N., & Guessous Idrissi, N. (2001). Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'Artemisia herba-alba Asso. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 94(1), 29-31.
 - Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of ethnopharmacology*, 107(2), 157-160.
 - Hieu, T. T., Jung, J., Kim, S. I., Ahn, Y. J., & Kwon, H. W. (2014). Behavioural and electroantennogram responses of the stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) to plant essential oils and their mixtures with attractants. *Pest management science*, 70(1), 163-172.
 - Hosseinzadeh, H., Karimi, G. H., & Nobakht, N. (2004). Effects of Rosmarinus officinalis L. aerial parts essential oil on intact memory and scopolamine-induced learning deficits in rats performing the Morris water maze task. *Journal of Medicinal Plants*, 3(12), 51-57.
 - Hou, C. W., Lin, Y. T., Chen, Y. L., Wang, Y. H., Chou, J. L., Ping, L. Y., & Jeng, K. C. (2012). Neuroprotective effects of carnosic acid on neuronal cells under ischemic and hypoxic stress. *Nutritional Neuroscience*, 15(6), 257-263.
 - Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
 - In, O. E. C. D. (2013). OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4.
 - Iriadam, M., Musa, D., Gumushan, H., & Baba, F. (2006). Effects of two Turkish medicinal plants Artemisia herba-alba and Teucrium polium on blood glucose levels and other biochemical parameters in rabbits. *J Cell Mol Biol*, 5(1), 19-24.
 - Isman, M. B. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry reviews*, 19, 235-241.

- Isman, M. B., Machial, C. M., Miresmailli, S., & Bainard, L. D. (2007). Essential oil-based pesticides: New insights from old chemistry. *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*, 201-209.
- Ivănescu, B., Burlec, A. F., Crivoi, F., Roșu, C., & Corciovă, A. (2021). Secondary metabolites from *Artemisia* genus as biopesticides and innovative nano-based application strategies. *Molecules*, 26(10), 3061.
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., & Stankiewicz, M. (2017). Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—A review. *Molecules*, 23(1), 34.
- Janovy, Jr, J., Detwiler, J., Schwank, S., Bolek, M. G., Knipes, A. K., & Langford, G. J. (2007). New and emended descriptions of gregarines from flour beetles (*Tribolium* spp. and *Palorus subdepressus*: Coleoptera, Tenebrionidae). *Journal of Parasitology*, 93(5), 1155-1170.
- Jerraya, A. (2003). *Principaux nuisibles des plantes cultivées et des denrées stockées en Afrique du Nord: leur biologie, leurs ennemis naturels, leurs dégâts et leur contrôle*. Climat pub.
- Jilani, G., & Saxena, R. C. (1990). Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweetflag oil, neem oil, and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera: Bostrychidae). *Journal of Economic Entomology*, 83(2), 629-634.
- Kadri A, Zarai Z, Chobba I. B, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. (2011). Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from the South-Western of Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(29), 6502-6508.
- Katiki, L. M., Barbieri, A. M. E., Araujo, R. C., Veríssimo, C. J., Louvandini, H., & Ferreira, J. F. S. (2017). Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. *Veterinary Parasitology*, 243, 47-51.
- Kayashima, T., & Matsubara, K. (2012). Antiangiogenic effect of carnosic acid and carnosol, neuroprotective compounds in rosemary leaves. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(1), 115-119.

- Khan, I., Prakash, A., & Agashe, D. (2016). Divergent immune priming responses across flour beetle life stages and populations. *Ecology and evolution*, 6(21), 7847-7855.
- Khan, S. A., Ranjha, M. H., Khan, A. A., Sagheer, M., Abbas, A., & Hassan, Z. (2019). Insecticidal efficacy of wild medicinal plants, *Dhatura alba* and *Calotropis procera*, against *Trogoderma granarium* (Everts) in wheat store grains. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(1).
- Khanikor, B., Parida, P., Yadav, R. N. S., & Bora, D. (2013). Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and docking studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(2), 006-012.
- Kheloul, L., Anton, S., Bréard, D., & Kellouche, A. (2021). Fumigant toxicity of some essential oils and eucalyptol on different life stages of *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Botany Letters*, 1-12.
- Kheloul, L., Anton, S., Gadenne, C., & Kellouche, A. (2020). Fumigant toxicity of *Lavandula spica* essential oil and linalool on different life stages of *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 23(2), 320-326.
- Kim, S. W., Lee, H. R., Jang, M. J., Jung, C. S., & Park, I. K. (2016). Fumigant toxicity of Lamiaceae plant essential oils and blends of their constituents against adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Molecules*, 21(3), 361.
- Kiplang'at, K. P., & Mwangi, R. W. (2014). Synergistic repellent activity of plant essential oils against *Aedes aegypti* on rabbit skin. *Int. J. Mosq. Res*, 1, 55-59.
- Kłyś, M. (2007). The influence of the herbs sage and wormwood on the migration of *Rhyzopertha dominica* (F.)(Coleoptera: Bostrichidae) populations. *Journal of stored products research*, 43(4), 558-563.
- Koul, O., Singh, R., Kaur, B., & Kanda, D. (2013). Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. *Industrial Crops and Products*, 49, 428-436.
- Kuete, V., Karaosmanoğlu, O., & Sivas, H. (2017). Chapter 10-Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables (VBT-MS and V. from A. Kuete.

- Laid, M., Hegazy, M. E. F., Ahmed, A. A., Ali, K., Belkacemi, D., & Ohta, S. (2008). Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba-alba*. *Phytochemistry Letters*, *1*(2), 85-88.
- Lakehal, S., Meliani, A., Benmimoune, S., Bensouna, S. N., Benrebaha, F. Z., & Chaouia, C. (2016). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* Asso grown in Algeria. *Med. Chem*, *6*(6), 435-439.
- Lau, K. M., Lai, K. K., Liu, C. L., Tam, J. C. W., To, M. H., Kwok, H. F., ... & Bik-San Lau, C. (2012). Synergistic interaction between *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, *141*(1), 250-256.
- Lee, B. H., Annis, P. C., & Choi, W. S. (2004). Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1, 8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research*, *40*(5), 553-564.
- Lee, M. Y. (2018). Essential oils as repellents against arthropods. *BioMed research international*, 2018.
- Leigh-de Rapper, S., Viljoen, A., & van Vuuren, S. (2021). Essential oil blends: The potential of combined use for respiratory tract infections. *Antibiotics*, *10*(12), 1517.
- Li, J., Lehmann, S., Weissbecker, B., Ojeda Naharro, I., Schütz, S., Joop, G., & Wimmer, E. A. (2013). Odoriferous defensive stink gland transcriptome to identify novel genes necessary for quinone synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *PLoS genetics*, *9*(7), e1003596.
- Liang, J. Y., Guo, S. S., Zhang, W. J., Geng, Z. F., Deng, Z. W., Du, S. S., & Zhang, J. (2018). Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from *Artemisia dubia* and its main compounds against two stored product pests. *Natural product research*, *32*(10), 1234-1238.
- Liang, J. Y., Wang, W. T., Zheng, Y. F., Zhang, D., Wang, J. L., Guo, S. S., ... & Zhang, J. (2017). Bioactivities and chemical constituents of essential oil extracted from *Artemisia anethoides* against two stored product insects. *Journal of oleo science*, *66*(1), 71-76.

- Liang, J. Y., Wang, W. T., Zheng, Y. F., Zhang, D., Wang, J. L., Guo, S. S., ... & Zhang, J. (2017). Bioactivities and chemical constituents of essential oil extracted from *Artemisia anethoides* against two stored product insects. *Journal of oleo science*, 66(1), 71-76.
- Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., ... & Kong, D. (2022). Essential Oils: Chemical Constituents, Potential Neuropharmacological Effects and Aromatherapy-A Review. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 100210.
- Lima, L. R., Andrade, F. K., Alves, D. R., de Morais, S. M., & Vieira, R. S. (2021). Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 1361-1370.
- Lis, L., Bakula, T., Baranowski, M., & Czarnewicz, A. (2011). The carcinogenic effects of benzoquinones produced by the flour beetle. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(1).
- Maghni, N., Louadi, K., Ortiz-Sánchez, F. J., & Rasmont, P. (2017, January). Les Anthophores de la région des Aurès (nord-est de l'Algérie) (Hymenoptera: Apidae: Anthophorini). In *Annales de la Société entomologique de France (NS)* (Vol. 53, No. 1, pp. 55-73). Taylor & Francis.
- Mahanta, S., & Khanikor, B. (2021). Mosquitocidal activity of twenty-eight plant essential oils and their binary mixtures against *Culex quinquefasciatus*, (Diptera: Culicidae). *Heliyon*, 7(2), e06128.
- Mahmoudvand, M., Abbasipour, H., Basij, M., Hosseinpour, M. H., Rastegar, F., & Nasiri, M. B. (2011). Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored-product pests. *Chilean journal of agricultural research*, (1) 71).
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.

- McDonald, L. L., Guy, R. H., & Speirs, R. D. (1970). *Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents, and attractants against stored-product insects* (No. 882). US Agricultural Research Service.
- Meharzi, M. K. E. (2010). Forêts, géosystèmes et dynamique du milieu: le cas de l'Aurès. *Thèse de doctorat d'État en Aménagement du Territoire, Option Géographie Physique*, 258.
- Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrouf, A., Najjaa, H., & Neffati, M. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone. *Comptes Rendus Chimie*, 13(3), 380-386.
- Misharina, T. A., & Polshkov, A. N. (2005). Antioxidant properties of essential oils: autoxidation of essential oils from laurel and fennel and of their mixtures with essential oil from coriander. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41, 610-618.
- Mohamed, A. E. H. H., El-Sayed, M., Hegazy, M. E., Helaly, S. E., Esmail, A. M., & Mohamed, N. S. (2010). Chemical constituents and biological activities of Artemisia herba-alba. *Records of Natural Products*, 4(1).
- Mohamed, H. R., Amer, M., & Faky, A. S. A. E. (2020). Growth retardation and apoptotic death of tumor cells by Artemisia herba-alba oral administration in Ehrlich solid carcinoma bearing mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 763-772.
- Moussii, I. M., Nayme, K., Timinouni, M., Jamaledine, J., Filali, H., & Hakkou, F. (2020). Synergistic antibacterial effects of Moroccan Artemisia herba alba, Lavandula angustifolia and Rosmarinus officinalis essential oils. *Synergy*, 10, 100057.
- 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. *Journal of Medical Entomology*, 54(6), 1684-1691.
- NCIBI, S. (2020). Spécialité Phytiairie.
- Nevo, E. (1988). Genetic diversity in nature: patterns and theory. *Evolutionary Biology: Volume 23*, 217-246.

- Noosidum, A., Chareonviriyaphap, T., & Chandrapatya, A. (2014). Synergistic repellent and irritant effect of combined essential oils on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *Journal of Vector Ecology*, 39(2), 298-305.
- Norris, E. J., Johnson, J. B., Gross, A. D., Bartholomay, L. C., & Coats, J. R. (2018). Plant essential oils enhance diverse pyrethroids against multiple strains of mosquitoes and inhibit detoxification enzyme processes. *Insects*, 9(4), 132.
- Novato, T. P. L., Araújo, L. X., de Monteiro, C. M. O., Maturano, R., Senra, T. D. O. S., da Silva Matos, R., ... & Daemon, E. (2015). Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 331-335.
- O'Flynn, B. G., Hawley, A. J., & Merkler, D. J. (2018). Insect arylalkylamine N-acetyltransferases as potential targets for novel insecticide design. *Biochemistry & molecular biology journal*, 4(1).
- Olszowy-Tomczyk, M. (2020). Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochemistry reviews*, 19, 63-103.
- Ortiz, C., Morales, L., Sastre, M., Haskins, W. E., & Matta, J. (2016). Cytotoxicity and genotoxicity assessment of sandalwood essential oil in human breast cell lines MCF-7 and MCF 10A. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.
- Ouaritini, Z. B., Chraïbi, M., Benbrahim, K. F., Ez-zriouli, R., Boukhira, S., Darkaoui, N., & Derwich, H. (2016). Phytochemical and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba* from Morocco. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 11, 40-45.
- Outaleb, T. (2016). *Extraits de romarin d'Algérie (Rosmarinus officinalis L. et Rosmarinus tournefortii De Noe)* (Doctoral dissertation, ENSA).
- Öztürk, M., Tümen, İ., Uğur, A., Aydoğmuş-Öztürk, F., & Topçu, G. (2011). Evaluation of fruit extracts of six Turkish Juniperus species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(5), 867-876.
- Pai, Aditi, and Gregor Bucher. "Tribolium." (2019) : 231-241.

- Pandiyan, G. N., Mathew, N., & Munusamy, S. (2019). Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 549-556.
- Papachristos, D. P., & Stamopoulos, D. C. (2002). Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say)(Coleoptera: Bruchidae). *Journal of stored products research*, 38(2), 117-128.
- Pardos, J.A.; Pardos, M. Enzyklopädie der Holzgewächse: Handbuch und Atlas der Dendrologie; Roloff, A., Weisgerber, H., Lang, U.M., Stimm, B., Schütt, P., Eds.; Wiley-Vch Verlag: Weinheim, Germany, 2000; p. 3.
- Pavela, R. (2014). Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) larvae. *Industrial crops and products*, 60, 247-258.
- Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends in plant science*, 21(12), 1000-1007.
- Peach, D. A., Almond, M., Gries, R., & Gries, G. (2019). Lemongrass and cinnamon bark: plant essential oil blend as a spatial repellent for mosquitoes in a field setting. *Journal of Medical Entomology*, 56(5), 1346-1352.
- Pfau, M. (1972). Photochemistry in the field of monoterpenes and related compounds. *Flavour Ind*, 3, 89-103.
- Pino-Otín, M. R., Ballesteros, D., Navarro, E., González-Coloma, A., Val, J., & Mainar, A. M. (2019). Ecotoxicity of a novel biopesticide from *Artemisia absinthium* on non-target aquatic organisms. *Chemosphere*, 216, 131-146.
- Pottier-Alapetite, G. (1981). Flore de la Tunisie. Angiospermes-dicotyledones [...] Gamopétales.
- Prober, S. M., & Brown, A. H. D. (1994). Conservation of the grassy white box woodlands: population genetics and fragmentation of *Eucalyptus albens*. *Conservation Biology*, 8(4), 1003-1013.
- Qin, J. C., Zhang, Y. M., Gao, J. M., Bai, M. S., Yang, S. X., Laatsch, H., & Zhang, A. L. (2009). Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic

fungus isolated from Ginkgo biloba. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(6), 1572-1574.

- Qnais, E. Y., Alatshan, A. Z., & Bseiso, Y. G. (2016). Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects of Artemisia herba-alba essential oil. *J Food Agric Environ*, 14, 20-7.
- Quezel P. &, Santa S., 1962-1963 : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méridionales. Tome I.Ed CNRS. Paris, 1170.
- Ramdani, M., Lograda, T., Silini, H., Zeraib, A., Chalard, P., Figueredo, G., ... & Zerrar, S. (2013). Antibacterial activity of essential oils of Juniperus phoenicea from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(11), 022-028.
- Ramos, S., Oliveira, J., da Câmara, C. A., Castelar, I., Carvalho, A. F., & Lima-Filho, J. V. (2009). Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 376-381.
- Rees, D. P. (2004). *Insects of stored products*. CSIRO publishing.
- Romani, R., Bedini, S., Salerno, G., Ascrizzi, R., Flamini, G., Echeverria, M. C., ... & Conti, B. (2019). Andean flora as a source of new repellents against insect pests: Behavioral, morphological and electrophysiological studies on Sitophilus zeamais (coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 10(6), 171.
- Rösner, J., Wellmeyer, B., & Merzendorfer, H. (2020). Tribolium castaneum: a model for investigating the mode of action of insecticides and mechanisms of resistance. *Current pharmaceutical design*, 26(29), 3554-3568.
- Rotenberg, S. A., Calogeropoulou, T., Jaworski, J. S., Weinstein, I. B., & Rideout, D. (1991). A self-assembling protein kinase C inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2490-2494.
- Rozman, V., Kalinovic, I., & Korunic, Z. (2007). Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of stored products research*, 43(4), 349-355.
- Sandasi, M., Kamatou, G., Chen, W., & Mulaudzi, N. (2023). Agathosma betulina. In *The South African Herbal Pharmacopoeia* (pp. 41-56). Academic Press.

- Santoyo, S., Cavero, S., Jaime, L., Ibanez, E., Senorans, F. J., & Reglero, G. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*, 68(4), 790-795.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., & Saukel, J. (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 1051-1076.
- Sasaki, K., El Omri, A., Kondo, S., Han, J., & Isoda, H. (2013). *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. *Behavioural Brain Research*, 238, 86-94.
- Sathantriphop, S., Achee, N. L., Sanguanpong, U., & Chareonviriyaphap, T. (2015). The effects of plant essential oils on escape response and mortality rate of *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 318-326.
- Seifelnasr, Y. E., Hopkins, T. L., & Mills, R. B. (1982). Olfactory responses of adult *Tribolium castaneum* (Herbst), to volatiles of wheat and millet kernels, milled fractions, and extracts. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 1463-1472.
- Sener, O., Arslan, M., Demirel, N., & Uremis, I. (2009). Insecticidal effects of some essential oils against the confused flour beetle (*Tribolium confusum* du Val)(Col.: Tenebrionoidea) in stored wheat. *Asian Journal of Chemistry*, 21(5), 3995.
- Shao, H., & Zhang, Y. (2017). Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin. *Scientific reports*, 7(1), 5521.
- Sharifian, I., Hashemi, S. M., Aghaei, M., & Alizadeh, M. (2012). Insecticidal activity of essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso against three stored product beetles. *Biharean biologist*, 6(2), 90-93.
- Sharma, M., Grewal, K., Jandrotia, R., Batish, D. R., Singh, H. P., & Kohli, R. K. (2022). Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112514.

- Shaw, K., Wright, K., Wang, J., & Kalnins, P. (2012). P01. 39. Synergism of herbs in classical Chinese medicine: evidence from HPLC. *BMC complementary and alternative medicine*, 12(1), 1-1.
- Sheng, Z., Jian, R., Xie, F., Chen, B., Zhang, K., Li, D., ... & Hong, W. D. (2020). Screening of larvicidal activity of 53 essential oils and their synergistic effect for the improvement of deltamethrin efficacy against *Aedes albopictus*. *Industrial Crops and Products*, 145, 112131.
- Shukla, J. N., & Palli, S. R. (2012). Sex determination in beetles: production of all male progeny by parental RNAi knockdown of transformer. *Scientific reports*, 2(1), 1-9.
- Shukla, J. N., & Palli, S. R. (2012). Sex determination in beetles: production of all male progeny by parental RNAi knockdown of transformer. *Scientific reports*, 2(1), 1-9.
- Singh, A., Zahra, S., & Kumar, S. (2019). In-silico Tools in Phytochemical Research. *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update: Advances in Phytochemical Research*, 351-372.
- Singh, S., & Prakash, S. (2013). Development of resistance in *Tribolium castaneum*, Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) towards deltamethrin in laboratory. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3(8), 1-4.
- Sokoloff, A., 1972. *The Biology of Tribolium*, vols. 1. Oxford University Press, Oxford.
- Sokoloff, A., 1975. *The Biology of Tribolium*, vols. 2. Oxford University Press, Oxford.
- Sokoloff, A., 1978. *The Biology of Tribolium*, vols. 3. Oxford University Press, Oxford
- Soliman, S. A., Hafez, E. E., Al-Kolaibe, A. M., Abdel Razik, E. S. S., Abd-Ellatif, S., Ibrahim, A. A., ... & Elshafie, H. S. (2022). Biochemical Characterization, Antifungal Activity, and Relative Gene Expression of Two *Mentha* Essential Oils Controlling *Fusarium oxysporum*, the Causal Agent of *Lycopersicon esculentum* Root Rot. *Plants*, 11(2), 189.
- Stejskal, V., Hubert, J., Aulicky, R., & Kucerova, Z. (2015). Overview of present and past and pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective. *Journal of Stored Products Research*, 64, 122-132.

- Suthisut, D., Fields, P. G., & Chandrapatya, A. (2011). Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *Journal of Stored Products Research*, 47(3), 222-230.
- Tak, J. H., & Isman, M. B. (2015). Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Scientific reports*, 5(1), 1-10.
- Tak, J. H., & Isman, M. B. (2016). Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. *Pesticide biochemistry and physiology*, 133, 20-25.
- Tak, J. H., & Isman, M. B. (2017). Enhanced cuticular penetration as the mechanism of synergy for the major constituents of thyme essential oil in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Industrial Crops and Products*, 101, 29-35.
- Tak, J. H., & Isman, M. B. (2017). Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- Takaki, I., Bersani-Amado, L. E., Vendruscolo, A., Sartoretto, S. M., Diniz, S. P., Bersani-Amado, C. A., & Cuman, R. K. N. (2008). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. *Journal of medicinal food*, 11(4), 741-746.
- Tatun, N., Vajarasathira, B., TUNGJITWITYAKUL, J., & Sakurai, S. (2014). Inhibitory effects of plant extracts on growth, development and α -amylase activity in the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *European Journal of Entomology*, 111(2).
- Taubert, A., Behrendt, J. H., Sühwold, A., Zahner, H., & Hermosilla, C. (2009). Monocyte-and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Veterinary parasitology*, 164(2-4), 141-153.
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G. J., Leitão, M. C., Vieira, H. L., ... & Santos, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols

is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 131(4), 1443-1452.

- Tavares, L., McDougall, G. J., Fortalezas, S., Stewart, D., Ferreira, R. B., & Santos, C. N. (2012). The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four Juniperus species found in Portugal. *Food chemistry*, 135(2), 562-570.
- Tilaoui, M., Ait Mouse, H., Jaafari, A., & Ziad, A. (2015). Comparative phytochemical analysis of essential oils from different biological parts of Artemisia herba alba and their cytotoxic effect on cancer cells. *PloS one*, 10(7), e0131799.
- Tong, F., & Bloomquist, J. R. (2013). Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 50(4), 826-832.
- Tong, F., & Coats, J. R. (2010). Effects of monoterpenoid insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and ³⁶Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98(3), 317-324.
- Trematerra, P., & Sciarretta, A. (2004). Spatial distribution of some beetles infesting a feed mill with spatio-temporal dynamics of *Oryzaephilus surinamensis*, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. *Journal of Stored Products Research*, 40(4), 363-377.
- Tsai-Turton, M. (2014). Tamoxifen.
- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12(1), 40-53.
- United Nations. Economic Commission for Europe. Secretariat. (2013). *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*. United Nations Publications.
- Vale, N., Silva, S., Duarte, D., Crista, D. M., da Silva, L. P., & da Silva, J. C. E. (2021). Normal breast epithelial MCF 10A cells to evaluate the safety of carbon dots. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(2), 245-253.
- Waliwitiya, R., Belton, P., Nicholson, R. A., & Lowenberger, C. A. (2010). Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor

activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 66(3), 277-289.

- Wang, Q. L., Li, H., Li, X. X., Cui, C. Y., Wang, R., Yu, N. X., & Chen, L. X. (2012). Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. *Food and chemical toxicology*, 50(12), 4348-4355.
- Wang, W., Li, N., Luo, M., Zu, Y., & Efferth, T. (2012). Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*, 17(3), 2704-2713.
- Wangrawa, D. W., Ochomo, E., Upshur, F., Zanré, N., Borovsky, D., Lahondere, C., ... & Sanon, A. (2022). Essential oils and their binary combinations have synergistic and antagonistic insecticidal properties against *Anopheles gambiae* sl (Diptera: Culicidae). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 42, 102347.
- Weatherston, J. (1967). The chemistry of arthropod defensive substances. *Quarterly Reviews, Chemical Society*, 21(3), 287-313.
- Weidner, H., & Rack, G. (1984). *Tables de détermination des principaux ravageurs des denrées entreposées dans les pays chauds: (titre de dos: Principaux ravageurs des denrées entreposées)*. Deutsche Gesellschaft für technische Zusammenarbeit.
- Wondatir, Z., Adie, A., & Duncan, A. J. (2015). Assessment of livestock production and feed resources at Robit Bata, Bahir Dar, Ethiopia.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, 92, 133-147.
- Yezerski, A., Ciccone, C., Rozitski, J., & Volingavage, B. (2007). The effects of a naturally produced benzoquinone on microbes common to flour. *Journal of chemical ecology*, 33, 1217-1225.
- 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.

- 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.
- Zaouali, Y., & Boussaid, M. (2008). Isozyme markers and volatiles in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L.(Lamiaceae): A comparative analysis of population structure. *Biochemical systematics and Ecology*, 36(1), 11-21.
- Zaouali, Y., Messaoud, C., Salah, A. B., & Boussaid, M. (2005). Oil composition variability among populations in relationship with their ecological areas in Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. *Flavour and fragrance journal*, 20(5), 512-520.
- Zhao, C. L., Chik, W. I., & Zhang, H. J. (2022). Bioprospecting and bioassay-guided isolation of medicinal plants—A tool for drug discovery. In *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (pp. 511-537). Elsevier.

Références électroniques

Site Elec 01 : https://www.meditflora.com/flora/juniperus_phoenicea.htm

Site Elec 02: <https://www.pinterest.com/pin/20618110783948468/>

Site Elec 03: <https://maps.google.com/>

Site Elec 04: <https://www.guidechem.com/>

Site Elec 05: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Site Elec 06: <https://algaeresearchsupply.com/blogs/news/the-extraordinary-life-of-brainy-briny>

● ● ● ———

Résumés

———— ● ● ●

المساهمة في إعداد مبيدات حشرية بيولوجية إنطلاقاً من الزيوت الأساسية لنباتات الشيح
(*Artemisia herba alba* Asso) و العرعار (*Juniperus phoenicea* L.) و إكليل الجبل
(*Rosmarinus officinalis* L.) ضد حشرة خنفساء الدقيق الحمراء *Tribolium castaneum*
(Herbst, 1797).

ملخص:

يساعد استخدام مخاليط الزيوت الأساسية لتحسين فعاليتها على تقليل كمية المركبات الحيوية المستعملة وكذا الحد من مقاومة الحشرات للمبيدات الحشرية الإصطناعية. تهدف هذه الدراسة إلى تطوير مبيدات حيوية ضد حشرة خنفساء الدقيق بإستعمال الزيوت الأساسية المستخلصة من نباتات الشيح (أ) و العرعار (ب) و إكليل الجبل (ج)، بالإضافة إلى خلطها الثنائية وخليط ثلاثي. كشفت نتائج دراسة التركيبات الكيميائية باستخدام كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب قياس الطيف الكتلي أن كل عينة كانت تحتوي علي أحد المركبات التالية : α -pinene Car-3-in-5-one، [2.2.1] trimethylbicyclo exo-2,77- Camphor وheptan- بأعلى تركيز. وقد أجري تقييم لسميتها وفعاليتها الطاردة ضد حشرة خنفساء الدقيق من خلال اختبارات التبخير و التنافر. بعد 24 ساعة من العلاج، أظهر زيت الشيح أقوى تأثير كمبيد حشري. غير أن أكثر المخاليط سمية هي (H (3 C : 1A) و (L (1B:1C) و (K (1B:3C) وذلك بتسجيل تراكيز قاتلة لنصف عدد الحشرات (DL_{50}) مساوية لـ 64.99 و 68,98 و 74.76 ميكروليتر/لترهواء، على التوالي. بعد 96 ساعة، أظهرت الخلائط (K و (I (1C : 1A) و (L أعلى فعالية وبشكل تآزري DL_{50} = 55,6 و 57,63 و 58,46 ميكروليتر/لترهواء، على التوالي. طوال مدة العلاج لم تتجاوز المدة اللازمة لقتل 90% من الحشرات لدى أقل العينات سمية عتبة 19.20 ساعة. بالمقابل أظهر كل من زيتي العرعار والشيح فعالية طاردة للحشرة جد.عالية، في حين أن أكثر المخاليط طاردة للحشرة كانت F و D و E و H وقد سجلنا التراكيز اللازمة لتنفير 90% من الأفراد 1.25 و 2.99 و 3.46 و 3.83 cm^2/nL على التوالي. وقد أظهرت جميع العينات تأثيرات تآزرية باستثناء التركيبات I و (G (1C: 3A). بينت تحاليل الإلتحام الجزيئي لـ 24 مركباً تم تحديدها سابقاً بواسطة GC-MS مع إنزيم N-Arylalkylamine acyltransferase من حشرة الدقيق، وجود روابط بين هذه المركبات والإنزيم محل الدراسة كما أن طاقة الربط جد منخفضة. أظهرت تحليلات سمية الزيوت الأساسية ومخاليطها ضد *A. salina* و MCF10a أن بعض العينات غير سامة للخلايا MCF-10A، ومع ذلك فقد أظهرت جميع العينات سمية ضد *A. salina*. لهذا الغرض، الخلائط التآزرية مناسبة كبداية للمعالجات الكيميائية للسيطرة على خنفساء الدقيق، ولكن الاختبارات الميدانية ضرورية للتحقق من نتائجنا.

الكلمات المفتاحية: خنفساء الدقيق، الزيوت الأساسية، الشيح، العرعار، إكليل الجبل، تآزر، التأثيرين الطارد والسمي، الإلتحام الجزيئي، *Artemia salina*، MCF10a

Contribution to the development of bio-insecticides based on the essential oils of
Artemisia herba alba Asso, *Juniperus phoenicea* L. and *Rosmarinus officinalis* L., against
Tribolium castaneum (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae).

Abstract

Using mixtures of essential oils (EO) to improve their effectiveness helps minimize insect resistance to synthetic insecticides and reduce the amount of the applied bioproducts. The purpose of this study is to develop bioinsecticides based on *Artemisia herba alba* Asso (A), *Juniperus phoenicea* L (B), and *Rosmarinus officinalis* L (C), as well as their binary mixtures and ternary mixture, against adults *Tribolium castaneum* herbst. Results of chemical compositions using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) revealed that each sample was dominated by one of the following compounds: Car-3-in-5-one, α -pinene, exo-2,7,7- trimethylbicyclo[2.2.1]heptan- and Camphor. Evaluation of their toxicities and repellent efficacy against adults of *T. castaneum* was conducted through fumigant and repellent tests. After 24 hours of treatment, *A. herba alba* oil showed the most powerful insecticidal effect. However, the most toxic mixtures were H (3 C:1A), L (1B:1C), with K (1B:3C) (LD₅₀=64.99, 68.98 and 74.76 μ L/L of air, respectively). After 96 h, the synergistic mixtures K, I (1C: 1A) and L appeared to be the most powerful (LD₅₀=55.6, 57.63 and 58.46 μ L/L of air, respectively) throughout four days. LT₉₀ values at 83.66 μ L/L of air did not exceed the 19.20 h limit for the least potent mixture. *A. herba alba*, *J. phoenicea* EOs reported high repellent potential against *T. castaneum* adults. While the most repellent mixtures were F (1B, 1A), D (1B, 3A), E (3B, 1A) and H, showing RD₉₀ values of 1.25, 2.99, 3.46 and 3.83 nL/cm², respectively. All samples showed synergistic effects with the exception of combinations I and G (1C: 3A). In silico study of inhibitory powers of 24 compounds previously identified by GC-MS against the enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase of *T. castaneum* by molecular docking showed intermolecular interactions with ligands with very low bonding energies. Toxicological analyses of EOs and their mixtures against MCF10a and *Artemia salina* cells have shown that some samples are non-toxic to MCF-10A cells, however all samples have shown toxicity against *A. salina*. For this purpose, synergistic mixtures may be suitable as alternatives to chemical treatments for the control of *T. castaneum*, but field tests are necessary to validate our results.

Keywords: *Artemisia herba alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L, *Rosmarinus officinalis* L, Essential oils, Synergy, *Tribolium castaneum*, insecticide and repellent effects, MCF 10A, molecular docking, *Artemia salina*.

Contribution à l'élaboration de bio-insecticides à base des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L. et *Rosmarinus*

***officinalis* L., contre *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera : Tenebrionidae).**

Résumé

L'utilisation de mélanges d'huiles essentielles (HE) pour améliorer leur efficacité aide à minimiser la résistance des insectes aux insecticides synthétiques et à réduire les quantités de bioproduits appliqués. Cette étude vise à élaborer des bioinsecticides à base d'HEs d'*Artemisia herba alba* Asso (A), *Juniperus phoenicea* L (B), et *Rosmarinus officinalis* L (C) ainsi que leurs mélanges binaires et un mélange ternaire, contre les adultes *Tribolium castaneum* herbst. Les résultats de l'étude des compositions chimiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), ont révélé que chaque échantillon était dominé par l'un des composés suivants : Car-3-en-5-one, α -pinene, exo-2,7,7- trimethylbicyclo[2.2.1]heptan- et Camphor. L'évaluation de leurs toxicités et de leur efficacité répulsive contre les adultes de *T. castaneum* a été menée par des tests de fumigation et de répulsion. Après 24 h de traitement, l'huile d'armoise a montré l'effet insecticide le plus puissant. Cependant, les mélanges les plus toxiques étaient H (3 C :1A), L (1B:1C), avec K (1B:3C) (DL_{50} = 64,99, 68,98 et 74,76 μ L/L d'air, respectivement). Après 96 h, les mélanges synergiques K, I (1C : 1A) et L semblaient être les plus puissants (DL_{50} = 55,6, 57,63 et 58,46 μ L/L d'air, respectivement) pendant toute la durée du traitement. Les valeurs de LT_{90} à la concentration 83,66 μ L/L d'air n'ont pas dépassé la limite de 19,20 h pour le mélange le moins puissant. Les HEs de genévrier et d'armoise ont rapporté un potentiel insectifuge très important. Tandis que les mélanges les plus répulsifs étaient F (1B, 1A), D (1B, 3A), E (3B, 1A) et H, montrant des valeurs de RD_{90} de 1,25, 2,99, 3,46 et 3,83 nL/cm^2 , respectivement. Tous les échantillons ont montré des effets synergiques, à l'exception des combinaisons I et G (1C : 3A). L'étude *In silico* des pouvoirs inhibiteurs de 24 composés préalablement identifiés par GC-MS contre l'enzyme Arylalkylamine N-acyltransferase de *T. castaneum* par docking moléculaire a montré des interactions intermoléculaires avec les ligands montrant ainsi des énergies de liaisons très basses. Des analyses toxicologiques des HEs ainsi que leurs mélanges contre les cellules MCF10a et *Artemia salina*, ont montré que certains échantillons sont non toxiques pour les cellules MCF-10A, cependant les tous les échantillons ont montré une toxicité contre *A. salina*. A cet effet, les mélanges synergiques pourraient convenir comme alternatives aux traitements chimiques pour le contrôle de *T. castaneum*, mais des tests sur terrain sont nécessaires pour valider nos résultats.

Mots clé : *Artemisia herba alba* Asso, *Juniperus phoenicea* L, *Rosmarinus officinalis* L, Huiles essentielles, Synergie, *Tribolium castaneum*, effets insecticide et répulsif, MCF 10A, docking moléculaire, *Artemia salina*.

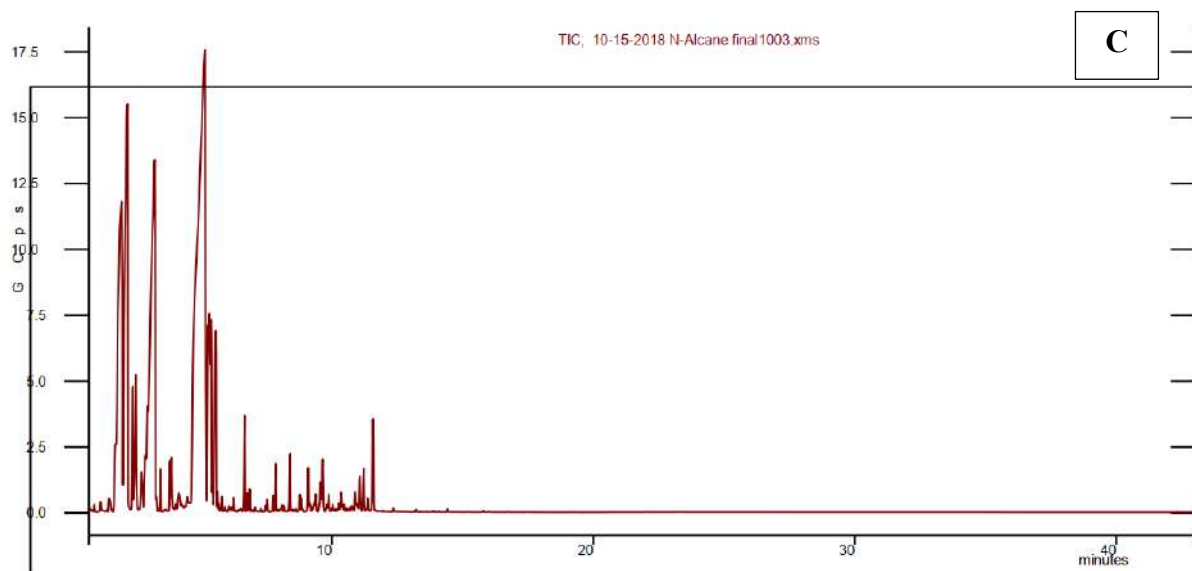
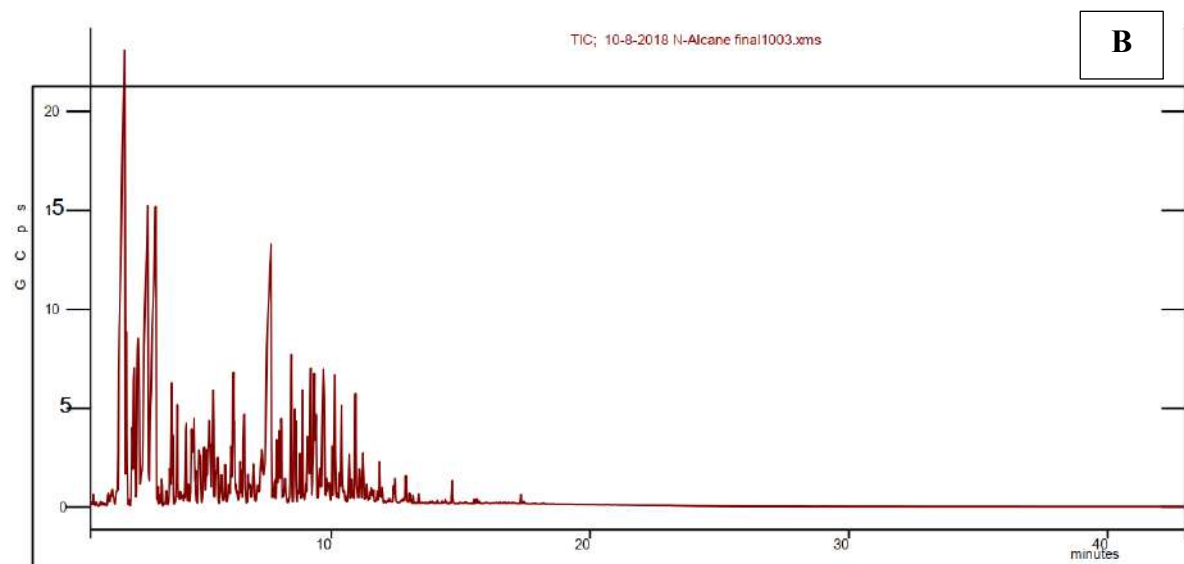
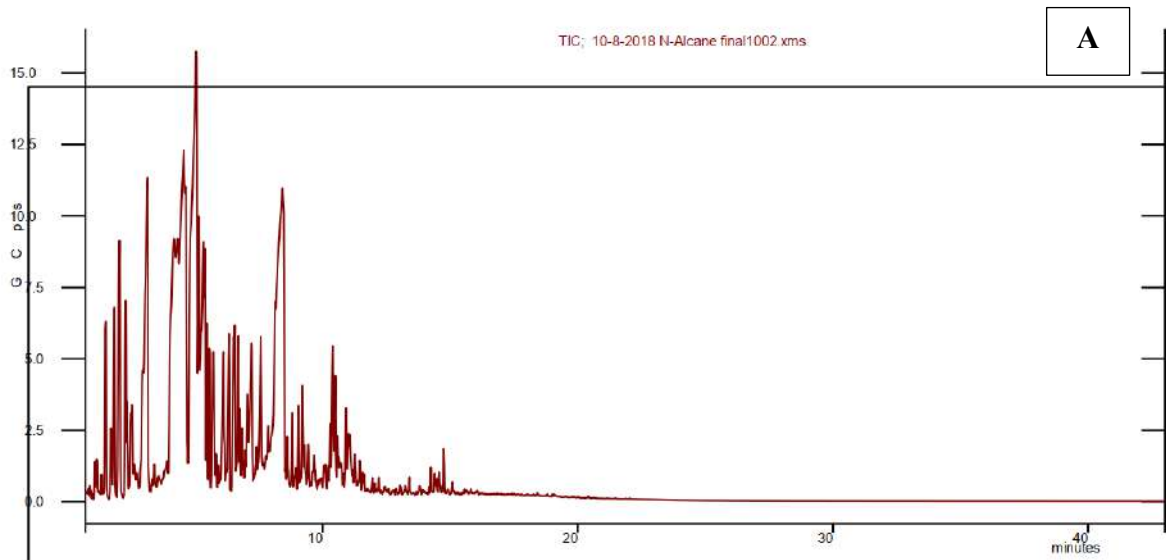
● ● ● ———
Annexe
————— ● ● ●

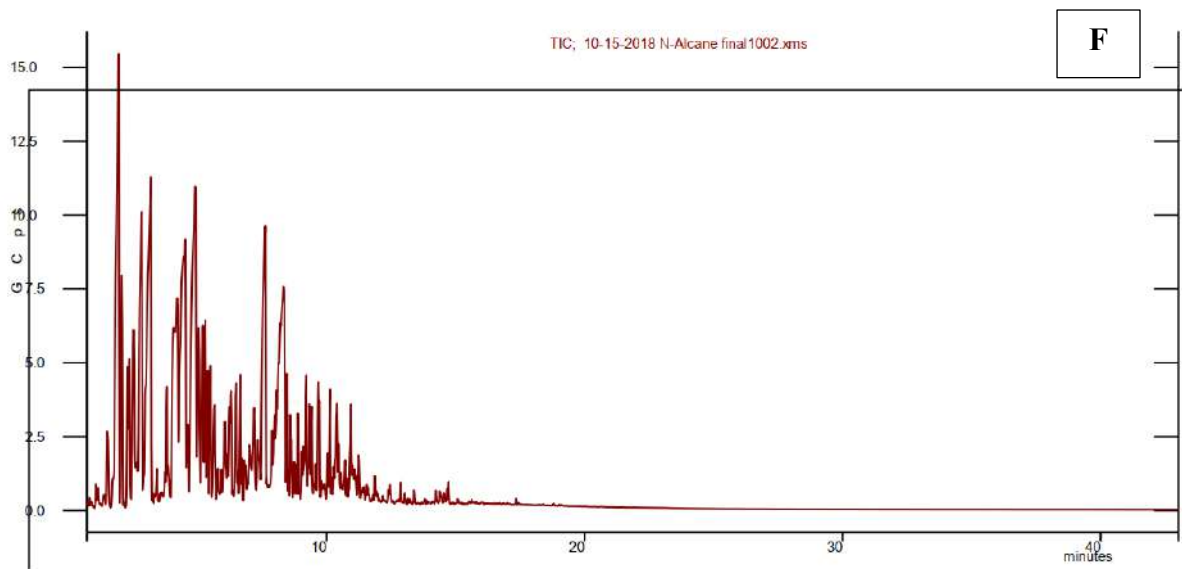
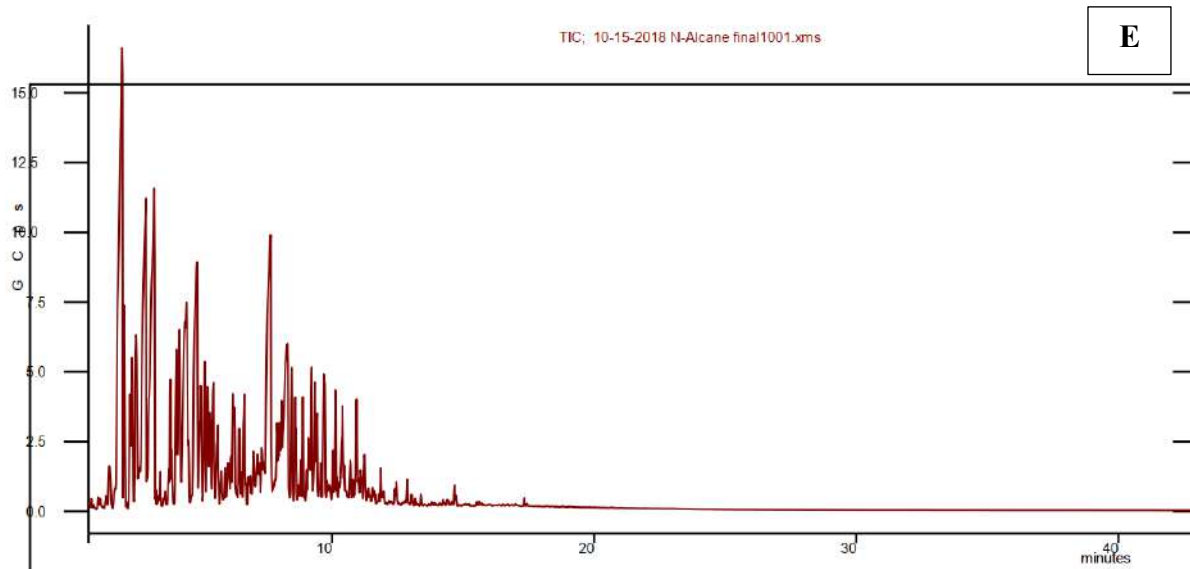
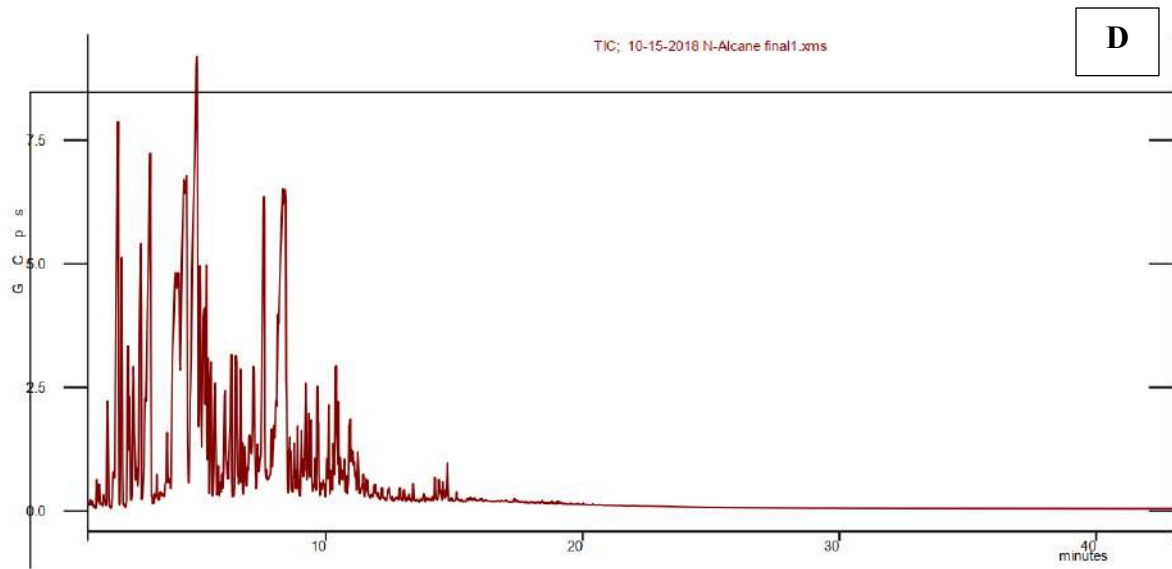


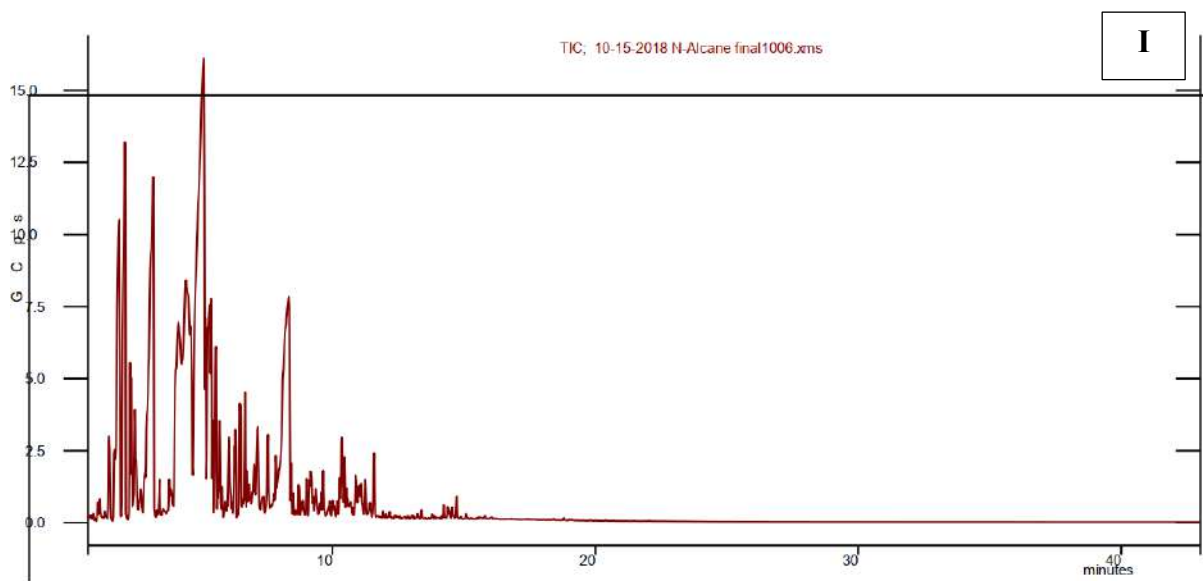
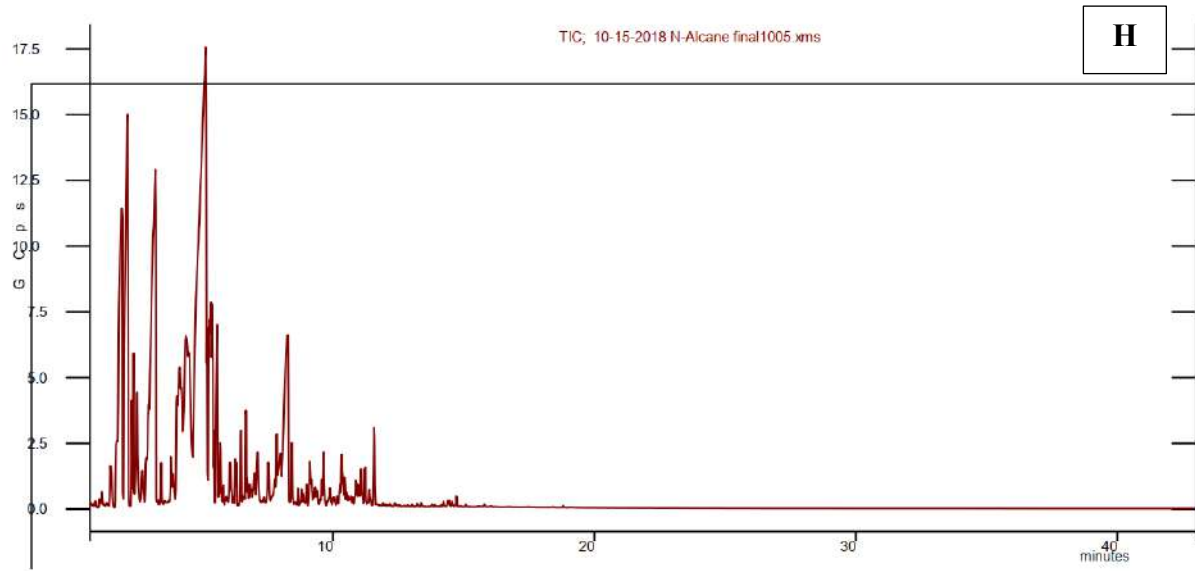
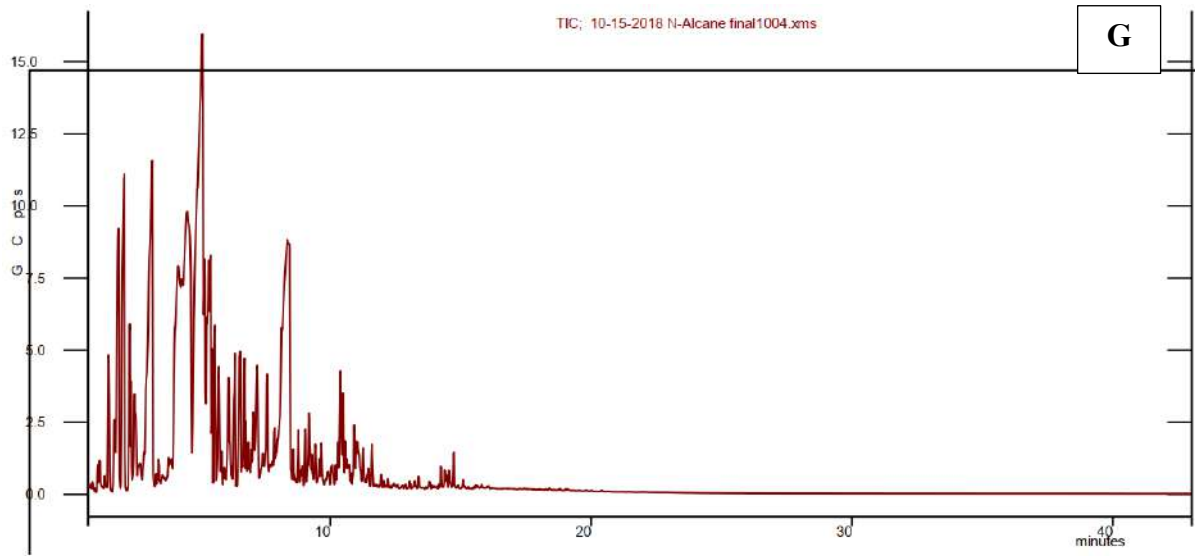
Figure 01 : Flacon utilisé lors des tests de toxicité par inhalation.

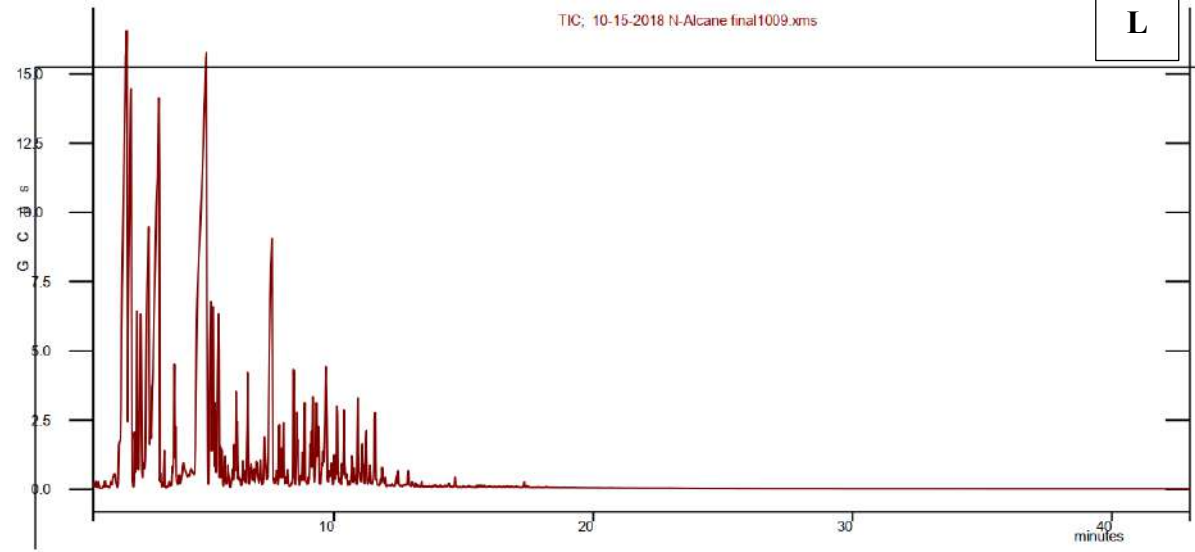
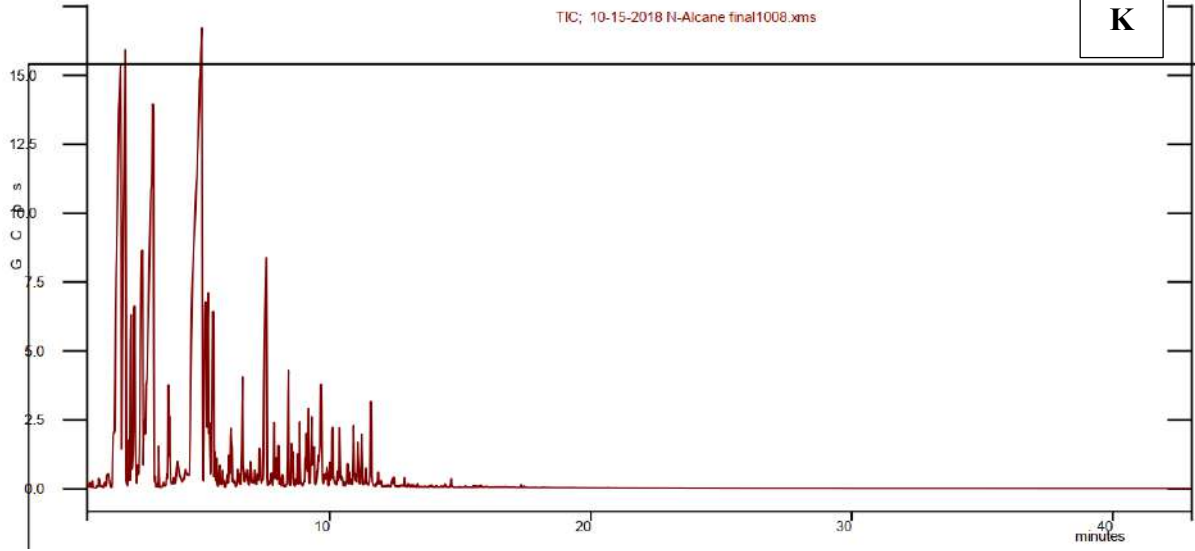
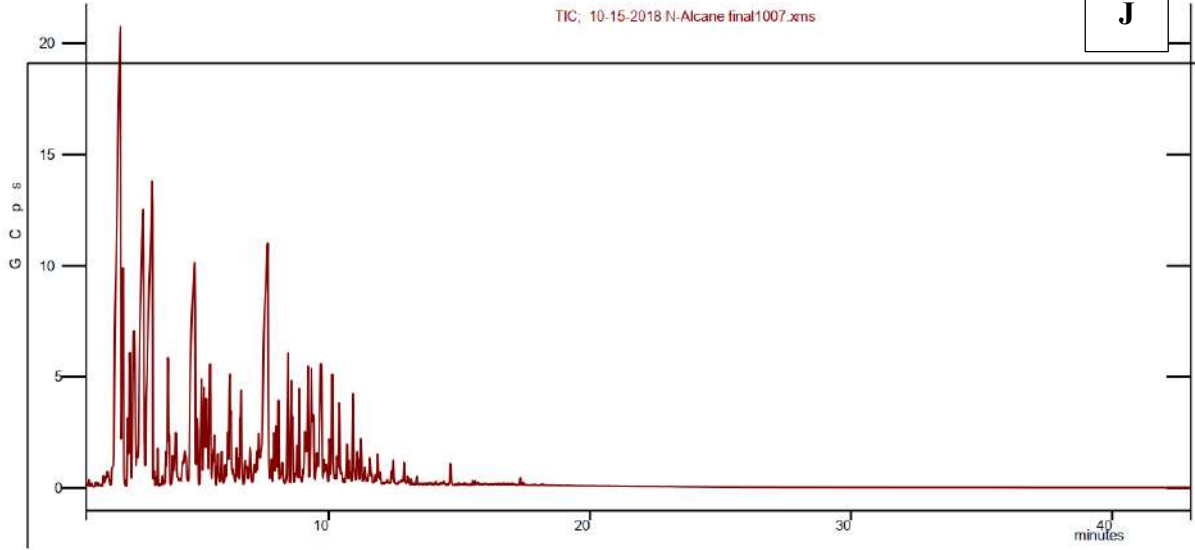


Figure 02 : a. Pupae mâles et femelles de *T. castaneum*. b. Adultes mâles et femelles émergés (de 0 à 7 jours).









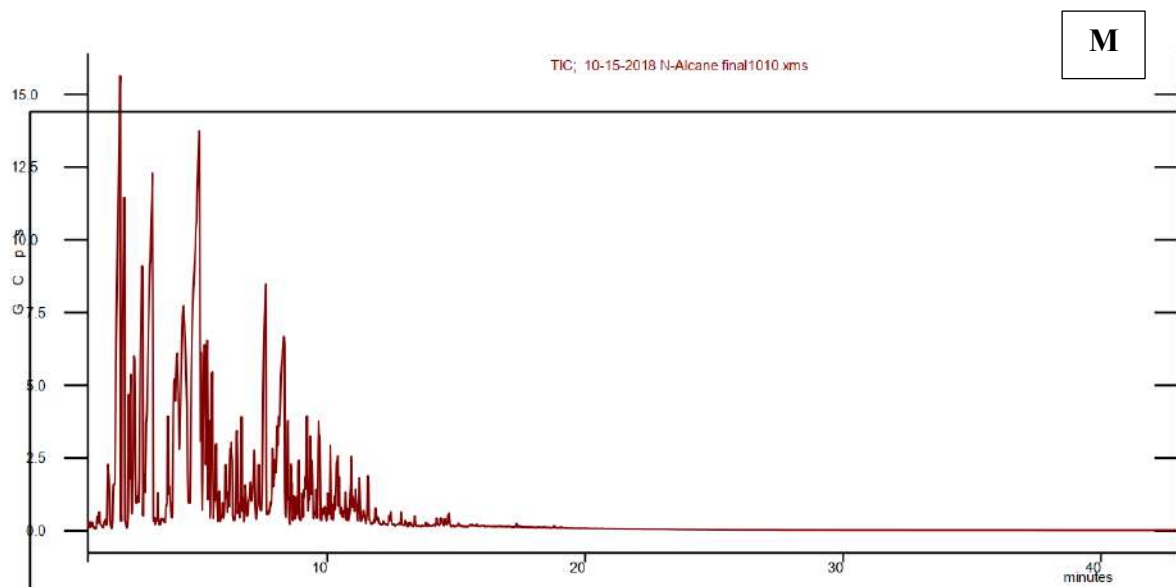


Figure 03 : Chromatogrammes de GC-MS

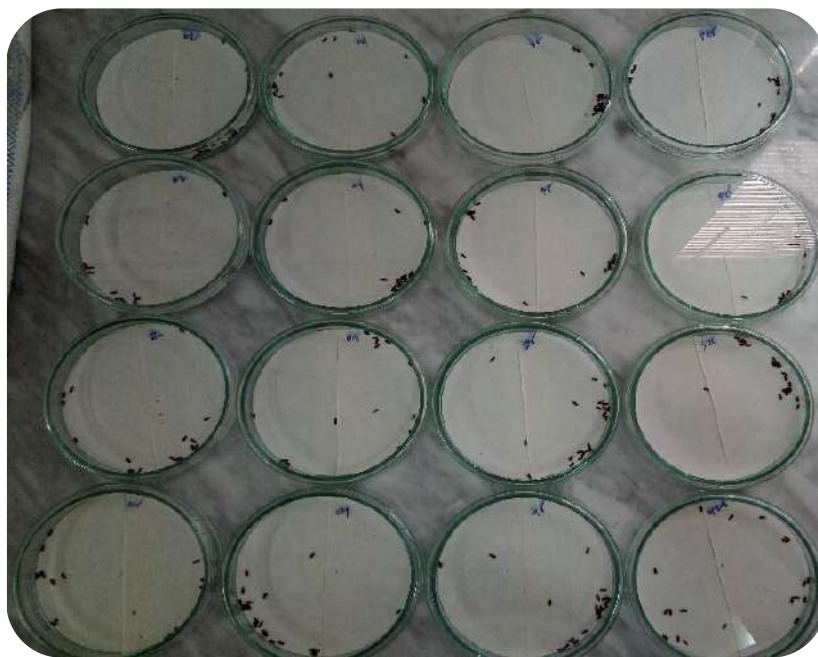


Figure 04 : Résultats de test de répulsion après 30 min de traitement par les HEs et leurs mélanges.

● ● ● ———
Publications
———— ● ● ●



RESEARCH ARTICLE

Chemical compositions, Fumigant and Repellent Activities, of Essential oils from three Indigenous medicinal plants and their mixture, against stored grain pest, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae)

**Naima Boukraa^{1,2*}, Segni Ladjel^{1,3}, Mohamed Bilal Goudjil^{1,3}, Amar Eddoud^{4,5},
Kifah Waleed Mustafa Sanori⁶**

¹Kasdi Merbah University, Faculty of Applied Sciences, Process Engineering Laboratory, Ouargla, Algeria.

²Kasdi Merbah University, Faculty of Natural Sciences and Life Sciences, Biological Sciences Department, Ouargla, Algeria.

³Kasdi Merbah University, Faculty of Applied Sciences, Department of Process Engineering, Ouargla 30000, Algeria.

⁴Kasdi Merbah University, Faculty of Natural Sciences and Life Sciences, Department of Agronomic Sciences, Ouargla, Algeria.

⁵Kasdi Merbah University, Faculty of Natural Sciences and Life Sciences, Saharan bio-resources laboratory, Ouargla, Algeria.

⁶Universiti Sains Malaysia, School of Languages Literacies and Translation, Penang, Malaysia.

*Corresponding Author E-mail: naimaaboukraa@gmail.com

ABSTRACT:

The chemical composition of the essential oils (EOs) of *Artemisia herba-alba* Asso, *Rosmarinus officinalis* L and *Juniperus phoenicea* L and its fumigant and repellent activities against *Tribolium castaneum* (Herbst) were investigated as well as their mixture. Dried leaves and flowers were subjected to hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus and the chemical composition of the volatile oils was studied by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A total of 117 components were identified from the three EOs and their mixture. The main compounds identified for EOs of *A. herba alba*, *R. officinalis*, *J. phoenicea* and the mixture were Car-3-en-5-one (12.51%), Camphor (34.37%), α -Pinene (15.49%), and camphor (13.95%), respectively. Interestingly we discovered that the EO extracted from *A. herba alba* from Khenchela had a new chemotype with the appearance of new compounds in the mixture of EOs. Results of fumigant toxicity showed that after 24 h exposure time, all EOs had pronounced toxicity against *T. castaneum*, with LC₅₀ value of 107.199, 155.724 and 156.589 μ l/l air for *A. herba-alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis*, respectively, while the LC₅₀ of the mixture was 131.570 μ l/l air. However, at the concentration 2 μ l and after 30 min exposure time, the EOs of *A. herba alba* and *J. phoenicea* showed significantly more repellent effects up to 100.00 \pm 0.00 and 90.00 \pm 10.00%, respectively, followed by the mixture and the *R. officinalis* EO with the percentages of repulsion equal to 76.67 \pm 11.55 and 41.67 \pm 10.41%. Data analysis by CompuSyn showed that the synergy, antagonism or additive effect of the EOs in both tests depend on the concentration of the bioinsecticides and the exposure time. The results indicated that the tested EOs and their mixture had the potential to be developed as bioinsecticides and repellent for the control of *T. castaneum* adults.

KEYWORDS: *Tribolium castaneum*, Essential oils, GC-MS, Bioinsecticide, Fumigant and Repellent activities.

INTRODUCTION:

Stored-grain insect pests damage agricultural stored products in granaries as well as storehouses and account worldwide loss reaches up to 10-40 % annually^{1,2,3}. The continuous increasing pressure of human population expansion has also created a critical problem of food

Received on 29.07.2020

Modified on 19.08.2020

Accepted on 12.09.2020

©AJRC All right reserved

Asian J. Research Chem. 2020; 13(6):455-464.

DOI: 10.5958/0974-4150.2020.00081.4

scarcity¹. In addition, the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) is one of the major pests of stored product in tropical and semitropical areas^{4,5,6}. The secreta of *T. castaneum* can cause: flour agglomeration, change in the color and as a result it goes bad. added to that, the secreta contains the benzoquinone which is a kind of carcinogenic substance. It has the characteristics of rapid reproduction, strong adaptation, and worldwide distribution. This pest causes extensive loss of wide range of commodities including grain, flour, peas, beans, cacao, nuts, dried fruits, and spices, but milled grain products like flour appear to be their preferred food^{4,6,7,8,9}. In such situation, protection for stored grain and agricultural products against insect infestation is a must¹⁰. Synthetic chemical insecticides and fumigants are commonly used to control pestiferous insects throughout the world⁶. However; the use of synthetic insecticides and fumigants raised concerns which include chronic poisoning of applicators, farmworkers, and even consumers; development of resistance and resurgence in pestiferous insect populations, adverse effects on the environment such as ozone depletion and pollution.^{5,11,12}. Therefore, it is an utmost priority to search for alternatives insecticides, which are deem environmentally safe, biodegradable and specific against these pests³. Amongst such plant-derived products, the use of essential oils (EOs) extracted from aromatic plants to control these pests has been investigated and is well documented, since last two decades^{14,3}. EOs are a complex mixture of volatile compounds produced as secondary metabolites¹⁵. Some studies have assessed the ability of the EOs and their constituents as fumigants and repellents against a number of insect pests^{2,14}, while some formulations of EOs are in use as bioinsecticides¹, whereby having the advantages over conventional fumigants in terms of low mammalian toxicity, easy biodegradability and local availability^{5,6,4}.

The present study was carried for to identification of chemical constituents as well as determining the fumigant and repellent activities of the EOs of *Artemisia herba-alba* Asso (Asteraceae), *Rosmarinus officinalis* L (Lamiaceae), and *Juniperus phoenicea* L (Cupressaceae) against the red flour beetle *T. castaneum* (Herbst), alone and together, for evaluating their synergistic, antagonistic or additive effects and the possible interactions between chemical constituents of these oils. The selection of species was made on the basis of their abundance and availability in Algeria.

MATERIAL AND METHODS:

Plant material:

Leaves and flowers of *R. officinalis* L, *J. phoenicea* L and *A. herba Alba* Asso were harvested during September 2017 from the region of Khenchela in East of

Algeria. Taxonomic authentication was performed by Plant taxonomists in the Department of Agronomy at Kasdi Merbah University, Ouargla, Algeria. Collected samples were dried in the shade, at room temperature (20-25°C) under good ventilation after that woody stems were separated.

Extraction of EOs:

EOs were obtained by steam distillation. 100g of air-dried plant material of each individual species was put into water (1:10 w/v plant material/water volume ratio) for 3 hours, using a Clevenger-type apparatus according to the method recommended in the European Pharmacopoeia¹¹. Anhydrous sodium sulphate was used to remove water after extraction. The resulting EOs were kept in separate glass flasks at 4°C in dark condition for further analysis. The EO contents (%) were expressed as volume of EO vs weight of fresh leaves (v/w).

Rearing of test insects:

Red flour beetles (*T. castaneum* Herbst) were collected from infested grains purchased from local market and brought to the laboratory; and its identity was confirmed by Pr. Sekour Makhlof, Department of agronomy, faculty of Natural Sciences and Life Sciences, Kasdi Merbah University, Ouargla, Algeria.

Insect laboratory culture were established in glass containers containing a mixture of disinfected wheat flour and beer yeast at a ratio of 10:1(w: w), under controlled temperature 29±1°C and 70–8% relative humidity in darkness following procedures by Liang *et al.* (2017)⁶. Adult unsexed insects, 7-14 days old, were used for subsequent experiments.

Gas Chromatography mass spectrometry (GCMS):

This step was carried out at Process Engineering Laboratory, Kasdi Merbah University Ouargla, to qualify and quantify the chemical composition of the samples. The chromatographic analysis of the EOs and their mixture was performed with a typical gas chromatograph (Bruker SCION 436 GC) coupled to a mass spectrometer. Fragmentation is performed by electronic impact at 70 eV. The column used is a HP-5MS capillary column (15m x 0.25mm). The film thickness is 0.25µm. The stationary phase of the column consists of: 5% Phenyl and 95% dimethylpolysiloxane.

Operating conditions are indicated as the following:

Injector temperature (1:50 split mode): 250°C
Temperature programming: 70°C to 280°C at 10°C/min;
The vector gas used is Helium with a flow rate of 1.5 ml/min.

The temperatures of the quadripole source are set at 250°C and 220°C, respectively. The linear retention indices (RI) for all compounds were determined using

nalkanes as standards. The identification of different constituents was achieved by comparing their mass spectra with those of the reference products contained in available computerized libraries (NIST and Wiley 2014).

Fumigant effect:

The EOs and their mixture were tested for their fumigant activity on mortality of *T. castaneum* adults, following the method of Papachristos et Stamopoulos (2002)¹⁶ with slight modifications. Glass jars of 60 mL capacity with screwed plastic caps were used as exposure chambers. Twenty 7-14-day-old *T. castaneum* adults were placed at the bottom of each container to expose them to the various concentrations of fumigants. A small piece of cotton was attached to the underside of the screw cap to serve as a diffuser, on which varying doses (2.5, 5, 10 and 20 μ l) of fumigants were applied to achieve final concentrations of 44.66, 83.33, 166.66 and 333.33 μ l/l of air respectively, with respect to the volume of the jars, while the control diffuser was left untreated. Thereafter, the jars were kept in the ambient conditions of temperature and humidity. Insect mortalities were determined and calculated after 24, 48, 72 and 96 hours of exposure time. Test insects were considered dead when no leg or antennal movements were observed. Three replicates were performed for each dose and control.

Repellent effect:

Repellency effects of the EOs against *T. castaneum* were assessed by the area preference method described by Jilani and Saxena. (1990)¹⁷. Range-finding studies were run to determine the appropriate testing concentrations. The solutions of EOs were prepared by dissolving 0.25, 0.5, 0.1 and 2 μ l of plant EO in 0.5 ml acetone. Acetone alone was used as the negative control.

Whatman filter papers (diameter 9cm) were cut into two equal halves and 0.5ml of each concentration was applied separately on one half of the filter paper as uniformly as possible by using a micropipette. The other half of the filter paper was treated with an equal volume of acetone as a control. The treated and control paper disc were air-dried to remove the solvent. Both treated and untreated sides were attached to their opposites with cellophane tape and placed at the bottom in glass Petri dishes (9cm in diameter). Twenty unsexed adults of *T. castaneum* were released at the center of each filter paper disc and the lid was sealed with Parafilm®. Three replicates set for each concentration, and insects were used only once. Counts of the insects present on each strip were made 30 min from the beginning of experiment. Percentage Repellency (**PR**) of each volatile oil and mixture was calculated using the following formula¹⁸;

$$\text{PR} = \text{Nc} - \text{Nt} / [(\text{Nc} + \text{Nt})] \times 100$$

Where, **Nc** is the number of insects present in the negative control half paper after the exposure interval and **Nt** is the number of insects present in the treated one after the exposure interval.

The averages were then assigned to different classes (0 to V) using the following scale (percentage repellency). Class, % repellency: 0, >0.01 to 0.1; I, 0.1–20.0; II, 20.1–40.0; III, 40.1–60.0; IV, 60.1–80.0; and V, 80.1–100¹⁹.

Data analysis:

The statistical analysis was performed using the SPSS software (version 24). The means were compared by the ANOVA test, followed by a multiple comparison using the Tukey test. The value of $P > 0.05$ were considered significant. The concentration-mortality data were analyzed by Probit analysis 21, to estimate lethal concentration values LC₅₀ using the same software. The effect of the combination of the three EOs was evaluated using CompuSyn® software version 1.0 22, which allows the calculation of the combination index (IC). The choice of this method is based on its sensitivity for the categorization of qualitative analysis of interactions between substances. The effects of the combination of EOs were classified according to IC values based on the categories proposed by 23: synergy (IC < 0.70); moderate synergy (IC 0.70 to 0.90); additive (IC 0.90 to 1.10); moderate antagonism (IC 1,10–1,45) and antagonism (IC > 1,45).

RESULTS AND DISCUSSIONS:

Chemical composition:

The yields of yellow EOs from *R. officinalis*, *A. herba alba* and *J. phoenicea* were 0.4, 0.88 and 0.99 % (v/w) respectively. The composition of the EOs and their mixture have been summarized in (Table 1). Total of 117 constituents were identified for the three EOs and their mixture (accounting for 88,29-94.09% of the samples). It was found that EO from *A. herba alba* from Khenchela had a new chemotype with Car-3-en-5-one (12.51%) as major constituent, followed by Camphor (12.18%) and 1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl) ethanol (8.08%). These results are compared with others obtained in Algeria, which indicate that EO of *A herba alba* harvested from Tamanrasset had Davanon chemotype²⁴. while, EO from Saida and Djelfa had camphor chemotype^{25,26}. Furthermore, Badreddine and Baouindi (2016)²⁷; Qnais et al. (2016)²⁸; Sharifian et al. (2012)¹⁴ reported that EO of *A. herba alba* from Tunisia, Jordan and Iran respectively, had β -thujone chemotype; while the EO from Morocco had α -terpineol chemotype²⁹. Moreover, EO of *R. officinalis* was composed of Camphor (34.37%) as major constituent, along with eucalyptol (14.46%) and

α -pinene (12.94%). All these compounds were *R. officinalis* from Tunisia 30, Spain 31 and even from previously detected as major constituent in EOs of China 32, with different proportions.

Table 01: Retention time (RT), chemical constituents of EOs extracted from *A. herba alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* and their mixture.

RT (min)	Compounds	A	B	C	D
1.488	1-2,5-dimethylnonane			0,26	
1.498	Santolina triene	1,11			0,74
1.536	2-Bornene		0,37		
1.829	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethy	1,41			
2.010	.alpha.-Pinene		15,49	12,94	8,36
2.087	Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-me		1,54		
2.181	Camphene	2,28		11,89	4,09
2.382	.beta.-Pinene	0,41	1,68	1,18	0,95
2.489	(E)- α -Bergamotene	0,58			
2.504	.beta.-Myrcene			1,74	1,93
2.529	Hemimellitene	0,68			
2.538	1-Vinyl-5,5dimethyl[2.1.1]bicyclohexane		3,38		
2.718	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 2-methyl-5-(1-m			0,7	
2.900	3- δ -Carene	0,13	9,63		3,9
2.955	3,7,7-Trimethyl-1,3,5-cycloheptatriene	1,11	0,72	1,68	
3.207	4-Thujanol				9,02
3.214	Sabinen	1,24	9,51		0,81
3.219	Eucalyptol	6		14,46	
3.446	.gamma.-Terpinene		0,17	0,25	0,13
3.837	α -Terpinolene		1,53		1,01
3.870	m-Cymenene		0,36	0,53	0,46
4.048	Linalool		0,98	0,44	
4.171	Filifolone	6,44			1,7
4.327	Thujone	3,66	0,01		3,19
4.397	Camphenol, 6-		0,77		0,13
4.428	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	2,03			7,03
4.554	1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol	8,08			
4.614	L-Pinocarveol		0,85		
4.641	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl	2,17			
4.698	trans-Verbenol		1,01		
4.889	D-Pinocamphone		0,46		
4.931	α -Phellandren-8-ol		0,52		
5.085	(S)-cis-Verbenol		0,82		
5.113	Bicyclo[5.1.0]octane, 8-(1-methylethylid				1,06
5.142	Camphor	12,18		34,37	13,95
5.147	2-Pentadecen-4-yne, (Z)-	2,18		0,08	
5.250	Isoborneol				2,19
5.290	Crypton		1,21		
5.331	endo-Borneol	3,42		4,11	
5.377	L-4-terpineneol		0,38	2,4	
5.386	Terpinen-4-ol	1,57			1,56
5.414	m-Cymenol		0,5	0,24	0,73
5.463	Ethanone,1-(6,6-dimethylbicyclo[3.1.0]h	1,2	0,29		0,41
5.557	.alpha.-Terpineol	1,18			
5.558	Terpineol		1,47	2,82	1,49
5.623	Isothujol				0,18
5.715	E-Piperitol	1,52	0,54		0,72
5.750	trans-3(10)-Caren-2-ol		0,44	0,12	
5.900	cis-p-mentha-1(7),8-dien-2-ol		0,42		
5.939	(R)-citronellol				0,24
6.105	(E)-Ocimenone	1,55			0,68
6.125	R-Limonene	0,31	0,83		
6.161	Linalool oxide				0,21
6.215	Linalyl acetate		1,23		0,57
6.254	3-Cyclohexen-1-one, 2-isopropyl-5-meth		0,59	0,1	
6.285	Isopiperitone				0,75
6.333	trans-Chrysanthenyl acetate	1,44			
6.525	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-meth	1,89		0,01	0,83
6.531	Phellandral		0,29		0,17

6.640	Bornyl acetate	1,08	1,23	0,77	0,87
6.874	Cuminol		0,18		
6.992	Bicyclo[3.1.1]hept-2-en-4-ol, 2,6,6-trim		0,66		
7.018	D-Verbenone				0,68
7.052	Limonene dioxide;	0,75			
7.272	2,4-Pentadien-1-ol, 3-pentyl-, (2Z)-		0,49		
7.316	Thujyl acetate		0,75		
7.336	γ -Terpineol				0,71
7.408	Piperitenone	0,45			
7.608	Neoisothujyl acetate				4,36
7.672	.alpha.-Terpinyl acetate		9,54	0,05	
7.879	.alfa.-Copaene		0,5	0,38	0,58
7.938	2-Naphthalenamine, 1,2,4a,5,6,7,8,8a-oc				0,24
7.975	Bicyclo[5.2.0]nonane, 4-methylene-2,8,8-				0,46
7.994	(-)-.beta.-Bourbonene		0,73	0,01	
8.061	Cyclohexane,1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(0,79
8.074	β -Elemen		0,81		
8.149	5-Isopropenyl-2-methylcyclopent-1-enec	2,55		0,05	0,76
8.219	Isoledene		0,4		
8.424	Car-3-en-5-one	12,51	0,1	0,05	4,8
8.451	Caryophyllene		1,56	0,51	0,75
8.623	cis-Thujopsene		0,5		0,2
8.708	α -Methyl- γ -crotonolactone				0,18
8.790	Cadina-3,5-diene		0,48		0,24
8.809	1-Penten-1-one, 2-methyl-	0,47			
8.880	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetram		0,97		
8.887	Humulene				0,41
9.026	2H-Inden-2-one, 1,4,5,6,7,7a-hexahydro-				0,24
9.054	Cyclohexanone,2-(2-butynyl)-	0,46			
9.088	7 α H,10 β H-Cadina-1(6),4-diene		0,66		0,23
9.095	.beta.-copaene			0,33	0,63
9.206	Isogermacrene D	1,39		0,01	
9.341	(Z)-Muurolo-4(15),5-diene		1,34		0,45
9.382	Cubebol		0,51		
9.412	.alpha.-Muurolole				0,58
9.416	α -Amorphene		0,63	0,18	
9.549	6-epi-shyobunol		0,58		0,01
9.697	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-he		2,57	0,52	0,67
9.708	cis-Calamenene				0,49
10.026	Elemol				0,28
10.031	Hedycaryol		0,47		
10.136	β -Germacrene		2,5		0,47
10.295	Chamigran-7-en-9-ol,2,10-dibromo-3-chl	0,36			
10.398	Caryophyllene oxide	0,9	1,05	0,17	0,98
10.402	(-)-Spathulenol	1,11			
10.464	Carvyl tiglate, cis-				0,51
10.495	Carvyl angelate, cis-	0,78			
10.695	Humulene epoxide II		0,54	0,04	0,3
10.813	ent-Germacre-4(15),5,10(14)-trien-1 β -ol	0,33	0,95		0,32
10.934	Epicubenol		1,13		0,66
11.055	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5.beta.-ol	0,53			
11.090	.tau.-Muurolol		0,54		
11.232	Maaliol		0,65		0,42
11.573	.alpha.-Bisabolol			0,96	0,4
11.862	1,1,4,7-Tetramethyldecahydro-1H-cyclop	0,63	0,37		0,18
12.880	Isoaromadendrene epoxide	0,11	0,83		0,15
Total of constituents (%)		88,29	92,21	94,09	92,52

RT: Retention Time; A: *A. herba alba*; B: *J. pheonicea*; C: *R. officinalis*; D: Mixture of Eos

Table 2: Result of Probit analysis to calculate LC₅₀ values of EOs extracted from *A. herba alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* and their mixture against *T. castaneum* after 24, 48, 72 and 96 h exposure time respectively.

EOs	LC ₅₀ µl/l air (95% fiducial limits)			
	24h	48h	72h	96h
<i>A. herba alba</i>	107.2(81.7-138.3)	85.4(63.4-110.0)	76.8(55.7-99.9)	74.4(53.8-96.8)
<i>J. phoenicea</i>	155.7(125.6-197.7)	135.6(113.0-163.7)	115.4(96.2-138.2)	97.8(88.2-108.3)
<i>R officinalis</i>	156.6(119.3-214.8)	75.9(62.9-88.8)	70.5(54.6-77.2)	66.4(56.0-73.0)
Mixture	131.6(112.1-155.4)	119.0(102.3-138.8)	114.0(97.8-133.0)	109.127(93.9-126.9)

Major compounds of *J. phoenicea* L EOs were α -Pinene (15.49%), α -Terpinyl acetate (9.54%) and 3-Carene (9.63%), these findings conflicted with those obtained by Ramdani et al. (2013)³³, where terpinolene (0-13%), Δ^3 -Karen (0-12.4%) and the β -phellandrene (0-7.3%) were identified as prominent components of *J. phoenicea* EOs belonging to different regions in Algeria. Moreover, α -pinene was detected as the main constituent in EOs from different origins worldwide^{34,35,36,37}. These differences in the EOs compositions might arise from differences in environmental (climatic, seasonal, geographical) factors¹¹. The chemical composition of the mixture of the three EOs was different compared to the chemical composition of the EOs, with the appearance of new compounds such as 4-Thujanol as a second main constituent (9.02%), while camphor (13.95%), and α -Pinene (8.36%) are the first and the third main compounds, respectively. In the same sample, it was observed that there was an increase in the total constituents' number, which may result from the interactions between the constituents of the three EOs.

Fumigant and Repellent activities of EOs:

It was found that the EOs of all selected plant species and their mixture had pronounced fumigant activities against *T. castaneum* adults (Table 2). Toxicity data indicate a remarkable difference in susceptibility of this

stored pest to treatment by EOs and their mixture in function of the concentrations of the samples, plant species and exposure time. No mortality was noted in the control. Probit analysis showed that at a 24 h exposure time, *A. herba-alba* was highly toxic toward *T. castaneum* adults with LC₅₀ value of 107.199 µl/L air. Whereas, the mixture of EOs possessed fumigant activity with LC₅₀ value of 131.570 µl/L air. On the other side, EOs of *J. phoenicea* and *R. officinalis* were less efficacious, with LC₅₀ values of 155.724 and 156.589µl/L, respectively.

Generally, mortality rates increased and LC₅₀ values, decreased when the EOs concentration and exposure time increased. After 96h of treatment the corresponding LC₅₀ values were 66.455, 74.389, 97.833 and 109.127 µl/l air for *R. officinalis*, *A. herba alba*, *J. phoenicea* and the mixture of EOs respectively.

The results obtained from the CompuSyn analysis (Table 03), showed that there was a synergistic effect between the three EOs at the concentration of 41.67 µl/l after 24 hours. while, moderate synergism was observed at the concentration of 83.33 µl/l after 24 hours. However; a slight synergistic effect was recorded at the highest and lowest concentrations after 24 and 48 hours, respectively.

Table 03: Effect of combination of EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* against *T. castaneum* at different concentrations after 24, 48, 72 and 96 h exposure time.

Time	Concentrations (µl/ml)	Percentage of mortalities (%) (± SE)					CI** value	Effect Modified	Compusyn
		<i>A. herba alba</i>	<i>J. phoenicea</i>	<i>R. officinalis</i>	Mixed formulation				
24 h	41.67	0±0(a) *	0±0(a)	0±0 (a)	3,33 ±2,89 (a)	0.5968	Synergism		
	83.33	55±13,23 (b)	18,33±10,41(a,b)	25±18,03 (a,b)	20±5 (b)	0.7788	Moderate synergism		
	166.67	61,67±7,64 (b)	38,33±20,21 (b)	33,33±10,41 (b)	65±13,23 (c)	1.0342	Additive		
	333.33	98,33±2,89 (c)	100±0 (c)	98,33±2,89 (c)	100±00 (d)	0.9187	Slight synergism		
48 h	41.67	0±0 (a)	0±0 (a)	13,33±2,89 (a)	5±05 (a)	0.9028	Slight synergism		
	83.33	71,67±15,28(b)	21,67±7,64 (a)	68,33±17,56 (b)	25±00 (b)	1.1263	Slight antagonism		
	166.67	78,33±7,64 (b)	56,67±25,16 (b)	98,33±2,89 (c)	66,67±15,28 (c)	1.4384	Moderate antagonism		
	333.33	100±0 (c)	100±0 (c)	100±0 (c)	100±00 (d)	1.1207	Slight antagonism		
72 h	41.67	0±0 (a)	0±0 (a)	38,33±12,58 (a)	5±05 (a)	1.3311	Moderate antagonism		
	83.33	78,33±17,56 (b)	36,67±7,64(b)	80±21,7945 (b)	30±05 (b)	1.3806	Moderate antagonism		
	166.67	88,33±10,41(b)	66,67±18,93 (c)	100±0 (b)	68,33±16,07 (c)	1.7045	Antagonism		
	333.33	100±0 (b)	100±0 (d)	100±0 (b)	100±0 (d)	1.1819	Slight antagonism		
96 h	41.67	0±0 (a)	0±0 (a)	73,33±00 (a)	5±05 (a)	3.0918	antagonism		
	83.33	81,67±15,28 (b)	41,67±10,41 (b)	88,33±16,07 (b)	35±10.00 (b)	2.1329	antagonism		
	166.67	90±8,66 (b)	86,67±7,64 (c)	100±0 (b)	70±13,23 (c)	2.3003	antagonism		
	333.33	100±0 (b)	100±0 (c)	100±0 (b)	100±0 (d)	1.2134	Moderate antagonism		

*Within each sample (EOs or mixture), means in the same column followed by the same letters do not differ significantly ($P > 0.05$) in the Tukey test.

**Combination Index (CI) - < 0.70 = synergism; $0.70-0.90$ = moderate synergism; $0.90-1.10$ = additive; $1.10-1.45$ = moderate antagonism; > 1.45 = antagonism. a Percent control obtained according to²³.

In contrast, an additive effect was observed at the concentration of 166.67 μ l/l after 24 hours of treatment. With increasing time, a slight antagonism was noted at the concentrations 83.33 and 333.33 μ l/l after 48 hours and 333.33 after 72 hours. Then, moderate antagonism was registered at the concentration 41.67 μ l/l and 83.33 μ l/l after 96 hours. Finally, antagonist effect was observed at the concentrations 166.67 μ l/l after 72 hours and 41.67, 83.33 and 166.67 μ l/l after 96 hours.

Our results indicate that the nature of the effect was influenced by the concentration of the mixture used in the treatment, and the time of exposure to that treatment. Comparing the effects recorded for all concentrations between the first and the last day of treatment confirms that the potency of the EOs alone increased over time; in contrast to the potency of the mixture of EOs, which decreased after 96 h of treatment.

The results revealed that the EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* and their mixture were repulsive against adults of *T. castaneum* (Table 4). The EO of *A. herba alba* showed the most repulsive activity with a repulsion percentage of 80.00 \pm 10.00% (class V), at the lowest test concentration of 0.25 μ l/l against *T. castaneum* after 2 h of exposure, followed by the mixture of EOs which had a repulsion equal to 61.67 \pm 31.75 % (class IV), whereas for the same concentration, the results indicated that the EO of *J. phoenicea* had an approximate repulsive activity with the EO of *R. officinalis* against the same insect with a repulsion percentage equal to 23.33 \pm 2.89 and 25.00 \pm 8.66% respectively, (Class II). At the highest concentration (2 μ l) the EOs of *A. herba alba* and *J. phoenicea* showed significantly more repellent effects up to 100.00 \pm 0.00 and 90.00 \pm 10.00%, respectively (class V). Less significant repellent effects were noted for the mixture and the *R. officinalis* EO, thus recorded percentages of repulsion equal to 76.67 \pm 11.55 (Class IV) and 41.67 \pm 10.41 (Class III) respectively. Based on the data of the repellent action against *T. castaneum*, adults were highly dependent on the sample concentration, an increase in repulsion was noted with the increase of concentrations.

Analysis of the Compusyn repulsive effect data has awakened a synergy between the three EOs at the concentration of 0.25 μ l, while a low synergy was observed at the concentration of 0.5 μ l. Moreover, moderate antagonism was stated at concentrations 1 and 2 μ l.

Under this study, Sharifian *et al.* (2012)¹⁴ reported that *A. herba-alba* oil might have potential as a control agent against *T. castaneum*, *C. maculatus*, and *R. dominica*. Similar to this study, Badreddine and Baouindi. (2016)²⁷ assessed the fumigant and repellent effects of EO from the same plant against *Trogoderma granarium* and *T. castaneum* adults. Several investigations showed the effectiveness of EO from *Artemisia* species which include *A. maritima* Linn, *A. anethoides*, and *A. dubia* as an insecticidal and repellent agent against *T. castaneum* adults^{2,6,38}. However, studies by Hashemi and Rostaefar (2014)³⁹, showed that EO from *J. communis* possesses a potential for the management of *T. castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. On the other hand, Sener *et al.* (2009)⁴ motioned that rosemary EO could be recommended as a potential source of environment-friendly botanical insecticide in the control of the confused flour beetle. Besides, EO of *R. officinalis* exhibited fumigant toxicity on *T. castaneum*, *Sitophilus granarius*, *Callosobruchus maculatus*, and *Plodia interpunctella* adults⁸.

In addition, some compounds identified in the tested EOs also demonstrated bioactivities against many insects. Chaubey (2012)³ reported that α -pinene and β -caryophyllene, had high fumigant toxicity against *T. castaneum* adults and larvae. **1,8-cineole screened from rosemary and common sage was the most potent fumigant toward confused flour beetle, followed by β -thujone from common sage and p-cymene from thyme**⁴. The compounds α -pinene and D-limonene reached the same level (Class V) of repellency as N, N-diethyl-3-methylbenzamide (DEET) against *L. bostrychophila* at 63.17nL/cm² after 2 h treatment. α -pinene and D-limonene were also found to have contact and repellent activities against *T. castaneum* and *L. bostrychophila*¹³.

Table 04: Repellent effects of essentials oils from *A. herba alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* and their Mixed formulation against *T. castaneum* adults.

Concentrations (μ l)	Repellency* (DC) (%) (\pm SE)				CI value	Effect Compusyn Modified
	<i>A. herba alba</i>	<i>J. phoenicea</i>	<i>R. officinalis</i>	Mixed formulation		
0.25	80,00 \pm 10,00 (a)	23,33 \pm 2,89 (a)	25,00 \pm 8,66 (a)	61,67 \pm 31,75 (a)	0.6235	Synergism
0.5	81,667 \pm 7,64 (a)	50,00 \pm 43,59 (a)	26,67 \pm 16,07 (a)	66,67 \pm 25,17 (a)	0.9599	Slight synergism
1	86,667 \pm 11,55 (a)	65,00 \pm 30,41 (a)	33,33 \pm 25,17 (a)	73,33 \pm 10,41 (a)	1.5291	Moderate antagonism
2	100,00 \pm 0,00 (a)	90,00 \pm 10,00 (a)	41,67 \pm 10,41 (a)	76,67 \pm 11,55 (a)	2.6844	Moderate antagonism

* Within each sample (EOs or mixture), means in the same column followed by the same letters do not differ significantly ($P > 0.05$) in the ANOVA test.

Previously **Guo et al. (2015)**⁴⁰ reported that Estragole, 1,8-cineole, and limonene showed weaker repellent activity than the EO of *Etlingera yunnanensis* rhizomes against *L. bostrychophila* adults. However, it has been suggested that this occurs since plants usually present defenses as a suite of compounds, not as individual ones. Accordingly, the insecticidal effects of the EOs and their mixture cannot be explained by the action of their major components only, even minor compounds may be involved in the insecticidal activities of the corresponding oils and may have a synergistic effect enhancing the effectiveness of the major constituents through a variety of mechanisms^{41,18,1,13}. To the authors' knowledge, this is the first experiment evaluating the contribution of the combined effect of EOs from *R. officinalis*, *A. herba alba* and *J. phoenicea* in the insect fumigation and repellency against *T. castaneum*. However; several previous experiments on insect toxicity are consistent with our results showing that the combined effect of bioactive substances on insects is synergistic, additive or antagonistic depending on the substances and the insect species. Bedini et al. (2016) and Zibae and Khorram (2015)^{42,43} stated that *Eucalyptus globulus* and *R. officinalis* EOs were toxic to *Periplaneta americana* (L.), *Blattella germanica* (L.), *Supella longipalpa*, *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi* and *Musca domestica* adults, their mixed formulation showed enhancement in the adulticidal activity against the same insects. Such activity has been reported in EOs from sesame, Amyris, sandalwood, Helichrysum, cedar wood, and black pepper that exhibited synergistic effects in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)⁴⁴. Similarly, Chaubey (2012)³ Found that α -Pinene and β -Caryophyllene in binary combination shows synergism, reduces the egg-laying capacity, inhibits pupation and adult emergence in *T. castaneum*. The same was observed in a study made by Araújo et al. (2016)⁴⁵, that reported synergistic interactions in all combinations (1:1) between carvacrol, thymol and eugenol against *Rhipicephalus microplus* larvae, while synergistic interactions and moderate synergistic effects were noted for *R. sanguineus* s.l. larvae²³ observed a synergistic or additive effect for combinations of thymol and carvacrol, depending on the concentration, against *D. nitens* larvae, while for *A. sculptum* larvae they observed a moderate synergistic or additive effect. However, the combinations of thymol with (E)-cinnamaldehyde and carvacrol with (E)-cinnamaldehyde presented an antagonistic effect at all concentrations of each substance, against both tick species and only *D. nitens*, respectively. Recently, Novato et al. (2019)²⁰ demonstrated that the combinations of thymol + carvacrol (3.125mg/mL), as well as carvacrol + eugenol and eugenol + thymol (6.25 mg/mL), had a synergistic effect on engorged females, while the other associations had an additive effect.

These findings indicate that different species can respond distinctly to the association of EOs or their components, so that an effect found against one organism cannot be extrapolated to others²³. Besides this, factors such as concentrations, the testing methods, route of penetration and source of the EOs can also interfere. Therefore, various aspects must be considered when investigating the interactions of EOs compounds^{46,20}.

Several studies about the modes of toxic action of EOs indicated that the insecticidal activity of EOs and their components can affect different and specific targets causing inhibition of many biological mechanisms⁴⁸. Zarrad et al. (2015)⁴¹ found that EOs of *Citrus aurantium* and limonene showed a high Acetylcholinesterase (AChE) inhibition rate of *Bemisia tabaci*. Similarly, Olmedo et al. (2015)⁴⁸ revealed that the toxicity of *Tagetes flifolia* EO and its major compounds (E)-anethole and estragole against *T. castaneum*, might be associated with inhibition of AChE activity. The authors also revealed that EO from *T. flifolia* and (E)-anethole exhibited oxidative stress, thus altering the level of malondialdehyde (MDA). Other studies suggested that the phenylpropanoids could act also by binding to the octopamine receptors. Enan (2001)⁴⁶ demonstrated that Eugenol, α -terpineol and cinnamic alcohol accelerate heartbeat and increase cAMP production in the nervous system of *Periplaneta americana*, also, similar changes were observed following treatment with octopamine. Earlier, several reports described the impact of EO and their compounds on biological parameters such as fecundity, fertility. Fatiha et al. (2014)⁴⁷ as well as Douiri et al. (2014)⁴⁹ showed the effectiveness of the various oil treatments, including *A. herba-alba* Asso and *R. officinalis* EOs, on *Callosobruchus chinensis* and *C. maculatus*, respectively. They reported that the effect of the oils reduced egg laying and egg hatching. Regarding EO mixture, Faraone et al. (2015)⁵⁰ suggested that synergism and antagonism between EOs, is contingent on the chemical compositions, properties or mode of action of these bioinsecticides. In addition to the chemical composition, it was concluded that the interaction between different compounds may lead to changes in the structural conformation, and it may result in the reduction of the biological activity giving hence an antagonistic effect⁵¹. An alternative explanation may be that the antagonistic relationship between EOs may result from competition for a possible primary target⁵¹. Conversely, the observed synergism may be the result of the insect being overwhelmed by the mixture of EOs that attack different target sites⁵⁰. This phenomenon of multi-target synergistic effect may occur, involving enzymes, substrates, metabolites and proteins, receptors, ion channels, transport proteins, ribosomes, DNA/RNA and physicochemical mechanisms⁵¹. This highlights the need

for a better understanding of synergistic and antagonistic effects in a holistic approach.

EOs and their mixture could be efficient alternatives to conventional insecticides because of their fast degradability properties, regional availability and act at low doses^{8,49}, but their natural origin does not imply that they are safe and non-phytotoxic in nature. Thus, to develop a practical application for the EOs and the combined formulation as novel insecticides, further researches on the safety and effectiveness of the EO for humans and treated seeds (germination and seedling growth) are needed^{1,2,41,47}. However, considering their high volatility, they are not recommended for long-term protection of stored products, hence the need to develop methods of stabilization⁴⁹.

CONCLUSION:

GCMS analysis of this study revealed that EO of *A. herba alba* from Khenchela is of a new chemotype; Car-3-en-5-one. In addition, the mixture of three EOs revealed the appearance of new constituents as major and minor compounds, which necessitates further investigations about the modes of interactions between constituents of EOs. Our results demonstrated that the EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea*, *R. officinalis* and their mixed formulation had pronounced fumigant and repellent effect against *T. castaneum* adults. However, *A. herba alba* EOs was more toxic and repellent to the red flour beetle than the other bioinsecticides. About bioactivity of the mixed formulation, it was concluded that the synergy, antagonism or additive effect of the EOs in the fumigant and repellent activities depend on their concentration and exposure time. The present findings may be utilized for the development of botanical insecticides as supplementary and replacement to synthetic ones.

ACKNOWLEDGEMENT:

We thank Professor Sekour Makhlouf member of the department of agronomy, faculty of Natural Sciences and Life Sciences, Kasdi Merbah University, Ouargla, for his assistance.

REFERENCES:

- Jaya, Singh P, Prakash B, Dubey NK. Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. J Food Sci Technol. 2012; 51(9): 2210-2215.
- Brari J, Thakur DR. Fumigation and repellent potential of four essential oils against major coleopteran pests of stored grain. International Journal of Advance Agricultural Research. 2017; 5: 40-51.
- Chaubey MK. Acute, Lethal and Synergistic Effects of Some Terpenes Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). Ecologia Balkanica. 2012; 4(1): 53-62.
- Sener O, Arslan M, Demirel N, Uremis I. Insecticidal Effects of Some essential oils Against the Confused Flour Beetle (*Tribolium confusum* du Val) (Col.: Tenebrionidae) in Stored Wheat. Asian Journal of Chemistry. 2009 ; 21(5) : 3995-4000.
- Mishra BB, Tripathi SP, Tripathi CPM. Research Article Investigation of Natural Plant Aegle marmelos Essential Oil Bioactivity on Development and Toxicity of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). International Journal of Zoological Research. 2016 ; 12 : 40-46.
- Liang JY, Wang WT, Zheng YF, Zhang D, Wang JL, Guo SS, Zhang WJ, Du SS, Zhang J. Bioactivities and Chemical Constituents of Essential Oil Extracted from *Artemisia anethoides* Against Two Stored Product Insects. J Oleo Sci. 2017; 66(1):71-76.
- Asgar E, Mohaddese M. Insecticidal activity of the essential oil isolated from *Azilia eryngioides* (PAU) hedge et lamond against two beetle pests. Chilean Journal of Agricultural Research. 2011; 71(3): 406-411.
- Mahmoudvand M., Abbasipour H., Basij M., Hossein Hosseinpour M., Rastegar F., Bagher Nasiri M. Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored-product pests. Chilean Journal of Agricultural Research. 2011; 71(1):83-89.
- Mohammed M, Lahcen PE, Abderahmane K, Abdelmonaim HB. Insecticidal activity of the essential oil from seven accessions of *Artemisia herba-alba* Asso domesticated in Errachidia (south-east of Morocco) against *Tribolium castaneum*. Int Journal of Engineering Research and Applications. 2014; 4 (6):33-36.
- Hashemi SM, Safavi SA. Chemical constituents and toxicity of essential oils of oriental arborvitae, *Platycladus orientalis* (L.) Franco, against three stored-product beetles. Chilean Journal of Agricultural Research. 2012; 72(2): 188-194.
- Siddique S, Parveen Z, Butt A, Chaudhary MN, Akram M. Chemical Composition and Insecticidal Activities of Essential Oils of Myrtaceae against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Polish Journal of Environmental Studies. 2017; 26(4): 1653-1662.
- Yan Y, Williams SB, Murdock LL, Baributsa D. Hermetic storage of wheat and maize flour protects against red flour beetle (*Tribolium castaneum* Herbst). PLoS ONE. 2017; 12(9): e0185386. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185386>
- Guo SS, Zhang W, Liang J, You C, Geng Z, Wang C, Du S. Contact and repellent activities of the essential oil from *Juniperus formosana* against two stored product insects. *Molecules*. 2016; 21(504): 1-11.
- Sharifian I, Hashemi SM, Aghaei M, Alizadeh M. Insecticidal activity of EO of *Artemisia herba-alba* Asso against three stored product beetles. Biharean Biologist. 2012; 6 (2): 90-93.
- Khleifat KM, Matar SA, Jaafreh M, Qaralleh H, Al-limoun MO, Alsharafa KY. Essential Oil of *Centaurea damascena* Aerial Parts, Antibacterial and Synergistic Effect. Journal of Essential Oil-Bearing Plants. 2019; 22(2): 356-367.
- Papachristos DP, Stamopoulos DC. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oils vapors on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Products Research. 2002 ; 38 (2) : 117-128.
- Jilani G, Saxena RC. Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweet flag oil, neem oil and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera, Bostrychidae). Journal of Economic Entomology. 1990; 83: 629-634.
- Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E. Repellent activity of essential oils: a review. Bioresource technology. 2010; 101(1): 372–378.
- Mc Donald LL, Guy RH, Speirs RD. 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. Marketing Research Report. n° 882. Washington: Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. 183 pp.
- Novato TLP., Marchesini P, Muniz N, De Azevedo Prata MC, Furlong J, Vilela FMP, Daemon E, Maturano R, Monteiro C. Evaluation of synergism and development of a formulation with

- thymol, carvacrol and eugenol for *Rhipicephalus microplus* control. *Experimental Parasitology*. 2019; 207: 107774.
21. Finney JD (1971) *Probit analysis*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK
 22. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*. 2006; 58: 621-681.
 23. Novato TPL., Araújo LX, De Monteiro CMO, Maturano R, Senra TDOS, Da Silva Matos R, Daemon E. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Veterinary parasitology*. 2015; 212(3-4): 331-335.
 24. Goudjil MB, Ladjel S, Bencheikh SE, Hammoya F, Bensaci MB, Zighmi S, Mehani M. Bioactivity of *Artemisia Herba alba* essential oil against plant pathogenic fungi. *Der Pharma Chemica*. 2016; 8(3):46-52.
 25. Lakehal S, Meliani A, Benmimoune S, Bensouna SN, Benrebihia FZ, et al. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. *Med chem (Los Angeles)*. 2016; 6: 435-439.
 26. Bouzidi N, Mederbal K, Raho B. Antioxidant Activity of essential oil of *Artemisia herba alba*. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. 2016; 6(5): 59-65.
 27. Badreddine BS, Baouindi M. Effects of *Artemisia herba-alba* essential oils on survival stored cereal pests: *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) and *Trogoderma granarium* (Everst) (Coleoptera, Dermestidae). *Journal of Coastal Life Medicine*. 2016; 4(5): 390-394.
 28. Qnais EY, Alatshan AZ, Bseiso YG. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Artemisia herba-alba* essential oil. *J Food Agric Environ*. 2016; 14: 20-27.
 29. Ouaritini ZB, Chraïbi M, Benbrahim KF, Ez-zriouli R, Boukhira S, Darkaoui N. Phytochemical and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba* from Morocco. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2016; 11: 40-45.
 30. Kadri A, Zarai Z, Chobba I. B, Békir A, Gharsallah N, Damak M, Gdoura R. Chemical constituents and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. *J. Med. Plants Res*. 2011; 5(29): 6502-6508.
 31. Santoyo S, Caverro S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of food protection*. 2005 ; 68(4) : 790-795.
 32. Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*. 2012 ; 17(3) : 2704-2713.
 33. Ramdani M, Lograda T, Silini, H, Zeraib A, Chalard P, Figueredo G, Bouchaala M, Zerrar S. Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2013; 3(11): 22-28.
 34. El-Sawi S. A., Motawae HM, Ali AM. Chemical composition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007; 4(4): 417-426.
 35. Aljaiyash A, Ghanmi M, Satrani B, Labiad H, Echhelh A, Chaouch A. Chemical Composition of Essential Oils of Ripe and Unripe Berries and Leaves of *Juniperus Phoenicea* L. and determination of their Antimicrobial Activities. *International Journal*. 2016; 4(10): 7-14.
 36. Alfitori MO, Lamlom SH, Aly HM. Essential oil composition of leaves of *Juniperus phoenicea* grown at Al-Jabel Al-Akhdar Region, Libya. *Middle East J Sci Res*. 2014; 22: 368-370.
 37. Adams RP, Altarejos J, Arista Palmero M. Geographic variation in the volatile leaf oils *J. phoenicea* var. *phoenicea* from throughout its range. *Phytologia*. 2014; 96 (2):110-116.
 38. Liang JY, Guo SS, Zhang WJ, Geng ZF, Deng ZW, Du SS, Zhang J. Fumigant and repellent activities of essential oil extracted from *Artemisia dubia* and its main compounds against two stored product pests. *Natural Product Research*. 2018; 32(10):1234-1238.
 39. Hashemi S. M., Rostaefar A. Insecticidal Activity of Essential Oil from *Juniperus communis* L. subsp. hemisphaerica (Presl) Nyman against Two Stored Product Beetles. *Ecologia Balkanica*. 2014; 6(1): 87-93.
 40. Guo SS, You CX, Liang JY, Zhang WJ, Geng ZF, Wang CF, Lei N. Chemical composition and bioactivities of the essential oil from *Etilingera yunnanensis* against two stored product insects. *Molecules*. 2015; 20(9) :15735-15747.
 41. Zarrad K, Hamouda A. B, Chaieb I, Laarif A, Jemâa JMB. Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2015; 76: 121-127.
 42. Bedini S, Bougherra HH, Flamini G, Cosci F, Belhamek K, Ascrizzi R, Conti B. Repellency of anethole-and estragole-type fennel essential oils against stored grain pests: the different twins. *Bull Insectol*. 2016; 69(1): 149-157.
 43. Zibae I, Khorram P. Synergistic effect of some essential oils on toxicity and knockdown effects, against mosquitos, cockroaches and housefly. *Arthropods*. 2015; 4(4): 107-123.
 44. Tong F, Bloomquist JR. Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. 2013; 50(4): 826-832.
 45. Araújo LX, Novato TPL, Zeringota V, Maturano R, Melo D, Da Silva BC, Daemon OE, De Carvalho M.G, Monteiro CM. Synergism of thymol, carvacrol and eugenol in larvae of the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, and brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and veterinary entomology*. 2016; 30(4) 377-382.
 46. Enan E. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2001; 130(3):325-337.
 47. Fatiha RA, Kada R, Khelil MA, Pujade-Villar J. Biological control against the cowpea weevil (*Callosobruchus chinensis* L., Coleoptera: Bruchidae) using essential oils of some medicinal plants. *Journal of Plant Protection Research*. 2014; 54 (3): 211-217.
 48. Olmedo R, Herrera JM, Lucini EI, Zunino MP, Pizzolitto RP, Dambolena JS, Zygadlo JA. Essential oil of *Tagetes filifolia* against the flour beetle *Tribolium castaneum* and its relation to acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation. *Agriscientia*. 2015; 32(2): 113-121.
 49. Douiri LF, Boughdad A, Alaoui MH, Mohammed M, Morocco M. Biological activity of *Rosmarinus officinalis* essential oils against *Callosobruchus maculatus*, (Coleoptera, Bruchinae). *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*. 2014; 4(2) 5-14.
 50. Faraone N, Hillier NK, Cutler GC. 2015. Plant Essential Oils Synergize and Antagonize Toxicity of Different Conventional Insecticides against *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *PLoS ONE* 10(5): e0127774. DOI : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127774>
 51. Rosato A, Carocci A, Catalano A, Clodoveo ML, Franchini C, Corbo F, Carbonara GG, Carrieri A, Fracchiolla G. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. *PLoS ONE*. 2018; 13(8): e0200902. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200902>



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)

Naima Boukraa^{a, b, *}, Segni Ladjel^{a, c}, Wiam Benlamoudi^d, Mohamed Bilal Goudjil^{a, c}, Mohammed Berrekbia^{d, f}, Amar Eddoud^{e, f}

^a Process Engineering Laboratory, Applied Sciences Faculty, Kasdi Merbah University, Ouargla, 30000, Algeria

^b Biological Sciences Department, Natural and Life Sciences Faculty, Kasdi Merbah University, Ouargla, 30000, Algeria

^c Process Engineering Department, Applied Sciences Faculty, Kasdi Merbah University, Ouargla, 30000, Algeria

^d National Institute of Agronomic Research of Algeria, Experimental station of Sidi Mehdi, B.P. 17, Touggourt, Algeria

^e Agronomic Sciences Department, Natural and Life Sciences Faculty, Kasdi Merbah University, Ouargla, 30000, Algeria

^f Bioresources Sahariennes Laboratory, Agronomic Sciences Department, Life and Nature Sciences Faculty, Kasdi Merbah University, Ouargla, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Essential oil
Tribolium castaneum
Synergy
Repellent and fumigant effects
Bioinsecticide
GC-MS

ABSTRACT

Using essential oil (EO) mixtures to improve their single effectiveness aids to minimize insect resistance to synthetic insecticides and reduce the amounts of the applied bio-products. This study seeks to identify the chemical compositions of nine binary combinations of EOs of *Artemisia herba alba* Asso (A), *Juniperus phoenicea* L (B), and *Rosmarinus officinalis* L (C), by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) side to side with the evaluation of their toxicity and repellency effectiveness against adults of *Tribolium castaneum* Herbst by fumigation and repellent tests. GC-MS results revealed that each mixture was dominated by one of the following compounds: Car-3-en-5-one, α -pinene, exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-, and Camphor. After 24 h of treatment, the most toxic mixtures were H (3C:1A), L (1B:1C), with K (1B:3C) ($LD_{50} = 64.99, 68.98, \text{ and } 74.76 \mu\text{L/L air, respectively}$). After 96 h, synergistic mixtures K, I (1C:1A), and L seemed to be the most potent ($LD_{50} = 55.6, 57.63, \text{ and } 58.46 \mu\text{L/L air, respectively}$) throughout the period of treatment. LT_{90} values at the concentration of $83.66 \mu\text{L/L air}$ did not exceed the limit of 19.20 h for the less potent blend. The most repellent mixtures were F, D, E, and H, showing RD_{90} values of 1.25, 2.99, 3.46, and 3.83 nL/cm^2 , respectively. All samples showed synergistic effects, except the combinations I and G (1C:3A). The synergistic mixtures might be suitable as alternatives to chemical treatments for the control of *T. castaneum*, but tests at a larger scale are necessary to confirm our results.

1. Introduction

The red flour beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae), is one of most troublesome and destructive stored product pests worldwide (Baccari et al., 2020). It attacks several grains including their derivatives, particularly wheat flour, which is

* Corresponding author. University Kasdi Merbah Ouargla, Ouargla Ghardaia Road, BP.511, 30000, Ouargla, Algeria.

E-mail addresses: naimaaboukraa@gmail.com (N. Boukraa), ladjelsegni@yahoo.fr (S. Ladjel), wiaminra@yahoo.fr (W. Benlamoudi), gdbilal@yahoo.fr (M.B. Goudjil), berrekbiaamohammed@gmail.com (M. Berrekbia), amareddoud@gmail.com (A. Eddoud).

<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102513>

Received 14 August 2022; Received in revised form 19 September 2022; Accepted 11 October 2022

Available online 15 October 2022

1878-8181/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

one of the most common ingredients in its diet (Baccari et al., 2020; Feng et al., 2020). When no control measures are taken, this insect may effectuate considerable economic losses (Badreddine and Baouindi, 2016). In addition, Rösner et al. (2020) indicated that due to the cost-effective and easy breeding, the availability of an entirely annotated and sequenced genome, besides the high-performance genetic tools, *T. castaneum* is considered as a promising genetic model to identify novel targets for pest management or/and the exploration of insecticides modes of action. It would therefore be advantageous to exploit it for the development of new insecticides. In this context, control procedures for this pest rely predominantly on synthetic insecticides, which have proven their effectiveness for over 70 years (Ebadollahi et al., 2017). However, it is now well established that they are unsafe by leading to various drawbacks, including the development of insecticide resistance, thus inducing pest resurgence (Yuan et al., 2019; Sheng et al., 2020), ecosystem dysfunctions (Brito et al., 2021), human health and environmental concerns, as well as their toxicity to non-target organisms (Novato et al., 2015; Ebadollahi et al., 2017). Consequently, recent years have seen a growing trend toward plant-based bioinsecticides as alternatives considering their safety and efficacy (Novato et al., 2015; Benelli et al., 2017; Ebadollahi et al., 2017; Feroz, 2020; Hategekimana and Erler, 2020; Sheng et al., 2020).

Essential oils (EOs) are secondary metabolites synthesized by several aromatic plant families (Myrtaceae, Apiaceae, Meliaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Rutaceae and Umbelliferae) in various vegetative organs (Koul et al., 2013; Benelli et al., 2017; Ebadollahi et al., 2017; Sheng et al., 2020; Kheloul et al., 2021). They consist of complex mixtures of lipophilic and highly volatile organic components, including terpenes (monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes), aromatic (phenylpropanoids) and aliphatic compounds with many functional groups (Bakkali et al., 2008; Brito et al., 2021; Pandiyan et al., 2019; Sheng et al., 2020; Turek and Stintzing, 2013). Hence, they have been widely used since antiquity as antibacterials, antifungals, and insecticides (Bakkali et al., 2008; Sheng et al., 2020). Researchers have long wondered about the individual contribution of each EO ingredient in its bioactivity. Some reports have signaled that the effectiveness of an EO is likely attributed to its major components (Kim et al., 2016; Brito et al., 2021). Contrariwise, others have repeatedly found that the total EO is more effective than its single constituents (Tak and Isman, 2016; Feng et al., 2020), meaning that the bioactivities of the single molecules do not refer to the whole oil (Nelson and Kursar, 1999; Kim et al., 2016; Pandiyan et al., 2019; Brito et al., 2021). In this respect, many hypotheses have been prompted, including the most intensely studied, the one which demonstrates that interactions between their individual chemicals can create different effects, namely additive, once the sum of the activities of the single molecules is equivalent to the activity of their mixture; antagonistic, when the activity of the pooled chemicals is considerably lower than that resulting from an additive effect; or synergistic, if the activity of the coupled molecules is significantly greater than that resulting from an additive effect (Nelson and Kursar, 1999; Harris, 2002; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009; Kim et al., 2016; Pandiyan et al., 2019; Feng et al., 2020; Olszowy-Tomeczyk, 2020; Brito et al., 2021).

One of the possible strategies to overcome the undesirable impacts of synthetic insecticides is to blend EOs with synthetic insecticides (Chansang et al., 2018; Sheng et al., 2020); EOs with terpenes (Hategekimana and Erler, 2020); synthetic insecticides and terpenoids (Isman, 2020); terpenoids with each other (Pavela, 2015; Novato et al., 2015); and various EOs (Kiplang'at and Mwangi, 2014; Feroz, 2020; Hategekimana and Erler, 2020), exploiting their probable synergistic interactions. This potency has proven to be an essential feature of fumigant, repellent, antifeedant, and ovicidal activities (Koul et al., 2013; Pandiyan et al., 2019; Hategekimana and Erler, 2020; Kheloul et al., 2020; Badji et al., 2021; Brito et al., 2021), owing to many important considerations: (1) increasing the efficacy through the synergistic effects; (2) counteracting resistance to insecticides; (3) reducing the doses, costs, and undesirable/toxic repercussions; and (4) broadening the efficiency spectrum (Pavela and Benelli, 2016; Pandiyan et al., 2019; Feroz, 2020). On the other hand, little information are currently known about EO combinations that lead to synergistic, additive, or antagonistic effects or even their chemical compositions. This knowledge can contribute to designing novel formulations that act as insecticides and repellents for insect control (Pandiyan et al., 2019). Here, we have selected three plants for EO extraction based on their local availability and safety, as they are widely used for culinary, medicinal, and insecticidal purposes. *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae), commonly known as white wormwood (Abad et al., 2012; Messaoudi Moussii et al., 2020); *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae), labeled juniper (Tavares et al., 2012); and *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), also called rosemary (Çetin and Güdek, 2020; Isman, 2020; Messaoudi Moussii et al., 2020). This investigation comes to complete a previous one, where the EOs of the three plants besides their tertiary blend (1:1:1), have exhibited fumigant and repellent activities against *T. castaneum* adults (Boukraa et al., 2020).

The present research explores, for the first time, the binary combinations of *A. herba alba*, *J. phoenicea*, and *R. officinalis* EOs. It begins by identifying the chemical compositions of the mixtures using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), followed by a hierarchical analysis of compounds (HAC) to determine the similarities between their compositions. It will then go on to the evaluation of their effectiveness as fumigants and repellents against *T. castaneum* adults. Correlation analysis will be next conducted to examine the relationship between these biological activities and the five principal components of each blend.

2. Material and methods

2.1. Insect rearing

The original strain of *T. castaneum* was gathered from infested semolina and maintained at laboratory conditions since 2017. According to Liang et al. (2017), adults of *T. castaneum* (one to seven days-aged) used for bioassays were obtained from cultures reared in glass containers on a diet of wheat flour mixed with yeast (10:1, w/w) inside a dark incubator set at 29 ± 1 °C and $70 \pm 8\%$ relative humidity (RH).

2.2. EOs extraction and mixtures preparation

The fresh leaves and flowers of *A. herba alba*, *J. phoenicea*, and *R. officinalis* were collected in September 2017 from khenchela area (Algerian eastern). The species was identified by plant taxonomists in the Agronomy Department at Kasdi Merbah University in Ouar-

gla, Algeria. All plant materials were air-dried under ventilation in 20 ± 5 °C. then weighed to 100 g and transferred into a Clevenger apparatus (2 L) equipped with a water-cooled oil receiver to minimize overheating effects. The hydrodistillation was carried out for 3 h according to the European Pharmacopoeia method. A separatory funnel was used to isolate the EOs from water due to the density variations. As final step, anhydrous sodium sulfate was added to remove the extra water. The EOs were kept in airtight glass flasks at 4 °C in dark conditions. The binary mixtures were prepared by combining each two EOs at various ratios, as shown in Table 1.

2.3. GC-MS analyses of EOs mixtures

Qualitative and quantitative analyses of each mixture were performed on a Bruker SCION 436 GC (USA) fitted with a VARIAN-Ion Trap Saturn II mass selective detector (70 eV) with an ion source at 230 °C. An HP-5MS column (15 m × 0.25 mm × 0.25 μm) was used. The column stationary phase consists of 5% phenyl and 95% dimethylpolysiloxane. The chromatographic conditions have been set as follows: carrier gas helium under a flow rate of 1.5 mL/min; sample injection volume of 1 μL of 1% solution (diluted in hexane); injector temperature of 250 °C (1:50 split mode); initial column temperature of 70 °C increased to 300 °C at 10 °C/min. All mixture compositions were identified using online NIST library (Standard Reference Data, Gaithersburg, MD, USA). The relative percentage (%) of each composition was determined by averaging the GC-MS peak area.

2.4. Fumigant effect

This test consisted of evaluating the effect of EO combinations on the longevity of *T. castaneum* adults by fumigation according to Papachristos and Stamopoulos's method (2001). The experiments were done in 60 mL Plexiglas containers with screw caps. Cotton pieces were fixed to the inner side of the caps with cotton threads and impregnated with 2.5, 05, 10, and 20 μL of EO blends, corresponding to respective calculated concentrations of 41.67, 83.33, 166.67, and 333.33 μL/L air, whereas untreated containers served as controls. Twenty individuals were directly deposited into each container without substrate, and then an adhesive strip was applied around the caps. Three replicates were performed for each dose, including controls. Bioassays were carried out at 25 ± 5 °C and 55 ± 5 RH. Mortalities were recorded after 24, 48, 72, and 96 h of exposure time. Insects were considered dead if no movement of antennae or legs was observed.

2.5. Repellent effect

The repellent effect of the studied EO mixtures on *T. castaneum* adults were assessed using the method described by Jilani and Saxena. (1990). In 500 μL of acetone, the following doses of each blend were diluted: 0.25, 0.5, 1, and 2 μL, which were equivalent to 7.86, 15.73, 31.45 and 62.91 nL/cm², respectively. A disc of filter paper with a 9 cm diameter was cut into two halves. The first half was treated with 500 μL of the prepared sample, while the same volume of acetone was used to treat the second half. After 15 min of complete evaporation of acetone, the half-discs are assembled using an adhesive and placed at the bottom of a Petri dish. Then, every twenty individuals with three replications were released at the center of a treated filter paper. Experiments were established at 25 ± 5 °C and 55 ± 5 RH. The insect numbers that settled on the negative control part (Nc) and treated part (Nt) were counted at 30 min post-exposure. The percent repellency (PR) was calculated using the formula of McDonald et al. (1970):

$$PR (\%) = \frac{(Nc - Nt)}{(Nc + Nt)} * 100$$

2.5.1. Statistical analyses

All data were analyzed using the statistical program v.20.0 (SPSS). The comparing of values was performed, according to the normality of data distribution, with ANOVA or Kruskal-Wallis tests at a significance level of $P \leq 0.05$. The lethal concentrations (LD₅₀ and LD₉₀) of each EO combination were calculated using Probit or Logit regression at confidence limits of 95%. Based on the chemical profile of the three EOs and their binary mixtures, a hierarchical cluster analysis (HCA) was carried out in order to understand the similarities of composition using the WARD distance method. Data analysis was performed using Spearman's correlation in order to evaluate the relationship between the fumigant and repellent effects together with percentages of the five main compounds of each EO mixture. At a significant level of $p < 0.05$ and 0.01, the correlation coefficient \approx or equal to 1 was considered a strongest relationship while values that are closet to 0 were meaningful to no linear relation between variables.

Table 1
Compositions of various combinations of EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis*.

EOs Combinations	Ratios	EOs volume for combinations (vol/vol)		
		<i>A. herba alba</i>	<i>J. phoenicea</i>	<i>R. officinalis</i>
D	1:3	6 mL	2 mL	–
E	3:1	2 mL	6 mL	–
F	1:1	4 mL	4 mL	–
G	1:3	6 mL	–	2 mL
H	3:1	2 mL	–	6 mL
I	1:1	4 mL	–	4 mL
J	1:3	–	6 mL	2 mL
K	3:1	–	2 mL	6 mL
L	1:1	–	4 mL	4 mL

3. Results and discussions

GC-MS analyses of the nine binary mixtures, prepared from *A. herba alba*, *J. phoenicea*, and *R. officinalis* EOs at different ratios, were performed in the present investigation because this technique can detect the influence of combining EOs on the chemical compositions of mixtures. The chemical profiles of all combinations are listed in Table 2. A total of 55 compounds are identified, representing 71.32–80.53% of the total combinations. According to the chromatographic analyses, car-3-en-5-one (9.67%) have a major contribution in sample D. Whereas, α -pinene is the most prominent constituent in blend E (11.17%) and J (14.96%). As well the sample F is characterized by a majority of exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1] heptan- (7.82%). Additionally, the combinations G, H, I, K, and L are dominated by camphor with respective percentages of 15.7, 24.47, 19.38, 24.46 and 20.94%. In a previous study the chemical compositions of the EOs used to prepare the binary blends in this investigation were already identified by Boukraa et al. (2020). *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EOs consisted mainly of Car-3-en-5-one (12.51%), α -pinene (15.49%) and camphor (34.37%), respectively. Furthermore, the chemical compositions of the mixtures varied significantly from those mentioned with the originals (Boukraa et al., 2020). This is the result of appearance of some compounds as major or minor ingredients, with variable quantities between blends (Fig. 1), either of terpenic (4-Thujanol ...) or other natures e.g. 1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol, 1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene, and 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7 ... etc. Otherwise, several compounds which were present in the original EOs were disappeared after mixing such as Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl; Nonane, 2,5-dimethyl-; and Bicyclo[2.2.1]heptane, 2,2-dimethyl-3-me. Besides, the proportions of the components detected in a single EOs were changed in all binary combinations following the increasing or decreasing of their amounts. In concordance with our findings, Mahanta and Khanikor (2021) observed a change in the chemical composition of EO blend when mixing EOs of *Allium sativum* L. (bulbs) and *Citrus paradisi* Macfad (pro. sp.) (leaves). In addition, Muturi et al. (2017) found few compounds in binary mixtures of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, *Leptospermum scoparium* J.R. Forst. & G. Forst and *Origanum vulgare* L EOs compared to those detected in the crude EOs. To be more precise, Wangrawa et al. (2022) advanced that piperitone (33.42%) and 2-carene (14.17%) were detected as new major constituents after combining *Lantana camara* L EO with *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng EO, whereas carvacrol quantities increased in binary mixtures of *Lippia multiflora* Moldenke EO with *Lantana camara* L. or *Lippia chevalieri* Moldenke EOs. However, these alterations could be related to a new distribution based on the solubility and the new components that maybe generated during the blending (Wangrawa et al., 2022). Furthermore, EOs are known for their non-stability regarding the physicochemical conditions surrounding them (Turek and Stintzing, 2013). Pfau (1972) described a series of photochemical catalyzed intramolecular isomerization reactions, such as the *trans/cis* conversions or cycloaddition of diverse monoterpenoids. According to these findings, an isomerization of *trans*-anethole to *cis*-anethole was detected following the treatment of *Foeniculum vulgare* Mill EO with UV rays or high temperatures (Braun and Franz, 1999). The *trans*-anethole in the same type of oil was totally isomerized to *cis*-anethole or oxidized to anisaldehyde after a period of storage under light at ambient temperature (Misharina and Polshkov, 2005). Likewise, several EOs were changed in terms of their chemical compositions after light storage, with decreasing amounts of eugenyl acetate, estragole, *trans*-anethole, and numerous monoterpenes while *p*-cymene, eugenol, and anisaldehyde increased (Turek and Stintzing, 2013). Additionally, it was reported that increasing temperatures increases the quantities of certain unidentified polymerization products derived from myrcene (Turek and Stintzing, 2013). A possible explanation for this might be that reaction processes within mixtures, as with EOs, were described as developing differently from individual substances. Thus, the reactions that occur in each molecule can influence the behavior of other molecules, such as pro or antioxidant effects (Guenther, 1948; Gracza and Ruff, 1981; Gopalakrishnan, 1994). In traditional medicine, Lau et al. (2012) and Shaw et al. (2012) suggested that the synergistic effects of herbal formulations can be attributed to novel compounds created during the boiling process as a result of interactions between the plant ingredients in the decoction medium. In this context, EO components (terpenes in particular) are known to easily and frequently convert to each other due to their structural relationship within the same chemical group, which generates new compounds via cyclization, oxidation, dehydrogenation or isomerization, stimulated by enzymes or chemicals (Turek and Stintzing, 2013). For instance, 4-Thujanol (sabinen hydrate) was one of the most prevalent constituents in blends K and L. This oxygenated monoterpene was synthesized from (–) sabinen by Schiebe et al. (2019) and Ganji et al. (2020) via stereoselective and asymmetric synthesis, respectively. On the other hand, Boukraa et al. (2020) declared the presence of sabinen as one of the main ingredients in *J. phoenicea* EO. While according to the current results, this component was missing in the mixtures L and K, which were prepared from the EOs of *J. phoenicea* and *R. officinalis* in ratios of 1:1 and 1:3, respectively. Otherwise, blend J, which includes the same oils (3:1), appeared to be devoid of 4 thujanol, while sabinen has a majority of 9.53%. It seems probable that the 4-Thujanol identified in the samples K and L was derived from sabinen, which preexisted in *J. phoenicea* EO. The prior hypothesis supports our findings regarding the modifications in the chemical compositions of all mixtures.

The obtained chemical profiles (EOs and ten mixtures) were then subjected to HCA based on the ward distance, to evaluate their similarities in terms of composition. With a dissimilarity of 8, the analysis revealed five unique groups, G1, G2, G3, G4, and G5 (Fig. 2), that are distinguished by their chemical compositions. G1 (K, L, and M) was identified by the presence of α -pinene (8.36–13.62%), camphor (13.95–24.46%), and 4-thujanol (9.02–12.96%) as major components. While G2 (A and D) detected the abundance of 1-(2-Ethyl-3 cyclohexenyl) ethanol (4.22–8.08%), camphor (10.6–12.18%), 2,6,6 trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7 (4.58–6.44%), and car-3-en-5-one (9.67–12.51%). On the other hand, at a dissimilarity of >6, G3 was divided into two further subgroups (SG3a and SG3b). First, SG3a contained rosemary EO and H, which were characterized by the presence of α -pinene (7.33–12.94%), camphor (24.47–34.37%), and eucalyptol (10.26–14.46%) as main ingredients. whereas SG3b (G and I) had a majority of camphor (15.72–19.38%) and car-3-en-5-one (10.25–10.26%). G4 (B and J) consisted of α -pinene (14.96–15.49%), α -Terpinyl acetate (8.4–9.54%), 3-carene (8.33–9.56%), and sabinen (9.51–9.95%). Lastly, G5 (E and F) contained α -pinene (7.71–11.17%) and camphor (5.38–7.55%). As previously mentioned mixtures D, H, and J belonged to the same hierarchical groups as the EOs of *A. herba*

Table 2
Chemical compositions of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EO mixtures.

RT	Compounds	Peak area (%)									
		D	E	F	G	H	I	J	K	L	
2.01	α -Pinene	4.3	11.17 ^a	7.71 ^a	3.19	7.33	4.97	14.96 ^a	13.39 ^a	13.62 ^a	
2.181	Camphene	1.85	1.8	1.87	3.85	7.75 ^a	5.51	3.07	8.51	6.97	
2.517	β -Myrcene	–	–	–	–	1.44	–	–	–	2.31	
2.531	β -Pinene	1.88	3.73	3.02	–	–	–	1.52	3.42	1.33	
2.538	5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	–	–	–	–	–	–	3.05	–	–	
2.9	3-Carene	2.68	6.79 ^a	4.75	–	–	–	8.33	4.31	5.16	
3.187	exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan- ^b	–	–	7.82 ^a	–	–	–	–	–	–	
3.219	Eucalyptol	5.4	–	–	8.44	10.26 ^a	9	–	–	–	
3.23	Sabinen	–	8.4 ^a	–	–	–	–	9.95 ^a	–	–	
3.231	4-Thujanol ^b	–	–	–	–	–	–	–	12.96 ^a	12.07 ^a	
3.32	3,5-Heptadien-2-ol, 2,6-dimethyl-	4.51	–	–	10.29 ^a	3.1	2.16	–	–	–	
3.837	α -Terpinolene	–	–	–	–	–	–	1.25	–	1.41	
4.048	Linalool	–	–	–	–	–	–	1.13	–	–	
4.146	Filifolone	4.58 ^a	1.56	2.82	–	1.04	–	–	–	–	
4.149	Thujone	3.02	2.4	2.94	1.91	7.48	6.54	–	–	–	
4.165	(3E,6E)-Nona-3,6-dienyl 2,2,3,3,4,4,4-he ^b	–	–	–	6.49	–	–	–	–	–	
4.428	1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	–	–	–	1.58	–	9.53 ^a	–	–	–	
4.448	3,3-Dimethyl-6-methylenecyclohexene ^b	–	2.28	–	–	–	–	–	–	–	
4.554	1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol	4.22	3.11	5.36	–	–	–	–	–	–	
4.641	1,3-Cyclopentadiene, 1,2,5,5-tetramethyl	–	–	1.94	–	–	–	–	–	–	
5.081	pinocavrone ^b	2.19	1.05	2.05	2.01	–	1.14	–	–	–	
5.142	Camphor	10.6 ^a	5.38	7.48 ^a	15.72 ^a	24.47 ^a	19.38 ^a	7.32	24.46 ^a	20.94 ^a	
5.147	2-Furoic acid, tridec-2-ynyl ester ^b	–	1.28	–	–	–	–	–	–	–	
5.313	endo-Borneol	2.24	–	1.78	3.29	3.36	3.29	1.27	2.94	2.44	
5.346	<i>m</i> -Cymen-8-ol	–	1.08	–	–	–	–	–	–	–	
5.377	L-4-terpineneol	1.56	1.21	1.38	–	1.84	–	1.11	1.73	1.72	
5.385	Terpinen-4-ol	–	–	–	1.3	–	1.67	–	–	–	
5.463	Ethanone, 1-(6,6-dimethylbicyclo[3.1.0]h)	1.26	–	–	–	–	–	–	–	–	
5.502	α -Terpineol	1.12	1.28	1.21	–	–	–	–	–	–	
5.558	Terpineol	–	–	–	1.41	2.07	1.68	1.59	2.22	2.09	
5.715	E-Piperitol	–	1.52	1.11	1.32	–	–	–	–	–	
6.105	(E)-Ocimenone	1.31	–	–	1.24	–	–	–	–	–	
6.215	Linalyl acetate	–	1.06	–	–	–	–	1.19	–	–	
6.315	trans-Chrysanthenyl acetate	1.53	–	–	1.2	–	–	–	–	–	
6.525	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-meth	1.55	0.76	–	1.5	–	1.09	–	–	–	
6.64	Bornyl acetate	–	1.02	–	–	–	–	1.12	–	–	
7.018	D-Verbenone ^b	3.39	–	–	–	–	–	–	–	–	
7.18	1-Hexen-3-yne, 2,5,5-trimethyl-	1.66	–	1.39	–	–	–	–	–	–	
7.659	Neoisothujyl acetate ^b	–	6.78	–	–	–	–	–	–	–	
7.672	α -Terpinyl acetate	4.02	–	5.19	–	–	–	8.4 ^a	4.01	5.19	
7.894	Isogermacrene D	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
7.999	Chrysanthemac acid ^b	–	–	–	–	1.02	–	–	–	–	
8.061	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(^b	–	–	1.05	–	–	–	–	–	–	
8.139	1H-Indene, 1-ethylideneoctahydro-7a-me	–	–	0.91	2.06	–	–	–	–	–	
8.424	Car-3-en-5-one	9.67 ^a	4.34	6.11	10.26 ^a	5.6	10.25 ^a	–	–	–	
8.451	Caryophyllene	–	1.21	–	–	–	–	1.4	–	–	
9.194	3,5-Heptadienal, 2-ethylidene-6-methyl-	–	–	–	1.17	–	–	–	–	–	
9.218	β -copaene ^b	–	1.01	1.16	–	–	–	1.28	1.09	–	
9.339	cis-Muurolo-4(15),5-diene	–	1.01	–	–	–	–	1.57	–	–	
9.69	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-he ^b	–	1.84	–	–	–	–	–	1.28	–	
9.7	Cadina-1(6),4-diene	–	–	–	–	–	–	2.85	0.21	1.89	
10.136	β -Germacrene	–	–	1.04	–	–	–	2.13	–	1.16	
10.388	(–)-Spathulenol	1.24	–	–	1.04	–	–	–	–	–	
10.402	Caryophyllene oxide	1.26	1.18	1.23	0.22	1.06	–	–	–	–	
10.934	Epicubenol	–	–	–	–	–	–	1.02	–	–	
Pourcentage of compounds (%)		77.04	74.25	71.32	79.49	77.82	76.21	75.51	80.53	78.3	
Number of compounds		24	26	23	31	14	13	21	13	14	

Compounds are listed in the order of RT (Retention Time) value. Constituents representing less than 1% were not listed in this table.

^a Major compounds.

^b New components comparing to original EOs compositions (Boukraa et al., 2020).

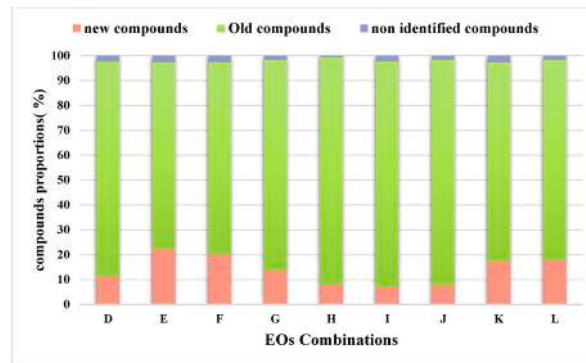


Fig. 1. Compositional variations of EO mixtures.

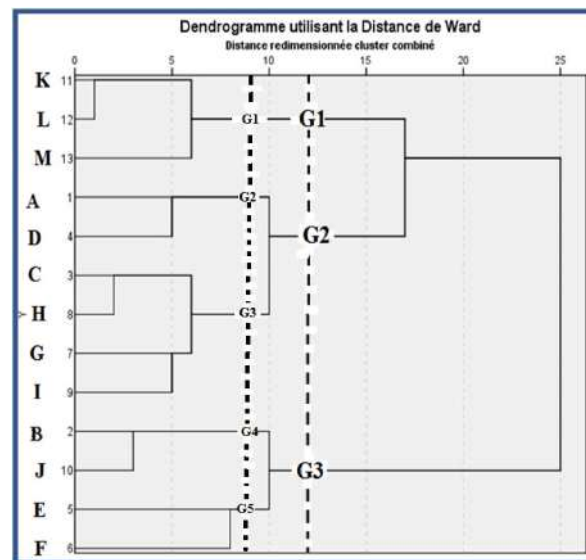


Fig. 2. Ward dendrogram based on the similarities of the GC/MS compositions of *A. herba alba* (A), *J. phoenicea* (B), *R. officinalis* (C) EOs and their blends. M* ternary combination of 3 essential oils with a ratio of 1:1:1 (Boukraa et al., 2020).

alba, *J. phoenicea*, and *R. officinalis*, respectively. This situation can be explained by the high concentration of each oil in the blend it resembles. Our findings showed also that the chemical compositions varied depending on the oil ratios in each sample. Thus, the same constitution of EOs in different blends does not imply identical chemical profiles. In this respect, combinations J, K, and L, which contain juniper and rosemary oils with respective ratios of 3:1, 1:3, and 1:1, K and L belong to G1 since their chemical compositions are highly similar, while J belongs to G4, with a distinct composition.

Using EO blends to increase their individual efficacy helps to decrease insect resistance to synthetic insecticides a long with reduced rates of the products in combination. Therefore, this biological tool can even be a complementary or alternative method for minimizing the use of chemical insecticides, thereby helping to limit their negative effects (Gross et al., 2017; Chansang et al., 2018; Isman, 2020; Sheng et al., 2020). The assessment of various EO combinations toxicity was ensured by applying increasing concentrations of bioinsecticides on *T. castaneum* adults for four days. There was no recorded mortality in the control group. The results illustrated in Figs. 3 and 4 demonstrate that all blends exhibited significant toxicity towards the treated insects. The evaluation of LD₅₀ and LD₉₀ values (Table 3) revealed a disparity in the toxicity of the samples. In addition, analysis of variance showed that the toxicity is usually dose-dependent ($p < 0.05$) but not time-dependent ($p > 0.05$). After 24 h of exposure, the mixture that recorded the highest potency was H (LD₅₀ = 64.99, LD₉₀ = 99.52 $\mu\text{L/L}$ air), followed by L (LD₅₀ = 68.98, LD₉₀ = 106.27 $\mu\text{L/L}$ air), K (LD₅₀ = 74.76, LD₉₀ = 89.64 $\mu\text{L/L}$ air), and I (LD₅₀ = 82.58, LD₉₀ = 196.24 $\mu\text{L/L}$ air). Moreover, mixtures F, G, and D exhibited moderate toxicity with LD₅₀ values of 116.46, 126.64, and 128.4 $\mu\text{L/L}$ air side to side with LD₉₀ values of 209.54, 277.31, and 271.20 $\mu\text{L/L}$ air, respectively. Contrariwise to mixtures J and E that showed LD₅₀ values of 140.19 and 154.84 $\mu\text{L/L}$ air, accompanied with LD₉₀ values of 356.02 and 316.15 $\mu\text{L/L}$ air, respectively. The SFs values of combinations L, H, K, I, J, and F are higher than 1 (Table 3), indicating

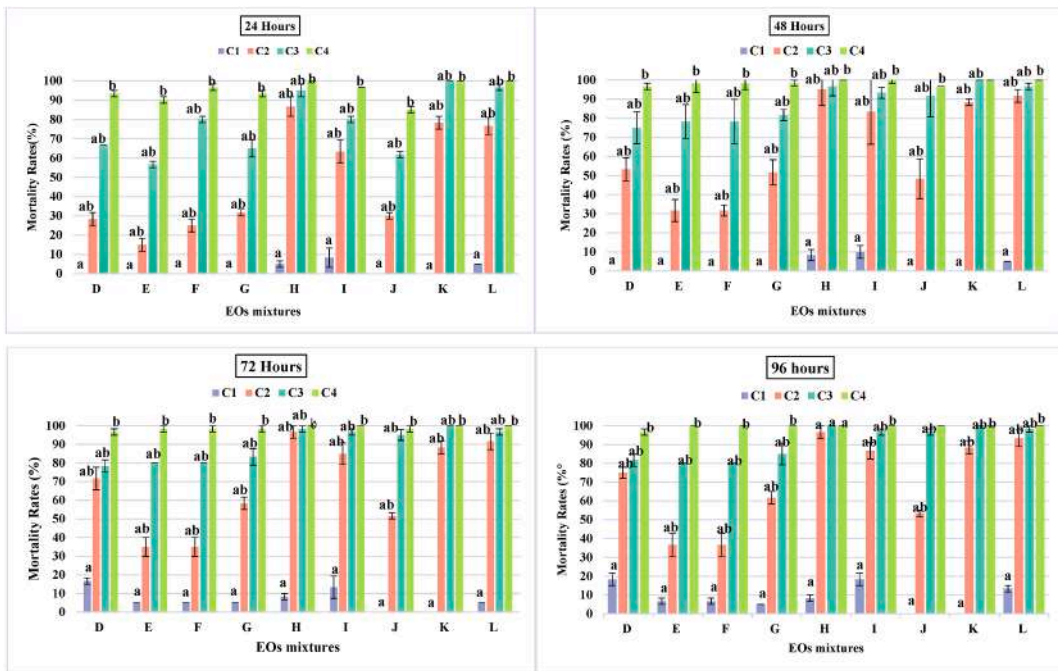


Fig. 3. Mortality Rates (mean \pm SE) of *T. castaneum* adults treated by fumigation with different concentrations: (C1 = 41.67 μ L/L air; C2 = 83.33 μ L/L air; C3 = 166.67 μ L/L air; C4 = 333.33 μ L/L air) of binary combinations of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* essential oils, after 24, 48, 72 and 96 h. Comparison of means is conducted using ANOVA or Kruskal-Wallis with Tukey's test for normal data. In the same column, bars with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$), while the opposite case generates a significance of data ($P < 0.05$).

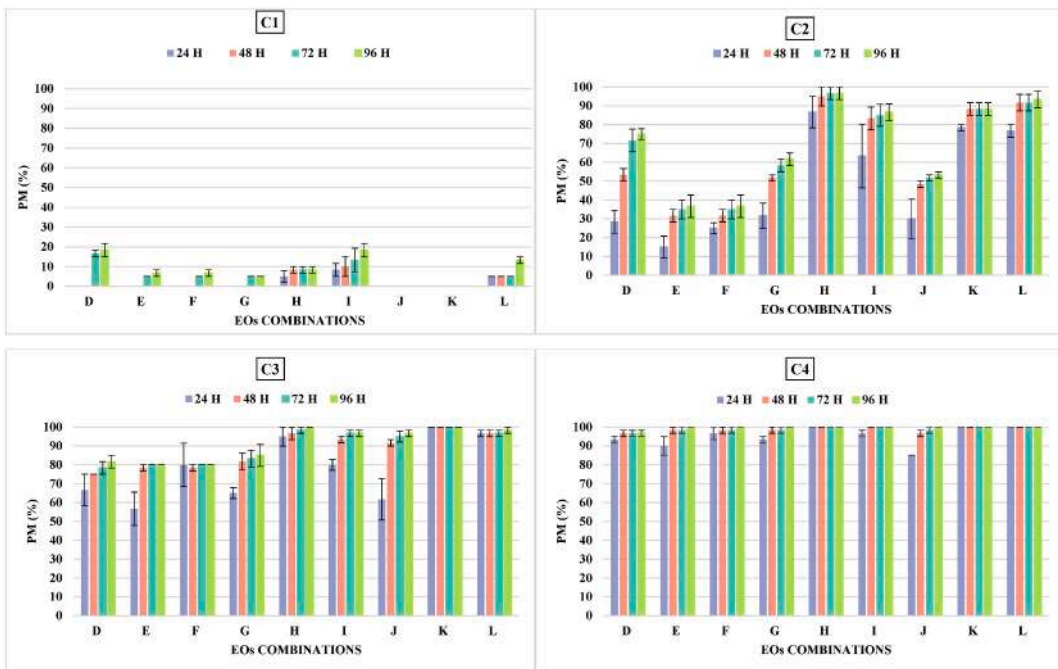


Fig. 4. Mortality rates (mean \pm SE) of *T. castaneum* adults treated by fumigation of binary combinations of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EOs, after 24, 48, 72, and 96 h for different concentrations (C1 = 41.67 μ L/L air; C2 = 83.33 μ L/L air; C3 = 166.67 μ L/L air; C4 = 333.33 μ L/L air). Means are compared using Tukey's test only following one-way ANOVA or Kruskal-Wallis. In the same column, bars with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$), while the opposite case generates a significance of data ($P < 0.05$).

Table 3

The estimated LD₅₀ and LD₉₀ values along with the 95% fiducial limits, the synergistic factors (SF) and the dose reduction indexes (DRI) of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EOs and their binary combinations against *T. castaneum* adults.

EOs and EO combinations	Observed LD ₅₀ (μL/L air)	95% Fiducial limits (μL/L air)	Observed LD ₉₀ (μL/L air)	95% Fiducial limits (μL/L air)	Theoretical LD ₅₀ (μL/L air) ^b	synergistic factor (SF) ^c	Dose Reduction Index (DRI) ^d
After 24 h							
A ^a	107.20	/	226.93	(158.42–540.05)	/	/	/
B ^a	155.70	/	249.41	(213.03–322.64)	/	/	/
C ^a	156.60	/	344.38	(241.22–841.17)	/	/	/
D	128.11	(109.99–149.44)	271.20	(219.82–377.88)	119.32	0.93	0.84
E	154.84	(131.90–182.88)	316.11	(253.25–458.56)	143.58	0.93	1
F	116.46	(96.40–140.73)	209.54	(167.76–316.79)	131.45	1.13	1.34
G	126.64	(109.74–146.33)	277.31	(226.30–378.04)	119.55	:	0.85
H	64.99	(39.40–93.58)	99.52	(74.98–376.37)	144.25	2.22	2.41
I	82.58	(61.83–106.62)	196.24	(142.95–384.3)	131.90	1.6	1.9
J	140.19	(110.56–180.21)	356.02	(255.79–682.24)	155.92	1.11	1.11
K	74.76	(68.25–77.64)	89.64	(86.93–96.05)	156.38	2.09	2.09
L	68.98	(62.36–75.69)	106.27	(94.61–126.64)	156.15	2.26	2.27
After 48 h							
A ^a	85.4	/	150.91	(110.27–360.08)	/	/	/
B ^a	135.6	/	212.68	(190.01–248.19)	/	/	/
C ^a	75.9	/	98.69	(87.24–118.22)	/	/	/
D	98.5	(79.97–110.66)	211.50	(166.85–317.66)	97.95	0.99	0.88
E	111.09	(20.42–146.45)	203.33	(177.40–245.68)	123.05	1.11	1.22
F	111.92	(53.71–75.71)	203.33	(177.4–245.68)	110.5	0.99	0.76
G	94.21	(79.97–110.66)	181.07	(147.31–256.72)	83.02	0.88	0.91
H	58.82	(20.42–146.45)	85.19	(60.68–24882.53)	78.28	1.33	1.29
I	64.3	(53.71–75.71)	109.92	(90.57–157.97)	80.65	1.25	1.18
J	91.07	(77.20–107.34)	161.30	(131.82–232.75)	120.68	1.32	1.49
K	68.5	(64.07–71.65)	83.12	(80.42–86.18)	90.82	1.32	1.11
L	62.2	(46.18–79.49)	89.32	(71.63–161.45)	105.75	1.7	1.22
After 72 h							
A ^a	76.8	/	113.84	(82.86–680.01)	/	/	/
B ^a	115.4	/	187.60	(161.76–233.06)	/	/	/
C ^a	70.5	/	74.28	(69.25–81.25)	/	/	/
D	72.17	(56.67–88.34)	200.96	(151.77–330.61)	86.45	1.2	1.06
E	103.46	(98.01–109.18)	207.38	(190.94–228.65)	105.75	1.02	1.11
F	103.46	(103.46–98.01)	207.38	(190.94–228.65)	96.1	0.93	0.74
G	85.47	(73.23–99.08)	176.40	(144.56–242.13)	75.22	0.88	0.90
H	57.05	(27.46–174.96)	78.04	(56.46–11204.24)	72.08	1.26	1.24
I	60.73	(52.38–69.71)	98.98	(83.9–131.45)	73.65	1.21	1.16
J	86.04	(69.07–107.36)	138.59	(110.21–254.78)	104.18	1.21	1.34
K	68.5	(64.07–71.65)	83.12	(80.42–86.18)	81.72	1.19	1.03
L	62.2	(46.18–79.49)	89.32	(71.63–161.45)	92.95	1.49	1.13
After 96 h							
A ^a	74.4	/	100.79	(73.06–15065.86)	/	/	/
B ^a	97.8	/	170.37	(146.25–214.04)	/	/	/
C ^a	66.4	/	77.33	(55.56–137.41)	/	/	/
D	67.8	(53.67–82.20)	183.55	(103.16–174.55)	80.25	1.18	1.1
E	99.85	(91.05–109.41)	199.75	(174.96–238.27)	91.95	0.92	0.98
F	99.85	(91.05–109.41)	199.75	(174.96–238.27)	82.1	0.82	0.98
G	81.78	(69.26–95.80)	158.30	(129.06–224.06)	72.4	0.88	0.91
H	55.6	(51.74–60.27)	72.28	(65.94–82.21)	68.4	1.23	1.19
I	57.63	(50.92–64.72)	97.24	(83.83–122.87)	70.4	1.22	1.15
J	83.32	(78.14–88.82)	120.86	(109.94–140.17)	89.95	1.08	1.17
K	68.5	(64.07–71.65)	83.12	(80.42–86.18)	74.25	1.08	0.97
L	58.46	(46.11–69.66)	82.68	(67.54–131.78)	82.1	1.4	1.13

DRI for samples D, F (after 48, 72 and 96 h). G are calculated corresponded to *A. herba alba* EO.

DRI for samples E, F after 24 h. J are calculated corresponded to *J. phoenicea* EO.

DRI for samples H, I, K and L are calculated corresponded to *R. officinalis* EO.

^a (Boukraa et al., 2020).

^b Theoretical LD₅₀ = [(Proportion of EO1 x LD₅₀ of EO1) + (Proportion of EO2 x LD₅₀ of EO2)].

^c SF = Theoretical LD₅₀/Observed LD₅₀; SF = 1 (Additive), < 1 (Antagonistic), > 1 (Synergistic) (Feroz, 2020).

^d DRI is a measure of reduction extent in dose of specific toxicant to synergistic combination corresponded to the separate application of that toxicant for a median lethal effect (LD₅₀) and it was calculated as: $DRI = Dx1/D1$ (Chou, 2010). Dx1 indicates only LD₅₀ of one of EOs including in the mixture. while D1 is the LD₅₀ of synergistic combination which contains that EOs. $DRI = 1$ (No dose reduction). < 1 (Unfavorable dose reduction). > 1 (Favorable dose reduction).

that these mixtures have a synergistic effect. It was also shown that blends including EOs of *R. officinalis* + *A. herba alba* (3:1) with EOs of *J. phoenicea* + *R. officinalis* in ratios of 1:3 and 1:1 exhibited considerable synergy, with SFs values of 2.22, 2.26, and 2.09, respectively. The synergistic impact significantly reduced the bioinsecticide doses (DRI = 2.41, 2.27, and 2.09, respectively). In contrast to those previously described, the mixtures D, E, and G were antagonistic. Very high toxicities of mixtures H, I, and L were detected after 96 h of *T. castaneum* exposure, with recorded LD₅₀ values of 55.6, 57.63, and 58.46 μL/L air and LD₉₀ values of 72.27, 97.24, and 82.68 μL/L air, respectively. The LD₅₀ and LD₉₀ values for the rest of the combinations were fluctuated between from 67.8 to 99.85 and 83.12–199.75 μL/L air, respectively. In spite of those effects, mixtures of F and E were antagonistic and synergistic, respectively, after 96 h, whilst the other combinations maintained their previously observed antagonistic or synergistic effects. Moreover, their synergistic effects and their LD₅₀ values decreased as much as exposure time elapsed.

Next, the effect of EO blends on adult longevities was examined; our findings indicate that this parameter is dose-dependent (Fig. 4). At the lowest concentration (C 1 = 41.67 μL/L air), no mortality was detected for the samples J and K for four days. In addition, mixtures D, E, F, and G exhibited no mortality after 48 h of exposure. Beyond this period, mortality rates were less than 10%. Likewise, the combinations L, I, and H resulted in very low mortality rates within four days. on the other hand, fumigation at the highest dose (333.33 μL/L air) resulted in mortalities that are close or equal to 100% throughout the treatment period, The LT₅₀ and LT₉₀ values for a concentration of 83.33 μL/L air (Table 4) revealed that mixtures L, I, and K brought about relatively significant mortalities (> 60%) after 24 h of exposure, making it impossible to determine LT₅₀ values for these samples. Furthermore, samples L, K, and I exhibited the lowest LT₉₀ values, which were 2.60, 3.97, and 4.15 h, respectively. The combinations J, E, and F have the lowest effects on insect longevity, with obtained LT₅₀ values of 10.40, 11.73, and 19.20 h, respectively. Other Investigations done on the same type of EOs included in the current mixtures showed their fumigant and repellent effectiveness against many stored product insect pests (Giatropoulos et al., 2013; Boukraa et al., 2020; Cetin and Gudek., 2020). In almost all these trials, the efficacy of the selected EOs was assessed in a single product application not as combination. The three EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea*, and *R. officinalis* were already proven to be toxic against *T. castaneum* adults with respective LD₅₀ values of 107.2, 155.7, and 156.6 μL/L of air after 24 h side to side 74.4, 97.8, and 66.4 μL/L of air after 96 h (Boukraa et al., 2020). Numerous previous studies were confirmed the biological activities of EOs combined with other bioactive molecules. Benelli et al. (2017) advanced that blending *Satureja montana* L. with *Aloysia citriodora* Paláu EOs (1:1) exhibit extremely strong larvicidal toxicity against *Culex quinquefasciatus* with a LD50 of 18.3 μL/L of air. While by combining *Satureja montana* L. and *Pinus nigra* Arnold EOs (1:1), an antagonistic effect was detected towards the same larvae. In addition, Pandiyan et al. (2019) tested the individual toxicities of the EOs of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (Myrtaceae), *Illicium verum* Hook. f (Schisandraceae) and *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague ex Turrill (Apiaceae) against *Aedes aegypti* larvae, as well as any synergistic interaction of their binary mixes (1:1). The results indicated that EOs exhibited synergistic larvicidal efficacy against mosquitoes. Currently, certain commercial bioinsecticides contain EO blends, in the image of EcotrolMT (10% oil of *R. officinalis*, 2% *Mentha piperita* L. (pro. sp.) oil, 5% geraniol) and TetraCURBMT (50% *R. officinalis* EO, 3% *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry EO, 1.95% *Mentha piperita* L. (pro. sp.) EO) (Isman, 2020). On the other hand, some of terpenes were combined together in several investigations. According to Koul et al. (2013), combining thymol with linalool or eucalyptol improved its toxicity against *Chilo partellus* Swinhoe, *Spodoptera litura* and *Helicoverpa armigera* larvae. Unlike the effectiveness against *C. partellus* and *H. armigera*, where thymol and anethole were antagonistic, both of these demonstrated a synergistic interaction towards *S. litura*, while carvacrol is antagonistic to all species in all combinations. Novato et al. (2015) assessed the coupled toxicity of thymol, carvacrol, and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* and *Dermacentor nitens* larvae. The results showed that only the mixtures of carvacrol

Table 4

Calculated LT₅₀ and LT₉₀ values along with their 95% fiducial limits. of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EOs then their binary combinations against *T. castaneum* adults.

EOs and EO combinations	LT ₅₀ (hour)	95% Fiducial limits (hour)	LT ₉₀ (hour)	95% Fiducial limits (hour)
A ^a	b	/	3.47	(2.90–4.70)
B ^a	4.129	(3.72–4.79)	7.32	(6.24–9.29)
C ^a	1.404	(1.07–1.66)	2.58	(2.24–3.18)
D	2.031	(1.54–2.42)	5.17	(4.35–6.84)
E	5.174	(3.85–16.64)	11.73	(7.60–52.60)
F	6.778	/	19.20	/
G	2.412	(1.75–3.02)	7.94	(6.08–13.38)
H	2.412	(1.75–3.02)	7.94	(6.08–13.38)
I	b	/	4.15	/
J	3.072	(2.14–5.89)	10.399	(6.85–41.25)
K	b	/	3.970	/
L	b	(-83.97–0.28)	2.595	(1.46–15.99)

^a (Boukraa et al., 2020).

^b Mortality Percentages after 24 h of treatment are < 50%.

with thymol (LD₅₀) and carvacrol with (E)-cinnamaldehyde (1/4 LD₅₀) displayed a synergistic impact. Furthermore, the thymol-carvacrol mixture exhibited a synergistic effect against *D. nitens* larvae, where the other combinations expressed additive or antagonistic effects. Recent studies demonstrated the efficacy of EOs and monoterpenes in association with synthetic insecticides. Feroz (2020) examined the toxicity of deltamethrin added to EOs of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *Cinnanomum camphora* (L.) J. Presl against two resistant populations of *Trogoderma granuloma* larvae, both separately and in different combinations. They reported that all blends had synergistic effects against both batches. Yuan et al. (2019) also mixed eucalyptol, *trans*-cinnamaldehyde, and eugenol with dimethylfluthrin against a resistant strain of *Culex quinquefasciatus*. Overall, the most synergistic samples were eucalyptol + eugenol (9:1), eucalyptol + *trans*-cinnamaldehyde (1:1), and *trans*-cinnamaldehyde + eugenol (9:1) associated with dimethylfluthrin (10:1). These findings highlight the promising potential of these terpenes as natural synergists in order to enhance the efficacy of dimethylfluthrin. Likewise, Brito et al. (2021) concluded that the use of the mixture of *Pimenta racemosa* (Mill.) J.W. Moore and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (pro. sp.) EOs in combination with chlorpyrifos reduced the amount of synthetic insecticide required, therefore that constituted an interesting alternative for controlling *S. zeamais*. This indicates that different species may respond distinctly to the combinations of EOs or their components, so an effect observed on one organism can not be generalized on others. These variations may be attributed to the testing methods, the concentrations, as well as the substances' origins (Novato et al., 2015).

Beyond, Harris (2002) explained that the EO combinations were difficult to assess scientifically because it was rarely possible to prove that each biologically active component contributes positively to the overall effect of the preparation. Although some literature reported the synergistic effect of EOs as insecticides but the mechanism of synergy was frequently unclear. Based on recent reports, the effectiveness of EOs combinations as insecticides may be attributed to their high content of monoterpenes that have a high potential for penetration through the cuticle, respiratory and digestive systems of insects (Lee et al., 2004; Rozman et al., 2007; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009; Gnankiné and Bassolé, 2017; Brito et al., 2021). Furthermore, the synergistic effect of EO mixtures on insects can be related to the mutual action of their major and minor ingredients in the tested samples since some principal ingredients have the ability to facilitate the absorption of minor bioactive ones (Tak and Isman, 2015, 2016, 2017a; Messaoudi Moussii et al., 2020). This was proved in a previous study, where eucalyptol, one of the major constituents of mixture H, increased the solubility as well as the spreading ability of synthetic insecticides on the lipid layer of the insect cuticle because of its lipophilic property (Tak and Isman, 2015, 2017b; Yuan et al., 2019). Consequently, it can be deduced that eucalyptol acts in the same way on *T. castaneum*. However, Yang et al. (2014) and Sheng et al. (2020) suggested the multi-target effect as a probable mode of synergy since EO blends contain several compounds and probably show synergistic efficacy by involving multiple target sites simultaneously. In fact, EOs cause a general physiological disturbance targeting different sites in the central nervous system of *T. castaneum*, such as γ -Aminobutyric acid and Acetylcholine receptors, so acts on the neuromuscular system causing dysregulation of motor activity of the insect (Tong and Coats, 2010; Waliwitiya et al., 2010; Novato et al., 2015; Sheng et al., 2020; Isman, 2020), and octopamine receptors, causing cell membrane rupture and compromising the trachea (Isman et al., 2007; Khanikor et al., 2013; Yang et al., 2014; Novato et al., 2015; Jankowska et al., 2018; Brito et al., 2021). Furthermore, Feroz (2020) demonstrated that all EO mixtures decreased significantly hemocyte viabilities, cell proliferations, and mitochondrial dehydrogenase activity in tow resistant populations of *Trogoderma granarium* larvae. In addition, it was observed that the lactate dehydrogenase activity was increased while phenoloxidase activity was decreased. Further, Arafa et al. (2020) proved a direct correlation between the toxic action of thymol and eucalyptus EO mixture and the inhibition of enzymatic activities of acetylcholinesterase, glutathione peroxidase, and catalase on *Rhipicephalus annulatus*, accompanied by an increase in lipid peroxidation. These observations lead us to deduce that one of the modes of synergy between the EOs is to inhibit the metabolic detoxification enzymes of insecticides in *T. castaneum*, such as glutathione S-transferases, cytochrome P450 monooxygenases, and carboxylesterases (Tong and Bloomquist, 2013; Gross et al., 2017; Norris et al., 2018; Sheng et al., 2020). Nevertheless, different agents can control the same target and therefore cooperate agonistically and synergistically (Yang et al., 2014). Researchers previously discovered that membrane disruption could be the main mechanism of action of monoterpenes, such as α -pinene, one of the major constituents of most mixtures (Abraham et al., 2003; Yuan et al., 2019). Likewise, the hydroxyl groups in these bioactive molecules may change the permeability of cell membranes (Jankowska et al., 2017; Arafa et al., 2020). On the other hand, the antagonistic effect of certain samples was strongly related to the formation of new biologically inactive chemicals during interactions between the EO constituents. In this context, Novato et al. (2015) assumed that the reason for the antagonist effect of (E)-cinnamaldehyde (aldehyde) combined with thymol and carvacrol (phenolic alcohol) was the reaction of these three compounds, forming a hemiacetal or an acetal, which are biologically inert due to the absence of an active functional group (phenol and enone) in both compounds. In addition, the antagonism may be due to the dilution of the most effective EO compounds in the mixture (Hategekimana and Erler, 2020). Feroz (2020) indicated that the effectiveness of EO combinations can be attributed to increasing or decreasing the amount of the most potent ingredients. Further studies are consequently required to determine the active substances in EO blends that have a synergistic effect and the subsequent mechanisms (Sheng et al., 2020).

Repulsion is the term used to describe an organism's directed movement away from a stimulus. The evaluation of the insect behavior revealed that all binary mixtures exhibited repellent effectiveness against *T. castaneum* adults (Fig. 5). At the lowest dose (7.86 nL/cm²), mixtures D, E, and F showed respective PR values of 66.67, 53.33, and 88.33%. These blends were extremely repulsive at 62.91 nL/cm² with a PR value of 100%. However, the lowest repulsions were obtained from the combinations H (18.33%) and I (28.33%) at 7.86 nL/cm². At 62.91 nL/cm², the same mixtures revealed PR values of 65% and 93%, respectively. Although many blends showed potent repellent effects compared to some others, these differences were not statistically significant ($P > 0.05$). Table 5 displays the RD₅₀ and RD₉₀ values, as well as the SFs for studied mixtures. As repellents, the combinations L, J, F, and G were extremely potent. As stated previously (Fig. 5), the RPs of these blends were greater than 50%. Therefore, RD₅₀ values were not determined for these samples. According to RD₉₀ values, the combination F with a dose of 1.25 nL/cm² presented the highest repellent activity. Whereas, blend G displayed the lowest repellence at 5.95 nL/cm². Based on the SF values, most binary combinations revealed

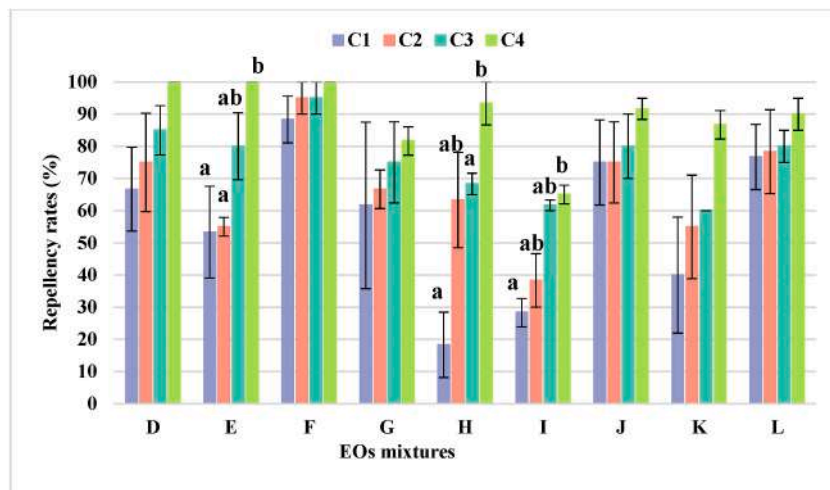


Fig. 5. Repellency rates (mean \pm SE) of different mixtures against *T. castaneum* at 30 min of exposure at various concentrations (C). C1 = 7.86 nL/cm²; C2 = 15.73 nL/cm²; C3 = 31.45 nL/cm²; C4 = 62.91 nL/cm². Comparison of means is conducted using ANOVA or Kruskal-Wallis with Tukey's test for normal data. In the same column, bars with the same letter are not significantly different ($P > 0.05$), while the opposite case generates a significance of data ($P < 0.05$).

Table 5

Calculated values of dose repellency (DR) 50s and 90s along with their 95% fiducial limits, of binary of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* EO combinations against *T. castaneum* adults.

EOs and EO combinations	Observed RD ₅₀ (nL/cm ²)	95% Fiducial limits (nL/cm ²)	Observed RD ₉₀ (nL/cm ²)	95% Fiducial limits (nL/cm ²)	Theoretical RD ₉₀ (nL/cm ²) ^c	SF ^d
A ^a	b	/	2.68	(1.74–10.51)	/	/
B ^a	2.14	(0.70–3.06)	4.27	(3.25–10.23)	/	/
C ^a	4.90	/	10.58	/	/	/
D	.373	/	2.99	(2.10–12.55)	3.07	1.03
E	1.27	(-0.46–1.90)	3.46	(2.73–5.92)	3.87	1.12
F	b	/	1.25	/	3.47	2.78
G	b	/	5.95	/	4.65	0.78
H	1.98	(1.21–2.53)	3.83	(3.10–5.96)	8.60	2.25
I	2.63	(2.17–3.14)	6.54	(5.32–9.34)	6.63	1.00
J	b	/	4.55	/	5.85	1.28
K	1.77	(-1.40–2.67)	4.96	(3.63–5.77)	9.00	1.81
L	b	/	5.02	/	7.42	1.47

^a (Boukraa et al., 2020).

^b Percentage Repellency at the lowest concentration <50%.

^c Theoretical RD₉₀ = [(Proportion EO1 x RD₉₀ of EO1) + (Proportion of EO2 x RD₉₀ of EO2)].

^d SF = Theoretical RD₉₀/Observed RD₉₀; SF = 1 (Additive). <1 (Antagonistic). >1 (Synergistic) (Feroz, 2020).

synergistic effects (SF > 1), except the combinations I and G, which exhibited additive (SF = 1) and antagonistic (SF > 1) effects, respectively. Moreover, all the EOs used for mixture preparations in this study exhibited repellent activity against *T. castaneum* adults (Boukraa et al., 2020). As well for low concentrations, Noosidum et al. (2014) found that binary combinations of EOs isolated from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers, *Litsea salicifolia* Roxb. ex Nees and *Melaleuca leucadendron* L. induced vigorous contact irritation and non-contact repellency against *Ae. aegypti*. Peach et al. (2019) also reported that the binary mixtures of *Cinnamomum cassia* (L.) D. Don, *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf and *R. officinalis* EOs enhanced the repellent efficacy compared to single EO if it was applied against the tropical yellow fever mosquito (*Ae. aegypti*), whereas their ternary combinations were less repulsive towards the insect. More similar results were advanced by Hategekimana and Erlar (2020) who revealed that all possible binary (1:1) and ternary (1:1:1) blends of the essences of *Pimpinella anisum* L., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh, and *Mentha piperita* L. (pro. sp.) and/or their major components (*trans*-anethole, eucalyptol, and L-menthol, respectively) enhanced the potential repellency of the EOs and generated more major efficacious compounds against *Sitophilus oryzae*. Meanwhile, Arafa et al. (2020) proved that thymol + eucalyptus EO combinations increased the ovicidal and repellent activities than thymol when applied against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* that were. In fact, it has commonly been known that EOs are complex mixtures of volatile organic compounds from derived plants and that insects have sensory hairs in their antennae that detect chemical substances, leading to various behavioral responses such as the repellent effect reported in this investigation (Abd El-Ghany and Abd El-Aziz, 2017; Romani et al., 2019; Brito et al., 2021). The authors stated that insect repellent behavior was the consequence of monoterpenoid, sesquiterpene, and alcohol interactions with the olfactory receptors (Sathantriphop et al., 2015; Arafa et al., 2020). This data was proved by Schiebet et al. (2019) who measured the olfac-

tory sensitivity of bark beetles to a range of terpenes using electroantennographic detection (EAG). Among the terpenes that elicited the highest olfactory responses, some were detected as the most compounds in our samples, such as α -pinene, 4-thujanol, β -pinene, 3-carene, myrcene, eucalyptol and camphor. However, no effect obtained for some others, such as (\pm)-sabinen. This indicates that the same species may respond distinctly to EOs or their constituents. These findings coincided exactly with this study concerning the repellent effects of all mixtures. Nevertheless, Bruce et al. (2005) and Badji et al. (2021) noted that the detection of plant components or pheromones via the olfactory receptors in phytophagous insects did not imply that these signals played an important role in attraction or repulsion reactions. These statements are confirmed through previous reports; e.g., Badji et al. (2021) who observed that caryophyllene was detected by *Tribolium confusum* with the same sensitivity as anethole using EAG but that it was less repellent than anethole in the behavioral test. Likewise, Hieu et al. (2014) found that limonene, nerol and citronellol induced high and moderate EAG responses in stable flies, but with weak behavioral repulsion.

Overall, our data support the probability that the difference in the molecular targets of the fumigant effect compared to the repellent effect is the reason for the distinct responses of *T. castaneum* to the same mixture. For example, combination F had both highly effective insect repellent and relatively ineffective insecticide. Another important finding provides that the convergence of the chemical compositions of some samples led to highly similar biological activities, which is evident for the K and L mixtures. Meanwhile, the mixture H exhibited a powerful insect repellent effect compared to rosemary EO, in spite of that both of them belonged to the same hierarchical group (G3) and included identical principal ingredients (α -pinene, camphor, and eucalyptol). This inconsistency may be due to the interaction between all components with the insect's physiology and behavior (Benelli et al., 2017). Therefore, the effectiveness of the combinations as fumigants and repellents was controlled by the specified parameters, such as G, H, and I, which consist of the EOs of *A. herba alba* and *J. phoenicea* in varying proportions. During four-day fumigation treatments, mixture G was moderately toxic and antagonistic, while H and I presented extremely high toxicity with obvious synergistic interaction. Such observations were expected as Feng et al. (2020) assessed the contact toxicity of binary mixtures of camphene and bornyl acetate at different ratios against the same insect. Three mixtures were antagonistic (1:1, 1:3.5, and 1:4.4) against two other additive (3.5:1) and synergistic (4.4:1). Katiki et al. (2017) tested the anthelmintic activity of some mixed monoterpenes in binary, ternary, and quaternary associations and reported that the binary combinations were the most effective ones. Away from bioinsecticides, in traditional Chinese medicine, the use of the blending herbs *Astragalus Radix* and *Rehmanniae Radix*, in a ratio of 2:1, could decrease the area of diabetic wounds in rats compared to the groups treated with each plant separately, which is ineffective (Rotenberg et al., 1991). These findings indicate that the amounts of oils in each combination could influence the interaction type (synergy, antagonism, or additivity) as well as the preparation potency. Hence, our results are a useful tool in the selection of the best mixture ratio in further investigations.

Finally, correlation analysis was carried out to determine the relationship between the fumigant and repellent activities and the amount (%) of the five major components in each blend of EOs at different concentrations (Table 6). Overall, the investigated biological activities were not main ingredient dependent (Coef $r < 0.5$), excluding some cases at certain concentrations where both of biological effects increased in the presence of particular compounds (Coef $r > 0.5$), including: 1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene, 4-Thujanol, camphor, camphene, and endo-Borneol for fumigant effect; and 1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol and 2,6,6-trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7 for repellent effect. On the other hand, sabinen reduced the insect mortalities (Coef $r > -0.5$) at 166.67 and 333.33 $\mu\text{L/L}$ air of samples. Similarly, camphene and terpineol induced the repellent effect reduction (Coef $r > -0.5$). The correla-

Table 6

Correlations (Spearman's rho correlation coefficient) of the fumigant and repellent effects with the percentages of the five main compounds of each EO mixture.

Compounds	Fumigant effect					Repellent effect			
	C1f	C2f	C3f	C4f	C1r	C2r	C3r	C4r	
Neoisothujyl acetate	C1	0.11	-0.52	-0.19	-0.10	-0.06	-0.13	0.07	0.07
(3E,6E)-Nona-3,6-dienyl 2.2.3.3.4.4.4-he	C2	-0.19	0.08	-0.12	-0.28	0.08	0.04	0.00	-0.24
α -Pinene	C3	-0.08	-0.25	-0.14	0.25	-0.22	-0.27	-0.34	-0.21
α -Terpinyl acetate	C4	-0.35	-0.24	-0.08	0.03	0.23	0.20	0.13	0.16
1-(2-Ethyl-3-cyclohexenyl)ethanol	C5	-0.43	-0.21	-0.10	-0.36	0.60*	0.57*	0.78**	0.80**
1,6-Dimethylhepta-1,3,5-triene	C6	0.58*	0.24	0.18	0.12	-0.08	-0.05	-0.11	-0.32
2,6,6-Trimethylbicyclo[3.2.0]hept-2-en-7	C7	-0.13	-0.19	0.04	-0.12	0.46	0.56*	0.69**	0.70**
3,5-Heptadien-2-ol. 2,6-dimethyl-	C8	0.25	0.07	0.12	-0.28	-0.02	0.07	0.19	0.12
3-Carene	C9	-0.21	-0.48	-0.10	-0.13	0.28	0.13	0.23	0.25
Car-3-en-5-one	C10	0.03	0.00	-0.06	-0.35	0.27	0.28	0.41	0.27
5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	C11	-0.28	-0.37	-0.46	-0.07	-0.09	-0.11	-0.08	0.02
4-Thujanol	C12	0.30	0.31	0.61*	0.60*	0.08	0.08	-0.22	-0.30
Camphor	C13	0.43	0.70**	0.45	0.46	-0.39	-0.28	-0.55	-0.55
Sabinen	C14	-0.48	-0.54	-0.59*	-0.57*	0.30	0.22	0.49	0.51
Camphene	C15	0.43	0.67*	0.43	0.43	-0.38	-0.30	-0.61*	-0.64*
endo-Borneol	C16	0.10	0.69**	0.13	0.13	-0.19	-0.11	-0.26	-0.25
Eucalyptol	C17	0.19	0.38	-0.12	-0.04	-0.45	-0.35	-0.34	-0.31
exo-2,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-	C18	-0.19	-0.23	0.19	-0.12	0.05	0.46	0.47	0.35
Terpineol	C19	0.40	0.49	0.27	0.50	-0.55	-0.50	-0.78**	-0.71**
Thujone	C20	0.46	0.10	0.22	0.04	-0.05	0.10	0.20	0.25

*and ** correlation is significant (two-sided) at the 0.05 level or at the 0.01 level, respectively; positive rS: the fumigant and repellent increase in presence of compound; negative rS: the fumigant and repellent effects decrease in the presence of the compound. C1f = 41.67 $\mu\text{L/L}$ air; C2f = 83.33 $\mu\text{L/L}$ air; C3f = 166.67 $\mu\text{L/L}$ air; C4f = 333.33 $\mu\text{L/L}$ air; C1r = 7.86 nL/cm²; C2r = 15.73 nL/cm²; C3r = 31.45 nL/cm²; C4r = 62.91 nL/cm².

tion analysis results reflected those of Hategkimana and Erler (2020), who also demonstrated that the minor components of EOs had significant importance in regulating repellent efficacy, highlighting the importance of their complex compositions in the expression of repulsion. Similarly, Feng et al. (2020) underlined that those minor constituents might play a crucial role in contact toxicity against *T. castaneum*.

4. Conclusion

This study may suggest that mixing EOs of *A. herba alba*, *J. phoenicea* and *R. officinalis* lead to chemical composition changes in all derived binary combinations. These findings raised important questions about the interactions between EO components. Overall, the current data strengthens the idea that EO mixtures are recommended for the management of *T. castaneum* in granaries as insect repellents and fumigants through preventive or curative control. It is worth mentioning that synergistic interactions in combinations D, E, F, H, I, K and L for one of the biological activities would be a fruitful area to develop effective and stable formulations based on these samples as active ingredients. Otherwise, the generalization of these results is subject to certain limitations. Thus, further studies are necessary to explore the toxicity and repellency effects of tested mixtures against other life stages of *T. castaneum*. We require additional investigations to explore the potential practical application including safety tests for human health and the environment.

Author contributions

Naima Boukraa: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - Original Draft, Visualization. **Segni Ladjel:** Methodology, Validation, Resources, Supervision. **Wiam BENLAMOUDI:** Conceptualization, Validation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Goudjil Mohamed Bilal:** Methodology, Validation. **Mohammed BERREKBIA:** Formal analysis. **Amar Eddoud:** Methodology, Resources.

Declaration of competing interest

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data availability

The data that has been used is confidential.

References

- Abad, M.J., Bedoya, L.M., Apaza, L., Bermejo, P., 2012. The *Artemisia* L. genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 17 (3), 2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>.
- Abd El-Ghany, N.M., Abd El-Aziz, S.E., 2017. External morphology of antennae and mouthpart sensillae of the granary weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 52 (1), 29–38. <https://doi.org/10.18474/JES16-19.1>.
- Abraham, D., Francischini, A.C., Pergo, E.M., Kelmer-Bracht, A.M., Ishii-Iwamoto, E.L., 2003. Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant. Physiol. Biochem.* 41 (11–12), 985–991. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2003.07.003>.
- Arafa, W.M., Aboelhadid, S.M., Moawad, A., Shokeir, K.M., Ahmed, O., 2020. Toxicity, repellency and anti-cholinesterase activities of thymol-eucalyptus combinations against phenotypically resistant *Rhipicephalus annulatus* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 81 (2), 265–277. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00506-1>.
- Baccari, W., Znati, M., Zardi-Bergaoui, A., Chaieb, I., Flamini, G., Ascrizzi, R., Jannet, H.B., 2020. Composition and insecticide potential against *Tribolium castaneum* of the fractionated essential oil from the flowers of the Tunisian endemic plant *Ferula tunetana* Pomel ex Batt. *Ind. Crop. Prod.* 143, 111888. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111888>.
- Badji, C.A., Dorland, J., Kheloul, L., Bréard, D., Richomme, P., Kellouche, A., De Souza, C.R.A., Bezerra, A.L., Anton, S., 2021. Behavioral and antennal responses of *tribolium confusum* to *varronia globosa* essential oil and its main constituents: perspective for their use as repellent. *Molecules* 26 (15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154393>.
- Badreddine, B.S., Baouind, M., 2016. Effects of *Artemisia herba-alba* essential oils on survival stored cereal pests: *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) and *Trogoderma granarium* (Everst) (Coleoptera, Dermestidae). *J. Coast. Life Med.* 4 (5), 390–394. <https://doi.org/10.12980/jclm.4.2016j6-19>.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 46 (2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2007.09.106>.
- Benelli, G., Pavela, R., Canale, A., Cianfaglione, K., Ciaschetti, G., Conti, F., Nicoletti, M., Senthil-Nathan, S., Mehlhorn, H., Maggi, F., 2017. 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 (2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.01.012>.
- Boukraa, N., Ladjel, S., Goudjil, M.B., Eddoud, A., Sanori, K.W.M., 2020. Chemical compositions, Fumigant and Repellent Activities, of Essential oils from three Indigenous medicinal plants and their mixture, against stored grain pest, *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Asian J. Res. Chem.* 13 (6), 455–464. <https://doi.org/10.5958/0974-4150.2020.00081.4>.
- Braun, M., Franz, G., 1999. Quality criteria of bitter fennel oil in the German Pharmacopoeia. *Pharmaceut. Pharmacol. Lett.* 9, 48–51.
- Brito, V.D., Achimón, F., Pizzolitto, R.P., Ramírez Sánchez, A., Gómez Torres, E.A., Zygadlo, J.A., Zunino, M.P., 2021. An alternative to reduce the use of the synthetic insecticide against the maize weevil *Sitophilus zeamais* through the synergistic action of *Pimenta racemosa* and *Citrus sinensis* essential oils with chlorpyrifos. *J. Pest. Sci.* 94 (2), 409–421. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01264-0>.
- Bruce, T.J., Wadhams, L.J., Woodcock, C.M., 2005. Insect host location: a volatile situation. *Trends Plant Sci.* 10 (6), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.003>.
- Çetin, H., Güdek, M., 2020. Effect of essential oil from the leaves of rosemary used in the control of *callosobruchus maculatus* (F.) on the hydration coefficient, cookability, taste and color of the edible chickpea. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 23 (2), 301–310. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1748522>.
- Chansang, A., Champakaew, D., Junkum, A., Jitpakdi, A., Amornlerdpison, D., Aldred, A.K., Riyong, D., Wannasan, A., Intirach, J., Muangmoon, R., Pitasawat, B., 2018. Synergy in the adulticidal efficacy of essential oils for the improvement of permethrin toxicity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *Parasites Vectors* 11 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3001-7>.
- Chou, T.C., 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 70 (2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>.
- Ebadollahi, A., Davari, M., Razzmjou, 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 (3), 1025–1030. <https://doi.org/10.1093/jee/tox065>.
- Feng, Y.X., Wang, Y., Geng, Z.F., Zhang, D., Almaz, B., Du, S.S., 2020. Contact toxicity and repellent efficacy of Valerianaceae spp. to three stored-product insects and

- synergistic interactions between two major compounds camphene and bornyl acetate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 190 (September 2019), 110106. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110106>.
- Feroz, A., 2020. Efficacy and cytotoxic potential of deltamethrin, essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Cinnamomum 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>.
- Ganji, S., Svensson, F.G., Unelius, C.R., 2020. Asymmetric synthesis of oxygenated monoterpenoids of importance for bark beetle ecology. *J. Nat. Prod.* 83 (11), 3332–3337. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00669>.
- Giatriopoulos, A., Pitarokili, D., Papaioannou, F., Papachristos, D.P., Koliopoulos, G., Emmanouel, N., Tzakou, O., Michaelakis, A., 2013. Essential oil composition, adult repellency and larvicidal activity of eight Cupressaceae species from Greece against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 112 (3), 1113–1123. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3239-5>.
- Gnankiné, O., Bassolé, I.L.H.N., 2017. Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against anopheles species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules* 22 (10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101321>.
- 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>.
- Gracza, L., Ruff, P., 1981. The light–stability of trans-isoasarone and related compounds. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 121, 2541–2544.
- Gross, A.D., Norris, E.J., Kimber, M.J., Bartholomay, L.C., Coats, J.R., 2017. Essential oils enhance the toxicity of permethrin against *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae*. *Med. Vet. Entomol.* 31 (1), 55–62. <https://doi.org/10.1111/mve.12197>.
- 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.
- Harris, R., 2002. Synergism in the essential oil world. *Int. J. Aromather.* 12 (4), 179–186. [https://doi.org/10.1016/S0962-4562\(02\)00083-8](https://doi.org/10.1016/S0962-4562(02)00083-8).
- Hategekimana, A., Erler, F., 2020. Comparative repellent activity of single, binary and ternary combinations of plant essential oils and their major components against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Plant Dis. Prot.* 127 (6), 873–881. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00353-7>.
- Hieu, T.T., Jung, J., Kim, S. Il, Ahn, Y.J., Kwon, H.W., 2014. Behavioural and electroantennogram responses of the stable fly (*Stomoxys calcitrans* L.) to plant essential oils and their mixtures with attractants. *Pest Manag. Sci.* 70 (1), 163–172. <https://doi.org/10.1002/ps.3547>.
- Isman, M.B., 2020. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry Rev.* 19 (2), 235–241. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09653-9>.
- Isman, M.B., Machial, C.M., Miresmaili, S., Bainard, L.D., 2007. Essential oil-based pesticides: new insights from old chemistry. In: Ohkawa, H., Miyagawa, H., Lee, P.W. (Eds.), *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. Wiley, pp. 201–210.
- Jankowska, M., Rogalska, J., Wyszowska, J., Stankiewicz, M., 2018. Molecular targets for components of essential oils in the insect nervous system—a review. *Molecules* 23 (1), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23010034>.
- Jilani, G., Saxena, R.C., 1990. Repellent and feeding deterrent effects of turmeric oil, sweetflag oil, neem oil, and a neem-based insecticide against lesser grain borer (Coleoptera: Bostrychidae). *J. Econ. Entomol.* 83 (2), 629–634. <https://doi.org/10.1093/jee/83.2.629>.
- Katiki, L.M., Barbieri, A.M.E., Araujo, R.C., Verissimo, C.J., Louvandini, H., Ferreira, J.F.S., 2017. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemochus contortus* in vitro. *Vet. Parasitol.* 243, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.008>.
- Khanikar, B., Parida, P., Yadav, R.N.S., Bora, D., 2013. Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and docking studies. *J. Appl. Pharmacol.* 3 (2), 6–12. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.30202>.
- Kheloul, L., Anton, S., Gadenne, C., Kellouche, A., 2020. Fumigant toxicity of *Lavandula spica* essential oil and linalool on different life stages of *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Asia Pac. Entomol.* 23 (2), 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2020.02.008>.
- Kheloul, L., Anton, S., Bréard, D., Kellouche, A., 2021. Fumigant toxicity of some essential oils and eucalyptol on different life stages of *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bot. Lett.* 1–12. <https://doi.org/10.1080/23818107.2021.1982767>.
- Kim, S.W., Lee, H.R., Jang, M.J., Jung, C.S., Park, I.K., 2016. Fumigant toxicity of Lamiaceae plant essential oils and blends of their constituents against adult rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Molecules* 21 (3), 361. <https://doi.org/10.3390/molecules21030361>.
- Kiplang'at, K.P., Mwangi, R.W., 2014. Synergistic repellent activity of plant essential oils against *Aedes aegypti* on rabbit skin. *Int. J. Mosq. Res.* 1, 55–59.
- Koul, O., Singh, R., Kaur, B., Kanda, D., 2013. Comparative study on the behavioral response and acute toxicity of some essential oil compounds and their binary mixtures to larvae of *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura* and *Chilo partellus*. *Ind. Crop. Prod.* 49, 428–436. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.032>.
- Lau, K.M., Lai, K.K., Liu, C.L., Tam, J.C.W., To, M.H., Kwok, H.F., Lau, C.P., Ko, C.H., Leung, P.C., Fung, K.P., Poon, S.K.S., Lau, C.B.S., 2012. Synergistic interaction between *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 141 (1), 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.02.025>.
- Lee, B.H., Annis, P.C., Tumaalii, F., Choi, W.S., 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *J. Stored Prod. Res.* 40 (5), 553–564. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2003.09.001>.
- Liang, J.Y., Wang, W.T., Zheng, Y.F., Zhang, D., Wang, J.L., Guo, S.S., Zhang, W.J., Du, S.S., Zhang, J., 2017. Bioactivities and chemical constituents of essential oil extracted from *Artemisia anethoides* against two stored product insects. *J. Oleo Sci.* 66 (1), 71–76. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16080>.
- Mahanta, S., Khanikar, B., 2021. Mosquitocidal activity of twenty-eight plant essential oils and their binary mixtures against *Culex quinquefasciatus*, (Diptera: Culicidae). *Heliyon* 7 (2), e06128. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06128>.
- McDonald, L.L., Guy, R.H., Speirs, R.D., 1970. Preliminary Evaluation of New Candidate Materials as Toxicants, Repellents and Attractants Against Stored Product Insects. Agricultural Research Service, U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C.
- Messaoudi Moussii, I., Nayme, K., Timinouni, M., Jamaledine, J., Filali, H., Hakkou, F., 2020. Synergistic antibacterial effects of Moroccan *Artemisia herba alba*, *Lavandula angustifolia* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Synergy* 10, 100057. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100057>.
- Misharina, T.A., Polshkov, A.N., 2005. Antioxidant properties of essential oils: autooxidation of essential oils from laurel and fennel and effects of mixing with essential oil from coriander. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 41 (6), 693–702.
- 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>.
- Nelson, A., Kursar, T., 1999. Interactions among plant defense compounds: a method for analysis. *Chemoecology* 9, 81–92. <https://doi.org/10.1007/s000490050037>.
- Noosidum, A., Chareonviriyaphap, T., Chandrapatya, A., 2014. Synergistic repellent and irritant effect of combined essential oils on *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *J. Vector Ecol.* 39 (2), 298–305. <https://doi.org/10.1111/jvec.12104>.
- Norris, E.J., Johnson, J.B., Gross, A.D., Bartholomay, L.C., Coats, J.R., 2018. Plant essential oils enhance diverse pyrethroids against multiple strains of mosquitoes and inhibit detoxification enzyme processes. *Insects* 9 (4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/insects9040132>.
- Novato, T.P.L., Araújo, L.X., de Monteiro, C.M.O., Maturano, R., Senra, T. de O.S., da Silva Matos, R., Gomes, G.A., de Carvalho, M.G., Daemon, E., 2015. Evaluation of the combined effect of thymol, carvacrol and (E)-cinnamaldehyde on *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) and *Dermaconter nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. *Vet. Parasitol.* 212 (3–4), 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.021>.
- Olszowy-Tomczyk, M., 2020. Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochemistry Rev.* 19, 63–103. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09658-4>.
- Pandiyani, G.N., Mathew, N., Munusamy, S., 2019. Larvicidal activity of selected essential oil in synergized combinations against *Aedes aegypti*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 174, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.019>.
- Papachristos, D.P., Stamopoulos, D.C., 2001. Repellent, toxic and reproduction inhibitory effects of essential oil vapours on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Stored Prod. Res.* 38 (2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00007-8).
- Pavela, R., 2015. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitol. Res.* 114 (10), 3835–3853. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4614-9>.
- Pavela, R., Benelli, G., 2016. Essential oils as ecofriendly biopesticides? Challenges and constraints. *Trends Plant Sci.* 21 (12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>.

- Peach, D.A.H., Almond, M., Gries, R., Gries, G., 2019. Lemongrass and cinnamon bark: plant essential oil blend as a spatial repellent for mosquitoes in a field setting. *J. Med. Entomol.* 56 (5), 1346–1352. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz078>.
- Pfau, M., 1972. Photochemistry in the field of monoterpenes and related compounds. *Flavour. Ind.* 3, 89–103.
- Romani, R., Bedini, S., Salerno, G., Ascrizzi, R., Flamini, G., Echeverria, M.C., Farina, P., Conti, B., 2019. Andean flora as a source of new repellents against insect pests: behavioral, Morphological and electrophysiological studies on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects* 171 (10). <https://doi.org/10.3390/insects10060171>.
- Rösner, J., Wellmeyer, B., Merzendorfer, H., 2020. *Tribolium castaneum*: a model for investigating the mode of action of insecticides and mechanisms of resistance. *Curr. Pharmaceut. Des.* 26 (29), 3554–3568. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200513113140>.
- Rotenberg, S.A., Calogeropoulou, T., Jaworski, J.S., Weinstein, I.B., Rideout, D., 1991. A self-assembling protein kinase C inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (6), 2490–2494. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2490>.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2006.09.001>.
- Sathantriphop, S., Achee, N.L., Sanguanpong, U., Chareonviriyaphap, T., 2015. The effects of plant essential oils on escape response and mortality rate of *Aedes aegypti* and *Anopheles minimus*. *J. Vector Ecol.* 40 (2), 318–326. <https://doi.org/10.1111/jvec.12170>.
- Shaw, K., Wright, K., Wang, J., Kalnins, P., 2012. P01.39. Synergism of herbs in classical Chinese medicine: evidence from HPLC. *BMC Compl. Alternative Med.* 12 (S1), 6882. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-s1-p39>.
- Sheng, Z., Jian, R., Xie, F., Chen, B., Zhang, K., Li, D., Chen, W., Huang, C., Zhang, Y., Hu, L., Zhao, D., Zheng, X., Wu, P., Hong, W.D., 2020. Screening of larvicidal activity of 53 essential oils and their synergistic effect for the improvement of deltamethrin efficacy against *Aedes albopictus*. *Ind. Crop. Prod.* 145, 112131. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112131>.
- Tak, J.H., Isman, M.B., 2015. Enhanced cuticular penetration as the mechanism for synergy of insecticidal constituents of rosemary essential oil in *Trichoplusia ni*. *Sci. Rep.* 5, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep12690>.
- Tak, J.-H., Isman, M.B., 2016. Metabolism of citral, the major constituent of lemongrass oil, in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, and effects of enzyme inhibitors on toxicity and metabolism. *Pestic. Biochem. Physiol.* 133, 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.03.009>.
- Tak, J.H., Isman, M.B., 2017a. Enhanced cuticular penetration as the mechanism of synergy for the major constituents of thyme essential oil in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Ind. Crop. Prod.* 101, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.003>.
- Tak, J.H., Isman, M.B., 2017b. Penetration-enhancement underlies synergy of plant essential oil terpenoids as insecticides in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Sci. Rep.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep42432>.
- Tavares, L., McDougall, G.J., Fortalezas, S., Stewart, D., Ferreira, R.B., Santos, C.N., 2012. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chem.* 135 (2), 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.023>.
- Tong, F., Bloomquist, J.R., 2013. Plant essential oils affect the toxicities of carbaryl and permethrin against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 50 (4), 826–832. <https://doi.org/10.1603/ME13002>.
- Tong, F., Coats, J.R., 2010. Effects of monoterpene insecticides on [3H]-TBOB binding in house fly GABA receptor and 36Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. *Pestic. Biochem. Physiol.* 98 (3), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.003>.
- 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>.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16 (2–3), 97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>.
- Waliwitiya, R., Belton, P., Nicholson, R.A., Lowenberger, C.A., 2010. Effects of the essential oil constituent thymol and other neuroactive chemicals on flight motor activity and wing beat frequency in the blowfly *Phaenicia sericata*. *Pest Manag. Sci.* 66 (3), 277–289. <https://doi.org/10.1002/ps.1871>.
- Wangrawa, D.W., Ochomo, E., Upshur, F., Zanré, N., Borovsky, D., Lahondere, C., et al., 2022. Essential oils and their binary combinations have synergistic and antagonistic insecticidal properties against *Anopheles gambiae* s. l. (Diptera: Culicidae). *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 42, 102347. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102347>.
- Yang, Y., Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., He, K., 2014. Synergy effects of herb extracts: pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia* 92, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>.
- Yuan, L., Yang, X., Yu, X., Wu, Y., Jiang, D., 2019. Resistance to insecticides and synergistic and antagonistic effects of essential oils on dimethrin toxicity in a field population of *Culex quinquefasciatus* Say. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 169, 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.115>.