

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR

ANNABA



جامعة باجي مختار
عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ANIMALE APPLIQUÉE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT ES SCIENCE

FILIERE : SCIENCES BIOLOGIQUES

SPECIALITE : BIOLOGIE ANIMALE

Intitulée

**Efficacité comparée des extraits de quelques plantes médicinales sur
une espèce de moustique *Culex pipiens* : Aspect toxicologique,
biochimique et biomarqueurs.**

Présentée par : ZEGHIB Fouad

Directrice de thèse : TINE-DJEBBAR Fouzia (Pr, Université Larbi Tébessi-Tébessa)

Co-Directrice de thèse : SIFI Karima (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)

Membres de jury:

Pr. SOLTANI. N	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. BENDALI. F	Examinatrice	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. TALEB. S	Examinatrice	Université Larbi Tébessi - Tébessa
Pr. TINE. S	Examineur	Université Larbi Tébessi - Tébessa

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

الحمد لله رب العالمين

"إِنَّ اللَّهَ وَمَلَائِكَتَهُ يُصَلُّونَ عَلَى النَّبِيِّ * يَا أَيُّهَا الَّذِينَ آمَنُوا صَلُّوا

عَلَيْهِ وَسَلِّمُوا تَسْلِيمًا" سورة الأحزاب الآية 56

Louange à ALLAH seigneur de l'univers

Mes plus vifs remerciements et toute ma considération à M. **Noureddine SOLTANI** (Professeur au Département de Biologie, Université d'Annaba) qui m'a fait l'honneur de présider le présent jury.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Mme **Fouzia TINE-DJEBBAR** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa). En acceptant de m'encadrer, vous m'avez donné l'opportunité de relancer ma carrière scientifique dans un monde aussi fascinant, celui des insectes. Vos enseignements, critiques, observations, suggestions m'ont permis d'améliorer ce travail. Que vous trouvez ici mes chaleureux remerciements et ma grande reconnaissance et gratitude pour vos encouragements et confiance en moi.

Mes profonds remerciements vont à Mme. **Karima SIFI** (Professeur au Département de Biologie, Université d'Annaba) pour avoir codirigé ce travail et pour ses encouragements et sa confiance.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Mme **Fatiha BENDALI** (professeur, au département de Biologie, université d'Annaba) qui m'a fait l'honneur d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner le présent travail.

Mes plus vifs remerciements vont à Mme **Salima TALEB** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui a bien voulu accepter d'être membre du jury et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Toute ma considération à l'égard de M. **Samir TINE** (Professeur au Département de Biologie des êtres vivants, Université de Tébessa) qui m'a fait l'honneur de juger le présent travail.

Les mots ne suffisent pas pour exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements pour Mme **Assia ZEGHIB** (Maitre de conférences A au Département de Biologie appliquée, Université de Tébessa) pour ses encouragements, son aide et son assistance dans tous les moments lors de la réalisation de cette thèse. Que Dieu vous bénisse et vous comble de ses biens.

Mes remerciements s'adressent également à Mme **Zahia KABOUCHE** qui m'a ouvert les portes du laboratoire Laboratoire d'Obtention de Substances Thérapeutiques (LOST), Faculté des Sciences Exactes de l'Université de Constantine I pour la réalisation de l'hydrodistillation. Soyez assurée de toute ma gratitude, de mon profond respect et de ma sympathie.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A la mémoire de mon défunt père et maître ABDELOUAHAB ZEGHIB, que Dieu t'accorde sa miséricorde et t'accueille dans son vaste paradis.

A ma chère mère, que Dieu te préserve et te donne toute la santé et le bonheur.

A ma petite famille :

Ma chère épouse qui n'a cessé de me soutenir et de m'épauler.

Tu as partagé avec moi les meilleurs moments de ma vie, aux moments les plus difficiles de ma vie, tu étais toujours à mes côtés. Je remercie le bon dieu qui a croisé nos chemins.

La prunelle de mes yeux, mes adorables enfants : MOHAMED AKRAM, AMJED ABDELDJALIL et ma petite princesse ANFEL qui ont supporté mes changements d'humeur.

A mon frère et soeurs et leurs familles

A ma belle famille

Sommaire

I. INTRODUCTION	1
II. MATERIEL ET METHODES	5
2.1. Présentation de l'espèce <i>Culex pipiens</i> Linné, 1758	5
2.2. Echantillonnage et technique d'élevage	5
2.3. Présentation de l'espèce de plantes étudiées	6
2.3.1. L'espèce <i>Rosmarins officinalis</i> L (Linné 1753)	6
2.3.2. L'espèce <i>Artemisia campestris</i> L (Linné 1753)	7
2.4. Origine géographique des espèces de plantes	8
2.5. Extraction des huiles essentielles	9
2.6. Extraction par les solvants	10
2.6.1. Extraction par les solvants de polarité croissante	10
2.6.2. Extraction par un solvant hydroalcoolique	11
2.7. Analyse chimique des huiles essentielles par CPG-SM.	13
2.7.1. L'huile de <i>R. officinalis</i>	13
2.7.2. L'huile d' <i>A.campestris</i>	13
2.8. Essais toxicologiques	14
2.9. Etude morphométrique	15
2.10.Extraction et dosage des métabolites	15
2.10.1 Dosage des protéines totales	17
2.10.2. Dosage des lipides totaux	17
2.10.3. Dosage des glucides totaux	18
2.11. Dosage biomarqueurs	18
2.11.1. Dosage du glutathion (GSH)	19
2.11.2. Dosage des glutathion S-transférases (GST)	19
2.11.3. Dosage de l'activité Activité de l'acétylcholinestérase (AChE)	20
2.12. Analyse statistique	21
III. RESULTATS	22
3.1. Rendement des extractions	22
3.1.1. Rendement des huiles essentielles	22
3.1.2. Rendement des extraits	22
3.2. Composition chimique des huiles essentielles	23
3.2.1. Composition chimique de l'HE de <i>R. officinalis</i>	23
3.2.2. Composition chimique de l'HE d' <i>A. campestris</i>	25
3.3. Effet larvicide des plantes à l'égard de <i>Cx. Pipiens</i>	28
3.3.1. Toxicité des huiles essentielles	28
3.3.2. Toxicité des extraits organiques de <i>R. officinalis</i> et <i>A. campestris</i>	30
3.3.3. Efficacité comparée des traitements appliqués	32
3.4. Effet des extraits de plantes sur la croissance de <i>Cx.pipiens</i>	33
3.4.1. Effet des extraits de plantes sur le poids corporel	33
3.4.2. Effet des extraits de plantes sur le volume corporel	34
3.5. Effet des extraits de plantes sur la composition biochimique de <i>Cx.pipiens</i>	35
3.5.1. Effet des extraits de plantes sur le contenu en protéines	35
3.5.2. Effet des extraits de plantes sur le contenu en glucides	36
3.5.3. Effet des extraits de plantes sur le contenu en lipides	38
3.6. Effet des extraits de plantes sur les biomarqueurs	39
3.6.1. Effet des extraits sur l'activité spécifique de l'AChE	39
3.6.2. Effet des extraits sur l'activité des GSTs	40

3.6.3. Effet des extraits sur le taux du GSH	41
IV. DISCUSSION	43
4.1. Rendement de l'extraction des plantes	43
4.2. Composition chimique des huiles essentielles	45
4.3. Effet larvicide des HEs et des extraits de plantes sur les moustiques	48
4.3.1. Toxicité des huiles essentielles	48
4.3.2. Toxicité des extraits organiques	51
4.4. Effet des HEs et les extraits de plantes sur la croissance	53
4.5. Effet des HEs et les extraits sur la composition biochimique	54
4.6. Effet des HEs et les extraits sur les biomarqueurs	57
4.6.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE	57
4.6.2. Effet sur l'activité spécifique des GSTs	59
4.6.3. Effet sur le taux du GSH	61
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	62
VI. RESUME	64
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67
VIII. ANNEXES	86

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Dosage des protéines totales chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	17
2	Dosage des lipides totaux chez les larves L4 de <i>Cx.pipiens</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	18
3	Dosage des glucides totaux chez les larves L4 de <i>Culex pipiens</i> : réalisation de la gamme d'étalonnage.	18
4	Rendement et propriétés des HEs de <i>R. officinalis</i> et d' <i>A. campestris</i> .	22
5	Rendement et propriétés des différents extraits de <i>R. officinalis</i> et d' <i>A. campestris</i> .	23
6	Composition chimique de l'HE de <i>R. officinalis</i> analysée par CPG-SM.	24
7	Principales familles chimiques de l'HE de <i>R. officinalis</i> .	25
8	Composition chimique de l'HE d' <i>A.campestris</i> analysée par CPG-SM.	26
9	Principales familles chimiques de l'HE d' <i>A.campestris</i> .	27
10	Efficacité des HEs de <i>R. officinalis</i> et <i>A. Campestris</i> (ppm) appliquées sur des larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> au cours de différentes périodes après traitement : analyse des probits et détermination des concentrations létales et leurs intervalles de confiance (95%).	30
11	Efficacité de l'extrait AC-EP d' <i>A. campestris</i> (ppm) appliqué sur les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à 24, 48 et 72 heures après traitement : analyse des probits et détermination des concentrations létales et leur intervalle de confiance (95%).	32
12	Efficacité comparée des HEs et de l'extrait Ether de pétrole d' <i>A.campestris</i> à l'égard des larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à 24h après traitement.	33
13	Constituants majoritaires de l'HE de <i>R. officinalis</i> collecté dans différents pays.	46
14	Constituants majoritaires des HEs d' <i>A. campestris</i> collecté dans différents pays.	48
15	Activité larvicide des extraits du genre <i>Artemisia</i> à l'égard de diverses espèces de moustiques.	53

Listes des figures

N°	Titre	Page
1	Collecte des larves de <i>Culex pipiens</i> à partir des sites urbains, peri-urbains et ruraux (photos personnelles).	6
2	Spécimens des plantes étudiées : à gauche <i>Rosmarinus officinalis</i> ; à droite <i>Artemisia campestris</i> (photos personnelles).	8
3	Localisation géographique de la zone de collecte des plantes.	9
4	Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger (Photos personnelles).	10
5	Procédé d'extraction par des solvants de polarité croissante (Photos personnelles).	11
6	Schéma représentant le processus de l'extraction hydroalcoolique.	12
7	Tests de toxicité réalisés sur les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> (Photo personnelle).	15
8	Extraction des glucides, protéines et lipides totaux selon Shibkoet al. (1966) .	16
9	Les extraits de plantes, (a) : <i>R. officinalis</i> et (b) : <i>A. campestris</i> .	22
10	Chromatogramme CPG-SM de l'HE de <i>R. officinalis</i> montrant la séparation des composés chimiques sur colonne HP-5MS (abondance en fonction du temps de rétention en minutes).	25
11	Chromatogramme CPG-SM de l'HE d' <i>A. campestris</i> montrant la séparation des composés chimiques sur colonne DB-5 (abondance en fonction du temps de rétention en minutes).	28
12	Toxicité des HEs de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>A. campestris</i> (B), appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de <i>Cx. pipiens</i> : Mortalité corrigée (%) ($m \pm SEM$, n=5 répétitions de 20 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.	29
13	Effets des HEs de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>A. campestris</i> (B), appliquées sur les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme des doses.	29
14	Toxicité des extraits organiques de <i>R. officinalis</i> (A) et <i>A. campestris</i> (B), appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de <i>Cx. pipiens</i> : Mortalité corrigée (%) ($m \pm SEM$, n=5 répétitions de 20 individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.	31
15	Toxicité de l'extrait AC-EP à différentes concentrations (ppm) contre les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à 24, 48 et 72 heures après traitement: mortalité corrigée (%) (Moyenne $\pm SEM$; n = 5 répétitions comportant chacune 20 individus). Les lettres représentent les groupes de doses selon le test HSD de Tukey.	32
16	Effet de l'extrait AC-EP d' <i>A. campestris</i> , appliqué sur les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> : Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme des doses.	32
17	Effet des HEs (CL ₂₅ et CL ₅₀) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait AC EP (C) sur le poids corporel (mg) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm SEM$, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) : Test HSD de Tukey.	34
18	Effet des HEs (CL ₂₅ et CL ₅₀) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait AC EP (C) sur le volume corporel (mm ³) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm SEM$, n=3 répétitions comportant chacune 20 individus) : Test HSD de Tukey.	35
19	Effet des HEs (CL ₂₅ et CL ₅₀) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait	36

	AC EP (C) sur le contenu en protéines totales ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	
20	Effet des HEs (CL_{25} et CL_{50}) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait AC EP (C) sur le contenu en glucides ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	37
21	Effet des HEs (CL_{25} et CL_{50}) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait AC EP (C) sur le contenu en lipides ($\mu\text{g}/\text{individu}$) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	38
22	Effet des HEs (CL_{25} et CL_{50}) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et l'extrait AC EP (C) sur l'activité de l'AChE ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	39
23	Effet des HEs (CL_{25} et CL_{50}) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et de l'extrait AC EP (C) sur l'activité des GSTs ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	40
24	Effet des HEs (CL_{25} et CL_{50}) de <i>R. officinalis</i> (A), <i>A. campestris</i> (B) et de l'extrait AC EP (C) sur le taux du GSH ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines) chez les larves L4 de <i>Cx. pipiens</i> à différentes périodes après traitement ($m \pm \text{SEM}$, $n=3$ répétitions comportant chacune 10 individus) : Test HSD de Tukey.	41

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

Les moustiques sont au centre de la recherche entomologique dans le monde en raison de leur importance en tant que vecteurs de plusieurs maladies virales et parasitaires affectant à la fois les humains et les animaux (Becker *et al.*, 2010). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale vit dans des zones à risque d'au moins une maladie à transmission vectorielle qui cause plus de 700 000 décès par an (OMS, 2017).

La famille des *Culicidae*, synonyme du terme courant de moustiques, comprend plus de 3300 espèces regroupées en 37 genres. Ils ont une distribution mondiale et se produisent dans les zones tropicales et tempérées (Carnevale & Robert, 2009). Les moustiques en plus d'être insectes nuisibles, sont responsables des maladies à transmission vectorielle à travers le monde telles que le paludisme, la dengue, la filariose lymphatique, le chikungunya, la fièvre jaune et l'encéphalite japonaise (Goddard, 2007). Ces dernières années, ces maladies autrefois limitées aux zones tropicales et subtropicales sont maintenant apparues dans les zones tempérées à cause du changement climatique, par conséquent ces pays peuvent être les plus menacés par l'émergence et la réémergence de ces maladies (Linthicum *et al.*, 2010 ; Ogden, 2017).

Le contrôle des moustiques vecteurs par des insecticides synthétiques conventionnels tels que les organophosphorés, les carbamates et les pyréthroïdes a entraîné le développement d'une résistance parmi les populations cibles, une toxicité pour les organismes non ciblés et des effets secondaires sur l'environnement et la santé humaine (Cuervo-Parra *et al.*, 2016). Ces inconvénients ont encore intensifié la nécessité d'explorer des méthodes alternatives de lutte antivectorielle. Pour ces raisons, les chercheurs concentrent de plus en plus leur attention sur le développement de nouveaux produits sélectifs pour les insectes à faible risque toxicologique (Thomas *et al.*, 2014).

En Algérie plusieurs études ont été menées sur la lutte et le contrôle des moustiques à travers l'évaluation de nouveaux insecticides fiables et moins polluants. Ainsi, les perturbateurs de croissance des insectes comme les inhibiteurs de la synthèse de la chitine (Rehimi & Soltani, 1999 ; Soltani *et al.*, 1999 ; Bouaziz *et al.*, 2011 ; Djeghader *et al.*, 2013), les agonistes ecdystéroïdes (Boudjelida *et al.*, 2005 ; Tine-Djebbar & Soltani, 2008 ; Hamaidia & Soltani, 2016 ; Hamaidia *et al.*, 2018) ou les analogues d'hormones juvéniles (Hamaidia & Soltani, 2014 ; 2019) ont été évalués contre les larves de moustiques. En parallèle, les recherches actuelles se penchent vers une nouvelle tendance, c'est l'utilisation des composés bioactifs naturels d'origine végétale qui ont suscité beaucoup d'intérêt due à leurs propriétés insecticides, leurs biodégradabilités et leurs non toxicités vis-à-vis des organismes non ciblés (Amer & Mehlhorn, 2006). C'est ainsi que l'activité insecticide contre les moustiques a été évaluée en utilisant des

huiles essentielles ou extraits de différentes plantes collectées en Algérie à savoir : *Marrubium vulgare* (Aouati & Berchi, 2015), *Thymus vulgaris* (Dahchar *et al.*, 2016 ; Bouguerra *et al.*, 2017) *Lavandula dentata* (Driset *al.*, 2017a), *Ocimum basilicum* (Driset *al.*, 2017b), *Mentha pulegium* (Guenez *et al.*, 2018), *Laurusnobilis* (Bouzidi *et al.*, 2020), *Mentha rotundifolia* (Kharoubi *et al.*, 2020) et *Petroleum crispum* (Seghier *et al.*, 2020).

D'après la littérature, 122 espèces végétales de 26 familles ont le potentiel d'être utilisées comme insecticides et que plus des 2/3 de ces plantes appartenaient à seulement 5 familles : *Lamiacées*, *Cupressacées*, *Rutacées*, *Apiacées* et *Myrtacées* (Pavela, 2015). Les familles des *Astéracées* (*Compositae*) et des *Lamiacées* (*Labiatae*) sont connues comme les plus grandes familles de plantes avec respectivement de 24 000 et 3 000 espèces végétales reconnues. Ces familles se répartissent dans différentes zones tempérée, subtropicale et même froide (Michel *et al.*, 2020). Les espèces végétales de la famille des *Astéracées* et des *Lamiacées* sont utilisées médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies vu qu'elles présentent des activités analgésiques, antimicrobiennes, antivirales, antioxydantes, antiprolifératives et anti-inflammatoires (Montaz & Abdollahi, 2008).

La flore Algérienne, avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (Quezel & Santa, 1963), reste très peu explorée aussi bien sur le plan pharmacologique que phytochimique. Dans ce contexte, notre choix s'est porté sur deux plantes, le romarin *Rosmarinus officinalis* et l'armoise rouge *Artemisia campestris* car plusieurs activités pharmacologiques ont été rapportées aussi bien pour les extraits que les huiles essentielles de ces espèces. Ces activités seraient dues, en grande partie, à la présence de composés phénoliques (Djeridane *et al.*, 2007).

Rosmarinus officinalis est une plante aromatique appartenant à la famille des *Lamiacées* originaire des pays tempérés de la région méditerranéenne. Elle est très répandue en Algérie et utilisée en médecine traditionnelle pour le traitement de nombreuses maladies. Le romarin et ses constituants ont fait l'objet d'un intérêt de recherche considérable en raison de leurs activités antioxydantes, anti-inflammatoires et neurologiques potentielles (Singletary, 2016). De nombreuses activités biologiques attribuées à l'huile essentielle de romarin ont été liées à la présence de composants volatils (Jordan *et al.*, 2011).

L'espèce *Artemisia campestris*, largement répartie en Algérie, appartient à la famille des *Asteraceae*. Il est parmi les onze espèces du genre d'*Artemisia* que compte la flore algérienne (Bakchiche *et al.*, 2019). En médecine traditionnelle, il est utilisé en décoction pour ses activités antivenimeuses, anti-inflammatoires, antirhumatismales et antimicrobiennes. Sa richesse en

métabolites secondaires tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles n'est que le reflet de ses propriétés pharmacologiques (Dib *et al.*, 2017a).

La sélection de ces espèces est basée essentiellement sur leur abondance dans la région d'étude et leurs utilisations éventuelles en médecine traditionnelle, en vue d'une étude toxicologique suivie d'une investigation phytochimique et biologique pour les extraits aux meilleurs potentiels insecticides.

Ainsi, nous nous sommes proposé d'apporter notre contribution à travers une recherche qui vise à déterminer le potentiel, en terme d'activité larvicide, aussi bien des extraits que des huiles essentielles de deux espèces de plantes *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia campestris* sur les larves du moustique *Culex pipiens*, l'espèce de moustique la plus abondante dans la région de Tébessa (Tine-Djebbar *et al.*, 2016).

Culex pipiens est l'espèce de moustique la plus abondante en milieu urbain et rural en Algérie (Rehimi & Soltani, 1999 ; Aouati & Berchi, 2015 ; Korba *et al.*, 2016 ; Tine-Djebbar *et al.*, 2016 ; Merabti, 2017). Cette espèce a été fortement impliquée dans l'émergence du virus du Nil occidental responsable d'épidémies majeures dans la région nord et sud du pays (Lafri *et al.*, 2019).

Dans le présent manuscrit, nous décrivons en détail dans la partie Matériels et Méthodes le matériel animal et végétal utilisés ainsi que toutes les méthodes d'obtention d'échantillons d'étude (extraits et huiles essentielles des plantes) pour l'analyse chimique (CPG/MS) et l'exploration biologique (toxicité, morphométrie, métabolites et biomarqueurs).

Dans la partie Résultats et Discussion, nous présentons et discutons les résultats obtenus qui seront organisés en trois principaux axes. Le premier axe est consacré à l'étude du rendement de l'extraction par hydrodistillation et par les solvants organiques à polarité croissante de *R.officinalis* et *A.campestris*, ainsi qu'à la détermination de la composition chimique des huiles essentielles par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Par la suite, nous étudions l'effet larvicide des huiles et des extraits avec la détermination des paramètres de létalité (CL₂₅, CL₅₀ et CL₉₀). Le deuxième axe traite l'impact des HEs et des extraits efficaces sur la morphométrie (poids et volume corporel) et la composition biochimique par la détermination du contenu en protéines, lipides et glucides chez les larves du quatrième stade de *Culex pipiens* à différentes périodes 24, 48, et 72 heures. Quant au troisième axe, il est dédié à l'étude de la réponse des moustiques, par la détermination des biomarqueurs de neurotoxicité, l'Acétylcholinestérase (AChE) ; de détoxification, les glutathion S-transférases

(GST) et son cofacteur, le glutathion réduit (GSH), après traitement des larves avec deux concentrations (CL₂₅ et CL₅₀) à différentes périodes.

MATERIEL ET METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

2.1. Présentation de l'espèce *Culex pipiens* Linné, 1758

Culex pipiens est un moustique extrêmement commun dans l'ensemble des zones tempérées d'Europe, d'Afrique, d'Asie, d'Amérique du Nord et du Sud, et de l'Australie (Balenghien, 2007). Cette espèce ubiquiste est capable de s'adapter à différents biotopes et elle se développe aussi bien dans les milieux urbains que ruraux, dans les eaux polluées que propres (Faraj et al., 2006). Elle présente le plus d'intérêt en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines (Bendali et al., 2001). Cette espèce est un vecteur majeur de filariose de Bancroft; virus Sindbis, virus West Nile et virus Rift Valley (Brunhes et al., 2000).

La position systématique de *Culex pipiens* est la suivante :

Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Arthropoda</i>
Sous Embranchement	<i>Antennata</i>
Classe	<i>Insecta</i>
Sous Classe	<i>Pterygota</i>
Ordre	<i>Diptera</i>
Sous Ordre	<i>Nematocera</i>
Famille	<i>Culicidae</i>
Sous Famille	<i>Culicinae</i>
Genre	<i>Culex</i>
Espèce	<i>Culex pipiens</i> (Linné, 1758)

2.2. Echantillonnage et technique d'élevage

Une prospection préliminaire effectuée en zone urbaine et rurale, nous a permis de cibler quelques gîtes larvaires potentiels. Les critères pris en compte dans le choix des gîtes larvaires sont la présence des larves de *Culicidés* dans un lot de gîte, et le non traitement par les insecticides. Les œufs et les larves de *Culex pipiens* ont été prélevés à partir de différents sites urbains, peri-urbains et ruraux dans différentes régions de la Wilaya de Tébessa à savoir Negrine, Boukhadra, El aouinet, Ain zerga, Hamamamet, BoulhafDyr, Safsaf El ouesra et Tébessa ville (Fig. 1). Ces sites d'échantillonnage sont, soit des sites épigés (flaque, mare temporaire) ou hypogés (cave, citerne, réservoir). La collecte est réalisée à l'aide d'une louche plongée dans l'eau puis déplacée d'un mouvement uniforme en évitant les remous. Les échantillons transportés au laboratoire ont été versés dans un cristalliseur. Les larves triées par stade (L1, L2, L3 et L4) ont

été mises séparément dans des récipients contenant 150 ml d'eau déchlorurée et nourries avec du mélange biscuit - levure (Rehimi & Soltani, 1999).

Lorsque les larves atteignent le stade nymphal, elles sont placées dans des récipients déposés dans une cage couverte de tulle où elles se transforment en adulte. Ces adultes sont nourris dans les cages d'élevage où les femelles peuvent pondre des œufs. L'élevage des moustiques a été réalisé sous les conditions de laboratoire avec une température de 25C° à 30 C° et une photopériode journalière.



Figure 1.Collecte des larves de *Culex pipiens* à partir des sites urbains, peri-urbains et ruraux (photos personnelles).

2.3. Présentation de l'espèce de plantes étudiées

2.3.1. *Rosmarinus officinalis* (Linné 1753)

Rosmarinus officinalis L. ou romarin, et encore *Klil*, en arabe (Quezel & Santa, 1963) est originaire des pays tempérés de la région méditerranéenne (Andrade *et al*, 2018). Le Romarin est une plante aromatique, médicinale et condimentaire appartenant à la famille des *Lamiacées*. Il est largement distribué en Europe, en Asie et en Afrique et notamment en bassin Méditerranée (Kasparavicienė *et al.*, 2013). Le Romarin fait partie des espèces végétales les répandus en Algérie où il se présente à l'état sauvage dans les zones littorales, les lieux sec et arides même au Sahara (Yazina, 2010). Il se développe bien dans les collines et les basses montagnes, sur les sols calcaires, schisteux, argileux et rocheux (Hameed, 2017). Quezel & Santa (1963) décrivaient le romarin en tant qu'un arbrisseau ligneux très odorant. Les feuilles linéaires entières à marges révoletées longues de 1-2 cm, verdâtres en dessus, hispides blanchâtres en dessous.

Selon [Begum et al. \(2013\)](#), la systématique botanique de la plante *Rosmarinus officinalis* proposé par Linné (1753) est comme suit :

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Rosmarinus
Espèce	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Linné, 1753)

2.3.2. *Artemisia campestris* (Linné, 1753)

Artemisia est un genre de petites herbes et arbustes appartenant la famille des *Asteraceae* qui comprend environ 1 000 genres et plus de 20 000 espèces ([Abadet et al., 2012](#)). C'est un genre cosmopolite principalement répartie dans les zones tempérées de l'hémisphère nord en Asie, Amérique du nord, Europe et l'Afrique du Nord ([Bakchiche et al., 2019](#)) colonisant des environnements arides et semi-arides (steppes) ([Janačković, et al., 2019](#)).

Artemisia campestris communément appelées « Degoufet » est un arbuste pérenne faiblement aromatique atteignant 30-150 cm, à rameaux constituant une panicule. Les Tiges sont ligneuses à la base et striées. Les feuilles sont glabres de couleur vert foncé. C'est plante commune des Hauts-Plateaux, rare l'Atlas Saharien et très rare dans le Sahara Septentrional.

Selon [Dib & El Alaoui-Faris \(2019\)](#) et [Quezel & Santa\(1963\)](#), la systématique de la plante *Artemisia compestris* proposée par (Linné 1753) est comme suit :

Règne	Plantae
Sous règne	Tracheobionta
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Astéracées
Sous famille	Asteroideae
Tribu	Anthemideae
Genre	Artemisia
Espèce	<i>Artemisia campestris</i> (Linné, 1753)

2.4. Origine géographique des espèces de plantes

Les échantillons de la plante *Rosmarinus officinalis* (Fig.2) ont été collectés en mois d'Octobre 2015 et janvier 2016 à partir d'un site dans la commune de BirEdheb dans la wilaya de Tébessa (Fig. 3).

La plante *Artemisia campestris* (Fig.2) a été collectée au mois d'Octobre 2015 au stade de floraison, dans la commune de Hammamet à la wilaya de Tébessa (Fig.3).

L'identification botanique des plantes a été réalisée au niveau du département de Biologie des êtres vivants, à l'Université Larbi Tebessi, par Mme Hioun Soraya (Maître assistant). Les plantes ont été rincées et séchées à l'ombre pendant quinze jours, puis pesées et récupérées dans des sacs en papier afin de les conserver jusqu'au moment de l'expérience.

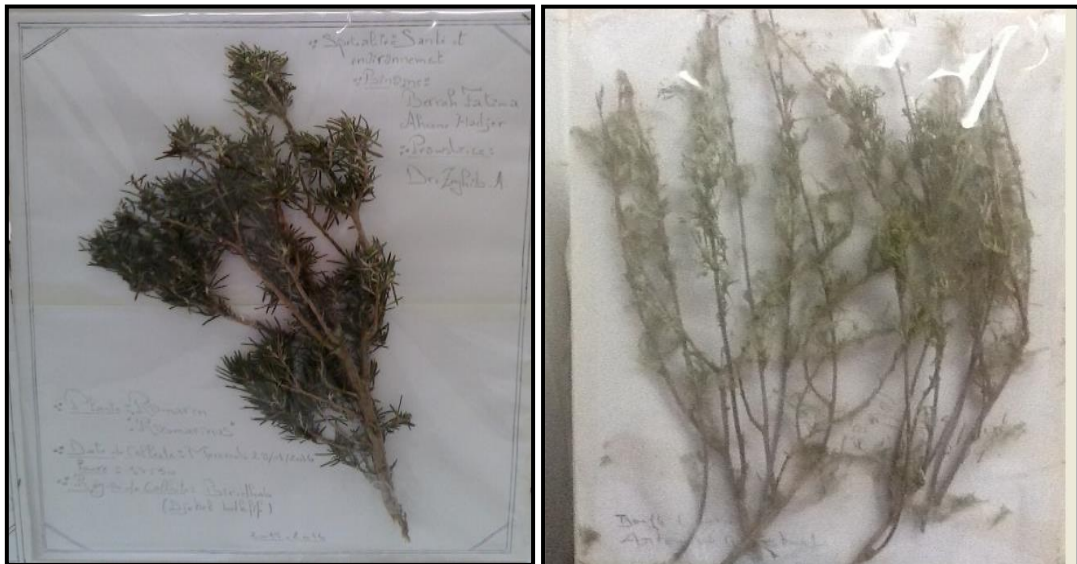


Figure 2. Spécimens des plantes étudiées : à gauche *Rosmarinus officinalis* ; à droite *Artemisia campestris* (photos personnelles).

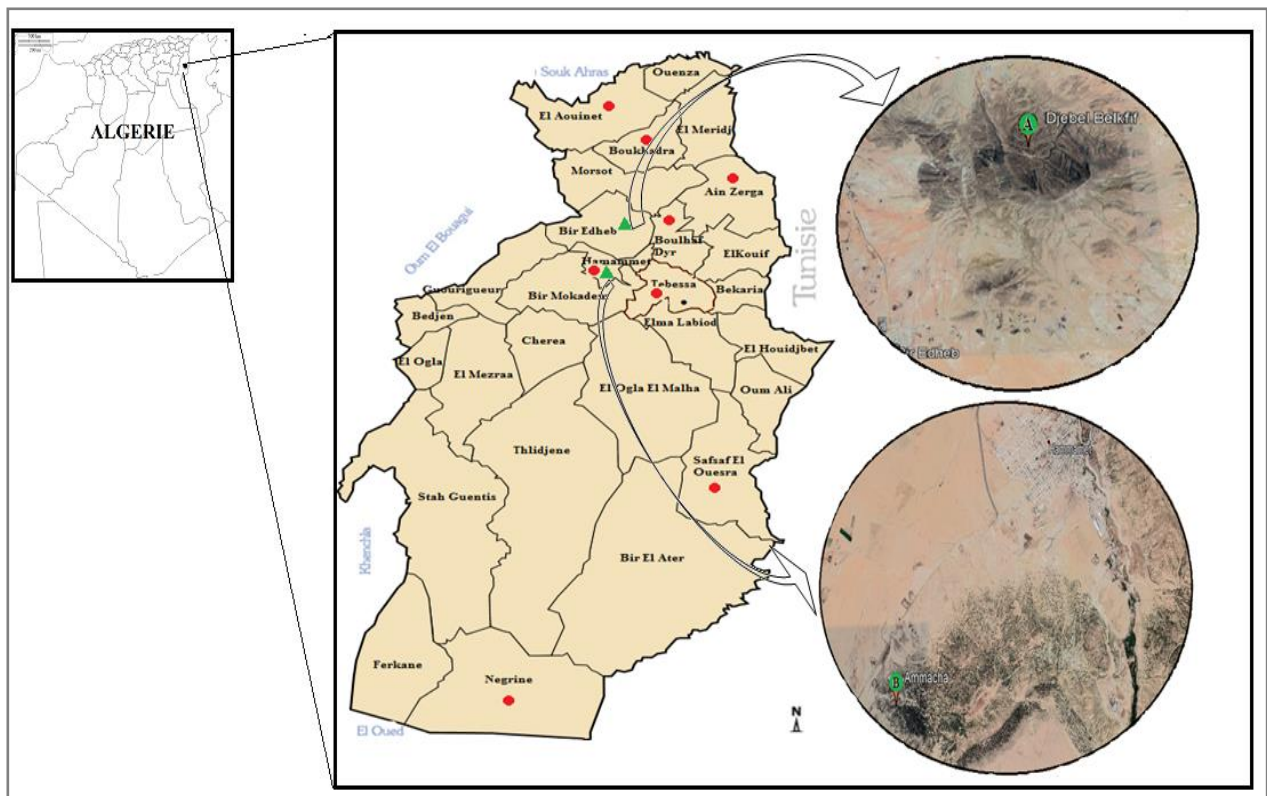


Figure 3. Localisation géographique de la zone de collecte des plantes. **En vert :** **A.** *Rosmarinus officinalis* (Bir Edheb). **B.** *Artemisia campestris* (Hammamet). **En rouge :** sites de collectes de moustiques.

2.5. Extraction des huiles essentielles

Notre étude porte sur les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* et d'*Artemisia campestris* (Tiges et feuilles). L'extraction des huiles essentielles a été effectuée par hydrodistillation, dans un appareil de type Clevenger (Fig.4). Une biomasse de la plante sèche avec un volume d'eau distillée sont mis dans un ballon, l'ensemble est porté à ébullition. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversant un réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter, l'eau et l'huile se séparent par différence de densité. Ensuite, l'huile est récupérée dans de petits flacons opaques et stockée à 4°C. Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante (AFNOR, 1986). Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$R = P_B / P_A \times 100$$

Ou

R : Rendement en huile en %.

P_A : Poids de la matière sèche de la plante en g.

P_B : Poids de l'huile en g.

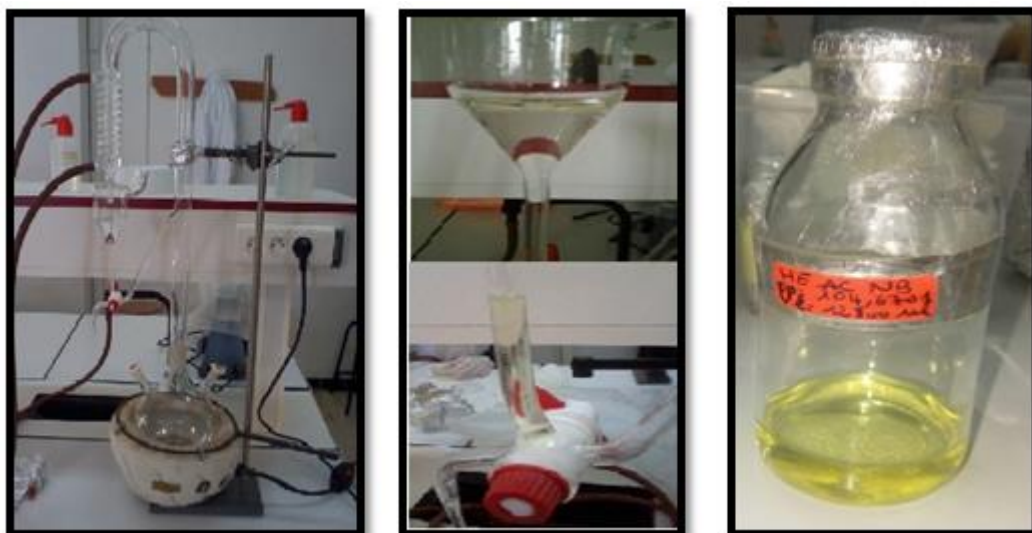


Figure 4. Montage de l'hydrodistillateur de type Clevenger (Photos personnelles).

2.6. Extraction par les solvants

2.6.1. Extraction par les solvants de polarité croissante

L'extraction par les solvants de polarité croissante (Fig. 5) a été effectuée par macération en utilisant quatre solvants de polarité croissante successivement.

Les macéras sont réunis puis ils ont été filtrés via un entonnoir pourvu du coton. Les filtrats sont évaporés presque à sec au moyen d'un évaporateur rotatif. Cette série d'extraction a permis d'obtenir 4 extraits organiques bruts : Ether de pétrole (EP), Dichlorométhane (DM), Acétate d'éthyle (AE), Méthanol (ME) et un extrait aqueux : l'eau distillée (ED). Les cinq extraits sont placés dans l'étuve pour être séchés. Les extraits secs sans solvant ont été pesés puis stockés dans des flacons stériles en verre jusqu'à leur utilisation.

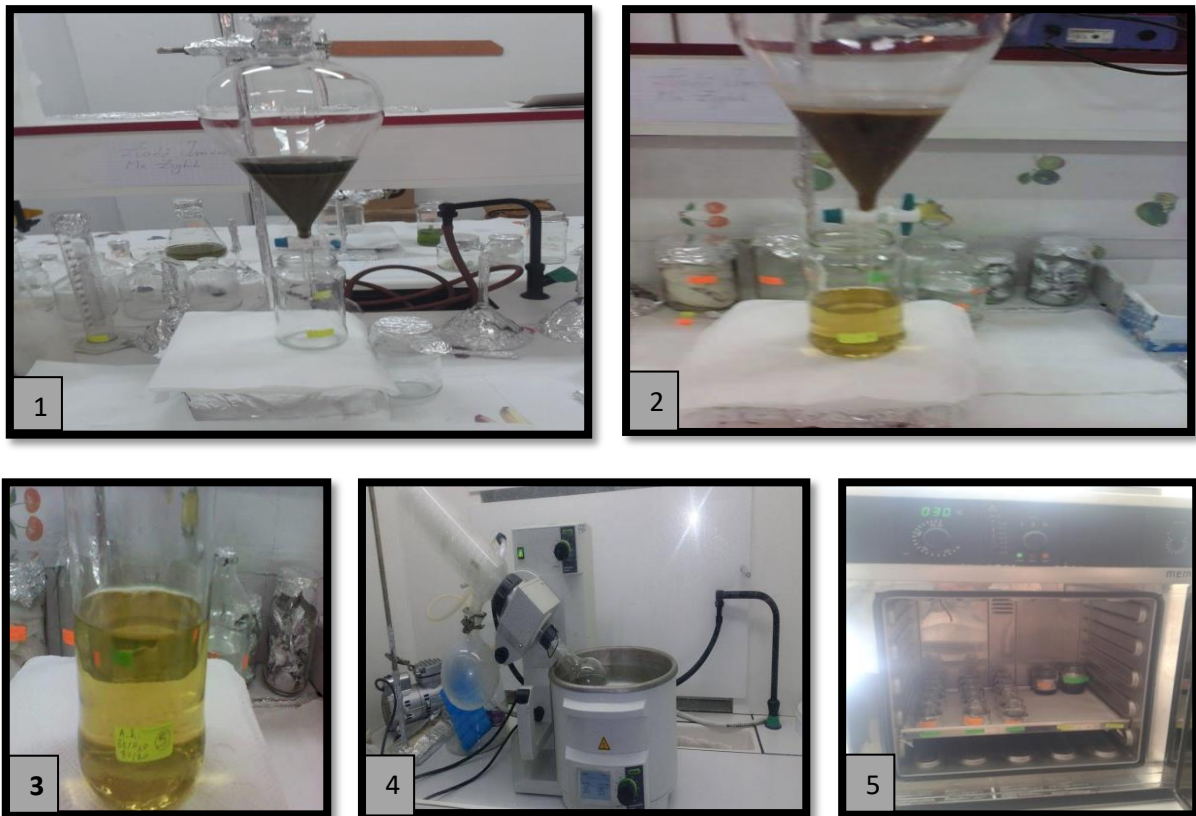


Figure 5. Procédé d'extraction par des solvants de polarité croissante (Photos personnelles).

1. Macération dans le solvant. **2.** Filtration des macérats.

3. Récupération des filtrats. **4.** Evaporation par rotavapeur. **5.** Séchage à l'étuve.

2.6.2. Extraction par un solvant hydroalcoolique

La méthode d'extraction adoptée est la macération successive par un solvant hydroalcoolique. Une quantité de la plante est macéré avec le solvant à une température ambiante dans un Erlenmeyer fermé hermétiquement par parafilm. Le contenu subit une filtration par décantation dans un entonnoir munit du coton hydrophile. Une fois le filtrat est récupéré, il subit encore autres extractions comme illustré dans la figure 6. Ces filtrats sont additionnés et concentrés à sec par un évaporateur rotatif. Après évaporation, l'extrait obtenu est placé à l'étuve pour éliminer le solvant et sécher l'extrait. Finalement la quantité d'extrait obtenue est pesée dans une balance de précision pour le calcul du rendement.

Le rendement de l'HE et des extraits est défini comme étant le rapport entre la masse obtenue et la masse du matériel végétal traité (AFNOR, 1986).

$$R \% = P_B / P_A \times 100$$

P_A : Poids de la matière sèche de la plante en g.

P_B : Poids de l'extrait en g.

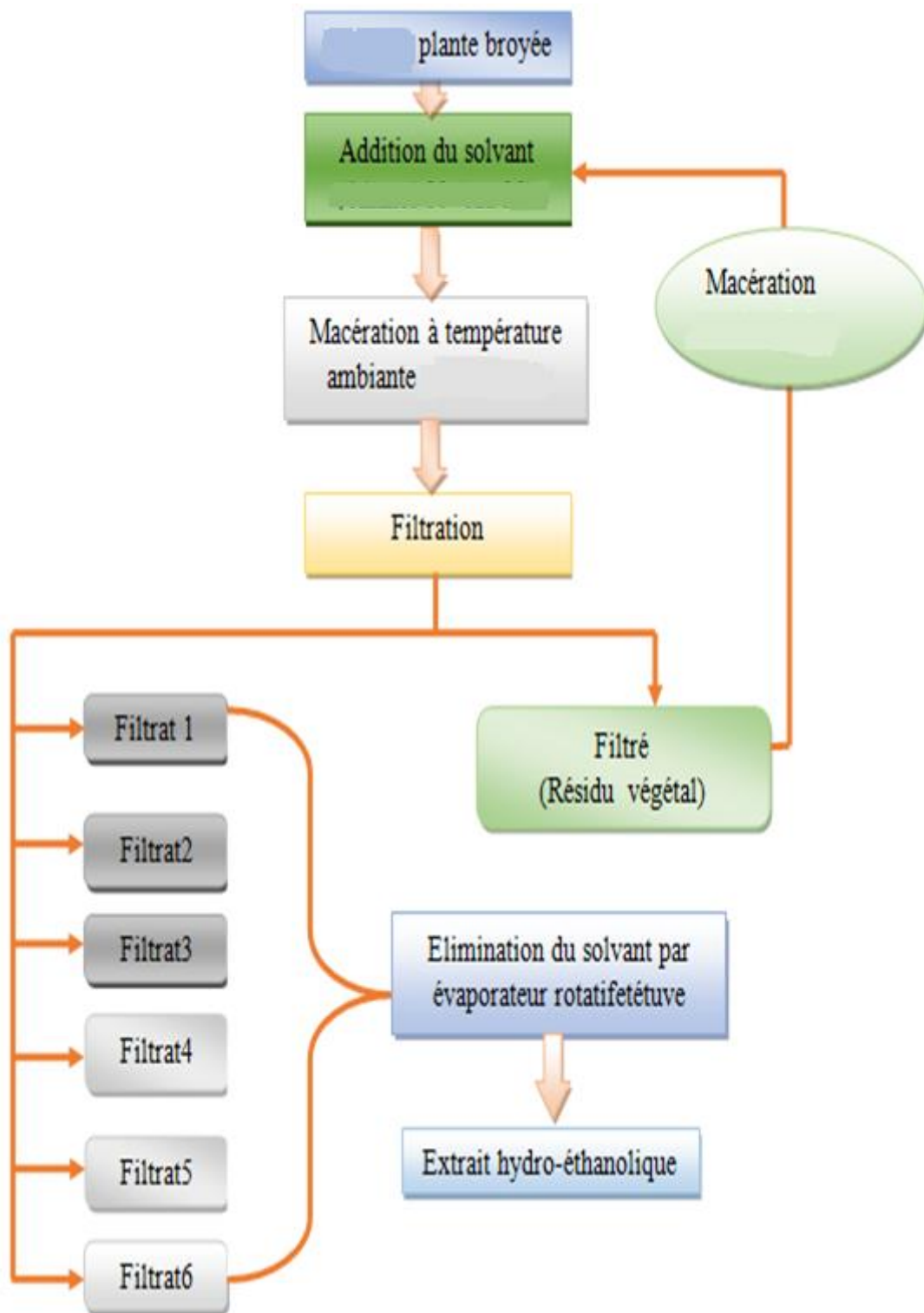


Figure 6. Schéma représentant le processus de l'extraction hydroalcoolique.

2.7. Analyse chimique des huiles essentielles par CPG-SM

2.7.1. Huile de *R. officinalis*

L'analyse chimique de l'HE de *R. officinalis* a été réalisée au centre de recherche scientifique et technique en analyses physicochimique CRAPC (Tipaza, Algérie) par chromatographie en phase gazeuse (GC/FID) et chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (CPG/SM). L'HE a été analysée sur un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard (HP) 6890 plus (Agilent Technologies) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) couplé à un spectromètre de masse quadripolaire Hewlett-Packard (HP) 5973 (Agilent Technologies). La séparation a été réalisée en utilisant une colonne capillaire non polaire HP-5MS (5% phényl 95% méthylpolysiloxane) (longueur de 30m x diamètre interne de 0,25 mm et épaisseur de film 0,25 mm). La température du four a été maintenue à 60 °C pendant 8 min, puis programmée à la vitesse de 2° C/ min à 250 °C. Le gaz vecteur qui constitue la phase mobile est l'Hélium, réglé à un débit de 0,5 ml/min. L'échantillon (0,2 µL) a été injecté avec un ratio de 50:1. L'injecteur a été maintenu à une température de 250 °C. Le spectromètre de masse fonctionnait en mode impact électronique à 70 eV. Les températures de la source d'ions et de l'interface étaient de 230 °C et 270 °C, respectivement.

L'identification des composés individuels a été réalisée sur la base d'indices de rétention en utilisant une série homologue de n-alcanes (C4-C24, Sigma-Aldrich), par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux enregistrés dans les bibliothèques de spectres de masse (Wiley 7n.L, NIST02. L). Les pourcentages relatifs des composants individuels ont été calculés sur la base de la surface du pic GC (réponse FID) obtenue sans correction du facteur de réponse. La quantification a été effectuée par la méthode standard externe. Des courbes d'étalonnage de composés représentatifs de chaque classe ont été dessinées et utilisées pour la quantification.

2.7.2. Huile d'*A.campestris*

L'analyse chimique de l'HE d'*A.campestris* a été effectuée au département de Chimie à la Faculté des Sciences, Université Sitki Kocman (Mugla, Turquie). Elle a été réalisée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu GC-17 AAF, V3, LV Series (Kyoto, Japan), équipé d'un FID et d'une colonne capillaire DB-5 (longueur 30m × diamètre interne 0,32 mm, épaisseur du film 0,32 µm). La température du four a été maintenue à 60°C pendant 5 min, puis programmée à 240°C à 4°C/min et maintenue isotherme pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250°C et 270°C. Le gaz vecteur était de l'hélium à un débit de 1,3 ml/min. Le volume d'injection était de 1 µL et le ratio de division était

de 50:1. La composition en pourcentage d'HE d'*A.campestris* a été déterminée avec un programme informatique Class-GC 10.

L'analyse de l'HE par CPG-SM a été réalisée en utilisant une trappe ionique Varian Saturn 2100 (Old York Rd., Ringoes, NJ, USA), équipée d'une colonne capillaire apolaire DB-5 MS (30 m x 0,32 mm, épaisseur de film 0,32 µm). Le gaz vecteur était de l'hélium à un débit de 1,4 ml/min. La température du four a été maintenue à 60°C pendant 5 min, puis augmentée jusqu'à 240 °C avec des incréments de 4°C/min et maintenue à cette température pendant 10 min. Les températures de l'injecteur et de la ligne de transfert ont été fixées à 250 et 180°C, respectivement. La température du piège à ions était de 200°C. Le volume d'injection était de 0,2 µL et le split ratio était de 1:30. Les mesures EI-MS ont été effectuées à une énergie d'ionisation de 70 eV. L'identification des composants de l'HE d'*A.campestris* était basée sur les indices de rétention GC et la correspondance avec la base Wiley, NIST-2005 et TRLIB, ainsi que par comparaison des spectres de masse avec ceux rapportés dans la littérature (Adams, 2007) et, par co-injection avec des composés authentiques.

2.8. Essais toxicologiques

L'activité larvicide déterminée à travers les tests de toxicités a été évaluée selon le protocole standard de l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2005). Une solution mère d'huile essentielle a été préparée, puis diluée pour obtenir des concentrations finales. Des lots de larves de quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx.pipiens* ont été placés dans des gobelets en plastique contenant de l'eau déchlorurée et un volume de concentration préparée. Par ailleurs, une série témoin négatif et une série témoin positif est conduite en parallèle (Fig. 7).

Après 24 heures d'exposition, les larves ont été retirées et placées dans l'eau propre. Cinq répétitions ont été réalisées pour chaque concentration ainsi que pour les témoins. Les mortalités sont été enregistrées à 24, 48 et 72 heures après traitement.

Le pourcentage de mortalité observée est corrigé par la formule d'Abbott (1925) qui permet d'éliminer la mortalité naturelle et déterminer la toxicité réelle de l'extrait. Grâce à un logiciel Graph Pad Prism 7, les concentrations létales ont été déterminées et seront appliquées sur les larves L4 de *Cx. pipiens* pour étudier leurs effets sur la morphométrie, la composition biochimique et les biomarqueurs.



Figure 7. Tests de toxicité réalisés sur les larves L4 de *Cx.pipiens* (Photo personnelle).

2.9. Etude morphométrique

Le volume corporel des larves témoins et traitées (CL₂₅ et CL₅₀) a été déterminé à partir de la largeur du thorax (Timmermann & Briegel, 1998) qui est mesurée à l'aide d'une loupe binoculaire préalablement étalonnée. Le poids corporel des larves a été également déterminé par une balance de précision.

2.10. Extraction et dosage des métabolites

L'extraction des différents métabolites a été réalisée selon Shibko *et al.* (1966) (Fig. 8). Les larves témoins et traitées à la CL₂₅ et la CL₅₀ sont placées dans des tubes eppendorf contenant 1 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 % et broyées à l'aide d'un homogénéiseur à ultrasons. Après une première centrifugation (5000 trs / min à 4°C, 10 mn), le surnageant I obtenu est utilisé pour le dosage des glucides totaux selon la méthode de Duchateau et Florkin (1959). Au culot I, on ajoute 1 ml de mélange éther/chloroforme (1V/1V) et après une seconde centrifugation (5000 trs/min, 10 mn), on obtient le surnageant II et le culot II, le surnageant II sera utilisé pour le dosage des lipides (Goldsworthy *et al.*, 1972) et le culot II, dissout dans la soude (0,1 N), servira au dosage des protéines selon la méthode de Bradford (1976). Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage dont l'équation de la droite de régression exprime l'absorbance en fonction de la quantité du standard.

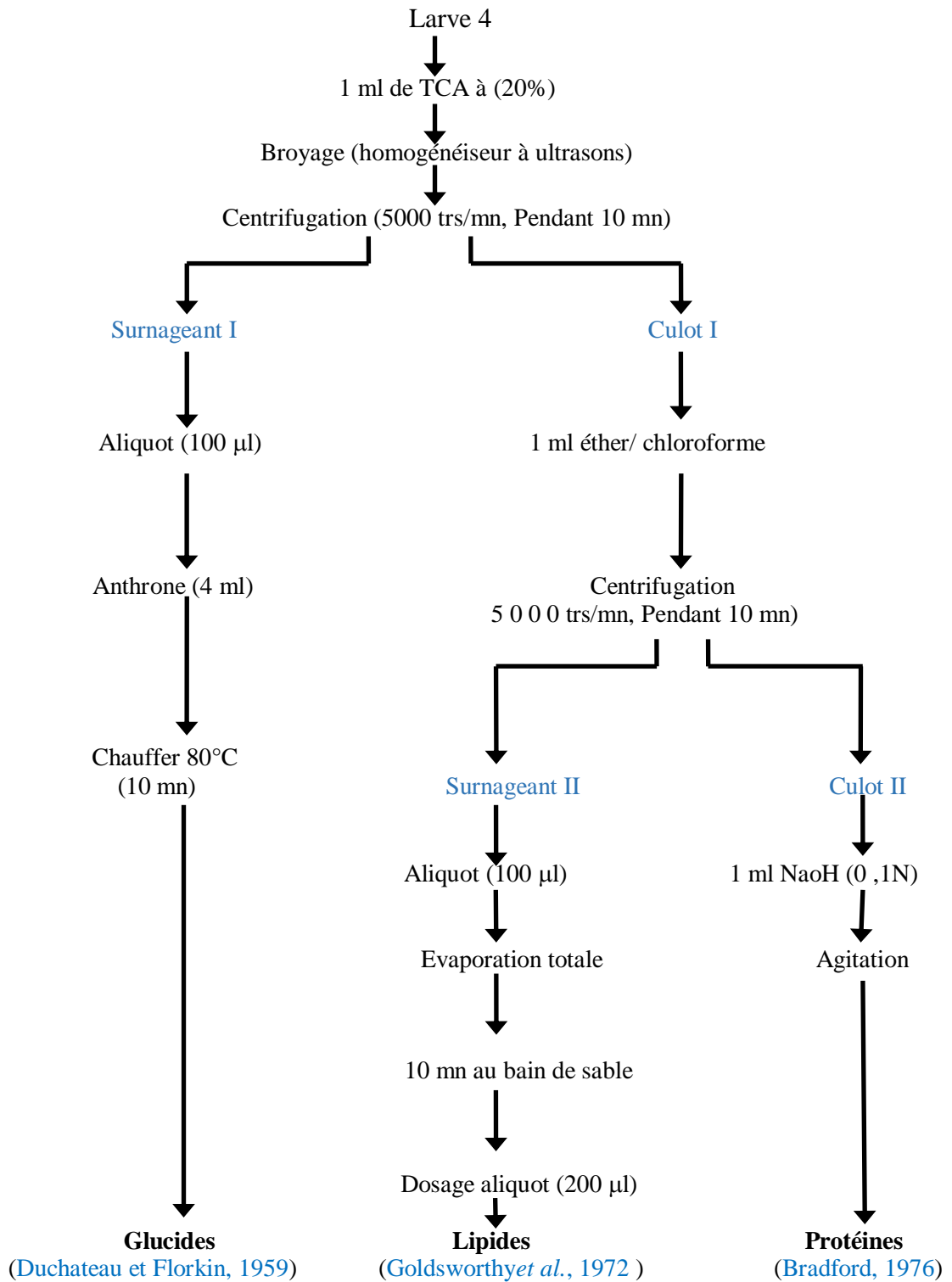


Figure 8. Extraction des glucides, protéines et lipides totaux selon [Shibkoet al. \(1966\)](#).

2.10.1. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de [Bradford \(1976\)](#) dans une fraction aliquote de 100 µl à laquelle on ajoute 4 µl de réactif du bleu brillant de commassie (BBC) G 250 (Merck). La solution de BBC, se prépare comme suit : On homogénéise 100 mg de BBC dans 50 ml d'éthanol 95°, on y ajoute 100 µl d'acide orthophosphorique à 85% et on complète à 1000 µl avec l'eau distillée. La durée de la conservation du réactif est de 2 à 3 semaines à 4 °C. Celui-ci révèle la présence des protéines en les colorants en bleu. L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf titrant 1 mg/ml (Tableau. 1).

Tableau 1. Dosage des protéines totales chez les larves L4 de *Cx. pipiens*: réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution standard d'albumine (µl)	0	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif BBC (µl)	4	4	4	4	4	4
Quantité d'albumine (µg)	0	20	40	60	80	100

2.10.2. Dosage des lipides totaux

Les lipides totaux ont été déterminés selon la méthode de [Goldsworthy et al. \(1972\)](#) utilisant le réactif sulfophosphovanillinique. Le dosage des lipides se fait sur des prises aliquotes de 100 µl des extraits lipidiques ou de gamme étalon (Tableau 2) aux quelles on évapore totalement le solvant, puis on ajoute 1ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont agités, et mis pendant 10 mn dans un bain de sable à 100 °C. Après refroidissement, on prend 200 µl de ce mélange au quel on ajoute 2,5 µl de réactif sulfophosphovanillinique. Après 30 mn à l'obscurité, la densité optique est lue dans un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 530 nm. Les lipides forment à chaud avec l'acide sulfurique, en présence de la vanilline et d'acide orthophosphorique, des complexes roses. Le réactif est préparé comme suit : Dissoudre 0,38 g de vanilline dans 55 µl d'eau distillée et ajouter 195 µl d'acide orthophosphorique à 85%. Ce réactif se conserve pendant 3 semaines à 4 °C et à l'obscurité. La solution mère des lipides est préparée comme suit : on prend 2,5 mg d'huile de table (tournesol 99% triglycérides) dans un tube eppendorf on ajoute 1 µl d'éther chloroforme (1V/1V).

Tableau 2. Dosage des lipides totaux chez les larves L4 de *Cx pipiens* : réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de lipides (µl)	0	20	40	60	80	100
Solvant (éther/chloroforme) (1V/1V)	100	80	60	40	20	0
Quantité de lipides (µg)	0	50	100	150	200	250

2.10.3. Dosage des glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été réalisé selon [Duchateau et Florkin \(1959\)](#). Elle consiste à additionner 100 µl du surnageant contenu dans un tube à essai, 4 ml du réactif d'anthrone et de chauffer le mélange à 80 °C pendant 10 min. Une coloration verte se développe dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de glucide présente dans l'échantillon. La lecture de l'absorbance est faite à une longueur d'onde de 620 nm. La préparation du réactif d'anthrone se fait comme suit : peser 150 mg d'anthrone, ajouter 75 ml d'acide sulfurique concentré et 25 ml d'eau distillée. On obtient une solution limpide de couleur verte qui est stockée à l'obscurité. La gamme d'étalonnage est effectuée à partir d'une solution mère de glucose (1mg/ml) (Tableau 3).

Tableau 3. Dosage des glucides totaux chez les larves L4 de *Cx. pipiens*: réalisation de la gamme d'étalonnage

Tubes	1	2	3	4	5	6
Solution mère de glucose (µl)	0	20	40	60	80	100
Eaudistillée (µl)	100	80	60	40	20	0
Réactif d'anthrone (ml)	4	4	4	4	4	4
Quantité de glucose (µg)	0	20	40	60	80	100

2.11. Dosage des biomarqueurs

Les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx. pipiens* des séries témoins et traitées (CL₂₅ et CL₅₀) ont fait l'objet d'un dosage des biomarqueurs enzymatiques : un biomarqueur de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE), des biomarqueurs de détoxication, les glutathion S-transférases (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH) à différentes périodes après traitement : 24, 48 et 72 heures. Par ailleurs, la concentration en protéines totales des différents échantillons a été préalablement déterminée selon [Bradford \(1976\)](#), afin de pouvoir calculer les différentes activités spécifiques des enzymes et le taux du glutathion.

2.11.1. Dosage du glutathion (GSH)

Le dosage du glutathion a été réalisé selon la méthode de [Weckberker& Cory \(1988\)](#). Il s'effectue après homogénéisation des échantillons témoins et traités de *Cx. pipiens* à différents temps (24, 48 et 72h) dans 1 ml d'une solution d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) à 0,02 M [7,448g EDTA, 1000 ml eau distillée]. Afin de protéger les groupements thiols du glutathion, l'homogénat doit subir une déprotéinisation par l'acide sulfosalicylique (ASS) à 0,25 % [0,25g ASS, 100 ml eau distillée] où 0,2 ml de l'ASS sont additionnés à 0,8 ml d'homogénat. Le mélange après agitation est plongé dans un bain de glace pendant 15 mn, puis centrifugé à 10000 trs/mn pendant 5 mn.

Une fraction aliquote de 500 µl de l'homogénat est ajoutée à 1 ml du tampon tris/ EDTA (0,02 M, pH 9,6) [63,04 g tris, 7,4448 g EDTA, 1000 ml eau distillée] et 0,025 ml de DTNB (0,01 M) [3,96 g DTNB, 1000 ml méthanol absolu]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune 20 individus avec une série témoin. La lecture des absorbances s'effectue à une longueur d'onde de 412 nm après 5 minutes de repos pour la stabilisation de la couleur contre un blanc où les 500 µl de surnageant sont remplacés par 500µl d'eau distillée.

Le taux du glutathion est estimé selon la formule suivante

$$X = \frac{D_0}{13,1} \times \frac{Vd}{Vh} \times \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines (µM / mg de protéines).

Δ Do : densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

13,1 : coefficient d'extinction molaire concernant le groupement thiol (-SH) (mM⁻¹cm⁻¹).

Vd : volume total des solutions utilisées dans la déprotéinisation : 1 ml [0,2 ml ASS + 0,8 ml homogénat].

Vh : volume de l'homogénat utilisé dans la déprotéinisation : 0,8 ml.

Vt : volume total dans la cuve : 1,525 ml [0,5 ml surnageant + 1 ml tris / EDTA + 0,025 ml DTNB].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,5 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.11.2. Dosage des glutathion S-transférases

L'activité des glutathion S-transférases (GSTs) est déterminée selon la méthode de [Habiget al. \(1974\)](#). Les larves témoins et traitées de *Cx. pipiens*, sont prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 h), pesées puis broyées dans 1ml de tampon phosphate de sodium (0,1 M ; pH 6). L'homogénat ainsi obtenu est centrifugé (13000 trs/min à 2°C pendant 30 min), le surnageant récupéré servira comme source d'enzyme.

Le dosage consiste à faire réagir 200 µl de surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1mM) /GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1M ; pH 6)]. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune larves avec une série

témoin. La lecture des absorbances est effectuée toutes les 1 min pendant 5 min à une longueur d'onde de 340 nm contre un blanc contenant 200 µl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

L'activité spécifique est déterminée d'après la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO/min}{9,6} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : millimoles de substrat hydrolysé par minute par mg de protéines (mM/min/mg de protéines).

Δ DO : pente de la droite de régression après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

9,6 : coefficient d'extinction molaire du CDNB (mM⁻¹cm⁻¹).

Vt : volume total dans la cuve : 1,4 ml [0,2 ml surnageant + 1,2 ml du mélange CDNB/GSH].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,2 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.11.3. Dosage de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE)

Le dosage de l'activité AChE est réalisé selon la méthode [d'Ellman et al. \(1961\)](#). Les larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* témoins et traitées (CL₂₅ et CL₅₀) prélevées à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) sont pesées, ensuite homogénéisées dans 1ml de la solution détergente D [38,03 mg EGTA (acide éthylène glycol-bis, β-aminoéthyl éther NNN'N' tétra-acétique), 1ml Triton X 100%, 5,845 g NaCl (chlorure de sodium), 80 ml tampon tris (10 mM, pH 7)]. Après centrifugation (5000 trs/ min pendant 5 min), le surnageant est récupéré et servira comme source d'enzyme. L'essai est conduit avec 3 répétitions comportant chacune individus avec une série témoin. Le dosage de l'AChE est réalisé sur une fraction aliquote de 100 µl à laquelle on ajoute 100 µl de DTNB préparé extemporanément [39,6 mg DTNB, 15 mg CO₃HNa (bicarbonate de sodium), 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7)] et 1 ml de tampon tris (0,1 M, pH 7). Après 3 à 5 minutes, 100 µl de substrat acétylthiocholine préparé extemporanément [23,6 mg ASCh, 1 ml eau distillée] sont ajoutés. La lecture des absorbances s'effectue toutes les 4 mn pendant 20 minutes à une longueur d'onde de 412 nm contre un blanc où 100 µl de solution détergente remplace les 100 µl de surnageant. L'activité spécifique de l'AChE est calculée selon la formule suivante :

$$X = \frac{\Delta DO/min}{1,36 \times 10^4} * \frac{Vt}{Vs} / \text{mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par minute et par mg de protéines (µM/min/mg de protéines).

Δ DO : pente de la droite de régression obtenue après hydrolyse du substrat en fonction du temps.

1,36 x 10⁴ : coefficient d'extinction molaire du DTNB (M⁻¹ cm⁻¹).

Vt : volume total dans la cuve : 1,3 ml [0,1 ml surnageant + 0,1 ml DTNB + 1 ml tampon tris (0,1 M, pH 7) + 0,1 ml acétylthiocholine].

Vs : volume du surnageant dans la cuve : 0,1 ml.

mg de protéines : quantité de protéines exprimée en mg.

2.12. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart-moyen (SEM). Le nombre d'individus et de répétitions pour chaque série est mentionné avec les résultats appropriés. Les quantités des métabolites (protéines, glucides et lipides) sont déterminées à partir des courbes d'étalonnage dont l'équation de la droite de régression exprime l'absorbance en fonction de la quantité du standard utilisé (albumine, glucose et l'huile de tournesol). L'analyse de la variance à un critère de classification et le test HSD de Tukey ont été utilisés. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 7 ([GraphPad Software 2018](#)).

RESULTATS

III. RESULTATS

3.1. Rendement des extractions

3.1.1. Rendement des huiles essentielles

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation de la partie aérienne de deux plantes étudiées, *R. officinalis* et *A.campestris* a donné un rendement calculé par rapport au poids total de la matière végétale sèche avec des taux de $1,24 \pm 0,27$ % et $0,28 \pm 0,04$ % respectivement. Ces huiles présentent une couleur jaune clair et une forte odeur agréable caractéristique de chaque espèce (Tableau 4).

Tableau 4. Rendement et propriétés des HEs de *R. officinalis* et d'*A. campestris*.

Plantes	Rendement (%)	Aspect et Couleur
<i>R. officinalis</i>	$1,24 \pm 0,27$	Liquide jaune clair
<i>A. campestris</i>	$0,28 \pm 0,04$	Liquide jaune clair

3.1.2. Rendement des extraits

L'extraction a permis d'obtenir quatre extraits organiques bruts : Ether de pétrole (EP), Dichlorométhane (DM), Acétate d'éthyle (AE), Méthanol (ME), un extrait aqueux (ED) et un extrait hydro-alcoolique (HA). Les extraits obtenus sont de couleur et d'aspects différents (Fig. 9)

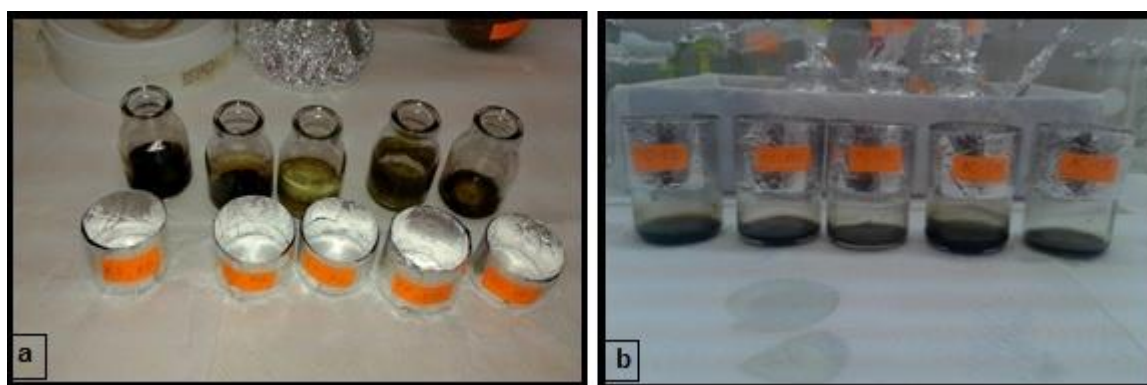


Figure 9. Les extraits de plantes, (a) : *R. officinalis* et (b) : *A. campestris*.

Les résultats des extractions par les solvants pour *R. officinalis* indiquent que les rendements en extraits bruts sont très variables où l'extrait hydro-alcoolique (HA) vient en première position avec un rendement de 20%, suivi par l'extrait aqueux (RO-ED) avec 12,78%. Les rendements des extraits RO-DM et RO-ME sont très rapprochés (5,80 et 5,90% respectivement) et

sont supérieurs à celui de RO-EP (4,14%). Cependant l'extrait RO-AE présente le plus faible rendement de 2,58% (Tableau 5).

De même, les résultats du rendement des extractions d'*A.campestris* montrent que le pourcentage le plus élevé est celui de l'extraithydro-alcoolique (HA) avec 25,53% suivi par AC-ED (12,21 %), AC-ME (7,09 %), AC-DM (5,87 %), AC-EP (3,32 %) et enfin AC-AE avec un rendement de 2,09 %. La comparaison des résultats du rendement des deux plantes permet d'établir l'ordre des extraits comme suit (HA >ED> ME > DM > EP > AE) (Tableau 5).

Tableau 5. Rendement et propriétés des différents extraits de *R. officinalis* et d'*A.campestris*.

<i>R. officinalis</i> (RO)			<i>A. campestris</i> (AC)		
Extraits	Rendement (%)	Aspect et Couleur	Extraits	Rendement (%)	Aspect et Couleur
RO EP	4,14 ± 0,68	Pâteux, Jaune	AC EP	3,32 ± 0,34	Pâteux, Vert
RO DM	5,80 ± 1,04	Sec, Vert foncé	AC DM	5,87 ± 0,60	Pâteux, Vert foncé
RO AE	2,58 ± 0,21	Sec, Vert clair	AC AE	2,09 ± 0,59	Pâteux, Vertclair
RO ME	5,90 ± 0,76	Pâteux, Marron clair	AC ME	7,09 ± 1,30	Pâteux, Marron
RO ED	12,78 ± 0,82	Pâteux, Marron	AC ED	12,21 ± 0,70	Pâteux, Marron
RO HA	20,00 ± 1,10	Sec, Vert clair	AC HA	25,53 ± 1,34	Pâteux, Vertfoncé

3.2. Composition chimique des huiles essentielles

3.2.1. Composition chimique de l'HE de *R.officinalis*

La composition chimique de *R. officinalis* analysée par CPG-SM a révélé 36 composés représentant un total de 99,97 % de composé identifiés (Tableau 6 ; Fig.10). De point de vue quantitatif, quatre composés identifiés affichent des pourcentages supérieurs à 5% et sont considérés comme composant majeurs. D'autres composants ont été trouvés en quantités faibles (<5%). La classification des composés identifiés selon la classe chimique a révélé une prédominance des monoterpènes oxygénés qui représentent 74,22 % avec quatre principaux composés à savoir le 1,8-Cinéole (44,34%), le Camphre (16,74%), le Bornéol (5,03 %) et l' α -Terpinéol (4,95 %). Par ailleurs, les monoterpènes hydrocarbonés qui représentent la deuxième grande classe chimique avec 22,07 %, sont caractérisés par la présence de l' α -Pinène (10,08 %). Cependant les sesquiterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés ne représentent que 0,88% et 1,73 % respectivement (Tableau 7).

Tableau 6. Composition chimique de l'HE de *R. officinalis* analysée par CPG-SM.

a : Ordre d'éluion sur colonne capillaire HP-5MS ; **b** : Temps de rétention (TR) (min) ; **c** : Indice de rétention expérimental sur colonne capillaire HP-5MS (IR) ; **d** : Concentrations (%).

Pics	Composés ^a	TR ^b	IR _{Exp} ^c	% ^d
1	Tricyclène	7,4	920	0,16
2	α -Thujène	7,6	924	0,12
3	α -Pinène	8,1	933	10,08
4	Camphène	8,8	945	4,14
5	β -Pinène	10,4	973	4,38
6	1-Octen-3-ol	11,1	979	0,13
7	β -Myrcène	11,3	989	1,18
8	α -Phellandrène	12,0	1002	0,19
9	δ -3-Carène	12,4	1007	0,13
10	α -Terpinène	12,9	1015	0,51
11	1,8-Cinéole	14,3	1036	44,34
12	β -Ocimène	14,5	1039	0,07
13	γ -Terpinène	15,7	1057	0,72
14	<i>cis</i> -Sabinène hydrate	16,4	1066	0,11
15	α -Terpinolène	17,7	1086	0,39
16	Linalool	19,0	1103	1,09
17	1,3-Cyclopentadiène, trimethyl	20,4	1124	0,11
18	Camphre	21,9	1146	16,74
19	Bornéol	23,5	1167	5,03
20	Terpinène-4-ol	24,2	1176	1,20
21	α -Terpinéol	25,4	1193	4,95
22	Bornylacétate	31,4	1275	0,70
23	Thymol	32,7	1292	0,11
24	Carvacrol	33,7	1300	0,18
25	Eugénol	36,4	1363	0,09
26	Méthyleugénol	39,5	1403	0,38
27	β -Caryophyllène	39,8	1411	0,66
28	α -Humulène	41,9	1456	0,09
29	γ -Muuroolène	43,5	1489	0,04
30	δ -Cadinène	46,3	1532	0,09
31	Caryophyllèneoxide	49,7	1577	0,75
32	Humulèneepoxide II	51,2	1597	0,10
33	Caryophylla-4(12).8(13)-dien-5.βta.-ol	52,9	1632	0,19
34	Methyljasmonate	53,7	1648	0,13
35	Allo-aromadendrèneepoxide	54,1	1657	0,52
36	(Z)-8-Hydroxy-4,7-dimethyl-6-octenoic acid lactone	54,9	1673	0,17
Total identifié				99,97 %

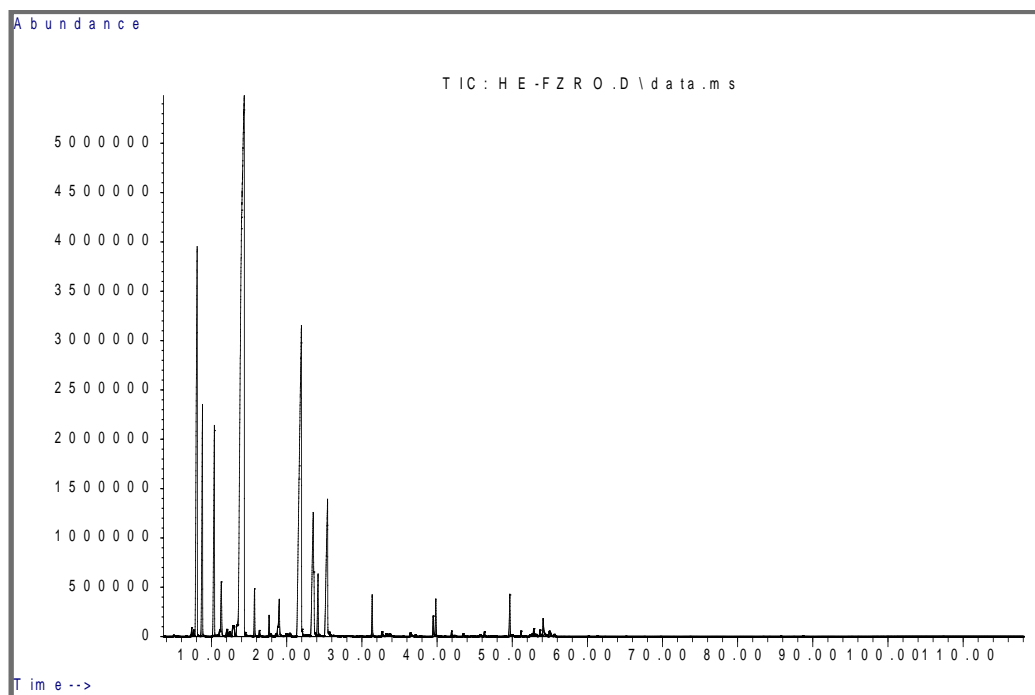


Figure 10. Chromatogramme CPG-SM de l'HE de *R. officinalis* montrant la séparation des composés chimiques sur colonne HP-5MS (abondance en fonction du temps de rétention en minutes).

Tableau 7. Principales familles chimiques de l'HE de *R. officinalis*.

Groupes chimiques	%	Constituants majeurs
Monoterpènes Hydrocarbonés	22,07	α -Pinène, β -Pinène, Camphène, β -Myrcène
Monoterpènes Oxygénés	74,22	1,8-Cinéole, Camphre, Bornéol, α -Terpinéol, Terpinène-4-ol
Sesquiterpènes Hydrocarbonés	0,88	β -Caryophyllène
Sesquiterpènes Oxygénés	1,73	Caryophyllène-oxide
Autres	1,07	
Total identifié	99,97	

3.2.2. Composition chimique de l'HE d'*A. campestris*

L'analyse de l'huile essentielle extraite d'*A. campestris* par CPG-SM a permis l'identification de quarante sept (47) composés représentant 95,49 % de la totalité des constituants de l'huile. De point de vue quantitatif, huit composés identifiés affichent des pourcentages supérieurs à 5% et sont considérés comme composant majeurs. D'autres composants ont été trouvés en faibles concentrations (<5%) (Tableau 8 ; Fig.11).

La classification des composés identifiés selon la classe chimique (Tableau 9) a révélé une prédominance des monoterpènes hydrocarbonés qui représente 52,08 % et dont les constituants majeurs sont le Fenchène (12,80 %), D-Limonène (7,91%), γ -Terpinène (6,59%), β -Pinène

(5,70%), α -Pinène (5,25%) et p-Cymène (5,21%). Alors que les monoterpènes oxygénés ne représentent que 3,81 %. Par ailleurs, les sesquiterpènes hydrocarbonés et les sesquiterpènes oxygénés sont marqués par la présence de Germacrène D (7,14%) et Spathuléol (8,81 %) comme composés majeurs.

Tableau 8. Composition chimique de l'HE d'*A.campestri* analysée par CPG-SM.

a : Ordre d'éluion sur colonne capillaire DB-5 ; **b** : Temps de rétention (TR)(min) ;

c : Indice de rétention expérimental sur colonne capillaire DB-5 (IR); **d** : Concentrations (%).

Pics	Composés ^a	TR ^b	IR _{Exp} ^c	% ^d
1	3-Thujène	2,35	923	0,04
2	2-Thujène	2,87	931	0,2
3	α -Pinène	2,99	942	5,25
4	Camphène	3,27	953	0,08
5	Fenchène	3,92	961	13,69
6	6-Methyl-5-heptène-2-one	4,26	985	0,04
7	β -Pinène	4,37	990	5,7
8	α -Terpinène	5,12	1012	0,78
9	p-Cymène	5,40	1026	5,21
10	D-Limonène	5,54	1034	7,91
11	cis-b-Ocimène	5,98	1037	1,56
12	trans-b-Ocimène	6,36	1046	4,19
13	γ -Terpinène	6,68	1054	6,59
14	Terpinolène	7,83	1079	0,88
15	Non identifié	9,19		0,35
16	6-Camphénol	9,39	1086	0,12
17	trans-Pinocarvéol	9,83	1129	0,18
18	Myrténol	9,99	1150	0,11
19	Verbenone	10,90	1171	0,14
20	Non identifié	11,39		0,09
21	Terpène-4-ol	11,63	1180	1,56
22	Non identifié	11,99		0,13
23	p-Cymen-8-ol	12,09	1186	0,08
24	α -Terpinéol	12,28	1192	0,58
25	Myrtenal	12,42	1194	0,48
26	Carvéol	13,82	1217	0,15
27	cis-Géraniol	14,70	1221	0,41
28	Non identifié	18,86		0,15
29	Non identifié	20,49		0,51
30	Terpinène-4-acétate	21,36	1304	0,66
31	β -Caryophyllène	22,26	1420	0,56

Pics	Composés ^a	TR ^b	IR _{Exp} ^c	% ^d
32	α -Selinène	23,69	1475	0,27
33	Aromadendrène	24,00	1476	0,14
34	<i>t</i> -Muuroène	24,15	1478	0,15
35	Non identifié	24,39		0,62
36	Germacrène D	24,94	1480	7,14
37	β -Himachalène	25,13	1486	0,85
38	α -Curcumène	25,29	1489	0,79
39	Valencène	25,58	1497	3,78
40	α -Muuroène	25,87	1499	0,97
41	α -Amorphene	26,36	1506	0,85
42	α -Farnesène	26,53	1510	1,29
43	<i>d</i> -Cadinène	26,85	1521	2,35
44	Spathuléol	28,85	1576	8,81
45	Isoaromadendrèneepoxide	29,20	1579	0,33
46	Non identifié	2,93		0,48
47	Caryophyllène oxide	29,43	1585	1,32
48	Non identifié	30,29		1,4
49	<i>cis</i> -Farnesol	30,62	1628	1,58
50	Cubenole	30,86	1635	0,56
51	<i>t</i> -Cadinole	31,27	1638	0,76
52	<i>d</i> -Cadinole	31,42	1640	0,94
53	β -Eudesmol	31,63	1649	3,24
54	α -Cadinol	31,90	1654	1,38
55	Non identifié	32,41		0,64
56	Cedr-8-en-13-ol	33,04	1668	0,84
57	Non identifié	34,67		0,14
Total identifié			95,49%	

Tableau 9. Principales familles chimiques de l'HE d'*A.campestris*.

Groupes chimiques	%	Constituants majeurs
Monoterpènes Hydrocarbonés	52,08	Fenchène, D-Limonène, γ -Terpinène, β -Pinène, α -Pinène, p-Cymène, trans- β -Ocimène
Monoterpènes Oxygénés	3,81	Terpène-4-ol
Sésquiterpènes Hydrocarbonés	19,14	Germacrène D, Valencène, δ -Cadinène, α -Farnesène
Sésquiterpènes Oxygénés	19,76	Spathuléol, β -Eudesmol, <i>cis</i> -Farnesol, α -Cadinole, Caryophyllène oxide
Autres	0,7	
Total identifié		95,49 %

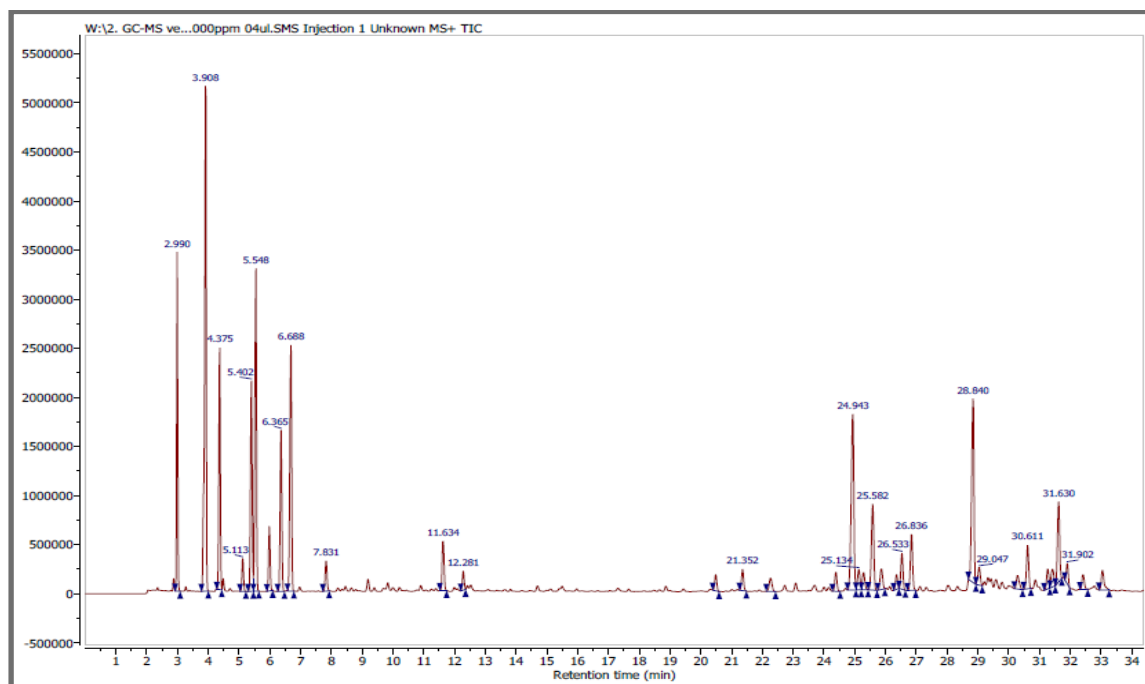


Figure 11. Chromatogramme CPG-SM de l'HE d'*A.campestris* montrant la séparation des composés chimiques sur colonne DB-5 (abondance en fonction du temps de rétention en minutes).

3.3. Effet larvicide des plantes à l'égard de *Cx. pipiens*

Les essais toxicologiques ont permis d'évaluer l'efficacité des huiles essentielles et des extraits organiques de *R. officinalis* et *A.campestris* à l'égard des larves de *Cx. pipiens* et cela à 24, 48 et 72 heures après traitement.

3.3.1. Toxicité des HEs

Un screening test réalisé à partir d'une solution mère a permis d'appliquer sept concentrations : 16,56; 33,11; 39,74; 52,98; 66,23; 88,28 et 99,34 ppm pour *R. officinalis* et 2,07; 8,28; 19,87; 33,11 et 88,28 ppm pour *A. campestris* sur les larves L4 de *Cx.pipiens*. Des séries témoins négatifs et témoins positifs sont réalisées en parallèle. Aucune mortalité n'a été observée dans les séries témoins.

Le traitement par les deux plantes a montré une activité larvicide avec une relation dose-réponse. Concernant *R. officinalis*, le taux de mortalités corrigées enregistrées au cours des tests de toxicité affiche une augmentation à 24, 48 et 72 heures après traitement en fonction des concentrations appliquées. Il varie de 5% à la dose la plus faible (16,56ppm) à 100% à la dose la plus forte (99,34ppm) à 24h, de 10% (16,56ppm) jusqu'à 100% (99,34ppm) à 48h et de 12% (16,56ppm) jusqu'à 100% (99,34ppm) à 72 heures.

Les mêmes observations ont été affichées pour *A. campestris*, où on a noté une augmentation du taux de mortalités corrigées au cours des périodes testées (24, 48 et 72 heures après exposition) en fonction des concentrations appliquées. Ce taux varie de 4% à la dose la plus faible (2,07ppm) à 99% à la dose la plus forte (88,28ppm) à 24h, de 7% (2,07ppm) jusqu'à 100% (88,28ppm) à 48h et de 9 % (2,07ppm) jusqu'à 100% (88,28ppm) à 72 heures.

Le classement des doses par le test HSD de Tukey révèle l'existence de 5 groupes pour le Romarin et 4 groupes pour l'Armoise (Fig.12).

La courbe dose-réponse exprimant les pourcentages de mortalité en fonction du logarithme des concentrations appliquées (Fig. 13) a permis de déterminer les concentrations létales (CL₂₅, CL₅₀ et CL₉₀) avec leurs limites de confiance à 95% et le Hill Slope (Tableau 10).

Les résultats ont montré que les concentrations létales montrent une variation selon les périodes testées. De plus, on a enregistré une forte activité larvicide après traitement à l'Armoise par rapport au Romarin chez *Cx.pipiens* (Tableau 10).

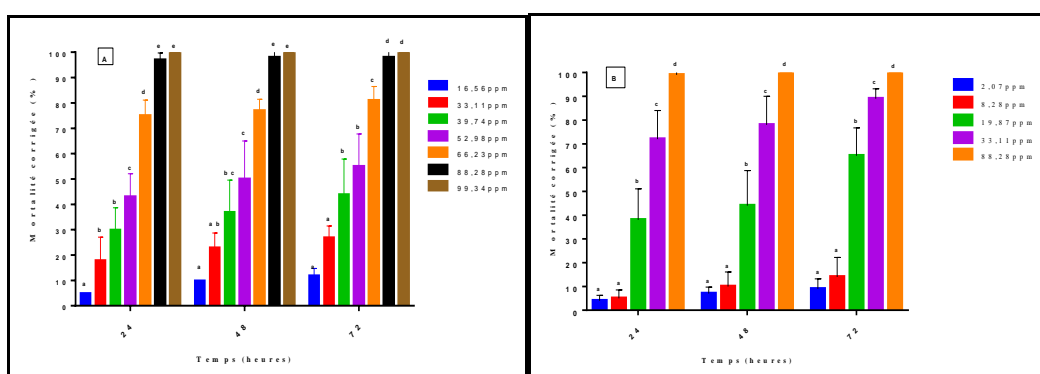


Figure 12. Toxicité des HEs de *R. officinalis*(A) et *A. campestris* (B), appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de *Cx. pipiens*: Mortalité corrigée (%) (m ± SEM, n=5 répétitions de individus chacune). Les lettres représentent le classement des doses selon le test HSD de Tukey.

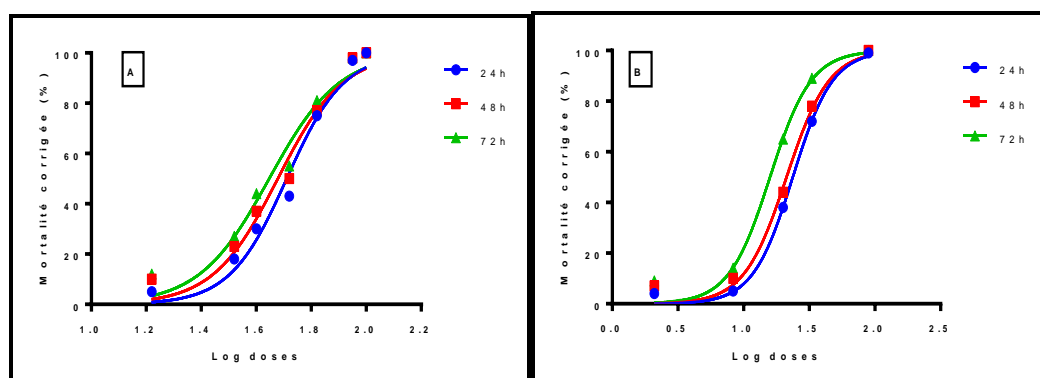


Figure 13. Effets des HEs de *R. officinalis* (A) et *A. campestris* (B), appliquées sur les larves L4 de *Cx. pipiens*: Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme des doses.

Tableau 10. Efficacité des HEs de *R. officinalis* et *A. campestris* (ppm) appliquées sur des larves L4 de *Cx. pipiens* au cours de différentes périodes après traitement : analyse des probits et détermination des concentrations létales et leurs intervalles de confiance (95%).

Périodes	Espèces	CL ₂₅ (ppm) (95% IC)	CL ₅₀ (ppm) (95% IC)	CL ₉₀ (ppm) (95% IC)	R ²	Slope
24 h	<i>R. officinalis</i>	39,47 (33,18 - 45,60)	51,33 (46,18 - 56,74)	86,77 (72,40 - 109,60)	0,98	4,18
	<i>A. campestris</i>	16,14 (14 - 18,58)	23,69 (21,77 - 25,78)	51,17 (41,02 - 63,83)	0,99	2,85
48 h	<i>R. officinalis</i>	35,32 (29,72 - 42,07)	47,64 (42,45 - 53,47)	86,50 (66,37 - 112,72)	0,97	3,68
	<i>A. campestris</i>	14,09 (10,47 - 18,97)	21,23 (17,82 - 25,28)	48,19 (31,62 - 73,45)	0,99	2,68
72 h	<i>R. officinalis</i>	32,14 (26,42 - 39,08)	44,33 (39,21 - 50,11)	84,53 (63,68 - 112,20)	0,97	3,41
	<i>A. campestris</i>	10,69 (7,66 - 14,89)	15,89 (12,78 - 19,75)	35,16 (23,77 - 51,88)	0,99	2,77

3.3.2. Toxicité des extraits organiques de *R. officinalis* et *A. campestris*

Les essais toxicologiques réalisés ont permis d'estimer l'efficacité du traitement sur les larves L4 de *Cx.pipiens*. Des séries témoins négatifs et témoins positifs sont réalisées en parallèles. Aucune mortalité n'a été observée chez les séries témoins.

Les résultats du traitement avec les différents extraits organiques de *R. officinalis* contre les larves L4 de *Cx. pipiens* ont montré une variation de la réponse, allant d'une mortalité modérée pour l'extrait RO-EP à une faible mortalité pour le reste des extraits à savoir RO-ME , RO-DM , RO-AE, RO-ED et RO-HA. Pour la période de 24h après traitement, l'extrait RO-EP présente le pourcentage de mortalité le plus élevé qui est de l'ordre de 85%. Il est presque deux fois et demi supérieur que les extraits RO-ME (36%) et RO-DM (33%). Par ailleurs, les extraits RO-AE, RO-ED présentent un pourcentage de mortalité de 13,8 % et 3,5 % respectivement. Cependant, l'extrait RO-HA affiche la mortalité la plus faible qui est de l'ordre de 0,8%. Pour les périodes de 48h et 72 h, la comparaison des moyennes concernant les mortalités permet d'établir l'ordre des extraits comme suit : EP > ME > DM > AE > ED > HA (Fig. 14A).

Les faibles taux de mortalités enregistrées après traitement aux différents extraits organiques de *R. officinalis* permettent de confirmer leur inefficacité et par conséquent il serait inutile d'établir les concentrations létales.

En ce qui concerne les extraits organiques d'*A.campestris*, les résultats obtenus ont montré une variation de mortalités, allant d'une forte mortalité pour l'extrait AC-EP à une faible mortalité pour le reste des extraits à savoir, AC-HA, AC-DM, AC-AE, AC-ME et AC-ED (Fig. 14B).

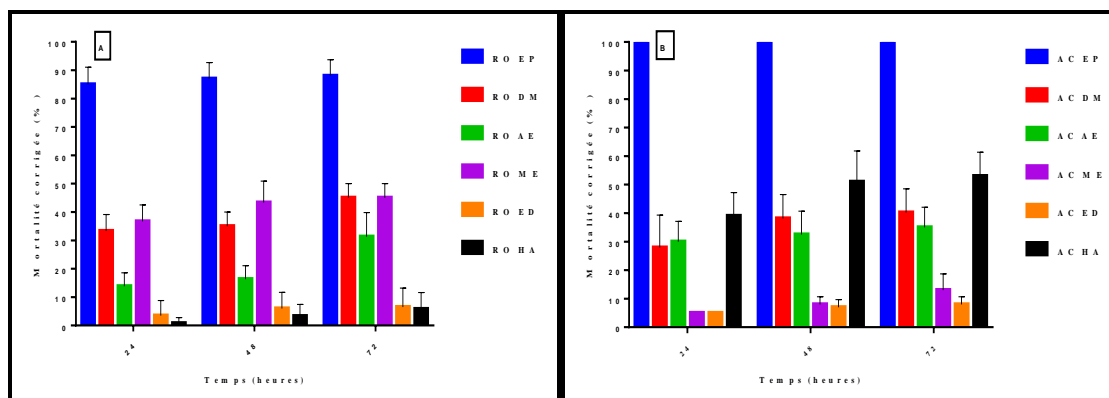


Figure 14. Toxicité des extraits organiques de *R. officinalis*(A) et *A. campestris* (B), appliquée sur les larves 4 nouvellement exuviées de *Cx. pipiens*: Mortalité corrigée .

A partir des résultats de la toxicité de l'extrait AC-EP d'*A.campestris* qui ont révélé une mortalité de 100% à 24 h, on a pu réaliser une série de dilutions à partir de la solution mère qui a permis de retenir quatre concentrations : 11,19; 22,38; 44,83 et 89,6 ppm.

Ces résultats ont révélé une forte activité larvicide de l'extrait AC-EP d'*A.campestris* contre les larves L4 de *Cx.pipiens* (Tableau 16) avec une relation dose-réponse (Fig.15). Les mortalités enregistrées affichent une augmentation à 24, 48 et 72 heures après exposition en fonction des concentrations appliquées. Ces mortalités varient de 8% à la dose la plus faible (11,19 ppm) à 80% à la dose la plus forte (89,6ppm) à 24h, de 12% (11,19 ppm) jusqu'à 87% (89,6 ppm) à 48h et de 17 % (11,19 ppm) jusqu'à 94 % (89,6ppm) à 72 heures. Le classement des doses par le test HSD de Tukey révèle l'existence de 3 groupes de moyennes.

L'analyse des Probits réalisée par Graph pad Prism 7 (Fig. 16), a permis de déterminer les concentrations létales (CL₂₅, CL₅₀ et CL₉₀), les limites de confiance à 95% (CL) et le Hill Slope comme mentionné dans le Tableau 11. Les résultats ont montré que les concentrations létales marquent également des variations selon les périodes post-expositions.

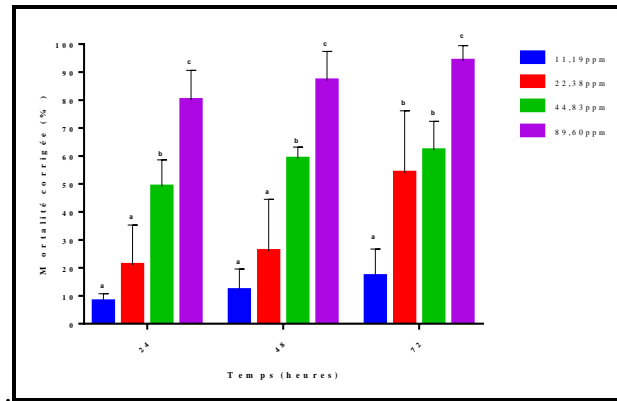


Figure 15. Toxicité de l'extrait AC-EP à différentes concentrations (ppm) contre les larves L4 de *Cx. pipiens* à 24, 48 et 72 heures après traitement: mortalité corrigée (%) (Moyenne \pm SEM; n = 5 répétitions comportant chacune un individu). Les lettres représentent les groupes de doses selon le test HSD de Tukey.

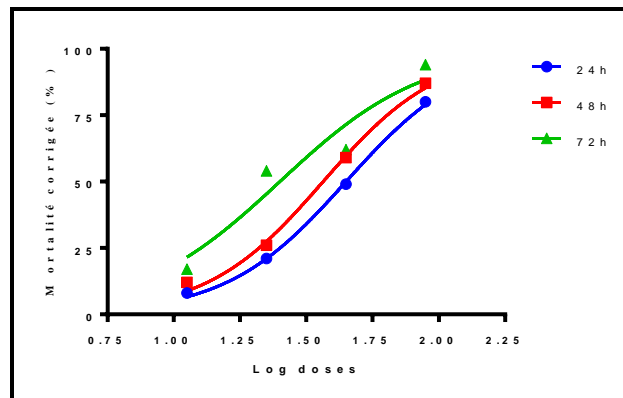


Figure 16. Effet de l'extrait AC-EP d'*A. campestris*, appliqué sur les larves L4 de *Cx. pipiens*: Courbe dose-réponse exprimant le pourcentage de mortalité corrigée en fonction du logarithme des doses.

Tableau 11. Efficacité de l'extrait AC-EP d'*A. campestris* (ppm) appliqué sur les larves L4 de *Cx. pipiens* à 24, 48 et 72 heures après traitement : analyse des probits et détermination des concentrations létales et leur intervalle de confiance (95%).

Périodes	CL ₂₅ (ppm) (95% IC)	CL ₅₀ (ppm) (95% IC)	CL ₉₀ (ppm) (95% IC)	R ²	Slope
24 h	25,18 (22,13 - 28,64)	44,67 (40,78 - 48,92)	140,6 (112,20 - 176,2)	0,99	1,92
48 h	20,99 (16,29 - 26,98)	36,59 (30,68 - 43,64)	111,43 (73,45 - 168,66)	0,99	1,98
72 h	12,65 (3,86 - 41,50)	25,13 (11,91 - 53)	99,08 (16,03 - 612,35)	0,93	1,60

3.3.3. Efficacité comparée des traitements appliqués

Le Tableau 12 présente les concentrations létales (CL₂₅, CL₅₀ et CL₉₀) des HEs de *R. officinalis*, d'*A. campestris* et de l'extrait Ether de pétrole d'*A. campestris* AC-EP obtenues chez les larves L4 de *Cx. pipiens*. En tenant compte des valeurs des CL₂₅ et CL₅₀ obtenues, nos

résultats montrent que l'huile d'armoise est la plus toxique suivie de l'extrait Ether de pétrole de la même plante et l'huile du Romarin. Par contre, les valeurs des CL₉₀ révèlent l'efficacité de l'HE d'*A.campestris* et de *R. officinalis* par rapport à l'extrait Ether de pétrole d'*A.campestris*.

Tableau 12. Efficacité comparée des HEs et de l'extrait Ether de pétrole d'*A.campestris* à l'égard des larves L4 de *Cx. pipiens* à 24h après traitement.

Plantes	Extraits	Concentrations létales (ppm)		
		CL ₂₅	CL ₅₀	CL ₉₀
<i>R. officinalis</i>	HE	39,47 (33,18 - 45,60)	51,33 (46,18 - 56,74)	86,77 (72,40 - 109,60)
	HE	16,14 (14 - 18,58)	23,69 (21,77 - 25,78)	51,17 (41,02 - 63,83)
<i>A. campestris</i>	EP	25,18 (22,13 - 28,64)	44,67 (40,78 - 48,92)	140,6 (112,20 - 176,2)

3.4. Effet des extraits de plantes sur la croissance de *Cx. pipiens*

La croissance pondérale et linéaire a été estimée dans le corps entier des larves L4 de *Cx.pipiens* à 24h, 48h et 72h après traitement en appliquant deux concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀) des extraits efficaces en terme de toxicité larvaire.

3.4.1. Effet des extraits de plantes sur le poids corporel

Le poids corporel des larves L4 de *Cx.pipiens* marque une diminution significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) avec une relation dose-réponse à 24h ($F_{2,6} = 52,54$; $P = 0,0002$) et 72 h ($F_{2,6} = 71,43$; $P < 0,001$) et seulement avec la concentration la plus forte (CL₅₀) à 48 h ($F_{2,6} = 6 371$; $P = 0,0328$) par rapport aux témoins (Fig. 17).

La comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'huile de l'Armoise, montre une diminution significative du poids corporel avec la concentration la plus forte (CL₅₀) à 24h ($F_{2,6} = 16,86$; $P=0,0034$) et 48h ($F_{2,6} = 13,4$; $P=0,0061$) et avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) à 72 h ($F_{2,6} = 16,84$; $P=0,0035$).

Par ailleurs, l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* réduisait significativement ce paramètre seulement avec la CL₅₀ à 72h ($F_{(2,5)} = 11,32$; $P=0,0139$) alors qu'aucun effet n'a été signalé au cours des autres périodes testées (Fig.21)

L'analyse comparative des valeurs moyennes des différents extraits a permis de constater l'impact significatif de l'HE de l'armoise qui affecte le poids corporel d'un facteur allant de 1,5 à 2,5 comparativement aux deux autres traitements.

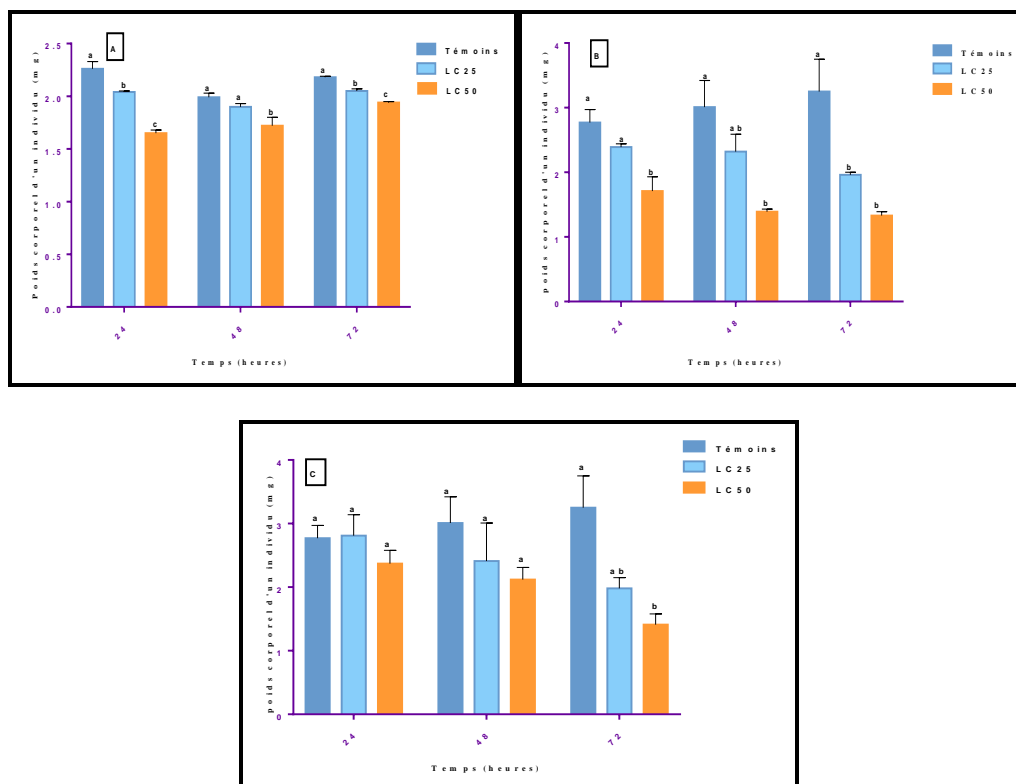


Figure 17. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur le poids corporel (mg) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.4.2. Effet des extraits de plantes sur le volume corporel

Le volume corporel des larves L4 de *Cx.pipiens* affiche une diminution significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) par rapport aux témoins (Fig. 18A) à toutes les périodes : 24h ($F_{2,42} = 29,34$; $P < 0,001$), 48h ($F_{2,42} = 68,63$; $P < 0,001$) et 72h ($F_{2,42} = 31,78$; $P < 0,001$).

La comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'huile de l'Armoise, montre que seule l'application de la concentration la plus forte (CL₅₀) affectait le volume corporel par diminution significative de ce paramètre à 24h ($F_{2,6} = 7,04$; $P=0,0267$) (Fig. 18B).

Alors aucune diminution significative n'a été signalée après l'application des concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀) de l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* comparativement aux témoins au cours de toutes les périodes testées (Fig. 18C).

En comparant les différents traitements, on constate que ce paramètre est trop affecté par l'huile du Romarin avec un facteur de diminution de 1,7 comparativement à l'huile de l'Armoise avec un facteur de 1,4.

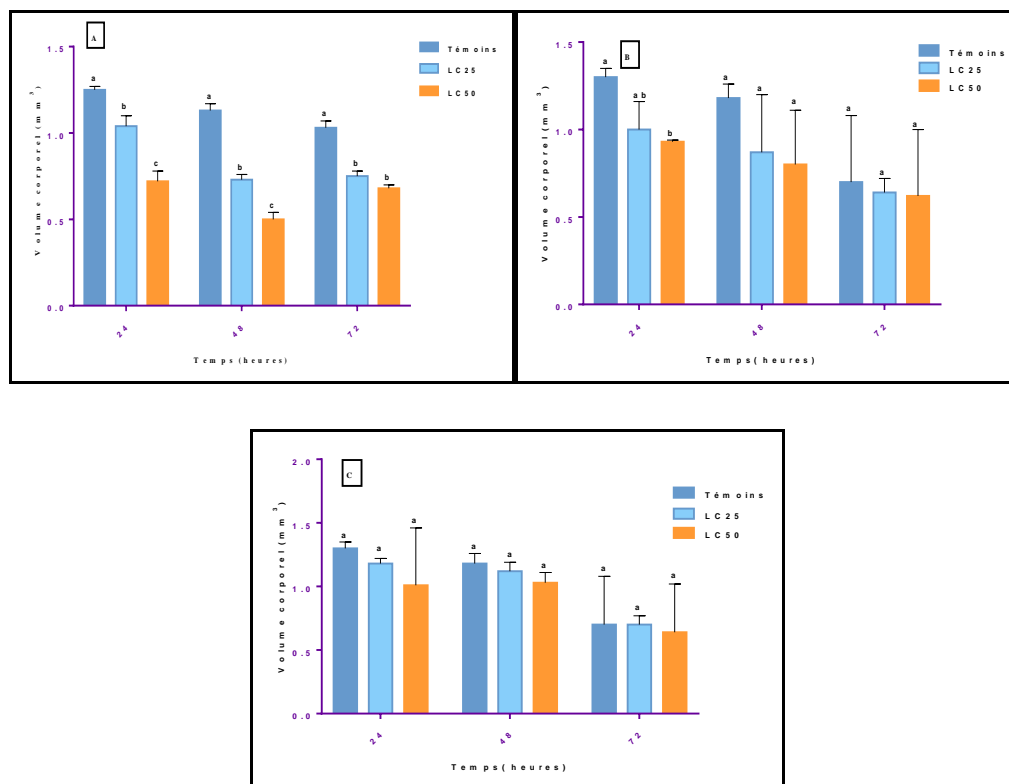


Figure 18. Effet des HES (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur le volume corporel (mm³) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.5. Effet des extraits de plantes sur la composition biochimique de *Cx. pipiens*

Les teneurs en protéines totales, en lipides et en glucides ont été estimées dans le corps entier des larves L4 de *Cx.pipiens* à 24h, 48h et 72h après traitement en appliquant deux concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀) des extraits efficaces en terme de toxicité larvaire.

3.5.1. Effet des extraits de plantes sur le contenu en protéines

Le contenu en protéines chez les larves L4 de *Cx.pipiens* marque une augmentation significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) seulement à 48h ($F_{2,6} = 11,04$; $P = 0,0098$) par rapport aux témoins (Fig. 19A). Aucun effet n'a été signalé à 24 et 72 heures.

La comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'huile de l'Armoise, montre une augmentation significative du contenu en protéines totales à 24h ($F_{2,6} = 9,94$; $P = 0,0125$) avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) par rapport aux témoins (Fig. 19B). Par contre, ce composé n'est pas affecté par le traitement à 48 et 72 heures.

Par ailleurs, l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* induit une augmentation de ce paramètre avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) à tous les temps à savoir : 24h ($F_{2,6} = 26,97$; $P=0,0010$), 48h ($F_{2,6} = 15,55$; $P=0,0042$) et 72h ($F_{2,6} = 5,808$; $P=0,0395$) (Fig.19C). Aucun effet dose n'a été signalé au cours des périodes testées.

En comparant les trois traitements, on constate que l'extrait AC EP a plus d'effet sur ce contenu avec un facteur d'augmentation de 1,8 par rapport à l'huile d'armoise (facteur = 1,4) et du romarin.

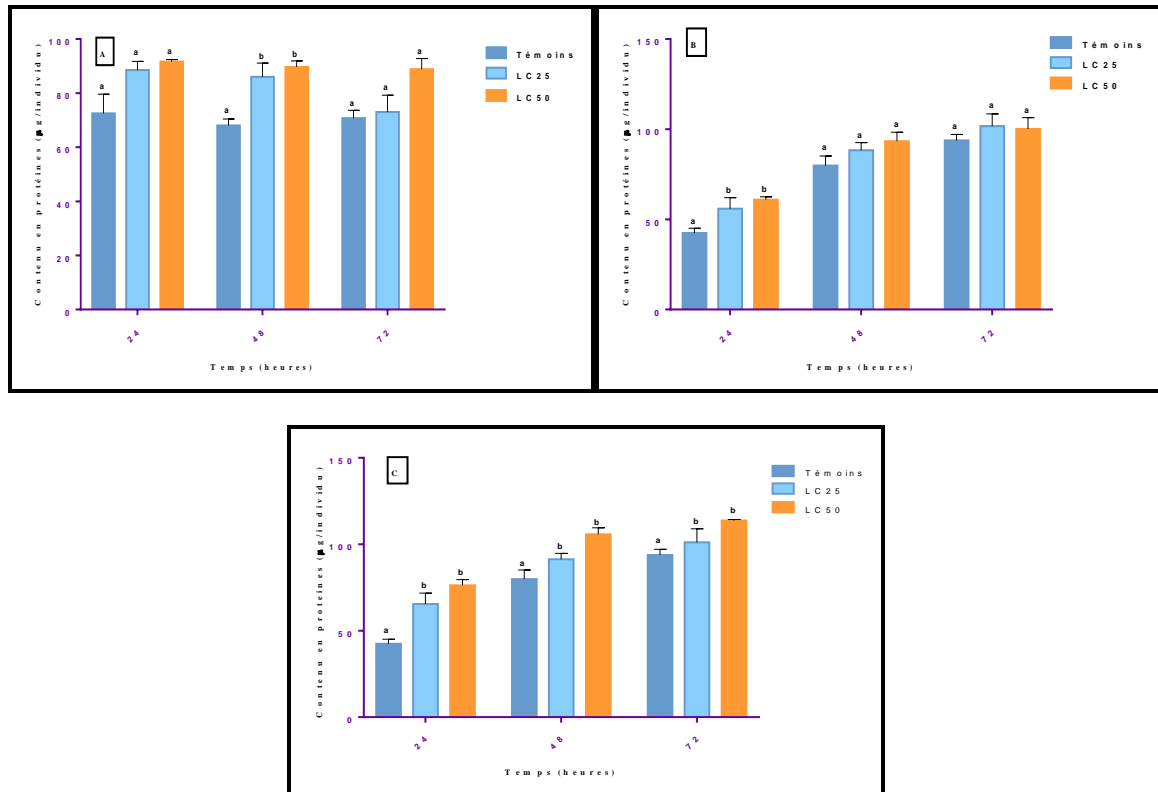


Figure 19. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur le contenu en protéines totales (µg/individu) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.5.2. Effet des extraits de plantes sur le contenu en glucides

Le contenu en glucides totaux chez les larves L4 de *Cx.pipiens* marque une augmentation significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) avec une relation dose-réponse à 48h ($F_{2,6} = 217,1$; $P < 0,0001$) et 72h ($F_{2,6} = 55,94$; $P = 0,0001$) et seulement avec la concentration la plus forte (CL₅₀) à 24h ($F_{2,6} = 17,04$; $P = 0,0034$) par rapport aux témoins (Fig. 20A).

Par contre, la comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'huile de l'Armoise avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀), montre une diminution

significative du contenu en glucides totaux à 48h ($F_{2,6} = 44,9$; $P=0,0002$) et 72h ($F_{2,6} = 147,2$; $P<0,0001$) et avec la concentration la plus forte (CL₅₀) à 24 h ($F_{2,6} = 20,43$; $P=0,0021$) (Fig. 20B).

De même, les résultats obtenus montrent que l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* induisait une diminution significative de ce composé biochimique avec les deux concentrations testées (CL₂₅ et CL₅₀) et avec une relation dose-réponse à 24 ($F_{2,6} = 70,65$; $P<0,0001$), 48 ($F_{2,6} = 144,4$; $P<0,0001$) et 72h ($F_{2,6} = 315,7$; $P<0,0001$) (Fig. 20C).

En comparant les trois traitements, on constate que l'extrait AC EP a plus d'effet sur le contenu en glucides totaux chez les larves L4 de *Cx. pipiens* comparativement à l'huile du Romarin et de l'Armoise.

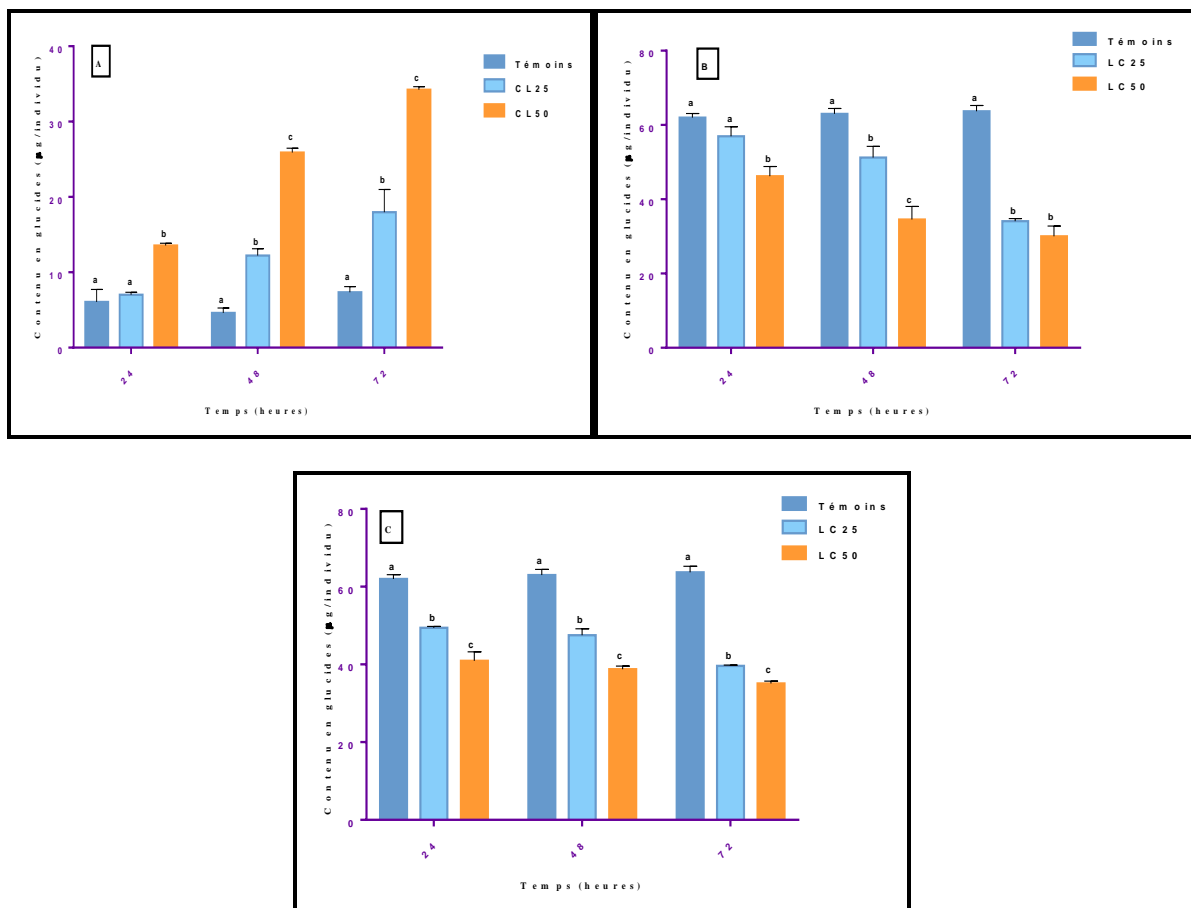


Figure 20. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur le contenu en glucides (µg/individu) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.5.3. Effet des extraits de plantes sur le contenu en lipides

Le contenu en lipides totaux des larves L4 de *Cx.pipiens* marque une diminution significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) à 24h ($F_{2,6} = 158,2$; $P < 0,0001$), 48h ($F_{2,6} = 846,7$; $P < 0,0001$) et 72h ($F_{2,6} = 275,2$; $P < 0,0001$) par rapport aux témoins (Fig. 21A).

Par contre, la comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'huile de l'Armoise avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) ne montre aucun effet sur le contenu en lipides totaux au cours des périodes testées (Fig.21B).

Alors que l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* réduisait significativement ce paramètre avec une relation dose-réponse chez les séries traitées avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) à tous les temps testés : 24h ($F_{2,6} = 117,7$; $P < 0,0001$), 48h ($F_{2,6} = 54,31$; $P = 0,0001$) et 72h ($F_{2,6} = 179,2$; $P < 0,0001$) (Fig. 21C).

On peut conclure que l'extrait (AC EP) affecte le plus ce paramètre biochimique par rapport à l'huile du Romarin et de l'Armoise.

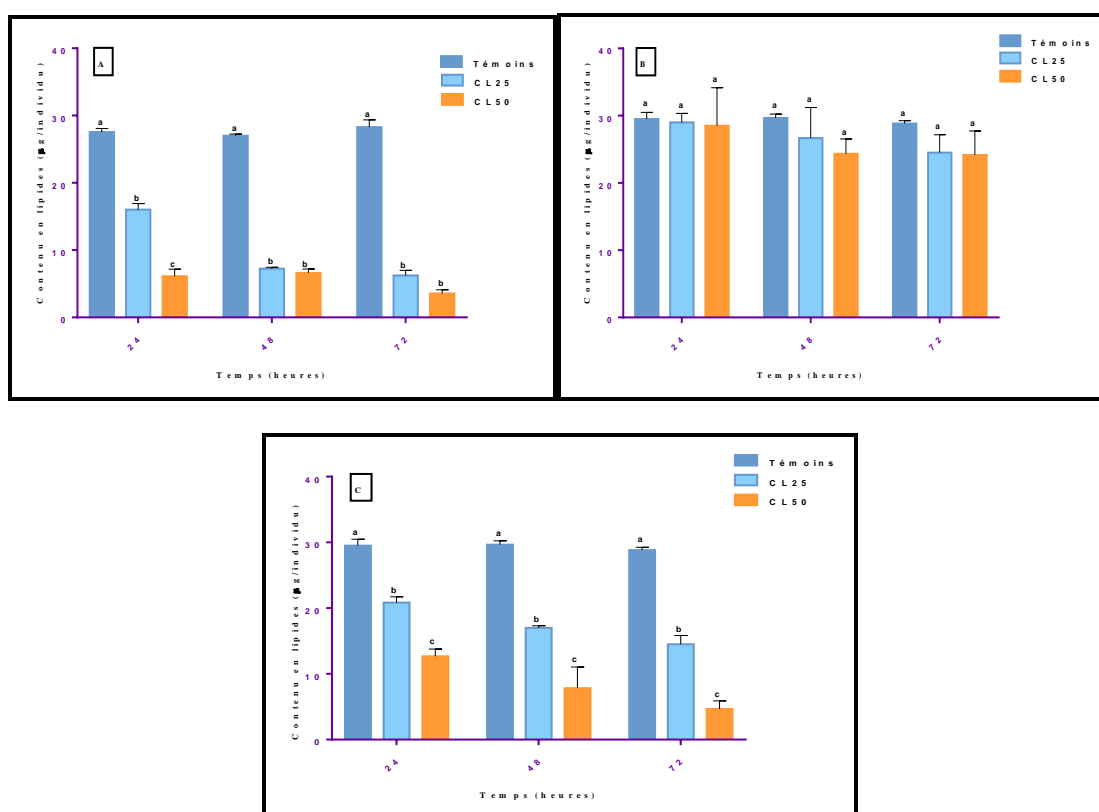


Figure 21. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur le contenu en lipides (µg/individu) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.6. Effets des extraits de plantes sur les biomarqueurs

L'effet des huiles essentielles des deux plantes et de l'extrait (AC EP) ont été évalués sur un biomarqueur de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase (AChE) et deux biomarqueurs de détoxification, les glutathion S-transférases (GSTs) et son cofacteur, le glutathion (GSH) chez les larves L4 de *Cx.pipiens* à différentes périodes (24, 48 et 72 heures) après traitement en appliquant les deux concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀).

3.6.1. Effets des extraits sur l'activité spécifique de l'AChE

L'application de l'HE du Romarin sur les larves L4 *Cx.pipiens* n'a induit aucun effet sur l'activité spécifique de l'AChE au cours de toutes les périodes testées ($p > 0,05$) (Fig. 22A).

Par contre, le traitement des larves L4 de *Cx. pipiens* par l'huile de l'Armoise provoque une diminution significative de l'activité de l'AChE de ce paramètre seulement à 24h ($F_{2,5} = 18,27$; $P = 0,0050$) avec la concentration la plus élevée (CL₅₀) (Fig. 22B).

Par ailleurs, les résultats obtenus montrent que l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* a induit une diminution significative de ce paramètre avec les deux concentrations (CL₂₅ et CL₅₀) à 24h ($F_{2,5} = 11,59$; $P = 0,0133$). Aucun effet n'a été signalé à 48h et 72heures (Fig. 22C). En comparant les trois traitements, on note l'effet marqué de l'extrait (AC EP) sur l'activité de l'AChE par rapport à l'HE de l'Armoise et du Romarin.

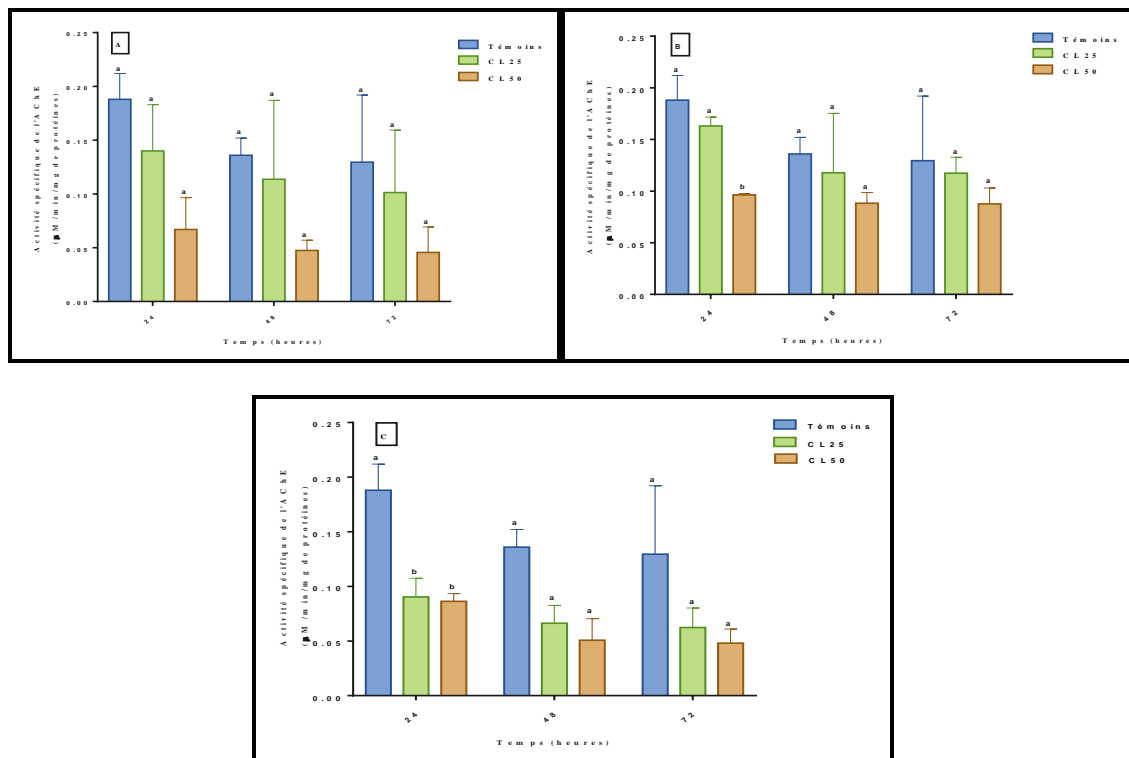


Figure 22. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et l'extrait AC EP (C) sur l'activité de l'AChE (µM/min/ mg de protéines) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.6.2. Effets des extraits sur l'activité des GSTs

Les résultats de l'activité spécifique des GSTs obtenus après traitement des larves L4 de *Cx.pipiens* par les extraits avec les deux concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀) à différentes périodes, sont présentés dans la Figure 23.

Les résultats de l'activité des GSTs chez les larves L4 de *Cx.pipiens* ont révélé une augmentation significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) avec une relation dose-réponse à 24h (F 2,6 = 533,5; P <0,0001) et seulement avec la concentration la plus forte (CL₅₀) à 48h (F 2,6 = 12,16; P = 0,0077) et 72h (F 2,6 = 6,65; P = 0,0300) par rapport aux témoins (Fig. 23A).

La comparaison des valeurs moyennes des séries témoins et traitées à l'HE de l'Armoise avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) ne montre aucun effet sur ce biomarqueur par rapport aux témoins au cours des périodes testées (Fig. 23B). Tandis que les résultats de l'activité des GSTs chez les traités à la CL₅₀ avec l'extrait (AC EP) d'*A.campestris* révèlent une augmentation significative seulement chez les séries traitées à la CL₅₀ après 24h de traitement (F_{2,6} = 9,249 ; P=0,0147) (Fig. 23C).

En comparant les trois traitements, on constate que l'activité des GSTs est trop affectée par l'HE du Romarin avec un facteur d'augmentation de 1,5 comparativement à l'extrait (AC EP).

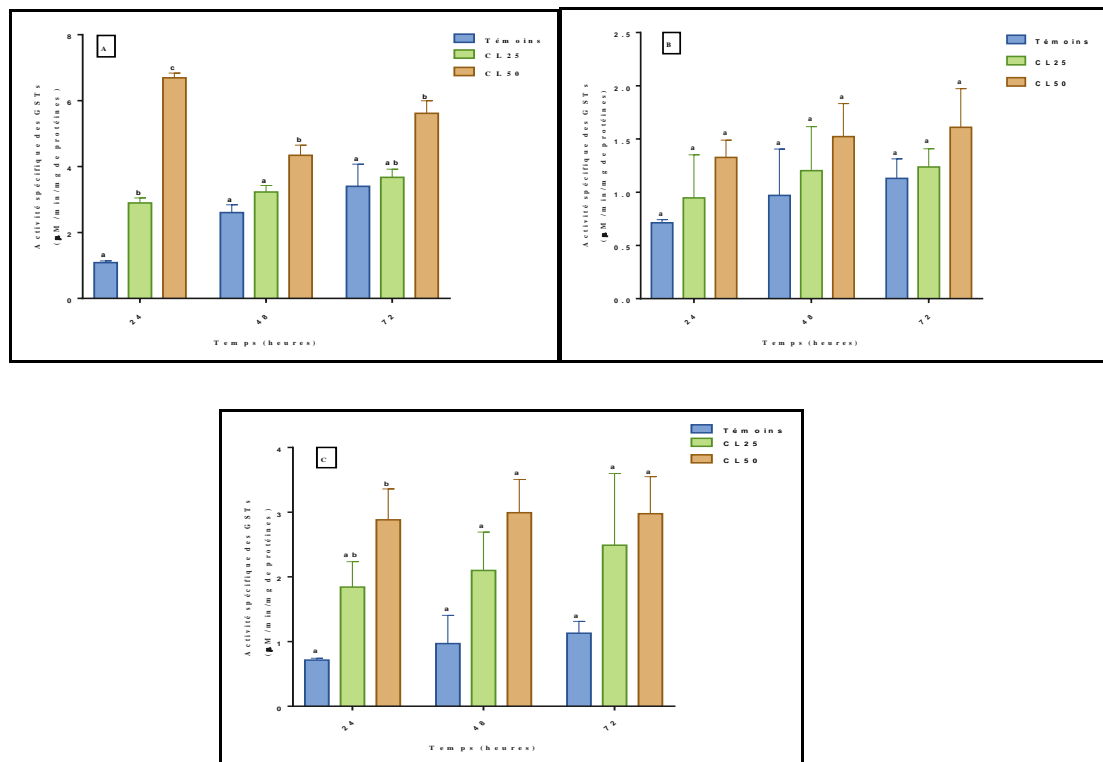


Figure 23. Effet des HEs (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et de l'extrait AC EP (C) sur l'activité des GSTs (µM/min/ mg de protéines) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

3.6.3. Effets des extraits sur le taux du GSH

Le taux du GSH chez les larves L4 de *Cx.pipiens* marque une augmentation significative chez les séries traitées par le Romarin avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) et avec une relation dose-réponse par rapport aux témoins à 24h ($F_{2,6} = 41,71$; $P = 0,0003$), 48h ($F_{2,6} = 7,424$; $P = 0,0238$) et 72h ($F_{2,6} = 95,65$; $P < 0,0001$) (Fig. 24A).

Par contre, aucun effet n'a été signalé chez les larves L4 de *Cx. pipiens* après traitement à l'huile et l'extrait AC EP de l'armoise et cela avec les deux concentrations appliquées (CL₂₅ et CL₅₀) comparativement aux témoins (Fig. 24B et C).

A partir de ces résultats, il ressort que l'HE du Romarin est l'extrait qui a le plus grand impact sur le taux du GSH, alors que l'HE et l'extrait éther de pétrole (AC EP) d'*A.campestris*n'ont aucun effet sur ce paramètre.

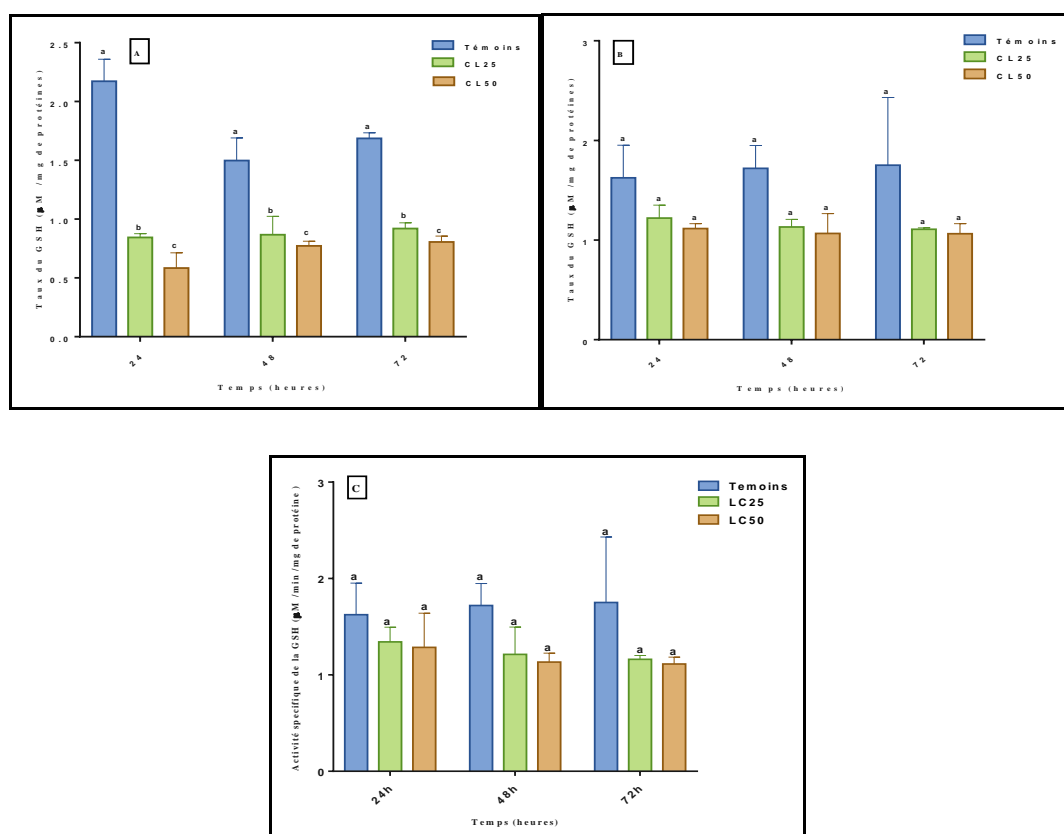


Figure 24. Effet des HES (CL₂₅ et CL₅₀) de *R.officinalis* (A), *A.campestris* (B) et de l'extrait AC EP (C) sur le taux du GSH (µM mg de protéines) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* à différentes périodes après traitement (m ± SEM, n=3 répétitions comportant chacune individus) : Test HSD de Tukey.

DISCUSSION

IV. DISCUSSION

4.1. Rendement de l'extraction des plantes

La méthode d'extraction est une étape très importante qui peut agir directement sur la qualité et la quantité de l'extrait. Le succès de cette étape est interprété par le calcul des rendements. Le rendement de l'huile essentielle de *Rosmarinus officinalis* extraite par hydrodistillation calculé sur la base de la matière sèche était de $1,24 \pm 0,27$ %. Nos résultats sont plus élevés que les pourcentages rapportés dans la littérature pour la même espèce dans d'autres régions d'Algérie. Des rendements moyens de 0,5% et de 0,44% ont été constatés à partir du romarin récolté dans la région d'Alger (Zoubiri & Baaliouamer, 2011 ; Tigrine-Kordjani *et al.*, 2012) et la région de Bibans (Boutekdjiret, 2003) respectivement. Tandis qu' Outaleb *et al.* (2015) ont enregistré un rendement de 1,8% à partir des échantillons sauvages collectés dans la région de Beni Yenni. Par rapport à plusieurs études précédentes dans les pays méditerranéens, notre rendement était également supérieur à ceux trouvés en Égypte (0,33%) (Abdelgaleil *et al.*, 2016) et en Italie (1%) (Tuttolomondo *et al.*, 2015). En Tunisie, Ben Jemia *et al.* (2014) et Zaouali *et al.* (2010) ont constaté que les rendements de cette même espèce variaient respectivement de 0,71% à 1,71% et de 1,17% à 2,7%. Le rendement obtenu dans nos expériences est inférieur à celui de la même plante collectée en Turquie (1,9%) (Zcan & Chalchat, 2008), au Maroc (2,7%) (Bouyahya *et al.*, 2017) et dans le péninsule balkanique (2,8%) (Lakusic *et al.*, 2012). Alors que Napoli *et al.* (2010) ont obtenu le rendement le plus élevé (3,6%) des échantillons prélevés dans une région sicilienne en Italie.

Le rendement en HE d'*A. campestris* obtenu au cours de nos expérimentations, était de $0,28 \pm 0,04$ % de la matière sèche, qui est proche de celui de Bakchiche *et al.* (2014) dans la région de Laghouat avec un pourcentage de 0,33% et presque trois fois supérieur (0,1%) pour la même espèce récoltée dans la région de Djelfa (Dob *et al.*, 2005). Cependant, nos résultats sont inférieurs à ceux notés dans la région de Laghouat (Houicher *et al.*, 2016 ; Cheraif *et al.*, 2020) et de M'sila (Belhattab *et al.*, 2011) avec des pourcentages de 0,71% ; 0,52% et 0,66% respectivement.

Par ailleurs, le rendement de cette même plante présente également des variations d'un pays à un autre, il est de 0,31 % en Tunisie (Chaieb *et al.*, 2018), de 0,2% en Serbie (Chalchat *et al.*, 2003) et de 0,18% en Libye (Janačković *et al.*, 2019). En outre, les travaux d'Al Jahid *et al.* (2016) au Maroc et de Neffati *et al.* (2008) en Tunisie ont signalé un rendement nettement supérieur à celui obtenu au cours de notre étude avec des pourcentages de 1,7% et 1,5% respectivement.

Ces variations peuvent être attribuées non seulement à des facteurs bioclimatiques et géographiques (Zaouali *et al.*, 2010 ; Jordan *et al.*, 2013), mais également aux variations génétiques et facteurs édaphiques. Le séchage, la durée et la méthode d'extraction, la partie de la plante, le stade de croissance et la saison de récolte peuvent également influencer le rendement en huiles essentielles (Pereira *et al.*, 2000 ; Boutekedjiret *et al.*, 2003 ; Figueiredo *et al.*, 2008).

Les résultats des extractions des deux plantes *R. officinalis* et *A. campestris* par les solvants à polarité croissante montrent des variations du rendement en extraits bruts. Les plus forts taux ont été observés pour l'extrait éthanolique (HA) et l'extrait aqueux (ED) par rapport aux extraits méthanolique (ME), dichlorométhane (DM), éther de pétrole (EP) et l'acétate d'éthyle (AE), indiquant que les solvants hautement polaires sont à l'origine de l'efficacité d'extraction. Cela pourrait être dû au fait que le matériel végétal contient des taux élevés de composés polaires solubles dans des solvants à forte polarité tels que l'eau et l'éthanol.

Dans notre étude, le rendement de l'extrait éthanolique de *R. officinalis* est de 20%. Ce taux est similaire et souvent supérieur comparativement à d'autres études réalisées sur la même espèce collectée dans d'autres régions dans le monde et par la même méthode adoptée ou par différents protocoles d'extraction. Selon la littérature un meilleur rendement de 20% a été obtenu par macération dans une solution d'éthanol (50:50) pendant 15 jours (Daniel *et al.*, 2013), ce qui est similaire à nos résultats mais avec une durée de 48h seulement. Par ailleurs, Zendehtdel *et al.* (2011) ont obtenu un rendement de 15% par macération dans de l'éthanol à 70% pendant 3 jours. Des valeurs nettement inférieures ont été rapportées par Kosaka & Yokoi (2003) avec un taux de 5,83 %. Plusieurs auteurs ont rapporté une variation du rendement des extraits de *R. officinalis* en utilisant la méthode d'extraction par soxhlet (Mutalib, 2015 ; Navaro *et al.*, 2017).

A l'issue de cette étude, le rendement de l'extrait hydroalcoolique d'*A. campestris* affiché un taux de 25,53% de la matière sèche. Ce rendement est nettement supérieur à celui obtenu dans d'autres études et reste le meilleur sur le plan quantité. Des études menées sur la même espèce rapportent des rendements variables d'une région à une autre en Algérie, car il affiche un taux de 12,8% dans la région de Djelfa (Derradji, 2013). De plus, ces variations ont été signalées d'une région à une autre dans le monde. Les travaux de Jawad (2007) réalisés sur la même plante ont montré un rendement de 17,4% en Irak. Alors que Masotti et ses collaborateurs (2012) qui ont étudié les extraits éthanoliques provenant de deux espèces d'armoises, *A. campestris* var. *glutinosa* et *A. molinieri* ont eu un rendement de 4% et 5,4% respectivement ce qui est nettement inférieur au notre. Les travaux réalisés par Erel *et al.* (2012) en Turquie et Pavela (2009a) en Bulgarie sur les extraits méthanoliques d'*A. campestris* sont mis en évidence des rendements de

21,47 % et 6,9 % respectivement. Ces différences confirment d'une part, la fiabilité et l'efficacité du protocole d'extraction adopté lors de notre étude, et d'autre part le potentiel et la richesse en métabolites secondaires de l'espèce *A. campestris* dans la région d'étude.

Les variations enregistrées peuvent être expliquées par plusieurs facteurs tels que la localisation géographique de la plante, le temps d'extraction et les conditions expérimentales. [Lagunez-rivera \(2006\)](#) a rapporté que la teneur d'une plante en composés et en métabolites secondaires varie en fonction de l'espèce végétale considérée et au sein de la même espèce végétale en fonction du stade de développement, de l'écotype, de la saison, de la période de récolte, de l'organe (feuille, tige, racine, etc..) et du protocole d'extraction utilisé.

4.2. Composition chimique des huiles essentielles

L'analyse de la composition chimique de l'HE de *R. officinalis* par CPG-SM a révélé la présence de 36 composés avec comme constituant majeurs : 1,8-Cinéole (44,343%), Camphre (16,745%), α -Pinène (10,079%) et Bornéol (5,026 %).

Une recherche dans la littérature montre des différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique de l'huile essentielle mais aussi certaines similitudes. L'HE de *R. officinalis* dans la présente étude est caractérisée par une teneur élevée en 1,8-cinéole (44,34%) et en se basant sur la classification proposée par [Napoli et al. \(2010\)](#), cette huile est un chémotype 1,8-Cinéole. [Elamrani et al. \(2000\)](#) ont étudié la chimiotaxonomie de l'HE de romarin marocain et ont défini trois chémotypes en fonction de l'abondance des composés pertinents, le chémotype α -Pinène- (α -pinène, 37-40%), le chémotype Camphre (camphre, 41-53%) et le chémotype 1,8-Cinéole (1,8-Cinéole, 58-63%). Nos résultats sont similaires à ceux trouvés dans d'autres études réalisées en Algérie dans lesquelles le 1,8-Cinéole représente le composant le plus abondant ([Touafek et al., 2004](#) ; [Zoubiri & Baaliouamer, 2011](#)), tandis que [Tigrine-Kordjani et al. \(2012\)](#) ont noté l'existence d'un chémotype α -Pinène. Plusieurs études sur la même espèce ont été menées dans les pays méditerranéens. Ainsi, les HEs des populations tunisiennes de *R. officinalis* ont révélé le 1,8-Cinéole, le Camphre, l' α -Pinène comme composants majeurs ([Zaouali et al., 2010](#) ; [Ben Jemia et al., 2014](#)). [Napoli et al. \(2010\)](#) ont identifié 100 composants à partir de 41 échantillons de *R. officinalis* prélevés sur l'île de Sicile et ont conclu que la majeure partie du romarin sicilien était classée dans le chémotype 1,8-Cinéole.

De nombreuses recherches ont rapporté d'autres chémotypes de *R. officinalis*. En Italie ([Angioni et al., 2004](#); [Conti et al., 2010](#)), en Espagne et en France ([Chalchat et al., 1993](#)), on a enregistré un chémotype α -Pinène. Alors qu'en Argentine et en Afrique du Sud, un chémotype Camphre a

été signalé (Gillij *et al.*, 2008 ; Okoh *et al.*, 2010). Par ailleurs, Zcan & Chalchat (2008) ont noté la présence d'un chémotype Myrcène de *R. officinalis* collecté en Turquie. Gachkar *et al.* (2007) ont rapporté Pipéritone comme chémotype du Romarin iranien. Les principaux constituants des HEs de *R. officinalis* collecté dans différentes régions dans le monde sont résumés dans le tableau 13.

Les résultats de l'analyse de la composition chimique de l'HE d'*A. campestris* par CPG-SM, ont permis l'identification de 47 composés sur 57 détectés. Les principaux composés étaient le Fenchène (12,80%), Spathuléol (8,81%), D-Limonène (7,91%), Germacrène D (7,14%), γ Terpinène (6,59%), β -Pinène (5,70%), α -Pinène (5,25%) et p-Cymène (5,21%). En comparant nos résultats à ceux trouvés dans des travaux antérieurs, on enregistre la présence du chémotype Fenchone en Algérie. On a pu constater que la composition chimique de l'HE d'*A. campestris* collecté dans différentes régions dans le monde est marquée par sa richesse en β -Pinène et en α -Pinène.

Tableau 13. Constituants majoritaires de l'HE de *R. officinalis* collecté dans différents pays.

Constituants majoritaires	Pays	Références
1,8-Cinéole (25,7%), Camphre (18,0%), Pinène (13,0%), Camphène (12,8%)	Turquie	Pandir & Baş (2016)
1,8-Cinéole (43,77%), Camphre (12,53%), α -Pinène (11,51%), β -Pinène (8,16%)	Serbie	Rašković <i>et al.</i> (2014)
1,8-Cinéole (23,67%), Camphre (18,74%), α -Pinène (14,07%)	Maroc	Bouyahya <i>et al.</i> (2017)
1,8-Cinéole (19,6%), Camphre (17,01%), α -Pinène (15,12%), Verbénone (9,55%)	Egypte	Abdelgaleil <i>et al.</i> (2016)
α -Pinène (39,2%), Eucalyptol (19,7%), Camphène (6,9%), β -Pinène (6,4%)	Italie	Conti <i>et al.</i> (2010)
1,8-Cinéole (48,3-58,7%), Borneol (8,8-10,4%), α -Pinène (7,9-9,9%)	Grèce	Papageorgiou <i>et al.</i> (2008)
1,8-Cinéole (71,7%), Borneol (9,8%), α -Pinène (6,0%)	Grèce	Giatropoulos <i>et al.</i> (2018)
Camphre (37,6%), Eucalyptol (20,25%), α -Pinène (12,68%), β -Myrcène (10,47%)	Brésil	Freitas <i>et al.</i> (2010)

Excepté le Fenchone, nos résultats concordent qualitativement avec ceux des études réalisées sur la même espèce en Algérie et en Tunisie et qui ont révélé la présence de 7 composés majeurs communs à savoir le β -Pinène, α -Pinène, p-Cymène, Limonène et γ -Terpinène (Akrouit *et al.*, 2003 ; Cheraif *et al.*, 2020), Germacrène D (Cheraif *et al.*, 2020) et Spathuléol (Akrouit *et al.*, 2003).

Les variations de la composition chimique des HEs du romarin ont été signalées et pourraient être attribuées aux effets climatiques sur les plantes qui poussent dans différents habitats, la

saison de récolte, le stade phénologique de la plante ainsi que la méthode d'extraction (Gachkar *et al.*, 2007 ; Rašković *et al.*, 2014). Tandis que Zaouali *et al.* (2010) ont rapporté que les variations de la composition chimique de l'huile peuvent être attribuées exclusivement aux variétés plutôt qu'aux conditions bioclimatiques.

En Algérie, plusieurs études ont montré que la composition chimique de l'HE d'*A. campestris* est caractérisée par la présence des chémotypes β -Pinène et α -Pinène. Dans la région de Laghouat, Houicher *et al.* (2016) ont rapporté un chémotype à α -Pinène avec comme composés majeurs l' α -Pinène (18,65%), β -Pinène (16,78%), β -Myrcène (17,34%), et Germacrène D (10,34%). Cependant, dans la même région, Bakchiche *et al.* (2014) ont trouvé que cette huile est composée principalement de β -Pinène (25,6%) et Sabinène (17%). Le même chémotype à β -Pinène d'HE d'*A. campestris* a été aussi noté par Ammar *et al.*, (2020) à Sétif avec le β -Pinène (15,2%), α -Pinène (11,2%), Myrcène (10,3%), Germacrène D (9%), (Z)- β -Ocimène (8,1%) et γ -Curcumène (6,4%) comme composés majeurs. D'autres chémotypes ont été signalés pour la même espèce collectée en Algérie, Belhattab *et al.* (2011) ont rapporté que le Terpenyl acétate (19%) représentait le composant le plus abondant de l'HE d'*A. campestris* collecté dans la région de M'Sila. Tandis que Dob *et al.* (2005) ont trouvé un chémotype à Farnésol (10,3 %) et à Cédrol (5,4 %) dans la région de Djelfa. De leur part, Zouaoui *et al.* (2020) ont indiqué la présence exclusive du chémotype Farnésène (14,17%) d'*A. campestris* poussant à Biskra. Alors que l'HE d'*A. campestris* en provenance de Khenchela présentait un chémotype à β -Myrcène (16,47%) (Ghorab *et al.*, 2013).

Les études antérieures sur la composition chimique de l'HE d'*A. campestris* issue des pays de la méditerranée et de l'Europe, ont montré divers chémotypes. En effet, un chémotype β -Pinène est majoritairement noté en Tunisie (Akrouf *et al.*, 2003 ; Neffati *et al.*, 2008 ; Aloui *et al.*, 2016 ; Abidi *et al.*, 2018), au Maroc (Al Jahid *et al.*, 2017), en Libye (Janačković *et al.*, 2019) et en Italie (Bellomaria *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'analyse chimique des HEs extraites d'*A. campestris* récoltées dans la région de l'Europe de l'Est, notamment en Pologne (Lis & Kowal, 2015) et Lituanie (Judzentiene & Budiene 2014) présentait un chémotype Germacrène D. D'un autre côté, certaines études ont révélé l'existence du chémotype Spathulénol au Maroc (Dib *et al.*, 2017b) et en Serbie (Chalchat *et al.*, 2003). Les constituants majeurs des HEs d'*A. campestris* collectés dans différentes régions dans le monde, sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14. Constituants majoritaires des HEs d'*A. campestris* collecté dans différents pays.

Constituants majoritaires	Pays	Références
α -Pinène (29,55 %), Muurolène (9,54 %), Santolinatriène (9,26 %), Gurjunène (8,67 %)	Algérie	Touil <i>et al.</i> (2017)
β -Pinène (14,49%), Germacrène (7,15%), β -Ocimène (6,78%)	Tunisie	Chaieb <i>et al.</i> (2018)
β -Pinène (35%), 1,8-Cineole (14,4 %), p-Cymène (11,2%), Myrcène (10,9%)	Tunisie	Dhifi <i>et al.</i> (2017)
1,8-Cinéole (19,2 %), Spathulénol (18,7%), α -Pinène (16,5%), epi-Cubénol (14,1%)	Italie	Mucciarelli <i>et al.</i> (1995)
Spathulénol (9,2%), β -Pinène (9,1%), α -Pinène (3,4%)	Serbie	Chalchat <i>et al.</i> (2003)
Germacrène D (24,2%), Bicyclgermacrène (14,7%), γ -Himachalène (12,6%) et β -Pinène (9,1%)	Serbie	Janačković <i>et al.</i> (2019)

4.3. Effet larvicide des HEs et des extraits de plantes sur les moustiques

4.3.1. Toxicité des huiles essentielles

Les produits phytochimiques dérivés de diverses sources botaniques ont fourni de nombreuses utilisations bénéfiques allant des produits pharmaceutiques aux insecticides. En plus d'être utilisés comme substances toxiques contre divers stades de la vie des moustiques, les produits phytochimiques ont également des utilisations potentielles comme répulsifs et inhibiteurs de croissance et de reproduction (Sukumar *et al.*, 1991). Contrairement aux insecticides conventionnels caractérisés par un seul ingrédient actif, les insecticides d'origine végétale comprennent des mélanges de composés chimiques qui agissent de manière concertée sur les processus comportementaux et physiologiques des moustiques (Ghosh *et al.*, 2012). Dans la présente étude, les résultats des tests de toxicité ont révélé une activité insecticide des HEs de *R. officinalis* et d'*A. campestris* contre les larves L4 de *Cx. pipiens*. L'analyse comparative des concentrations létales des deux plantes étudiées a montré que l'HE d'*A. campestris* est la plus efficace contre *Cx. pipiens* par rapport à l'HE de *R. officinalis*.

De nombreuses expériences ont été réalisées sur l'activité biologique des HEs contre plusieurs espèces de moustiques. Mais rares sont les publications sur l'activité larvicide de *R. officinalis* contre les larves de *Cx. pipiens*. Deux études ont été menées en Égypte pour évaluer le potentiel insecticide de l'HE du Romarin sur les larves de *Cx. pipiens*, sans présenter la composition chimique de cette huile (Radwan *et al.*, 2008 ;Zahran *et al.*, 2017). Nos résultats ont montré un potentiel très élevé du Romarin avec une CL₅₀ de 51,33 ppm contre 216,10 ppm et 128 ppm enregistrés par Radwan *et al.* (2008) et Zahran *et al.* (2017) respectivement.

Des études antérieures ont été réalisées sur l'activité larvicide de l'HE de *R. officinalis* et de ses principaux composants contre d'autres espèces de larves de moustiques. Pavela (2009a) a évalué

le potentiel toxique des HEs de plusieurs espèces de plantes aromatiques dont *R. officinalis* contre *Cx. quinquefasciatus* et a obtenu une CL₅₀ et CL₉₀ de 111,1 ppm et 251,6 ppm, respectivement. Des études antérieures ont rapporté des effets larvicides faibles de l'huile du Romarin contre *Ae. albopictus* avec une CL₅₀ > 250 ppm (Conti *et al.*, 2010), égale à 104,6ppm (Giatropoulos *et al.*, 2018) et > 500 ppm (Waliwitiya *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les résultats des essais toxicologiques de l'HE d'*A. campestris* ont montré une très forte activité larvicide contre *Cx. pipiens* avec une CL₅₀ et une CL₉₀ de 23,69 ppm et 51,17 ppm respectivement après 24 h d'exposition. Une étude récente réalisée sur l'HE d'*A. campestris* collecté dans la région de Sétif a montré un potentiel larvicide efficace contre les larves de *Cx. quinquefasciatus* après 24 heures d'exposition avec des CL₅₀ et CL₉₀ de 45,8 ppm et 84,2 ppm respectivement (Ammar *et al.*, 2020). L'application de l'HE d'*A. monosperma* collecté d'Egypte sur *Cx. pipiens* a révélé une très forte activité larvicide avec des valeurs de CL₅₀ de 7,73 ppm et 2,63 ppm après 24 h et 48 h d'exposition respectivement (Zahran *et al.*, 2017). Dans la même étude, les auteurs rapportent des effets moins efficaces de l'huile d'*A. judiaca* contre *Cx. Pipiens* avec une CL₅₀ de 111 mg/L et 75,08 mg/L au cours des mêmes périodes. En outre, Aziz *et al.* (2018) ont signalé que l'HE d'*A. herba-alba* présente une activité larvicide modérée contre *Cx. quinquefasciatus* (CL₅₀= 126,66 ppm), *Ae. Aegypti* (CL₅₀= 117,18 ppm) et *An. stephensi* (CL₅₀= 108,04 ppm). De même, l'activité de l'HE des feuilles d'*A. vulgaris* contre les larves d'*Ae. Aegypti* a affiché une CL₅₀ de 4,3 ppm et une CL₉₀ de 50,4 ppm après 24 h d'exposition (Balasubramani *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'HE d'*A. absinthium* testée contre *Cx. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *Cx. tritaeniorhynchus*, *Ae. albopictus*, *An. stephensi* et *An. subpictus* présentait une forte activité larvicide avec des CL₅₀ allant de 41,85 ppm à 62,16 ppm (Govindarajan & Benelli, 2016).

Les résultats de la présente étude ont indiqué que l'HE de *R. officinalis* avec ses principaux composants : 1,8-Cinéole (44,34%), Camphre (16,74%), α -Pinène (10,08%) et Bornéol (5,03%), ainsi l'HE d'*A. campestris* et ses constituants majeurs : le Fenchène (12,80 %), Spathulénol (8,81%), D-Limonène (7,91%), Germacrène D (7,14%), γ -Terpinène (6,59%), β -Pinène (5,70%), α -Pinène (5,25%) et p-Cymène (5,21%) présentaient une activité larvicide importante contre les larves de *Cx. pipiens*.

Plusieurs auteurs ont rapporté que les activités biologiques des HEs sont principalement liées à leurs principaux composés (Waliwitiya *et al.*, 2009). Cependant, il a été démontré que les effets insecticides de certaines HEs ne peuvent pas être expliqués par l'action de leurs principaux composants suggérant que leur action insecticide est le résultat d'un effet synergique (Gonzalez-Coloma *et al.*, 2013). Dans notre cas, l'activité larvicide de l'HE de *R. officinalis* et d'*A.*

campestris ne semble pas être due seulement à l'activité des principaux composants mais aussi à l'activité des composés mineurs par des effets probablement synergiques. Cette interprétation s'accorde avec les travaux de [Yu et al. \(2013\)](#) qui ont constaté que l'HE de *R. officinalis* avait un pouvoir larvicide élevé contre les larves de *Cx. quinquefasciatus* avec une valeur de CL₅₀ de 38,3 ppm et suggèrent que les constituants mineurs tels le Limonène et le Pinène sont responsables de cette activité. Cette suggestion est consolidée par des études antérieures dans lesquelles les composés majeurs 1,8-Cinéole, Camphre et Bornéol, isolés ou purs, testés sur des larves de *Cx. pipiens* étaient inefficaces ([Traboulsi et al., 2002](#); [Kim et al., 2008](#); [Radwan et al., 2008](#); [Zahran et al., 2011](#); [Kimbaris et al., 2012](#)). Par contre, il a été constaté que les principaux composés de l'huile du Romarin tel l' α -Pinène ([Traboulsi et al., 2002](#) ; [Michaelakis et al., 2009](#)), ainsi ceux trouvés dans l'HE d'*A. campestris* dont le Limonène, γ -Terpinène ([Santos et al., 2011](#)) et le Germacrène D ([Kiran & Devi \(2007\)](#)) ont une toxicité significative contre *Cx. pipiens* et *Ae. aegypti*. En ce qui concerne les composés mineurs de l'HE de *R. officinalis*, plusieurs études antérieures ont rapporté que le Thymol, Carvacrol, γ -Terpinène, cis-Ocimène ([Michaelakis et al., 2008](#); [Radwan et al., 2008](#); [Zahran et al., 2011](#); [Evergetis et al., 2013](#)), β -Pinène ([Michaelakis et al., 2009](#)), α -Phellanderène, Bornyl acétate, β -Myrcène ([Vourlioti -Arap et al., 2012](#) ; [Evergetis et al., 2013](#)), Δ 3-Carène ([Kim et al., 2008](#)) et Eugénol ([Kimbaris et al., 2012](#)) montrent une forte activité larvicide contre les larves de *Cx. pipiens*.

Les huiles essentielles sont constituées d'un mélange complexe de monoterpènes, de sesquiterpènes et de leurs dérivés oxygénés ([Shaalan et al., 2005](#)) et peuvent comprendre plusieurs substances actives (généralement 20 à 60), qui sont caractérisées par deux ou trois composés principaux à des concentrations élevées (20-85%) ainsi que d'autres composants présents à l'état de traces ([Pavela & Benelli, 2016](#)). Un certain nombre d'études rapportent que la variation de l'activité larvicide de l'huile essentielle dépend fortement de sa composition chimique ([Yu et al., 2013](#) ; [Zahran et al., 2017](#)). Cette activité peut également être attribuée à l'effet des groupes fonctionnels (alcools, phénols, etc.), des composés majeurs et mineurs qui peuvent interagir de manière additive, synergique et même antagoniste, augmentant, diminuant ou n'entraînant aucune modification de l'activité larvicide de l'huile par rapport à l'ingrédient actif majeur purifié ([Waliwitiya et al., 2009](#) ; [Li et al., 2014](#)). Dans certains cas, la même molécule phytochimique provenant d'une seule espèce végétale présente divers degrés de toxicité pour différentes espèces de moustiques ([Sukumar et al., 1991](#)).

[Dias & Morais \(2014\)](#) ont rapporté que les HEs riches en phénylpropanoïdes, sesquiterpènes oxygénés et les hydrocarbures monoterpéniques se sont révélées les plus actifs contre les larves

de moustiques et que la bioactivité des huiles testées était supérieure à celles des composés purifiés. D'autre part, de nombreuses études ont montré que les composés synthétiques ou les mélanges de composés purs sont moins efficaces par rapport à l'activité de leur huile essentielle correspondante (Rehman *et al.*, 2014). De son côté, Pavela (2015) a rapporté qu'un grand nombre de combinaisons binaires de plusieurs composés purs ont montré un effet synergique significatif sur la mortalité, tandis que d'autres mélanges ont montré un effet antagoniste. De plus, plusieurs facteurs influencent les réponses des larves aux HEs tels que : l'espèce végétale, l'âge de la plante, les parties de la plante, le chémotype, le temps de collecte, les conditions pédologiques et climatiques dans lesquelles la plante a été collectée, les méthodes d'extraction, les espèces de moustiques et leur origine (Ghosh *et al.*, 2012 ; Dias & Morais, 2014).

4.3.2. Toxicité des extraits organiques

Les tendances actuelles de la recherche des biocides se penchent vers l'utilisation des composés phytochimiques des extraits végétaux comme insecticides alternatifs vu la diversité de leurs contenances en composé bioactifs spécifiques aux insectes cibles sans nuire à d'autres organismes et à l'environnement. Les tests toxicologiques sont adoptés pour évaluer la sensibilité des larves, vis-à-vis des nouveaux insecticides à travers l'estimation des concentrations létales. Dans la présente étude, excepté l'extrait éther de pétrole d'*A. campestris* (AC-EP) qui était efficace avec une CL₅₀ de 44,67 ppm après 24 h d'exposition, les résultats du traitement avec les différents extraits organiques des deux plantes (*R. officinalis* et d'*A. campestris*) à savoir acétate d'éthyl (AE), dichloroéthane (DM), méthanol (ME), eau distillée (ED) et hydroalcoolique (HA) contre les larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* ont montré une faible activité larvicide.

En Algérie, peu d'études ont été consacrées à l'évaluation de l'activité insecticide vis-à-vis des moustiques à partir des extraits organiques ou aqueux des plantes. Les travaux d'Aouati (2016) ont montré que l'extrait méthanolique de *R. officinalis* était inefficace contre *Cx. pipiens* avec une CL₅₀ de 4809 ppm et une CL₉₀ de 8701 ppm après une exposition de 24h. Par contre, Shalaby & Khater (2005) ont noté une efficacité larvicide des extraits d'hexane, d'acétone et d'éthanol contre *Cx. pipiens*, alors que l'éther diéthylique était moins efficace. Les résultats des tests réalisés pour évaluer le potentiel insecticide de *R. officinalis* contre les larves de *Cx. pipiens* ont montré que l'extrait d'éther de pétrole était plus puissant que l'extrait éthanolique avec une CL₅₀ qui était de 511,84 contre 721,81 ppm respectivement (El-Ghaban *et al.*, 2015). Hasaballah (2015) a évalué les effets toxiques des extraits de l'éthanol et d'éther de pétrole des feuilles et des

tiges de *R. officinalis* dans des conditions de laboratoire contre des larves L3 de *Cx. pipiens*. En se basant sur les CL₅₀, on a noté que l'extrait éther de pétrole des feuilles (42,55 ppm) était plus efficace que l'extrait éthanolique (68,39 ppm).

En ce qui concerne *A. campestris*, [Pavela \(2009b\)](#) a signalé que l'extrait méthanolique d'*A. campestris* présente une très forte activité larvicide contre *Cx. quinquefasciatus* avec une CL₅₀ de 23 ppm, alors que l'espèce *A. abrotanum* affiche une faible activité avec une CL₅₀ de 609 ppm. Par ailleurs, d'autres espèces du genre *Artemisia* ont également été utilisées pour tester l'activité larvicide de leurs extraits organiques à l'égard de diverses espèces de moustiques (Tableau 35). Par ailleurs, [Aouati \(2016\)](#) a noté une CL₅₀ de 1625 ppm et une CL₉₀ de 3814 ppm de l'extrait méthanolique d'*A. herba alba* chez *Cx. pipiens*. En France, [Masotti et al. \(2012\)](#) a étudié l'activité larvicide d'extraits éthanoliques provenant de deux espèces d'armoises, *A. campestris* var. *glutinosa* et *A. molinieri*, sur les larves de *Cx. pipiens*. Les extraits issus d'*A. molinieri* (CL₅₀= 9091) présentaient une activité larvicide supérieure à celles des extraits d'*A. campestris* var *glutinosa* (CL₅₀=9898 ppm) après 48h d'exposition.

Les réponses induites par ces composés phytochimiques chez diverses espèces de moustiques sont influencées par des facteurs intrinsèques tels que l'espèce de plante et les parties de la plante et des facteurs extrinsèques comme l'emplacement géographique, polarité et concentration du solvant et les méthodes d'extractions et la purification des composés phytochimiques du matériel végétal ([Sukumar et al., 1991](#) ; [Nawaz et al., 2020](#)). Le choix de la procédure et le solvant d'extraction est basé sur les caractéristiques physicochimiques des composés à extraire. Ainsi, des solvants non polaires sont utilisés pour solubiliser principalement des composés lipophiles (alcanes, acides gras, pigments, cires, stérols, certains terpénoïdes, alcaloïdes et des coumarines). Les solvants de polarité moyenne sont utilisés pour extraire des composés de polarité intermédiaire (certains alcaloïdes, flavonoïdes), tandis que les plus polaires sont utilisés pour les composés plus polaires (glycosides flavonoïdes, tanins, certains alcaloïdes) ([Seidel, 2005](#)). Puisque aucun solvant unique ne peut extraire tous les composés phytochimiques, une extraction sélective avec des solvants de polarité croissante est utilisée pour les extraire. Ceci est réalisé en utilisant des systèmes de solvants allant de l'hexane/éther de pétrole, le plus apolaire à celui de l'eau, le plus polaire pour assurer l'extraction d'une large gamme de composés de polarité différente. Ainsi, vu qu'il existe une différence dans le profil chimique des espèces végétales, différents types de solvants peuvent affecter de manière significative le potentiel des composés végétaux extraits ([Ghosh et al., 2012](#)).

Tableau 15. Activité larvicide des extraits du genre *Artemisia* à l'égard de diverses espèces de moustiques.

Plantes	Solvant	Espèces	CL ₅₀ (ppm)	Références
<i>A. herba alba</i>	Acétone	<i>Cx. pipiens</i>	73,99	El-Bokl (2016)
	Hexane		1,44	
<i>A. absinthium</i>	Méthanol	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	124,42	Ali <i>et al.</i> (2018)
		<i>Ae. aegypti</i>	88,71	
		<i>An. stephensi</i>	59,37	
<i>A. annua</i>	Hexane	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	374,99	Cheah <i>et al.</i> (2013)
		<i>An. sinensis</i>	244,55	
		<i>Ae. aegypti</i>	276,14	
<i>A. annua</i>	Méthanol	<i>An. stephensi</i>	16,85	Sharma <i>et al.</i> (2006)
<i>A. annua</i>	Ethanol	<i>An. stephensi</i>	19,27	Sharma <i>et al.</i> (2014)
	Acetone		35,72	
	Chloroforme		0,84	
	Methanol		2,09	
	Ethanol	<i>A. aegypti</i>	26,03	
	Acetone		86,69	
	Chloroforme		0,67	
	Methanol		5,47	
<i>A. annua</i>	Ethanol	<i>An. stephensi</i>	1,766	Senthilkumar <i>et al.</i> (2009)
<i>A. nilagirica</i>	Ether de pétrole	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	190,92	Karmegam <i>et al.</i> (1997)
<i>A. vulgaris</i>	Ethanol	<i>Ae. aegypti</i>	18,6	Ninditya <i>et al.</i> (2020)
<i>A. dracunculus</i>	Ethanol	<i>An. stephensi</i>	11,36	Osanloo <i>et al.</i> (2017)
<i>A. taurica</i>	Méthanol	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	>500	Pavela (2009b)

4.4. Effet des HEs et des extraits de plantes sur la croissance

Dans la présente étude, le traitement par l'huile de *R. officinalis* (CL₂₅ et CL₅₀) a induit une diminution significative du poids et du volume corporels des larves L4 de *Cx. pipiens* par rapport aux témoins. Dans des études précédentes, les auteurs ont rapporté des observations similaires sur les changements qui se produisent dans le poids et le volume du corps de la larve après traitement aux HEs. Dris (2018) a montré que l'application de l'huile du basilic, de la menthe et de la lavande a induit une diminution de ces paramètres biométriques chez *Cx. pipiens* et *Cs. longiareolata*. Des résultats similaires ont été obtenus chez les larves L4 de *Cx. pipiens* et *Cs.*

longiareolata traitées à l'huile de *P. crispum* (Seghier *et al.*, 2020), et l'huile de *L. nobilis* (Bouzidi, 2021), chez *Cx. pipiens*, *Cs. longiareolata* et *Ae. caspius* traités à l'huile de *Mentha pulegium* (Guenez, 2020).

La taille du corps est un trait essentiel pour les moustiques, car elle peut influencer leur capacité à se nourrir de sang, le taux d'attaque de l'hôte et la fécondité. Tous ces traits sont des déterminants importants de leur potentiel à transmettre des maladies (Farjana & Tuno, 2013). L'explication possible de la diminution du poids et du volume corporel est l'impact des composants des huiles essentielles sur les cellules digestives des larves. Des études histopathologiques ont montré que l'intestin moyen des insectes est l'un des principaux organes cibles de nombreux xénobiotiques (Perumalsamy *et al.*, 2013). Les produits d'origine végétale sont capables de modifier la structure histologique de l'intestin moyen des insectes (Dutra *et al.*, 2020 ; Bouzidi, 2021) et aussi d'exercer un effet néfaste sur les cellules épithéliales digestives (Al-Mekhlafi, 2018). Les dommages de ces cellules digestives peuvent altérer les processus de digestion et d'absorption dans l'intestin moyen des larves, ce qui va perturber leur développement et leur survie (Procópio *et al.*, 2015). De plus, plusieurs études ont également démontré les effets inhibiteurs des insecticides botaniques sur l'activité de plusieurs enzymes digestives qui jouent un rôle majeur dans le corps des insectes en convertissant les matières alimentaires complexes en micromolécules nécessaires pour fournir de l'énergie et des métabolites pour la croissance, et le développement (Zibae, 2011 ; Sahayaraj, 2014).

4.5. Effet des HEs et les extraits sur la composition biochimique

Le contenu énergétique total d'un animal dépend de la quantité de glucides, de protéines et de lipides contenus dans son corps (Brey, 1988). Van Handel (1972) a signalé que la capacité d'un moustique à survivre, et donc à transmettre des maladies, dépend en grande partie de ses réserves énergétiques. Le stockage de l'énergie chez les diptères adultes est généralement sous forme de glucides, qui sont utilisés pour le vol, et de lipides, qui fournissent l'énergie au repos (Gray & Bradley, 2003). Les réserves nutritives accumulées au cours des stades larvaires permettent le développement ultérieur, non seulement de la larve elle-même, mais aussi de la puppe et de l'adulte (Kinneer & Thomson, 1975).

Les résultats ont révélé des changements généralement significatifs dans les quantités de ces principaux constituants biochimiques chez les séries traitées par rapport aux témoins.

Les protéines totales, les glucides et les lipides sont les principaux composants nécessaires pour qu'un organisme se développe et exerce ses activités vitales (Gamil *et al.*, 2011). La teneur en protéines de l'insecte dépend de sa synthèse et de sa dégradation (Gnanamani & Dhanasekaran, 2017).

Dans la présente étude, les analyses biochimiques ont révélé une teneur accrue en protéines totales chez les larves traitées par rapport aux témoins. Des résultats similaires ont été obtenus après l'application de la CL₅₀ de citronnelle (*Cymbopogon nardus*) et d'huile de patchouli (*Pogostemon cablin*) sur les larves L3 d'*Ae. aegypti* où le taux de protéines totales a augmenté de 114,7% et 91,1% respectivement et le taux de glucose à 57,1% avec de l'huile de patchouli (Hazarika *et al.*, 2018). Devi & Bora (2017) ont constaté que le taux de protéines totales était significativement multiplié par 2,4 chez les larves d'*Ae. aegypti* après le traitement avec les extraits phénoliques de *Ziziphus jujuba*. Madaci *et al.* (2008) ont également rapporté que les extraits hydroalcooliques des feuilles de *Nerium oleander* provoquent une augmentation des niveaux de protéines chez les larves de Rhizotrogini (Coleoptera : Scarabaeidae). Dans une étude récente, l'HE de *Piper marginatum* a induit une augmentation du taux de protéines totales chez les larves de *Spodoptera frugiperda* traitées par rapport aux témoins (Dutra *et al.*, 2020). Par contre, l'application des huiles extraites d'*O. basilicum* (Dris *et al.*, 2017b), de *T. vulgaris* et *O. vulgare* (Bouguerra *et al.*, 2018), de *P. crispum* sur les moustiques (Seghier *et al.*, 2020) a provoqué une diminution du contenu en protéines totales chez les larves L4.

Les métabolites secondaires des plantes peuvent induire un stress physiologique chez les insectes traités, entraînant une augmentation du métabolisme énergétique pour contrer le stress induit par les insecticides (Devi & Bora, 2017). Les changements dans la teneur en protéines reflètent probablement l'équilibre entre la synthèse, le stockage, le transport et la dégradation des nutriments structurels et fonctionnels au cours de l'ontogénèse ainsi que la réponse à des conditions physiologiques particulières (Shoukry *et al.*, 2003). L'augmentation du taux de protéines peut s'expliquer par l'augmentation de la synthèse des protéines et leur accumulation au niveau du corps adipeux, l'hémolymphe et d'autres tissus des larves (Kinnear & Thomson, 1975) comme préparation pour la synthèse de protéines cuticulaires sous le stress des insecticides (Nath *et al.*, 1997). En outre, plusieurs rapports montrent que les extraits de plantes ont augmenté les niveaux de protéines ce qui peut être due à la conversion des glucides et des lipides en protéines (Sahayaraj, 2014).

Les glucides en tant qu'éléments énergétiques jouent un rôle essentiel dans la physiologie des insectes et les niveaux de glycogène et de tréhalose dans les tissus et l'hémolymphe sont

étroitement liés à des événements physiologiques tels que la mue et la reproduction (Wiens & Gilbert, 1968).

Dans le présent travail, le dosage des glucides est réalisé dans le corps entier des larves 4 de *Cx. pipiens* après traitement. Les résultats révèlent une réduction du contenu en glucides chez les traités comparativement aux témoins. Des résultats similaires ont été enregistrés chez la même espèce suite à une exposition à l'huile de *Petroselinum crispum* (Seghier *et al.*, 2020), à l'huile de *Lavandula dentata*, *Ocimum basilicum* et *Mentha piperita* (Dris, 2018), au *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* (Bouguerra, 2019), au *Laurus nobilis* (Bouzidi, 2021) et *Mentha pulegium* (Guenez, 2020). Shu *et al.* (2018) ont rapporté dans leurs études une diminution de la teneur en glucides chez les larves de *Cx. pipiens* traitées aux huiles et ils ont corrélé cette diminution aux propriétés anti-appétantes de ces composés. Dans cette situation, les sucres seraient métabolisés pour répondre aux dépenses énergétiques des larves affamées.

Chez les insectes, les lipides jouent un rôle important. Ils sont des constituants de structures cellulaires, agissent comme des hormones et forment d'importantes réserves d'énergie pour certaines activités telles que le vol et la production d'œufs (Arrese *et al.*, 2001). Chez les moustiques, une lipogenèse efficace a été révélée au quatrième stade, qui représente le stade de la croissance le plus intense, avec une augmentation de près de dix fois la synthèse des lipides en 2 à 3 jours (Briegel *et al.*, 2002).

Les données de la présente recherche ont révélé que les lipides totaux diminuaient de façon remarquable et linéaire avec le volume et le poids corporels à toutes les périodes. Nos résultats sont en accord avec de nombreux travaux. Dris *et al.* (2017b) et Bouguerra *et al.* (2018) ont rapporté une diminution de la teneur totale en lipides chez les moustiques *Cx. pipiens* traités respectivement avec les HEs d'*O. basilicum* et *T. vulgaris*. La même observation a également été signalée avec l'HE de *P. crispum* appliquée sur les larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* et *Cs. longiareolata* (Seghier *et al.*, 2020). Sharma *et al.* (2011) ont testé l'extrait d'*A. annua* sur des larves des Anophèles et de Culicinés et ont noté que la teneur en lipides diminuait de 28,57% et 25,0%, respectivement. Des résultats similaires ont été obtenus par Senthilkumar *et al.* (2009) chez les larves d'*A. stephensi* traitées avec des extraits éthanoliques de la plante sélectionnée. Les changements de la teneur en lipides par l'action des HEs varient en fonction de nombreux facteurs, notamment l'espèce d'insecte, son stade de développement et le type d'huile utilisée (Ali & Ibrahim, 2018). Sharma *et al.* (2011) ont suggéré que le stress causé par les extraits de plantes

avec une réduction des lipides chez les insectes se produit en raison d'un changement du métabolisme énergétique via le catabolisme de ces derniers.

4.6. Effet des HEs et les extraits sur les biomarqueurs

Le terme biomarqueur se réfère à tous les paramètres biochimiques, cellulaires, physiologiques ou comportementaux qui peuvent être mesurés dans les tissus ou les fluides d'un organisme ou sur l'organisme entier, pour mettre en évidence l'exposition à, ou les effets, d'un ou plusieurs contaminants (Depledge, 1994). Ainsi les réponses des biomarqueurs biochimiques permettent de détecter les effets biologiques associés à l'exposition aux xénobiotiques, même à de faibles concentrations (Lionetto *et al.*, 2003). L'effet du stress infligé par les insecticides botaniques est souvent évalué par des biomarqueurs de détoxification et du stress oxydatif tels glutathion peroxydase, glutathion S-transférase, catalase, cytochrome P450 mono-oxygénase, superoxyde dismutase et les phosphatases.

Afin d'estimer l'impact des huiles et les extraits des plantes sur ces marqueurs chez les larves de moustique et par conséquent, suggérer les mécanismes qui régissent leur mode d'action, nous avons évalué l'effet des HEs de *R. officinalis* et d'*A.campestris* ainsi l'extrait (AC EP) d'*A. campestris* sur l'activité d'un biomarqueur de neurotoxicité, l'acétylcholinestérase, des biomarqueurs du stress oxydatif, glutathion S-transférases et son cofacteur, le glutathion, chez *Cx. pipiens* à 24, 48 et 72 heures après traitement.

4.6.1. Effet sur l'activité spécifique de l'AChE

L'AChE (E.C. 3.1.1.7) est une sérine hydrolase qui appartient à la famille des protéines de cholinestérase (Rattan, 2010). Au cours de la neurotransmission, l'ACh est libérée dans la fente synaptique où elle se lie aux récepteurs de l'ACh au niveau de la membrane post-synaptique, transférant le signal aux cellules nerveuses en aval. L'AChE est essentielle pour les insectes, car elle est activement impliquée dans l'arrêt de la signalisation cholinergique via l'hydrolyse de l'acétylcholine dans la fente synaptique, empêchant son accumulation dans le site cholinergique et la stimulation permanente des fibres nerveuses qui en résulte, provoquant ainsi, la paralysie et la mort (Ryan & Byrne, 1988).

Le rôle physiologique important de l'AChE est l'une des raisons pour lesquelles cette enzyme a attiré tant d'attention et a été étudiée pendant des décennies. Cette enzyme qui possède deux sites cibles, catalytiques et périphériques, est ciblée par plusieurs médicaments, agents neurotoxiques

et également de deux potentiels insecticides les organophosphorés et les carbamates. L'absence de l'inhibition de l'AChE lors de l'utilisation de ces insecticides est le résultat de la résistance des insectes à ces produits.

Les résultats de l'activité spécifique de l'AChE obtenus après traitement des larves L4 de *Cx. pipiens* par les HEs de *R. officinalis* et d'*A. campestris* ainsi l'extrait (ACEP) d'*A. campestris* à deux concentrations létales CL₂₅ et CL₅₀ à différentes périodes, révèle une diminution de ce biomarqueur. Cette diminution est significative qu'à 24h pour les huiles et l'extrait (ACEP) d'*A. campestris*, ce qui prouve d'un côté, leur effet neurotoxique rapide sur le système nerveux des larves, et d'un autre côté, cette inhibition de l'AChE constitue un mode d'action pour son activité larvicide. Cependant, pour le cas de l'huile de *R. officinalis*, la non significativité de la diminution de l'activité spécifique de l'AChE au cours de toutes les périodes, nous laisse suggérer que cette huile n'a pas d'effet neurotoxique, et que sa forte activité larvicide est probablement régie par d'autres modes d'action. Cette faible neurotoxicité peut être également due au faible taux de pénétration des constituants de cette huile dans le site cible de l'AChE (Kim *et al.*, 2013).

L'AChE est abondante dans le tissu nerveux de l'insecte et est considérée comme biomarqueur de la neurotoxicité. L'effet inhibiteur des extraits de plantes testés sur l'activité de l'AChE chez différentes espèces de moustiques est rapporté par de nombreux auteurs. Les résultats de la présente recherche corroborent avec les résultats des travaux récents réalisés en Algérie dans la même région d'étude (Tébessa) qui ont montré une activité neurotoxique via une inhibition significative de l'activité de l'AChE et ce pour les huiles extraites d'*O. basilicum*, *L. dentata* et *M. piperita* à l'égard des larves 4 de *Cx. pipiens* et *Cs. Longiareolata* (Dris, 2018), ainsi les HEs de *M. pulegium* et *L. nobilis* contre *Cx. pipiens*, *Cs. Longiareolata* et *Ae. Caspius* (Guenez, 2020). Par contre, l'application des HEs de *T. vulgaris* et d'*Origanum vulgare* sur les larves de *Cx. pipiens*, ne révèle aucun effet sur ce biomarqueur (Bouguerra, 2019).

Shahat *et al.* (2020) ont indiqué que les extraits du méthanol, éthyle acétate, chlorobenzène et hexane des feuilles d'*Origanum syriacum*, *Pergulariata mentosa*, *Senna italica*, et *Otostegia fruticosa* contre les larves de *Cx. pipiens* montrent une diminution significative de l'activité de l'AChE. Le traitement par les trois huiles essentielles isolées d'écorces d'agrumes *Citrus reticulata*, *Citrus reticulata* chinase Blanco et *Citrus sinensis* contre *Cx. pipiens* ont causé une forte inhibition de l'AChE avec des taux de 68,62 ; 53,81 et 29,89 % respectivement (Badawy *et al.*, 2017). De leur côté, Castillo-Morales *et al.* (2019) ont rapporté que l'HE de *Salvia officinalis*,

à la dose CL₅₀ inhibe l'activité de l'AChE à un taux de 37 % chez *Ae. aegypti* et provoquant sa mort. Dans une étude récente, une inhibition de l'AChE a été signalée chez *Ae. aegypti* et *Ae. Albopictus* après traitement à l'HE de *Lippia grata* (Felix *et al.*, 2021)

De plus, les résultats de la présente étude ont montré la richesse de l'HE de *R. officinalis* en monoterpènes (1,8-Cinéole, Camphre, α -Pinène, β -Pinène, Bornéol) et d'*A. campestris* (Fenchène, D-Limonène, γ -Terpinène, β -Pinène, α -Pinène, p-Cymène) et que ces HEs présentaient une activité larvicide très importante contre les larves de *Cx. pipiens*. De ce fait, ces composants majeurs des huiles seraient probablement impliqués dans la diminution de l'activité de l'AChE. La neurotoxicité d'un certain nombre de monoterpènes d'HEs a été testée chez différentes espèces d'insectes (Coats *et al.*, 1991) et certains monoterpènes ont été identifiés comme inhibiteurs compétitifs de l'acétylcholinestérase (Isman, 2000). Les résultats du test d'inhibition de l'AChE de 29 composés contre *Ae. Albopictus* a montré que α -Pinène présente l'activité inhibitrice la plus élevée (87,1%), suivi par le Carvacrol (78,8%) et le β -Pinène (77,6%) (Seo *et al.*, 2015). De même, plusieurs autres monoterpènes et sesquiterpènes, y compris le β -Limonène, le δ -Terpinène et le Cuminaldéhyde provoquent une activité larvicide aiguë contre *Ae. albopictus* avec l'inhibition de l'AChE comme mode d'action (Seo *et al.*, 2009 ; Tabanca *et al.*, 2016). Les travaux de Taktak & Badawy (2019), ont montré que le 3-Carène, Limonène, β -Myrcène, Cinnamyle Acétate, Géraniol, Menthol, Citral et Menthone étaient les inhibiteurs les plus importants par rapport à tous les composés. Ainsi, Zarrad *et al.* (2015) ont indiqué que le Limonène a une activité anticholinestérase chez *Bemisia tabaci*.

4.6.2.Effet sur l'activité spécifique des GSTs

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont des enzymes multifonctionnelles de grande taille et impliquées dans divers processus biologiques, notamment la détoxification d'un large éventail de composés endogènes et xénobiotiques, tels que les médicaments, les insecticides, les polluants organiques, les métabolites secondaires et d'autres toxines. De plus, elles contribuent à la biosynthèse et au transport intracellulaire des hormones et à l'élimination des espèces de radicaux libres oxygénés toxiques produites par l'action de substances toxiques (Chen *et al.*, 2003 ; Hayes *et al.*, 2005). Les GSTs principalement cytosoliques sont des enzymes qui catalysent la conjugaison de molécules électrophiles avec le groupe thiol du glutathion réduit (GSH), pour les convertir de molécules lipophiles réactives en produits hydrosolubles moins toxiques excrétables à partir de la cellule (Grant & Matsumura, 1989). Les résultats de l'activité spécifique des GSTs obtenus après traitement des larves L4 de *Cx. pipiens* par les HEs de *R. officinalis* et d'*A.*

campestris ainsi l'extrait (AC EP) d'*A. campestris* à deux concentrations létales (CL₂₅ et CL₅₀) à différentes périodes après traitement : 24, 48 et 72 heures, révèlent une augmentation de l'activité spécifique des GSTs chez les séries traitées par rapport aux témoins.

Les GSTs sont des composants importants de la voie de désintoxication dans presque tous les organismes. La plupart des études se sont concentrées sur leur rôle dans le métabolisme des insecticides, car des niveaux élevés d'activité des GSTs ont été associés au développement d'une résistance chez les insectes à toutes les principales classes d'insecticides (Ranson & Hemingway, 2005). La résistance est attribuée à des augmentations de la quantité d'un ou de plusieurs enzymes (GSTs), soit à la suite de l'amplification génique, soit par l'augmentation du taux de transcription, plutôt que des changements qualitatifs dans les enzymes (Enayati *et al.*, 2005). Des produits naturels d'origine végétale tels que les HEs et les extraits ont également été signalés comme un inducteur de l'activité des GSTs chez les insectes (Ebadollahi, 2013). Une augmentation de l'activité des GSTs a été signalée après traitement avec l'HE d'agrumes (Badawy *et al.*, 2017), d'*O. basilicum* (Dris *et al.*, 2017b), de *T. vulgaris* (Bouguerra *et al.*, 2018) chez les larves L4 de *Cx. pipiens* et par *P. crispum* chez les larves d'*Ae. Aegypti* (Intirach *et al.*, 2019). En outre, l'activité des GSTs a révélé une élévation après traitement des larves de *Cx. quinquefasciatus* et *An. stephensi* avec les extraits méthanoliques de *Lantana camara* et d'*Anacardium occidentale* (Tripathy *et al.*, 2011). En outre, il a été constaté que les composés purs augmentaient l'activité des GSTs telle l'Ar-Turmérone extraite de *Curcuma longa* chez les larves de *Cx. pipiens* (Liu *et al.*, 2020), β -Sélinène extraite d'*Arisaema fargesii* chez les larves d'*Ae. Aegypti* et *Ae. Albopictus* (Huang *et al.*, 2019). D'autre part, les HEs et les extraits de plantes augmentaient également l'activité des GSTs chez d'autres espèces d'insectes telles que l'HE d'*A. dracuncululus* appliquée sur *Tribolium castaneum* (Shojaei, 2017), extrait d'*A. annua* appliqué sur *Glyphodes pyloalis* (Khosravi *et al.*, 2011) et *Eurygaster integriceps* (Zibae & Bandani, 2010).

L'activité spécifique élevée reflète une mise en place d'un processus de détoxification qui constitue une forme de défense de l'insecte contre les pesticides (Clark, 1989). Étant donné que les GSTs peuvent métaboliser une grande variété de substances, une activité accrue des GSTs fait partie du changement compensatoire généralisé en raison de l'exposition à un stress environnemental (Tripathy *et al.*, 2011). Les populations d'insectes survivent à l'effet des composés insecticides toxiques par différents mécanismes physiologiques, notamment une sensibilité réduite du site cible et une production élevée d'enzymes détoxifiantes (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Le mécanisme moléculaire responsable de l'augmentation de l'activité des

GSTs est principalement dû aux changements de la régulation associés à une augmentation des niveaux d'ARNm des GSTs indiquant une synthèse de novo de l'enzyme (Yu, 1996; Che-Mendoza *et al.*, 2009).

4.6.3. Effet sur le taux du GSH

Le glutathion réduit (GSH) est un tripeptide composé des acides aminés L-glutamate, L-cystéine et glycine. Il est présent à des concentrations intracellulaires élevées principalement sous forme réduite et joue un rôle important dans le maintien du statut redox cellulaire et l'activité des facteurs transcriptionnels. En outre, ce peptide est également un antioxydant intracellulaire qui piège les radicaux libres, et joue le rôle de co-substrat dans la réaction de détoxification du peroxyde catalysée par le glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion transférase (GST) (Deponte, 2013). Une diminution de la teneur en GSH en dessous du taux normal expose la cellule au risque de dommages oxydatifs et peut indiquer une perturbation de l'état redox cellulaire et un changement dans la régulation redox dépendante des gènes (Kalinina *et al.*, 2014).

Les résultats du taux de GSH obtenus après traitement des larves du quatrième stade de *Cx. pipiens* par les HEs de *R. officinalis* et *d'A.campestris* ainsi l'extrait (AC EP) *d'A. campestris* à deux concentrations létales (LC₂₅ et CL₅₀) à différentes périodes révèlent une diminution de ce cofacteur chez les séries traitées par rapport aux témoins. D'après nos résultats, il était clair que l'augmentation de l'activité de la GST est corrélée à une diminution des quantités de GSH suite aux traitements appliqués.

Des résultats similaires ont été rapportés chez *Cx. pipiens*, *Cs. longiareolata* et *Ae. caspui* traités à l'huile extraite de *M. pulegium* (Guenez, 2020), chez *Cx. pipiens* et *Cs. Longiareolata* traités aux HEs d'*O. basilicum*, *L. dentata* et *M. piperita* (Dris, 2018), chez *Cx. pipiens* traité par *T. vulgaris* et *O. vulgare* (Bouguerra, 2019) et *L. nobilis* (Bouzidi, 2021). Par ailleurs, Kiran *et al.* (2017) ont noté une réduction du taux du GSH chez *Callosobruchus chinensis* et *Callosobruchus maculatus* après traitement à l'HE de *Boswellia carterii*. Cette diminution a été également observée chez *S. oryzae* et *R. dominica* traités à la CL₅₀ de l'huile de *Gaultheria procumben* (Kiran & Prakash, 2015).

La diminution du taux de GSH pourrait s'expliquer par une augmentation de la consommation de ce cofacteur et sa conjugaison à haut débit avec les GSTs en réponse à l'induction du système de détoxification et de défenses antioxydantes de l'organisme (Ait Hamlet *et al.*, 2016).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Pour prévenir la prolifération des maladies transmises par les moustiques et améliorer la qualité de l'environnement et la santé publique, la lutte contre les moustiques est essentielle. Actuellement, le principal outil de lutte contre les moustiques est l'application d'insecticides synthétiques. Mais leur utilisation est mal acceptée en raison des effets nocifs sur la santé humaine, animale et d'autres organismes non ciblés. A ceci s'ajoute aussi les préoccupations envers l'environnement vu leur nature non biodégradable, et la résistance croissante des populations de moustique à ces insecticides.

L'une des approches alternatives les plus efficaces dans le cadre du programme de lutte biologique consiste à explorer la biodiversité florale et favoriser l'utilisation d'insecticides d'origine végétale.

Le travail réalisé, nous a permis d'évaluer l'impact des huiles essentielles et des extraits par solvants organiques de polarité croissante de deux plantes : *Rosmarinus officinalis* et *Artemisia campestris* sur la mortalité, la morphométrie, la composition biochimique, et l'activité des biomarqueurs chez *Culex pipiens*, l'espèce de moustique la plus abondante dans la région de Tébessa.

Les HEs extraites des deux plantes, *R. officinalis* et *A. campestris* présentent des rendements de 1,24 % et 0,28 % respectivement. Les résultats obtenus des extractions par les solvants organiques de polarité croissante Ether de pétrole (EP), Dichlorométhane (DM), Acétate d'éthyle (AE), Méthanol (ME), l'extrait aqueux (ED) et l'extrait hydroalcoolique (HA) des deux plantes indiquent que les rendements en extraits bruts sont très variables et que l'extrait aqueux (ED) enregistre le taux le plus élevé avec 20 % et 25,53% respectivement.

L'analyse chimique de l'huile de *R. officinalis* réalisée par la CPG-SM a montré que cette huile a un chémotype, 1,8-Cinéole. L'analyse a également révélé la présence de 36 composés avec une prédominance des monoterpènes oxygénés représentés par quatre principaux composés : le 1,8-Cinéole (44,34 %), le Camphre (16,74 %) et le Bornéol (5,03 %). Alors que l'huile d'*A. campestris* a un chémotype, Fenchène et contient 47 composés, avec l'abondance des monoterpènes hydrocarbonés dont les constituants majeurs sont le Fenchène (12,80 %), D-Limonène (7,91%), γ -Terpinène (6,59%), β -Pinène (5,70%), α -Pinène (5,25%) et p-Cymène (5,21%).

Les essais toxicologiques ont permis de déterminer les concentrations létales (CL₂₅, CL₅₀ et CL₉₀) des huiles de deux plantes à l'égard des larves du quatrième stade de *Cx. pipiens*.

Les résultats des tests ont révélé la forte activité larvicide de l'huile essentielle de *R. officinalis* et d'*A. campestris* ainsi l'extrait d'éther de pétrole d'*A. campestris* (AC-EP) alors que les différents extraits organiques : ME, DM, AE, ED et HA des deux plantes étaient inefficaces et présentaient une faible mortalité.

L'étude morphométrique montre que les HEs extraites de deux plantes et l'extrait (AC-EP) perturbent la croissance linéaire et pondérale des individus, en réduisant le volume et le poids corporel des larves de *Cx. pipiens*. De plus, une perturbation de la composition biochimique (contenu en protéines, glucides et lipides) a été enregistrée chez les larves traitées. Les résultats révèlent une augmentation du contenu en protéines et une diminution des lipides pour tous les extraits alors que le contenu des glucides augmentait avec l'HE de *R. officinalis* et diminuait avec l'HE d'*A. campestris* et son extrait (AC-EP).

L'évaluation du biomarqueur de neurotoxicité révèle une diminution significative de l'activité spécifique de l'acétylcholinestérase chez les traités à l'huile et l'extrait EP d'*A. campestris*. Cependant, l'huile de *R. officinalis* ne montre aucun effet neurotoxique. De plus, tous les extraits provoquent une réduction du taux du GSH et une augmentation de l'activité des GSTs suggérant ainsi, une induction du processus de détoxification chez les traités.

Les résultats de la présente étude sont encourageants et révèlent clairement que l'huile essentielle de *R. officinalis* et d'*A. campestris* ainsi l'extrait d'éther de pétrole d'*A. campestris* (AC-EP) pourraient servir d'agents larvicides potentiels contre les larves de *Culex pipiens*.

En perspectives, il serait intéressant de compléter cette recherche avec des investigations plus approfondies afin de déterminer par fractionnement et isolement, les composants actifs responsables de cette activité et mener des recherches sur les combinaisons synergiques de différents constituants. Enfin, il est primordial de lancer des études sur l'impact de ces extraits végétaux sur les organismes non ciblés dans le milieu naturel où les espèces de moustiques règnent.

RESUMES

VI. RESUME

Le but de cette étude était de déterminer la composition chimique et l'activité larvicide des huiles essentielles et des extraits de solvants organiques de polarité croissante extraites de *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) et *Artemisia campestris* (Astéracées) contre les larves de quatrième stade de *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae).

Le rendement des HEs de *R. officinalis* et *A. campestris* obtenues par hydrodistillation affiche des valeurs de 1,24 % et 0,28 % respectivement. Alors que les résultats des rendements en extraits bruts de solvants organiques sont très variables et que les extraits aqueux (ED) enregistrent le taux le plus élevé.

La composition chimique des huiles essentielles analysée par CPG/SM a montré la prédominance des composés monoterpéniques avec le Cinéole (44,34 %), le Fenchène (12,80 %) comme constituants majoritaires chez *R. officinalis* et *A. campestris* respectivement.

Les tests toxicologiques ont révélé l'activité larvicide de ces HEs et l'extrait d'éther de pétrole d'*A. campestris* (AC-EP) à l'égard des larves de *Cx. pipiens*, alors que les autres extraits organiques : Dichlorométhane (DM), Acétate d'éthyle (AE), Méthanol (ME), l'extrait aqueux (ED) et l'extrait hydroalcoolique (HA) des deux plantes étaient inefficaces. De plus, l'HE d'*A. campestris* est le traitement le plus efficace par rapport aux autres traitements.

L'étude morphométrique montre que les HEs de *R. officinalis* et *A. campestris* ainsi que l'extrait d'éther de pétrole d'*A. campestris* (AC-EP) provoquent une diminution du poids et du volume corporel des individus des larves L4 de *Cx. pipiens*. De plus, ils perturbent le contenu en protéines, glucides et lipides.

Les biomarqueurs révèlent d'une part, un effet neurotoxique des huiles essentielles chez cette espèce de moustique, via une inhibition de l'activité spécifique de l'AChE et d'autre part, une induction du système de détoxification par le biais d'une augmentation des GSTs et une diminution du GSH.

Mots clés : *Culex pipiens*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia campestris*, Huile essentielle, Toxicité, Morphométrie, Composition biochimique, Biomarqueurs.

Abstract

The aim of this study was to determine the chemical composition and the larvicidal activity of essential oils and organic solvent extracts of increasing polarity extracted from *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) and *Artemisia campestris* (Asteraceae) against fourth instar larvae of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae).

The yield of the EOs of *R. officinalis* and *A. campestris* obtained by hydrodistillation shows values of 1.24% and 0.28% respectively. While the results of the yields of crude extracts of organic solvents are very variable and the aqueous extracts (DE) register the highest rate.

The chemical composition of essential oils analyzed by GC / MS showed the predominance of monoterpene compounds with Cineole (44.34%), Fenchene (12.80%) as major constituents in *R. officinalis* and *A. campestris* respectively.

Toxicological tests revealed the larvicidal activity of these EOs and the petroleum ether extract of *A. campestris* (AC-EP) on *Cx. pipiens* larvae, while the other different organic extracts Dichloromethane (DM), Ethyl acetate (AE), Methanol (ME), Aqueous extract (ED) and the Hydroalcoholic extract (HA) of the two plants were ineffective. In addition, EO of *A. campestris* were more effective compared to the petroleum ether extract of the same plant (AC-EP) and EO of *R. officinalis*.

The morphometric study shows that the EOs of *R. officinalis* and *A. campestris* thus the petroleum ether extract of *A. campestris* (AC-EP) cause a decrease in the weight and body volume of *Cx. pipiens* larvae. In addition, they disrupt the protein, carbohydrate and lipid contents.

The biomarkers reveal on the one hand, a neurotoxic effect of essential oils in this species of mosquito, via an inhibition of the specific activity of AChE and on the other hand, an induction of the detoxification system traduced by an increase in GSTs and a decrease in GSH.

Keywords: *Culex pipiens*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia campestris*, Essential oil, Toxicity, Morphometry, Biochemical composition, Biomarkers.

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية والنشاط القاتل للزيوت العطرية ومستخلصات المذيبات العضوية ذات القطبية المتزايدة المستخرجة من *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) و *Artemisia campestris* (Asteraceae) ضد يرقات الطور الرابع *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae).

يظهر محصول الزيوت الأساسية لـ *R. officinalis* و *A. campestris* المتحصل عليه بالتقطير المائي قيم 1.24% و 0.28% على التوالي. في حين أن نتائج مردود مستخلصات المذيبات العضوية الخام متفاوتة للغاية وسجلت المستخلصات المائية (DE) أعلى معدل.

أظهر التركيب الكيميائي للزيوت الأساسية التي تم تحليلها بواسطة CPG / MS غلبة مركبات monoterpene مع Cineole (44.34%)، Fenchene (12.80%) كمكونات رئيسية في *R. officinalis* و *A. campestris* على التوالي.

كشفت اختبارات السموم عن النشاط السمي للزيوت الأساسية ومستخلص الأثير البترولي لـ *A. campestris* (AC-EP) ضد يرقات *Cx. pipiens*، بينما كانت المستخلصات العضوية المختلفة الأخرى (DM) Dichloromethane و Ethylacetate (AE) و Methanol (ME) والمستخلص المائي (ED) والمستخلص الكحولي (HA) لنبتتين غير فعالة. بالإضافة إلى ذلك، كانت الزيوت الأساسية لـ *A. campestris* أكثر فعالية مقارنة بمستخلص الأثير البترولي من نفس النبات (AC-EP) والزيوت الأساسية لـ *R. officinalis*.

تُظهر الدراسة المورفومترية أن الزيوت الأساسية لـ *R. officinalis* و *A. campestris* وبالتالي فإن مستخلص الأثير البترولي لـ *A. campestris* (AC-EP) يسبب انخفاض في وزن وحجم الجسم للأفراد من يرقات *Cx. pipiens*. بالإضافة إلى ذلك، فإنها تعطل محتوى البروتين والكربوهيدرات والدهون.

تكشف المؤشرات الحيوية، من ناحية، عن التأثير السام للأعصاب للزيوت الأساسية في هذه الأنواع الثلاثة من البعوض، عن طريق تثبيط النشاط المحدد لـ AChE ومن ناحية أخرى، تحفيز نظام إزالة السموم عن طريق زيادة (GST) وانخفاض في GSH

الكلمات الرئيسية: *Culex pipiens*، الزيوت الأساسية، *Rosmarinus officinalis*، *Artemisia campestris*، السمية، المؤشرات القياسية، التركيب البيوكيميائية، المؤشرات الحيوية

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES 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.

Abbott, W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. **18**: 265–7

Abdelgaleil, S.A.M., Mohamed, M.I.E., Shawir, MS. & Abou-Taleb, H.K. (2016). Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. *Journal of Pesticide Science*. **89**:219–229.

Abidi, A., Sebai, E., Dhibi, M., Alimi, D., Rekik, M., B'chir, F., Maizels, R.M., & Akkari, H. (2018). Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. *Journal of Veterinary Parasitology*. **5**: 263:59-65.

Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatograph/mass spectrometry 4th ed. Carol Stream, USA: Allured Publishing Corporation.

AFNOR (1986) Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p

Ait Hamlet, S., Bensoltane, S., Djekoun, M. & Berrebbah, H. (2016). Evaluation of acetylcholinesterase, glutathione S-transferase and catalase activities in the land snail *Helix aspersa* exposed to thiamethoxam. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. **4(5)**: 369-374.

Akrout, A., Chemli R., Simmonds, M., Kite, G., Hammami, M., & Chreif, I. (2003). Seasonal variation of the essential oil of *Artemisia campestris* L., *Journal of Essential Oil Research*. **15(5)**: 333-336

Al Jahid, A., Essabaq, S., Elamrani, A., Blaghen, M., & Jamal Eddine, J. (2016). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and the Hydro-alcoholic Extract of *Artemisia campestris* L. Leaves from Southeastern Morocco. *Journal of Biologically Active Products from Nature*. **6(5-6)**: 393–405.

Ali, A.M. & Ibrahim, A.M.A. (2018). Castor and camphor essential oils alter hemocyte populations and induce biochemical changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. **21 (2)**: 631-637.

Ali, S.I., Gopalakrishnan, B., & Venkatesalu, V. (2018). Chicory (*Cichorium intybus*) and wormwood (*Artemisia absinthium*) extracts exhibit strong larvicidal activity against mosquito vectors of malaria, dengue fever, and filariasis. *Parasitology International*. **67** :781–786.

Al Jahid, A., Elamrani, A., Lahlou, F.A., Hmimid, F., Bourhim, N., Blaghen, M., & Eddine, J.J. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil isolated from the seeds of Moroccan *Artemisia campestris* L. *Journal of Essential Oil Research*. **20**: 375–384.

Al-Mekhlafi, F.A. (2018). Larvicidal, ovicidal activities and histopathological alterations induced by *Carum copticum* (Apiaceae) extract against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*. **25**: 52–56

Aloui, Z., Messaoud, C., Haoues, M., Neffati, N., Bassoumi, J.I., Essafi-Benkhadir, K.H., Boussaid, M., Guizani, I., & Karoui, H. (2016). Asteraceae *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* Essential Oils Trigger Apoptosis and Cell Cycle Arrest in *Leishmania infantum* Promastigotes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **12**: 1-15.

Amer, A. & Mehlhorn, H. (2006). Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* mosquitoes. *Parasitology Research*. **99**:478–490.

Ammar, S., Noui, H., Djamel, S., Madani, S., Maggi, F., Bruno, M., Romano, D., Pavela, R. & Benelli, G. (2020). Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides?. *Environmental Science and Pollution Research*. **27**: 26594-26604

Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, CP., & Rijo, P. (2018): *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry & biological activity. *Future Science OA*. **4(4)**: FSO283.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J.D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V. & Cabras, P. (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**: 3530-3535.

Aouati, A. (2016). Etude de la toxicité de certaines plantes sur les larves de *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae) Thèse de Doctorat. Université des frères Mentouri de Constantine.

Aouati, A. & Berchi, S. (2015). Larvicidal effect of *Marrubium vulgare* on *Culex pipiens* in eastern Algeria *Energy Procedia*. **74**:1026 – 1031

Arrese, E.L., Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Pennington, J. E., Tsuchida, K. & Ells, M.A. (2001). Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **31(1)**: 7-17.

Aziz, A.T., Alshehri, M.A., Panneerselvam, C., Murugan, K., Trivedi, S., Mahyoub, J.A., & Benelli, G. (2018). The desert wormwood (*Artemisia herba - alba*) – From Arabian folk medicine to a source of green and effective nanoinsecticides against mosquito vectors. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **180**: 225–234.

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

Bakchiche, B., Gherib, A., Bronze, M. R., & Ghareeb, M.A. (2019) Identification, Quantification, and Antioxidant Activity of Hydroalcoholic Extract of *Artemisia campestris* from Algeria. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. **16 (2)**:234-239.

Bakchiche, B., Gherib, A., Maatallah, M. & Miguel, M.G. (2014). Chemical composition of essential oils of *Artemisia campestris* and *Juniperus phoenicea* from Algeria. International Journal of Innovation and Applied Studies. **9**: 1434-1436.

Balasubramani, S., Sabapathi, G., Moola, A.K., Solomon, R.V., Venuvanalingam, P., & Bollipo Diana, R.K., 2018. Evaluation of the leaf essential oil from *Artemisia vulgaris* and its larvicidal and repellent activity against dengue fever vector *Aedes aegypti*-an experimental and molecular docking investigation. ACS Omega. **3 (11)**: 15657-15665.

Balenghien, T. (2007). Les moustiques vecteurs de la Fièvre du Nil Occidental en Camargue. Insectes. **146** :13-17.

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Dahl, C., Madon, M. & Kaiser, A. (2010). Mosquitoes and Their Control. 2nded. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Begum, A., Sandhya, S., ShaffathAli, S., Vinod, KR., Reddy, S., & Banji, D. (2013). An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. **12(1)**: 61–73

Belhattab, R., Boudjouref, M., Barroso, J.G., Pedro, L.P. & Figueirido, A.C. (2011). Essential oil composition from *Artemisia campestris* grown in Algeria. Advances in Environmental Biology. **5**: 429–432.

Bellomaria, B., Valentini, G. & Biondi, E. (2001). Chemotaxonomy of *Artemisia variabilis* Ten. and *A. campestris* L. ssp. *glutinosa* (Ten.) Briq. et Cavill. (Asteraceae) from Italy. Journal of Essential Oil Research. **13**: 90–94.

Ben Jemia, M., Tundis, R., Pugliese, A., Menichini, F., Senatore, F., Bruno, M., Kchouk, M.E. & Loizzo, M.R. (2014). Effect of bioclimatic area on the composition and bioactivity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils. Natural Product Research. **29(3)**: 213-222.

Bendali, F., Djebbar, F., & Soltani, N. (2001). Efficacité comparée de quelques espèces de poissons à l'égard de divers stades de *Culex pipiens* (L.) dans des conditions de laboratoire. Parasitica **57(4)**: 255-265.

Bouaziz, A., Boudjelida, H. & Soltani, N. (2011). Toxicity and perturbation of the metabolite contents by a chitin synthesis inhibitor in the mosquito larvae of *Culiseta longiareolata*. Annals of Biological Research. **2(3)**: 134-142.

Boudjelida, H., Bouaziz, A., Soin, T., Smagghe, G. & Soltani, N. (2005). Effects of ecdysone agonist halofenozide against *Culex pipiens*. Pesticide Biochemistry and Physiology. **83**:115–123.

Bouguerra, N. (2019). Efficacité comparée des extraits de deux plantes, *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* à l'égard d'une espèce de moustique, *Culex pipiens* Composition chimique, Toxicité, Biochimie et Biomarqueurs. Thèse de Doctorat Université de Tebessa. 143p

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

Bouguerra, N., Tine-Djebbar, F. & Soltani, N. (2018). Effect of *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae) Essential oil on energy reserves and biomarkers in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) from Tebessa (Algeria). Journal of Essential Oil Bearing Plants. **21:** 1082–1095

Boutekedjiret, C., Bentahar, F., Belabbes , R. & Bessiere , J. M.(2003).Extraction of rosemary essential oil by steam distillation and hydrodistillation. Flavour And Fragrance Journal. **18:** 481–484.

Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Ahmed, T., Fellah, H., Abrini, J. & Dakka, N. (2017). Chemical composition of *Menthapulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microbial Pathogenesis. **111:** 41-49.

Bouzidi, O (2021). Efficacité comparée d'une plante médicinale, *Laurus nobilis* à l'égard de deux espèces de moustiques, *Culiseta longiareolata* et *Culex pipiens*. Thèse Doctorat. Université de Tébessa 146p.

Bouzidi, O., Tine S., Hamaidia, K., Tine-djebbar, F. & Soltani, N. (2020). Chemical Composition and Bioefficacy of Essential Oil from Bay Laurel Shrub (Laurales: Lauraceae) against *Culiseta longiareolata* (Macquart) (Diptera: Culicidae) Larvae. Journal of Entomological Science. **55(2):** 262-272.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method of the quantitation microgram quantities of protein utilising the principle dye binding. analytic. Biochemistry **72:** 248–254.

Brey, T., Rumohr, H. & Anka, S. (1988). Energy content of macrobenthic invertebrates: general conversion factors from weight to energy. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. **117:** 271-278.

Briegel H. , Hefti M. & DiMarco E. (2002). Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. Journal of Insect Physiology. **48:** 547–554

Brunhes, J., Rhaim A., Geoffroy, B., Angel, G. & Hervy, J.-P. (2000). Les moustiques de l'Afrique méditerranéenne. Institut de recherche pour le développement IRD. Logiciel d'identification.

Carnevale, P. & Robert, V. (2009). Les anophèles Biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle. IRD Éditions Institut de Recherche Pour Le Développement. Marseille. 389p.

Castillo-Morales, R.M., Otero, A.L.C., Mendez-Sanchez, S.C., Da Silva, M.A.N., Stashenko, E.E., & Duque, J.E. (2019). Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* lar-

vae. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. **221**: 29–37.

Chaieb, I., Ben Hamouda, A., Tayeb, W., Zarrad K., & Bouslema, T. (2018). The Tunisian *Artemisia* Essential Oils for Reducing Contamination of Stored Cereals by *Tribolium castaneum*. Food Technology and Biotechnology., **56(2)**: 247-256.

Chalchat, J.C., Garry, R.P., Michet, A., Benjilali, B. & Chabart, J.L. (1993). Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain, France). Journal of Essential Oil Research. **5(6)**: 613-618.

Chalchat, J-C., Cabassu, P., Petrovic, S. D., Maksimovic, Z. A. & Gorunovic M. S. (2003). Composition of Essential Oil of *Artemisia campestris* L. from Serbia, Journal of Essential Oil Research. **15(4)**: 251-253.

Cheah, S.-X., Tay, J.-W., Chan, L.-K., & Jaal, Z. (2013). Larvicidal, oviposition, and ovicidal effects of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) against *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Parasitology Research. **112(9)**: 3275–3282.

Che-Mendoza, A., Penilla, R.P. & Rodríguez, D.A. (2009). Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. African Journal of Biotechnology. **8 (8)**: 1386-1397.

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.

Clark, AG. (1989). The comparative enzymology of GST from nonvertebrate organisms. Comparative Biochemistry & Physiology. **92**: 419-46

Coats, JR., Karr, LL., & Drewes, CD. (1991). Toxicity and neurotoxic effects of monoterpenoids in insects and earthworms. In: Hedin, P.A. (Ed.), Naturally Occurring Pest Bio-regulators, ACS Symposium Series. **449**:305-316.

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

Cuervo-Parra, J.A., Cortes, T.R. & Ramirez-Lepe, M. (2016). Mosquito-borne diseases, pesticides used for mosquito control, and development of resistance to insecticides. In: Trdan S, editor. Insecticides resistance. Rijeka: InTechOpen. 111–34.

Dahchar, Z., Bendali-Saoudi, F. & Soltani, N (2016). Larvicidal activity of some plant extracts against two mosquito species *Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata*. Journal of Entomology and Zoology Studies. **4**: 346-350.

Daniel, G .M., Mauricio, P.C., Vivian, B.N., Grasiela, O.B., André, C., Luis, E.B.B ., Agatha, O., Francis, L.P., Juliana, B.D., Edésio, L.S., Moacir, G.P., & Ana Lucia, S.R.

(2013). Antidepressant-like effects of fractions ,essential oil,carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus Officialis* L. Food Chemistry . **136**: 999-1005.

Depledge, M.H., (1994). The rationale basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Non destructive biomarkers in vertebrates, *in* : Fossi, M.C., Leonzio, C., Eds. Lewis Publishers, p. 271-296.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. Biochimica et Biophysica Acta. **1830** : 3217-3266

Derradji, H.F. (2013). composition chimique et activité insecticide de trois extraits végétaux à l'égard de *Sitophilus oryzae*(L) (Coleoptera : Curculionidae). Thèse de Magister. Ecole nationale supérieure agronomique. Algérie.92p

Devi, U. & Bora, D. (2017). Growth inhibitory effect of phenolic extracts of *Ziziphus jujuba* Mill. in dengue vector *Aedes aegypti* (L) in parent and F1 generation. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. **10(8)**: 787–791

Dhifi, W., Jilani, I.B.H., Bellili, S., Jazi, S., ElBeyrouthy, M., & Mnif, W. (2017). Essential oil chemical characterization and allelopathic Potential of *Artemisia campestris* L.growing in Tunisia. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences. **7**.302–305.

Dias, C.N. & Moraes, D.F.C. (2014). Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. Parasitology Research. **113**:565–592.

Dib, I., Angenot, L., Mihamou, A., Ziyat, A., & Tits, M. (2017a). *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. Journal of Herbal Medicine. **7**: 1-10.

Dib I. & El Alaoui-Faris F.E. (2019). *Artemisia campestris* L.: review on taxonomical aspects, cytogeography, biological activities and bioactive compounds. Biomedicine & Pharmacotherapy **109**: 1884–1906.

Dib, I., Fauconnier, M., Sindic, M., Belmekki, F., Assaidi, A., Berrabah, M., Mekhfi, H., Aziz, M., Legssyer, A., Bnouham, M., & Ziyat, A. (2017b). Chemical composition, vasorelaxant, antioxidant and antiplatelet effects of essential oil of *Artemisia campestris* L. from Oriental Morocco. BMC Complementary and Alternative Medicine. **17(1)**:82.

Djeghader, N.E.H., Boudjelida, H., Bouaziz, A. & Soltani, N. (2013). Biological effects of a benzoylphenylurea derivative (Novaluron) on larvae of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Advances in Applied Science Research. **4(4)**:449-456.

Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Vidal N., Lesgards J., & Stocker P., (2007). Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. European Food Research and Technology. **224**: 801-809.

Dob, T., Dahmane, D., Berramdane, T. & Chelghoum, C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria . *Pharmaceutical Biology*. **43**: 512–514.

Dris, D. (2018). Etude de l'activité larvicide des extraits de trois plantes : *Mentha piperita*, *Lavandula dentata* et *Ocimum basilicum* sur les larves de deux espèces de moustiques *Culex pipiens* (Linné) et *Culiseta longiareolata* (Aitken).Thèse de doctorat. Université Annaba. 140p

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

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

Duchateau, G. & Florkin, M.(1959). Sur la tréhalosémie des insectes et sa signification. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. **67**: 306–314.

Dutra, K., Wanderley-Teixeira, V., Guedes, C., Cruz, G., Navarro,D., Monteiro, A., Agra, A., Neto,C. L. & Teixeira, A. (2020). Toxicity of Essential Oils of Leaves of Plants from the Genus *Piper* with Influence on the Nutritional Parameters of *Spodopterafrugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. **23(2)**: 213-229.

Ebadollahi, A. (2013). Plant essential oil from Apiaceae family as alternatives to conventional insecticides. *Ecologia Balkanica*. **5(1)**:149-172.

Elamrani, A., Zrira, S., Benjilali, B. & Berrada, M. (2000). A Study of Moroccan Rosemary oils. *Journal of Essential Oil Research*.**12 (4)**: 487-495.

El-Bokl, M. M.(2016) .Toxicity and bioefficacy of selected plant extracts against the mosquito vector *Culex pipiens* L.(Diptera: Culicidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. **4(2)**: 483-488.

El-Ghaban, AG., Eldiasty, JG. & Kamel, O.M.H.M. (2015). Evaluation of *rosmarinus* species extracted by different solvents against mosquito larvae, *biomophalaria* species and different pathogenic bacteria. *Journal of Advanced Scientific Research*. **6(4)**: 44-49.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology Journal*. **7** : 88-95.

Enayati, A.A., Ranson, H. & Hemingway J. (2005). Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology*. **14**: 3–8.

Erel, B , S., Reznicek, G., Senol, S.G., Nefise, Ulku, K.Y. & Zeybek, A.U. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. *Turkish Journal of Biology*. **36**: 75-84

Evergetis, E., Michaelakis, A. & Haroutounian, S.A. (2013). Exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and rich source of phellandrenes. *Industrial Crops and Products*.**41**: 365-370.

Faraj, C., Elkohli, M. & Lyagoubi M. (2006). Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Entomologie médicale. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*. **99(2)** :119-121.

Farjana, T. & Tuno, N. (2013). Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*. **50(4)**:838-846.

Felix, S.F., Rodrigues, A.M., Rodrigues, A.L.M., de Freitas, J.C.C., Alves, D.R., da Silva, A.A., dos Santos, D.L., de Oliveira, K.R.L., Montes, R.A., da Silva, M.V.F., da Silva Lopes, F.F., & de Moraes, S.M. (2021). Chemical Composition, Larvicidal Activity, and Enzyme Inhibition of the Essential Oil of *Lippia grata* Schauer from the Caatinga Biome against Dengue Vectors. *Pharmaceuticals*. **14**: 250.

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

Freitas, F.P., Freitas, S.P., Lemos, G.C., Vieira, I.J., Gravina, G.A. & Lemos, F.J. (2010). Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. *Chemistry & Biodiversity*. **7**:2801–2807.

Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A. & Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*. **102**:898–904.

Gamil, W.E., Mariy, F.M., Youssef, L. A. & Abdel Halim, S. M. (2011). Effect of In-doxacarb on some biological and biochemical aspects of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Annals of Agricultural Sciences*. **56(2)**: 121–126.

Ghorab, H., Laggoune, S., Kabouche, A., Semra, Z. & Kabouche, Z. (2013). Essential oil composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* L. from khenchela (Algeria). *Der Pharmacia Lettre* **5**: 189–192.

Ghosh, A., Chowdhury, N. & Chandra, G. (2012). Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian Journal of Medical Research*. **135**:581–598

Giatropoulos, A., Kimbaris, A., Michaelakis, A., Papachristos, D.P., Polissiou, M.G. & Emmanouel, N. (2018). Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedesalbopictus*. *Parasitology Research*. **117(6)**: 1953-1964.

Gillij, Y.G., Gleiser, R.M. & Zygadlo, J.A. (2008). Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Bioresource Technology*.**99**. 2507–2515.

Gnanamani, R. & Dhanasekaran, S. (2017). Efficacy of Azadirachta Indica Leaf Extract on the Biochemical Estimation of a Lepidopteran Pest *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae). World Applied Sciences Journal. **35** (2): 177-181.

Goddard, J. (2007). Physician's guide to Arthropods of medical importance. 5th ed .CRC Press.

Goldsworthy, A.C., Mordue, W. & Guthkelch, J. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. General and Comparative Endocrinology. **18**: 306–314.

Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Diaz, C.E., Fraga, B.M. & Santana-Meridas, O. (2013). Natural Product-Based Biopesticides for Insect Control. In: Reedijk, J. (Ed.) Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier.

Govindarajan, M., & Benelli, G. (2016). Artemisia absinthium-borne compounds as novel larvicides: effectiveness against six mosquito vectors and acute toxicity on non-target aquatic organisms. Parasitology Research. **115**(12): 4649–4661.

Grant, D.F. & Matsumura, F. (1989). Glutathione S-transferase 1 and 2 in susceptible and insecticide resistant *Aedes aegypti*. Pesticide Biochemistry and Physiology. **33**:132–138.

GraphPad Software (2018). GraphPad Prism version.7 Software for windows. La Jolla California USA.

Gray, E.M. & Bradley, T.J. (2003). Metabolic rate in female *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae): Age, size, activity, and feeding effects. Journal of Medical Entomology. **40**: 903–911

Guenez, R. (2020). Contribution à l'étude de l'activité larvicide des extraits de certaines plantes sur les larves de trois espèces de moustiques *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas) et *Culiseta longiareolata* (Aitken). Thèse de doctorat. Université Annaba. 116p

Guenez, R., Tine-Djebbar, F., Tine, S. & Soltani, N. (2018). Larvicidal Efficacy of *Menthapulegium* essential oil against *Culex pipiens* L. and *Aedescaspius* P. Larvae. World Journal of Environmental Biosciences. **7**(1):1-7.

Habig, W.H., Pabst, M.J. & Jakoby, W.B. (1974). Glutathione Stransferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry. **249**: 7130–7139

Hamaidia, K. & Soltani, N. (2016). Ovicidal activity of an insect growth disruptor (methoxyfenozide) against *Culex pipiens* L. and delayed effect on development. Journal of Entomology and Zoology Studies. **4**: 1202–1207.

Hamaidia, K., Tine-Djebbar, F. & Soltani, N. (2018). Activity of a selective insecticide (methoxyfenozide) against two mosquito species (*Culex pipiens* and *Culiseta longiareolata*): toxicological, biometrical and biochemical study. Physiological Entomology. **43**: 315–323.

Hamaidia, K. & Soltani, N. (2014). Laboratory evaluation of a biorational insecticide, ki-

noprene, against *Culex pipiens* larvae: effects on growth and development. Annual Research & Review in Biology. **4**: 2263–2273

Hamaidia, K. & Soltani, N. (2019). Compensation of kinoprene effect on reproduction of *Culex pipiens* by methoxyfenozide, an ecdysone agonist. Journal of Entomological Research. **43 (2)**: 125–130.

Hameed, IH. & Mohammed, GJ. (2017). Phytochemistry, antioxidant, antibacterial activity, and medicinal uses of aromatic (medicinal plant *Rosmarinus officinalis*). In Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature. El-Shemy H (Ed). In Tech open, London. England. p 175-189.

Hasaballah A. I. (2015). Toxicity of some plant extracts against vector of lymphatic filariasis, *Culex pipiens*. Journal of the Egyptian Society of Parasitology. **45(1)**: 185 -194.

Hazarika, H., Tyagi, V., Krishnatreyya, H., Kishor, S., Karmakar, S., Bhattacharyya, D.R., Zaman, K. & Chattopadhyay, P. (2018). Toxicity of essential oils on *Aedes aegypti*: A vector of chikungunya and dengue fever. International Journal of Mosquito Research. **5(3)**: 51-57

Houicher, A., Hechachna, H., Ozogul, F. (2016). In Vitro Determination of the antifungal activity of *Artemisia campestris* essential oil from Algeria. International Journal of Food Properties. **19**: 1749–1756.

Huang, Y., Lin, M., Jia, M., Hu, J. & Zhu, L. (2019). Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes* mosquitoes of essential oils from *Arisaema fargesii*. Pest Management Science. **76(2)**: 534-542.

Intirach, J., Junkum, A., Lumjuan, N., Chaithong, U., Somboon, P., Jitpakdi, A., Riyong, D., Champakaew, D., Muangmoon, R., Chansang, A. and Pitasawat, B. (2019). Biochemical Effects of *Petroselinum crispum* (Umbelliferae) Essential Oil on the Pyrethroid Resistant Strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Insects. **10**: 1.

Isman, MB. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection. **19**: 603-608.

Janačković, P., Rajčević, N., Gavrilović, M., Novaković, J., Giweli, A., Stešević, D., & Marin, P. D. (2019). Essential oil composition of five *Artemisia* (Compositae) species in regards to chemophenetics. Biochemical Systematics and Ecology, **87**, 103960.

Jawad A-L. (2007). Activity determination of plant extracts in the control of cyanobacteria. Iraqi Journal of Aquaculture. **1** : 17-24.

Jordan, M.J., Lax V., Martínez, C., Aouissat, M. & Sotomayor J.A. (2011). Chemical intraspecific variability and chemotype determination of *Rosmarinus officinalis* L. in the Region of Murcia. Proc. XXVIIIth IHC – IHC Seminar: A New Look at Medicinal and Aromatic Plants Eds.: Mathé Á. et al. Acta Hort. 925, ISHS.

Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Loran, S. & Sotomayor, J.A. (2013). Effect of bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. Food Control. **30**: 463-468.

Judzentiene, A. & Budiene, J. (2014). Variability of *Artemisia campestris* L. essential oils from Lithuania. *Journal of Essential Oil Research*. **26**: 328–333.

Kalinina, E.V., Chernov, N.N. & Novichkova M.D. (2014). Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. *Biochemistry (Moscow)*. **79(13)**: 1562-1583.

Karmegam N., Sakthivadivel M., Anuradha V., & Daniel T. (1997). Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* say. *Bio resource Technology*. **59** .137-140.

Kasparavičienė, G., Ramanauskienė, K., Savickas, A., Velžienė, S., Kalvėnienė, Z., Kazlauskienė, D. et al. (2013). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity of different *Rosmarinus officinalis* L. ethanolic extracts. *Biologia*. **59** : 39-44

Kharoubi, R., Rehim, N. & Soltani, N. (2020). Essential oil from *Mentharotundifolia* harvested in Northeast Algeria: Chemical Composition, Larvicidal and Enzymatic Activities on *Culex pipiens* larvae. *Transylvanian Review*. **27 (47)**: 14724-14732.

Khosravi, R., Jalali Sendi, J., Ghadamyari, M. & Yazdani, E. (2011). Effect of sweet wormwood *Artemisia annua* crude leaf extracts on some biological and physiological characteristics of the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. *J. Insect Science*. **11**: 156.

Kim, N.J., Byun, S.G., Cho, J.E., Chung, K. & Ahn, Y.J. (2008). Larvicidal activity of *Kaempferiagalanga* rhizome phenylpropanoids towards three mosquito species. *Pest Management Science*. **64**:857–862

Kim, S.-W., Kang, J., & Park, I.-K. (2013). Fumigant toxicity of Apiaceae essential oils and their constituents against *Sitophilus oryzae* and their acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **16(4)**: 443–448.

Kimbaris, A.C., Koliopoulos, G., Michaelakis, A. & Konstantopoulou M.A. (2012). Bioactivity of *Dianthus caryophyllus*, *Lepidium sativum*, *Pimpinella anisum*, and *Illicium verum* essential oils and their major components against the West Nile vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*. **111**:2403–2410.

Kinnear, J.F. & Thomson, J.A. (1975). Nature, origin and fate of major haemolymph proteins in *Calliphora*, *Insect Biochem*. **5 (5)**: 531-552 .

Kiran, SR. & Devi, PS. (2007). Evaluation of mosquitocidal activity of essential oil and sesquiterpenes from leaves of *Chloroxylon swietenia* DC. *Parasitology Research*. **101** : 413-8.

Kiran, S. & Prakash, B. (2015). Assessment of toxicity, antifeedant activity, and biochemical responses in stored-grain insects exposed to lethal and sublethal doses of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **63 (48)** : 10518-10524.

Kiran, S., Kujur, A., Patel, L., Ramalakshmi, K. & Prakash, B. (2017). Assessment of toxicity and biochemical mechanisms underlying the insecticidal activity of chemically

characterized *Boswellia carterii* essential oil against insect pest of legume seeds. Pesticide Biochemistry and Physiology Journal. **139** : 17-23.

Kosaka, K. & Yokio, T. (2003). Carnosic Acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), Promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. Biological and Pharmaceutical Bulletin. **26 (11)** : 1620 -1622

Lafri, I., Hachid, A. & Bitam, I. (2019). West Nile virus in Algeria: a comprehensive overview. New Microbe and New Infect. **27**: 9–13.

Lagunez-rivera, L. (2006). Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de doctorat, institut national polytechnique de Toulouse, France. 335 p

Lakusic, D.V., Ristic, M.S., Slavkovska, V.N., Sinzar-Sekulic, J.B. & Lakusic, B.S. (2012). Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. Chemistry & Biodiversity. **9**: 1286- 1302.

Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S. & Chemat, F. (2014). Essential Oils as Insecticides. In: Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Springer Briefs in Molecular Science. Springer, Cham. pp 41-53.

Linné C. 1857. Systema naturae per regna fria naturae. Edition 10. Holmia. (1): 82 p

Linthicum, K.J., Anyamba, A., Chretien, J.P., Small, J., Tucker, C.J. & Britch, S.C. (2010). The Role of Global Climate Patterns in the Spatial and Temporal Distribution of Vector-Borne Disease. In Atkinson PW (Ed.) Vector Biology, Ecology and Control, Springer Science and Business Media. pp 3-14.

Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., & Schettino, T. (2003). Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin. **46(3)**: 324–330.

Lis, A & Kowal, M. (2015). Constituents of the essential oils from different organs of *Artemisia campestris* L. subsp. *campestris*. Journal of Essential Oil Research. **27**: 545–550

Liu, J., Fernandez, D., Gao, Y., Silvie, P., Gao, Y. & Dai, G. (2020). Enzymology, Histological and Ultrastructural Effects of Ar-Turmerone on *Culex pipiens pallens* Larvae. Insects. **11**:336..

Madaci, B., Merghem, R., Doumandji, B. & Soltani, N. (2008). Effet du *Nerium oleander*, laurier-rose, (Apocynaceae) sur le taux des protéines, l'activité de l'AChE et les mouvements des vers blancs *Rhizotrogini*, (Coleoptera : Scarabaeidae). Science et Technologie. **27**: 73-78.

Martinez-Torres, D., Chandrae, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. & Pauron, D. (1998). Molecular characterization

of pyrethroid knock down resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*. **7**:179-184.

Masotti, V., De Jong, L., Moreau, X., Rabier, J., Laffont-Schwob, I., Thiéry, A. (2012). Larvicidal activity of extracts from *Artemisia* species against *Culex pipiens* L. Mosquito: Comparing endemic versus ubiquitous species for effectiveness, *Comptes Rendus Biologies* **335**: 19–25.

Merabti, B., Lebouz, I. & Ouakid M.L. (2017). Larvicidal activity and influence of azadirachtin (Neem Tree Extract) on the longevity and fecundity of mosquito species. *Acta Zoologica Bulgarica*. **69 (3)**: 429-435.

Michaelakis, A., Koliopoulos, G., Milonas, P., Kontodimas, D., Polissiou, M., Kimbaris, A.C. & Papachristos, D. (2008). Activity of non-oxygenated versus oxygenated monoterpenes against mosquitoes. An attempt to correlate toxicity with chemical structure. In: 7th Joint Meeting of AFERP, GA, PSE& SIF. Natural Products with Pharmaceutical, Nutritional, Cosmetic and Agrochemical Interest, Athens, Greece.

Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A. & Polissiou, M.G. (2009). Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. **105**:769–773.

Michel, J., AbdRani, N.Z. & Husain, K. (2020). A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Pharmacology*. **11**: 852.

Momtaz, S., & Abdollahi, M. (2008). A Systematic Review of the Biological Activities of *Satureja* L. Species. *Pharmacologyonline* **2**: 34–54

Mucciarelli, M., Caramiello, R., Maffei, M., & Chialva, F. (1995). Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour and Fragrance Journal*. **10(1)** : 25–32.

Mutalib, L.Y. (2015). Comparison between conventional and modern methods for extraction of *Rosmarinus officinalis* leaves. *Zanco Journal of Medical Sciences*. **19(2)**:1029-1034.

Napoli, E.M., Curcuruto, G. & Ruberto, G. (2010). Screening of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary. *Biochemical Systematics and Ecology*. **38**: 659–670.

Nath, B.S., Suresh, A., Mahendra, V.B. & Kumar, R.P. (1997). Changes in protein metabolism in haemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L., in response to organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **36**: 169–173.

Navarro, M.J., Laguerre, M., Fabiano-Tixier, A.S., Tenon, M., Feuillère, N., Bily A. & Chemat, F. (2017). What is the best ethanol-water ratio for the extraction of antioxidants from rosemary? Impact of the solvent on yield, composition and activity of the extracts. *Electrophoresis*. p :1-18.

Nawaz, H., Shad, M.A., Rehman, N., Andaleeb H. & Ullah N. (2020.) Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* **56**:e17129

Neffati, A., Skandrani, I ., Ben Sghaier, M ., Bouhleb, I ., Kilani, S. & Ghedira, K. (2008). Chemical Composition, Mutagenic and Antimutagenic Activities of Essential Oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *Journal of Essential Oil Research.* **20** : 471-477.

Ninditya, VI., Purwati, E., Utami, AT., Marwaningtyaz, AS., Fairuz, NK., Widayanti, R. & Hamid, PH. (2020) *Artemisia vulgaris* efficacies against various stages of *Aedes aegypti*, *Veterinary World.* **13(7)**: 1423-1429

Ogden, N.H. (2017). Climate change and vector-borne diseases of public health significance. *FEMS Microbiology Letters.* **364**: 19.

Okoh, OO., Sadimenko, AP. & Afolayan, AJ. (2010). Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. Obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. *Food Chemistry.* **120**:308–312

OMS (2005). Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides..**13**: 7-20.

OMS (2017). Global vector control response 2017–2030. World Health Organization. Geneva, Switzerland

Osanloo, M., Amani, A., Sereshti, H., Abai, M.R., Esmaili, F., & Sedaghat, M.M. (2017). Preparation and optimization nanoemulsion of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) essential oil as effective herbal larvicidal against *Anopheles stephensi*. *Industrial Crops and Products.* **109**: 214–219.

Outaleb, T., Hazzit, M., Ferhat, Z., Baaliouamer, A., Yekkour, A., Zitouni, A. & Sabaou, N. (2015). Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Algerian *Rosmarinus officinalis* L. Extracts. *Journal of Essential Oil Bearing Plants.* **18(3)**: 654-665

Pandir, D. & Baş, H. (2016). Compositional analysis and toxicity of four plant essential oils to different stages of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) *Türkiye Entomoloji Dergisi.* **40 (2)**: 185-195.

Papageorgiou, V., Gardeli, C., Mallouchos, A., Papaioannou, M. & Komaitis, M. (2008). Variation of the Chemical Profile and Antioxidant Behavior of *Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Miller Grown in Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **56**: 7254–7264.

Pavela, R. (2009a). Larvicidal effects of some Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research.* **105 (3)**: 887–892.

Pavela, R. (2009b). Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products.* **30**: 311–315.

- Pavela, R. (2015).** Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Parasitology Research*. **114(10)**:3835-53
- Pavela, R. & Benelli G. (2016).** Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*. **21(12)**: 1000–1007.
- Pereira, S.I., Santos, P.A.G., Barroso, J.G., Figueiredo, A.C., Pedro, L.G., Salgueiro, L.R., Deans, S.G. & Scheffer, J.J.C. (2000).** Chemical polymorphism of the essential oils from populations of *Thymus caespititius* grown on the island S. Jorge (Azores). *Phytochemistry*. **55**: 241-246.
- Perumalsamy, H., Kim, J-R., Oh, S.M., Jung, J.W., Ah, Y-J. & Kwon, H.W. (2013).** Novel Histopathological and Molecular Effects of Natural Compound Pellitorine on Larval Midgut Epithelium and Anal Gills of *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* **8(11)**: e80226.
- Procópio, T.F., Fernandes, K.M., Pontual, E.V., Ximenes, R.M., de Oliveira, A.R.C., Souza, C.D.S., Melo, A.M.M.A., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., Martins, G.F. and Napoleão T.H. (2015).** *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS ONE*. **10(5)**: e0126612.
- Quezel & Santa S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, CNRS, Paris. 793 p.
- Radwan, M.A., El-Zemity, S.R., Mohamed, S.A. & Sherby, S.M. (2008).** Larvicidal activity of some essential oils, monoterpenoids and their corresponding N-methyl carbamate derivatives against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *International Journal of Tropical Insect Science*. **28(2)**:61–68.
- Ranson, H., & Hemingway, J. (2005).** Mosquito Glutathione Transferases. In *Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases* Helmut Sies, Lester Packer(Eds). *Methods in Enzymology*. **401**: 226–241.
- Raskovic, A., Milanovic, I., Pavlovic, N., Čebovic, T., Vukmirovic, S. & Mikov, M. (2014).** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. **14**:225.
- Rattan, R. S. (2010).** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, **29(9)**, 913–920.
- Rehimi, N. & Soltani, N. (1999).** Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae): effects on development and cuticle secretion. *Journal of Applied Entomology*. **123**: 437-441.
- Rehman, J.U., Ali, A. & Khan, I. A. (2014).** Plant based products: use and development as repellents against mosquitoes: A review. *Fitoterapia*. **95**:65–74.
- Ryan, M.F. & Byrne, O. (1988).** Plant-insect coevolution and inhibition of acetylcholinesterase. *Journal of Chemical Ecology*. **14**: 1965–1975

Sahayaraj, K. (2014). Modulation of Botanicals on Pest's Biochemistry. In Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology. (1):57 – 74.

Santos, S.R.L., Melo M.A., Cardoso A.V., Santos R. L.C. & Sousa, D.P. (2011). Structure–activity relationships of larvicidal monoterpenes and derivatives against *Aedes aegypti* Linn. Chemosphere **84**: 150–153

Seghier, H., Tine-Djebbar, F., Loucif-Ayad, W. and Soltani, N. (2020). Larvicidal and Pupicidal Activities of *Petroselinum Crispum* Seed Essential Oil on *Culex Pipiens* and *Culiseta Longiareolata* Mosquitoes. Transylvanian Review.**27 (47)**:14669-14675.

Seidel, V. (2005). Initial and Bulk Extraction. From: Methods in Biotechnology, Vol. 20, Natural Products Isolation, 2nd ed. Edit; Sarker, S.D., Latif, Z. and A. I. Gray _ Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Senthilkumar, N., Varma, P. & Gurusubramanian G (2009). Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the malarial vector, *Anopheles stephensi* (Liston). Parasitology Research.**104**:237–44

Seo, S-M., Kim, J., Lee, S-G., Shin, C-H., Shin, S-C & Park, I-K. (2009). Fumigant anti-termite activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*), caraway (*Carum carvi*), dill (*Anethum graveolens*), geranium (*Pelargonium graveolens*), and litsea (*Litsea cubeba*) oils against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). Journal of Agricultural and Food Chemistry. **57**:6596–6602

Seo, S.M., Jung, C.S., Kang, J., Lee, H.R., Kim, S.W., Hyun, J. & Park, I.K. (2015). Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activity of apiaceae plant essential oils and their constituents against *Aedes albopictus* and formulation development. Journal of Agricultural and Food Chemistry. **63**: 9977–9986

Shalan, E., Canyon, D.V., Faried, M.W., Abdel-Wahab, H. & Mansour, A. (2005). A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environment International. 31: 1149–1166.

Shahat, M.A.M. , El-sheikh T.M.Y, Hammad, K.M., Hasaballah, A.I. & Shehata, A.Z.I. (2020). Effect of Some Plant Extracts on The Biochemical Parameters, AChE and GST Activities of The Mosquito, *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) . Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. **12(2)**: 69 – 80

Shalaby, A.A. & Khater, H.F. (2005). Toxicity of certain solvent extracts of *Rosmarinus officinalis* against *Culex pipiens* larvae. Journal of Egyptian German Society of Zoology. (48E): 69- 80

Sharma P, Mohan L, Srivastava CN. (2006). Phytoextract-induced developmental deformities in malaria vector. Bioresource Technology. **97** : 1599-604.

Sharma, G., Kapoor, H., Chopra, M., Kumar, K., & Agrawal, V. (2014). Strong larvicidal potential of *Artemisia annua* leaf extract against malaria (*Anopheles stephensi* Liston)

and dengue (*Aedes aegypti* L.) vectors and bioassay-driven isolation of the marker compounds. *Parasitology Research*, 113(1), 197- 209. doi:10.1007/s00436-013-3644-4

Sharma, P., Mohan, L., Dua, K.K. & Srivastava, C.N. (2011). Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **4**: 301–304.

Shibko, S., Koivistoinen, P., Tratnyek, C.A., Newhall, A.R. & Friedman, L. (1966). A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytical Biochemistry*. **19(3)**: 514-528.

Shojaei, A., Talebi, K., Sharifian, I. & Ahsaei, S.M. (2017). Evaluation of detoxifying enzymes of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidae) exposed to essential oil of *Artemisia dracunculus* L. *Biharean Biologist*. **11 (1)**: 5-9

Shoukry, I.F., Khlaf, A.A., Hussein, T.H. & Khater, K.S. (2003). Toxicological evaluation of some botanical oils on biochemical aspects in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* H.B. (Lepidoptera: Pyralidae). *Egyptian Journal of Biology*. **5**:155–163

Shu, Z., Shahen M., Hegazi, M.A.M., Al-Sharkaw, I.M. & Seif, A.I. (2018). Physiological response of *Culex pipiens* larvae to sublethal concentrations of sodium and calcium hypochlorite. *Journal of Environmental Biology*. **(39)**. 314-323

Singletary, K. (2016). Rosemary an Overview of Potential Health Benefits. *Nutrition Today*. **51**: 2.

Soltani, N., Rehim, N., Drardja, H. & Bendali. F. (1999). Activité du triflumuron à l'égard de *Culex pipiens* et impacts sur deux espèces larvaires non visées. *Annales de la Société entomologique de France*. **35**: 59–64.

Sukumar, K., Perich, M.J. & Boobar L.W. (1991). Botanical derivatives in mosquito control: a review. *Journal of American Mosquito Control Association* **7**:210-237

Tabanca, N., Tsikolia, M., Ozek, G., Ozek, T., Abbas, A., Bernier, U.R., Duran, A., Baser, K.H. & Khan, I.A. (2016). The identification of suberosin from *Prangos pabularia* essential oil and its mosquito activity against *Aedes aegypti*. *Records of Natural Products*. **10**:311–325

Taktak, N.E.M., & Badawy, M. E. I. (2019). Potential of hydrocarbon and oxygenated monoterpenes against *Culex pipiens* larvae: Toxicity, biochemical, pharmacophore modeling and molecular docking studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **158**: 156–165.

Thomas, S.J., Martinez, L.J. & Endy, T.P. (2014). Flaviviruses: Yellow Fever, Japanese B, West Nile, and Others. In: Kaslow R., Stanberry L., Le Duc J. (eds) *Viral Infections of Humans*. Springer, Boston, MA.

Tigrine-Kordjani, N., Meklati, B.Y., Chemat, F. & Guezil, F.Z. (2012). Kinetic investigation of rosemary essential oil by two methods: solvent-free microwave extraction and hydrodistillation. *Food Anal Methods*. **5**:596–603.

Timmermann, S.E. & Briegel, H. (1998). Molting and metamorphosis in mosquito larvae: a morphometric analysis. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*. **71**: 373-87.

Tine-Djebbar, F. & Soltani N. (2008). Activité biologique d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue sur *Culiseta longiareolata* : analyses morphométrique, biochimique et énergétique. *Synthèse*. **18**:23-34.

Tine-Djebbar, F., Bouabida, H. & Soltani, N. (2016). Répartition spatio-temporelle des culicidés dans la région de Tébessa. Editions Universitaires Européennes.

Touafek, O., Nacer, A., Kabouche, A., Kabouche, Z. & Bruneau, C. (2004). Chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* cultivated in the Algerian Sahara. *Chemistry of Natural Compounds*. **40 (1)**: 28-29.

Touil, S., Benrebiha, F Z. & Hadj sadok ,T (2017). influence of seasonal variation on chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of field wormwood *artemisias campestris*. *Revue Agrobiologia*. **7(2)**: 502-511

Trabousli, A.F., Taoubi, K., EI-Haj, S., Bessiere, J. & Rammal, S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science* **58**:491–495.

Tripathy, A., Samant, A.L., Das, S., Parida S.K., Marai, N., Hazra, R.K., Mallavdani, U.V., Kar, S.K. & Mahapatra, N. (2011). The Mosquitocidal Activity of Methanolic Extracts of *Lantana camara* Root and *Anacardium occidentale* Leaf: Role of GlutathioneS-Transferase in Insecticide Resistance. *Journal of Medical Entomology*. **48(2)**:291-295

Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., Cicero, N., Gervasi, T., Virga, G., Leone, R., Licata, M. & La Bella, S. (2015). Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Natural Product Research*. **29(20)**:1928-34.

Van Handel, E. (1972). Simple biological and biochemical methods to determine the caloric reserves of mosquitoes. *Mosquito News*. **32(4)**:589-591.

Vourlioti-Arapi, F., Michaelakis, A., Evergetis, E., Koliopoulos, G. & Haroutounian, S.A. (2012). Essential oils of endemic in Greece six *Juniperus* taxa: Chemical composition and larvicidal activity against the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasitology Research*. **110**: 1829–1839.

Waliwitiya, R., Kennedy CJ. & Lowenbergern CA. (2009) Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science*. **65**: 241–248.

Weckberker, G. & Cory, J.G. (1988). Ribonucleotide reductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L1210 cells in vitro. *Cancer Letters*. **40**: 257-264.

- Wiens, A.W. & Gilbert, T. (1968).** Regulation of carbohydrate mobilization utilization in *Leucophaea maderae*. *Journal of Insect Physiology*, **13**: 779-794.
- Yazina, H. (2010).** Etude et biomasse du romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) dans le massif des Beni-Imloul-aures-Algerie. *Forest Science*. (3):25-42.
- Yu, J., Liu, X.Y., Yang, B., Wang, J., Zhang, F.Q., Feng, Z.L., Wang, C.Z. & Fan, Q.S. (2013).** Larvicidal activity of essential extract of *Rosmarinus officinalis* against *Culex quinquefasciatus*. *Journal of American Mosquito Control Association*. **29 (1)**:44-48
- Yu, S.J. (1996).** Insect glutathione-s-transferase. *Zoological Studies*. **35**:9–19.
- Zahran, H.A. & Abdelgaleil, S.A.M. (2011).** Insecticidal and developmental inhibitory properties of monoterpenes on *Culex pipiens L.* (Diptera: Culicidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. **14**: 46–51.
- Zahran, H.M., Abou-Taleb, H.K. & Abdelgaleil, S.A.M. (2017).** Adulticidal, larvicidal and biochemical properties of essential oils against *Culex pipiens L.* *Journal of Asia-Pacific Entomology*. **20**:133-139.
- Zaouali, Y., Bouzaine, T. & Boussaid, M. (2010).** Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis L.* varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 3144–3152.
- Zarrad, K., Hamouda, A.B., Chaieb, I., Laarif, A. & Jemaa, J.M. B. (2015).** Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the tunisian *Citrus aurantium L.* essential oils. *Industrial Crops and Products*. **76**, 121–127.
- Zcan, M.M.O. & Chalchat, J.C. (2008).** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) oil from Turkey. *International Journal of Food Science and Nutrition*. **59(7-8)**: 691-698.
- Zendehdel, M., Beizaee, S., Taati, M. & Bashiri, A. (2011).** Antinociceptive mechanisms of *Rosmarinus officinalis* extract in mice using writhing test. *International Journal of Veterinary Research*. **5(4)**: 240-246.
- Zibae, A. (2011).** Botanical insecticides and their effects on insect biochemistry and immunity, *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. Stoytcheva M.(Ed.). ISBN: 978-953-307-457-3, InTech.
- Zibae, A. & Bandani, A.R. (2010).** A study on the toxicity of a medicinal plant, *Artemisia annua L.* (Asteracea) extracts to the sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *Journal of Plant Protection Research*. **50**:79–85.
- Zouaoui, N., Chenchouni, H., Bouguerra, A., Massouras, T. & Barkat, M. (2020)** Characterization of volatile organic compounds from six aromatic and medicinal plant species growing wild in North African drylands. *Nutrition and Food Science Journal*. **18**: 19–28
- Zoubiri, S. & Baaliouamer, A. (2011).** Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chemistry*. **129** :179–182

ANNEXE

ANNEXE

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PUBLICATIONS

1. **ZEGHIB F**, TINE-DJEBBAR F, ZEGHIB A, BACHARI K, SIFI K & SOLTANI N (2020) Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil Against West Nile Vector Mosquito *Culex pipiens* (L.), Journal of Essential Oil-Bearing Plants. **23(6)**:1463-1474.DOI: 10.1080/0972060X.2020.1860138

COMMUNICATIONS ORALES

1. **ZEGHIB F**, ZEGHIB A, HIOUN S, MANSOURI F-Z, MESSABHIA H, TINE-DJEBBAR F & KABOUCHE Z. Preliminary investigation of larvicidal effect of hydroethanolic extract from *Rosmarinus officinalis* L. on the early 4th instar larvae of *Culex pipiens* (Linné). Third International Symposium: Medicinal Plants and Materials (MPM-2020). 25-27 February 2020, Tebessa, ALGERIE.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

1. **ZEGHIB F**, ZEGHIB A, BOUMEDJERIA T, GUENEZ R, HIOUN S, TINE-DJEBBAR F & KABOUCHE Z. preliminary investigation of larvicidal effect of *Rosmarinus officinalis* L. polar extracts on the early 4th instar larvae of *Culex pipiens* (Linné). Premier Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie, 4-6 Février **2019**, Université Mostefa Ben Boulaid (Batna 2), Batna, ALGERIE.
2. ZEGHIB A, **ZEGHIB F**, KOURDES H, MELKIA E, HIOUN S, TINE-DJEBBAR F & KABOUCHE Z. Preliminary investigation of larvicidal effect of *Artemisia campestris* L. polar extracts on the early 4th instar larvae of *Culex pipiens* (Linné). Premier Colloque International sur la Lutte Biologique et Intégrée en Algérie, 4-6 Février **2019**, Université Mostefa Ben Boulaid (Batna 2), Batna, ALGERIE.
3. **ZEGHIB F**, ZEGHIB A, AHCENE H, BERRAH F, BOUABIDA H & TINE-DJEBBAR F. Mosquito larvicidal activities of *Rosmarinus officinalis* essential oil against *Culex pipiens* (L.) (Diptera : Culicidae). 1er séminaire national en Biologie-Santé et stress oxydant (BSSO), 9-10 Novembre **2016**, Tébessa, ALGERIE.



Chemical Composition and Larvicidal Activity of *Rosmarinus officinalis* Essential Oil Against West Nile Vector Mosquito *Culex pipiens* (L.)

Fouad Zeghib ^{1,2}, Fouzia Tine-Djebbar ^{2,3*}, Assia Zeghib ⁴,
Khalidoun Bachari ⁵, Karima Sifi ³ and Noureddine Soltani ³

¹ University of Larbi Ben M'hidi, Oum El Bouaghi, Algeria

² Laboratory of Water and Environment, University Larbi Tebessi, Tebessa, Algeria

³ Laboratory of Applied Animal Biology, University Badji Mokhtar of Annaba, Algeria

⁴ University Mentouri 1-Constantine, Laboratory of Therapeutic Substances Obtention (LOST), Constantine, Algeria

⁵ Scientific and Technical Research Center in Physico-Chemical Analysis (CRAPC), Tipaza, Algeria

Received 16 July 2020; accepted in revised form 03 December 2020

Abstract: The dry aerial part of *Rosmarinus officinalis*, collected from Djebel Belkif (Tébessa, North-Eastern, Algeria), were hydrodistilled in a Clevenger type apparatus and analyzed by GC and GC-MS. The larvicidal activity of the *R. officinalis* essential oil (EO) against the fourth instar larvae of *Culex pipiens* L. was determined after 24 hours of exposure according to the World Health Organization procedure. The *R. officinalis* EO effects, via application of two lethal concentrations (LC₂₅ and LC₅₀), were examined on morphometric parameters (weight and body volume) and main biochemical components (proteins, lipids, carbohydrates) at different exposure periods. Furthermore, glutathione-S-transferase (GST) activity and glutathione (GSH) rate were assessed as biomarkers of the detoxification system. The GC and GC-MS analysis led to the identification of 36 components representing 99.97 % of the total oil, in 1.9 % yield, with 1,8-cineole (44.34 %), camphor (16.74 %), α -pinene (10.07 %) and borneol (5.02 %) as the main components. Bioassay test revealed that *R. Officinalis* EO exhibited a larvicidal activity against fourth instar larvae at 24 hours (LC₂₅, LC₅₀ and LC₉₀ values were 39.47, 51.33 and 86.77 ppm, respectively). When applied to its LC₂₅ and LC₅₀, EO induced a significant decrease of larvae morphometric parameters and disturbed energy reserves with a marked lipid decrease at different periods. Also, treatment-induced stimulation of the detoxification system is highlighted by GST activity increase and GSH level decrease.

Key words: *Culex pipiens*, *Rosmarinus officinalis*, essential oil, toxicity, morphometry, biochemical components, biomarkers.

Introduction

The mosquitoes are at the center of worldwide entomological research because of their importance as vectors of several viral and parasitic diseases affecting both humans and animals. According to the World Health Organization (WHO), more than 80 % of the world's population lives in

areas at risk of, at least, one vector-borne disease that causes more than 700,000 deaths annually ¹. Vector mosquitoes are responsible for the transmission of the major global vector-borne diseases throughout the world such as malaria, dengue, lymphatic filariasis, chikungunya, yellow fever and Japanese encephalitis, apart from being a nuisance

*Corresponding author (Fouzia Tine-Djebbar)
E-mail: <fouzia.djebbar@univ-tebessa.dz>

insect². In recent years, many vector-borne diseases, once limited to tropical and subtropical zones, are now emerged in temperate areas because of climate change, therefore the temperate countries may be the most threatened by the emergence and re-emergence of vector-borne diseases.

In Algeria, *Culex pipiens* is the most abundant mosquito species in urban and rural areas³. The control of vector mosquitoes by conventional synthetic insecticides, such as organophosphates, carbamates and pyrethroids, has resulted in resistance development among target populations, toxicity to non-target organisms and secondary effects on the environment and human health. These disadvantages have led researchers to develop alternative vector control methods through research of new insect-selective products with low toxicological risks. Thus, insect growth disruptors such as chitin synthesis inhibitors^{3,4}, ecdysteroid agonists⁵, juvenile hormone analogs⁶ have been evaluated against mosquito larvae. Most of the mosquito control programs target the larval stage in their breeding sites with larvicides because at this stage they are most concentrated, immobile and accessible while the use of adulticides only reduces the adult population temporarily⁷.

Natural bioactive compounds of plant origin with insecticidal properties offer an alternative source of insect control. Among plant secondary metabolites, essential oils exhibit significant insecticidal, nematicidal, acaricidal and larvicidal properties⁷. They are considered very promising materials for the development of botanical insecticides due to their low toxicity to mammals and their biodegradability in the environment. *Rosmarinus officinalis* L. is a perennial evergreen herb of the Lamiaceae, native to the Mediterranean region and is known as an aromatic plant with a beneficial effect for human health⁸. Rosemary and its constituents have been the subject of considerable research interest because of their potential antioxidant, antiinflammatory and neurological activities. In continuation of our works on the insecticidal potential of essential oils against mosquitoes⁹⁻¹², in the present study, we have investigated the chemical composition of the essential oil of *R. officinalis* L. growing at Djebel Belkif (Tébessa,

North-Eastern, Algeria) and its larvicidal activity against the West Nile vector, *Cx. pipiens* mosquitoes (Diptera: Culicidae).

Materials and methods

Plant collection

Fresh aerial parts of *R. officinalis* L. (16.80 kg) were collected from a rural site Djebel Belkif (35°33'28" North and 7°59'2" East, North-Eastern, Tébessa, Algeria) in January 2016, then washed with tap water, to remove soil and other surface contaminants and dried at room temperature (27±2°C) for 15 days, to obtain 5.92 kg of the shade-dried plant. Plant material was authenticated by Dr. Hioun Soraya (plant taxonomist at Botany Department, Tébessa University). A voucher specimen (FZRO/01/16) was deposited at the laboratory herbarium of the Animal Biology Department, Tébessa University.

Essential oil extraction

Air-dried aerial parts (100g), cut into small pieces (1 cm), were hydrodistilled with 1500 mL distilled water for 3 h, using a Clevenger-type apparatus, according to the *European Pharmacopoeia*. A total of 28 extractions using 2800 g of plant material were performed. The obtained oil was collected and stored in screw-capped glass vials at 4°C until use. The oil yield was calculated based on the dry weight of samples.

Mosquito rearing

The larvae and eggs raft of *Cx. pipiens* mosquitoes were collected from untreated urban sites in the Tébessa district. The larvae were reared, under laboratory conditions, in plastic trays containing dechlorinated water and maintained at 25±2°C, with a 14:10 light and dark photoperiod cycle. They were fed with a finely powdered mixture of biscuits and dried yeast, at a ratio of 4:1³ and water was renewed every two days.

Larvicidal bioassay

The larvicidal activity of *R. officinalis* EO was assessed according to the WHO standard protocol¹³. An EO stock solution was prepared in ethanol and then diluted to obtain the final concentrations of 16.56; 33.11; 39.74; 52.98; 66.23; 88.28 and

99.34 ppm. Batches of twenty newly exuviated fourth instar larvae of *Cx. pipiens* were, separately, placed into plastic cups containing 150 mL of dechlorinated tap water and 1 mL of prepared concentration. In parallel, a separate set of cups received 1 mL of ethanol and served as positive controls while that of negative controls contains only water. After the exposure time (24 h), larvae were removed, washed with untreated water and placed in clean dechlorinated tap water. The test was carried out with five replicates. Mortality was registered at 24 h following treatment. Dead larvae were identified when they failed to move after probing with a needle in the siphon or cervical region and unable to reach the water surface.

Gas chromatography (GC/FID) and Gas chromatography-Mass spectrometry (GC/MS) analyses

The EO was analysed on a Hewlett-Packard (HP) 6890 plus (Agilent Technologies) gas chromatograph equipped with flame ionization detector (FID) coupled to a quadrupole mass spectrometer Hewlett-Packard (HP) 5973 (Agilent Technologies). The separation was achieved by the use of a non-polar HP-5MS (5 % phenyl 95 % methylpolysiloxane) capillary column (30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness). The oven temperature was kept at 60°C for 8 min, then programmed at the rate of 2°C/min to 250°C and held isothermally for 10 min. Helium, at a flow rate of 0.5 mL/min, was employed as a carrier gas. The sample (0.2 µL) was injected with a 50:1 split ratio. The injector was maintained at a temperature of 250°C. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV. Ion source and interface temperatures were 230°C and 270°C, respectively.

The identification of individual compounds was carried out based on retention indices using a homologous series of n-alkanes (C₄-C₂₄, Sigma-Aldrich) by comparing their mass spectra with those recorded in the mass spectra libraries (Wiley 7n.L, NIST02.L), co-injection with authentic samples of identified compounds and literature data¹⁴. The relative percentages of the individual components were calculated based on the GC

peak area (FID response) obtained without response factor correction. Quantification was done by the external standard method. Calibration curves of representative compounds from each class were drawn and used for quantification.

Morphometric measurements

As above, newly moulted fourth instar larvae were exposed to *R. officinalis* EO for 24h at their lethal concentrations 25 and 50 (LC₂₅ and LC₅₀). The survived larvae were subjected to a morphometric study. Thorax width was measured for each control and treated larvae, under a dissecting microscope and its cubic value (mm³) represents the body volume. The body weight of control and treated larvae was assessed with an analytical balance (Ohaus® Analytical, Switzerland).

Body biochemical composition

Proteins, carbohydrates and lipids were extracted and quantified as previously described¹⁰. Newly moulted larvae were collected. Pooled samples (10 individuals per pool) were weighed and extracted in 1 mL of trichloroacetic acid (20 %). In brief, quantification of proteins was carried following the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye-binding method with bovine serum albumin as a standard. The absorbance was measured at 595 nm. Carbohydrates were determined using anthrone as a reagent and glucose as standard. Lipids were measured by the vanillin method and the table oil (99 % triglycerides) used as a standard. Data were expressed in µg per individual and assays conducted with 3 replicates per treatment.

Biomarker assays

The LC₂₅ and LC₅₀ of *R. officinalis* EO have been applied on *Cx. pipiens* larvae and their effects were examined on GST (glutathione S-transferase) activity and GSH (glutathione) rate, at various times (24, 48 and 72 h) following treatment. The GST assay was carried out as previously described¹². Larvae body was homogenized in 1 mL phosphate buffer (0.1 M, pH6). The homogenate was centrifuged (14000 rpm for 30 min). Two hundred µL of the resulting supernatant was added

to 1.2 mL of the mixture GSH-CDNB in phosphate buffer (0.1, pH 7). Changes in absorbance were measured at 340 nm every minute for 5 min. The activity was expressed as $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ proteins. The GSH assay was conducted with homogenized larvae bodies in 1 mL of EDTA (0.02 M, pH 6). The homogenate was subjected to a deproteinization with sulfosalysilic acid (SSA) at 0.25 %. The optical density was measured at 412 nm.

Data analysis

Results were presented as mean \pm Standard Error of the Mean (SEM). The number of individuals and repeats, tested in each series, was given with suitable results. The significance between different series was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) ($P \leq 0.05$) followed by a post-hoc honestly significant difference (HSD) Tukey's test. All statistical analyzes were performed using Graph Pad Prism 7 software program.

Results and discussion

Essential oil yield

The *R. officinalis* EO yield was 1.24 ± 0.27 % (on a dry weight basis). Compared to several previous studies in Mediterranean countries, the present yield is higher than those found from Egypt (0.33 %) ¹⁵ and Sicilia in Italy (1 %) ¹⁶, but lower than those collected in Turkey (1.9 %) ¹⁷, Morocco (2.7 %) ¹⁸ and the Balkan Peninsula (2.8 %) ¹⁹ and medium compared to those from Tunisia (0.71 % to 1.71 %) ²⁰. The difference may be due to several factors such as bioclimatic, geographic, edaphic and others like genetic variations, drying, extraction method, part of the plant and harvesting season ²¹.

Chemical composition

The GC and GC/MS analysis of *R. officinalis* EO underlined 36 compounds representing 99.97 % of the total oil, mainly characterized by 1,8-cineole (44.34 %), camphor (16.74 %), α -pinene (10.07 %) and borneol (5.02 %), accounting for 76.17 % of the oil (Table 1). The 1,8-cineole chemotype of the studied oil is alike the majority of *R. officinalis* EOs reported in the literature

for Mediterranean countries. The chemical composition investigations of the Algerian and Tunisian Rosemary EOs revealed the 1,8-cineole, camphor and α -pinene as the first three major components ^{20,22}. In literature, in addition to 1,8-cineole chemotype, α -pinene (Spain and France) ²³, camphor (South Africa) ²⁴, myrcene and borneol (Turkey) ^{17, 25} chemotypes were, also, reported for *R. officinalis* EOs. The variations in the chemical composition of rosemary EOs could be attributed to several factors like climatic effects, geographical location, part of the plant, season of harvesting and extraction method ²⁶.

Larvicidal assays

The toxicity assay results of the present study revealed a high larvicidal activity of *R. officinalis* EO against fourth instar larvae of *Cx. pipiens*. The mortality rate of *Cx. pipiens* larvae treated with different concentrations exhibited larvicidal activity with a dose-response relationship. The results showed that after an exposure period of 24 h, the values of LC_{25} , LC_{50} and LC_{90} were 39.47; 51.33 ppm and 86.77 ppm, respectively (Table 2).

Several experiments have been carried out on the biological activity of EOs against mosquito species. But there were a few reports of the larvicidal activity of *R. officinalis* against *Cx. pipiens* larvae. Compared to other studies on the same plant and mosquito species, our results showed that the present *R. officinalis* EO has a higher larvicidal activity than those conducted by Radwan *et al.* ²⁷ and Zahran *et al.* ²⁸ where the LC_{50} value after 24h was 216.10 and 128 mg/L, respectively. Also, in agreement with our results, *R. officinalis* EO was reported to possess larvicidal activity against other mosquito species. Yu *et al.* ²⁹ found that EO of *R. officinalis* had high larvicidal potency against *Cx. quinquefasciatus* larvae with an LC_{50} value of 38.3ppm. Also, Freitas *et al.* ³⁰ recorded a high larvicidal activity of this plant against *Ae. Aegypti* with the values of 1.18 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 1.67 $\mu\text{L}/\text{mL}$ correspondings to LC_{50} and LC_{90} , respectively.

Several authors have reported that the biological activities of EOs are mainly linked to their main compounds. On the other hand, it has been shown

Table 1. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil

No.	Compounds ^a	RT ^b	RI _{Exp} ^c	RI _{Lit} ^d	%
1	Tricyclene	7.4	920	921	0.16
2	α -Thujene	7.6	924	925	0.12
3	α -Pinene	8.1	933	932	10.08
4	Camphene	8.8	945	946	4.14
5	β -Pinene	10.4	973	974	4.38
6	1-Octen-3-ol	11.1	979	979	0.13
7	β -Myrcene	11.3	989	989	1.18
8	α -Phellanderene	12.0	1002	1002	0.19
9	δ - 3-Carene	12.4	1007	1008	0.13
10	α -Terpinene	12.9	1015	1014	0.51
11	1,8-Cineole	14.3	1036	1035	44.34
12	β -Ocimene	14.5	1039	1044	0.07
13	γ -Terpinene	15.7	1057	1056	0.72
14	<i>cis</i> -Sabinene hydrate	16.4	1066	1066	0.11
15	α -Terpinolene	17.7	1086	1086	0.39
16	Linalool	19.0	1103	1104	1.09
17	1,3-Cyclopentadiene, trimethyl	20.4	1124	-	0.11
18	Camphor	21.9	1146	1146	16.74
19	Borneol	23.5	1167	1166	5.03
20	Terpinen-4-ol	24.2	1176	1175	1.20
21	α -Terpineol	25.4	1193	1192	4.95
22	Bornylacetate	31.4	1275	1281	0.70
23	Thymol	32.7	1292	1292	0.11
24	Carvacrol	33.7	1300	1302	0.18
25	Eugenol	36.4	1363	1362	0.09
26	Methyleugenol	39.5	1403	1402	0.38
27	β -Caryophyllene	39.8	1411	1410	0.66
28	α -Humulene	41.9	1456	1456	0.09
29	γ -Muurolene	43.5	1489	1485	0.04
30	δ -Cadinene	46.3	1532	1530	0.09
31	Caryophylleneoxide	49.7	1577	1575	0.75
32	Humulene epoxide II	51.2	1597	1605	0.10
33	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5.beta.-ol	52.9	1632	1632	0.19
34	Methyljasmonate	53.7	1648	1644	0.13
35	Allo aromadendrene epoxide	54.1	1657	1655	0.52
36	(Z)-8-Hydroxy-4,7-dimethyl-6-octenoic acid lactone	54.9	1673	-	0.17
	Monoterpene hydrocarbons: 1-5, 7-10,12,13,15				22.07
	Oxygenated monoterpenes: 11,14,16,18-21, 23-26				74.22
	Sesquiterpene hydrocarbons: 27-30				0.88
	Oxygenated sesquiterpenes : 31-33, 35,36				1.73
	Others: 6,17,22,34				1.07
	Total				99.97

^a Elution order on HP-5MS column^b Retention time (min);^c Experimental retention indices on HP-5MS capillary column;^d Literature retention indices ¹³⁷.

Table 2. Effects of *R. officinalis* EO after 24 hours treatment at different concentrations (ppm) against fourth instar larvae of *Cx. pipiens*: Corrected mortality (%) (mean \pm SEM; n = 5 each pools containing 20 individuals) LC₂₅, LC₅₀ and LC₉₀ and their fiducial limits (FL)

Doses (ppm)	Mortality (%)	LC ₂₅ (95 % FL)	LC ₅₀ (95 % FL)	LC ₉₀ (95 % FL)	Hill Slope	R ²
16.56	5.00 \pm 0.00 a	39.47	51.33	86.77	4.18	0.98
33.11	18.00 \pm 9.08 b	(33.18-45.60)	(46.18-56.74)	(72.40-109.60)		
39.74	30.00 \pm 8.66 b					
52.98	43.00 \pm 9.08 c					
66.23	75.00 \pm 6.12 d					
88.28	97.00 \pm 2.74 e					
99.34	100.00 \pm 0.00 e					

Mean values followed by the same letter are not significantly different at $p > 0.05$

that the insecticidal effects of some EOs are the result of their compound's synergistic effect. In a review, Dias and Morais³¹ reported that EO rich in phenylpropanoids, oxygenated sesquiterpenes and monoterpene hydrocarbons were found to be most active against mosquito larvae than purified compounds. This affirmation was confirmed by several studies in which isolated or pure compounds such as 1,8-cineole, camphor and borneol tested on *Cx. pipiens* larvae were ineffective^{32,27}. Moreover, previous publications reported that minor compounds found in the present *R. officinalis* EO such as thymol, carvacrol^{27,32}, β -pinene³³, *cis*-ocimene, α -phellandrene, bornyl acetate and β -myrcene³⁴, exhibit strong larvicidal activity against *Cx. pipiens* larvae. Thus, the variance in the larvicidal activity of EO greatly depends upon its chemical composition^{28,29} and may be attributed to the effect of the functional groups (alcohols, phenols, etc.) of major and minor compounds that may interact additively, synergistically and even antagonistically⁷. Also, other factors induce different larval responses to EOs such as plant species, plant parts, chemotypes, collection time, pedological and climatic conditions, extraction method and mosquito species³¹.

EO effect on growth

The whole body weight and volume were estimated for the fourth larvae instar of *Cx. pipiens* at different times following the treatment with

R. officinalis EO (Table 3). In the present study, the treatment with *R. officinalis* EO (LC₂₅ and LC₅₀) induced a significant decrease in the weight and the body volume of larvae of *Cx. pipiens* compared to controls in all tested periods. In previous studies, authors have reported similar observations using other plant EOs such as *O. basilicum*, *L. dentata*, *M. piperita*^{9,10} and *L. nobilis*¹¹. The body size is a pivotal trait for mosquitoes because it can influence their blood-feeding ability, host attack rate and fecundity. All of these traits are important determinants of their potential to transmit diseases³⁵. The decrease in larval weight and body size may be due to an impaired absorption process caused by the impact of EO on larval digestive cells³⁶. Also, several studies have demonstrated the inhibitory effects of botanical insecticides on the activity of several digestive enzymes which play a major role in the conversion of complex food materials into micromolecules necessary to provide energy and metabolites for growth and development³⁷.

EO effect on biochemical composition

The different contents for total proteins, lipids, or carbohydrates were estimated in the whole body of *Cx. pipiens* fourth instar larvae, at different times following the treatment, using LC₂₅ and LC₅₀ of *R. officinalis* EO (Table 4). In the current study, biochemical analysis revealed an increase of proteins and carbohydrates and a decrease

Table 3. Effect of *R. officinalis* EO (LC₂₅ and LC₅₀) on the fresh body weight (mg) and the body volume (mm³) in the fourth instar larvae of *Cx. pipiens* at different periods after treatment (mean ± SEM; n = 3 pools each containing 10 individuals)

Time (hours)	Parameters	Control	LC ₂₅	LC ₅₀
24	Body weight (mg)	2.26 ± 0.07 a	2.04 ± 0.01 b	1.65 ± 0.03 c
	Body volume (mm ³)	1.25 ± 0.02 a	1.04 ± 0.06 b	0.72 ± 0.06 c
48	Body weight (mg)	1.99 ± 0.04 a	1.90 ± 0.03 ab	1.72 ± 0.08 b
	Body volume (mm ³)	1.13 ± 0.04 a	0.73 ± 0.03 b	0.50 ± 0.04 c
72	Body weight (mg)	2.18 ± 0.01 a	2.05 ± 0.02 b	1.94 ± 0.01 c
	Body volume (mm ³)	1.03 ± 0.04 a	0.75 ± 0.03 b	0.68 ± 0.02 b

For each period, mean values followed by the same letter are not significantly different at $p > 0.05$. One-way ANOVA revealed a significant decrease in the body weight at 24h ($F_{2,6} = 52,54$; $p = 0,0002$) and 72 h ($F_{2,6} = 71,43$; $p < 0,0001$) in the treated series (LC₂₅ and LC₅₀ respectively) and also at 48 h ($F_{2,6} = 6,371$; $P = 0,0328$) in the treated series with the highest dose (LC₅₀) compared to the controls with a dose-response relationship. One-way ANOVA indicated a significant reduction in the body volume with LC₂₅ and LC₅₀ treated series compared to the controls in all tested periods : 24 h ($F_{2,42} = 29,34$; $P < 0,0001$), 48 h ($F_{2,42} = 68,63$; $P < 0,0001$) and 72 h ($F_{2,42} = 31,78$; $P < 0,0001$)

Table 4. Effect of *R. officinalis* EO (LC₂₅ and LC₅₀) on contents of proteins, carbohydrates and lipids (µg/individual) in fourth instar larvae of *Cx. pipiens* at different periods after treatment (mean ± SEM; n = 3 pools each containing 10 individuals)

Components	Time (hours)	Control	LC ₂₅	LC ₅₀
Proteins	24	72.53 ± 7.07 a	88.56 ± 3.17 a	91.70 ± 0.73 a
	48	68.08 ± 2.39 a	86.05 ± 5.06 a	89.69 ± 2.24 b
	72	70.77 ± 2.87 a	73.03 ± 6.22 a	88.84 ± 3.95 a
Carbohydrates	24	6.08 ± 1.65 a	7.03 ± 0.31 a	13.55 ± 0.31 b
	48	4.60 ± 0.67 a	12.23 ± 0.90 b	25.89 ± 0.59 c
	72	7.35 ± 0.75 a	17.97 ± 3.02 b	34.23 ± 0.41 c
Lipids	24	27.55 ± 0.52 a	16.03 ± 0.89 b	6.13 ± 1.05 c
	48	26.99 ± 0.26 a	7.25 ± 0.19 b	6.59 ± 0.61 b
	72	28.28 ± 1.07 a	6.25 ± 0.74 b	3.55 ± 0.56 b

For each period, mean values followed by the same letter are not significantly different at $p > 0.05$. The protein content significantly increased only at 48 h after treatment with the highest concentration (LC₅₀) ($F_{2,6} = 11.04$; $p = 0.0098$). The carbohydrate content increased at 48 h ($F_{2,6} = 217.1$; $p < 0.0001$) and 72 h ($F_{2,6} = 55.94$; $p = 0.0001$), while at 24 h a significant difference was registered only with the highest concentration (LC₅₀) ($F_{2,6} = 17.04$; $p = 0.0034$). The lipid content was significantly decreased with the two tested concentrations comparatively to control at 24 h ($F_{2,6} = 158.2$; $p < 0.0001$), 48 h ($F_{2,6} = 846.7$; $p < 0.0001$) and 72 h ($F_{2,6} = 275.2$; $p < 0.0001$)

of lipids content in the whole body of the treated larvae compared to the control series.

Our results are in agreement with those of Hazarika *et al.*³⁸ in which an increase in proteins and carbohydrates levels was recorded after applicati-

on of the essential oils of *Cymbopogon nardus* and *Pogostemon cablin* against the larvae of *Ae. aegypti*. Also, about lipids, our data corroborate those obtained by the treatment of *Cx. pipiens* larvae with *O. basilicum*¹⁰ and *T. vulgaris*¹² EOs.

The same observations were also reported with *Artemisia annua* extract in *Anopheline* and *Culicine* larvae³⁹.

Changes in protein content probably reflect the balance between synthesis, storage, transport and degradation of structural and functional nutrients during ontogeny as well as response to particular physiological conditions⁴⁰. The raised protein level may be explained by an increase of the synthesis of proteins and their accumulation by the fat body, haemolymph and other tissues as a preparation for the synthesis of cuticular proteins under the stress of insecticides⁴¹. Carbohydrates play an essential role in the physiology of insects. In addition to their role as energy elements, their levels in the tissues and the hemolymph are closely linked to physiological events such as moulting and reproduction⁴². The exposure to pesticides can affect carbohydrate metabolism in different species of insects by the induction of glycogenolysis leading to an elevation of carbohydrates level as a response to stress conditions³⁹. In insects, lipids act as hormones and form important energy reserves of great metabolic activity such as flight and egg production⁴³. Sharma *et al.*³⁹ suggested that lipids content reduction in insects occurs because of a change in lipids metabolism as a result of stress caused by the plant extract.

Changes in lipids content by the action of EO vary depending on many factors including the insect species, its developmental stage and type of the oil used⁴⁴.

EO effect on biomarkers

The impact of *R. officinalis* EO on two biomarkers of the detoxification system, glutathione (GS-H) and glutathione S-transferase (GST) was evaluated in the fourth instar larvae of *Cx. pipiens* at different times (Table 5). The results revealed a significant increase in GST activity and a decrease in GSH rate, in the LC₂₅ and LC₅₀ treated series when compared to control.

Glutathione S-transferases (GSTs) are large multifunctional family enzymes involved in various biological processes including the detoxification of a wide range of endogenous and xenobiotic compounds. These enzymes catalyze the conjugation of electrophile molecules with reduced glutathione (GSH), to convert them from reactive lipophilic molecules into fewer toxic products excretable from the cell. Most studies have focused on their role in insecticide metabolism because elevated levels of GST activities have been associated with developing resistance in insects to all major classes of insecticides⁴⁵. Plant-origin natural products such as EOs were also

Table 5. Effect of *R. officinalis* EO (LC₂₅ and LC₅₀) on GST activity ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ of proteins) and GSH rate ($\mu\text{M}/\text{mg}$ of proteins) in fourth instar larvae of *Cx. pipiens* (mean \pm SEM, n = 3 pools each containing 10 individuals)

Biomarkers	Periods (hours)	Control	LC ₂₅	LC ₅₀
GSTs	24	1.09 \pm 0.06a	2.90 \pm 0.20b	6.69 \pm 0.19c
	48	2.60 \pm 0.28a	3.23 \pm 0.26a	4.34 \pm 0.41b
	72	3.40 \pm 0.89a	3.67 \pm 0.33ab	5.62 \pm 0.50b
GSH	24	2.17 \pm 0.25a	0.84 \pm 0.04b	0.58 \pm 0.17b
	48	1.50 \pm 0.26a	0.87 \pm 0.18b	0.77 \pm 0.05b
	72	1.69 \pm 0.06a	0.92 \pm 0.06b	0.81 \pm 0.06b

For each period, values followed by the same letter are not significantly different at $p > 0.05$

The GST activity measurements revealed a significant increase in LC₂₅ and LC₅₀ treated series at 24 h ($F_{2,6}=533.5$; $p < 0.0001$) with a concentration–response relationship as compared to the control series and with the highest concentration (LC₅₀) at 48 h ($F_{2,6}=12.16$; $p=0.0077$) and 72 h ($F_{2,6}=6.65$; $p=0.0300$). The glutathione rate showed a significant decrease with the two tested concentrations when compared to control at all tested periods: 24 h ($F_{2,6}=41.71$; $p=0.0003$), 48 h ($F_{2,6}=7.424$; $p=0.0238$) and 72 h ($F_{2,6}=95.65$; $p < 0.0001$)

reported as an inducer of GST activity in insects.

In agreement with the results of the present study, an increase in GST activity was recorded after treatment of *Cx. pipiens* larvae with EO of *Citrus* fruits⁴⁶ and *T. vulgaris*¹². Similar observations were also reported with EO of *P. crispum* against *Ae. Aegypti*⁴⁷. The high specific activity of these enzymes reflects that a high detoxification capacity by various physiological mechanisms, including reduced sensitivity of the target site and high production of detoxifying enzymes is needed to protect the biosynthetic pathways from inhibition by toxic substances⁴⁸. The molecular mechanism responsible for elevated GST activity is mostly due to regulatory changes associated with increased GST mRNA levels indicating de novo synthesis of the enzyme⁴⁹.

Glutathione (GSH) is a tripeptide present at high intracellular concentrations mainly in reduced form. This compound plays an important role in the maintenance of cellular redox status and acts as an antioxidant that scavenges free radicals. Besides, it is also involved in the detoxification system as a co-substrate in the reaction of peroxide detoxification catalyzed by glutathione peroxidase (GPx) and glutathione transferase

(GST)⁵⁰. From the results obtained in our research, it was clear that the increase of GST activity was also correlated with a decrease in GSH amounts after treatment with *R. officinalis* EO. The GSH depletion could be explained by an increase in the consumption of this cofactor and its high rate of conjugation with GSTs in response to the induction of the detoxification system and antioxidant defenses of the organism¹².

Conclusions

In the present study, it can be concluded that the essential oil of *R. Officinalis* with 1,8-cineole, camphor and α -pinene as major compounds was shown to exhibit strong larvicidal activity against *Cx. pipiens* with an LC₅₀ value of 51.33 ppm. This essential oil disrupted the main biochemical components and caused a decrease in the weight and volume of the larvae. Also, biomarker assessment indicated that rosemary essential oil has induced the detoxification system via an increase in GST activity and decrease in GSH level. Due to its mosquitocidal efficacy, *R. Officinalis* EO could be useful in the search for newer, more selective and biodegradable natural larvicides.

References

1. **WHO (2017)**. Global vector control response 2017-2030. World Health Organization. Geneva, Switzerland, pp. 1-16.
2. **Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., Weaver, S.C., Monath, T.P., Heymann, D.I. and Scott, T.W. (2017)**. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect. Dis.* 17: 101-106.
3. **Rehimi, N. and Soltani, N. (1999)**. Laboratory evaluation of Alsystin, a chitin synthesis inhibitor, against *Culex pipiens pipiens* (Diptera: Culicidae): effects on development and cuticle secretion. *J. Appl. Entomol.* 123: 437-441.
4. **Soltani, N., Rehimi, N., Drardja, H. and Bendali, F. (1999)**. Activité du triflumuron à l'égard de *Culex pipiens* et impacts sur deux espèces larvivoires non visées. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 35: 59-64.
5. **Tine-Djebbar, F. and Soltani N. (2008)**. Activité biologique d'un agoniste non stéroïdien de l'hormone de mue sur *Culiseta longiareolata* : analyses morphométrique, biochimique et énergétique. *Synthèse.* 18: 23-34.
6. **Hamaidia, K. and Soltani, N. (2019)**. Compensation of kinoprene effect on reproduction of *Culex pipiens* by methoxyfenozide, an ecdysone agonist. *J. Entomol. Res.* 43(2): 125-130.
7. **Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S. and Chemat, F. (2014)**. Essential Oils as Insecticides. In: *Essential Oils as Reagents in Green Chemistry*. Sharma, S.K (ed.), Springer Briefs in Molecular Science. Springer, pp. 41-53.
8. **Chung, M., Lee, G.W., Lee, S.S., Chung, B.Y. and Lee, S. (2020)**. Comparative Analysis of

- Volatile Terpenoids Composition in Rosemary Leaves in Response to Ionizing Radiation. *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 23(3): 594-600.
9. **Dris, D., Tine-Djebbar, F. and Soltani, N. (2017a).** *Lavandula dentata* essential oils: chemical composition and larvicidal activity against *Culiseta longiareolata* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Afr. Entomol.* 25(2): 387-394
 10. **Dris, D., Tine-Djebbar, F., Bouabida, H. and Soltani, N. (2017b).** Chemical composition and activity of an *Ocimum basilicum* essential oil on *Culex pipiens* larvae: Toxicological, biometrical and biochemical aspects. *S. Afr. J. Bot.* 113: 362-369.
 11. **Bouzidi, O., Tine S., Hamaidia, K., Tine-djebbar, F. and Soltani, N. (2020).** Chemical Composition and Bioefficacy of Essential Oil from Bay Laurel Shrub (Laurales: Lauraceae) against *Culiseta longiareolata* (Macquart) (Diptera: Culicidae) Larvae. *J. Entomol. Sci.* 55(2): 262-272.
 12. **Bouguerra, N., Tine-Djebbar, F. and Soltani, N. (2018).** Effect of *Thymus vulgaris* L. (Lamiales: Lamiaceae) Essential oil on energy reserves and biomarkers in *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) from Tebessa (Algeria). *J. Essent. Oil-Bear. Plants.* 21: 1082-1095.
 13. **WHO (2005).** Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. [who/cds/whopes/gcdpp/2005](http://www.who.int/cds/whopes/gcdpp/2005). 13: 7-20.
 14. **National Institute of Science and Technology. (2018).** Chemistry WebBook. Data from NIST Standard Reference Database 69.
 15. **Abdelgaleil, S.A.M., Mohamed, M.I.E., Shawir, MS. and Abou-Taleb, H.K. (2016).** Chemical composition, insecticidal and biochemical effects of essential oils of different plant species from Northern Egypt on the rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. *J. Pest. Sci.* 89: 219-229.
 16. **Tuttolomondo, T., Dugo, G., Ruberto, G., Leto, C., Napoli, E.M., Cicero, N., Gervasi, T., Virga, G., Leone, R., Licata, M. and La Bella, S. (2015).** Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Nat. Prod. Res.* 29(20): 1928-34.
 17. **Zcan, M.M.O. and Chalchat, J.C. (2008).** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 59(7-8): 691-698.
 18. **Bouyahya, A., Et-Touys, A., Bakri, Y., Ahmed, T., Fellah, H., Abrini, J. and Dakka, N. (2017).** Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. *Microb. Pathog.* 111: 41-49.
 19. **Lakusic, D.V., Ristic, M.S., Slavkovska, V.N., Sinzar-Sekulic, J.B. and Lakusic, B.S. (2012).** Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chem. Biodivers.* 9: 1286- 1302.
 20. **Ben Jemia, M., Tundis, R., Pugliese, A., Menichini, F., Senatore, F., Bruno, M., Kchouk, M.E. and Loizzo, M.R. (2014).** Effect of bioclimatic area on the composition and bioactivity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Nat. Prod. Res.* 29(3): 213-222.
 21. **Jordan, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Loran, S. and Sotomayor, J.A. (2013).** Effect of the bioclimatic area on the essential oil composition and antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. *Food Control.* 30: 463e468.
 22. **Zoubiri, S. and Baaliouamer, A. (2011).** Chemical composition and insecticidal properties of some aromatic herbs essential oils from Algeria. *Food Chem.* 129: 179-182.
 23. **Chalchat, J.C., Garry, R.P., Michet, A., Benjilali, B. and Chabart, J.L. (1993).** Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The chemical composition of oils of various origins (Morocco, Spain, France), *J. Essent. Oil Res.* 5(6): 613-618.
 24. **Okoh, O.O., Sadimenko, A.P. and Afolayan, A.J. (2010).** Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. Obtained by hydrodistillation and solvent-free microwave extraction methods. *Food Chem.* 120: 308-312.

25. **Çetin, H. and 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.
26. **Raskovic, A., Milanovic, I., Pavlovic, N., Aebovic, T., Vukmirovic, S. and Mikov, M. (2014).** Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. *BMC Complement Altern. Med.* 14: 225.
27. **Radwan, M.A., El-Zemity, S.R., Mohamed, S.A. and Sherby, S.M. (2008).** Larvicidal activity of some essential oils, monoterpenoids and their corresponding N-methyl carbamate derivatives against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 28(2): 61-68.
28. **Zahran, H.M., Abou-Taleb, H.K. and Abdelgaleil, S.A.M. (2017).** Adulticidal, larvicidal and biochemical properties of essential oils against *Culex pipiens* L. *J. Asia Pac. Entomol.* 20: 133-139.
29. **Yu, J., Liu, X.Y., Yang, B., Wang, J., Zhang, F.Q., Feng, Z.L., Wang, C.Z. and Fan, Q.S. (2013).** Larvicidal activity of essential extract of *Rosmarinus officinalis* against *Culex quinquefasciatus*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* 29(1): 44-48.
30. **Freitas, F.P., Freitas, S.P., Lemos, G.C., Vieira, I.J., Gravina, G.A. and Lemos, F.J. (2010).** Comparative larvicidal activity of essential oils from three medicinal plants against *Aedes aegypti* L. *Chem.Biodivers.* 7: 2801-2807.
31. **Dias, C.N. and Moraes, D.F.C. (2014).** Essential oils and their compounds as *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) larvicides: review. *Parasitol Res.* 113: 565-592.
32. **Trabousli, A.F., Taoubi, K., El-Haj, S., Bessiere, J. and Rammal, S. (2002).** Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 58: 491-495.
33. **Michaelakis, A., Papachristos, D., Kimbaris, A., Koliopoulos, G., Giatropoulos, A. and Polissiou, M.G. (2009).** Citrus essential oils and four enantiomeric pinenes against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 105: 769-773.
34. **Evergetis, E., Michaelakis, A. and Haroutounian, S.A. (2013).** The exploitation of Apiaceae family essential oils as potent biopesticides and a rich source of phellandrenes. *Ind. Crops. Prod.* 41: 365-370.
35. **Farjana, T. and Tuno, N. (2013).** Multiple Blood Feeding and Host-Seeking Behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 50(4): 838-846.
36. **Procópio, T.F., Fernandes, K.M., Pontual, E.V., Ximenes, R.M., de Oliveira, A.R.C., Souza, C.D.S., Melo, A.M.M.A., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G., Martins, G.F. and Napoleão T.H. (2015).** *Schinus terebinthifolius* Leaf Extract Causes Midgut Damage, Interfering with Survival and Development of *Aedes aegypti* Larvae. *PLoS ONE.* 10(5): e0126612.
37. **Sahayaraj, K. (2014).** Modulation of Botanicals on Pest's Biochemistry. In *Short Views on Insect Biochemistry and Molecular Biology.* (1): 57-74.
38. **Hazarika, H., Tyagi, V., Krishnatreyya, H., Kishor, S., Karmakar, S., Bhattacharyya, D. R., Zaman, K. and Chattopadhyay, P. (2018).** Toxicity of essential oils on *Aedes aegypti*: A vector of chikungunya and dengue fever. *Int. J. Mosq. Res.* 5(3): 51-57
39. **Sharma, P., Mohan, L., Dua, K.K. and Srivastava, C.N. (2011).** Status of carbohydrate, protein and lipid profile in the mosquito larvae treated with certain phytoextracts. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 4: 301-304.
40. **Shoukry, I.F., Khlaf, A.A., Hussein, T.H. and Khater, K.S. (2003).** Toxicological evaluation of some botanicals oils on biochemical aspects in the Indian meal moth *Plodia interpunctella* H.B. (Lepidoptera: Pyralidae). *Egypt. J. Biol.* 5: 155-163.
41. **Nath, B.S., Suresh, A., Mahendra Varma, B. and Kumar, R.P. (1997).** Changes in protein metabolism in haemolymph and fat body of the silkworm, *Bombyx mori* L., in response to

- organophosphorus insecticides toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36: 169-173.
42. **Wiens, A.W. and Gilbert, T. (1967).** Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in *Leucophaea maderae*. *J. Insect. Physiol.* 13(5): 779-794.
 43. **Arrese, E.L., Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Pennington, J.E., Tsuchida, K. and Ells, M.A. (2001).** Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31(1): 7-17.
 44. **Ali, A.M. and Ibrahim, A.M.A. (2018).** Castor and camphor essential oils alter hemocyte populations and induce biochemical changes in larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Asia-Pacific Ent.* 21(2): 631-637.
 45. **Enayati, A.A., Ranson, H. and Hemingway, J. (2005).** Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14: 3-8.
 46. **Badawy, M.E.I., Taktak, N.M. and El-Aswad, A.F. (2018).** Chemical composition of the essential oils isolated from peel of three citrus species and their mosquitocidal activity against *Culex pipiens*. *Nat. Prod. Res.* 32(23): 2829-2834.
 47. **Intirach, J., Junkum, A., Lumjuan, N., Chaithong, U., Somboon, P., Jitpakdi, A., Riyong, D., Champakaew, D., Muangmoon, R., Chansang, A. and Pitasawat, B. (2019).** Biochemical Effects of *Petroselinum crispum* (Umbelliferae) Essential Oil on the Pyrethroid Resistant Strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Insects.* 10, 1. doi:10.3390/insects10010001.
 48. **Martinez-Torres, D., Chandrea, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D. (1998).** Molecular characterization of pyrethroid knock-down resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 7: 179-184.
 49. **Che-Mendoza, A., Penilla, R.P. and Rodríguez, D.A. (2009).** Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: A review. *Afr. J. Biotechnol.* 8(8): 1386-1397.
 50. **Kalinina, E.V., Chernov, N.N. and Novichkova, M.D. (2014).** Role of Glutathione, Glutathione Transferase and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes. *Biochemistry (Moscow).* 79(13): 1562-1583.