

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI CONSTANTINE1



FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :209/Ds/2018

N° de série :28/Ch/2018

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences

Filière : Chimie Organique

Spécialité : Phytochimie

THEME

Huiles essentielles de trois espèces d'*Eucalyptus* d'Algérie :
composition et activité acaricide (*Varroa destructor*)

Soutenue publiquement

Le 18 Novembre 2018

par

M^{me} ATMANI – MERABET Ghania

Devant le jury :

Présidente : KABOUCHE Zahia Prof Université des frères Mentouri Constantine1

Encadreur : BELKHIRI Abdelmalik Prof Université Salah Boubnider Constantine3

Examineurs :

AKKAL Salah Prof Université des frères Mentouri Constantine1

DJERROU Zouheir MCA Université 20 Août 1955 Skikda

DALICHAOUCH Souhaila MCA Université Salah Boubnider Constantine3

Membre invité : M^r MOSBAH Bouzid Conservation des forêts de Constantine

Remerciements

Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance à Monsieur le professeur Abdelmalik BELKHIRI pour son dévouement, son encadrement sans faille, ses conseils et orientations éclairés. Enfin, pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard pour mener à bien ce projet.

Je remercie le professeur Zahia KABBOUCHE de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, de m'avoir fait l'immense honneur d'accepter d'être la présidente du jury pour la soutenance de ma thèse de Doctorat.

Je suis reconnaissante au professeur Salah AKKAL de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 pour l'honneur qu'il m'accorde en acceptant de juger ce travail et de faire partie du jury.

Mes vifs remerciements pour le Docteur Zouheir DJERROU (MCA) de l'Université 20 Août 1955 Skikda, qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer au jury de thèse.

Mes sincères remerciements pour le Docteur Souhaila DALICHAOUCH (MCA) de l'Université Salah Boubnider Constantine 3, je suis honorée de vous compter parmi les membres de mon jury.

Je remercie Monsieur Bouzid MOSBAH de la Conservation des Forêts de Constantine, je suis honorée que vous participiez au jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes plus sincères remerciements à Monsieur Hamadi MOKADEM, apiculteur et président de la coopérative El Fadjr à Azzaba wilaya de Skikda, pour son aide précieuse sur le terrain, sa disponibilité permanente et ses conseils.

J'exprime mes vifs remerciements et mon grand respect pour Monsieur Zakaria KHALFAOUI Directeur de l'Institut Technique de l'Elevage, Hamma Bouziane Constantine pour son aide, sa disponibilité et ses conseils.

Ma reconnaissance et mes remerciements pour Monsieur Abdeslam DEMS, Maître de Recherche, Plate forme Bioinformatique et Biostatistique, Centre de Recherche de Biotechnologie de Constantine (CRBT), pour son immense aide et ses précieux conseils.

Mes sincères remerciements pour le Docteur Abdeldjallil LALAOUNA, Pharmacien Maître assistant en chimie analytique, CHU Benbadis, Faculté de Médecine, Université Salah Boubnider Constantine 3, pour son aide très précieuse.

Un grand merci pour l'équipe du Centre de Recherche de Biotechnologie de Constantine (CRBT) spécialement pour le Docteur Mouna Derdour qui m'a énormément aidé.

Un vif merci pour Madame Nacéra MEKTI responsable du Laboratoire de Phytochimie du Centre Algérien du Contrôle de Qualité et de l'Emballage de Constantine (CACQE) pour son chaleureux accueil et son aide précieuse.

Une pensée particulières pour mes amies et collègues de la première année de Médecine Dentaire : Yasmina ; Souhaila ; Sihem ; Hanene.....

Dédicace

*A la mémoire de mes parents bien aimés
et de tous mes chers que j'ai perdu,
Qu'ils reposent en paix*

*A mon mari et mes enfants pour leur encouragement
leur soutien et leur patience*

*A mes frères et sœurs qui perpétuent
l'union et l'esprit familial*

A ma belle famille

*A tous mes collègues et amis de la première année
de Médecine Dentaire*

*A mes amies et tous ceux qui m'ont aidé à réaliser
ce modeste travail*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition Chimique d' <i>Eucalyptus</i> originaires d'Algérie de Tunisie et du Maroc.....	36
Tableau 2: Caractéristiques de toxicité des extraits végétaux	41
Tableau 3 : Différences entre <i>Varroa destructor</i> et <i>Varroa jacobsoni</i>	53
Tableau 4: Huiles essentielles utilisées contre <i>Varroa destructor</i>	62
Tableau 5: Origines et noms communs des espèces étudiées.....	70
Tableau 6: Caractéristiques organoleptiques.....	88
Tableau 7: Rendement et masses des huiles essentielles des espèces étudiées.....	88
Tableau 8: Masses, volumes et densités des huiles essentielles.....	89
Tableau 9 : Indice de réfraction des huiles essentielles des <i>Eucalyptus</i>	89
Tableau 10: Indices d'acides des huiles essentielles des <i>Eucalyptus</i>	89
Tableau 11 Miscibilité des huiles essentielles des <i>Eucalyptus</i>	90
Tableau 12: Rendement de l'huile essentielle d' <i>E. robusta</i> , <i>E.sideroxylon</i> et <i>E. globulus</i> dans différentes régions du monde.....	91
Tableau 13: Constantes physico-chimiques des huiles essentielles d' <i>E. robusta</i> , <i>E. sideroxylon</i> et <i>E. globulus</i>	92
Tableau 14: Composition chimique des HE des feuilles d' <i>E. robusta</i>	94
Tableau 15: Composition chimique des HE des feuilles d' <i>E. sideroxylon</i>	96
Tableau 16: Composition chimique des HE des feuilles d' <i>E. globulus</i>	98
Tableau 17: Chémotypes de quelques espèces d' <i>Eucalyptus</i>	99
Tableau 18: Composés principaux de l'HE d' <i>E. robusta</i> dans différentes régions du monde	100
Tableau 19: Composés principaux de l'HE d' <i>E. sideroxylon</i> dans différentes régions du monde.....	101
Tableau 20: Composés principaux de l'HE d' <i>E.globulus</i> dans différentes régions du monde.....	103
Tableau 21: Caractéristiques des composés communs aux trois espèces Er, Es et Eg....	105
Tableau 22: Principaux ions fragments et leur intensité relative (IR%) des composés 1,8-cinéole et α -pinène.....	107

Tableau 23: Concentrations létales médianes CL50 des HE d' <i>E. robusta</i> , <i>E. sideroxylon</i> et <i>E. globulus</i>	110
Tableau 24: CL50 d'espèces d' <i>Eucalyptus</i> de différente région du monde.....	111
Tableau 25 : Acaricides les plus utilisés en Algérie.....	126

Liste des Figures

Figure 1 : Cellules sécrétrices de quelques huiles essentielles.....	6
Figure 2 : Isoprène [2-méthyl buta-1,3-diène].....	6
Figure 3 : Structures de quelques monoterpènes.....	8
Figure 4 : Diversité structurale des monoterpènes.....	8
Figure 5 : Structures de quelques sesquiterpènes.....	9
Figure 6 : Structures de quelques diterpènes.....	10
Figure 7 : 2, 6, 10, 14, 18- penta méthyl Eicosane.....	10
Figure 8 : Structure du squalène	10
Figure 9 : Structure chimique du β - Carotène.....	11
Figure 10 : Structure d'un polyterpène (caoutchouc naturel).....	11
Figure 11 : Structures de quelques composés aromatiques.....	12
Figure 12 : Structure de quelques arènes dérivées du phenylpropane	12
Figure 13 : Biosynthèse des constituants chimiques des huiles essentielles.....	15
Figure 14 : Biosynthèse des terpènes.....	19
Figure 15 : Montage d'extraction de type Clevenger	21
Figure 16 : Montage de l'entraînement à la vapeur.....	21
Figure 17 : Montage d'extraction par le CO ₂ critique.....	22
Figure 18 : Montage d'extraction assistée par micro-ondes.....	23
Figure 19 : Schéma de l'extraction par expression à froid.....	23
Figure 20 : Extracteur de Soxhlet et de Lichens-Nickerson.....	24
Figure 21 : Branche d' <i>Eucalyptus globulus</i> avec des fruits.....	32
Figure 22 : <i>Eucalyptus</i> à tronc qui se divise au sol : <i>Eucalyptus globulus</i>	32
Figure 23 : <i>Eucalyptus</i> à tronc unique : <i>Eucalyptus globulus</i>	33
Figure 24 : Mâle et femelle <i>Artémia</i>	40
Figure 25 : Morphologie d'une abeille.....	42
Figure 26 : Ruche Langstroth	44
Figure 27 : Différentes castes des abeilles	46
Figure 28 : Grandes étapes du développement communes aux trois castes d'abeille.....	47

Figure 29 : Représentation des deux espèces de <i>Varroa</i> : (a et b): vues dorsales et ventrales de <i>Varroa jacobsoni</i> , (c et d) : vues dorsales et ventrales de <i>V. destructor</i>	53
Figure 30 : <i>Varroa</i> femelle adulte.....	54
Figure 31 : <i>Varroa</i> mâle adulte.....	55
Figure 32 : <i>Varroa</i> sur abeille adulte.....	56
Figure 33 : Principales étapes du cycle de reproduction de <i>Varroa</i>	57
Figure 34 : Abeille avec des ailes déformées.....	58
Figure 35 : Abeille saine (à gauche) et abeille parasitée par <i>Varroa</i> (à droite) peu de temps avant l'éclosion.....	58
Figure 36 : Couvain d'ouvrières parasité par <i>V. destructor</i>	59
Figure 37 : Famille de <i>Varroa</i> dans une cellule. On aperçoit la tache blanche des excréments.....	59
Figure 38 : Schéma général de l'expérimentation.....	66
Figure 39 : Localisation de la région d'étude.....	67
Figure 40 : Forêt de Djebel El Ouahch.....	67
Figure 41 : Situation géographique de l'arboretum de Draa Naga.....	68
Figure 42 : Plan parcellaire de l'arboretum Draa Naga.....	69
Figure 43 : Arbre d' <i>Eucalyptus robusta</i>	70
Figure 44 : Feuilles et fruits d' <i>Eucalyptus robusta</i>	71
Figure 45 : Fleurs et feuilles d' <i>Eucalyptus sideroxylon</i>	71
Figure 46 : Fruits d' <i>Eucalyptus sideroxylon</i>	72
Figure 47 : Arbre d' <i>Eucalyptus sideroxylon</i>	72
Figure 48 : Arbre d' <i>Eucalyptus globulus</i>	73
Figure 49 : Feuilles et fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i>	73
Figure 50 : Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles.....	74
Figure 51 : Montage utilisé pour le test de létalité des crevettes de saumures.....	80
Figure 52 : Situation de la zone d'étude (Rucher Boufernana » (Gooble maps, 2018)..	81
Figure 53 : Diversité florale dans le rucher « Boufernana » (photo personnelle).	82
Figure 54 : Zone d'étude (Rucher « Boufernana » de la coopérative El Fadjr) (Photo personnelle).....	83
Figure 55 : Plateau grillagé (Photo personnelle).....	84

Figure 56 : Ruche Langstroth munie d'un plateau grillagé (Photo personnelle).....	84
Figure 57 : Lange retiré pour examen et comptage de <i>Varroa</i> (Photo personnelle).....	85
Figure 58 : Dépôt du mélange (huile essentielle-thymol) sur la languette (photo personnelle).....	86
Figure 59 : Languette est déposée sur le plateau grillagé sous les cadres de la ruche (Photo personnelle).....	86
Figure 60 : Languette sous les cadres de la ruche (Photo personnelle).....	87
Figure 61 : Chromatogramme de L'HE d' <i>E. robusta</i>	93
Figure 62 : Chromatogramme de l'HE d' <i>E.sideroxylon</i>	95
Figure 63 : Chromatogramme de l'He d' <i>E.globulus</i>	97
Figure 64 : Spectre de masse du 1,8-cinéole.....	105
Figure 65 : Spectre de masse de l' α -pinène	106
Figure 66 : Spectre de masse du (+) spathulenol.....	106
Figure 67 : Spectre de masse du camphene	106
Figure 68 : Spectre de masse du α -terpinéol.....	106
Figure 69 : Spectre de masse du 4-terpinéol.....	107
Figure 70 : Voie de fragmentation de α -pinène.....	108
Figure 71 : Voie de fragmentation du 1,8-cinéole.....	108
Figure72 : Arbre hiérarchique utilisant la Distance de Ward	109
Figure73 : Evolution de la chute de <i>Varroa</i> morts dans le Lot (1) traité par le mélange (HE Er+thymol).....	112
Figure74 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans le Lot (2) traité par (HE Er).....	113
Figure75 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans le Lot (7) traité par le (Thymol).....	114
Figure76 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans le Lot (8) le (Contrôle)....	115
Figure77 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> avec les différents traitements à l'HE Er exprimée en (moyenne \pm écart type).....	116
Figure 78 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> morts dans le lot (3) traité par le mélange (HE Es+thymol).....	117
Figure 79 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> morts dans le lot (3) traité par le mélange (HE Es)	118

Figure 80 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> avec les différents traitements à l'HE Es exprimée en (moyenne \pm écart type).....	119
Figure 81 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans le Lot (5) traité par le mélange (HE Eg+ thymol).....	120
Figure 82 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans le lot(6) traité par (HE Es).....	121
Figure 83 : Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> avec les différents traitements à l'HE Eg exprimée en (moyenne \pm écart type).....	122
Figure 84 : Nombre de <i>Varroa</i> morts pour les HEs associées au thymol de Er, Es et Eg exprimé en moyenne \pm écart type.....	123
Figure 85 : Nombre de <i>Varroa</i> morts pour les HEs des trois espèces Er, Es et Eg exprimé en moyenne \pm écart type.....	124

Liste des abréviations

Er	<i>Eucalyptus robusta</i>
Es	<i>Eucalyptus sideroxylon</i>
Eg	<i>Eucalyptus globulus</i>
HE	Huile essentielle
HE E	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i>
HE Er	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus robusta</i>
HE Es	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus sideroxylon</i>
HE Eg	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>
ISO	International Standard Organisation
AFNOR	Association Française de Normalisation
CPG/SM	Chromatographie en phase gaz couplée à une spectroscopie masse
BSL	Brine Shrimps Lethality test
NaCl	Chlorure de sodium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
CL50	Concentration létale médiane

Table des matières

Remerciements.....	i
Dédicace.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	x
Table des matières.....	xi
Introduction.....	1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les huiles essentielles

	4
1-1 Historique.....	
1-2 Définition des huiles essentielles.....	5
1-3 Localisation et répartition des huiles essentielles.....	5
1-4 Composition et biosynthèse des huiles essentielles.....	6
1-4-1 Constituants des huiles essentielles	6
1-4-2 Paramètres de variabilité des huiles essentielles.....	13
1-4-3 Biosynthèse.....	14
1-5 Notion de chémotype.....	20
1-6 Extraction des huiles essentielles.....	20
1-7 Fonction, propriété et utilisation des huiles essentielles.....	24
1-8 Analyse des huiles essentielles.....	26
1-8-1 Analyse des caractéristiques physicochimiques.....	26
1-8-2 Détermination de la composition des huiles essentielles par CPG/SM...	26

1-9 Toxicité des huiles essentielles.....	28
1-10 Conservation des huiles essentielles.....	28
1-11 Marché mondial des huiles essentielles.....	29

Chapitre II : Description des *Eucalyptus*

2-1 Description botanique.....	30
2-2 Propriétés et intérêts des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus</i>	33
2-3 Activités biologiques des <i>Eucalyptus</i>	35
2-4 Constituants des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus</i>	36
2-5 Evaluation de la toxicité des <i>Eucalyptus</i> par l'approche des Bio-essais.....	38
2-5-1 Test de Létalité des Crevettes de Saumures (Brine Shrimp Lethality Assay : BSL).....	39
2-5-2 Choix du solvant.....	40
2-5-3 Critères de test de toxicité	40

Chapitre III : La vie des abeilles

3-1 Description des abeilles.....	42
3-2 Abeilles Algériennes.....	43
3-2-1 Races autochtones	43
3-2-2 Races introduites	43
3-3 Communauté des abeilles.....	44
3-4 Ruche au fil des saisons.....	47
3-5 Rôle écologique de l'abeille.....	48
3-6 Miel et produits de la ruche.....	49
3-7 Maladies de l'abeille.....	50

Chapitre IV : Description du *Varroa destructor*

	52
4-1 Historique.....	
4-2 Morphologie de <i>Varroa destructor</i>	54
4-3 Cycle de vie de reproduction de <i>Varroa destructor</i>	55
4-4 Evolution de l'infestation de <i>Varroa destructor</i>	57
4-4-1 Effets du <i>V.destructor</i> sur l'abeille	57
4-4-2 Effet de <i>Varroa destructor</i> sur la colonie	59
4-5 Moyens de lutte contre le <i>Varroa destructor</i>	60
4-5-1 Evaluation de l'infestation par <i>Varroa destructor</i>	60
4-5-2 Lutte par traitements acaricides	61
4-5-3 Lutte par traitements alternatifs	61
4-5-4 Lutte par traitements mécaniques	63
4-5-5 Lutte contre <i>V. destructor</i> et axes de recherches	64
4-6 Apiculture et <i>Varroa destructor</i> en Algérie	64

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre V : Matériel et méthodes

I- Etude analytique

5-1 Localisation de la zone d'étude	67
5-2 Présentation botanique des <i>Eucalyptus</i>	70
5-2-1 <i>Eucalyptus robusta</i> Sm	70
5-2-2 <i>Eucalyptus sideroxylon</i> A. cunn	71
5-2-3 <i>Eucalyptus globulus</i> Labill.....	72
5-3 Analyses physicochimiques	74
5-3-1 Extraction des huiles essentielles	74
5-3-2 Détermination et calcul du rendement.....	75
5-3-3 Caractérisation physicochimique des huiles essentielles	75
5-4 Analyse des huiles essentielles par CPG/SM	78

II- Etude biologique

5-1 Test de létalité de la crevette de saumure (The Brine Shrimps Lethality Assay : BSL).....	79
5-2 Test antiparasitaire	80
5-2-1 Dispositif expérimental	83
5-2-2 Méthode de diagnostique	84
5-2-3 Mode d'utilisation des traitements (HE E +thymol, HE E et thymol).....	85
5-2-4 Tes t-Student.....	87

Chapitre VI: Résultats et discussions

6-1-Propriétés physico - chimiques	88
6-1-1 Paramètres organoleptiques.....	88
6-1-2 Rendement des huiles essentielles	88
6-1-3 Densité (d_{20}^{20})	88
6-1-4 Mesure de l'indice de réfraction n_D^{20}	89
6-1-5 Mesure de l'indice d'acide I_A	89
6-1-6 Miscibilité à l'éthanol.....	90
6-1-7 Identification du cinéole selon la pharmacopée Européenne 8 ^{ème} édition ...	90
6-1-8 Identification de l'HE d' <i>Eucalyptus</i> selon la pharmacopée Japonaise 16 ^{ème} édition.....	90
6-1-9 Discussion générale des propriétés physico-chimiques.....	90
6-2 Analyse chromatographique CPG/SM.....	93
6-2-1 Discussion générale sur l'analyse CPG-SM	100
6-2-2 Spectres de masse de quelques composés majoritaires des espèces Er, Es et Eg.....	104
6-2-3 Analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	109
6-2-4 Conclusion sur l'analyse CPG/SM	109
6-3 Etude biologique	110
6-3-1 Test de létalité de la crevette de saumure :(Brine Shrimps Lethality Assay: BSL).....	110

6-3-2 Test acaricide.....	111
6-3-2-1 Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans les lots traités par l’huile essentielle d’ <i>E. robusta</i>	112
6-3-2-2 Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans les lots traités par l’huile essentielle d’ <i>E. sideroxylon</i>	116
6-3-2-3 Evolution de la mortalité de <i>Varroa</i> dans les lots traités par l’huile essentielle d’ <i>E. globulus</i>	119
6-3-2-4 Synthèse du test acaricides pour les trois espèces étudiées <i>E. robusta</i> , <i>E. sideroxylon</i> et <i>E. globulus</i>	122
6-3- 3 Conclusion sur l’étude biologique	125
 Conclusion générale	 127
 Références bibliographiques	 130

Annexes

INTRODUCTION

Le monde végétal est une forteresse qui offre à l'Homme une immensité de trésors naturels. Des centaines de milliers d'années ont permis à la nature d'élaborer le règne végétal avec sa richesse et sa biodiversité ; richesse que l'Homme a utilisé pour se nourrir, se soigner, dans ses rites religieux et pour ses besoins médicaux. Ainsi donc, la phytothérapie ou l'utilisation des plantes pour le traitement des maladies est très ancienne, elle a évolué avec l'histoire et la civilisation de l'humanité.

Selon ARMELIN (1974), la phytothérapie ou la thérapie par les plantes est la première thérapeutique connue ; elle reste la base de l'ensemble de la thérapeutique utilisée de nos jours. En phytothérapie et en aromathérapie, les huiles essentielles sont utilisées dans le traitement de nombreuses maladies ; l'intérêt accru de la population pour les produits de santé naturels, a contribué au développement de l'industrie de ces huiles. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), 80% de la population mondiale a recours aux médecines traditionnelles, et par conséquent aux huiles essentielles, pour satisfaire aux besoins en soins et en santé primaire. [Namiki, 1990; Angharad Rees, 2011].

Les huiles essentielles peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques [Bardeau, 2009 ; Hamid et al., 2011], mais aussi comme matière première pour la synthèse de principes actifs [(OMS), 1998 ; Goetz, 2007], elles possèdent de nombreuses propriétés qui indiquent leur immense importance. Elles peuvent être : anti-infectieuses, anti-inflammatoires, antispasmodiques, antimicrobiennes, anti-oxydantes, cytotoxiques et anticancéreuses [Ait M'barek et al., 2007 ; Inouye et Abe 2007 ; Steflitsch 2008 ; Bardeau, 2009 ; Le Hir et al., 2009]. Ce sont des agents antimicrobiens à large spectre [Randhawa et al., 2001], elles ont des activités insecticides [Ünlü et al., 2002 ; Ayvaz et al., 2010] et sont utilisées comme pesticide dans la lutte biologique contre les ravageurs.

Les bio pesticides à partir des huiles essentielles, sont caractérisés par leur faible rémanence, leur faible toxicité pour l'Homme et leur mode d'action sur les ravageurs [Miresmailli et al., 2006 ; Koul et al., 2008 ; Shahi et al., 2009]. L'un des ravageurs les plus néfaste est sans doute le *Varroa destructor*, acarien parasite de l'abeille domestique *Apis mellifera*, il provoque des pertes économiques importantes

en apiculture et il est l'une des causes qui ravage le cheptel apicole en Algérie et dans le monde [Brodschneider et al., 2010 ; Chauzat et al., 2010 ; Guzman-Nova et al., 2010 ; Vanengels et al., 2011, Adjlane et al., 2012].

L'Algérie possède une flore variée de par sa situation géographique, cette richesse s'explique par l'étendue de sa surface constituée par des écosystèmes de type méditerranéen, steppique et saharien. Environ 3139 espèces sont décrites par Quezel et Santa (1962); Zeraia dénombre quant à lui à peu près 168 espèces endémiques spécifiques de l'Algérie. Toutefois certaines espèces introduites se sont bien adaptées à ces différents écosystèmes, et ont proliférées de manière naturelle pour constituer une essence forestière de premier ordre ; c'est le cas de l'*Eucalyptus*, introduit par les français vers 1850 [Chevalier, 1952]. Le genre *Eucalyptus* de la famille des Myrtacées dont les espèces sont riches en huiles essentielles, compte plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral Algérien ainsi que dans ses régions internes [Benazzedine, 2010 ; INRF 1996].

L'objectif de notre travail est de mettre en évidence l'importance et la diversité de la flore Algérienne, en étudiant la composition chimique et la toxicité de trois espèces d'*Eucalyptus* : *E.robusta*, *E.sideroxylon* et *E.globulus*, de faire ressortir leur action acaricide et antiparasitaire sur le *Varroa destructor* et ce, dans l'espoir de contribuer à la mise au point d'une stratégie de lutte contre cet acarien à base de produits naturels, sans inconvénients majeurs sur l'abeille, la ruche, le miel et le bioclimat.

La première partie de notre travail est une synthèse bibliographique qui regroupe quatre chapitres. Le premier présente les huiles essentielles, leurs origines, leurs caractéristiques, et leurs importances dans différents domaines. Le deuxième chapitre est consacré au genre *Eucalyptus* où on procède à une description botanique, ensuite nous détaillons ses propriétés et les domaines de son utilisation ; nous abordons par la suite l'évaluation de la toxicité des *Eucalyptus* par l'approche des bio-essais, en utilisant le test de létalité de la crevette de saumure (BSL : Brine Shrimp Lethality Assay). Le troisième chapitre parle de la vie de l'abeille domestique *Apis mellifera* et le quatrième de l'acarien *Varroa destructor*.

La deuxième partie est la partie expérimentale, elle comporte le cinquième chapitre qui décrit les méthodes et le matériel utilisés dans ce travail, et le sixième chapitre traite les résultats obtenus et leur discussion.

Enfin une conclusion générale clos ce manuscrit accompagnée par des perspectives s'ouvrant sur de nouvelles voies à prospecter concernant les huiles essentielles d'*Eucalyptus* et le *Varroa destructor* des abeilles.

Première partie

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I

Généralités sur les huiles essentielles

1-1 Historique

L'histoire des huiles essentielles remonte à des temps très anciens. Il y a des milliers d'années, les aborigènes d'Australie (4000 av J.-C.) ainsi que les chinois utilisaient déjà les plantes aromatiques pour leurs vertus médicinales par fumigations ou en cataplasmes, mais elles n'étaient pas encore distillées en huiles essentielles. Ce sont les égyptiens qui les premiers, fabriquaient les machines à distiller pour produire l'huile de bois de cèdre qui mélangée à d'autres produits servait à embaumer les morts ; ils intégraient aussi les huiles essentielles dans la fabrication de leurs cosmétiques et de leurs parfums ; les grecs eux utilisaient un parfum appelé « mageleion » comme anti-inflammatoire et pour cicatriser les blessures.

Les perses semblaient avoir inventé le procédé de distillation 1000 ans av J.-C., toutefois il faudra attendre 2000 ans, et la venue du célèbre médecin et philosophe Ibn Sinna « Avicenne » (980-1037) pour produire la première huile essentielle pure ; c'était l'huile essentielle de roses.

Les huiles essentielles furent ainsi étroitement associées à la médecine grâce à Ibn Sinna « Avicenne » et à la distillation des huiles essentielles pures qui donna un nouvel essor à la médecine par les plantes.

Au début du XX^{ème} siècle, un français du nom de René Maurice Gattefossé (1881-1950), s'investit dans l'étude des huiles essentielles et de leurs vertus médicinales, c'est le père de l'aromathérapie. En se brûlant les mains lors d'une explosion au laboratoire, il eut le réflexe génial de plonger ses mains dans un récipient rempli de l'huile essentielle de lavande ; la plaie guérit très vite et étonné, il décida alors d'étudier les huiles essentielles et leurs propriétés.

Au fil des temps, l'aromathérapie prend plus d'ampleur dans la vie quotidienne et les gens s'intéressent de plus en plus aux moyens naturels, pour soulager leurs corps et apaiser leurs esprits, sans recourir aux médicaments et leurs effets secondaires souvent néfastes, les huiles essentielles leur offrent ce moyen.

1-2 Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles, communément appelées « essences » sont des mélanges de composés aromatiques des plantes qui sont extraites par distillation, par la vapeur d'eau ou par des solvants [Smallfield, 2001]. La norme AFNOR NTF 75-006- 5 février 1998 (Association Française de la normalisation), a donné la définition suivante d'une huile essentielle : « Produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation sèche ». L'huile essentielle est ensuite séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques, pour les deux premiers modes d'obtention, elle peut subir des traitements physiques n'entraînant pas de changement significatif de sa composition [Bruneton, 2008].

1-3 Localisation et répartition des huiles essentielles

Les huiles essentielles se situent dans toutes les parties vivantes de la plante et elles se forment dans le cas le plus simple dans le cytosol des cellules ; ou elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles [Charabot et al., 1899], soit elles s'accumulent dans les vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophyle de nombreux pétales [Gerhard, 1993]. D'autres structures spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante, sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles, ces structures regroupent les poils et canaux sécréteurs et les poches sécrétrices [Bruneton, 1999].

Les huiles essentielles peuvent être stockés dans tous les organes végétaux : les fleurs (bergamotiers, rose, oranger...), les sommités fleuries (tagète, lavande, menthe...), les feuilles (citronnelle, Eucalyptus...), les racines (vétiver), les fruits (poivre, fenouil...), le bois (bois de rose, santal, camphrier...) ou les graines (muscades, coriandre...) (Figure : 1).

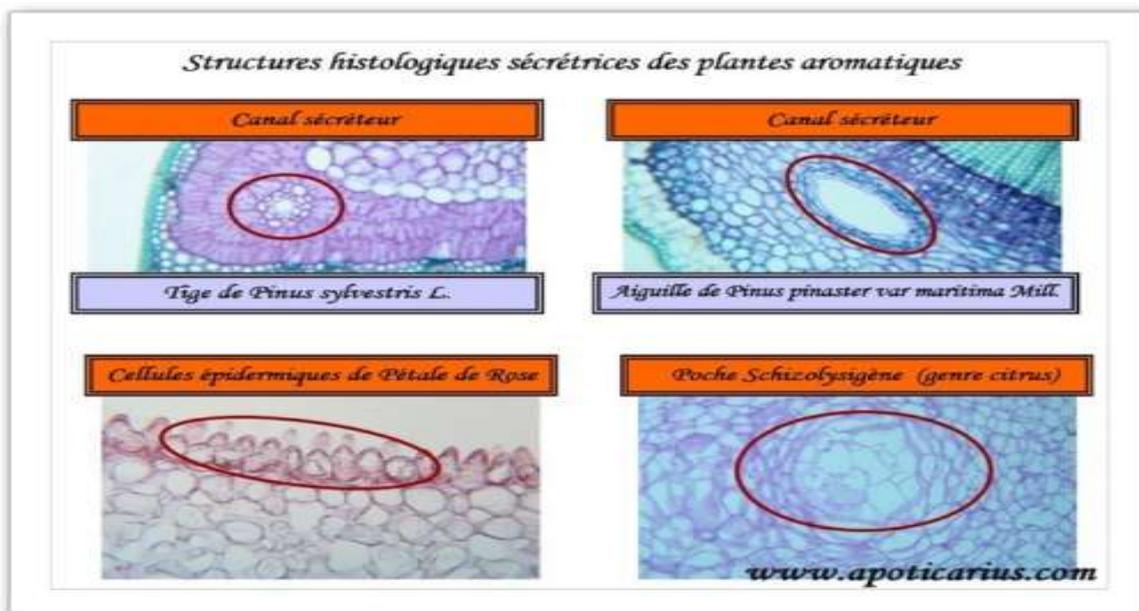


Figure 1: Cellules sécrétrices de quelques huiles essentielles

1-4 Composition et biosynthèse des huiles essentielles

1-4-1 Constituants des huiles essentielles

L'étude de la composition chimique des huiles essentielles révèle, qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes, ce sont : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phenyl propane [Gildo, 2006].

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. Le nom terpène vient du mot allemand **Terpen** [1866] provenant de Das Terpentin : la térébenthine, l'emprunt francisé terpène date de la fin du XIX^{ème} siècle [1871].

La formule brute des terpènes est $[(C_5H_8)_n]$, n peut prendre les valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes ou il peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La formule de base est l'isoprène C_5H_8 (Figure : 2). Le terme terpénoïdes désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques [alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone...].

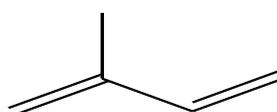


Figure 2: Isoprène [2-méthyl buta-1,3-diène]

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires [avec les flavonoïdes et les alcaloïdes]. Leur classification est basée sur le nombre de répétition de l'unité de base isoprène, on a ainsi :

- Hemiterpènes C_5
- Monoterpènes C_{10}
- Sesquiterpènes C_{15}
- Diterpènes C_{20}
- Sesterpènes C_{25}
- Triterpènes C_{30}
- Tétraterpènes et polyterpènes C_{40}

• Hemiterpènes C_5

Dans la nature, il existe peu de composés naturels ayant une formule de C_5 ramifiée, parmi certains composés naturels trouvés chez les plantes qui peuvent être considérés comme Hemiterpènes, seul l'isoprène a toutes les caractéristiques biogénétiques des terpènes [Loomis et Croteau, 1980].

• Monoterpènes C_{10}

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes, dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage « tête-queue ». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (Figures : 3, 4).

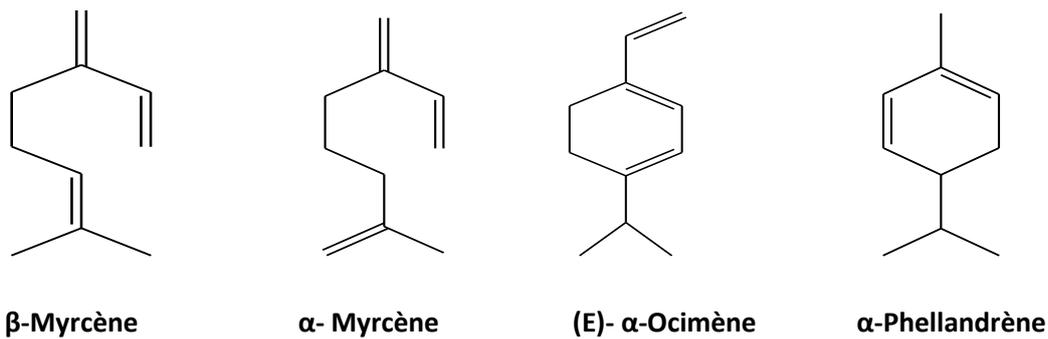


Figure 3: Structures de quelques monoterpènes

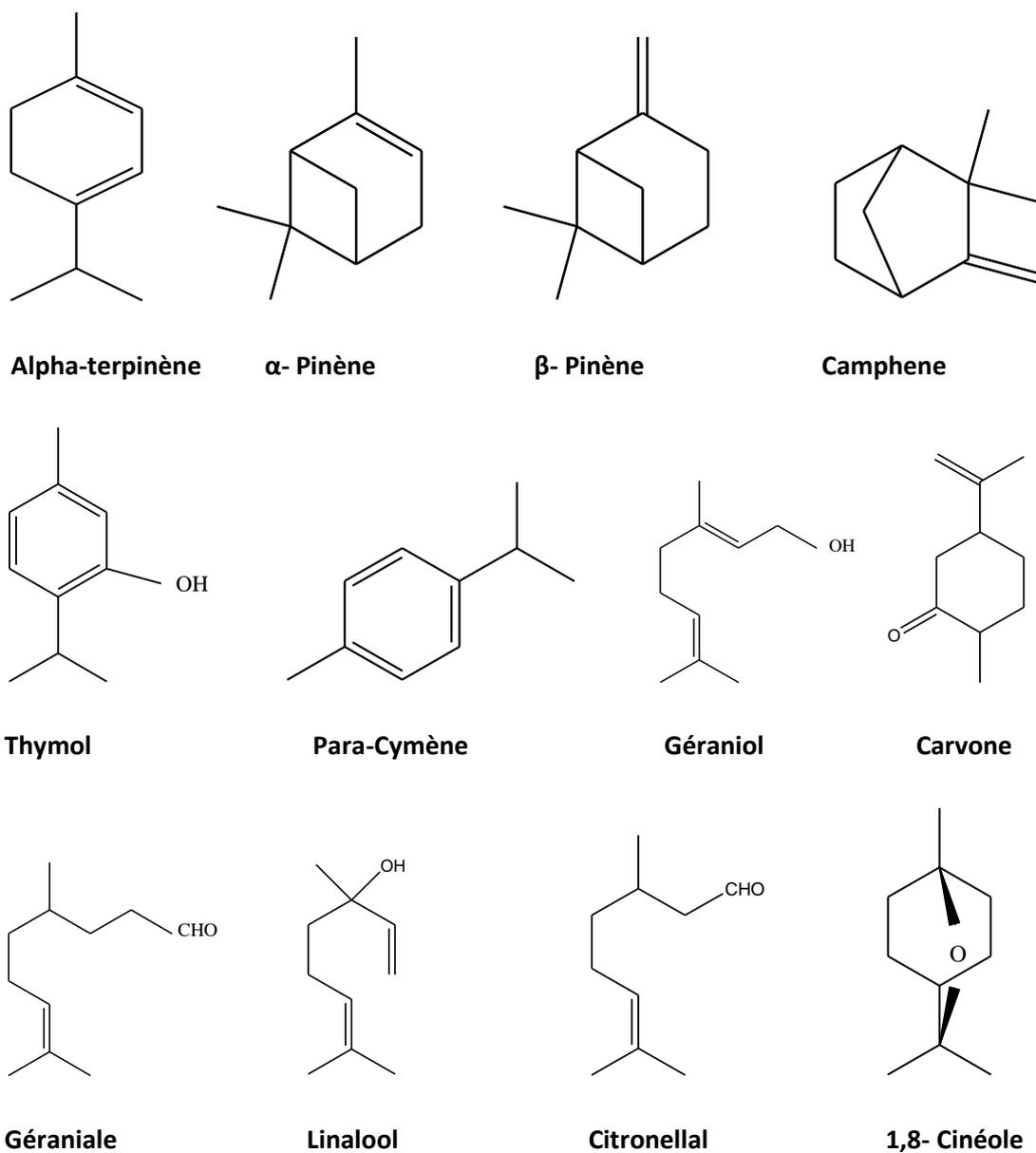


Figure 4: Diversité structurale des monoterpènes

• Sesquiterpènes C₁₅

Ils représentent la classe la plus diversifiée des terpènes puisqu'elle contient plus de 3000 molécules. Les sesquiterpènes se divisent en plusieurs catégories structurales : acycliques, bicycliques, tricycliques et polycycliques (Figures : 5).

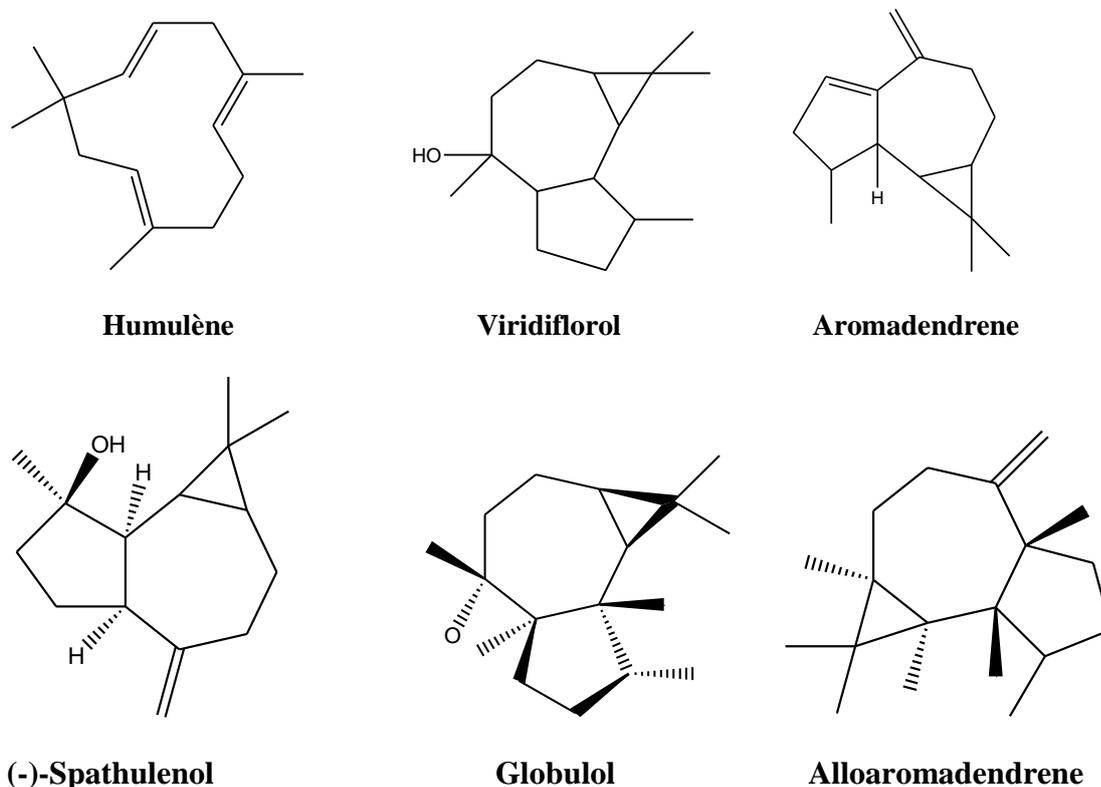
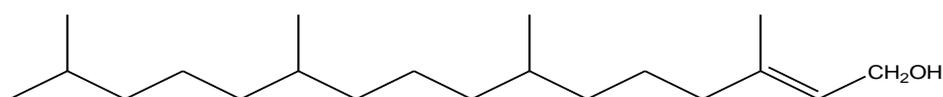


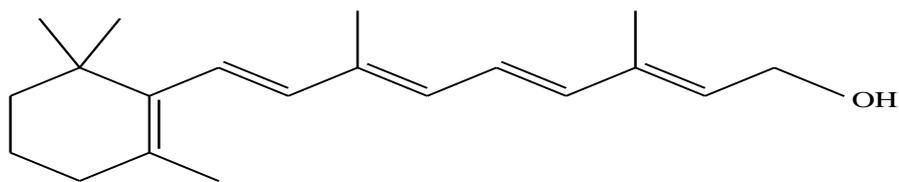
Figure 5 : Structures de quelques sesquiterpènes

• Diterpènes C₂₀

Il existe environ 2700 diterpènes dans la nature, la majorité est sous forme cyclique. Parmi les diterpènes linéaires, on rencontre la famille Phytane dont le phytol est le représentant le plus connu dans la chlorophylle ou dans les vitamines K et E. Les diterpènes cycliques sont des dérivés du cyclophytane, le rétinol et le rétinol deux formes de la vitamine A, sont les plus connus de cette famille (Figure : 6).

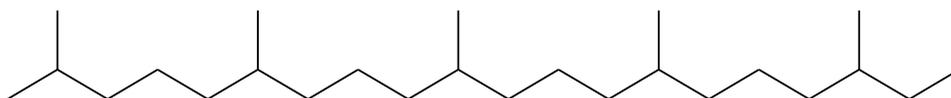


Phytol

**Rétinol****Figure 6 : Structures de quelques diterpènes**

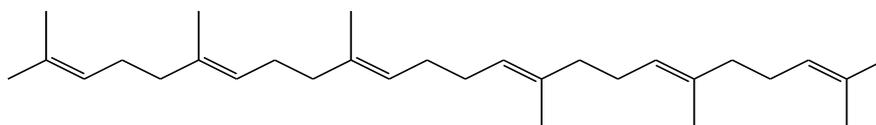
- **Sesterpènes C₂₅**

Il existe plus de 150 Sesterpènes bien connus, parmi lesquels une trentaine possède la structure du furfurane, dérivé du : 3, 7, 11, 15, 19 - penta méthyl Eicosane. Plutôt rares dans la nature, ils peuvent être linéaires ou cycliques (Figure : 7).

**Figure 7 : 2, 6, 10, 14, 18- penta méthyl Eicosane**

- **Triterpènes C₃₀**

Il existe plus de 1700 Triterpènes dans la nature, dont la majorité est sous forme tétra cyclique ou penta cyclique. La forme acyclique étant très rare. Le squalène (triterpène acyclique) est le précurseur des autres triterpènes et aussi des stéroïdes végétaux. La plupart des triterpènes sont des alcools sous forme libre, ou glycosides (les saponines) ou esters. Les triterpènes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux (Figure : 8).

**Figure 8 : Structure du squalène**

- **Tétraterpènes C₄₀**

Les caroténoïdes sont des Tétraterpènes, les plus typiques étant les apocaroténoïdes et les diapocaroténoïdes (Figure : 9).

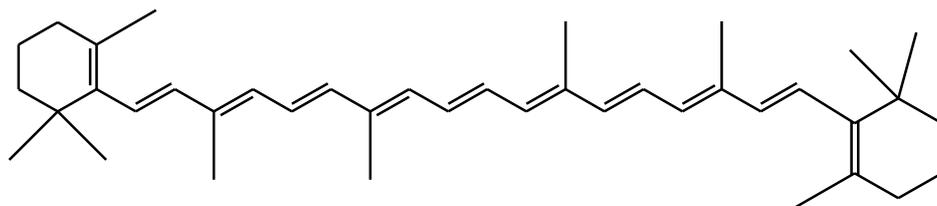


Figure 9 : Structure chimique du β - Carotène

• Polyterpènes

Ils se composent en général de plus de huit unités d'isoprène ; ils se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis et trans. Le cis poly-isoprène se trouve dans le caoutchouc indien, alors que le trans poly-isoprène est la partie principale de gutta-percha. Les vitamines K1 et K2 et la vitamine E sont des polyterpènes comptant plus de 10 unités d'isoprène (Figure : 10).

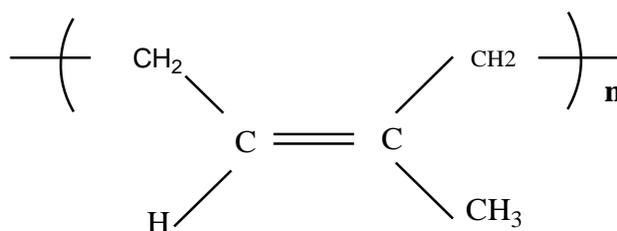


Figure 10 : Structure d'un polyterpène (caoutchouc naturel).

• Composés aromatiques

Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane sont moins fréquents, mais néanmoins très importants: eugénole, anéthole, vaniline etc. (Figure : 11)

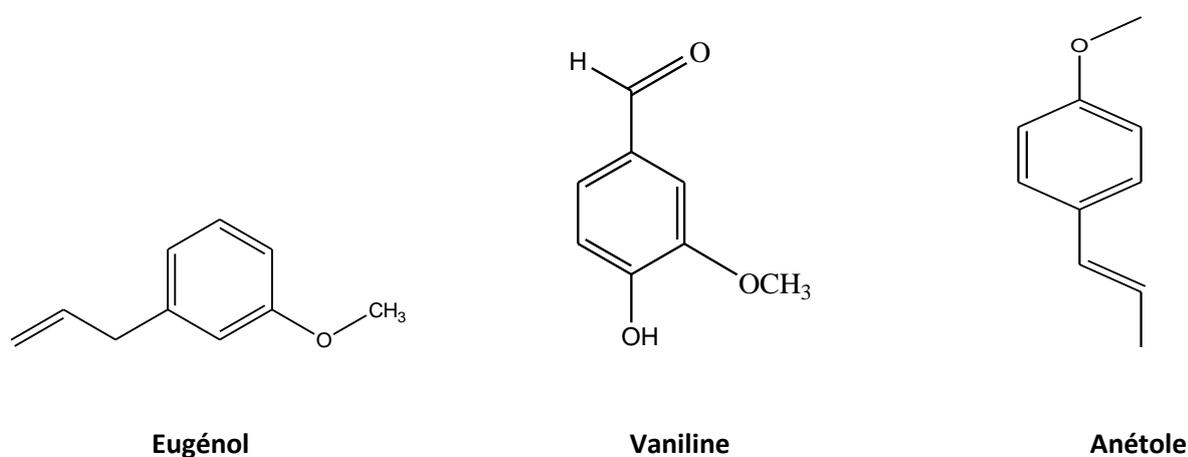


Figure 11 : Structures de quelques composés aromatiques

Ces composés aromatiques constituent un ensemble important, car ils sont généralement responsables des caractères olfactifs et organoleptiques des huiles essentielles : par exemple, l'eugénol est responsable de l'odeur du clou de girofle (*Syzygium aromaticum*) [Hurtel, 2006].

• Composés d'origines diverses

Ce sont des produits résultants de la transformation de molécules non volatiles. Ces composés contribuent aux arômes de fruits. Compte tenu de leur mode de préparation, les concrètes et les absolues peuvent en renfermer. Il en est de même pour les huiles essentielles, lorsqu'elles sont entraînaibles par la vapeur d'eau [Bruneton, 1999] (Figure : 12).

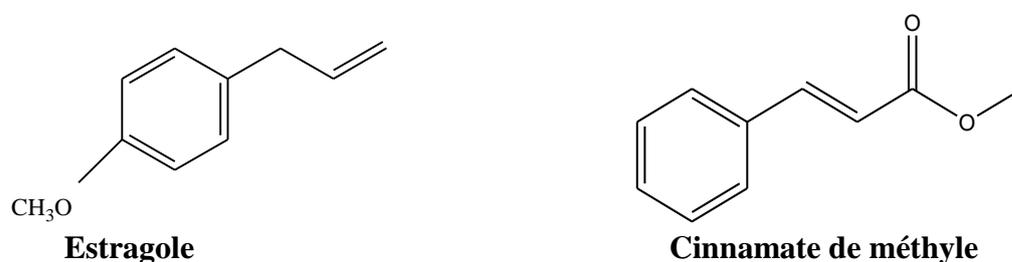


Figure 12 : Structure de quelques arènes dérivées du phenylpropane

Il est important de signaler que parmi les HE, on peut rencontrer des huiles que l'on pourrait qualifier de simples (riches en un composé prépondérant) ; de complexes (ne possédant aucun composé prépondérant) et tous les intermédiaires sont possibles. L'un des exemples typiques d'une huile simple est celui de l'huile de girofle qui contient au moins 80 % d'eugénol et de petites quantités d'autres produits. Le cas extrême de complexité peut être illustré par l'huile de vétiver (*Vetiveria zizanoides*) qui contient une centaine de composants [Boutamani, 2013].

1-4-2 Paramètres de variabilité de la composition des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent une très grande variabilité, au niveau de leur composition ainsi que sur le plan du rendement des plantes d'origines. Cette variabilité est fondamentale car les activités biologiques qui découlent des huiles essentielles peuvent être différentes [Garnéro, 1991 ; Bruneton, 1999 ; Benini, 2007]. Cette variabilité peut s'expliquer par différents facteurs d'origine intrinsèque, spécifiques du bagage génétique de la plante ou extrinsèque ; liés aux conditions de croissance et de développement de la plante.

• Facteurs intrinsèques

Une huile essentielle doit être rapportée au matériel botanique d'où elle est issue pour éviter toute dénomination trompeuse du matériel [Bruneton, 1999]. L'influence du stade végétatif [Garnéro, 1991 ; Bruneton, 1999 ; Aprotosoie et al., 2010], l'organe de la plante [Chowdhury et al., 2009], les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie [Garnéro, 1991] et le polymorphisme chimique [Garnéro, 1991 ; Belyagoubi, 2006] sont les principaux facteurs intrinsèques qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles.

• Facteurs extrinsèques

Les conditions environnementales influencent aussi la composition des huiles essentielles. La température, la lumière, la pluviométrie et les conditions édaphiques représentent des causes potentielles de la variation de la composition chimique d'une plante aromatique donnée [Bruneton, 1999 ; Olle et Bender, 2010]. L'origine géographique [Mohammedi, 2006 ; Marzoukia et al., 2009], les conditions de culture telles que : la date de récolte, l'emploi d'engrais, et les techniques de récolte influencent aussi la composition et le rendement des huiles essentielles [Benini, 2007 ; Aprotosoie et al., 2010].

L'instabilité des constituants des huiles essentielles explique que la composition du produit obtenu par hydrodistillation, soit le plus souvent différente de celle du mélange présent dans le végétal. Pendant l'hydrodistillation, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire l'hydrolyse des esters, des isomérisations, des oxydations, etc. [Lucchesi, 2005].

La méthode d'extraction, et l'état du matériel végétal [Bruneton, 1999 ; Pinto et al., 2006 ; Benini, 2007] ; ainsi que le stockage du végétal avant distillation [Besombes, 2008] influent aussi sur la composition et le rendement des huiles.

1-4-3 Biosynthèse

Les principales familles des produits naturels qui se retrouvent comme constituants principaux, des huiles essentielles sont les terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérant dans la plupart des essences, et les composés aromatiques dérivés du phenyl propane. Tous ces produits émanent de la photosynthèse comme le montre la figure : I-15. La biosynthèse des huiles essentielles se fait selon deux principales voies [Mann, 1987] :

- La voie des phenylpropanoïdes qui aboutit à un très grand nombre de substances aromatiques via une série d'acide, dont l'acide shikimique d'où son nom de : **voie shikimique**, et de l'acide cinnamique. Les métabolites terminaux importants de cette voie sont : les acides aromatiques suivants : salicylique, cinnamique et benzoïque ainsi que leurs dérivés esters, certains phénols (eugénols) et les coumarines. Quelques grandes familles chimiques de molécules non volatiles comme les tannoïdes et les flavonoïdes se trouvent incluses dans cette voie [Spurgeon et Porter, 1981].
- La voie des terpénoïdes, en effet les terpènes sont issus d'une voie métabolique secondaire de l'acide mévalonique nommé aussi : **la voie mévalonique** [Henrich et al., 1983], leur biosynthèse végétale prend son origine au niveau de l'acétyl-coenzyme A, l'acide pyruvique produit du métabolisme des sucres se transforme en acétyl-coenzyme A (Figure : 13). L'étude des mécanismes réactionnels régissant la biosynthèse des terpènes a montré l'existence de plusieurs étapes [Lamarti et al., 1994].

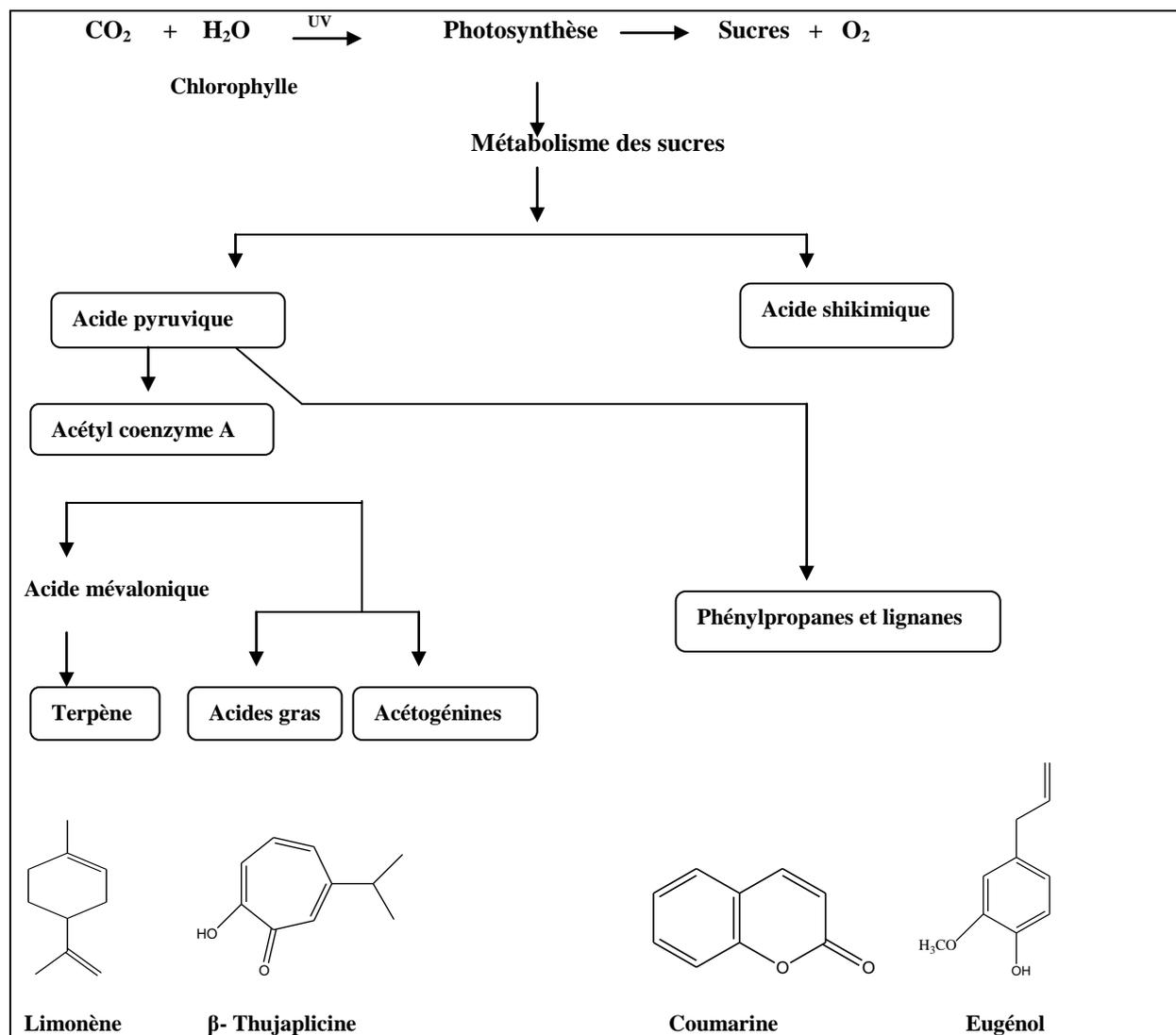


Figure 13 : Biosynthèse des constituants chimiques des huiles essentielles.
[Garneau, 2004]

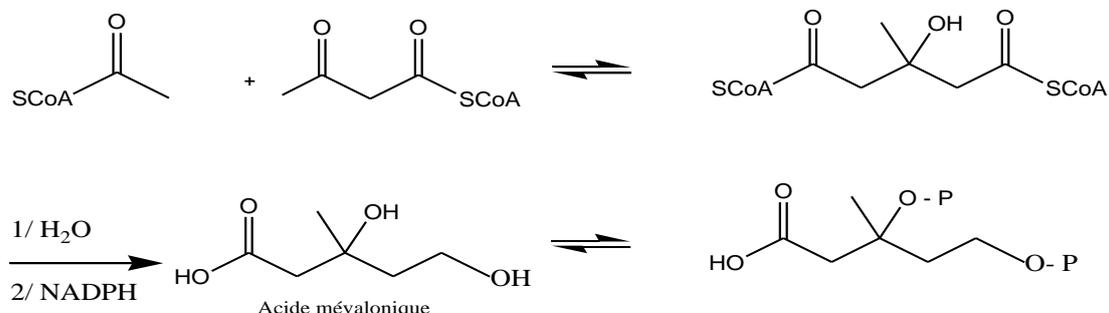
La première étape est une condensation de type Claisen entre deux molécules d'acétyl-coenzyme A conduisant à l'acétoacétylCoA [Nait Achour, 2012].

Première étape :



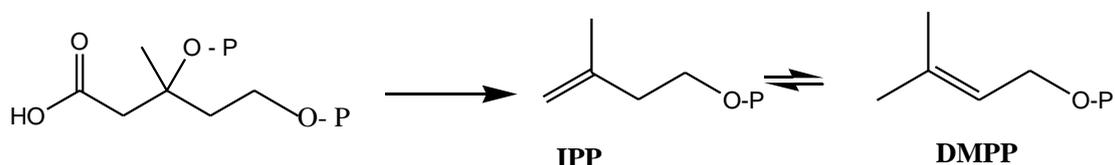
La deuxième étape est une réaction d'aldolisation entre une 3^{ème} molécule d'acétylCoA et l'acétoacétylCoA. L'hydrolyse et la réduction par NADPH (Nicotine Adénine Dinucléotide) conduisent alors à l'acide mévalonique.

Deuxième étape



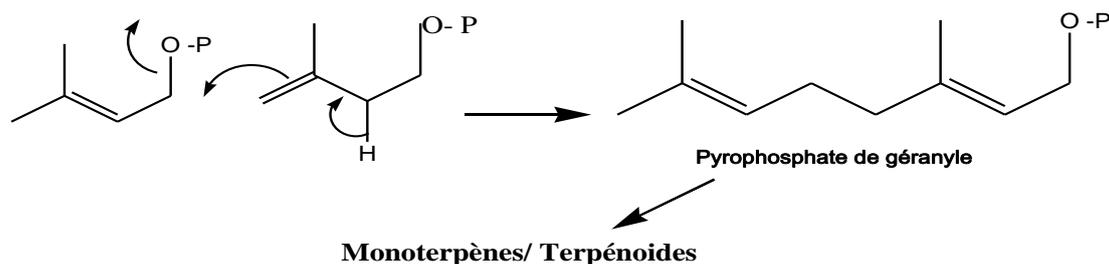
Une pyrophosphorylation par ATP (Adénosine Triphosphate), suivi d'une déshydratation et d'une décarboxylation par une élimination concertée permettent d'atteindre les deux intermédiaires en C₅, qui sont les bio-précurseurs des terpènes, le pyrophosphate d'isopentenyl (IPP) qui est en équilibre par simple transfert de proton avec le pyrophosphate de diméthylallyl (DMPP).

Le pyrophosphate d'isopentenyl (IPP) et le pyrophosphate de diméthylallyl (DMPP).



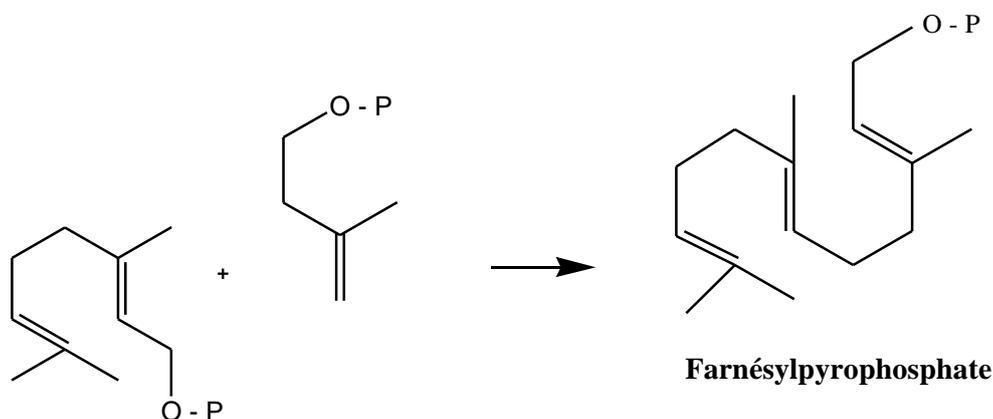
Le pyrophosphate d'isopentenyl (IPP) réagit alors avec le pyrophosphate de diméthylallyl (DMPP) pour donner le pyrophosphate de géranyl (GPP), qui est le point de départ de tous les monoterpènes et les terpénoïdes [NAIT ACHOUR, 2012].

Le pyrophosphate de géranyl (GPP) point de départ des monoterpènes:



Le pyrophosphate de farnésyl (FPP) qui est le point de départ de tous les sesquiterpènes est obtenu par la condensation entre le pyrophosphate d'isopentenyl (IPP) et le pyrophosphate de géranyl (GPP).

Le pyrophosphate de farnésyl (FPP) point de départ des sesquiterpènes :



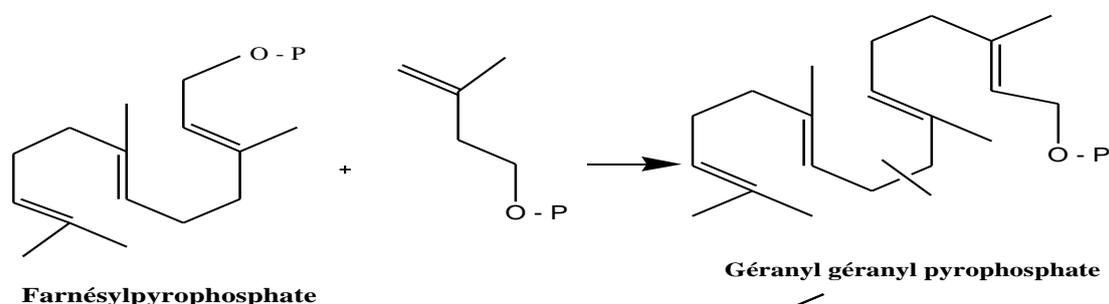
Géranylpyrophosphate

Farnésylpyrophosphate

Sesquiterpènes/Terpénoïdes

Le géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP) qui est le point de départ de tous les diterpènes, est obtenu par la condensation entre un pyrophosphate d'isopentenyl (IPP) et un pyrophosphate de farnésyl (FPP).

Le géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP) point de départ des diterpènes :



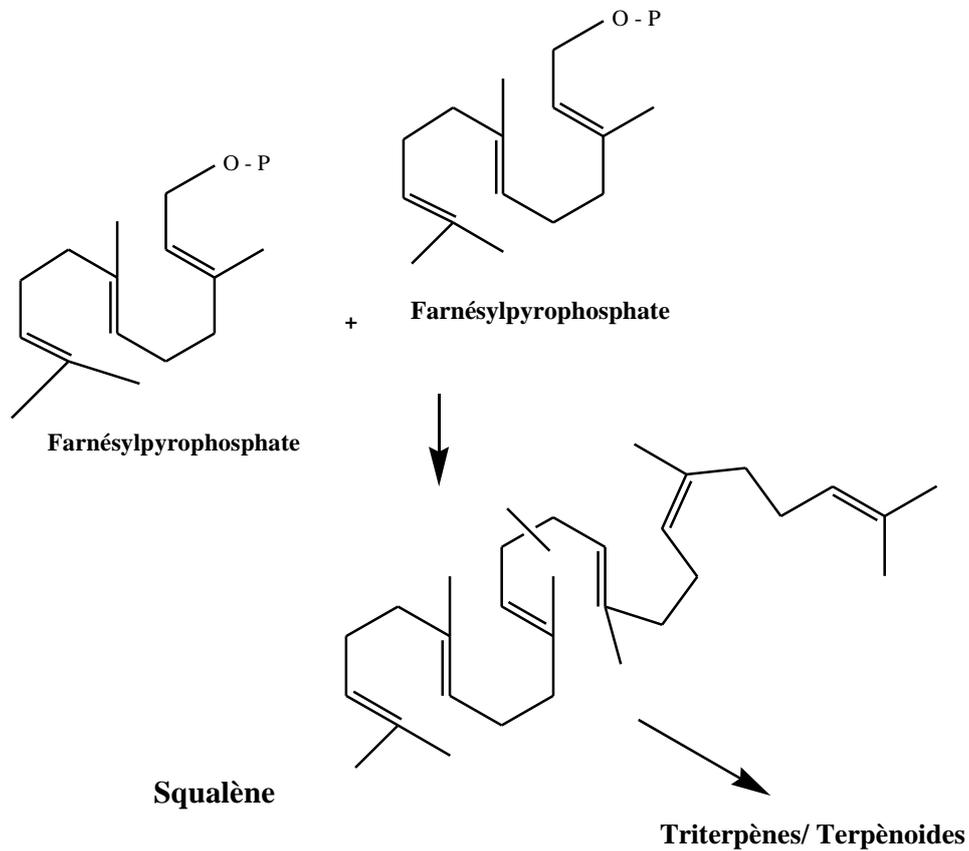
Farnésylpyrophosphate

Géranyl géranyl pyrophosphate

Diterpènes / Terpénoïdes

La dimérisation réductive à l'aide de NADPH de deux unités de pyrophosphate de farnésyl (FPP) ou géranyl-géranyl pyrophosphate (GGPP) conduit à la formation des tri et tétra terpènes.

La formation des tri et tétra terpènes :



Les différentes étapes de la biosynthèse des terpènes sont illustrés par la Figure : 16 [Erman, 1985 in Nait Achour, 2012].

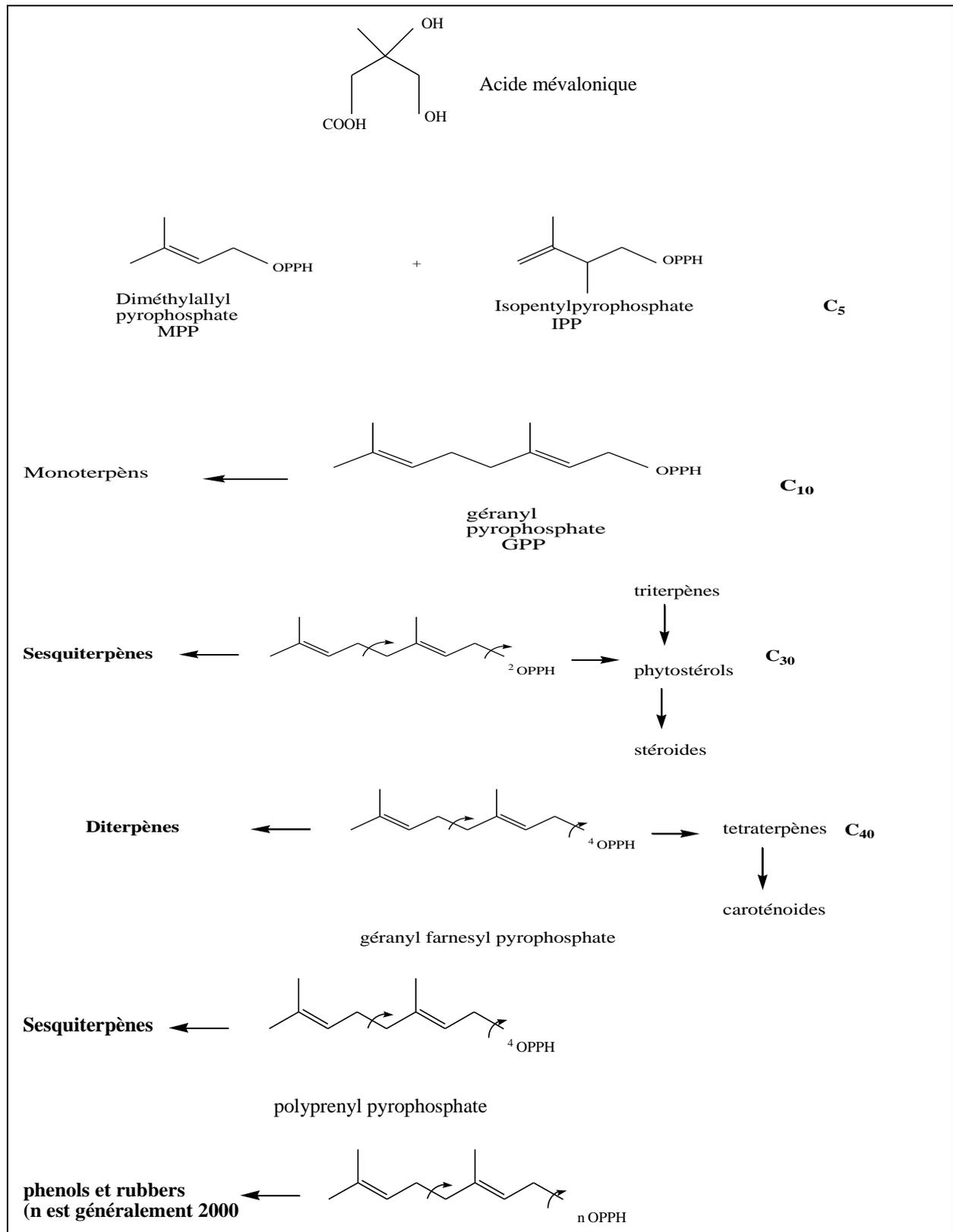


Figure 14 : Biosynthèse des terpènes [Erman, 1985 in Nait Achour, 2012]

1-5 Notion de chémotype

La composition chimique de l'huile essentielle de certaines plantes peut varier à l'intérieur d'une même espèce, ces variétés chimiques sont communément appelées : **Chémotype**. Le mot chémotype est dérivé de chimiotype ou chimiovariété. Cette variation peut se présenter d'un peuplement à l'autre ou d'un individu à l'autre ; elle peut être due à des facteurs exogènes comme : l'ensoleillement, la nature des composants du sol, la température et l'altitude, et au facteur endogène : la composition génétique des individus. Par exemple le basilic cultivé en pleine lumière à Madagascar a un taux de chavicol de 57 %, alors que la même plante cultivée à l'abri de la lumière en contient 74 % [Franchomme et Penoel, 1990].

Cette variabilité peut être influencée également par la situation géographique, l'*Eucalyptus globulus* récolté au Brésil possède un taux de cinéole de 83,9 % [Maciel et al. 2010], alors que la même plante récoltée en Algérie a un taux de 48,6 % [Daroui et al. 2010].

1-6 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (environ 1%) ; ce qui les rend des substances fragiles, précieuses et rares. Il existe différentes méthodes pour les extraire, le choix de la méthode la plus adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction [Samate Abdoul, 2001].

• Hydrodistillation

Méthode la plus anciennement utilisée, on immerge la matière végétale dans un ballon rempli d'eau placé sur une source de chaleur. On porte à ébullition, les vapeurs chargées de molécules odorantes sont condensées dans un réfrigérant et les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Le système généralement utilisé pour l'extraction est le Clevenger. La durée d'une hydrodistillation peut atteindre plusieurs heures selon le matériel végétal utilisé (Figure : 15).



Figure 15 : Montage d'extraction de type Clevenger.

<https://www.phytochemia.com> (consulté en 2017)

• Entraînement à la vapeur

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles, elle ne met pas en contact direct le végétal et l'eau. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située sur une grille. Le mélange huile essentielle-eau est véhiculé vers le condensateur et l'essencier, ensuite il est séparé en eau et huile. L'absence de contact entre l'eau et le végétal évite les phénomènes de dégradation (Figure : 16).

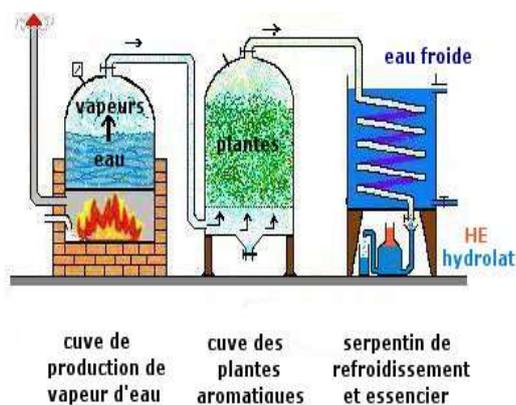


Figure 16 : Montage de l'entraînement à la vapeur.

www.inconscients.com (consulté en 2017)

● Extraction par CO₂ supercritique

Elle est fondée sur la solubilité des constituants dans le dioxyde de carbone à l'état liquide supercritique. Le CO₂ permet l'extraction dans le domaine liquide et la séparation dans le domaine gazeux. Le CO₂ est liquéfié par refroidissement et comprimé à la pression d'extraction choisie, il est ensuite injecté dans l'extracteur qui contient le végétal puis le liquide se détend pour se convertir à l'état gazeux pour être conduit vers un séparateur où il sera séparé en extrait et en solvant. L'avantage de cette méthode est d'éliminer et de recycler le solvant et les températures basses ne sont pas agressives pour les constituants les plus fragiles. Cette technique est utilisée pour les essences difficiles à distiller [Martini et Seiller, 1999] (Figure : 17).

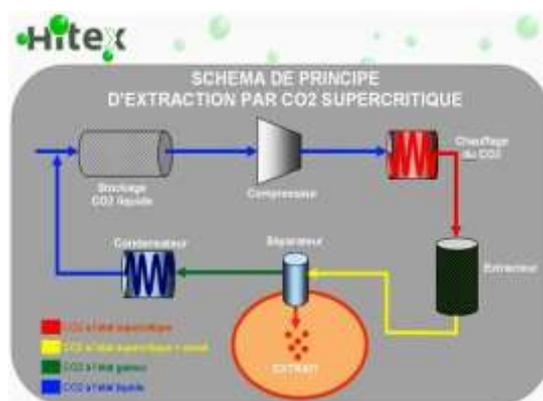


Figure 17 : Montage d'extraction par le CO₂ critique

<http://tpe-huile-essentielle.e-monsite.com> (consulté en 2017)

● Extraction assistée par micro-ondes

Elle a été développée au cours des dernières décennies à des fins analytiques [Wang et al., 2006]. La technique consiste à irradier par micro-ondes le végétal broyé en présence du méthanol, solvant qui absorbe fortement les micro-ondes ce qui permet l'extraction des composés polaires ou bien en présence de l'hexane qui n'absorbe pas les micro-ondes ce qui permet l'extraction des composés apolaires. L'ensemble est chauffé sans atteindre l'ébullition durant de courtes périodes entrecoupées par des étapes de refroidissement. Cette méthode permet d'obtenir de bon rendements d'extrait, et de réduire considérablement la durée de la distillation (Figure : 18).

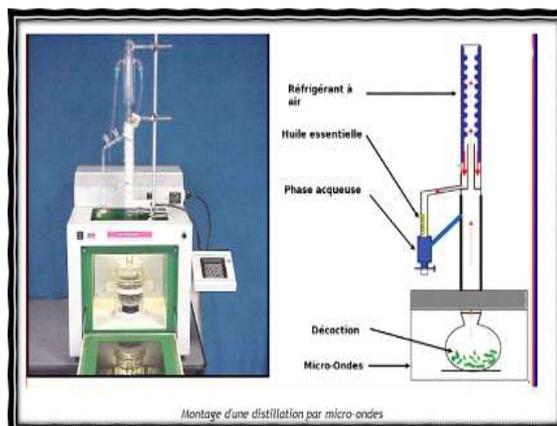
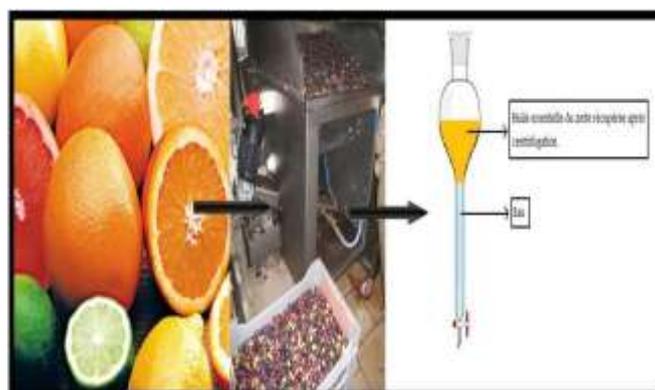


Figure 18 : Montage d'extraction assistée par micro-ondes.
(Source : Boutayeb, 2013)

• L'expression à froid

Réservée aux écorces d'agrumes, elle consiste à briser mécaniquement les cellules sécrétrices pour récupérer les précieux liquides. Ce procédé réalisé à température ambiante, consiste à dilacérer (procéder à de multiples petites coupures) les zestes du fruit. Le contenu des poches sécrétrices est rompu puis récupéré en exerçant une action abrasive en présence d'eau sur toute la surface du fruit. Une fois les déchets solides éliminés, l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse dans une centrifugeuse puis filtrée (Figure : 19).



[Huile essentielle du zeste récupérée après centrifugation]

Figure 19 : Schéma de l'extraction par expression à froid.

<http://lessentielleshuilesessentielles.e-monsite.com> (consulté en 2017)

• L'extraction par solvants volatils

Elle consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et le végétal. Grâce à des lavages successifs, le solvant se charge en molécules aromatiques, il sera alors envoyé au concentrateur pour être distillé à pression atmosphérique. Les solvants les plus utilisés sont : l'hexane, le cyclohexane, l'éthanol, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone [Kim et Lee, 2002]. Ces solvants ont un pouvoir d'extraction plus élevé que l'eau si bien que les extraits contiennent des composés volatils ainsi que des cires, des pigments, des acides gras et d'autres composés [Hubert, 1992]. L'extraction est réalisée avec un appareil de Soxhlet ou un appareil de Lichens-Nickerson (Figure : 20).

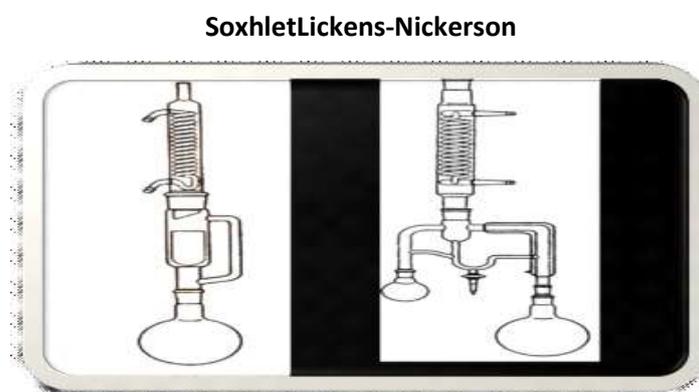


Figure 20 : Extracteur de Soxhlet et de Lichens-Nickerson

(Source : Boutayeb, 2013]

1-7 Fonction, Propriété et utilisation des huiles essentielles

La fonction biologique des terpénoïdes des huiles essentielles demeure le plus souvent obscure, toutefois ils ont un rôle écologique établi expérimentalement aussi bien dans le domaine des interactions végétales comme agents allélopathiques, notamment inhibiteurs de germination [AL Mousawi et al. 1975], que dans celui des interactions végétales-animales comme agents de protection contre les prédateurs tels que les insectes. Il est indiqué que les vapeurs des huiles essentielles d'*Eucalyptus* se trouvant à la surface des feuilles réduisent la perte de l'eau et interviennent également par leurs odeurs caractéristiques dans l'attraction de pollinisateurs [Morrow et al. 1980].

Par ailleurs, les huiles essentielles constituent une matière première destinée à divers secteurs ; leurs multiples usages dans de nombreux domaines industriels témoignent de leur grande importance en industrie ; notamment, l'industrie des cosmétiques et parfum qui constitue le plus gros consommateur des huiles essentielles [Shahi et al. 2009] ; elles sont utilisées comme matière première de base, dans la fabrication des parfums et d'autres produits cosmétiques [Fischetti, 2010]. Dans l'industrie alimentaire, les huiles essentielles sont utilisées pour rehausser le goût des aliments [Health, 1981], et pour la conservation grâce aux effets anti-oxydants et antimicrobiens de certains de leurs constituants [Shan et al., 2005 ; Burt, 2009]. Les huiles essentielles représentent un outil thérapeutique très efficace [Millet, 2010 et Robard, 2010], elles entrent dans le traitement de différentes pathologies (digestives, infectieuses...) pour leurs propriétés : anti-infectieuses, antalgiques, anti-inflammatoires, sédatives, antimicrobiennes, antispasmodiques et anti-oxydantes [Steflitsch, 2008 ; Bardeau, 2009 ; Le Hir, 2009 ; Harkat-Madouri, 2015 ; Mehani, 2015].

L'activité anti-oxydante des huiles essentielles est exploitée dans la lutte contre le stress oxydatif qui est impliqué dans certaines maladies dégénératives comme les cancers, la cataracte, les accidents vasculaires cérébraux, l'arthrose, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson [Behl, 1999 ; Rezaie, 2007] ; les huiles essentielles de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants [Jenner, 2003], le thymol et le carvacrol sont les plus actifs [Ruberto et Baratta, 1996 ; Edriss, 2007].

Les huiles essentielles présentent également des propriétés cytotoxiques, l'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est révélée efficace contre les cellules cancéreuses humaines incluant les cellules leucémiques [Ait M'barek, 2007], ce sont aussi des agents antimicrobiens à large spectre ; les huiles d'agrumes, de lavande, de menthe, de genévrier, de l'arbre à thé, de thymus et d'*Eucalyptus* sont actives sur le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline [Billerbeck, 2008, Kempf et al., 2011], et sur l'*Enterococcus faecium* résistant à la vancomicine [May et al. 2000]. Enfin, les huiles essentielles présentent des activités insecticides [Ünlü et al., 2002 et Ayvaz et al., 2010, Taleb-Toudert, 2015], elles sont utilisées dans la lutte biologique contre les ravageurs, le plus néfaste de tous est le *Varroa destructor*, acarien parasite de l'abeille

domestique *Apis mellifera*. Les huiles essentielles de différentes plantes présentent une activité de plus en plus grande sur le *Varroa* sans danger pour l'abeille et les produits de la ruche [Brodtschneider et al., 2010, Chauzat et al., 2010, Guzman et al., 2010, Vanengels et al., 2010]. Les bio pesticides à partir des huiles essentielles sont caractérisés par leur faible rémanence, leur faible toxicité pour l'Homme et par leur mode d'action sur les ravageurs [Miresmailli et al., 2006 ; Koul et al., 2008 ; Shahi et al., 2009]. L'action des huiles essentielles sur les insectes et acariens cible leur croissance, leur mue, leur fécondité et leur développement.

1-8 Analyse des huiles essentielles

1-8-1 Analyse des caractéristiques physico-chimiques

Selon Buchbauer (2000), c'est la connaissance détaillée des constituants de l'huile essentielle qui mènera à une utilisation appropriée. Selon la pharmacopée Française et Européenne, le contrôle des huiles essentielles s'effectue par différents essais. Ce contrôle a pour but de définir les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle ; ces caractéristiques propres à chaque huile seront ensuite utilisées pour décrire l'huile essentielle et servir de critère de qualité. Les méthodes de détermination des caractéristiques physico-chimiques sont décrites dans le recueil de normes publié par l'Association Française de Normalisation (AFNOR, 1996), qui sont identiques aux normes internationales de l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO, 1977).

La normalisation des huiles essentielles concerne :

- Les propriétés organoleptiques : couleur, aspect, odeur...
- Les caractéristiques physicochimiques : densité, indice d'acide, miscibilité dans l'éthanol...
- Le profil chromatographique et la quantification relative des différents constituants.

1-8-2 Détermination de la composition des huiles essentielles par CPG/SM

Cette analyse concerne l'identification qualitative et quantitative des différents constituants des huiles essentielles. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est la méthode de référence dans leur analyse, elle repose sur le principe de migration

différentielle des constituants d'un mélange à travers une phase stationnaire (liquide ou solide) et une phase mobile gazeuse, elle est utilisée pour l'analyse quantitative. La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse CPG/SM est utilisée pour l'analyse qualitative [Lahlou, 2004 ; Bourkhiss et al., 2007].

● Principe du couplage CPG/SM :

L'échantillon est introduit dans le spectromètre de masse par la CPG sur colonne capillaire, ainsi cette colonne est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation des constituants. Deux types d'ionisation: l'ionisation chimique (IC) et l'ionisation par impact électronique (IE), cette dernière est la plus utilisée car elle permet l'étude systématique de la structure des ions moléculaires et des fragments formés.

Le principe de la CPG/SM repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). A la sortie de la colonne, les molécules arrivent au niveau de la source d'ionisation, elles entrent en collision avec un flux d'électrons. Ces électrons leur arrachent un autre électron formant ainsi des cations radicalaires ($M^{\cdot+}$). Ces ions peuvent à leur tour se fragmenter et donner d'autres ions, on aura ainsi dans la chambre d'ionisation un ensemble d'ions dont le plus léger est H^+ et le plus lourd est $M^{\cdot+}$. Ces cations accélérés entrent dans l'analyseur ou ils sont séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). A la sortie, ils sont accélérés et déviés pour entrer en collision avec le channeltron (dynode) ou ils sont convertis en dizaines d'électrons de plus faible énergie. Ces électrons sont multipliés tout au long du channeltron, le cation qui arrive va générer quelques dizaines d'électrons qui génèrent une amplification allant jusqu'à 10^8 .

L'ordinateur enregistre les données et les convertit en valeurs de masses, d'intensités de pics et en courant ionique total. Les spectres de masses ainsi obtenus sont ensuite comparés avec ceux de produits de références contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles [NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Wiley Registry of Mass Spectral Data, Adams] [Cavalli, 2000].

1-9 Toxicité des huiles essentielles

La nature végétale des huiles essentielles les font souvent considéré à tort, comme des produits inoffensifs or, si les huiles essentielles sont naturelles, elles ne sont pas dénuées de toxicité. Pour certaines, la dose létale est même très basse ou alors les effets secondaires sont très importants. La dose létale de *Corymbia citriodora* DL₅₀ est supérieure à 2,48 g/Kg chez le rat [Bonnafous, 2013]. Les huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses ; ce sont les huiles essentielles de : cannelle de Ceylan, menthe, clou de girofle, basilic exotique et thym à thymol. Certaines sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol et en carvacrol), et allergènes (huiles riches en cinnamaldéhyde) [Smith et al., 2000]. Chez les enfants, certaines huiles essentielles sont interdites, notamment les huiles riches en aldéhydes aromatiques : dermocaustiques et allergisantes, riches en cétones : neurotoxiques, et riches en terpènes : fortes et agressives [Koziol, 2015].

L'administration de 10g d'eucalyptol peut entraîner la mort, et plusieurs cas d'effets indésirables graves sont survenus à la suite d'une utilisation de produits cosmétiques à base de 1,8-cinéole, de camphre et de menthol chez des enfants de 2 mois et demi à 4 ans [Koziol, 2015]. Il est donc impératif que les huiles essentielles ne soient pas à la portée de tout le monde, qu'elles soient utilisées avec précaution et que ne devraient être délivrées en vente libre que celles qui sont particulièrement diluées pour éviter tout accident [Vassart, 2009].

1-10 Conservation des huiles essentielles

L'instabilité relative des molécules qui composent les huiles essentielles, rend leur conservation délicate [Bruneton, 1993]. Trois facteurs interviennent dans leur altération : **La température** : obligation de stockage à basse température (entre 8°C et 25°C). **La lumière** : les stocker dans l'obscurité et dans un récipient opaque brun de préférence. **L'oxygène** : les flacons doivent être entièrement remplis et fermés de façon étanche, il est possible de recourir à l'adjonction d'anti-oxydants. La durée de conservation admise est de 2 à 5 ans.

1-11 Marché mondial des huiles essentielles

Ces dernières années, le marché mondial des huiles essentielles est en nette évolution. Quelque 3000 huiles essentielles sont connues, dont environ 300 sont d'une importance commerciale [Bégin et al., 2000 in Bessah et al., 2015]. Les quantités d'huiles essentielles produites dans le monde sont très variables. La production annuelle de certaines huiles essentielles est de 35.000 tonnes, alors que celle des autres peut atteindre quelques kilogrammes [Iqbal, 1993 in Bessah et al., 2015]. Les principaux importateurs et exportateurs en volume et en valeur sont la Chine, Hong Kong et les Etats-Unis. La Chine domine le marché des exportations avec près de 33% du marché mondial que ce soit en volume ou en valeur (période 2004-2014). Les Etats-Unis sont les premiers importateurs mondiaux avec plus de 10% du marché mondial des importations en volume ou en valeur durant la même période. De nouveaux pays émergent sur ces marchés. Ainsi, l'Egypte connaît une expansion rapide des exportations en volume et en valeur durant la moyenne des deux périodes considérées 1994-2003 et 2004-2014 avec un taux croissant annuel de 8% jusqu'à 2014. En valeur, l'Egypte prend la sixième position sur le marché mondial des exportations au cours de la période 2004-2014, en passant de 2% à 6% du marché mondial. Un autre pays tiers méditerranéen, le Maroc, gagne également des parts du marché mondial des exportations atteignant 2,5% du marché en 2014 [Ilbert et al., 2016].

En Algérie, en dépit de la richesse floristique et tenant compte des importations croissantes d'huiles essentielles et d'extraits de plante, il apparaît que la filière des huiles essentielles et peu développée malgré les fortes potentialités ce qui explique que notre pays reste absent de la scène internationale des échanges de plantes aromatiques et médicinales. [Bessah et al., 2015, Ilbert et al., 2016].

CHAPITRE II

Description des *Eucalyptus*

2-1 Description botanique

Les *Eucalyptus* ou gommiers, forment un groupe très riche d'arbre du genre *Eucalyptus* de la famille des Myrtacées, « eucalyptus » vient du grec, eu « bien » et calyptos « couvert », car les pétales et sépales sont soudés ; « gommier » fait allusion à la gomme résineuse rouge qu'ils exsudent quand ils sont blessés. Il porte aussi comme nom commun : arbre au koala, arbre à fièvre et huile de respiration.

Originnaire d'Australie, le genre *Eucalyptus* a donné plus de 800 espèces, plusieurs espèces sont introduites dans différents pays, où règnent des conditions climatiques adéquates, car ce genre craint le froid ; leur nombre dépasse les 150 espèces, moins d'une trentaine sont exploitées de façon significative en plantation. A la fin des années 80 quatre espèces : *E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. tereticornis* et *E. grandis*, occupent la moitié des surfaces plantées [El Bridge et al., 1993].

L'*Eucalyptus* fut introduit en Algérie par les français à partir de 1850 avec l'espèce *camaldulensis* Dehn comme espèce pionnière. La plantation massive des *Eucalyptus* ne se fera qu'à partir de 1865 pour l'assèchement des marais [Abderrahim, 1983]. L'espèce qui prit une grande extension entre 1850 et 1870 [Boudy, 1952], est *E. globulus*. Labill (du nom de Labillardière qui la découvrit en 1800 en Australie). Pendant les années 60 à 70, les reboisements à base d'*Eucalyptus* ont concernés l'est, le centre et l'ouest du pays et ce pour répondre aux besoins nationaux en produits ligneux [Benazzedine, 2010]. Grâce à leur facilité d'adaptation, les espèces *E. globulus*, *E. camaldulensis*, *E. gomphocephala*, sont les plus répandues dans la région méditerranéenne [Metro, 1970] ; près de 600 espèces sont connues dans le monde [Foudil-Cherif, 1991]. Certains *Eucalyptus* s'hybrident facilement entre elles étant donné la facilité avec laquelle les graines de pollen se transfèrent d'une espèce à une autre, d'où l'*Eucalyptus* « algériensis » ce qui complique encore plus leur identification. [Benazzedine, 2010]

La classification systématique du genre *Eucalyptus* est réalisée par l'AGP (Angiosperms Phylogeny Group).

Embranchement	Phanérogames
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Rosids-Eurosids II
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtacées
Genre	<i>Eucalyptus</i>

La taille de cet arbre à feuilles persistantes, peut varier de quelques centimètres à plus de 60 mètres (le plus haut dépasse les 99 mètres). Certains arbres sont à tronc unique (figure : 23), d'autres ont un tronc qui se divise au niveau du sol (Figure : 22). Les feuilles sont bleutées recouvertes de glandes à huiles, elles ont pour particularité de changer d'apparence en fonction de l'âge de l'arbre mais conservent toujours une orientation verticale. Les fleurs d'*Eucalyptus* sont de couleurs variées (blanche, rose, crème, jaune ou rouge) selon l'espèce et présentent toutes de nombreuses étamines qui sont dans un premier temps fermées par un opercule. Des fruits secs et bruns en forme de cônes murissent sur les arbres et d'où sortiront des graines (figure : 21). La plupart des *Eucalyptus* possèdent également des organes de sauvegarde souterrains appelés lignotubes. Ces lignotubes se présentent sous forme de renflements à la base du collet racinaire, ils contiennent des réserves glucidiques comme l'amidon.

Les racines permettent à l'*Eucalyptus* d'engendrer de nouvelles pousses ; si une perturbation majeure vient à détruire l'appareil végétatif aérien de la plante, elles favorisent donc la survie des espèces d'*Eucalyptus* [Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. 1982. Les *Eucalyptus* dans les reboisements. FAO, Italie].



Figure 21 : Une branche d'*Eucalyptus globulus* avec des fruits
(Photo personnelle, 2014)



Figure 22 : *Eucalyptus* à tronc qui se divise au sol : *Eucalyptus globulus*
(Photo personnelle, 2014)

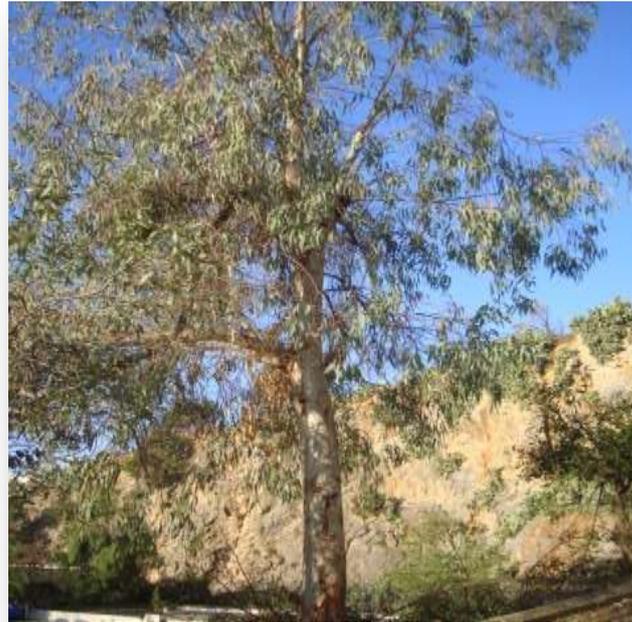


Figure 23 : *Eucalyptus* à tronc unique : *Eucalyptus globulus*
(Photo personnelle, 2014)

2-2 Propriétés et intérêts des huiles essentielles d'*Eucalyptus*

La croissance rapide de l'*Eucalyptus* en fait une essence de choix pour le reboisement anti-érosion. Cette espèce a été choisie en Algérie pour constituer les plantations, dont la production est destinée pour l'alimentation des usines de pâte à papier [Villagran et Kadik, 1981]. Un *Eucalyptus* peut produire en 20 ans ce qu'un pin d'Alep produit en 60 ans. En foresterie, les arbres produisent généralement tous les 80 à 100 ans, alors que l'*Eucalyptus* produit tous les 15 ans. Les forêts d'*Eucalyptus* sont capables de jouer un rôle primordial dans la filière du bois, et diminuer ainsi en grande partie les importations de ce produit vital à l'économie [Meziane, 1996].

Il joue un rôle dans l'équilibre écologique, dans les régions productives de fruits, il améliore la pollinisation des arbres fruitiers et grâce à sa croissance rapide et sa taille imposante il forme une haie qui protège le verger des vents froids ou chauds. Toutefois, l'*Eucalyptus* possède le défaut majeur correspondant à sa qualité principale : « l'avidité en eau », jusqu'à 300 litres par jour pour un seul individu. Lorsqu'il est planté en zone peu humide et en monoculture intensive, il assèche les cours d'eau et les nappes phréatiques et il épuise les sols instables.

L'*Eucalyptus* assaini également les marais, ce qui a permis de réduire les populations de moustiques et par conséquent, les épidémies de malaria. Les vapeurs antiseptiques que dégagent ses feuilles et son bois éloignent les insectes nocifs.

Herbier médicinal, l'*Eucalyptus* grâce à sa composition chimique et à son principe actif qui est le 1,8-cinéole possède des vertus considérables : astringents, hémostatiques, fébrifuges désinfectants, antiseptiques, l'un des meilleurs remèdes contre l'inflammation chronique de la muqueuse gastrique et de la muqueuse intestinale. C'est un puissant antiseptique des voies respiratoires, il soigne les bronchites, la grippe, la tuberculose pulmonaire et l'asthme. Il est employé comme désinfectant pour laver les plaies, les brûlures et les ulcères de la peau. Excellent antiseptique, il soigne les infections urinaires et l'inflammation de la vessie [<http://crittercrossing.org/bienfaits-effets-bio/eucalyptus>].

En industrie, le cinéole est utilisé comme additif au carburant pour moteurs de voiture, il assure une meilleure miscibilité du mélange éthanol/carburant.

En parfumerie, l'huile essentielle d'*Eucalyptus* entre dans la composition de certaines eaux de Cologne et lotions après rasages, le citronellal est utilisé quant à lui dans la production de parfum de haute gamme. L' α et β pinène sont utilisés dans la synthèse de dérivés terpéniques utilisés dans les industries de la parfumerie et des arômes. Les formes habituelles d'utilisation traditionnelles de l'*Eucalyptus* sont : les infusions, les décoctions des feuilles et les fumigations.

Par ailleurs, les *Eucalyptus* en général possèdent une toxicité aigüe par voie orale, la majorité et qui sont couramment utilisés possède une dose létale DL_{50} comprise entre 2 et 5 g/Kg, les mêmes observations peuvent être faites pour les constituants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, en effet rares sont ceux qui ont une $DL_{50} < 2\text{g/Kg}$, le thujone, pulégone et carvone possèdent les DL_{50} respectives suivantes : 0,2 g/Kg, 0,47 g/ Kg et 1,64 g/Kg [Benazzeddine, 2010].

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est interdite chez les enfants et les femmes enceintes, le pouvoir expectorant très asséchant des *Eucalyptus* est à prendre avec précaution chez les asthmatiques. Les huiles riches en eucalyptol (1,8-cinéole) vont stimuler les glandes digestives et vont augmenter les sécrétions gastriques d'où l'apparition d'ulcère gastrique lors d'intoxication aux huiles essentielles [Koziol, 2015]. L'eucalyptol est la substance toxique majeure, il est testé neurotoxique (épileptogène) à forte dose ($LD_{50} = 1,7\text{ g/Kg}$ chez le rat), les

organes ciblés sont : les poumons, le système nerveux central et le système gastro-intestinal [Aouadhi, 2010]. Enfin, Les huiles essentielles d'*Eucalyptus* peuvent provoquer des brûlures gastriques, des nausées et vomissements, de la tachycardie ainsi qu'une hypertension, des suffocations, et une parésie cérébrale. Deux cas de décès ont été constatés à fortes doses en Australie à la suite d'une ingestion de 3,5 ml d'huile essentielle d'*Eucalyptus* pour l'un et 4 à 5 ml pour l'autre [Devincenzi, 2002]. L'intoxication a lieu le plus souvent par voie orale, mais elle peut aussi se faire par voie locale.

2-3 Activités biologiques des *Eucalyptus*

L'effet insecticide des huiles essentielles d'*Eucalyptus* par contact, ingestion et par fumigation a été bien démontré contre les déprédateurs des denrées entreposées, de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des formes d'utilisation des plantes qui permettent de renforcer leur activité insecticide [Ismane, 1994]. En effet l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* possède un effet bio insecticide contre le bruche du haricot [Goucem - Khelfane, 2014], sur les larves L4 *Culex pipiens* [Aouati, 2015], et sur le bruche de niébé [Taleb-Toudert, 2015]. On a enregistré l'efficacité de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* pour protéger le riz stocké contre *Sitophilus oryzae* (Coleoptera : Gelechiidae) [Togola et al., 2014]. Les huiles d'*Eucalyptus citriodora*, *globulus* et *staigriana* présentent une activité insecticide assez importante [Benazzeddine, 2010 ; Ribeiro et al., 2014 ; Slimane et al., 2014 ; Aouati, 2015].

Contre *Varroa destructor* parasite des colonies d'abeilles, plusieurs travaux ont été menés sur l'effet toxique de certaines essences d'*Eucalyptus*, en effet, l'huile d'*E. globulus* et d'*E. robusta* montre une bonne efficacité contre ce parasite [Gendé et al., 2010 ; Shengping et Lihua, 2011].

Contre les champignons, les huiles des *Eucalyptus* : *globulus*, *citriodora*, *robusta* et *saligna* indiquent une activité antifongique contre différents champignons [Ramzani et al., 2002 ; Sartorelli et al., 2007; Benseddik et Khenfer, 2015].

Contre les bactéries, des tests biologiques sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de différentes espèces d'*Eucalyptus* sur diverses souches de bactéries se sont révélées positives [Kebisi, 2011; Mehani et Segni, 2014].

2-4 Constituants des huiles essentielles d'*Eucalyptus*

Les HE du genre *Eucalyptus* ont fait l'objet d'un grand nombre d'études dans différentes régions du monde notamment dans les pays du Maghreb. Nous avons classé les huiles des espèces originaires d'Algérie, de Tunisie et du Maroc en fonction de leur composition et de leur origine (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition Chimique d'*Eucalyptus* originaires d'Algérie de Tunisie et du Maroc

<i>Eucalyptus</i> ssp	Origine	Composés des HE	Références
<i>E. astringens</i>	Tunisie	1,8-cinéole (60%) limonène (14,5%) α -pinène (6,7%)	Cimanga et al., 2002
		1,8-cinéole (43,7%) α -pinène (21,3%)	Elaissi et al., 2012
		α -pinène (29,8%) 1,8-cinéole (17,3%) viridiflorol (11,22%)	Hamdi et al., 2015
<i>E. botryoïdes</i>	Maroc	1,8-cinéole (18,4%) <i>p</i> -cymène (12,6%) α -pinène (9,4%)	Elaissi et al., 2011
<i>E. camaldulensis</i>	Algérie	<i>p</i> -cymène (22,5%) spathulenol (22,05%) crypton (16,79%)	Nait-achour, 2012
	Tunisie	1,8-cinéole (20,6%) α -pinène (9,4%)	Jemaa et al., 2012
<i>E. cinerea</i>	Tunisie	1,8-cinéole (79,2%) α -pinène (4,1%)	Sebei et al., 2015
	Tunisie	1,8-cinéole (70,4%) α -terpinéol (10,3%)	Elaissi et al., 2010
<i>E. cladocalyx</i>	Algérie	Benzaldéhyde (31,8%) 1,8-cinéole (25,23%) <i>trans</i> -pinocarvéole (7,81%)	Nait-Achour, 2012
<i>E. diversifolia</i>	Tunisie	1,8-cinéole (37,23%) <i>trans</i> -pinocarvéole (7 %)	Elaissi et al., 2012
<i>E. elaeophora</i>	Algérie	1,8-cinéole (81,9%)	Nait-Achour, 2012
<i>E. erythrocorys</i>	Tunisie	1,8-cinéole (54,8%) α -pinène (7,8%)	Ghnaya et al., 2013
<i>E. globulus</i>	Algérie	1,8-cinéole (47,05%), <i>p</i> -cymène (3,48%), α -pinène (7,69 %), globulol (8,65)	Taleb-Toudert, 2015

<i>E. globulus</i>	Algérie	1,8-cinéole (55,3%), spathulenol (7,4%), α -terpinéol (5,5%)	Harkat-Madouri et al., 2015
	Maroc	1,8-cinéole (22,4%), limonène (7,0%), solanone (6,1%), β -pinène (5,2%)	Derwich et al., 2009
<i>E. gradilis</i>	Tunisie	1,8-cinéole (71,6%) α -pinène (18,2%)	Marzoug et al., 2010
<i>E. lehmannii</i>	Tunisie	1,8-cinéole (18 %) <i>p</i> -cymène (12,3%) spathulenol (12,3%)	Jemaa et al., 2012
	Tunisie	1,8-cinéole (49,1 %) α -pinène (26,4 %)	Marzoug et al., 2010
<i>E. leucoxydon</i>	Tunisie	1,8-cinéole (77,8 %) α -pinène (5,9%)	Marzoug et al., 2010
<i>E. maidenii</i>	Tunisie	1,8-cinéole (83,6 %) globulol (3,6%)	Marzoug et al., 2010
	Tunisie	1,8-cinéole (20,9 %) α -pinène (7,3%)	Elaissi et al., 2010, 2012
<i>E. odorata</i>	Tunisie	Crypton (20,9%) <i>p</i> -cymène (16,7%)	Elaissi et al., 2010, 2012
<i>E. oleosa</i>	Tunisie	1,8-cinéole (41,2 %) α -pinène (21,8%)	Marzoug et al., 2010
<i>E. ouata</i>	Maroc	1,8-cinéole (41,6%) <i>trans</i> -pinocarvéole (13,8 %) α -pinène (13,5%)	Elaissi et al., 2011
<i>E. platyrus</i>	Tunisie	1,8-cinéole (22,5 %) spathulenol (11,2%) α -pinène (9,4%)	Elaissi et al., 2010, 2012
<i>E. radiata</i>	Algérie	1,8-cinéole (68,34%) α -terpinéol (14,42%) globulol (6,13%)	Taleb-Toudert, 2015
<i>E. rudis</i>	Tunisie	1,8-cinéole 19,9 %) α -pinène (14,9%)	Jemaa et al., 2012
<i>E. salmonophloia</i>	Tunisie	1,8-cinéole 59,3 %) α -pinène (10,7%)	Marzoug et al., 2010
<i>E. salubris</i>	Tunisie	1,8-cinéole (71,3%) <i>trans</i> -pinocarvéole (6 %)	Marzoug et al., 2010
<i>E. sideroxydon</i>	Algérie	1,8-cinéole (33,5%), <i>p</i> -cymène (12,27%), α -pinène (3,83 %), spathulenol (11,48%)	Nait-Achour, 2012
	Tunisie	1,8-cinéole (80,8%), α -pinène (5,8%), limonène (3,3%)	Elaissi et al., 2012

On remarque que la composition chimique de l'huile des différentes espèces d'*Eucalyptus* est remarquablement riche en oxyde monoterpénique 1,8-cinéole avec un taux

qui varie entre (17.3 – 83.6 %), ce composé qui reste un marqueur spécifique aux huiles essentielles de ce genre à travers le monde. L'alpha-pinène est le deuxième composé majoritaire de ce genre avec des variations plus ou moins importantes ; les quantités sont inférieures à celle du 1,8-cinéole pour la majorité des espèces réparties dans différentes régions du Maghreb avec un taux d'alpha pinène qui varie entre (3.83 - 29.8%). Cependant l'espèce *E. camaldulensis* d'Algérie avec une composition de *p*-cymène (22.5%), spathulenol (22.05 et crypton (16.79%) et celle de Tunisie *E. odorata* avec la composition crypton (20.9%), *p*-cymène (16.7%) sont des espèces à dominance « *p*-cymène, spathulenol, crypton », et « crypton, *p*-cymène » respectivement.

Ces différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique des huiles essentielles peuvent être attribuées à plusieurs facteurs tels que la situation géographique, les effets climatiques des plantes, la saison de la récolte, la nature du sol, l'âge des parties de plantes (jeunes ou adultes), l'état du matériel végétal utilisé (frais ou sec), la partie de la plante utilisée, le temps de collecte, le lieu de séchage, la température, la durée de séchage, les parasites et la méthode d'extraction [Bruneton, 1999].

2-5 Evaluation de la toxicité des *Eucalyptus* par l'approche des Bio- essais

Le processus d'obtention d'un composé pharmacologiquement pur et actif à partir d'une plante médicinale est souvent long et fastidieux ; l'approche classique tend à donner des constituants qui peuvent être obtenus facilement et en grande quantité. Malheureusement, ces composés ne sont pas actifs dans les plantes médicinales [Christophersen et al., 1991], c'est pourquoi, les chercheurs privilégient désormais l'approche des bio-essais.

Les bio-essais peuvent être définis comme des tests qui sont utilisés, pour détecter l'activité biologique d'un extrait obtenu à partir d'un organisme vivant [Hamburger et Hustettmann, 1991]. Ces tests sont connus sous le nom de : bio-essais de paille ; le dosage doit être simple, rapide, reproductible et relativement peu coûteux. Le test de létalité des crevettes de saumures (Brine Shrimp Lethality Assay : BSL) est sans doute le plus largement utilisé parmi les différents bio-essais qui existent [Mac Laughlin et al., 1998, Quazi Saheli et al., 2017].

2-5-1 Test de Létalité des Crevettes de Saumures (Brine Shrimps Lethality Assay : BSL)

Les *Artemia* sont très répandus dans les eaux dont le taux de salinité est supérieur à la normale, et sont rejetés sur les côtes par le vent et les vagues. Ils se présentent sous forme de petits grains apparemment inactifs qui ont la capacité d'entrer en période de latence. Notons qu'il est possible d'élever des *Artemia* dans un milieu artificiel. Au niveau commercial, la présentation d'*Artemia* se fait sous la forme de cystes (œufs) déshydratés sous vide en boîte de conserve pour faciliter le stockage [Mousseux, 1995].

Les œufs de la crevette de saumure (*Artemia salina*) sont viables pendant plusieurs années lorsqu'ils sont maintenus dans un état sec. Lorsque les œufs sont placés dans l'eau de mer, ils éclosent dans les 48 heures pour fournir un grand nombre de larves (nauplii) qui restent très actives pendant au moins 24 heures (Figure 24).

Ce test a été utilisé par Michael et al., (1965) et développé plus tard par Vanhaecke et al., (1981) et Sleet et Brendel (1983). Il a été utilisé pour la détection des : toxines fongiques [Harwig et Scott, 1971], les toxines de cyanobactéries [Jaki et al., 1999], cytotoxicité [Mac Laughlin et al., 1991 ; Pelka et al., 2000], les métaux lourds [Martinez et al., 1998] et les pesticides [Barahona et Sanchez Fortun, 1999]. Ce test a l'avantage d'être rapide (ne prend que 24 heures), peu coûteux (les œufs et les matériaux utilisés ne sont pas chers), et seule une petite quantité d'échantillon (quelques milligrammes) est nécessaires, en outre, les défenseurs des droits des animaux ne s'opposent pas à l'utilisation des invertébrés dans le travail expérimental.

L'efficacité ou la relation concentration-mortalité du produit végétal est habituellement exprimée sous la forme d'une concentration létale médiane (CL50). Ceci représente la concentration du produit chimique qui engendre la mort de la moitié des sujets d'essai après un certain temps d'exposition et est déterminé par la méthode de régression linéaire à partir de la représentation du pourcentage de mortalité par rapport au logarithme correspondant de la concentration (% mortalité) = f (concentration) [Meyer et al., 1982; Ahmed et al., 2010; Moshi et al., 2010].



Figure 24: Mâle et femelle *Artemia*

2-5-2 Choix du solvant

Dans le test de létalité des crevettes de saumures (BSL), les solvants les plus usuels sont : le méthanol, l'éthanol, tween 20 et le diméthylsulfoxyde (DMSO), ils sont utilisés pour dissoudre les différents composés. Malheureusement, il y a un seuil à partir duquel les solvants peuvent être toxiques et vont donc interférer dans les résultats expérimentaux. Pour éviter ceci, des concentrations permises de ces solvants ont été identifiées, le test BSL a permis d'évaluer la toxicité de ces solvants contre *A. salina*, après 24 heures, la concentration maximale pour ces solvants (v/v) est : CL₅₀ pour : DMSO (8,5 %), (6,4 %) pour méthanol, (3,4 %) pour éthanol et (2,5 %) pour tween 20 (tween 20 est un détergent qui peut aider à dissoudre les huiles se trouvant dans les produits naturels). Le DMSO est le solvant le moins toxique et le plus sûr donc le plus adéquat dans ce test comparé aux autres solvants [Geetha et al., 2013 ; Chao, 2014].

2-5-3 Critères de test de toxicité

La toxicité des extraits de plantes exprimés en valeurs de CL₅₀ est couramment valorisée soit par rapport à l'indice de toxicité de Meyer, ou à l'indice de toxicité de Clarkson. Selon l'indice de toxicité de Meyer, des extraits avec des CL₅₀ < 1000 µg / mL sont considérés comme toxiques, tandis que les extraits avec CL₅₀ > 1000 µg / mL sont considérés comme non toxiques [Meyer et al., 1982 ; Gupta et al. 1996 ; Santos et al., 2003].

Le critère de Clarkson pour l'évaluation de la toxicité d'extraits végétaux est illustré dans le tableau 2.

Tableau 2 : Critères de toxicité des extraits végétaux
[Clarkson et al., 2004]

CL50 (µg / mL)	Etat des extraits végétaux
> 1000	Non toxiques
500 – 1000	De faible toxicité
100 – 500	Moyennement toxiques
0 – 100	Hautement toxiques

CHAPITRE III

La vie des abeilles

3-1 Description des abeilles

L'abeille domestique ou abeille à miel, *Apis mellifera* est un insecte de l'ordre des Hyménoptères, qui comprend plus de 100 000 espèces et qui stockent des réserves alimentaires (miel et pollen) pour survivre aux saisons d'hivernage [Alphandery et Alphandery, 1945 ; Brisset et al., 1946 ; Delayens et Bonnier, 1946 ; Raymondis, 1947 ; Grasse, 1951 ; Chauvin, 1968 ; Bertrand, 1972 ; La flèche, 1981]. Elle appartient à la grande famille des apoïdes, dont les membres ont pour caractéristiques communes de posséder une langue pour recueillir le nectar, de disposer sur les pattes arrière d'un astucieux système pour entreposer le pollen et d'être poilus (Figure : 25).

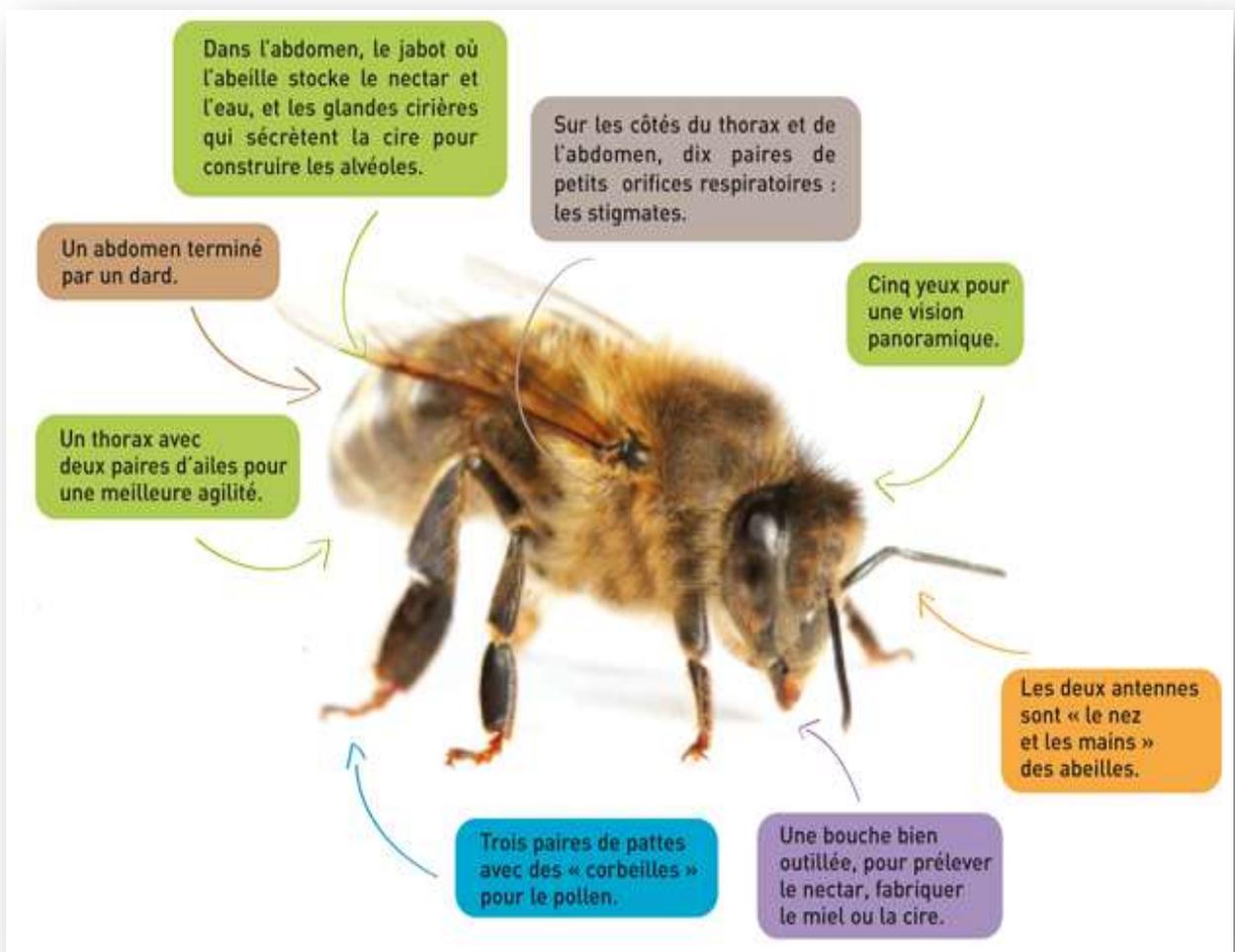


Figure 25 : Morphologie d'une abeille

(UNAF Abeilles sentinelles : www.abeillesentinelles.net. Consulté en 2014)

3-2 Abeilles Algériennes

En Algérie, on a des races d'abeilles rustiques et autochtones (c'est-à-dire des races originaires du pays), et des races introduites.

3-2-1 Races autochtones

Il existe en Algérie deux races ou sous espèces d'abeilles autochtones :

- L'abeille Saharienne ou *Apis mellifera* Sahariensis [Baldenperger, 1922].

- L'abeille Tellienne ou *Apis mellifera* Intermissa [Buttel-Reepen, 1906].

La race Intermissa est la plus répandue, son aire de répartition s'étend sur toute l'Afrique du nord, du Maroc à la Tunisie [Cornet et al., 1988 ; Grissa et al., 1990 ; Barour et al., 2011 ; Loucif - Ayad et al., 2014]. Cette abeille est très précieuse, car c'est une race primaire qui peut servir pour les croisements. La position systématique de cette race est :

Embranchement	Arthropodes
Sous embranchement	Mandibulates
Classe	Insectes
Sous - classe	Ptérygotes
Ordre	Hyménoptères
Sous - ordre	Apocrites
Section	Aculéates
Famille	Apidés
Genre	<i>Apis</i>
Espèce	<i>Apis mellifera</i>
Sous – espèce	<i>Apis mellifera</i> Intermissa

3-2-2 Races introduites

Des races Européennes ont été introduites en Afrique du nord, ce sont : *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* et *Apis mellifera carnica*. L'introduction d'abeilles étrangères a pour conséquences inévitables l'apparition de familles de races croisées, plus agressives et plus actives que des abeilles de races pures [M. Ahmim, 2008)].

3-3 Communauté des abeilles

Très tôt, et pour éviter que la chasse au miel ne détruise et ne perturbe les colonies d'abeilles, l'apiculteur a créé la ruche. La ruche à cadres mobiles [la ruche Langstroth] a fait considérablement progresser l'apiculture en la rendant plus précise. Cette ruche fut inventée en 1844 par le Français M. Debeauvoys et perfectionnée par l'Américain Langstroth (Figure : 26).



I



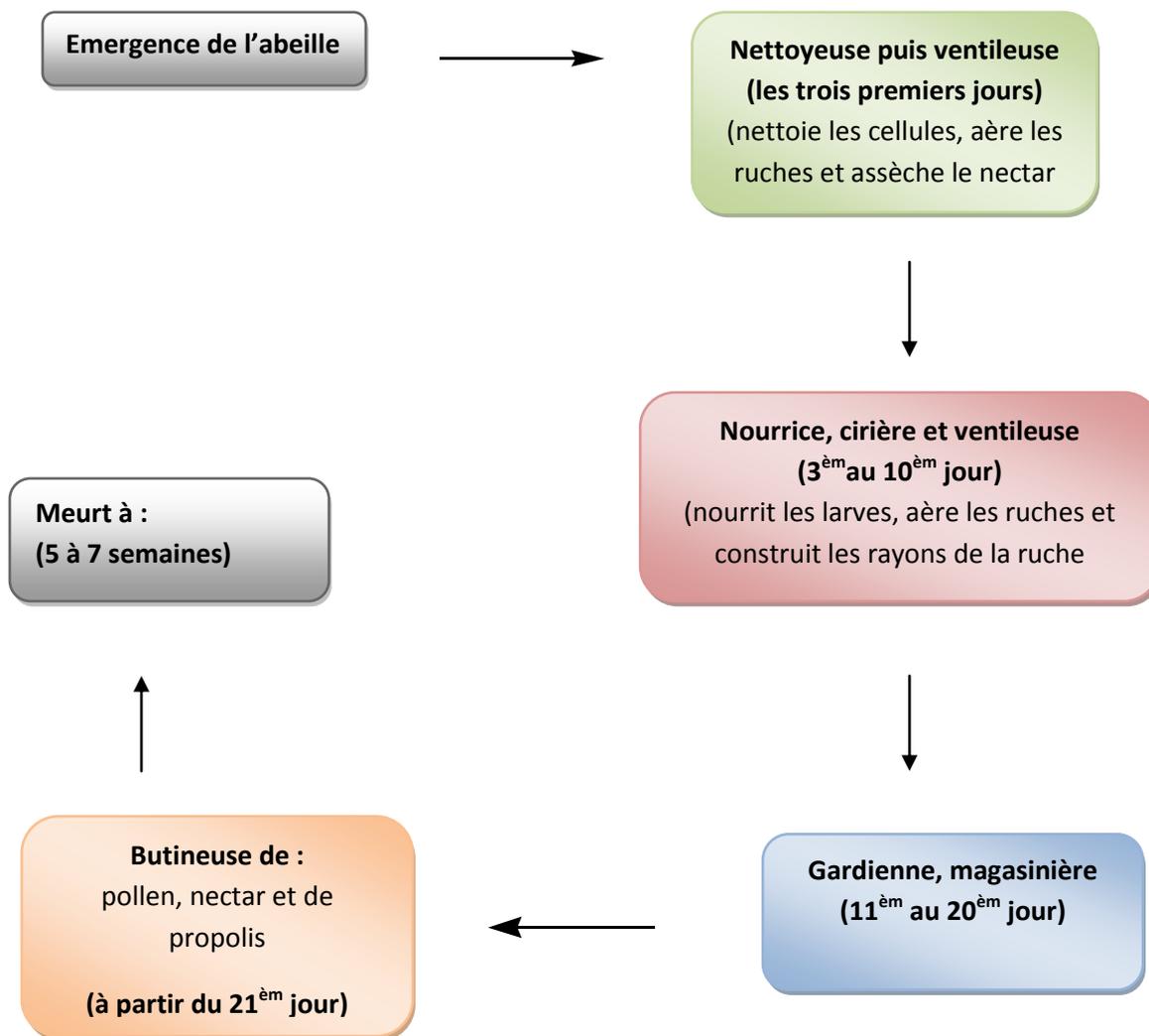
II

Figure 26: Ruche Langstroth (I: photo: wikipedia, II: photo personnelle)

Les abeilles vivent dans les ruches en colonie. Elles forment une société très organisée. Une colonie comprend trois sortes (castes) d'abeilles adultes (Figure 27):

- **Ouvrière :**

L'espérance de vie des ouvrières varie selon les saisons : de 30 à 50 jours pour les abeilles au printemps et en été, à plusieurs mois pour celles qui naissent à l'automne et permettent à la colonie de survivre à l'hiver et de redémarrer le cycle. Au fur et à mesure de leur existence et de leur maturation, les ouvrières changent de rôle. Les activités d'une ouvrière à partir de son éclosion peuvent être résumées comme suit :



- **Reine :**

La reine a pour unique mission d'assurer le renouvellement permanent des membres de la colonie, elle passe tout son temps à pondre, c'est elle qui donne naissance à toute les abeilles de la ruche. Elle peut pondre jusqu'à 2000 œufs par jour. Elle se distingue des ouvrières par sa taille, elle mesure 18 à 20 mm (les ouvrières 14 à 15 mm), son thorax est plus large et son abdomen est plus long (Figure : 27). Dans de bonnes conditions, elle peut vivre quatre à cinq ans.

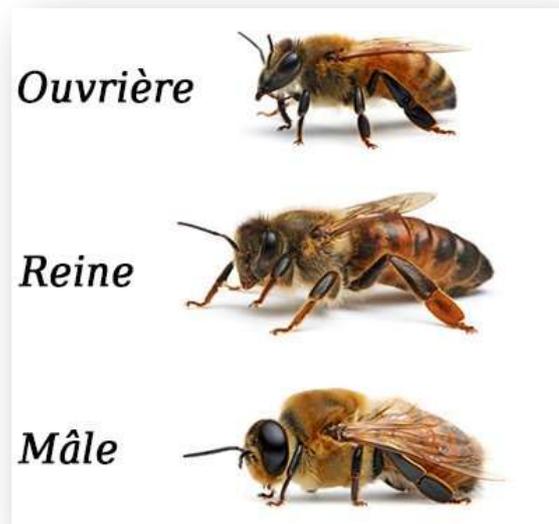


Figure 27 : Différentes castes des abeilles [source : internet, 2015]

La reine est issue d'un œuf placé dans une cellule spécifique, la larve est nourrit exclusivement de gelée royale. La reine élimine ses rivales et au bout de quelques jours, elle s'envole pour être fécondée : c'est le vol nuptial. Elle connaît plusieurs accouplements avec différents mâles, les faux-bourçons. Lorsque sa spermathèque est pleine, elle retourne dans la ruche, dont elle ne sortira plus. Quelques jours après sa fécondation, la reine commence à pondre. Les ouvrières sont issues d'œufs fécondés, les faux-bourçons d'œufs non fécondés déposés dans des cellules plus grandes. Les ouvrières entourent constamment la reine en veillant sur elle, la nourrissant et la nettoyant tout le temps.

Au bout de quelques jours, l'œuf éclos, débute alors le stade larvaire. Au 9^{em} jour, les larves sont devenues grandes, les ouvrières ferment alors leur cellules par un opercule de cire. Quelques jours plus tard, la larve se transforme en nymphe. Huit jours plus tard, l'abeille rompt l'opercule et s'extrait de sa cellule. Le couvain représente l'ensemble des œufs, larves et nymphes qui se retrouvent dans un rayon de la ruche (Figure : 28).



a : jeune larve issue de l'éclosion d'un oeuf. De *a* à *e* : croissance de la larve. En *e* : fermeture de l'alvéole dans laquelle se trouve la larve. En *f* : nymphe (phase de métamorphose de l'insecte). En *g* : Imago adulte sortant de l'alvéole.

Figure 28 : Grandes étapes du développement communes aux trois castes d'abeille.

[Source : Internet, 2015]

• Faux-bourdons :

Les faux-bourdons (ou abeilles mâles) sont plus trapus, plus velus que les ouvrières. Ils naissent uniquement au printemps, leur nombre est de quelques centaines dans une colonie. Leur rôle est de féconder la reine. Ceux qui y parviennent en meurent : leur appareil génital est arraché lors de la fécondation. Incapables de butiner, ils puisent dans les réserves de miel de la ruche. A l'automne, quand la nourriture devient moins abondante, les faux-bourdons sont tués ou expulsés de la ruche. Ne sachant pas se nourrir seuls, ils meurent.

3-4 Ruche au fil des saisons

Le nombre d'individus de la colonie varie selon la saison et la force de chaque ruche. Ce nombre est de 20 000 à 60 000 individus durant la belle saison (printemps), et il chute à 15 000 jusqu'à 5000 en hiver [Ravazzi, 1996].

Au printemps, les abeilles sortent de la ruche et commencent à butiner dès les premières floraisons. La reine reprend ses pontes, et de jeunes abeilles remplacent celles de l'hiver. C'est : **la phase de développement.**

En mai – juin, les abeilles sont très nombreuses (plus de 40 000) ; les ouvrières élèvent alors les larves de reines. Peu avant la naissance, la vieille reine quitte la ruche avec une partie des abeilles et crée une nouvelle colonie. C'est : **la phase d'essaimage**.

Du printemps au milieu de l'été, les abeilles profitent au maximum des fleurs mellifères pour stocker le miel.

En août, la reine réduit sa ponte, la colonie diminue, les faux-bourçons sont expulsés de la ruche, c'est : **la phase de préparation à l'hivernage**.

En automne, les abeilles butinent les dernières fleurs, la reine reprend sa ponte pour faire naître les abeilles qui traverseront l'hiver.

En hiver, les abeilles restent à l'abri dans la ruche. La colonie est réduite et se serre en grappe autour de la reine qui a cessé de pondre, se nourrissant sur les réserves accumulées au printemps, la température est maintenue au centre de la grappe à 34°-35°C. C'est : **la phase d'hivernage** [Prost, 1990].

3-5 Rôle écologique de l'abeille

La plante mellifère est une plante qui sécrète du nectar ou du miellat, substance à partir de laquelle l'abeille fait son miel telles que : les fleurs des arbres fruitiers, amandiers, abricotiers, les *Eucalyptus*, la lavande.... Si toutes les plantes à fleurs produisent du pollen, toutes ne produisent pas du nectar tel : la rose ou le géranium. La pollinisation désigne la fécondation indispensable à la production sexuée des plantes à fleurs. Les abeilles domestiques, *Apis mellifera* jouent un rôle primordial dans les diverses phases de la vie de nombreuses espèces végétales et animales. Elles contribuent à maintenir la chaîne des écosystèmes [Straub, 2007].

Les abeilles maintiennent l'équilibre de la biosphère terrestre en présentant de nombreux intérêts dont :

- La pollinisation : elles représentent de 65 à 95 % des insectes pollinisateurs [Gallai et al., 2009 ; Moritz et al., 2010 ; Rader et al., 2009] ;
- Le maintien de la diversité génétique [Anderson et al., 2011 ; Krupke et al., 2012] ;
- La production du miel, de la propolis, de la gelée royale, du pollen, et de la cire.

Ainsi donc ces petites bûcheuses que sont les abeilles, représentent non seulement une importance économique mondiale; mais aussi par effet de transition constituent une source intarissable d'effets bénéfiques pour la santé humaine [Bogdanov, 2006]. Si l'abeille arrivait à disparaître, c'est tout un écosystème qui sera déstabilisé et beaucoup d'espèces végétales et animales disparaîtront.

A ce propos, la célèbre citation d'Albert Einstein:

«Si l'abeille disparaissait de la surface du globe, l'homme n'aurait plus que quatre années à vivre» – Albert Einstein.

3-6 Miel et produits de la ruche

Le miel contient du sucre, des sels minéraux, des vitamines, et des oligo-éléments qui lui confèrent un intérêt nutritif bien plus supérieur à celui des sucres raffinés de canne et de betterave. Il possède des vertus médicinales connues depuis bien longtemps. Au V^e siècle avant J.C, Hippocrate, célèbre médecin grec prescrivait le miel pour lutter contre la fièvre, les infections respiratoires, et soigner les blessures cutanées.....Aujourd'hui, les vertus antibactériennes [Recrosio, 2010], anti-inflammatoires [Tomczak ; 2010], anti-oxydantes [Cooper, 2007 ; Hegazi et al., 2009 ; Tomczak, 2010], antifongiques [Koc et al., 2011] et cicatrisantes[Al- Waili et al., 2010] du miel sont scientifiquement prouvées.

La propolis, sorte de mastic fabriqué par les abeilles à partir de résine végétale ; servant de désinfectant contre les bactéries pour la ruche, présente plusieurs propriétés biologiques : antifongiques [Sosa, 2007], cicatrisantes [Pessolato et al., 2011], immunomodulatrices [Orsatti et Sforcin, 2011], anticancéreuses [Chen et al., 2011], antiparasitaires [Monzote et al., 2011] et antibactériennes [Orsi et al., 2011].

La gelée royale possède des vertus revitalisantes remarquables ; enfin la cire très prisée avant l'emploi de la paraffine, entre dans la composition de produits de traitements du bois et de certains cosmétiques.

3-7 Maladies de l'Abeille

Les abeilles subissent depuis une dizaine d'année des pertes importantes dans l'ensemble des régions du monde. Les causes ne sont pas toujours idéalement établies. Les disparitions ont atteint de 50 % à 90 % des populations selon les lieux de la planète [Dupont, 2007]. Le Syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles ou CCD (pour l'expression anglaise «Colony Collapse Disorder») est le nom donné à un phénomène en premier lieu nommé «syndrome de disparition des abeilles» ou aussi «Fall-DwindleDisease» (maladie du déclin automnal des abeilles). Ce phénomène touche les abeilles et par contre-coup, la production apicole dans une grande partie du monde. Ce syndrome d'effondrement décrit le fait que des abeilles domestiques, subitement, à n'importe quelle époque (sauf en hiver où la ruche est en quasi-sommeil) ne rentrent pas dans leur ruche. L'absence de cadavres dans la ruche ou à proximité est le second critère définissant ce nouveau syndrome [Van Engelsdorp et al., 2006]. Des disparitions d'ouvrières ont déjà été observées par le passé, mais elles ont en 2007 des caractéristiques nouvelles jugées alarmantes par le MAAREC (Mid-Atlantic Apiculture Research and extension Consortium) [Johnson, 2007].

- les abeilles "disparaissent" massivement, fait nouveau et particulièrement anormal chez ces insectes sociaux ;

- les pertes sont brutales : une colonie entière peut disparaître en une seule nuit ;

- aucune explication satisfaisante n'a été trouvée.

Curieusement, la reine abandonnée semble en bonne santé et fréquemment continue à pondre, tandis qu'il n'y a plus assez d'ouvrières pour s'occuper du couvain. Les quelques abeilles restées dans la ruche (de jeunes adultes) semblent manquer d'appétit et la production de miel chute fortement.

Parmi les pistes étudiées ou évoquées, les nombreuses maladies qui menacent la vie des abeilles, les plus dangereuses sont: l'acariose et la nosérose, qui touchent les abeilles adultes, la loque Américaine et la loque Européenne, qui touchent le couvain, enfin les mycoses et la varroase communes aux couvains et aux adultes [Fernandez et Coinneau, 2007]. Toutefois, l'augmentation de la pression environnementale à laquelle sont exposées les colonies d'abeilles domestiques est soupçonnée d'être à la base de leur déclin à l'échelle mondiale [Paxton, 2007 ; Grixti et al., 2009 ; Whitehorn et al., 2012]. D'autres facteurs tels

que les prédateurs, les parasites, les résidus des pesticides, la monoculture qui engendre la perte de la diversité génétique [Henry et al., 2012 ; James & Xu, 2012] contribuent à l'affaiblissement et la disparition des colonies d'abeilles [Van Engelsdorp et al., 2009 ; Van Engelsdorp & Meixner, 2010].

Le *Varroa*, et spécifiquement *Varroa destructor* (Acari : varroadae) [Anderson & Truman, 2000], parasite habituel de l'abeille domestique ayant été véhiculé sur l'ensemble des continents par des transferts d'abeilles reproductrices ou de ruches, reste une des causes initiales ou partielles envisageables comme affaiblissant les abeilles et propageant des infections virales associées [Chauzat et al., 2010 ; Topolska et al., 2010 ; Martin et al., 2012].

CHAPITRE IV

Généralités sur le *Varroa* *destructor*

Le *Varroa destructor* [Anderson et Trueman, 2000] est un acarien ectoparasite de l'abeille asiatique *Apis cerana*, qui au milieu du 20^{èm} siècle est passé sur l'abeille domestique *Apis mellifera* [Oldroyd, 1999]. La présence de ce parasite chez d'autres groupes d'insectes a été mentionnée, toutefois, elle ne participe pas à son cycle biologique [Kevan et al., 1990]. Cet acarien est l'agent de la varroase qui est une parasitose de l'abeille mellifère. Le *V.destructor* est un ectoparasite phorétique et obligé de l'abeille, c'est-à-dire qu'il vit sur le corps externe de l'abeille (ectoparasite), se déplace d'une colonie à l'autre en étant transporté par l'abeille (Phorétique) et il ne peut se développer chez d'autres hôtes que l'abeille [Simoneau, 2004].

4-1 Historique

Edward Jacobson découvrit un acarien parasite des abeilles *Apis cerana* de l'île de Java en Indonésie. Ce parasite fut décrit pour la première fois par Oudemans qui lui a donné le nom : *Varroa jacobsoni* en hommage à son découvreur [Oudemans, 1904]. Le passage de *Varroa* de son hôte originel *Apis cerana* à son nouvel hôte *Apis mellifera*, a eu lieu au cours des années 1940 ou 1950 [Grobov, 1976]. La propagation de ce parasite fut très rapide, et ce n'est qu'en 1966 que l'on signale officiellement le danger et les dommages potentiels pour l'apiculture provoqués par l'extension de ce parasite. Les échanges internationaux d'abeilles (colonies, reines) ont fait que la présence de *Varroa* dans les ruches devient de plus en plus mondiale.

Aujourd'hui, peu de régions sont épargnées par l'infestation des colonies d'*Apis mellifera* par ce parasite. L'Australie est un des territoires resté indemne ainsi que, l'île sud de la Nouvelle Zélande et certains pays Africains [Faucon et al., 2007].

En 2000, Anderson et Trueman séparent l'espèce d'acarien connue sous le nom de *Varroa jacobsoni* en deux espèces distinctes : le parasite responsable de la varroase chez l'abeille *Apis mellifera* est : *Varroa destructor*, l'autre espèce qui parasite l'abeille *Apis cerana* est : *Varroa jacobsoni*. La relation entre le parasite et *Apis cerana* est actuellement en état d'équilibre, si bien que *Varroa jacobsoni* ne constitue pas aujourd'hui une menace pour *A. cerana* [Donzé ; 1995 in Wendeling ; 2012] (Tableau 3), (Figure : 29).

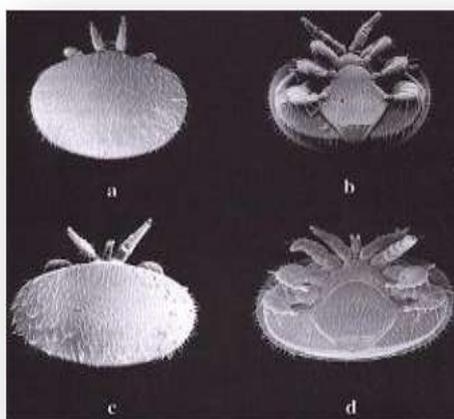


Figure 29 : Représentation des deux espèces de *Varroa* : (a et b) : vues dorsales et ventrales de *Varroa jacobsoni*, (c et d) : vues dorsales et ventrales de *V. Destructor* [Anderson et Trueman, 2000].

Tableau 3 : Différences entre *Varroa destructor* et *Varroa jacobsoni*

	<i>V.destructor</i> Anderson et Truman, 2000	<i>V. jacobsoni</i> Oudemans, 1904	Références
Abeille	<i>A.mellifera</i>	<i>A. cerana asiatique</i>	
Taille	plus grand	plus petit	Delfinado- Baker et Hook, 1989
Développement	Se reproduit dans le couvain des faux-bourçons et des ouvrières	Se reproduit dans le couvain des mâles d' <i>Apis. cerana</i> . Infeste l'abeille asiatique et ne se reproduit pas sur <i>A.mellifera</i> Européenne	Anderson ,2000 Anderson, 1994
Analyse de l'ADN	Différente de celle de <i>V. jacobsoni</i>	Différente de celle de <i>V. destructor</i>	Anderson, 1999

En Algérie, le *Varroa* qui parasite l'abeille *A. mellifera* Intermissa est le *Varroa destructor* [Belaid, 2011]. Anderson et Trueman(2000) attribuent au *Varroa destructor* la classification suivante :

Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous embranchement	Chelicerata
Classe	Arachnidae
Sous classe	Acari
Ordre	Mesostigmata
Sous ordre	Anactinotrichida (parasitiformes)
Famille	Varroidae
Genre	<i>Varroa</i>
Espèce	<i>Varroa destructor</i>

4-2 Morphologie de *Varroa destructor*

Varroa destructor ressemble à un petit crabe aplati. La femelle de couleur rouge à marron foncé mesure de 1,2 à 1,8 mm de long sur 1,5 à 1,6 mm de large, son corps est recouvert de nombreuses soies, et l'extrémité de ses pattes est munie de ventouses pour s'agripper aux abeilles (Figure : 30). Sa forme plate est bien adaptée pour se loger entre la nymphe et les parois de l'alvéole ainsi que sur le corps de l'abeille adulte [Le conte et Faucon, 2002]. L'appareil buccal de la femelle est de type piqueur-suceur.



Figure 30: *V. destructor* femelle adulte (wiki media, 2010)

Les mâles ne sortent jamais des alvéoles. Ils sont blancs jaunâtres, plus petits que la femelle, ils mesurent entre 0,75 à 0,92 mm de longs sur 0,70 à 0,91 mm de large. Leurs appareils buccaux ne sont pas adaptés à la succion de l'hémolymphe de l'abeille [Fernandez et Coineau, 2007], les *Varroa* mâles sont donc incapables de se nourrir seuls, sensibles à la déshydratation, ils meurent après l'émergence de l'abeille adulte [Moritz et Jordan, 1992]. Jusqu'à présent, on ne connaît aucun prédateur à cet acarien [Riondet, 2010] (Figure : 31).



Figure 31: *V. destructor* mâle adulte (wiki media, 2010)

4-3 Cycle de vie de reproduction de *Varroa destructor*

La femelle *Varroa* se nourrit par piqûre de l'hémolymphe (le sang) de l'abeille. La reine, les ouvrières et les faux-bourçons sont tous touchés et à tous les stades de leur développement (larve, nymphe, abeille adulte). La durée de vie d'un parasite est adaptée au cycle de vie de l'abeille. En été, la femelle *Varroa* vit entre un et deux mois, en hiver, entre six et huit mois. Le mâle meurt après l'accouplement [Shutler, 2014]. Le cycle du développement du *Varroa* comporte deux périodes :

- **Période hors couvain :**

Elle est appelée phorétique, pendant cette période l'acarien est sur l'abeille adulte (Figure : 32). Cette période est courte, environ une semaine quand il y a de l'élevage, mais très longue jusqu'à quatre mois en absence de couvain. Il se nourrit de l'hémolymphe de l'abeille et l'affaiblit. Pendant la phorésie, la transmission de la varroase se fait par le butinage, la dérive, le pillage et surtout l'essaimage [Ellis et Zettelnen, 2010]. La phorésie constitue une phase d'attente, en attendant l'infestation du couvain pour un nouveau cycle de reproduction [Al Ghzawi, 1993 in Wendling, 2012].



Figure 32 : *V.destructor* sur abeille adulte (source : la santé de l'abeille)

● **Période dans le couvain :**

La femelle *Varroa* se loge dans une cellule occupée par une larve juste avant son operculation, elle est appelée : femelle fondatrice, elle se place sous la larve dans la bouillie larvaire, et en cas de forte infestation, plusieurs femelles peuvent se loger dans la même alvéole. Elle préfère les cellules de couvain mâle qu'elle distingue à l'odeur [Colin, 1982 et Iftandis, 1988].

La femelle pond de deux à huit œufs, le premier pondu 60 heures après operculation donnera un mâle [Laurent et Santas, 1987 et Donze, 1998], les autres des femelles toutes les 30 heures environ [Iftandis, 1988, in Donze, 1995]. Une fondatrice peut effectuer plusieurs cycles de ponte, elle atteint l'âge adulte en 7 à 8 jours, le mâle *Varroa* atteint l'âge adulte en 5 à 7 jours [Colin, 1982 et Robaux, 1986].

Avant que l'abeille ne sorte de la cellule, les mâles doivent féconder les femelles, seules les femelles fécondées peuvent parasitiser les abeilles adultes et survivre en dehors du couvain. Les mâles ainsi que les femelles non fécondées ne survivent pas, quand la jeune abeille adulte émerge, ils meurent de faim ou de déshydratation et sont jetés par les ouvrières au fond de la ruche lors du nettoyage de la cellule. Le *Varroa* peut ensuite être facilement transporté par les abeilles d'une colonie à une autre, et le cycle de reproduction recommence (Figure : 33).

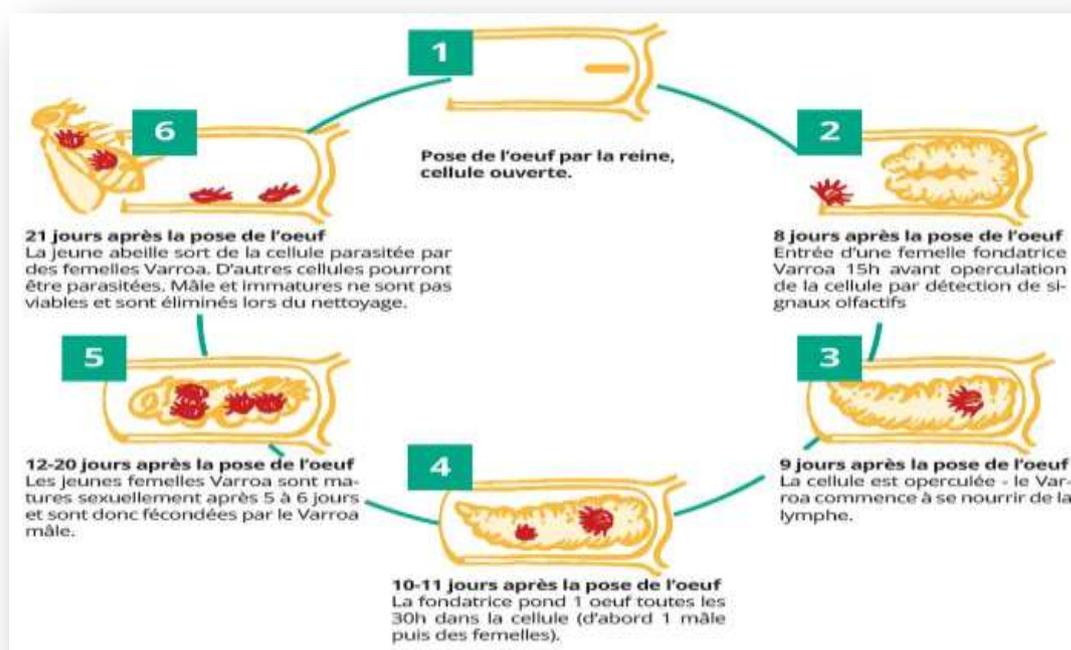


Figure 33 : Principales étapes du cycle de reproduction de *Varroa* [Martin, 1994]

4-4 Evolution de l'infestation de *Varroa destructor*

L'augmentation de la population de *Varroa* suit celle de la colonie d'abeille, la situation devient critique en fin d'été quand le couvain diminue alors que le rythme de reproduction de *Varroa* continue. L'infestation est à son minimum en hiver, elle augmente au cours de la saison apicole ou les cellules du couvain mâle sont beaucoup plus infestées que celles du couvain des ouvrières et elle atteint son paroxysme en automne [Boot, 1995 et Calderone, 2001].

La maladie provoquée par la prolifération de *Varroa* est appelée : la varroase ou varroose. C'est une maladie contagieuse affectant les abeilles à tous les stades de leur développement, causant affaiblissement et effondrement des colonies.

4-4-1 Effets du *V.destructor* sur l'abeille

Le *Varroa* se nourrit de l'hémolymphe, il prive l'abeille de nombreuses cellules sanguines et de protéines [Colin, 1989]. La gelée produite par les nourrices est alors de moins bonne qualité ce qui nuit au développement du couvain [Pinto et al., 2011]. Les ailes sont déformées [Bowen-Walker et al., 1999] (Figure : 34), le poids des abeilles infestées baisse

sensiblement [Schneider et Drescher, 1987 in Belaid, 2010] (Figure 35). La durée de vie des abeilles est réduite, car le parasite diminue leur capacité de vol ainsi que leur activité dans la ruche, c'est l'action mécanique de *Varroa* [Fernandez et Coinneau, 2007]. L'effet de *Varroa* le plus dévastateur est son action vectrice qui est la transmission des maladies d'une colonie à une autre, qui peuvent être virales ou bactériennes lors des piqûres [Simoneau, 2001]. Ainsi la varroase est souvent associée au développement d'autres maladies telles que : la maladie des ailes déformée, la paralysie aigue [Bowen-Walker et al., 1999], et la loque [Allipi, 1991 in Vandame, 1996].



Figure 34 : Abeille avec des ailes déformées [source : L'abeille du XX^e siècle]



Figure 35 : Abeille saine (à gauche) et abeille parasitée par *Varroa* (à droite) peu de temps avant l'éclosion (Photo Bee Research, ALP)

4-4-2 Effet de *Varroa destructor* sur la colonie

La colonie d'abeille paraît normale quand l'infestation par *Varroa* est faible, mais lorsque l'infestation est importante on assiste à une diminution brutale du nombre d'abeille. L'expression clinique la plus caractéristique est la présence d'abeilles trainantes au sol, certaines ont les ailes écartées, déformées, le corps peut être noir dépourvu de poils, le couvain est en mosaïque et il paraît négligé, des alvéoles ouvertes et des alvéoles vides (Figures : 36 et 37). Les réserves en miel et pollen apparaissent disproportionner par rapport à la force de la colonie. La mort de la colonie survient la plus part du temps pendant l'hiver [Wendeling, 2012]



Figure 36: Couvain d'ouvrières parasité par *V. destructor* (The Food and Environment Research Agency, UK, 2010 in Wendeling, 2012).



Figure 37: Famille de *Varroa* dans une cellule. On aperçoit la tache blanche des excréments (Photo Bee Research, ALP).

4-5 Moyens de lutte contre le *Varroa destructor*

4-5-1 Evaluation de l'infestation par *Varroa destructor*

Il existe trois façons pour évaluer l'infestation par *Varroa*, directement dans le couvain, directement sur les abeilles et indirectement par la chute naturelle de *Varroa*. La méthode visuelle est trop imprécise, toutefois elle peut donner une impression générale du degré d'infestation [Develin, 2001 in Giovenazzo, 2011].

- **Examen du couvain** : cette méthode consiste à prélever les acariens qui se trouvent dans les cellules du couvain operculé, elle donne une idée sur le taux d'infestation de celui-ci, en effet 50 à 90 % des *Varroas* se trouvent dans les cellules operculées du couvain [Rosenkranz et al., 2010]. L'opercule protège ainsi la plus grande partie de la population lors de l'application des traitements ponctuels peu rémanents.

- **Examen de l'abeille** : le principe est de ramasser 150 à 300 abeilles par colonie, les mettre dans un bocal contenant de l'alcool ou bien de l'eau plus un détergent, agiter et compter le nombre de *Varroa* tombé. Leur pourcentage par rapport aux abeilles prélevées nous donne le degré d'infestation de la colonie [Cantin, 2012]. Un *Varroa* visible sur une abeille égal 5 à 10 *Varroa* présents dans le couvain [Martin, 1994].

- **Chute naturelle** : sur le plancher de la ruche, on place un plateau enduit de graisse protégé d'une grille pour empêcher le nettoyage spontané des ruches par les abeilles. Cette méthode est plus représentative son avantage est qu'on puisse récolter les *Varroa* morts à n'importe quelle période de l'année [Labeste, 2013, Ghomari, 2014]. Elle est plus précise que les deux précédentes, elle ne nécessite pas l'ouverture de la ruche. C'est une méthode qui consiste à établir un taux moyen de *Varroa* par jour, ainsi 24 *Varroa* observés sur six jours = 4 *Varroa* / jours [Rosenkranz et al., 2010].

Hors les périodes de traitement, les valeurs de comptage considérées comme compatibles avec une bonne viabilité de la ruche ne devraient pas dépasser les bornes suivantes, étant admis que la chute d'un *Varroa* tous les deux jours traduit la présence de 50 *Varroa* dans la ruche [Rosenkranz et al., 2010].

- ◆ Printemps : $\frac{1}{2}$ *Varroa* / 24 heures, ou 1 *Varroa* / 100 abeilles.

- ◆ mi - juin : 5 *Varroas* / 24 heures, ou 3 *Varroa* / 100 abeilles.

◆ mi - juillet : 10 *Varroas* / 24 heures ou 3 *Varroa* / 100 abeilles.

◆ Aout : 25 *Varroas* / 24 heures ou 5 *Varroa* / 100 abeilles.

En toutes situation, un comptage supérieur à 25 *Varroa* /jours impose un traitement immédiat et impératif pour la survie de la colonie [Barbançon, 2012].

4-5-2 Lutte par traitements acaricides

Le contrôle du parasite *Varroa destructor* a été réalisé par l'utilisation d'acaricides efficaces contre l'acarien et tolérés par l'abeille *Apis mellifera* [Wendeling, 2012]. Les qualités recherchées pour un traitement sont: une bonne efficacité vis-à-vis de l'agent à traiter, une innocuité pour l'abeille, n'entraînant pas une résistance, une innocuité pour le manipulateur et ne contamine pas les produits de la ruche [Colin, 2011 in Wendeling, 2012].

Les acaricides les plus utilisés dans le monde sont à base de fluvinate [Apistan®, Klarton®], d'amitraz [Apivar], de fluméthrine [Bayvarol®] et de coumaphose [Perizin®]. Ces produits ont une activité comprise entre 50 et 99 % et dans la plupart des cas seuls les *Varroa* phorétiques sont accessibles par ces substances thérapeutiques [Faucon et al., 2007]. Malheureusement, l'apparition de la résistance de *Varroa* a été constatée dans plusieurs pays surtout vis-à-vis du fluvinate [Apistan®, Klarton®]. D'autres acaricides ont l'inconvénient de laisser des résidus importants dans les cires d'abeilles tels que le Perizin qui se retrouve dans les cires et nuit au développement des larves d'abeilles [Bacher, 2006]. L'alternance des molécules accroît l'action du traitement, et actuellement il est nécessaire de faire deux traitements, le premier en fin de récolte du miel et le second en hiver ou on a un faible nombre de couvain.

4-5-3 Lutte par traitements alternatifs

Ces traitements « biologiques » ont une efficacité plus irrégulière et plus faibles que les acaricides, toutefois, leurs résidus présentent moins de nocivité pour la santé, ils permettent d'élargir la palette des traitements et de réduire l'apparition de résistance de *Varroa* [Clément, 2011]. Ces traitements se font soit :

- Par application d'acides organiques qui sont présents naturellement dans le miel tels que : l'acide formique et l'acide oxalique [Adjlane, 2016]. La manipulation de ces produits nécessite beaucoup de précautions et un respect du protocole d'utilisation, car ils ont montré

une toxicité pour l'Homme et pour l'abeille. Le mode d'application de l'acide oxalique est : dégouttement, pulvérisation [Imdorf et al. 1997], évaporation [Imdorf et al. 2003], ou bien par insertion de bandelettes [Boucher, 2004]. L'application de l'acide formique se fait par insertion de bandelettes imbibées, il est conseillé en hiver car un traitement au printemps augmente la concentration de l'acide formique dans le miel [Bogdavov et al., 2002].

- Soit par application des huiles essentielles extraites directement des plantes comme le traitement par fumigation du Thym [Ghomari et al., 2014] et le traitement par la méthode « pose des langes » en utilisant l'huile essentielle d'*Eucalyptus* seule ou mélangée à d'autres huiles essentielles [Labeste, 2013 ; Habbi-Cherifi, 2014]. Le thymol ayant donné les meilleurs résultats [Imdorf et al., 1999], plusieurs acaricides à base de thymol ont fait leur apparition et sont utilisés pour la lutte contre *Varroa*, les plus courants sont : Apilifvar®, Apiguard® et Thymovar®.

Plusieurs travaux ont été effectués par les chercheurs du monde entier notamment en Algérie, afin d'étudier l'efficacité des huiles essentielles contre *Varroa destructor* des abeilles (Tableau 4).

Tableau 4 : Huiles essentielles utilisées contre *Varroa destructor*

Huiles essentielles	Références
Thym commun Romarin	Razafindrazaka, 2011
Eucalyptus (gommier bleu) Romarin	Habbi- Cherifi, 2014
Thym commun	Ghomari et al., 2014
Eucalyptus (gommier bleu) Geranium Origan Anis Lavande Oranger	Imdorf et al., 1999
Lavande Laurier et Thym	Damani et al., 2009
Clou de girofle Geranium Lavande Vetiver Palmarosa Eucalyptus (gommier bleu)	Labeste, 2013
(camomille sauvage) Eucalyptus (gommier bleu)	Eguaras et al., 2005 Ruffinengo et al., 2001

orange amère, citronnelle	Abdelwahab et al., 2006
Menthe Eucalyptus (gommier bleu) Marjolaine Cumin Ail Basilic Orange Geranium Anis	Ariana et al., 2002 Abdelhalim et al., 2006 Nageh et al. 2011
Clou de girofle	Maggi et al., 2010
Romarin	Maggi et al., 2011
Thym commun <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Ghasemi et al., 2011
Thym commun Basilic	Refaei, 2011
<i>Eucalyptus globulus</i> Thym commun Origan	Samataro et al., 1998
Girofle Ail Olive	Mahmoud et al., 2014

4-5-4 Lutte par traitements mécaniques

La méthode de la lutte mécanique est de plus en plus utilisée, l'apiculteur peut lui-même réaliser ces différentes techniques telles que :

- Equiper les ruches d'un plateau grillagé pour que les *Varroa* qui chutent au fond de la ruche restent prisonniers de ces plateaux [Labeste, 2013, Ghomari et al., 2014].
- Bloquer la ponte de la reine ainsi on perturbe et on interrompt la multiplication des femelles *Varroa* [Giacomelli et al., 2016].
- Retirer et détruire le couvain des mâles après operculation, ce qui permettra de diminuer l'infestation [Calderone, 2005].
- Former de jeunes nuclei par essaimage, ainsi la quantité de *Varroa* sera répartie entre deux colonies ce qui réduira le taux d'infestation [Charriere et al., 1998 in Wendeling, 2012].

4-5-5 Lutte contre *V. destructor* et axes de recherches

La recherche s'oriente vers l'utilisation des champignons dont l'effet acaricide contre *Varroa* semble prometteur [Rodriguez et al., 2009], la sélection d'abeilles tolérantes ou résistantes au *Varroa* [Burel, 2012], et enfin l'utilisation de bio pesticides qui se basent sur la découverte de virus qui s'attaqueraient au *Varroa* et épargneraient l'abeille, toutefois la culture de ces virus reste problématique [Tardieu, 2009].

4-6 Apiculture et *Varroa destructor* en Algérie

Au cours de ces dernières années, on a remarqué un affaiblissement et une mortalité inhabituelle des colonies d'abeilles dans plusieurs pays du monde notamment en Algérie [Van Engelsdorp et al., 2010 ; Boucher, 2009 in Adjlane, 2012]. En 2010, l'Algérie comptait environ 1,2 millions de colonies d'abeilles mais dont le rendement restait très faible [Adjlane, 2012]. Les maladies qui figurent sur la liste des maladies des abeilles à déclaration obligatoire en Algérie sont : la varroase, les loques (Américaines et Européennes), la nosérose et l'acariose. Le principal agent responsable de la mortalité des colonies d'abeilles en Algérie est : *Varroa destructor* [Adjlane, 2012]. Cet acarien a fait sa première apparition en Algérie en 1981 [De Favaux, 1981], précisément dans les ruchers de la région de Souk Ahras venant à partir des abeilles ramenées de Tunisie. La Tunisie a, elle, été contaminée par des colonies d'abeilles importées de Roumanie. Le *Varroa* a causé beaucoup de dégâts au niveau des ruchers nationaux, en effet plus de la moitié avaient un niveau d'infestation dans le couvain dépassant le seuil tolérable ; estimé à 15% dans une colonie saine [Wilkinson et Smith, 2002 in Adjlane, 2012].

Depuis, plusieurs études ont été menées en Algérie pour trouver les meilleurs moyens pour combattre *V. destructor* et minimiser ainsi, ses effets néfastes sur notre cheptel apicole en préservant l'abeille et les produits de la ruche [Aliouane et al., 2009 ; Belaid, 2011 ; Benseghir, 2010 ; Adjlane, 2012 ; Ghomari, 2014 ; Habbi- Cherifi, 2014 ; Koumad, 2015 ; Nedji, 2015].

Le présent travail s'inscrit dans l'effort commun aussi bien national que mondial, pour la lutte contre ce parasite et la préservation de la richesse apicole terrestre.

Deuxième partie

Partie expérimentale

CHAPITRE V

Matériel et méthodes

Le présent travail a pour objectif général la valorisation des HE du genre *Eucalyptus*. L'étude s'est intéressée à trois espèces : *E. robusta*, *E. sideroxylon* et *E. globulus* récoltées à l'arborétum de Draa Naga, forêt de « Djebel El Ouahch », Constantine. Le travail d'extraction et de l'évaluation de l'activité biologique a été réalisé au laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de l'université des Frères Mentouri Constantine 1.

La partie expérimentale se présente sous forme de deux grandes parties :

- La première partie est consacrée à l'étude analytique des huiles essentielles, l'extraction des huiles essentielles des espèces végétales, le calcul du rendement la détermination des propriétés physicochimiques et la détermination de leur composition chimique par la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse CPG/SM ont été détaillés.
- La deuxième partie est consacrée aux tests biologiques, la toxicité des huiles essentielles a été évaluée par le test de létalité de la crevette de saumure (Brine Shrimp Lethality Test BSL) et l'activité acaricide des huiles essentielles sur l'acarien des abeilles *Varroa destructor* par le test de la méthode « pose des langes » ou « couvre fonds », qui a été réalisées dans le rucher « Boufernana » de la coopérative « El Fadjr » située dans la commune de Azzaba, wilaya de Skikda.

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour exploiter statistiquement les résultats de l'analyse CPG/SM l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH). Le traitement statistique de l'activité acaricide des HE est fait avec le test t-Student.

Le schéma général suivi lors de la réalisation de ce travail de recherche est résumé dans la figure 38.

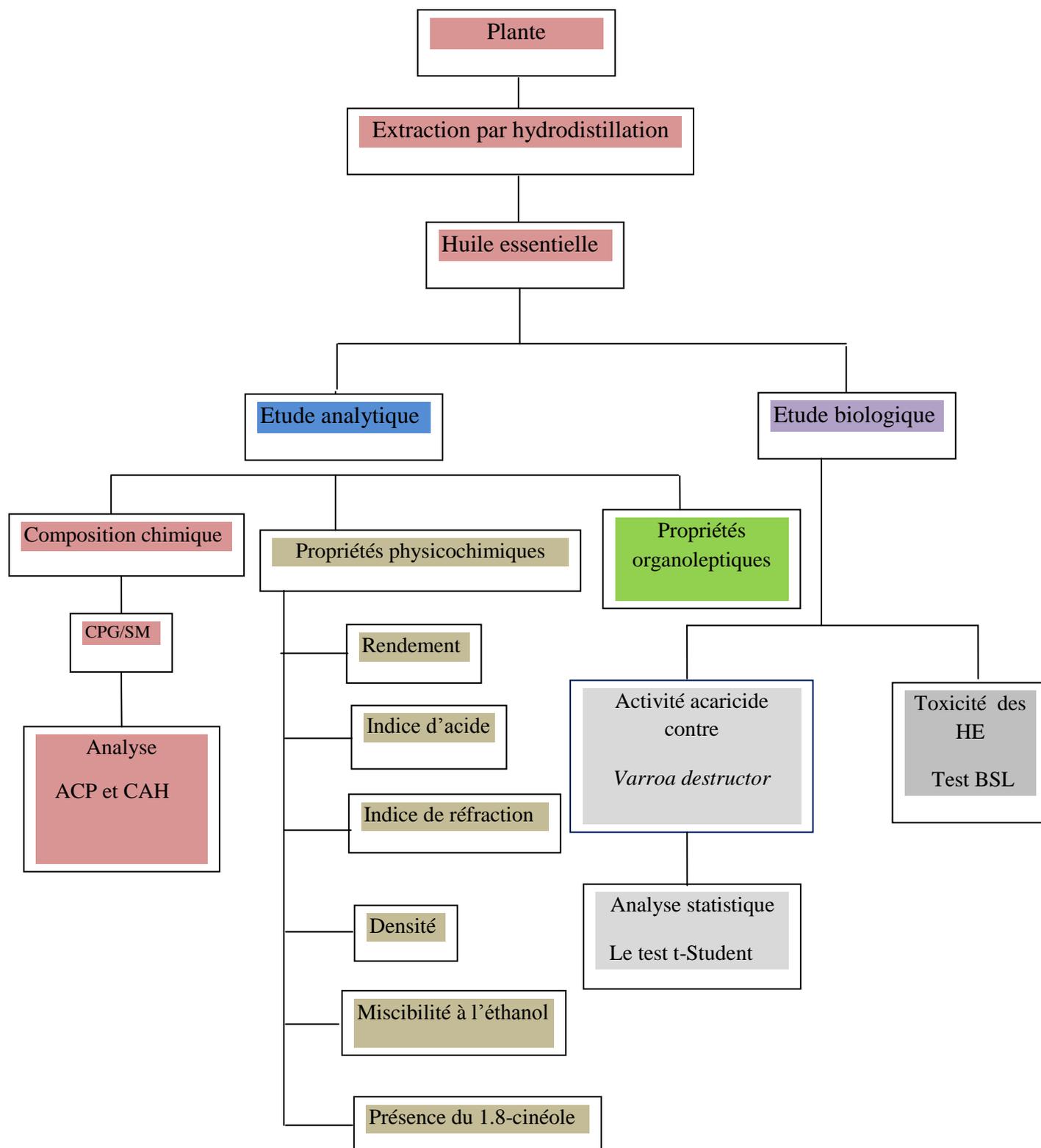


Figure 38 : Schéma général de l'expérimentation

I ETUDE ANALYTIQUE

5-1 Présentation de la zone d'étude

Les trois espèces étudiées *E. robusta*, *E.sideroxylon* et *E.globulus* ont été récoltées en avril 2012 et en avril 2014 au niveau de l'Arboretum de Draa Naga dans la forêt de « Djebel El Ouahch » Wilaya de Constantine au nord est de l'Algérie (Figures : 39 et 40). Les spécimens de référence des espèces Er(Er006502), Es(Es006503) et Eg(Eg006501) ont été déposés au niveau de la Conservation des Forêts de Constantine.



Figure 39 : Localisation de la région d'étude

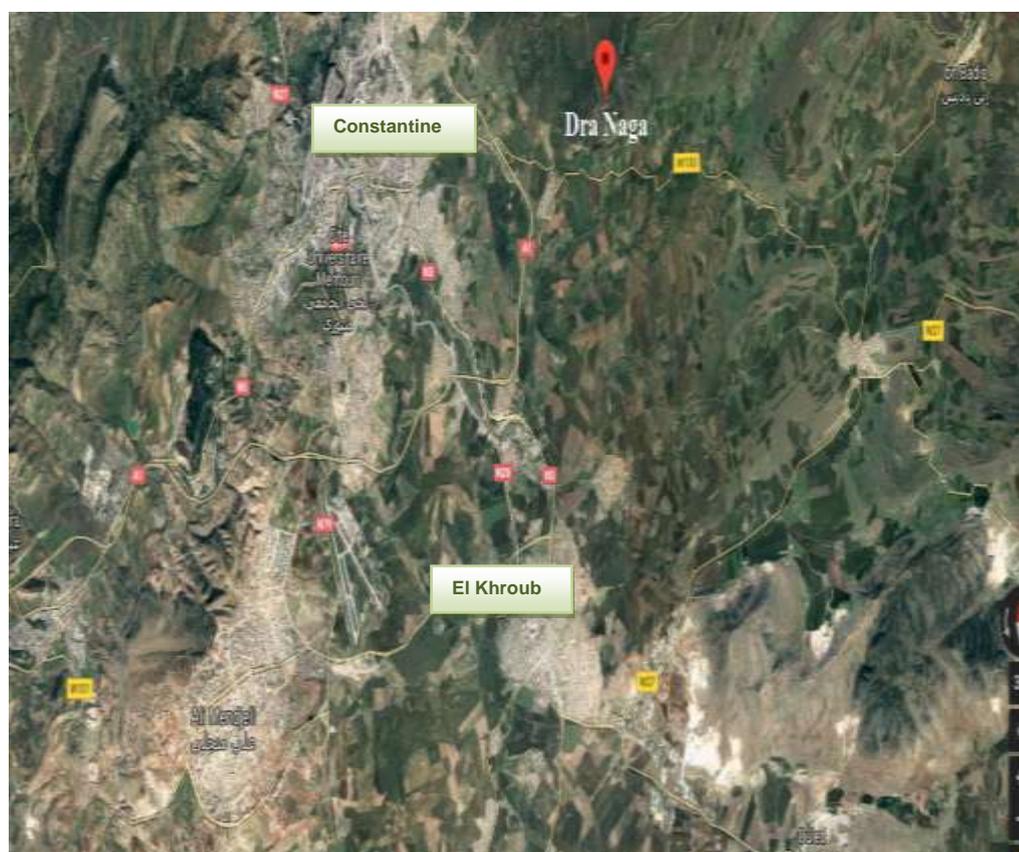


Figure 40 : Forêt de Djebel El Ouahch

L'Arboretum de Draa Naga est géré par la conservation des forêts de la wilaya de Constantine. La station forestière de « Draa naga » est formée d'un Arboretum

(implanté en 1954 et en 1967) de 77 parcelles, où sont plantées plusieurs espèces sylvicoles (feuillus et résineux) de provenances diverses introduites dans le but de connaître leur potentialités, adaptations, productivités et de mettre à la disposition des forestiers une gamme d'espèces leur permettant d'orienter la reconstitution de la forêt [Leguene, 2014].

La zone d'étude ou arboretum de Draa Naga (forêt de Djebel El Ouahch) appartient à la wilaya de Constantine (15 Km de Constantine). Il est situé entre la longitude [$X_1 : 6^{\circ} 42' 5''$, $X_2 : 6^{\circ} 42' 30''$] et la latitude ($Y_1 : 36^{\circ} 20' 45''$, $Y_2 : 36^{\circ} 22' 15''$), il occupe une superficie de 30 ha (Figure 41). Le plan parcellaire de l'arboretum est donné dans la figure 42.



**Figure 41 : Situation géographique de l'arboretum de Draa Naga
(Google maps, 2018)**

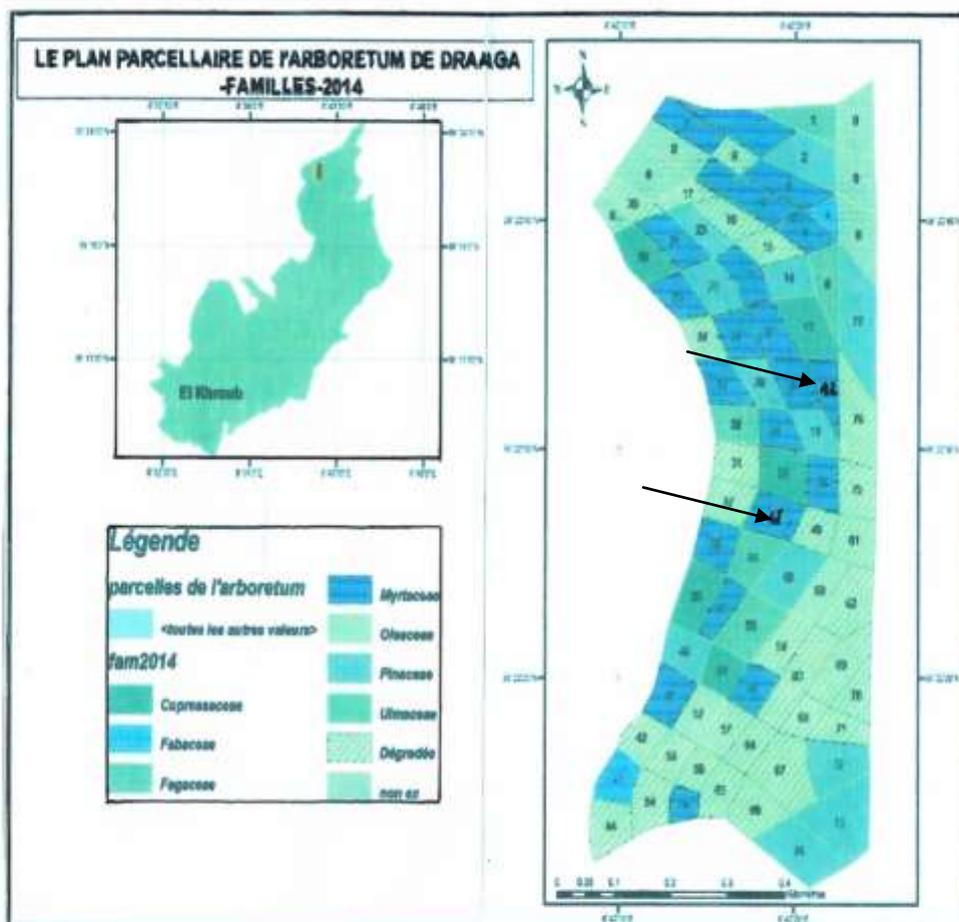


Figure 42 : Plan parcellaire de l’Arboretum de Draa Naga (Source : la conservation des forêts de Constantine)

Sur ce plan La parcelle 47 correspond à l’espèce Er, la parcelle 12 à Es quant à Eg l’espèce est plantée aux alentours de l’arboretum de Draa Naga (Figure 42).

Les espèces et leurs origines sont données dans le tableau 5.

Tableau 5 : Origines et noms communs des espèces étudiées

Nom latin	Auteur	Nom commun	Famille	Parties prélevées
<i>E. robusta</i> Sm	Smith(1795)	Gommier robuste ou <i>Eucalyptus</i> des marais	Myrtacées	Feuilles
<i>E. sideroxylon</i> A. Cunn	A. Cunningham (1886)	<i>Eucalyptus</i> à écorce de fer (Ironbark) rouge ou mugga		
<i>E.globulus</i> Labill.	Labillardière (1800)	Gommier bleu		

5-2 Présentation botanique des *Eucalyptus*

5-2-1 *Eucalyptus robusta* Sm

L'Eucalyptus robusta (Er), communément appelé acajou de marais est décrit comme étant un arbre d'une hauteur de 20 à 30 mètres et de plus de 1 mètre de diamètre. Le tronc et les branches sont couverts d'écorce épaisse rouge-brune spongieuse. Les feuilles sont larges d'un vert foncé et les fleurs blanches à crèmes apparaissent en automne et en hivers [Boland et al., 2006] (Figures : 43 et 44).



Figure 43: Arbre d'*Eucalyptus robusta* (source: wikipedia)



Figure 44: Feuilles et fruits d'*Eucalyptus robusta* (photo personnelle, 2014)

5-2-2 *Eucalyptus sideroxylon* A. cunn

L'Eucalyptus sideroxylon (Es), appelé aussi *Eucalyptus* à écorce de fer d'une hauteur de 25 mètres, il doit son nom à son écorce persistante dure presque noire sur le tronc et les grosses branches, lisse et blanche sur les jeunes branches. Les feuilles adultes sont pétiolées, lancéolées mesurant 14 cm de long sur 1,8 cm de large, d'un gris ou vert terne. Les fleurs sont de couleur blanche, rose, rouge ou jaune pâle et apparaissent du début de l'automne jusqu'au milieu du printemps [Nicolle, 2010] (Figures: 45, 46, 47).



Figure 45 : Fruits et feuilles d'*Eucalyptus sideroxylon* (photo personnelle, 2014)



Figure 46: Fruits d'*Eucalyptus sideroxylon* (Photo personnelle, 20140)

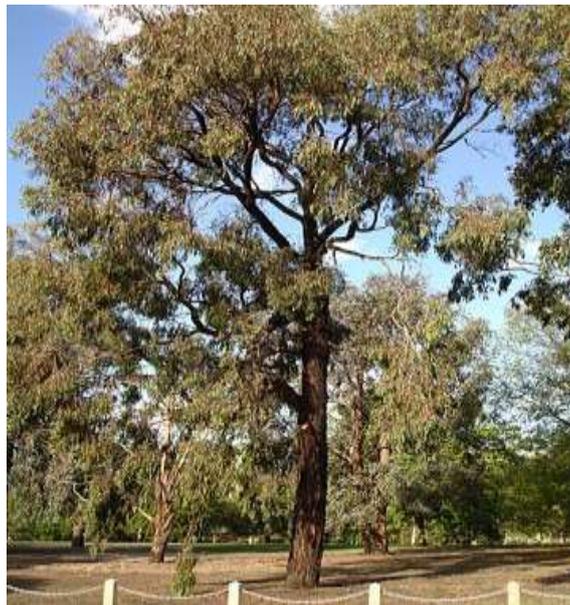


Figure 47: Arbre d'*Eucalyptus sideroxylon* (source : wikipedia)

5-2-3 *Eucalyptus globulus* Labill

L'*Eucalyptus globulus* (Eg), appelé communément : Gommier bleu, arbre de fièvre ou *Eucalyptus* commun peut croître jusqu'à 30-55 m de haut. Les feuilles des arbres juvéniles sont couvertes d'une pruite cireuse bleu-gris qui est à l'origine du nom de gommier bleu. Les feuilles des arbres adultes sont d'un vert foncé luisant, les fleurs blanches sont solitaires à l'aisselle des feuilles, elles produisent un abondant

nectar que les abeilles transforment en un miel à saveur prononcée. Les fruits ligneux ont une capsule très dure [Bruneton, 1987] (Figures : 48, 49).

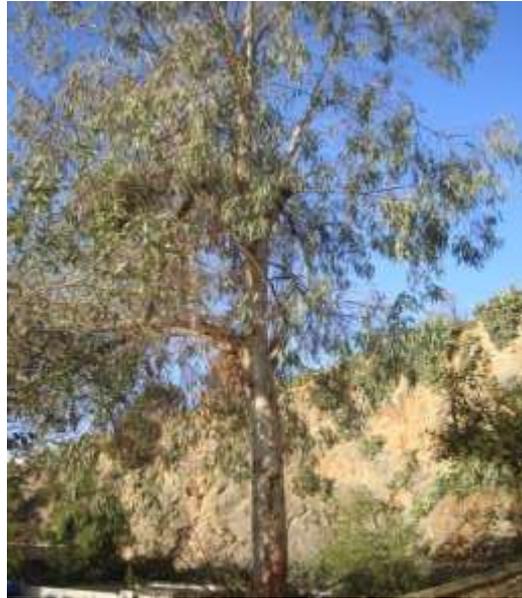


Figure 48 : Arbre d'*Eucalyptus globulus* (photo personnelle, 2014)



Figure 49 : Feuilles et fruits d'*Eucalyptus globulus* (photo personnelle, 2014)

5-3 Analyses physicochimiques

5-3-1 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles des feuilles sèches des différentes espèces Er, Es et Eg ont été extraites par entrainement à la vapeur d'eau au laboratoire de Pharmacologie et de Toxicologie de l'université Constantine 1.

- **Technique d'hydrodistillation :**

Les feuilles des *Eucalyptus* sont découpées en petits morceaux, et introduites dans un ballon en verre de 5 litres rempli au 2/3 de sa capacité. L'ensemble est chauffé dans un chauffe ballon jusqu'à l'ébullition où on a la formation d'une vapeur chargée de constituants volatiles. Au contact des parois du réfrigérant qui est constamment refroidi à une température comprise entre 15°C et 18°C, les vapeurs chaudes se condensent et s'écoulent dans un récipient où elles forment le distillat. Ce dernier est un mélange de deux phases non miscibles (huile essentielle + eau) qui seront séparées par décantation. La phase organique (l'huile essentielle) est séchée sur une surface de sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'eau et l'huile obtenue est conservée dans un flacon en verre opaque à une température de 4°C. La durée de la distillation est de 3 à 4 heures (Figure : 50).



Figure 50 : Montage utilisé pour l'extraction des huiles essentielles

5-3-2 Détermination et calcul du rendement

Le rendement est la quantité maximale d'huile essentielle que donne une masse donnée de végétal pendant une période donnée. C'est le rapport entre la masse de l'huile essentielle obtenue sur la masse du matériel végétal utilisé. On a calculé le rendement en utilisant la relation suivante :

$$R(\%) = \text{Masse(HE)} / \text{Masse (M V S)} \times 100$$

R (%) : Rendement en huile essentielle.

Masse (HE) : masse de l'huile essentielle.

Masse (MVF) : masse du matériel végétal sec.

5-3-3 Caractérisation physicochimique des huiles essentielles

Les méthodes utilisées pour déterminer les indices physicochimiques de nos huiles essentielles sont celles indiquées dans le recueil de normes de l'Association Française de Normalisation (AFNOR).

• Mesure de la densité relative (Norme NF T 75 -111. 2000)

La densité relative de l'HE est définie comme étant le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C et la masse de volume d'eau distillée à 20°C. Cette grandeur est sans dimension et son symbole est d_{20} . On a mesuré la densité à l'aide de la formule suivante : $\rho = m/v$ [Kebisi, 2011]

ρ : masse volumique de l'huile (g/l)

m : masse du volume (v) de l'huile (g).

v : volume de l'huile (ml).

On effectue la correction à 20°C par la formule :

$$d_{20} = d_{\text{exp}} + 0,00073 (T_{\text{exp}} - 20)$$

d_{20} : Densité à 20°C.

d_{exp} : Densité mesurée par la relation : $d_{\text{exp}} = \rho_{\text{(HE)}} / \rho_{\text{(EAU)}}$ [$\rho_{\text{(EAU)}} = 1 \text{ g/l}$]

T_{exp} : Température ambiante.

• Mesure de l'indice de réfraction (Norme NF T 75 – 112. 2000)

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante où la longueur d'onde de la raie D de sodium est 589,3nm. Ensuite on effectue la correction à 20°C par la formule suivante :

$$\eta_D^{20} = \eta_D^T + 0,00045 (T - 20)$$

η_D^{20} : Indice de réfraction à 20°C.

η_D^T : Indice de réfraction à la température ambiante ou de mesure.

T : Température ambiante.

On a déterminé les indices de réfractons de nos huiles essentielles au niveau du laboratoire physicochimique du Centre Algérien du Contrôle de Qualité et de l'Emballage de Constantine (CACQE). Le réfractomètre utilisé est de type ABBE, il est muni d'un système de température, d'une lampe de sodium, et d'un thermostat. On a fait une lecture directe sur l'appareil étalonné avec l'eau ($I_R = 1,333$) à 20°C.

L'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement supérieur à celui de l'eau égal à 1,333 à 20°C. Le faible indice de réfraction pour l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (Boukhatem et al., 2010).

• Mesure de l'indice d'acide : (AFNOR NFT 75 – 103. 2000)

Il représente le nombre en milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle.

1^{ère} étape : On neutralise 50ml d'un mélange à volumes égaux d'éthanol à 96 % et d'éther de pétrole.

Dans la burette : On met une solution d'hydroxyde de potassium (0,01M).

Dans la fiole conique : On met le mélange de solvant à neutraliser et 0,5ml de la solution de phénolphaléine (mélange incolore en milieu acide)

La solution d'hydroxyde de potassium est versée goutte à goutte jusqu'au virage au rose persistant.

2^{ème} étape : Détermination de l'indice d'acide

On dissout 1 g d'huile essentielle dans 50 ml du mélange éthanol à 96 % et d'éther de pétrole neutralisé. Après dissolution, On titre la solution contenant l'huile essentielle par la solution d'hydroxyde de potassium 0,01 M. Le titrage est terminé lorsque la couleur rose pâle persiste pendant au moins 15 s. On note alors le volume de KOH, et l'indice d'acide est calculé selon la formule suivante [Chaabane et al, 2001] :

$$\text{IA} = \text{N} \cdot \text{V} \cdot 56,1 / \text{PE}$$

IA : indice d'acide

N : normalité de KOH

V : volume de la solution de KOH (ml)

PE : prise d'essai de l'huile essentielle (g)

56,1 : masse molaire de KOH

• Miscibilité à l'éthanol : (AFNOR 75 - 101. 2000)

Une huile essentielle est dite « soluble dans n volume et plus d'alcool d'un titre donné « t », si la solution limpide dans n volumes demeure limpide comparée à l'huile essentielle non diluée, après addition de nouvelles quantités d'alcool jusqu'au volume de 20 ml. On ajoute à 1 ml d'huile essentielle de l'éthanol à 70% par des quantités de 0,1 ml, quand on arrive à une solution limpide on note le volume de l'alcool et on continue jusqu'à 20 ml. La miscibilité des huiles essentielles dans l'alcool est exprimée comme suit : un volume d'huile essentielle dans V volumes d'éthanol à titre t.

- **Identification du cinéole:[EDQM : Pharmacopée Européenne 8^{ème} édition]**

On ajoute 4 ml d'acide sulfurique (réactif commercial) à 0,1 ml d'huile essentielle, il se développe alors une couleur rouge orange qui vire au brun foncé par ajout de 0,2 ml de formaldéhyde. Ce virage de couleur indique la présence du cinéole dans l'huile essentielle.

- **Identification de l'HE d'*Eucalyptus* selon la pharmacopée Japonaise 16^{ème} édition :**

On mélange 1 ml d'une huile essentielle avec 1 ml d'acide phosphorique, si au bout de 30 minutes le mélange se solidifie, ceci indique qu'il s'agit d'une huile essentielle du genre *Eucalyptus*.

5-4 Analyse des huiles essentielles par CPG/SM

L'Huile essentielle extraite des feuilles d'Er, Es et Eg a été analysé par un chromatographe en phase gazeuse couplé à spectromètre de masse «GPC/SM» (système Agilent HP-5MS.) décrit ci-dessous: colonne de chromatographie capillaire de 30 m (longueur), 0,25 mm (diamètre) et 25 µm (épaisseur du film)], avec une phase stationnaire apolaire de 5% de phényle et de 95% de diméthyle polysiloxane. La température du compartiment de la colonne a été programmée de 50 à 200 ° C pour 10 ° C / min; l'Interface GPC / MS a été maintenu à 230 ° C et la source d'ionisation à 150 ° C. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur avec un débit de 0,5 ml / min; le volume d'injection était de 0,5 µl; et l'énergie d'ionisation SM était de 70ev avec une bande de balayage de 45 à 400 u.

Les divers constituants d'HE, ont été identifiés par leurs indices de rétention (indices de Kovats) (RI) calculés par rapport aux temps de rétention d'un mélange d'alcane linéaires C₆-C₃₀ et par comparaison de leurs spectres de masse avec ceux stockés dans deux bibliothèques de spectres de masse (Wiley 275 et Nist 0.5). Les IR ont été aussi justifiés par comparaison avec ceux rapportés dans la littérature [Adams, 2007].

II ETUDE BIOLOGIQUE

5-1 Test de létalité de la crevette de saumure (The Brine Shrimp Lethality Assay : BSL)

Les composés bioactifs sont presque toujours toxiques à doses élevées, une létalité *in vivo* dans un organisme simple comme la crevette de saumure peut être utilisé comme un moyen commode de surveillance des constituants bioactifs des plantes [Michael et al., 1956 ; Meyer et al., 1982 ; Mac Laughlin et al., 1998].

Le test BSL a été utilisé pour déterminer la toxicité de nos HE et la méthode modifiée de Mc Laughlin et al., (1991) a été suivie dans cette étude. Différentes concentrations (1000, 100, 10, 1 ppm) des HE de nos trois espèces d'*Eucalyptus* ont été préparés en utilisant de l'huile essentielle, du diméthyl sulfoxyde (DMSO 1%) et l'eau salée. Les œufs d'*Artemia salina* ont été placés dans de l'eau salée, au bout de 48h d'incubation à température ambiante, les larves (nauplii) ont éclos et ont été récupérées pour la suite de l'expérience. Des plaques multi puits stérilisées ont été utilisées, dix larves de crevettes ont été placées dans chaque puits contenant 4,5 mL d'eau salée et 0,5 mL d'HE. Le test pour chaque concentration a été fait 4 fois et un test contrôle contenant 4,9 mL d'eau salée, 0,1 mL de DMSO et dix nauplii a été fait en parallèle [Parra et al., 2001 ; Pisutananan et al., 2004 ; Sharma et al., 2013] (Figure : 51).

Le contrôle permet d'éliminer d'autres facteurs qui contribuent au nombre total de nauplii morts. Le solvant utilisé pour dissoudre les extraits de plantes brutes est un contrôle négatif à cet effet [Asaduzzaman et al., 2015]. L'expérience a été maintenue à la température ambiante pendant 24 heures où le nombre de larves survivantes a été compté et enregistré.

Le résultat est interprété à l'aide d'une analyse de régression Probit (Finney, 1971), pour le calcul de la concentration létale CL50 ($\mu\text{g/mL}$ ou ppm), avec un intervalle de confiance de 95% pour une comparaison de puissance statistiquement significative [Meyer et al., 1982 ; Mc Laughlin et al., 1991 ; Wanyoike et al., 2004]. En effet, la méthode statistique de Finney a été incorporée dans plusieurs logiciels tels que Stata, Mat Lab, Bio Stat, R et IBM SPSS, qui permettent des calculs

informatisés de CL50 avec des intervalles de confiance. Dans notre étude, les CL50 ont été déterminées en utilisant le logiciel Bio Stat.

1- Larves (nauplii) attirées vers un coin par une source lumineuse



2- plaques multi puits (HE +10 nauplii + eau de mer)

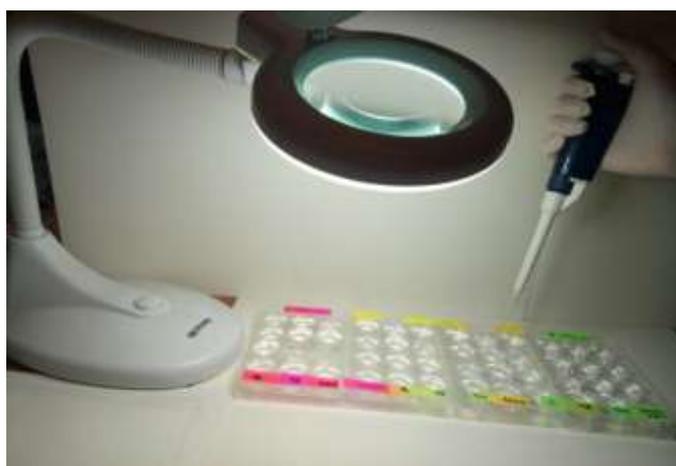


Figure 51 : Montage utilisé pour le Test de Létalité des Crevettes de Saumures (BSL) (photos personnelles, 2015)

5-2 Test antiparasitaire

L'étude a été réalisée dans le rucher « Boufernana » de la coopérative agricole « El Fadjr » située dans la commune d'Azzaba dans la wilaya de Skikda à l'est de l'Algérie. Le rucher de Boufernana ($36^{\circ}45' 41,1''$ N, $7^{\circ}03'50,3$ E) (Figure 52) est un verger constitué de différents arbres et arbustes tels que : l'*Eucalyptus*, le pin, le chêne, l'olivier, le lentisque, l'indigotier, la bruyère, le basilic.....La diversité florale est très importante et s'étend sur toute l'année (Figure 53).



Figure 52 : Situation de la zone d'étude (Rucher Boufernana »

(Google maps, 2018)



**Figure 53: Diversité florale dans le rucher « Boufernana »
(Photo personnelle, 2014)**

L'expérience s'est déroulée en automne 2014 sur 24 ruches infestées réparties aléatoirement en huit lots.

Lot 1 : ruches traitées par (HE Er + thymol)

Lot 2 : ruches traitées par (HE Er)

Lot 3 : ruches traitées par (HE Es + thymol)

Lot 4 : ruches traitées par (HE Es)

Lot 5 : ruches traitées par (HE Eg + thymol)

Lot 6 : ruches traitées par (HE Eg)

Lot 7 : ruches traitées par le thymol.

Lot 8 : ruches n'ont subi aucun traitement, c'est le lot contrôle de la chute naturelle de *Varroa* (Figure 54).



**Figure 54 : Zone d'étude (Rucher« Boufernana » de la coopérative El Fadjr)
(Photo personnelle, 2014)**

5-2-1 Dispositif expérimental

Des ruches de type LANGSTOTH sont munies de plateaux grillagés, des langes graissés recouvrent la surface du fond amovible des plateaux, ils servent à recueillir les *Varroas* qui tombent et ils sont protégés par une grille métallique (Figure : 55et 56).



Figure 55 : Plateau grillagé (Photo personnelle, 2014)



**Figure 56 : Ruche Langstroth munie d'un plateau grillagé
(Photo personnelle, 2014)**

5-2-2 Méthode de diagnostique

Cette méthode est appliquée aux huit lots, elle dure 21 jours durant lesquels le comptage est fait tous les deux jours. La méthode suivie est la méthode biologique « pose des langes » ou « couvre fond » [Ayvaz et al., 2010 ; Benazzeddine, 2010 ; Labeste, 2013; Ghomari et al., 2014], elle permet de suivre la chute des *Varroa*. Les langes sont graissés par de la graisse blanche puis les plateaux sont posés sous les

cadres des ruches, les langes seront ensuite retirés et examinés attentivement à l'aide d'une loupe à main pour y détecter les *Varroa* morts parmi les nombreux débris (Figure : 57). Après chaque comptage les langes sont soigneusement nettoyés puis remis en place. Un diagnostic préliminaire est effectué sur les ruches afin de déterminer les ruches infestées par *Varroa*, qui auront au minimum une chute de un *Varroa* par jour [Benazzeddine, 2010 ; Labeste, 2013]. Pour notre cas les chutes variaient entre 3 et 15 *Varroa* par jour. Les résultats sont exprimés en (valeurs moyennes \pm écart type) et le test t-Student est utilisé pour évaluer les différences entre les traitements.



Figure 57 : Lange retiré pour examen et comptage de *Varroa*

(Photo personnelle, 2014)

5-2-3 Mode d'utilisation des traitements (HE E +thymol), (HE E), et (thymol)

Le mélange (HE+ thymol) a été déposé sur une languette métallique (ou cartonnée) (1 mm d'épaisseur, 4 cm de largeur sur 20 cm de longueur). Le volume déposé est de 1 mL et la concentration du thymol est de 50% de thymol dans le mélange (%poids / volume) (Figure : 58) [Labeste, 2013]. La languette est introduite par l'entrée principale de la ruche et la zone du dépôt du mélange sur la languette sera placée sous les cadres (Figures : 59 et 60). Tous les lots suivent le même protocole, le volume du traitement déposé est de (1mL/ruche/semaine) pendant trois semaines. Le thymol se présente sous forme de cristaux qu'on dissout dans de l'alcool à 70% soit

10 g de thymol en cristaux dans 10 mL d'alcool on obtient alors une solution d'un volume voisin de 20 mL. On dépose la solution sur la languette et on laisse d'abord s'évaporer l'alcool 15mn puis on l'introduit sous les cadres de la ruche [Baggio et al., 2004].

L'expérience dure 21 jours à raison d'un traitement par semaine. La température durant l'expérience variait entre 20 ° C et 22 °C.



**Figure 58 : Dépôt du mélange (huile essentielle-thymol) sur la languette
(photo personnelle, 2014)**



**Figure 59 : Languette déposée sur le plateau grillagé sous les cadres de la ruche
(Photo personnelle, 2014)**



Figure 60 : Languette sous les cadres de la ruche (Photo personnelle, 2014)

5-2-4 Test t-Student

Nos résultats sont exprimés en (valeurs moyennes \pm écart type) et le test t-Student est utilisé pour évaluer les différences entre les traitements. Ce test paramétrique repose sur des comparaisons de moyennes. Il est utilisé pour comparer deux échantillons indépendants et/ou appariés (2 versions, adaptées à chaque catégorie d'échantillons). Lorsqu'il y a plus de 2 échantillons, il devient nécessaire d'utiliser une ANOVA adaptée.

CHAPITRE VI

Résultats et discussion

6-1 Propriétés physico – chimiques

6-1-1 Paramètres organoleptiques

Les paramètres organoleptiques des huiles essentielles obtenues par hydrodistillation des feuilles sèches des trois espèces étudiées : Er, Es et Eg sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6: Caractéristiques organoleptiques

Espèce	Aspect	Couleur	Odeur
<i>E. robusta</i>	Liquide	Jaune très clair	Fraîche
<i>E.sideroxylon</i>	Liquide limpide	Jaune très clair	Fraîche assez prenante
<i>E. globulus</i>	Liquide, mobile	Jaune	Forte, aromatique odeur prononcée de camphre
AFNOR,2000 (HE <i>E.globulus</i>)	Liquide mobile, limpide	Jaune très pâle à transparent	fraiche, plus ou moins eucalyptolée selon l'origine

6-1-2 Rendement des huiles essentielles

Les rendements des huiles essentielles exprimés en pourcentage (m/m, matière sèche) sont indiqués dans le tableau 7.

Tableau 7: Rendements des huiles essentielles des espèces étudiées

Espèce	Masse de la matière végétale sèche (g)	Masse de l'huile essentielle (g)	Rendements (% m/m)
<i>E. robusta</i>	1450	12,119	0,83
<i>E. sideroxylon</i>	800	8,794	1,09
<i>E. globulus</i>	1400	13,033	0,93

6-1-3 Densité (d_{20})

La densité des huiles essentielles des espèces étudiées est indiquée dans le tableau 8.

Tableau 8: Masses, volumes et densités des huiles essentielles

Espèce	Volume de l'HE (mL)	Masse de l'HE (g)	d_{20}
<i>E. robusta</i>	3	2,745	0,9164
<i>E.sideroxylon</i>	4	3,623	0,9072
<i>E. globulus</i>	4	3,643	0,9122
AFNOR, 2000 (HE <i>E.globulus</i>)	d_{20} [0,9060 – 0,9250]		

6-1-4 Indice de réfraction n_D^{20}

Les indices de réfraction des huiles essentielles d'Er, Es et Eg sont indiqués dans le tableau 9.

Tableau 9 : Indice de réfraction des huiles essentielles des *Eucalyptus*

Espèce	Indice de réfraction
<i>E. robusta</i>	1,4698
<i>E. sideroxylon</i>	1,46291
<i>E. globulus</i>	1,4608
AFNOR, 2000 (HE <i>E.globulus</i>)	1,460 – 1,476

6-1-5 Mesure de l'indice d'acide I_A

Les valeurs des indices d'acides des huiles essentielles d'Er, Es et Eg sont indiquées dans le tableau 10.

Tableau 10:Indices d'acides des huiles essentielles des *Eucalyptus*

HE	<i>E. robusta</i>	<i>E.sideroxylon</i>	<i>E.globulus</i>
PE (g)	1	1	1
V (mL)	3	3.9	4.1
I_A	1,371	1,783	1,874
AFNOR, 2000 (HE <i>E.globulus</i>)	I_A [0,84 – 3,74]		

PE : masse de l'huile essentielle (g) V : volume de KOH (mL)

6-1-6 Miscibilité à l'éthanol

La miscibilité des huiles essentielles d'Er, Es et Eg est indiquée dans le tableau 11.

Tableau11: Miscibilité des huiles essentielles des *Eucalyptus*

HE	<i>E. robusta</i>	<i>E.sideroxylon</i>	<i>E. globulus</i>	AFNOR, 2000 (<i>E.globulus</i>)
V _(HE) : V _(ETOH)	1 : 1,9	1 : 2,1	1 : 2	1 : 3

6-1-7 Identification du cinéole selon la pharmacopée Européenne 8^{ème} édition

Le test de l'acide sulfurique a été positif pour les trois HE ; l'obtention d'une coloration rouge orange qui vire au brun foncé par ajout de formaldéhyde signifie qu'on est en présence d'une HE à cinéole.

6-1-8 Identification de l'HE d'*Eucalyptus* selon la pharmacopée Japonaise 16^{ème} édition

Le test à l'acide phosphorique est positif pour les huiles essentielles des trois espèces, ce qui indique que leur origine provient du genre *Eucalyptus*

6-1-9 Discussion générale des propriétés physico-chimiques

Les huiles essentielles obtenues sont de couleur jaunâtre plus ou moins foncée avec une odeur balsamique très puissante notamment pour Eg (Tableau 5).

Les rendements obtenus pour les HE de Es (1,09%) et Eg (0,93%) sont généralement comparables à ceux décrits dans la littérature (Tableau12). En ce qui concerne Eg d'Algérie, notre espèce a montré un taux de (0,93 %) qui est assez élevé comparé aux taux décrits pour la même espèce récoltée à partir de différentes populations d'Eg en Algérie [Blida (0,2%), Tizi Ouzou (0,48%), Ouargla (0,51%)]. Toutefois notre valeur reste faible par rapport à celles obtenues par d'autres auteurs utilisant des population d'Eg récoltées à Constantine [Benayache et al., 2001] et Bejaia [Harkat-Madouri et al., Bey-Ould Si Said, 2014] où on note un rendement de l'ordre de (1,1%) et(2,53%) respectivement. L'HE d'Er a montré un taux plus faible

de l'ordre de (0,83%) que les deux précédentes espèces, mais qui reste largement au dessus des valeurs signalées pour la même espèce de différentes origines géographiques (Tableau 12).

Tableau12: Rendement de l'huile essentielle d'*E. robusta*, *E. sideroxylon* et *E .globulus* dans différentes régions du monde

Rendements			Pays	Références
Er	Es	Eg		
0,83 [•]	1,09 [•]	0,93 [•]	Algérie (Constantine)	Atmani-Merabet et al., 2018
	1,2 [•]		Algérie (Tizi Ouzou)	Nait Achour, 2012
0,6 ^{••}	0,7 ^{••}	1,1 ^{••}	Algérie (Constantine)	Benayache et al., 2001
		2,5 ^{••}		Daroui-Mokadem et al., 2010
		0,51 [•]	Algérie (Ouargla)	Kebsi, 2011
		0,48 [•]	Algérie (Tizi Ouzou)	Taleb-Toudert, 2015
		0,2 ^{••}	Algérie (Blida)	Boukhatem et al., 2014
		2,53 [•]	Algérie (Bejaia)	Harkat-Madouri et al., 2015 ; Bey-Ould Si Said, 2014
0,34 [•]			Brésil	Filomeno et al., 2016
0,20 [•]			Brésil	Sartorelli et al., 2007
0,13 ^{••}			RD du Congo	Cimanga et al., 2002
	1,65 [•]		Argentine	Alzogaray, et al., 2011; Toloza et al., 2010
	3,0 [•]		Tunisie	Sebei et al., 2015
	2,7 [•]		Tunisie	Elaissi et al., 2012
		1,89 [•]	Pakistan	Ghaffar et al., 2015
		1,21 [•]	Maroc	Derwich et al., 2009
		1,80 ^{••}	Monténégro	Vratnica et al., 2011
		0,96 ^{••}	Nigéria	Olayinka et al., 2012
		1,87 ^{••}	RD Congo	Cimanga et al., 2002
		3,1 [•]	Brésil	Mossi et al., 2011
		1,31- 1,49 [•]	Argentine	Russo et al., 2015
		1,66 [•]	Argentine	Toloza et al., 2010
		2,25 [•]	Argentine	Lucia et al., 2009

[•] : Feuilles sèches

^{••} : Feuilles fraîches

Il est bien établi que le rendement tout comme la qualité d'une HE sont influencés par des facteurs endogènes et exogènes [Garnéro, 1991 ; Bruneton, 1999].L'influence du stade végétatif, l'organe de la plante, les hybridations, les facteurs de mutation, la polyploïdie et le polymorphisme chimique sont les principaux

facteurs endogènes qui influencent la composition et le rendement des huiles essentielles [Belyagoubi, 2006 ; Chowdhury et al., 2009, Aprotosoiaie et al., 2010].

Les conditions environnementales, la température, la lumière, la pluviométrie, les conditions édaphiques, l'origine géographique, les conditions de culture; telles que : la date de récolte, l'emploi d'engrais, les techniques de récolte, la méthode d'extraction, et l'état du matériel végétal ainsi que le stockage du végétal avant distillation sont les principaux facteurs exogènes qui influent sur la composition et le rendement des huiles essentielles [Bruneton, 1999 ; Mohammedi, 2006 ; Pinto et al., 2006 ; Benini, 2007 ; Marzoukia et al., 2009 ; Aprotosoiaie et al., 2010 ; Olle et Bender, 2010].

Les propriétés physico chimiques des huiles essentielles obtenues des trois espèces Er, Es et Eg sont regroupées dans le tableau 13.

Tableau13: Constantes physico-chimiques des huiles essentielles d'*E.robusta*, *E. sideroxylon* et *E. globulus*

Espèce	Indice d'acide (I _A)	Indice de réfraction (n _D ²⁰)	Densité (d ₂₀)	Miscibilité [V (HE) : V (ETOH)]
<i>E. robusta</i>	1.371	1.4698	0.9164	1 : 1.9
<i>E. sideroxylon</i>	1.783	1.4629	0.9072	1 : 2.1
<i>E. globulus</i>	1.874	1.4608	0.9122	1 : 2
AFNOR, 2000 (<i>E.globulus</i>)	0.84 -3.74	1.460 - 1.476	0.9060 - 0.9250	1 : 3

L'HE Eg a montré des paramètres physicochimiques (I_A, n_D²⁰, d₂₀) qui se situent dans les proportions fixés dans les normes AFNOR, sauf pour la miscibilité à l'éthanol où 1 volume d'HE pour 2 volumes d'éthanol a été obtenu (Tableau 13). Les HE des espèces Er et Es ont des indices d'acides, des indices de réfraction et des densités qui restent comparables aux valeurs AFNOR décrites pour Eg.

L'indice d'acide permet de vérifier la qualité d'un HE, notamment en ce qui concerne sa dégradation avec le temps durant le stockage; il donne une idée sur le taux d'acides libres, un IA inférieur à 2 est une preuve de bonne conservation de l'essence (faible quantité d'acides libres) [Boukhatem, 2010]. L'indice de réfraction est un critère de pureté de l'HE, un faible indice de réfraction indique la faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser l'utilisation de l'huile essentielle dans les produits cosmétiques [Boukhatem, 2010].

Les propriétés organoleptiques et les valeurs des différents paramètres physico chimiques des huiles essentielles obtenues des trois espèces d'*Eucalyptus* étudiées suggèrent des produits bien conservés et de bonnes qualités.

6-2 Analyse chromatographique CPG/SM

Les compositions chimiques des huiles essentielles d'Er, Es et Eg sont décrites dans les figures 61, 62, 63 et les tableaux 14, 15, 16 respectivement. L'analyse a permis d'identifier 13 composés chez Er (représentant 96,66 % de l'HE), 36 composés chez Es (98.85 % de l'HE) et 39 composés chez Eg (99.17% de l'HE).

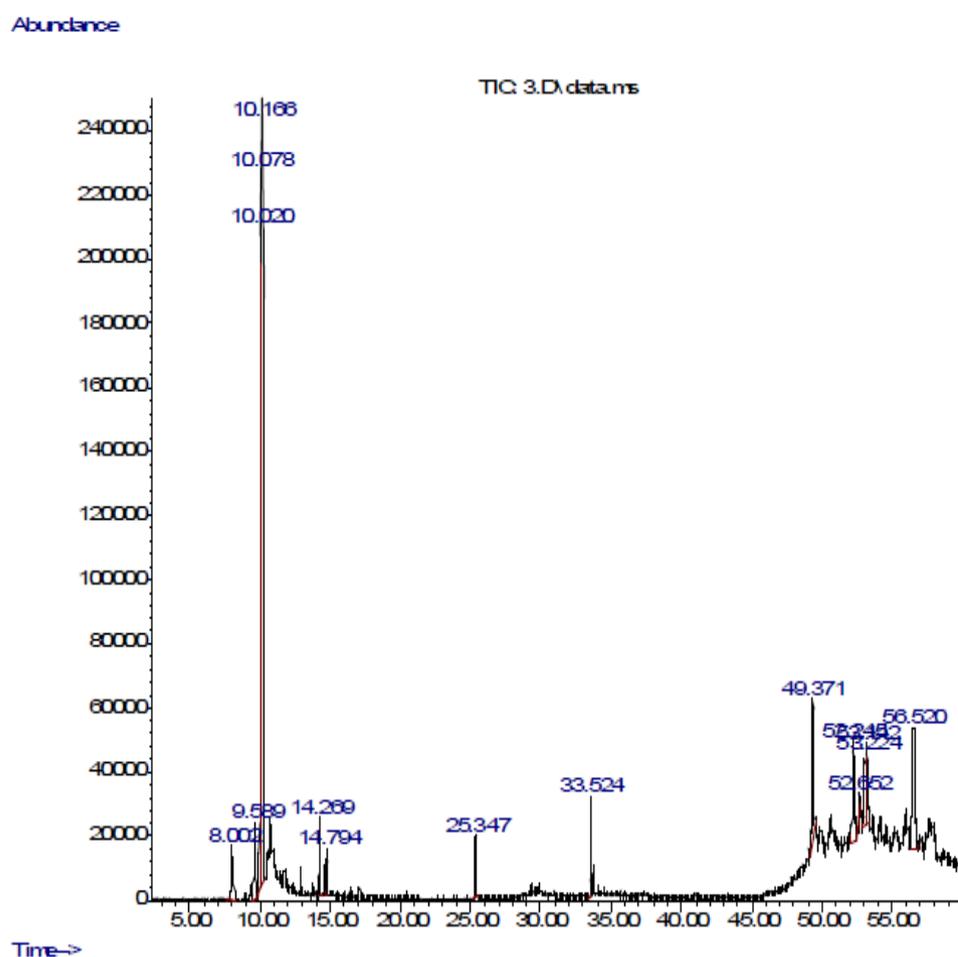


Figure 61 : Chromatogramme de l'HE d'*E. robusta*

Tableau14:Composition chimique des HE des feuilles d'*E. robusta*

Composé	(%)	RI
α -pinène	1,89	939
Camphene	1,25	966
1-phellandrene	1,52	1 003
<i>p</i> -cymène	7,83	1 025
<i>o</i> -cymène	4,57	1 026
1,8-cinéole	65,79	1 030
4-terpinéol	1,0	1 177
α -terpinéol	0,6	1 189
spathulenol	1,12	1 578
Tricosane	3,4	3000
Tetracosane	4,20	4000
Pentacosane	2,36	5000
Heptacosane	1,10	7000
(%) Total identifiés	96,66	

RI : Indices de retention, tel que déterminés sur une colonne HP-5MS

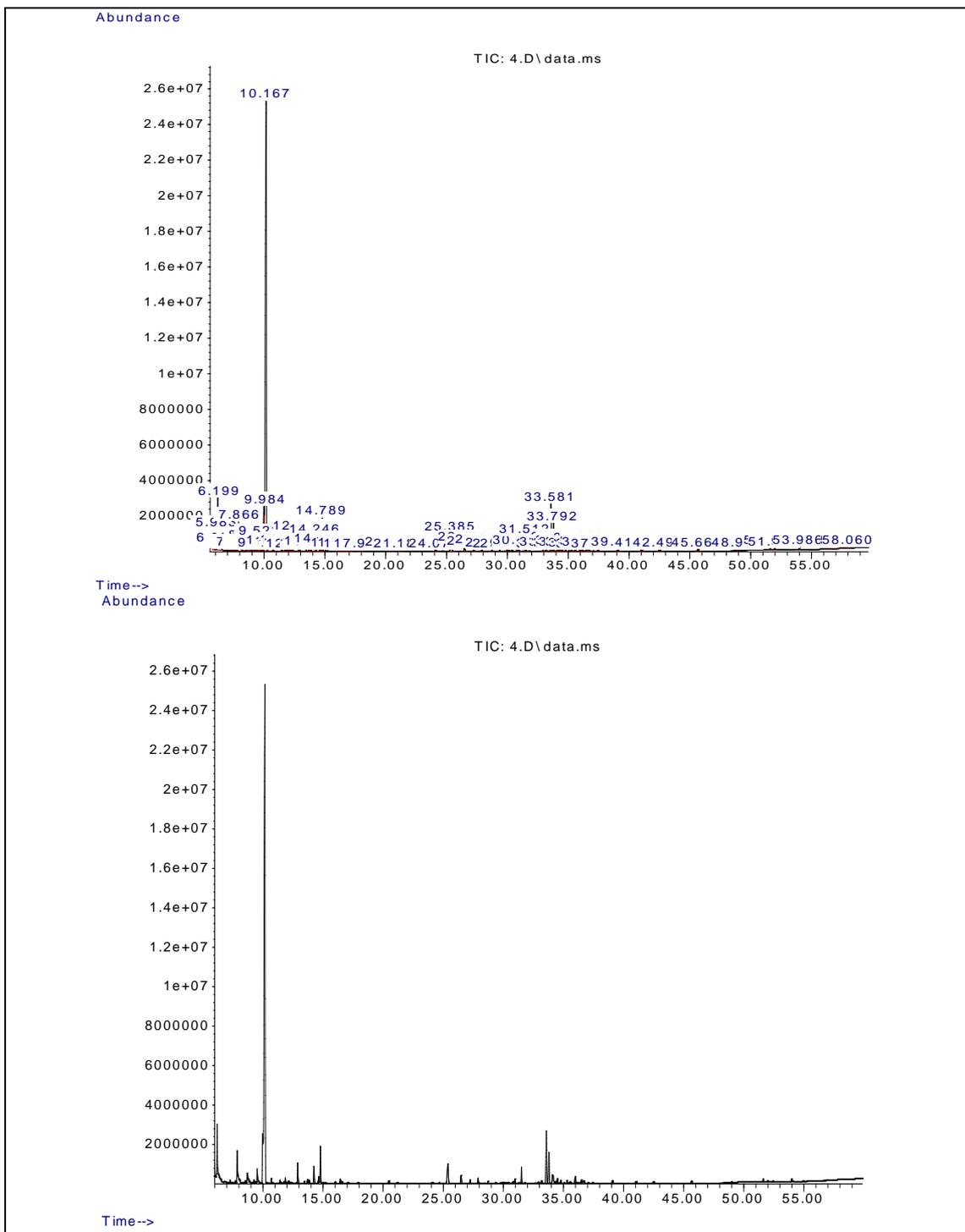


Figure 62 : Chromatogramme de l'HE d'*E.sideroxylon*

Tableau15: Composition chimique des HE des feuilles d'*E.sideroxylon*

Composé	(%)	RI
1,4-diméthylcyclohexane	2.34	774
octane	9.45	800
<i>Cis</i> -1-éthyl-2-méthyl cyclopentane	2.69	827
2,6-diméthyl heptane	3.24	828
Ethyl cyclohexane	8.04	841
1,1,3-triméthyl cyclohexane	6.35	845
Meta-xylène	3.97	861
Benzol	0.88	868
α -pinène	2.19	939
<i>cis</i> -6-oxabicyclo[3.2.0]heptane	0.68	-
Camphene	1.85	966
1-phellandrene	0.84	1 003
<i>p</i> -cymène	2.64	1 025
1,8-cinéole	40.24	1 030
γ -terpinène	0.19	1 047
<i>trans</i> -pinocarvéole	0.99	1 139
4-terpinéol	0.93	1 177
<i>trans</i> - <i>p</i> -mentha-1(7),8-diène-2-ol	0.45	1 185
α -terpinéol	2.07	1 189
<i>trans</i> -1,1,3,4-tétraméthylcyclohexane	0.21	1 151
<i>exo</i> -2-méthylbicyclo-(2,2,1)-heptane	1.00	-
<i>cis</i> - <i>p</i> -mentha-1(7), 8-diène-2-ol	0.25	1 235
pipériténone oxyde	0.56	1 369
Tétradecène	0.27	1 400
Isospathulenol	0.37	1409
Aromadendrene	1.80	1 460
Spathulenol	2.85	1 578
Hexadecène	0.39	1 590
Viridiflorol	0.41	1 593
Viridiflorol	0.41	1 593
3-méthyl butylester	0.19	2 388
1-éthylidene-7a-méthyl-octahydro-1H-indene	0.31	1 644
(%) Total identifiés	98,85	

RI : Indices de rétention, tel que déterminés sur une colonne HP-5MS

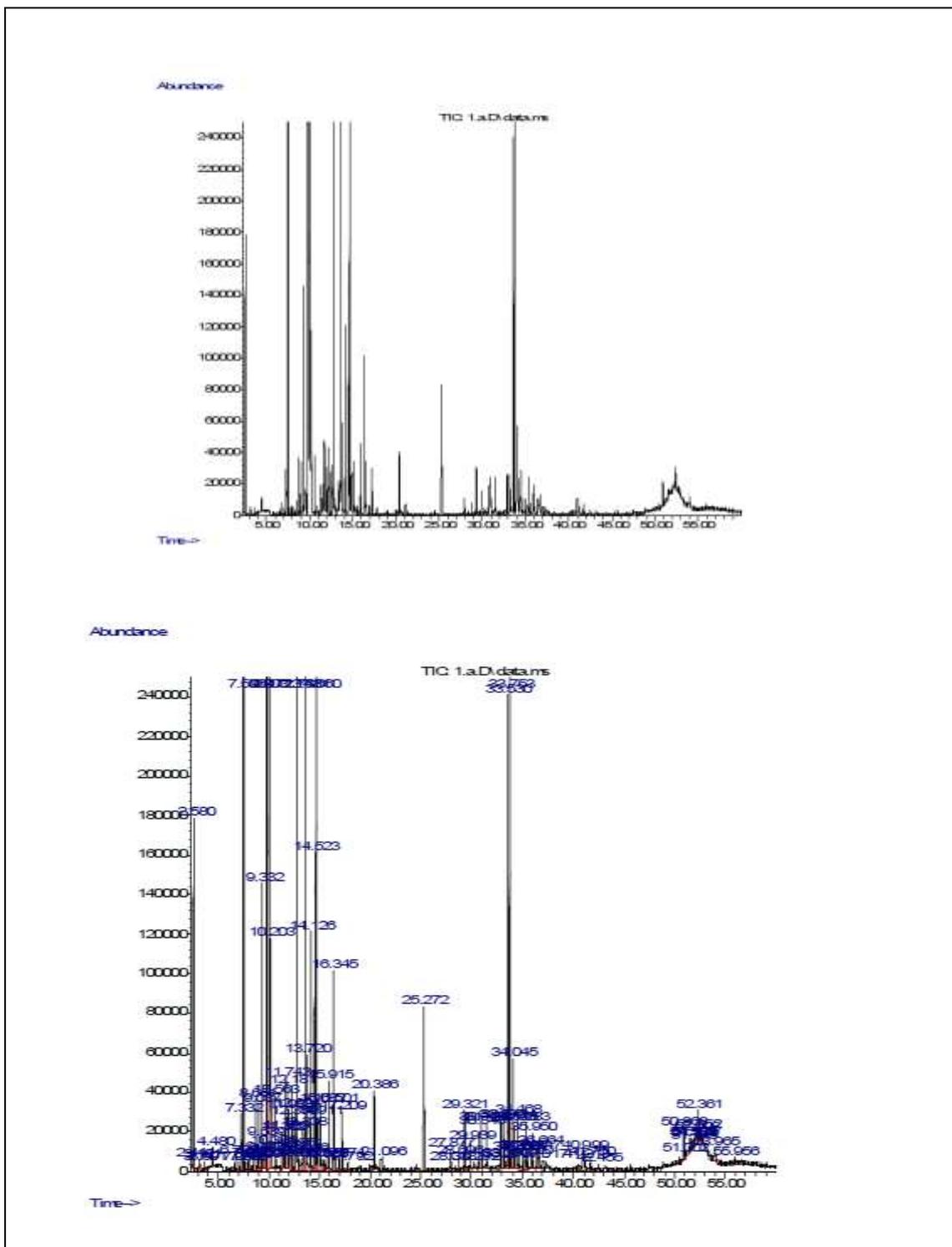


Figure 63 : Chromatogramme de l'HE d'*E. globulus*

Tableau 16: Composition chimique des HE des feuilles d'*E. globulus*

Composé	(%)	RI
méthyl benzene	0,77	773
3-méthylbut-2-éanal	0,16	790
α -thujène	0,1	930
α -pinène	1,69	939
Camphene	0,7	966
2-beta-pinène	0,12	979
β -myrcène	0,13	991
1-phellandrene	0,35	1 003
<i>o</i> -cymène	2,18	1 026
1,8-cinéole	78,45	1 030
gamma-terpinène	0,1	1 060
α -terpinolène	0,1	1 089
<i>trans</i> -p-mentha-2,8-dienol	0,16	1 105
α -campholène aldéhyde	0,1	1126
D-Fenchyl alcool	0,1	1 139
Pinocarvone	1,34	1 165
4-terpinéol	0,5	1 177
<i>trans</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0,79	1 185
α -terpinéol	1,36	1 189
4,4,6-triméthyl bicyclo[3.1.1] hept-3-en-2-one	0,17	1206
<i>trans</i> -carvéol	0,22	1 217
Isopinocarvéole	1,74	1 226
<i>cis</i> -p-mentha-1(7),8-dien-2-ol	0,51	1 235
D-carvone	0,16	1 243
thymol	0,28	1 290
Myrténol	0,13	1 327
2-phenylpropanoates	0,1	1 350
Aromadendrene	0,1	1 441
Allo-Aromadendrene	0,1	1457
Valencene	0,11	1 496
α -selinene	0,14	1 498
Bicyclogermacrene	0,1	1 500
2,4-di-ter-butyl phénol	0,1	1 525
Spathulenol	1,05	1 578
Viridiflorol	1,31	1 593
3- méthylbutylester	0,17	2 388
Ledol	0,28	1 569
1-éthylidene-7a-méthyl-octahydro-1H-indene [Allo- isolongifolene]	0,1	1409
Isospathulenol	0,1	1 644
(%) Total identifiés	96,17	

RI : Indices de rétention, tel que déterminés sur une colonne HP-5MS

6-2-1 Discussion des résultats de l'analyse CPG/SM

Il existe de nombreuses études dans la littérature sur la composition chimique des huiles essentielles des espèces du genre *Eucalyptus* [Roh et al., 2013 ; Taleb-Toudert, 2015; Barbosa et al., 2016]. Plusieurs travaux ont mis en évidence l'existence de multiples composés bioactifs dont le 1,8-cinéole qui reste un marqueur spécifique aux huiles essentielles de ce genre à travers le monde [Russo et al., 2015, Yones et al., 2016]. Toute fois, plusieurs chémotypes caractérisent les espèces d'*Eucalyptus*, quelques exemples sont cités sur le tableau 17 [Jean-Philippe, 2016].

Tableau 17 : Chémotypes de quelques espèces d'*Eucalyptus*

Espèce	Chémotype	Propriétés
<i>E. globulus</i>	1,8-cinéole (plus de 70%)	Expectorantes et mucolytiques
<i>E. radiata</i>	1,8-cinéole (60 % - 70%)	Même effets qu' <i>E. globulus</i>
<i>E. citriodora</i>	Citronellal 70%	Calmantes, hypotensives, anti inflammatoires et antalgiques
<i>E. smithii</i>	1,8-cinéole 85%	Immunostimulantes, expectorantes, mucolytiques et antivirales

Notre étude a montré que l'HE Er de provenance Constantine est riche en 1,8-cinéole (65,97%) suivi du *p*-cymène (7,83%), *o*-cymène (4,75%) et α -pinène (1,89%) (Tableau 16). Ce qui la place parmi le chémotype 1,8-cinéole [Barbosa et al., 2016]. Ce résultat va dans le sens de l'étude faite sur la même espèce et de même provenance [Benayache et al., 2001]. Cette dernière étude rapporte un taux de 1,8-cinéole (50,0%) suivi de l' α -pinène (22,2%) et du *trans*-pinocarvéole (13,0%). Dans le monde l'HE Er analysée a montré une composition différente ; des échantillons d'HE Er du Brésil ont montré l'absence du 1,8-cinéole et une grande quantité d' α -pinène où des valeurs variant de 36,6 à 70,0 % ont été signalées. En revanche, l'espèce de Chine a affiché un pourcentage modéré de (26,08 %) pour le 1,8-cinéole et de (30,18%) pour l' α -pinène. Avec une composition de (27,3 %) de *p*-cymène et (12,8%) de myrtenal, l'HE Er de la RD du Congo présente une grande variabilité de composition (Tableau 18). Ces variations d'HE Er d'Algérie et celles d'ailleurs dénotent de l'existence d'un polymorphisme chimique comme précédemment rapporté [Barbosa et al., 2016].

Tableau 18 : Composés principaux de l'HE d'*E. robusta* dans différentes régions du monde

Espèce	Origine	Composés principaux	Références
<i>E. robusta</i>	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (65,97%), <i>p</i> -cymène (7,83%), α -pinène (1,89%), <i>o</i> -cymène (4,75%)	Atmani-Merabet et al., 2018
	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (50,0%), α -pinène (22,2%), <i>trans</i> -pinocarvéole (13,0%) globulol (5,7%)	Benayache et al., 2001
	Chine	α -pinène (30,18%), 1,8-cinéole (26,08%), globulol (4,44%)	Xin Chao et al., 2014
	Brésil	α -phellandrene (36.6%), α -pinène (16.6%), <i>p</i> -cymène (14.8%), β -pinène (11.8%)	Filomeno et al., 2016
	Brésil	α -pinène (73.0%), limonene (8.3%)	Sarotelli et al., 2007
	RD du Congo	<i>p</i> -cymène (27.3%), myrténal (12.8%), β -pinène (6.3%), α -terpineol (6.3%)	Cimanga et al., 2002

L'HE de l'espèce *Es* étudiée est majoritairement composée de 1,8-cinéole (40,28%), α -terpinéol (2,07%), *p*-cymène (2,64%), α -pinène (2,19%), spathulenol (2,85%) et un taux d'hydrocarbures variant de 2,34% à 9,45%. Cette composition est en accord avec les résultats obtenus sur la même espèce récoltée à Tizi Ouzou avec un taux de 1,8-cinéole (33,5%), suivi du *p*-cymène (12,27%), de l' α -pinène (3,83 %) et du spathulenol (11,48%). Cependant l'analyse de l'HE *Es* de Constantine [Benayache et al., 2001] a enregistré une différence dans la composition où les taux trouvés sont : α -pinène (24,0%), *p*-cymène (12,5%), γ -terpinène (7,5%), méthyl eugénol (6,0%), globulol (3,8%) et 1,8-cinéole (3,5%). ce qui pourrait se traduire par des propriétés biologiques et pharmacologiques différentes [Bruneton, 1999]. Dans le monde l'espèce *Es* d'Argentine est la plus riche en 1,8-cinéole suivi d'*Es* de Tunisie et enfin d'Australie avec des taux de (91,3%), (80,8%) et (54,4%) respectivement (Tableau 19).

Tableau 19: Composés principaux de l'HE d'*E.sideroxylon* dans différentes régions du monde

Espèce	Origine	Composés principaux	Références
<i>E. sideroxylon</i>	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (40.24%), α -terpinéol (2.07%), <i>p</i> -cymène (2.64%), α -pinène (2.19%), spathulenol (2.85%)	Atmani-Merabet et al., 2018
	Algérie (Tizi-Ouzou)	1,8-cinéole (33,5%), <i>p</i> -cymène (12,27%), α -pinène (3,83 %), spathulenol (11.48%)	Nait-Achour,2012
	Algérie (Constantine)	α -pinène (24,0%), <i>p</i> -cymène (12,5%), γ -terpinène (7,5%) méthyl eugénol (6,0%), globulol (3,8%) 1,8-cinéole (3,5%)	Benyache et al., 2001
	Australie	1,8-cinéole (54,4%), limonène (11.9%), α -pinène (8.2%)	Roh et al., 2013
	Argentine	1,8-cinéole (91.3%), α -terpinéol (2.6%)	Toloza et al., 2010
	Tunisie	1,8-cinéole (80.8%), α -pinène (5.8%), limonène (3.3%)	Elaissi et al., 2012

Le composé principal de l'HE Eg analysée est le 1,8-cinéole (78.45%) suivi d'*o*-cymène (2.18%), α -pinène (1,69%) et isopinocarveole (1.74%). Différentes populations d'Eg récoltées dans différentes régions d'Algérie présentent un taux en 1,8-cinéole qui varie entre [47,05 – 78,45%] et un taux en α -pinène variant entre [1,67 - 9,7%] (Tableau 20).

La composition chimique de l'HE Eg, prélevée de différents endroits très éloignés géographiquement (Brésil, Australie, Italie, Indonésie, Monténégro et Iran), est remarquablement riche en 1,8-cinéole avec un taux qui varie entre (83,9– 90%) (Tableau : 20). Les autres constituants étant minoritaires, ceci permet de considérer ces huiles comme des produits à chémotype 1,8-cinéole, et qui restent très recommander par les utilisateurs en industrie pharmaceutique et cosmétique surtout si la teneur en phellandrene est inférieur à 1% [Sen-Sung et al., 2009].

L' α -pinène est le deuxième composé de cette espèce avec des variations plus ou moins importantes (Tableau : 20) ; les quantités sont inférieures à celle du 1,8-cinéole pour la majorité des espèces réparties dans différentes régions du monde (Ethiopie, Kenya et Espagne) avec un taux de 1,8-cinéole qui varie entre (17.2 – 63.8%) et un taux d' α pinène qui varie entre (7.1 – 16.1%). Cependant l'espèce du Nigéria avec une composition de terpinèn-4-ol (23.46 %), γ -terpinène (17.01 %) et celle de Taiwan avec la composition α -pinène (22.52%), *p*-cymène (21.6%) sont des espèces à dominance « terpinèn-4-ol et γ -terpinène » et « α -pinène et *p*-cymène » respectivement. L'espèce Eg récoltée au Maroc et au Pakistan est à chémotype « 1,8-cinéole et limonène », celle de l'Egypte et de l'Inde est à chémotype « 1,8-cinéole et *o*-cymène ». Enfin, celle de la RD du Congo est à chémotype « 1,8-cinéole, camphène » (Tableau : 20).

Cette différence au sein d'une même espèce est due essentiellement au phénomène de variabilité naturelle qui caractérise les organismes biologiques (vivants) dont les végétaux font partie [Tobler et Schneider, 2001]. Il faut savoir que la composition d'une plante est tributaire de plusieurs facteurs endogènes (génétiques) et exogènes (environnementaux).

Tableau 20: Composés principaux de l'HE d'*E. globulus* dans différentes régions du monde

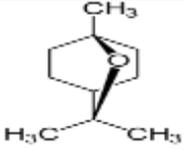
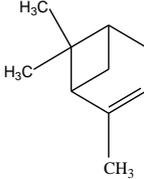
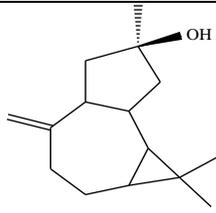
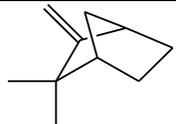
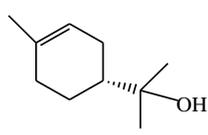
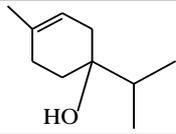
Espèce	Origine	Composés principaux	Références
<i>E. globulus</i>	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (78.45%), <i>o</i> -cymène (2.18%), α -pinène (1,69%), isopinocarveole (1.74%), pinocarvone (1.34%)	Atmani-Merabet et al., 2018
	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (71.3%), α -pinène (8,8%), <i>Trans</i> -pinocarvéole (3,3%) α -terpinéol (2.7%)	Benayache et al., 2001
	Algérie (Tizi-Ouzou)	1,8-cinéole (47.05%), <i>p</i> -cymène (3.48%), α -pinène (7.69 %), globulol (8.65)	Taleb-Toudert, 2015
	Algérie (Béjaia)	1,8-cinéole (55.3%), spathulenol (7.4%), α -terpinéol (5.5%)	Harkat-Madouri et al., 2015
	Algérie (Constantine)	1,8-cinéole (48.6%), α -pinène (9.7 %), <i>Trans</i> -pinocarvéole (10.7%)	Daroui-Mokadem, 2010
	Argentine	1,8-cinéole (52,3-62.1%)	Russo et al., 2015
	Australie	1,8-cinéole (90.0%), α -pinène (2.2%)	Yang et al., 2004
	Brésil	1,8-cinéole (83.9%), limonene (8.2%), α -pinène (4.2%)	Macedo et al., 2009
	RD du Congo	1,8-cinéole (44.3%), camphene (23.1%), α -pinène (9.3%), globulol (7.3%)	Cimanga et al., 2012
	Egypte	1,8-cinéole (21.4%), <i>o</i> -cymène (21.4%), α -pinène (6.7%), spathulenol (6.3%)	Yones et al., 2016
	Inde	1,8-cinéole (66.3%), <i>Cis</i> - <i>o</i> -cymène (21.3%), α -terpinyl acétate (3.4%)	Pant et al., 2014
	Indonésie	1,8-cinéole (86.5%), α -pinène (4.7%)	Mulyaningsih et al., 2011
	Ethiopie	1,8-cinéole (63.0%), α -pinène (16.1%)	Mekonnen et al., 2016
Italie	1,8-cinéole (84.9%), α -pinène (5.6%), <i>p</i> -cymène (5.3%)	Fratini et al., 2014	

<i>E. globulus</i>	Kenya	1,8-cinéole (17.2%), α -pinène (7.1%), spathulenol (6.5%)	Karemu et al., 2013
	Iran	1,8-cinéole (84.5%), limonène (8.50%)	Golestani et al., 2015
	Monténégro	1,8-cinéole (85.8%), α -pinène (7.2%), β -myrcène	Vratnica et al., 2011
	Maroc	1,8-cinéole (22.4%), limonène (7.0%), solanone (6.1%), β -pinène (5.2%)	Derwich et al., 2009
	Pakistan	1,8-cinéole (56.5%), limonène (28.0%)	Ghaffar et al., 2015
	Espagne	1,8-cinéole (63.8%), α -pinène (16.1%)	Lius et al., 2016
	Nigéria	terpinèn-4-ol (23.46 %) γ -terpinène (17.01 %), spathulenol (8.94 %), <i>p</i> -cymène (8.10 %) <i>p</i> -cymèn-7-ol (6.39 %).	Olayinka et al. , 2012
	Taiwan	α -pinène (22.52%) <i>p</i> -cymène (21.6%) β -phellandrene (20,08%)	Chen et al., 2009

6-2-2 Spectres de masse de quelques constituants des HE (Er, Es et Eg)

Les composés chimiques qui sont communs aux trois espèces d'*Eucalyptus* étudiées et dont le pourcentage est >0,5% sont le 1,8-cinéole (40,24% - 78,45%), l' α -pinène (1,69% - 2,19%), le spathulenol (1,05% - 1,85%), le camphène (0,7% - 1,85%), l' α -terpinéol (0,6% - 2,85%) et le 4-terpinéol (0,5% - 1,0%). Les caractéristiques de ces composés sont listées dans le tableau 21. Les figures 64 – 69 montrent leurs spectres de masse tandis que les principaux ions fragments du 1,8-cinéole et de l' α -pinène ainsi que leurs intensités relatives (%) sont énumérés dans le tableau 22.

**Tableau 21 : Caractéristiques des composés communs aux trois espèces
Er, Es et Eg**

Composé	Formule	Poids moléculaire	Structure chimique	Ions fragments
1,8-cinéole	$C_{10}H_{18}O$	154		154, 139, 111, 108, 96, 93, 81, 71 [Imad et al., 2015 ; Mamoun et al., 2016]
α -pinène	$C_{10}H_{16}$	136		136, 121, 105, 93, 92, 91, 77 [Imad et al., 2015 ; Mamoun et al., 2016]
spathulenol	$C_{15}H_{24}O$	220		220, 205, 159, 119, 91, 69, 43, 41 [Luciardi et al., 2016]
Camphene	$C_{10}H_{16}$	136		121, 93, 79, 67, 53 [Bufler et al., 1990]
α -terpinéol	$C_{10}H_{18}O$	154		136, 121, 107, 93, 81, 79 [mohammed Ali et al., 2017]
4-terpinéol	$C_{10}H_{18}O$	154		154, 136, 111, 93, 86, 71, 55 [Martinez –Evaristo et al., 2015]

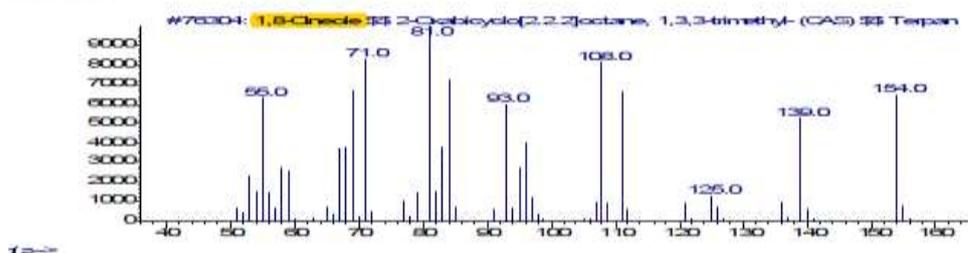


Figure 64 : Spectre de masse du 1,8-cinéole

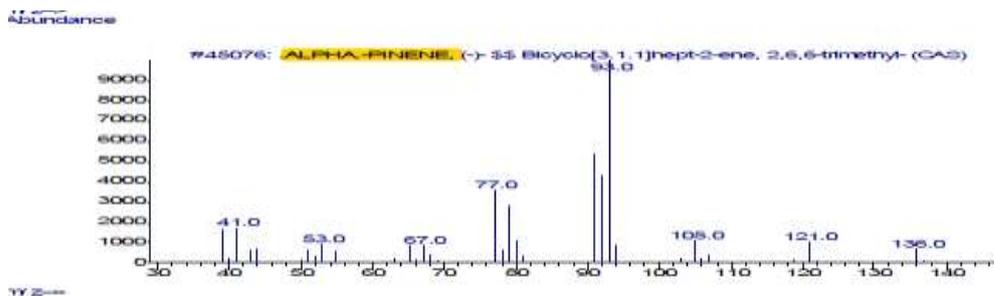


Figure 65 : Spectre de masse de l' α -pinène

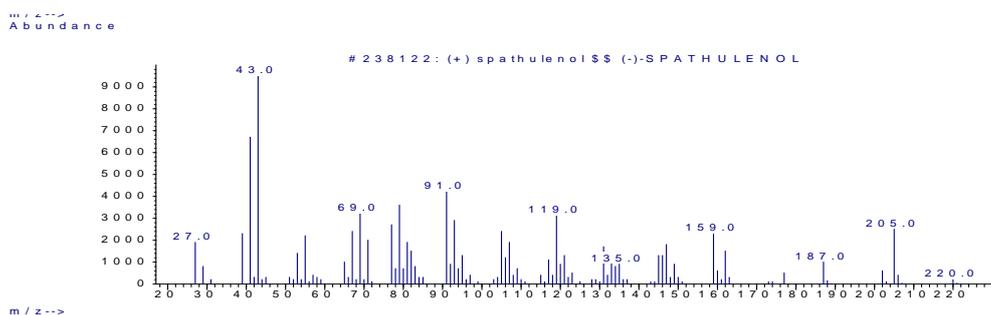


Figure 66: spectre de masse du spathulenol

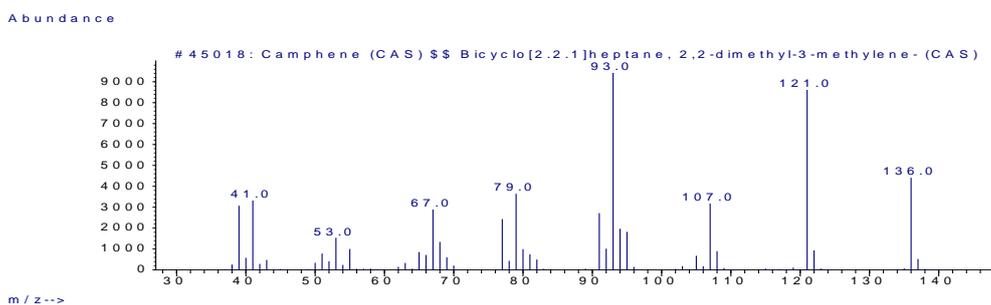


Figure 67 : spectre de masse du camphene

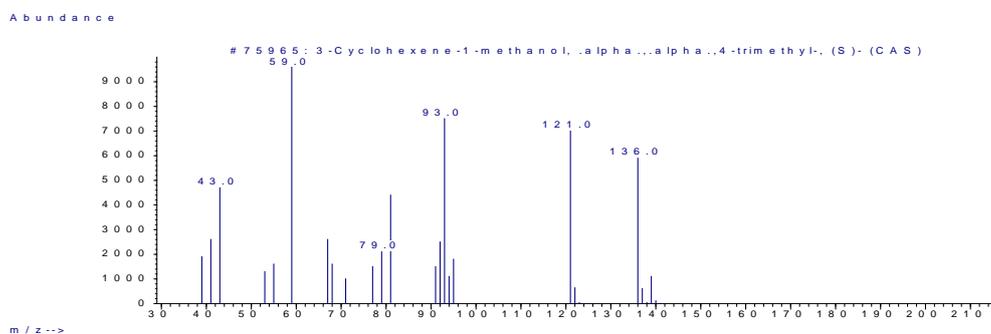


Figure 68 : Spectre de masse du α -terpinéol

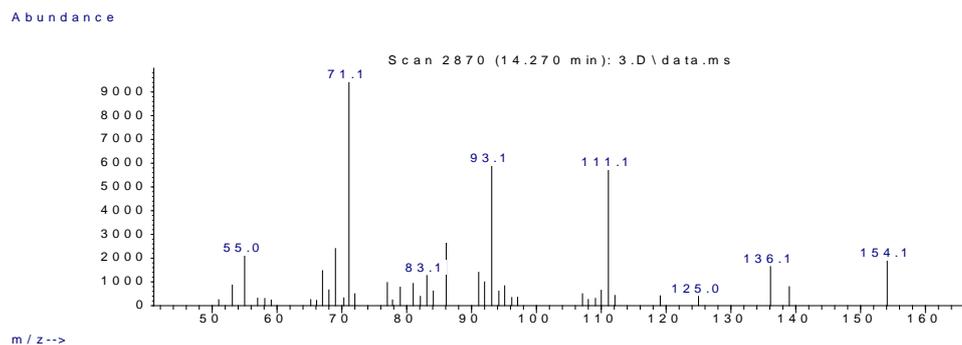


Figure 69 : Spectre de masse du 4-terpinéol

**Tableau 22 : Principaux ions fragments et leur intensité relative (%)
des composés 1,8-cinéole et α -pinène**

Ion fragment (m/z)	Intensité relative (%)	
	1,8-cinéole	α -pinène
81	100	3
91	-	46
92	-	42
93	74	100
96	42	-
108	83	-
111	65	-
121		12
136	-	10
139	63	-
154	67	

L'intensité relative de l'ion moléculaire pour l' α -pinène $[M]^+ = 136$ (10%) est faible comparée à celle du 1,8-cinéole $[M]^+ = 154$ (67%). Le processus de fragmentation de l' α -pinène est obtenu grâce à la dissociation de l'ion moléculaire, par perte du radical C_3H_7 il se forme l'ion fragment principal (pic de base) $[M-C_3H_7]^+$ tel que montré sur la figure 70. Le deuxième processus de fragmentation de la molécule est la formation de l'ion fragment à m/z 121 qui représente l'ion $[M-CH_3]^+$ avec une faible intensité relative (12%).

Le processus de fragmentation du 1,8-cinéole commence par la dissociation de l'ion moléculaire, par perte de CH_3 il se forme l'ion fragment $[M-CH_3]^+$ à m/z 139 (63%). L'ion fragment à m/z = 81 représente le pic le plus intense (pic de base) formé

par le processus secondaire $[M-C_3H_6O-CH_3]^+$ + tel que montré sur la figure 71 [Imad et al., 2015 ; Mamoun et al., 2016].

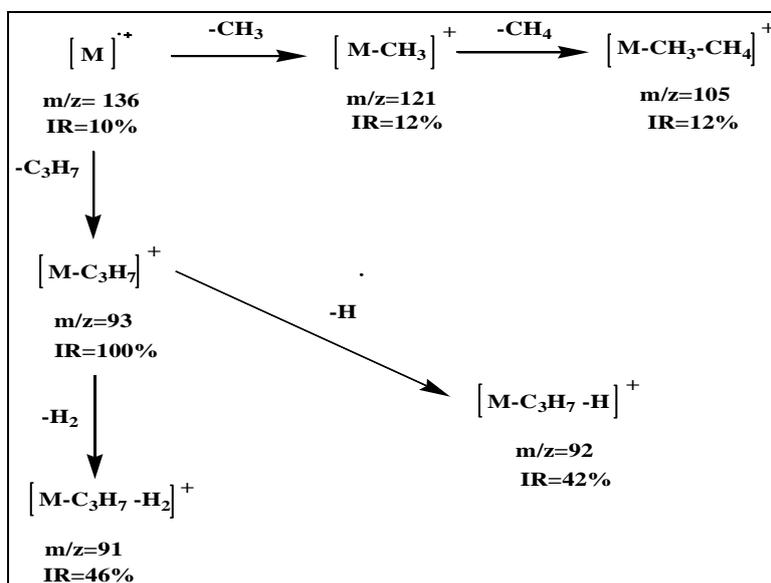


Figure 70 : Voie de fragmentation de α -pinène

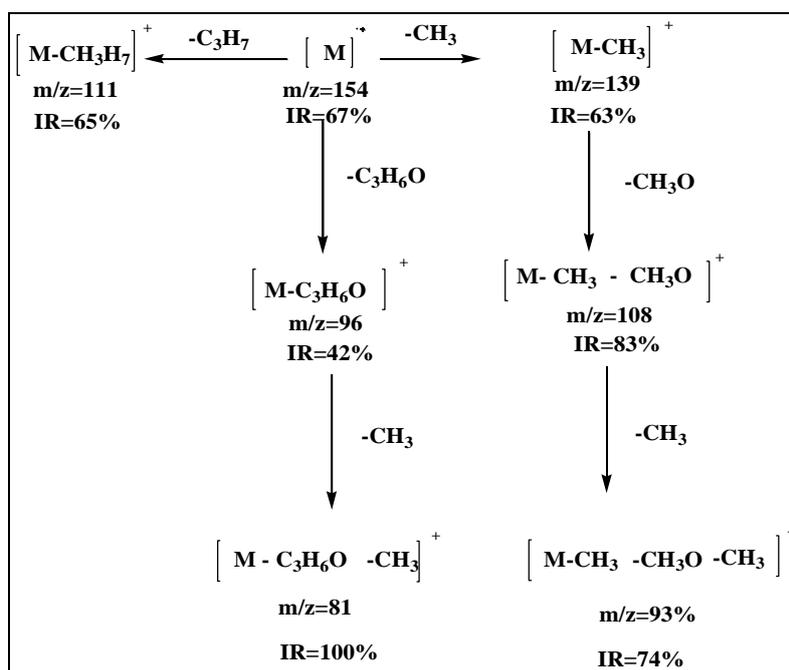


Figure 71: Voie de fragmentation du 1,8-cinéole

Concernant les autres composés, les ions fragments obtenus rejoignent ceux trouvés dans la littérature [Tableau : 21].

6-2-3 Analyse en Composante Principale (ACP) et la Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

Deux méthodes ont été mises en œuvre pour exploiter les résultats de l'analyse CPG/SM des HE des espèces Er, Es et Eg, l'analyse en composantes principales (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH). Le traitement des données a été réalisé à l'aide du logiciel R studio. Nous avons retenu deux classes de cette étude; La première classe comprend l'HE d'*Eucalyptus robusta* et l'HE d'*Eucalyptus sideroxylon* et la 2^{ème} classe est celle de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* [Figure 72]. Ces deux méthodes classent les espèces étudiées selon leurs similitudes quant à leur composition chimique.

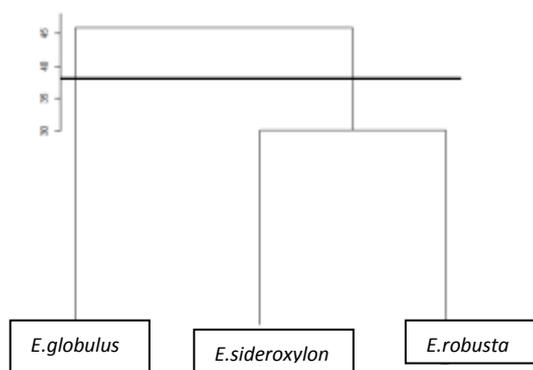


Figure 72 : Arbre hiérarchique utilisant la Distance de Ward

6-2-4 Conclusion sur l'analyse physicochimiques des HE d'Er, Es et Eg

Sur la base du profil chimique et des paramètres physicochimiques, la qualité des HE des espèces Er, Es et Eg d'Algérie est proche de celle produite dans d'autres parties du monde. Les différences dans la composition des huiles peuvent survenir en raison des différences de chémotypes, de facteurs environnementaux et de conditions de croissance. L'analyse CPG/SM a révélé que nos espèces sont à prédominance 1,8-cinéole et l'analyse en composante principale ainsi que la classification ascendante hiérarchique ont déterminé deux classes : la classe d'Er et Es et la classe d'Eg. De plus, ces résultats constituent une contribution préliminaire à l'établissement

de valeurs standards de profils chimiques et de paramètres physicochimiques pour un produit régional intéressant pour l'industrie de notre pays.

6-3 Etude biologique

6-3-1 Test de létalité de la crevette de saumure :(Brine Shrimp Lethality Test: BSL)

Le résultat du test de létalité de la crevette de saumure pour les huiles essentielles des trois espèces étudiées est indiqué sur le tableau 23.

**Tableau 23: Concentrations létales médianes CL50 des HE d'*E. robusta*,
E. sideroxylon et *E. globulus***

Extrait de plante	Dose (µg/ml)	Nbre initial de larves	Nbre de larves mortes	CL50 (µg /mL)
<i>E. robusta</i>	1	40	14	9.42
	10	40	19	
	100	40	26	
	1000	40	35	
<i>E.sideroxylon</i>	1	40	11	34.80
	10	40	16	
	100	40	24	
	1000	40	29	
<i>E. globulus</i>	1	40	13	67.55
	10	40	20	
	100	40	25	
	1000	40	32	

Toutes les huiles essentielles ont montré un potentiel de toxicité important selon l'échelle établie par Clarkson. La concentration létale médiane CL50 (µg /mL) de l'HE Eg analysée est 67,55µg /mL ce qui indique qu'elle est hautement toxique. Ce résultat va dans le même sens que d'autres études faites sur des populations de Eg originaires du Pérou et du Nigéria qui ont présenté un potentiel de toxicité important sur l'échelle de Clarkson évalué à 29 et 9,59 (µg /mL) respectivement.

Les espèces Er, Es ont montré un potentiel toxique comparable à Eg. L'effet toxique de nos trois espèces reste plus élevé comparées à d'autres espèces du même genre notamment : *E. major* (faiblement toxique) du Pérou, *E. baileyana* (moyennement

toxique) d'Australie et *E. citriodora* (non toxique) du Pérou (Tableau 24). Notons que l'espèce *Eg* du Nigéria [Olayinka et al., 2012] avec une composition chimique riche en terpinèn-4-ol (23.46 %), γ -terpinène (17.01 %), spathulenol (8.94 %) et seulement (2.52%) de 1,8-cinéole présente une $CL_{50} = 9,59 \mu\text{g} / \text{mL}$. La faible teneur en 1,8-cinéole de l'espèce *Eg* du Nigéria et sa toxicité importante suggèrent que d'autres constituants de l'huile essentielle pourraient contribuer à sa toxicité.

Tableau 24 : CL_{50} des huiles essentielles d'*Eucalyptus*

Espèces	Origine	CL_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Références
<i>E. globulus</i> (feuilles)	Algérie	65,55	Atmani-Merabet et al., 2018
<i>E. globulus</i> (feuilles)	Pérou	29	[Bussmann et al., 2011]
<i>E. globulus</i> (feuilles)	Nigéria	9,59	[Olayinka et al., 2012]
<i>E. robusta</i> (feuilles)	Algérie	9,42	Atmani-Merabet et al., 2018
<i>E. sideroxylon</i> (feuilles)	Algérie	34,80	Atmani-Merabet et al., 2018
<i>E. major</i> (feuilles)	Australie	762	[Cock, 2007]
<i>E. baileyana</i> (fleurs)	Australie	216	[Cock, 2007]
<i>E. citriodora</i> (feuilles)	Pérou	> 1000	[Bussmann et al., 2011]

6-3-2 Test acaricide

Les résultats du test acaricide pour les trois espèces étudiées sont exprimés en valeurs moyennes \pm écart type. Le test t-Student est utilisé pour évaluer les différences entre les traitements.

6-3-2-1 Evolution de la mortalité de *Varroa* dans les lots traités par l'huile essentielle d'*E. robusta*

a/ Effet du traitement (HE Er+ thymol)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec le mélange (HE Er+thymol) est décrite dans la figure 73. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 1.

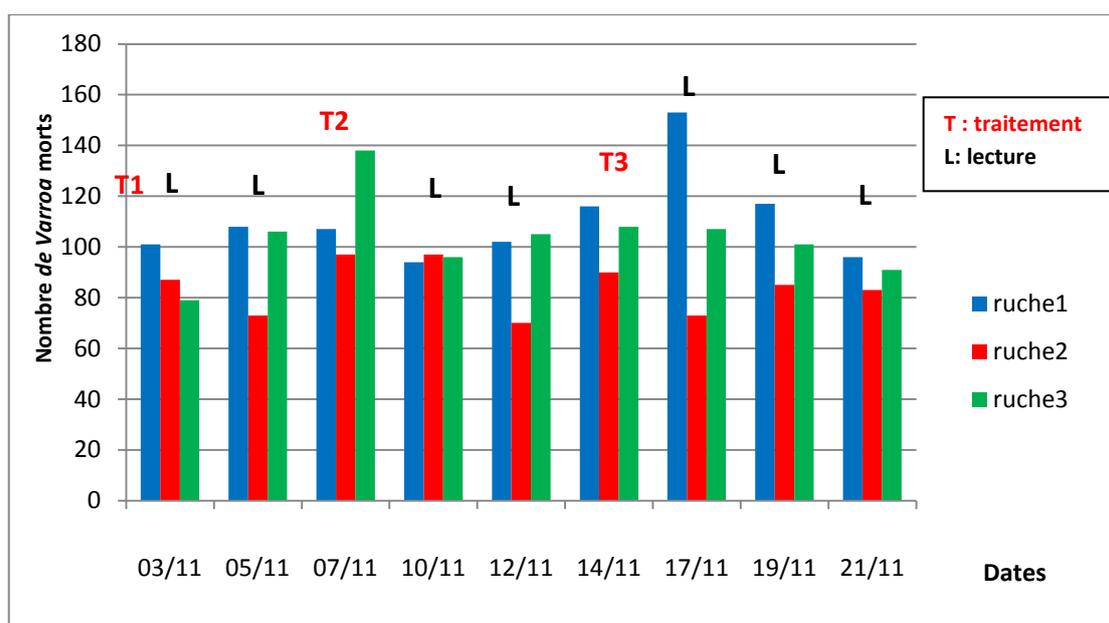


Figure 73 : Evolution de la chute de *Varroa* morts dans le Lot (1) traité par le mélange (HE Er+thymol)

La lecture de l'histogramme indique que :

- Le traitement (HE Er+thymol) a provoqué une chute de 2680 *Varroa* sur l'ensemble des trois ruches pendant la période de trois semaines.
- La chute des *Varroa* a une tendance continue.
- La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est : $99,26 \pm 3,83$.

b / Effet du traitement (HE Er)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec (HE Er) est décrite dans la figure 74. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 2.

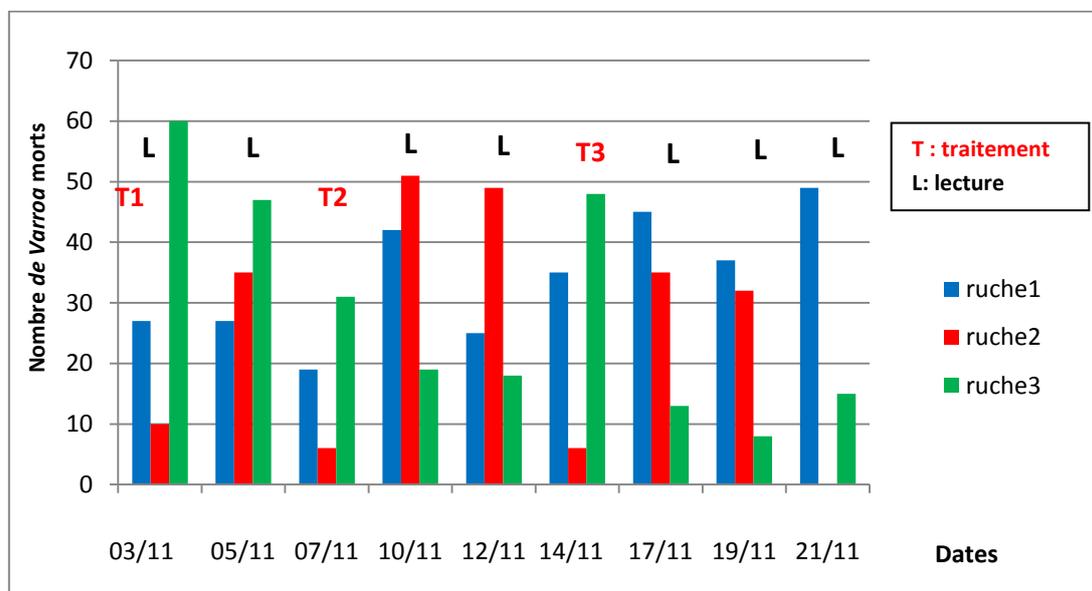


Figure 74: Evolution de la mortalité de *Varroa* dans le Lot (2) traité par (HE Er)

La lecture de l'histogramme indique que :

- La chute des *Varroa* a une tendance discontinue.
- La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est : $29,22 \pm 1,82$.
- Le traitement (HE Er) a provoqué une chute de 789 *Varroa* moins importante comparée au 1^{er} traitement (HE Er+thymol) (Figure 73).

c/ Effet du traitement par le Thymol

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec le (Thymol) est décrite dans la figure 75. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 3.

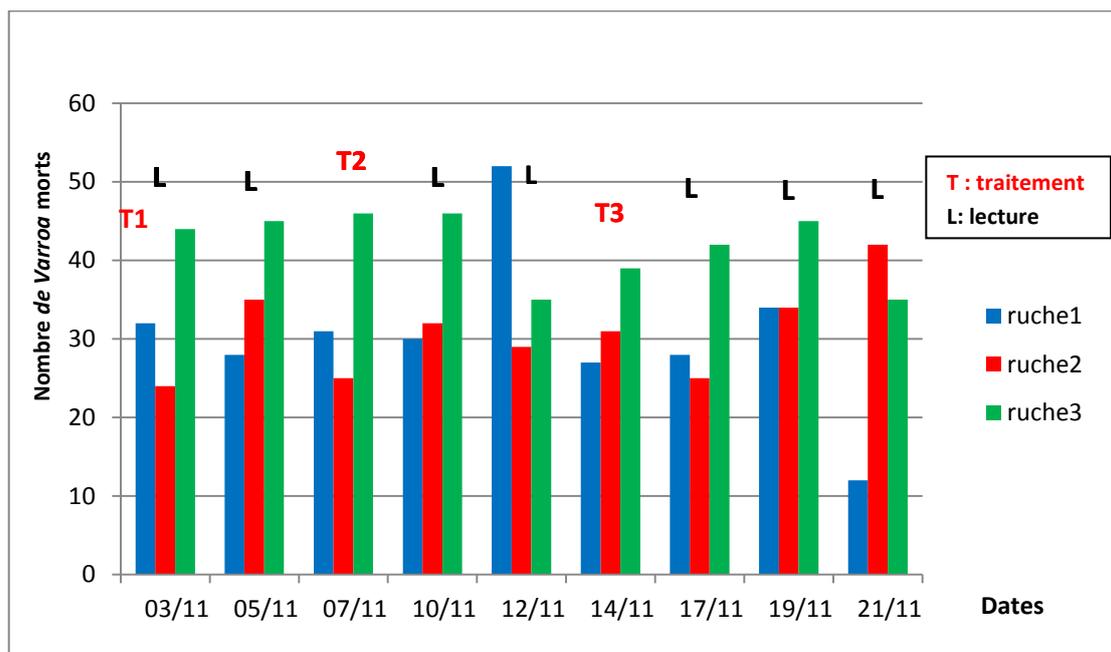


Figure 75: Evolution de la mortalité de *Varroa* morts dans le Lot (7) traité par le (Thymol)

La lecture de l'histogramme indique que :

- La chute des *Varroa* a une tendance discontinue.
- La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est : $34,37 \pm 6,51$.
- Le traitement au (Thymol) a provoqué une chute de 928 *Varroa* moins importante comparée au traitement (HE Er+thymol) (Figure 73) et plus grande comparée au traitement (HE Er) (Figure 74).

d/ Effet du (Contrôle) chute naturelle de *Varroa*

L'évolution de la mortalité de *V. destructor* dans le lot contrôle de la chute naturelle de *Varroa* pendant les 21 jours de traitement des ruches est décrite dans la figure 76. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 4.

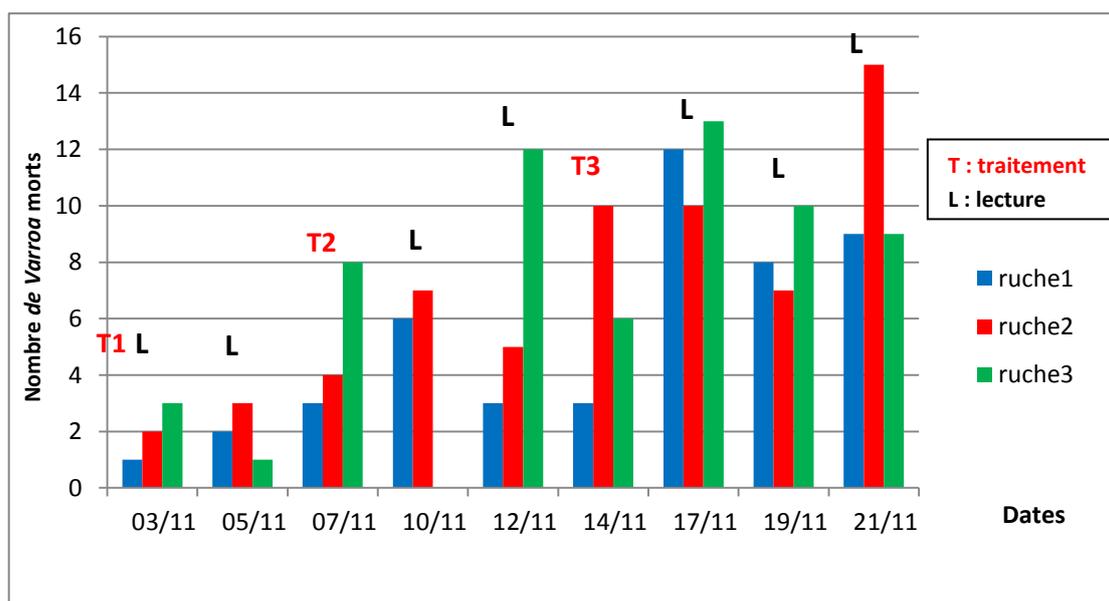


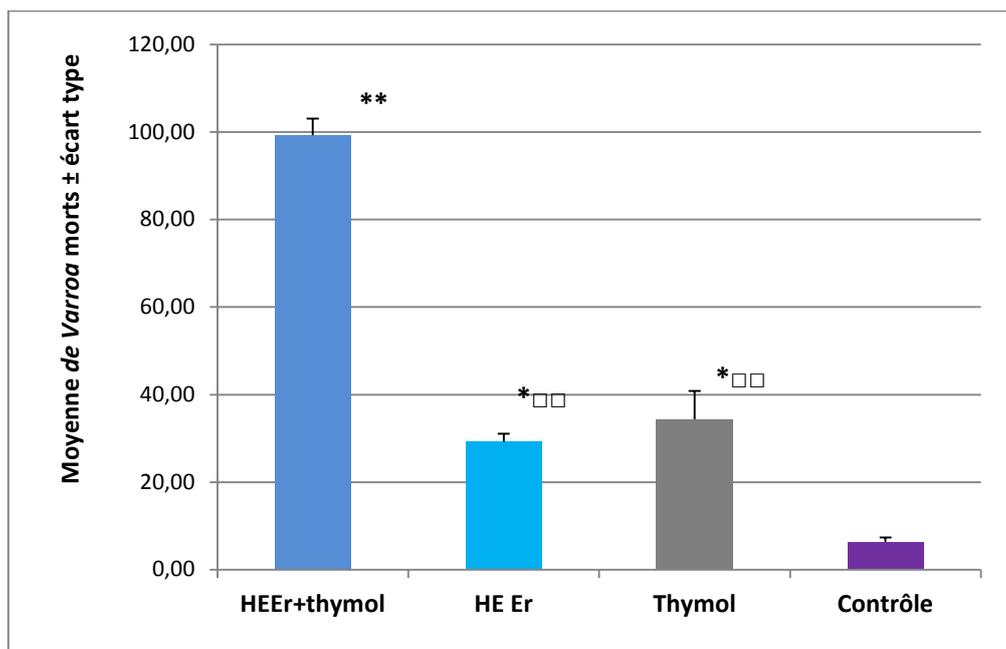
Figure 76: Evolution de la mortalité de *Varroa* morts dans Lot (8) le (Contrôle)

La lecture de l'histogramme indique que :

- Un total de 172 *Varroa* morts naturellement a été enregistré. Ce résultat reste très faible comparé aux traitements précédents.
- La chute des *Varroa* a une tendance ascendante.
- La valeur moyenne des chutes naturelles de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches est : $6,37 \pm 1,011$.

Cette différence de mortalité de *Varroa* qui se manifeste d'une ruche à une autre est due au degré d'infestation de chaque ruche qui est différent ainsi qu'au nombre d'individus de la colonie d'abeille dans la ruche.

Le résultat du test acaricide de l'HE Er exprimés en (valeur moyenne \pm écart type) est décrit dans la figure 77. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 5.



Valeur de *Varroa* mort exprimée en moyennes ± écarts type (3) ; ($p^{**} < 0.01$, $p^* < 0.05$) valeur vs contrôle; ($p^{\square\square} < 0.01$) valeur vs traitement (HE Er + thymol).

Figure 77: Evolution de la mortalité de *Varroa* avec les différents traitements à l'HE Er exprimée en (moyenne ± écart type)

La lecture de l'histogramme indique que :

- Toutes les ruches d'abeilles infectées traitées ont montré une moyenne de chute significative de *Varroa destructor* par rapport au (Contrôle).
- Le lot traité par (HE Er+thymol) s'est montré le plus efficace pour réduire les colonies de parasites comparé aux lots de Thymol ($p = 0,002$) et d'HE Er ($p = 0,001$). Cependant, aucune différence significative n'a été observée entre les lots traités au thymol et à l'HE Er seule ($p = 0,4$).

6-3-2-2 Evolution de la mortalité de *Varroa* dans les lots traités par l'huile essentielle d'*E. sideroxylon*

a/ Effet du traitement (HE Es+ thymol)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec le mélange (HE Es+ thymol) est décrite dans la figure 78. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 6.

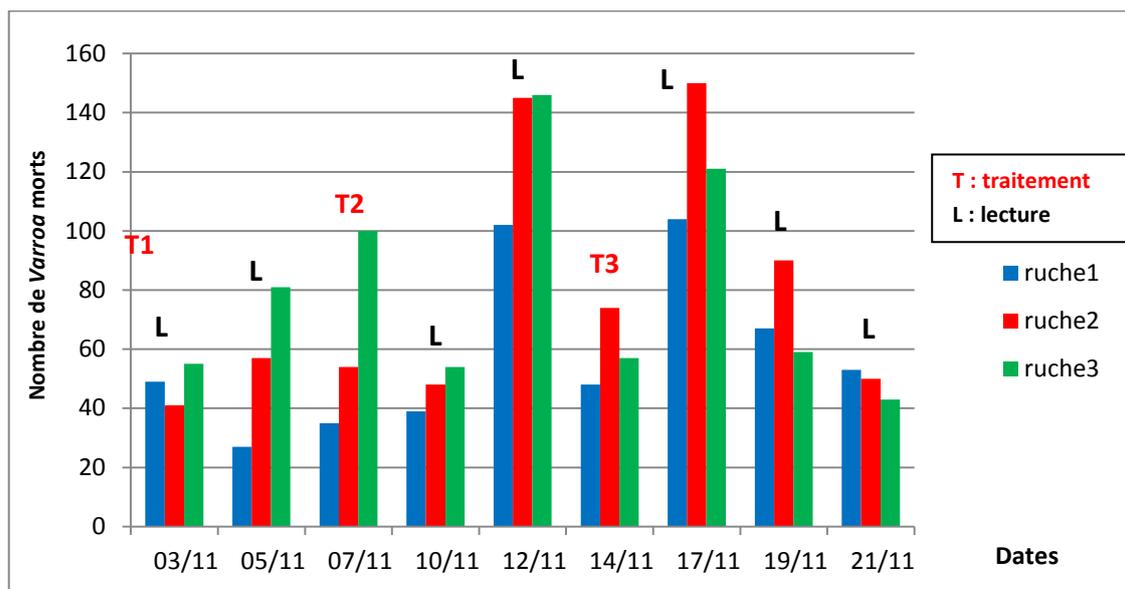


Figure 78 : Evolution de la mortalité de *Varroa* dans le Lot (3) traité par le mélange (HE Es+thymol)

La lecture de l'histogramme indique que :

- La chute des *Varroa* a une tendance discontinue.

-La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est : $72,19 \pm 6.94$.

Le traitement (HE Es+thymol) a provoqué une chute de 1949 *Varroa* moins importante comparée au traitement (HE Er+thymol) et plus grande comparée au traitement (Thymol).

b/ Effet du traitement (HE Es)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec (HE Es) est décrite dans la figure 79. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 7.

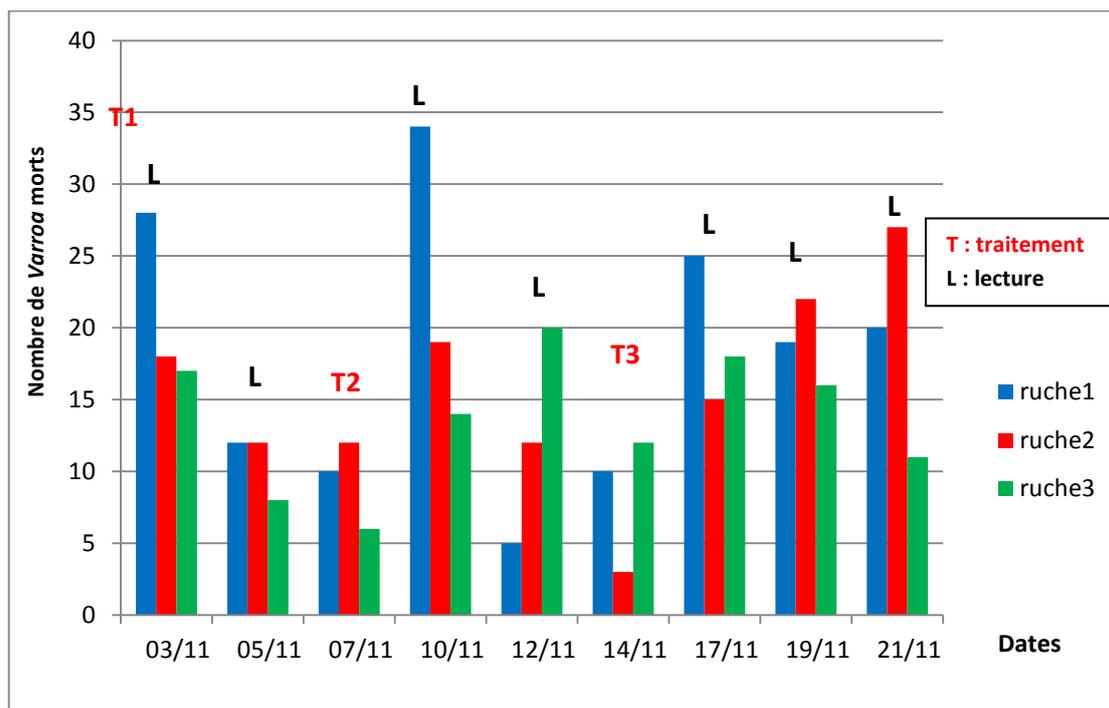
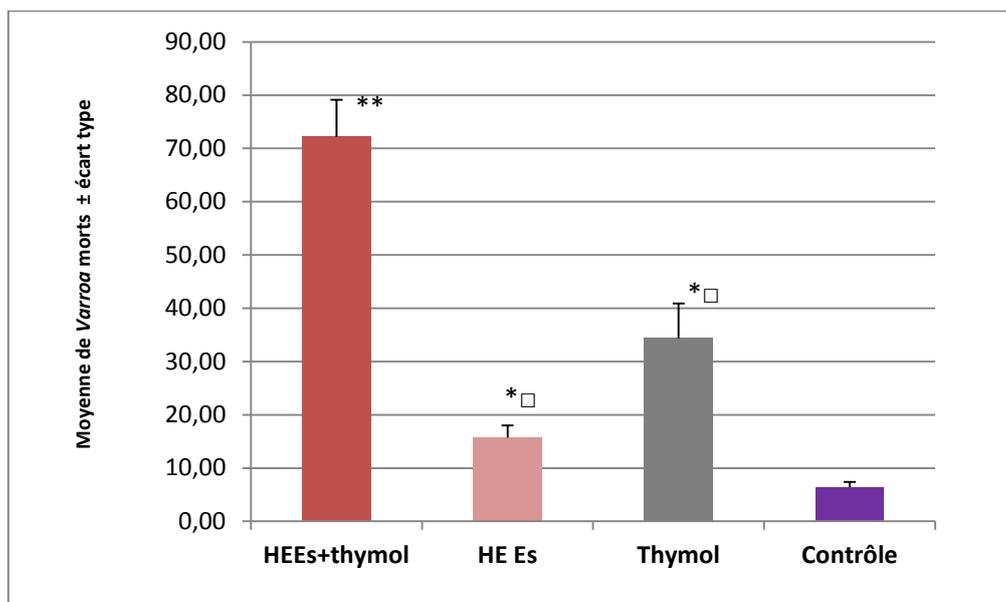


Figure 79: Evolution de la mortalité de *Varroa* dans le lot(4) traité par (HE Es)

La lecture de l'histogramme indique que :

- La chute des *Varroa* a une tendance ascendante à discontinue.
- La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est: $15,74 \pm 2,28$.
- Le traitement (HE Es) a provoqué une chute de 425 *Varroa* moins importante comparée au traitement (HE Er) et plus grande que le (Contrôle)

Le résultat du test acaricide de l'HE Es exprimés en (valeur moyenne \pm écart type) est décrit dans la figure 80. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 8.



Valeur de *Varroa* mort exprimée en moyenne \pm écarts type (3) ; ($p^{**} < 0.01$, $p^* < 0.05$) valeur vs contrôle; ($p^{\square} < 0.05$) valeur vs traitement (HE Es + thymol).

Figure 80: Evolution de la mortalité de *Varroa* avec les différents traitements à l'HE Es exprimée en (moyenne \pm écart type)

La lecture de l'histogramme indique que :

- Une chute significative de *Varroa destructor* est enregistrée par rapport au contrôle.
- Le lot traité par (HE Es+thymol) s'est montré le plus efficace pour éliminer l'ectoparasite comparé aux lots de thymol ($p = 0,02$) et d'HE Es ($p = 0,02$).
- Aucune différence significative n'a été observée entre les lots traités au thymol et à l'HE Es ($p=0,06$).

6-3-2-3 Evolution de la mortalité de *Varroa* dans les lots traités par l'huile essentielle d'*E. globulus*

a/ Effet du traitement (HE Eg+ thymol)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec le mélange (HE Eg+thymol) est décrite dans la figure 81. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 9.

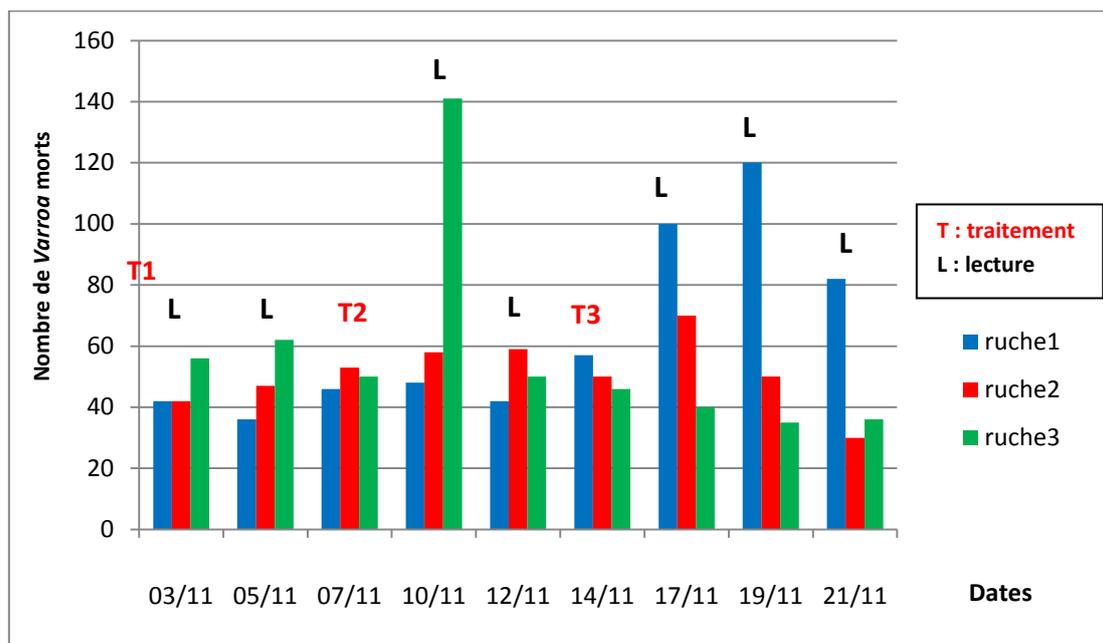


Figure 81: Evolution de la mortalité de *Varroa* dans le Lot (5) traité par le mélange (HE Eg+ thymol)

La lecture de l'histogramme indique que :

-Le traitement (HE Eg+thymol) a provoqué une chute de 1548 *Varroa* moins importante comparée aux traitements (HE Er+thymol) et (HE Es+thymol).

- La chute des *Varroa* a une tendance en général continue.

-La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est : $57,33 \pm 6.33$.

b/ Effet du traitement (HE Eg)

L'évolution de la mortalité de *V.destructor* pendant les 21 jours de traitement des ruches avec le mélange (HE Eg) est décrite dans la figure 82. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 10.

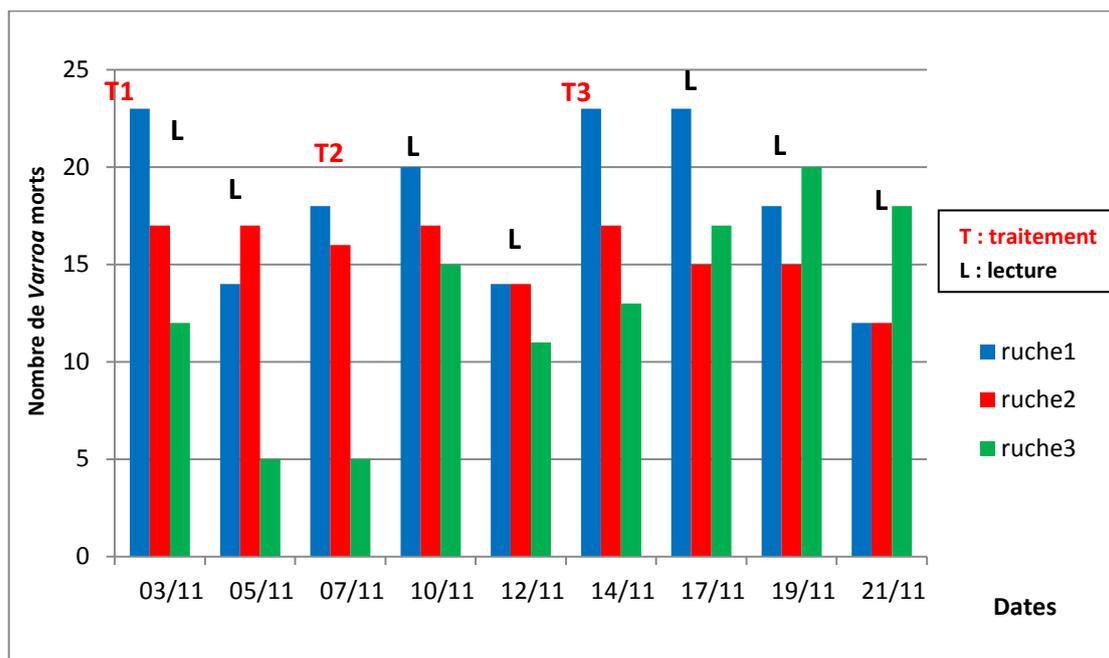


Figure 82: Evolution de la mortalité de *Varroa* dans le Lot (5) traité par (HE Eg)

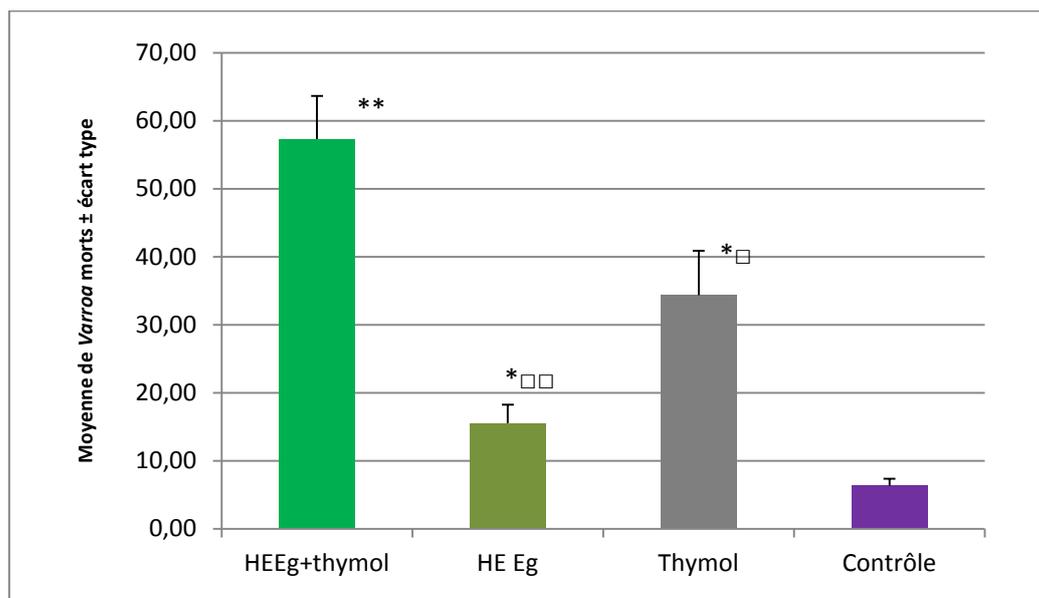
La lecture de l'histogramme indique que :

-Le traitement (HE Eg) a provoqué une chute de 421 *Varroa* comparable à celle de (HE Es) est faible comparée au traitement (HE Er).

- La chute des *Varroa* a une tendance descendante.

-La valeur moyenne des chutes de *Varroa* morts enregistrée sur les trois ruches pendant le traitement est: $15,56 \pm 2,71$.

Le résultat du test acaricide de l'HE Eg exprimés en (valeur moyenne \pm écart type) est décrit dans la figure 83. Les valeurs chiffrées obtenues sont exposées dans le tableau en annexe 11.



Valeur de *Varroa* mort exprimée en moyennes \pm écarts type (3) ; ($p^{**} < 0.01$, $p^* < 0.05$) valeur vs contrôle; ($p^{\square\square} < 0.01$, $p^{\square} < 0.05$) valeur vs traitement (HE Eg+ thymol).

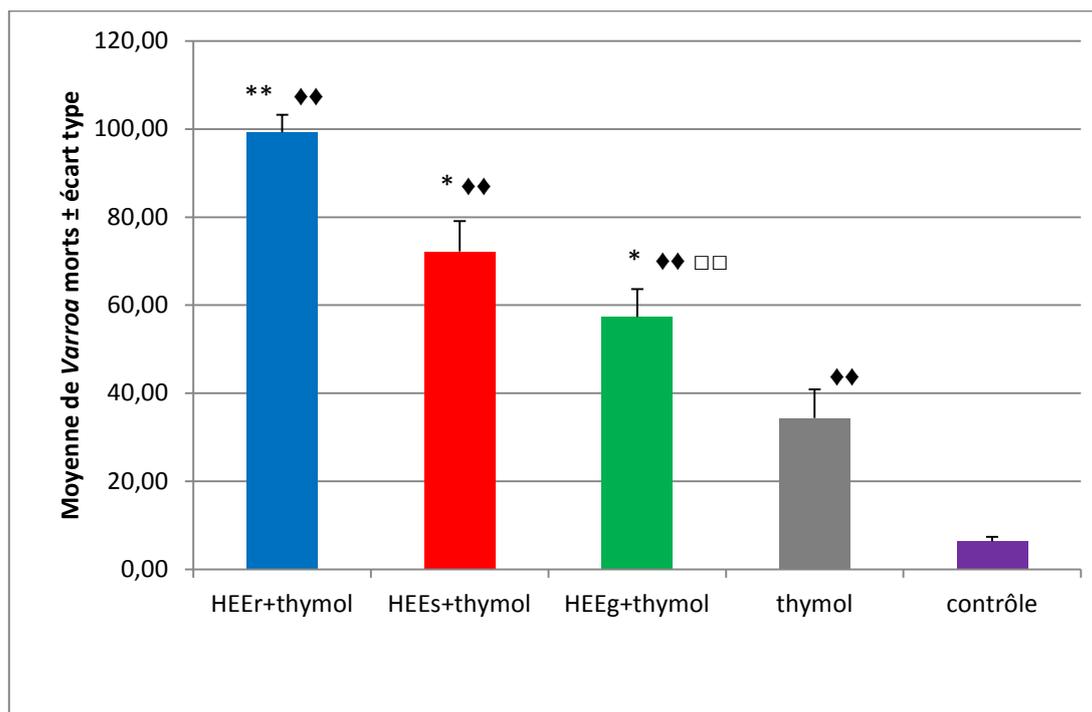
Figure 83: Evolution de la mortalité de *Varroa* avec les différents traitements à l'HE Eg exprimée en (moyenne \pm écart type)

La lecture de l'histogramme a indiqué que :

- Toutes les ruches traitées ont montré une chute significative de *Varroa destructor* par rapport au contrôle.
- Le lot (HE Eg + thymol) s'est montré le plus efficace pour éliminer l'ectoparasite comparé aux lots du thymol ($p = 0,05$) et d'HE Eg ($p = 0,006$).
- Aucune différence significative n'a été observée entre les lots traités au thymol et à l'HE Eg la différence n'est pas significative ($p = 0,07$).

6-3-2-4 Synthèse du test acaricide pour les trois espèces

La figure 84 regroupe les résultats du test acaricide exprimés en (valeur moyenne \pm écart type) pour les huiles essentielles des espèces Er, Es et Eg associées au thymol.

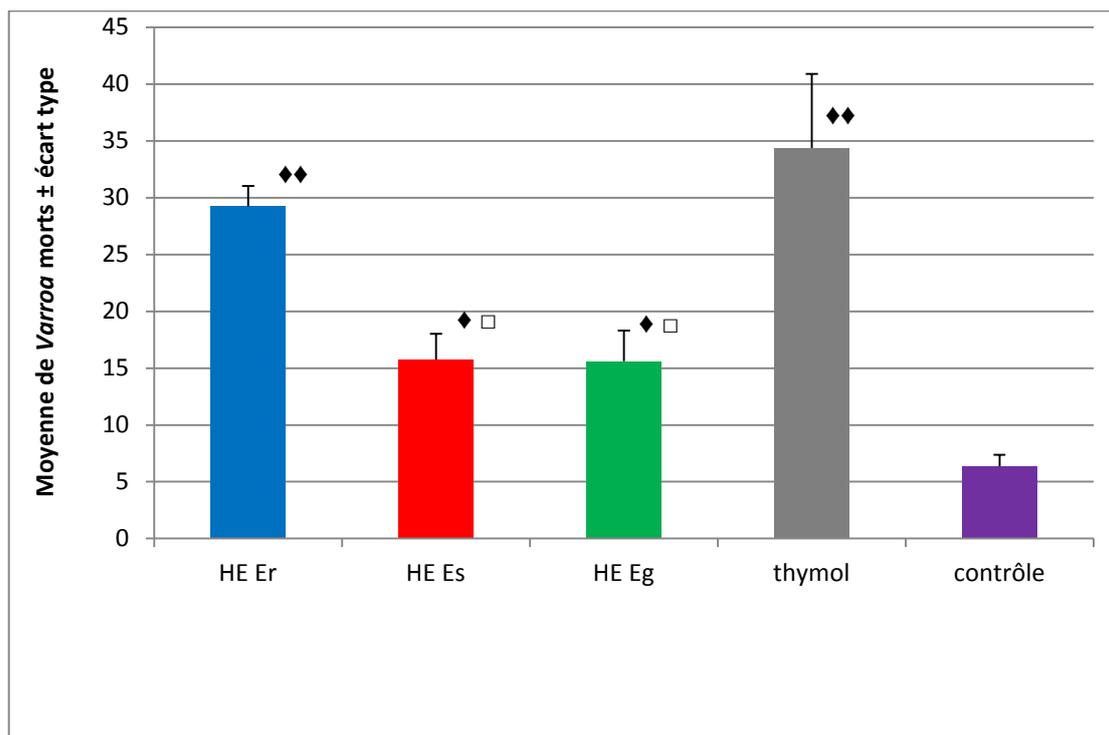


Valeur de *Varroa* mort exprimée en moyennes ± écarts type (3) ; (p♦♦ < 0.01) valeur vs contrôle (p** < 0.01, p* < 0.05) valeur vs thymol; (p□□ < 0.01) valeur vs traitement (HE Er + thymol).

Figure 84: Nombre de *Varroa* morts pour les HE associées au thymol de Er, Es et Eg exprimé en moyenne ± écart type

- Tous les traitements ont provoqués une chute de *Varroa* significative par rapport au contrôle.
- Une différence significative a été observée entre le lot traité par (HE Er + thymol) et celui de (HE Eg + thymol) ($p = 0.01$).
- Aucune différence n'a été notée entre le lot (HE Es + thymol) et les deux lots précédents.
- Le traitement (HE Er + thymol) présente une différence très significative par rapport au thymol ($p = 0.002$).
- Les lots (HE Es + thymol) et (HE Eg + thymol) ont montré une différence significative avec le thymol, ($p = 0.023$) et ($p = 0.05$) respectivement.

La figure 85 regroupe les résultats du test acaricide exprimés en (valeur moyenne ± écart type) pour les huiles essentielles seules.



Valeur de *Varroa* mort exprimée en moyennes ± écarts type (3) ; (p♦ < 0.05, p♦♦ < 0.01) valeur vs contrôle (p□ < 0.05) valeur vs traitement (HE Er).

Figure 85: Nombre de *Varroa* morts pour les HE des trois espèces Er, Es et Eg exprimé en moyenne ± écart type

La lecture de l'histogramme a indiqué que:

- Les traitements à base des HE et du thymol ont montré des valeurs moyennes de chutes de *Varroa* significativement supérieures par rapport au contrôle.
- Les traitements à base des HE ont montré des valeurs moyennes de chutes de *Varroa* plus faibles mais non significativement différents par rapport au thymol.
- Le traitement à base de HE Er s'est montré significativement plus efficace que ceux à base de HE Es (p = 0,02) et HE Eg (p = 0,02).
- Aucune différence entre les traitements à l'HE Eg et l'HE Es (p = 0.54).

Malgré le fait que le groupe traité au thymol a montré une moyenne plus élevée de *Varroa* tombé (34,37 ± 6,51) que celle de l'HE Er (29,22 ± 1,82), de l'HE Es (15,74 ± 2,28 et l'HE Eg (15,56 ± 2,71), aucune différence statistiquement significative entre ces groupes n'a été observée. Une des raisons pourrait être liée à la

forte variabilité détectée dans le rucher. Pour surmonter ce problème, le nombre de ruches doit être augmenté afin d'obtenir une meilleure appréciation de l'efficacité des effets des traitements appliqués.

6-3-3 Conclusion sur l'étude biologique

Les résultats obtenus par l'étude de la toxicité ont révélé que les HE étudiées sont toutes actives envers *Artemia salina* avec l'effet le plus élevé pour celle de l'espèce Er. L'évaluation de l'effet des HE sur les ruches a confirmé la même tendance de toxicité. D'une part, les traitements par les HE seules des ruches infectées se sont révélés comparables en efficacité par rapport au traitement à base de thymol composé, largement utilisé en apiculture pour protéger les colonies d'abeilles contre différentes maladies notamment la varroase et d'autre part, l'association (HEE +thymol) s'est montrée statistiquement plus efficace que les traitements précédents.

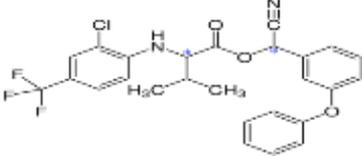
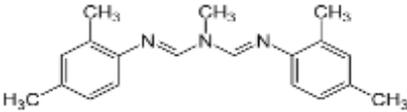
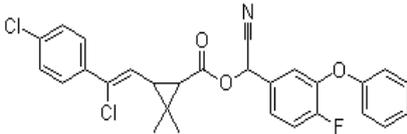
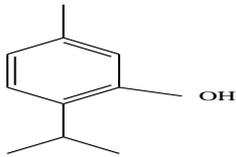
Parmi les trois associations testées celle à base de (HE Er + thymol) s'est distinguée par un effet acaricide statistiquement supérieur aux autres.

Nos résultats vont dans le sens d'autres études [Calderone et Spivak, 1995 ; Eguaras et al., 2005 ; Ghasemi et al., 2011 ; Labeste, 2013 ; Habbi-Cherifi, 2014 ; Abu Bakar et al., 2017] qui ont montré un potentiel acaricide important des huiles essentielles des espèces d'*Eucalyptus* contre l'acarien des abeilles le *Varroa destructor*.

Notre étude bien qu'elle rejoint les conclusions des auteurs précédant a permis de montrer que l'association (HE E+thymol) donne une meilleure efficacité que le traitement avec du thymol à réduire la population du parasite à l'intérieur du rucher. Il faut savoir que les traitements conventionnels à base de thymol seul rencontrent actuellement un phénomène de résistance de la part de *V.destructor* [Charpentier, 2013 ; Bruneau, 2015], ainsi la piste proposée par notre étude repose sur une association (HE+thymol) pour palier à ce problème de résistance. Sachant d'une part que la composition complexe d'une HE et sa diversité structurale remarquable, constituera un obstacle difficilement surmontable pour que le parasite puisse développer une quelconque résistance. D'autre part, les médicaments anti *Varroa* les plus utilisés en Algérie présentant pour la plupart un seul principe actif (Tableau 25)

donc, les huiles essentielles de part leur structure complexe, pourraient diminuer le phénomène de résistance de *Varroa*.

Tableau 25 : Acaricides les plus utilisés en Algérie

Acaricide	Principe actif	Structure
Apistan	Fluvinate	
Apivar	Amitraze	
Bayvarol	Fluméthrine	
Apiguard	Thymol	

Conclusion générale et perspectives

L'Algérie, de par sa position, géographique possède une biodiversité exceptionnelle et une richesse importante en plantes aromatiques et médicinales. Dans le présent travail, on s'est intéressé à la valorisation des plantes aromatiques locales utilisées en médecine traditionnelle vétérinaire pour leurs propriétés acaricides dans le contrôle de la varroase.

Trois espèces d'*Eucalyptus* ont fait l'objet de notre recherche, à savoir, *E. robusta*, *E. sideroxylon* et *E. globulus*.

La caractérisation chimique des huiles essentielles est réalisée par la mesure de paramètres physicochimiques et une analyse par CPG couplée à la masse. Les HE d'Er, Es et Eg ont donné des rendements variant entre 0,83% et 1,09%.

Les propriétés organoleptiques et les paramètres physico chimiques des huiles essentielles des feuilles de nos trois plantes sont en accord avec ceux mentionnés par les normes AFNOR. La valeur des paramètres obtenus indiquent que nos huiles sont de bonne qualité.

L'étude chromatographique des huiles essentielles des feuilles d'Er, Es et Eg a révélé que le composant le plus abondant chez les trois espèces est le 1,8-cinéole avec le pourcentage le plus élevé pour l'espèce Eg (78,45%) Les résultats obtenus permettent d'affecter nos huiles au chémotype 1,8-cinéole. Par ailleurs en plus d'un fort taux en 1,8-cinéole, nos huiles essentielles notamment celles d'Es et Eg contiennent un faible taux de phellandrene. Cette substance est considérée comme extrêmement toxique [Dooms et al., 1977] . Ces spécifications des HE d'Es et Eg les rendent très recherchées en industrie pharmaceutique et par le secteur de la cosmétique.

Les trois huiles essentielles ont montré un seuil de toxicité important sur les deux tests, BSL et varroacides. Les résultats de ces deux essais se rejoignent pour indiquer que l'espèce Er est la plus toxique suivie de Es et finalement Eg.

Ce travail a permis d'identifier le potentiel varroacides des HE d'*Eucalyptus* et indique que l'association (HEE + thymol) peut constituer une option viable aux traitements conventionnels à base de thymol seul. En effet, cette étude a été motivée par le fait que le thymol est un produit dont l'efficacité dans le contrôle des acariens

est établie et que cet effet pourrait être potentialisé en le combinant avec les huiles essentielles d'*Eucalyptus* locales. L'utilisation de l'huile d'*Eucalyptus* comme pesticide naturel est d'une importance immense compte tenu des implications environnementales et toxicologiques de l'utilisation néfaste des pesticides synthétiques. Le but ultime est de développer de nouveaux produits plus efficaces, mais surtout de surmonter le problème de l'augmentation de la résistance des ravageurs aux traitements actuels.

Les investigations réalisées concernant les trois plantes sont une première étape qui s'inscrit dans le cadre de leur valorisation tant sur le plan chimique que sur le plan biologique. Ainsi, pour développer cet objectif de recherche, un certain nombre de pistes peuvent être explorées:

- La chute la plus importante de l'ectoparasite a été enregistrée avec l'association de (HE Er+ thymol). Ce résultat est important et soulève d'autres questions parmi lesquelles : Est-ce que l'effet acaricide observé de l'huile essentielle d'*E.robusta*, est attribué ou non aux composés prédominant de l'espèce à savoir 1,8-cinéole? Si tel est le cas, il sera intéressant d'étudier les traitements à base du 1,8-cinéole, de l'association (thymol + 1,8-cinéole), et de les comparer au thymol.

- L'évaluation expérimentale *in vitro* de :
 - ◆ L'impact de nos huiles essentielles sur l'abeille et les produits de la ruche
 - ◆ L'effet des huiles essentielles sur le développement des nymphes des abeilles
 - ◆ La mise au point d'une formulation galénique plus appropriée à base de gel pour la libération retardée de l'huile essentielle et palier ainsi à son évaporation précoce.

- Envisager l'utilisation des huiles essentielles seules ou en association avec d'autres produits en alternance avec les médicaments anti *Varroa* et ce pour diminuer le phénomène de résistance de *Varroa*.

Enfin, La varroase est désormais un problème d'ordre mondial c'est pourquoi la lutte contre ce fléau doit être prise au sérieux par les pouvoirs publics, par les

apiculteurs et par les chercheurs. Elle doit faire l'objet d'un vaste programme d'action territorial afin d'éviter les perpétuelles infestations, et de sauver ainsi notre sentinelle de l'environnement : l'abeille domestique.

Références bibliographiques

Abdelhalim MI, Helmy AG, Ayman AO. Combating honey bee *Varroa* mites by plants oils alone or in an IPM programme. The 2nd conference of farm integrated pest management. Fac Agric Fayoum Univ; 2006:172-85.

Abdelwahab TE, Ebadah MA, Zidan EW. Evaluation of some volatile plant oils and maurik against *Varroa destructor* in honey bee colonies. J of Appl Sci Res. 2006 ; 2(8):514-21.

Abderrahim A. Comportement des trois espèces d'*Eucalyptus* introduites à Bainem. Thèse d'étude (D.E.S). U.S.T.H.Alger ; 1983.

Abu Bakar M, Anjum Aqueel M, Muhammad Raza AB, Ullah MI, Arshad M, Sohail M, et al. Evaluation of Few Essential Oils for the Management of Parasitic Bee Mites, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* L. Colonies. Pakistan. J. Zool. 2017.

Adam. Association de Développement de l'Apiculture en Midi-Pyrénées. France; 2016.

Adjlane N, Doumandji SE, Haddad N. Situation de l'apiculture en Algérie: facteurs menaçants la survie de colonies d'abeilles locales *Apis mellifera* Intermissa. Cah of Agric. 2012; 12(4) : 235-47.

Adjlane N, EL Ouanass J, Haddad N. Evaluation of oxalic acid against the mite *Varroa destructor* and secondary effects on honey bees *Apis mellifera*. J Arthropod-Born Dis. 2016; 10(4): 501-9.

AFNOR. « Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». AFNOR, Paris ; 2000 :661-3.

Ahmed Y, Sohrab H, Al-Reza SM, Shahidulla Tareq F, Hasan CM, Sattar MA. Antimicrobial and cytotoxic constituents from leaves of *Sapium baccatum*. Food Chem Toxicol. 2010; 48: 549-52.

Ahmim M. Nature et biodiversité Algérienne. Algérie, 2008.

Ait M'barek L, Ait Mouse H, Tilaoui M, Jaâfari A, Aboufatima R, Chait A, et al. Anti tumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. Braz J of Med and Biol. 2007; 40(11): 839-47.

Al Ghazawi A. Factors affecting the maturity of young females of *Varroa jacobsoni* Oudemans. Phd thesis, University of Hohenheim, Dr Nein hausVerlag, Stuttgart; 1993.

Aliouane Y, El Hassani AK, Gary V, Armegand C, Lambin M, Gauthier M. Subchronic exposure of honey bees to sublethal doses of pesticides: effects on behavior. Environ Toxicol and Chem. 2009; 28: 113-22.

Allipi AM. A comparison of laboratory techniques for the detection of significant bacteria of the honey bee *Apis mellifera* in Argentina. J Apicul Res. 1991; 30:75-80.

Al Musawi AH, Al-Naib FA.G. Allelopathic effects of *Eucalyptus microtheca* F.Muell. J Univ Kuwait (Sci). 1975; 2:59-65.

Al-Waili NS, Salom K, Al-Ghambi AA. Honey for wound healing, ulcers, and burns: data supporting its use in clinical practice. The Sci World J. 2011; 11:766-87.

Alzogaray RA, Lucia A, Zerba EN, Masuh HM. Insecticidal activity of EOs from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germânica*. J Econ Entomol. 2011; 104: 595–600.

Anderson DL. Non product of *Varroa jacobsoni* Oud. Apidol. 1994 ; (31): 281-92.

Anderson DL and Trueman JWH. Are there different species of *Varroa jacobsoni*? in: Proc. XXXV1. Apimondia Congr, Canada; 1999.

Anderson DL and Trueman JWH. *Varroa jacobsoni* (Acari: varroadae) is more than one species. Exp. Appl Acarol. 2000; 24(3):165-89.

Anderson KE, Sheehan TH, Eckholm BJ, Moh BM, De Grandi-Hoffman G. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insect Soc.* 2011 ; 58: 431-44.

Angharad Rees I. Face aux défis des systèmes publics de santé, quel rôle pour la médecine traditionnelle dans les pays en développement ? *Santé Internationale.* 2011 : 337-45.

Aouadhi S. Atlas des risques de la phytothérapie traditionnelle de 57 plantes recommandées par les herboristes. Mémoire on line ; 2010.

Aouati A. Etude de la toxicité de certaines plantes sur les larves de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). Thèse de Doctorat, Université des Frères Mentouri, Constantine ; 2015.

Aprotosoiaie AC, Spac AD, Hancianu M, Miron A, Tanasescu VF, Dorneanu V, et al. The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Farmacia.* 2010; 58 (1):46-54.

Ariane A, Ebadir, Tahmasebi G. Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: varroidae). *Exp and Appli Acarol.* 2002 ; 27: 319-27.

Armelin G. Introduction à la médecine de terrain, application à la phytothérapie clinique. 1974.

Assaduzzaman MD, Sohel Rana MD, Raqibul Hasan SM, Monir Hossain MD, Nittananda Das. Cytotoxic (Brine Shrimp Lethality Bioassay) and Antioxidant Investigation of *Barringtonia acutangula* (L.)". *Int J of Pharma Sci and Res.* 2015; 6(8): 1179 - 85.

Ayvaz A, Sagdic O, Karaborklu S, Ozturk I. Insecticidal Activity of the Essential Oils from Different Plants Against Three Stored-Product Insects. *J Insect Sci.* 2010; 10: 21.

Bacher R. L'ABC du rucher bio, édition terre vivante. 2006.

- Baggio A.** Arculeo,P, Nanetti A, Marinelli E, Mutinelli F. Field trials with different thymol based products for the control of varroasis. *Am Bee J.* 2004; 144 (5): 395-400.
- Baldensperger PJ.** Sur l'apiculture en Orient. Proceeding of the Sixth International Congress of Apiculture. Marseille, France; 1924.
- Barahona MVand Sancez-Fortun S.** Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine BW284e51, ISO-OMPA and 2-PAM on carabyl toxicity. Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Veterinary, Univ Complutense, Madri-Spain; 1999.
- Barbançon JM et Le Conte Y.** 2006. *Traité Rustica de l'Apiculture.* Rustica Editions.
- Barbosa LCA, Filomeno CL, Teixeira RR.** 2016. Supplementary Materials: Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. *Ess Oils. Molecules.* 2016 ; 21 : 1671.
- Bardeau F.** Les huiles essentielles / découvrir les bienfaits et les vertus d'une médecine ancestrale. Editeur, Fernand Lanore; 2009.
- Barour C, Tahar A, Baylac M.** Forewing shape variation in Algerian honey bee populations of *Apis mellifera* Intermissa (Buttel-Reepen, 1906) (Hymenoptera: Apidae): A landmark based geometric morphometrics analysis. *Afr Entomol.* 2011; 19(1): 11-22.
- Bayala B, Bassole I H, Gnoula C, Nebie R, Yonli A, Morel L.** Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *Am J Cancer Res.* 2014 ; 4(6):591-607.
- Bégin D, Lavoué J, Gérin M.** 'La Substitution des Solvants par le d-limonène', Health (NIOSH) ; 2000.
- Behl C.** Alzheimer's disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiol.* 1999 ; 57(3):301-23.

Belaid M et Doumandji S. Effet du *Varroa destructor* sur morphométrie alaire et sur les composants du système immunitaire de l'abeille ouvrière *Apis mellifera* Intermissa. Lebanese Sci J.2010 ; 11 : 83-90.

Belaid M. Effet du parasitisme par *Varroa destructor* sur les paramètres morphométriques et physiologiques de l'abeille ouvrière *Apis mellifera* L, dans la région médio- septentrionale d'Algérie. Thèse de Doctorat en sciences agronomique. INA EL Harrache, Alger ; 2011.

Belyagoubi L. Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoire de magister. Université Abou Bekr Belkaid ; 2006.

Benadja S, Tlili Ait Kaki Y, Djahoudi A, Hedef Y, Chefrou A. Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. J of Life Sci. 2013 ; 7(8) : 814-19.

Benayche S, Benayache F, Benyahia S. Leaf oils of some *Eucalyptus* species growing in Algeria. J Essent Oil Res. 2001;13: 210-13.

Benazzeddine S. Activité insecticide de cinq huiles essentielles vis-à-vis de *Sitophilus orizae* (Coleoptra, Tenebrionidae). Mémoire on line ; 2010.

Benini C. Contribution à l'étude de la diversification de la production d'huiles essentielles aux Comores. Mémoire d'ingénieur. Université Gembloux ; 2007.

Benseddik ML et Khenfer B. Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus algeriensis* contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L). Master Académique. Université Kasdi Merbah, Ouargla, Algérie ; 2015.

Ben Slimane B, Ezzinz O, Dhahri S, Ben Jamaa ML. Essential oils from two *Eucalyptus* from Tunisia and their insecticidal action on *Orgyia trigotephras* (Lepidoptera, Lymantriidae). Biol Res. 2014 ; 47:29.

Bessah R et Benyoussef EL. La filière des huiles essentielles Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Rev Energ Renouv.* 2015 ; 18 (3) :513 - 28.

Besombes C. Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro thermomécanique d'herbes aromatiques. Applications généralisées. Thèse de Doctorat. Université de La Rochelle ; 2008.

Bey-Ould Si Said Z. Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Mémoire de Magister. Université Abderrahmane, Mira, Bejaïa ; 2014.

Billerbeck VG. Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytotherapie.* 2008; 5(5) : 249-53.

Bogdanov S, Charriere JD, Imdorf A, Kilchenmann V. Determination of residues in honey after treatment with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidol.* 2002 ; 33: 399-409.

Bogdanov S. Contaminants of bee products. *Apidol.* 2006; 38(1): 1-8.

Boland D J , Brooker MIH, Chippendale GM. *Forest Trees of Australia*, (4th ed). Collingwood, Victoria; 2006.

Bonafos C. *Traité scientifique aromathérapie: aromatologie & aromachologie.* Escalquens : Editions Dangles; 2013.

Boot WJ, Schoenmaker J, Calis JUM, Beetsma J. Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone cells of honey bee *Apis mellifera*. *Apidol.* 1995 ; 26: 109-18.

Boucher C. Dépistage de l'infestation par *Varroa destructor*. Centre québécois d'inspection des aliments et de la santé animale (CQIASA), journée champêtre en apiculture ; 2004.

Boucher C. Bilan de la mortalité hivernale 2008-2009 au sein des colonies d'abeilles du Québec d'après le sondage effectué au printemps 2009. *Bull Zoo Sanitaire.* 2009 ; 65: 1-8.

Boudy P. Guide du forestier en Afrique du nord. Edité par La Maison Rustique - Librairie Agricole, Horticole, Forestière et Ménagère, Paris, **1952**.

Boukhatem MN, Hamaidi MN, Saidi F, Hakim Y. Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du *Géranium Rosat (Pelargonium graveolens L.)* cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie). Rev Nat et Technol .2010 ; 3.

Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kerkedi W, Sadok Bouziane M. Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) origin. Int Lett of Chem, Phys and Astron. 2014; 17(3): 303-15.

Bourkhiss M, Hanach M, Bourkhiss B, Ouhssine M, Chaouch A. Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc. Afr Sci. 2007 ; 3 (2) : 232-42.

Boutamani M. Etude de la variation du rendement et de la composition chimique du *Curcuma longa* et *Myristica fragrans* en fonction du temps et de la technique utilisée. Mémoire on line. U.S.T.H.B Alger, 2013.

Boutayeb A. Etude bibliographique sur les huiles essentielles et végétales. Mémoire on line. Université Ibn Tofail, 2013.

Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunna A. The transmission of deformed wings virus between honey bees (*Apis mellifera*. L) by the ectoparasite mite *Varroa jacobsoni*. Oud. J of Invert Pathol. 1999; 73: 101-6.

Brodshneider R, Moosbeckhofer R, Crailsheim K. Surveys as a tool to record winter losses of honey bee colonies: a two year case study in Austria and South Tyrol. J of Apicul Res. 2010 ; 49(1): 23-30.

Bruneau E. Varroase, un autre regard. Actu Apicul. 2015 ; 65 : 1-23.

Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier, Paris ; 1993

Bruneton J. Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 3ème éd., Tec & Doc. Lavoisier, Paris ; 1999.

Bruneton J. Déments de phytochimie et de pharmacognosie. Lavoisier, Paris ; 1987.

Bruneton J. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4ème éd., Tec & Doc. Editions médicales internationales, Paris ; 2009 : 1188.

Bufler U, Seufert G, Juttner F. Monoterpene patterns of different tissues and plant parts of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst). Environ Pollu. 1990; 68(3-4): 367-75.

Burel D. La ruche le miel et le jardin, édition Ouest-France ; 2012.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3): 223-53.

Bussmann RW, Malca G, Glenn A, Sharon D, Nilsen B, Parris D, et al. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. J Ethnopharmacol. 2011; 137(1): 121-40.

Buttel-Reepen HV. Apistica beitragezur systematic, biologie, sowie zurgeschicht-lichenund geographischenverbreitung der honigbiene (*Apis mellifera* L.) her varietaten und der ilbrigen Apis arten. Mitteilwigen aus dem. Zoologischen Museum im Berlin. 1906; 3: 121-96.

Calderone NW and Spivak M. Plant extracts for control of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol. 1995; 88 : 1211-15.

Calderone NW and Kuenen LPS. Effects of western honey bee (Hymnoptera: apidae) colony cell type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: varroidae). J. Econ. Entomol. 2001; 94: 1022-30.

Calderone NW. Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae) in the north eastern United States. *J Econ Entomol.* 2005 ; 98: 645-50.

Cantin JM. Le comptage des *Varroas* la méthode par lavage à l'alcool – site internet consulté le 14 octobre 2012 : <http://www.apiculture.com/rfa/artic...>

Cavalli JF. Caractérisation par CPG/SM et RMN du carbone-13 des huiles essentielles de Madagascar. Thèse de Doctorat. Université de Corse, Pascal Paoli ; 2002.

Chao W. An important player in brine shrimp lethality bioassay: The solvent. *J Adv Pharm Technol Res.* 2014; 5(1): 57–58.

Charabot E, Dupont J, Pillet L. Les huiles essentielles et leurs principaux constituants. Beranger, Paris ; 1899.

Charriere JD, Imdorf A. Méthodes de lutte alternative contre *Varroa*. *Rev Suisse Apicul.* 1998 ; 95: 187-91.

Charpentier G. Étude des effets létaux et sublétaux d'une intoxication au thymol sur le développement et l'immunité des larves d'*Apis mellifera* élevées *in vitro*. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse ; 2013.

Chauzat MP, Carpentier P, Madec F, Bougeard S, Congoule N, Drajnude P, et al. The role of infectious agents in parasites in the health of honey bee colonies in France. *J of Apicul Res and Bee World.* 2010; 49(1): 30-39.

Chen CN, Hsiao CJ, Guh JH, Chiang CC, Huang WJ. Chemical composition and anticancer effects of prenylated flavones from Taiwanese propolis. *Nat Prod Res.* 2011; 101: 204-9.

Chen S, Huang C, Chen Y, Yu J, Chen W, Chang S. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Biores Technol.* 2009; 100: 452-56.

Chevalier A. Etude&Dossier. Travaux français sur le genre *Eucalyptus*. *Rev Int de Bot Appl & d'Agric Tropicale.* 1952 ; 32 : 353-354

Chowdhury JU, Mobarok H, Bhuiyan NI, Nandi NC. Constituents of essential oils from leaves and seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. Cultivated in bangladesh. *Bangladesh J Bot.* 2009; 38(2): 181-83.

Christophersen C, Larsen C, Dimayuga RE. Traditional medicine- A potential resources in exploitation of natural product. The HC Orsted Institute. Copenhagen; 1991: 8-10.

Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyine T, Hermans N, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of EOs of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79, 213–20.

Clarkson C, Maharaj VJ, Crouch NR, Grace OM, Pillay P, Matsabisa MG, et al. In vitro antiplasmodial activity of medicinal plants native to or naturalized in South Africa. *J Ethnopharmacol.* 2004 ; 92 : 177-91.

Clement H. Le traité Rustica de l'apiculture ; 2011. www.rusticaeditions.fr.

Cock I. Assessment of the toxicity of selected Australian native plant extracts using the *Artemia franciscana* nauplii bioassay. *The Internet J of Toxicol.* 2007; 5(2).

Colin M.E. La varroase. *Rev Sci Off Int Epiz.* 1982; 1(4): 1174-89.

Colin M.E. Pouvoir pathogène de *Varroa jacobsoni* et conséquences pour la conduite du traitement de la varroatose de l'abeille. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 1989 ; 8(1): 221-26.

Colin M.E. Bases de traitement de la varroose. Polycopié de cours ; 2011.

Cooper R. Honey in wound care: antibacterial properties. *GMS Krankenhau-interdiszip.* 2007; 2(2): Docs 51.

Cornet JM, Daoudi A, Moshine EH, Fresnaye J. Etude biométrique de populations d'abeilles marocaines. *Apidol.* 1998 ; 19 : 355-66.

Damani N, Gende LB, Bailac P, Marcangelli JA, Eguaras M. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). *Parasitol Res.* 2009 ; 106(1): 145-52.

Daroui-Mokadem H, Kabouche A, Bouacha M, Soumati B, El Azzouny A, Bruneau C, et al. GC/MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil of fresh leaves of *Eucalyptus globulus* , and stems of *Smyrniium olusatrum* from Constantine (Algeria). *Nat Prod Commun.* 2010; 5(10): 1669-72.

Daroui-Mokadem H. Phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (*Myrtaceae*), *Smyrniium olusatrum* (*Apiaceae*), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (*Asterarceae*). Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar; Annaba, Algérie; 2010.

De Favaux M. Les acariens et les insectes parasites et prédateurs des abeilles *Apis mellifera* intermissa en Algérie. *Bull de Zool Agric INA.* 1984 ; 8 : 13-21.

Delfinado-Baker M and Houck MA. Geographic in *Varroa jacobsoni* (Acari: varroidae) : application of multivariate morphometric. *Apidol.* 1989; (20): 354-58.

Derwich E, Benziane Z, Boukir A. GC/MS analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Ad Nat Appl Sci.* 2009; 3: 305–13.

Develin S. Comparative analysis of sampling methods for varroa mite (*Varroa destructor*, Anderson et Trueman) in honey bees (*Apis mellifera*). MPM, Thesis. Simon Fraser Univ, Barnaby BC, Canada; 2001.

Devincenzi M, Silano M, Devincenzi A, Maialett I, Scazzocchio B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. *Fitoterapia*. 2002 ; 73(3): 269-75.

Donze G., Adaptation comportementales de l'acarien ectoparasite *Varroa jacobsoni* durant sa phase de reproduction dans les alvéoles operculées de l'abeille mellifère *Apis mellifera*. Thèse de Doctorat en sciences. Université de Neuchâtel ; 1995.

Donze G, Fluri P, Imdorf A. Un si petit espace, une si grande organisation : la reproduction de varroa dans le couvain operculé de l'abeille. *Rev Suisse de l'Apicul*. 1998 ; 12 : 11-18.

Dooms- Goossens A, Degreef H, Holvoet C, Maertens M. Turpentine - induced hypersensitivity to peppermint oil. *Contact Dermatitis*. 1977 ; 3 (6): 304-8.

Dupont G. Les abeilles malades de l'homme. Article *Le Monde*. 2007.

Edriss A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. *Phytotherapy Res*. 2007; 21(4): 308-23.

EDQM : Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé. Pharmacopée Européenne, 8ème Édition, Strasbourg ; 2013.

Eguaras MJ, Fuselli S, Gende L, Fritz R, Ruffinengo SR. An in vitro evaluation of *Tagetes minuta* essential oil for the control of the honey bee pathogens *paenibacillus* larvae and *Ascosphaera apis*, and the parasitic mite *Varroa destructor*. *J of Essent Oil Res*. 2005; 17(3): 336-40.

Elaissi A, Marzouki H, Medini H, Khouja M.L, Farhat F, Lynene F, et al. Variation in volatile leaf oils of 13 *Eucalyptus* species harvested from Souinet Arboreta (Tunisia). *Chem Biodivers*. 2010; 7: 909–21.

Elaissi A, Medini H, Simmonds M, Lynen F, Farhat F, Chemli R, et al. Variation in volatile leaf oils of seven *Eucalyptus* species Harvested from Zerniza Arboreta (Tunisia). *Chem Biodivers*. 2011; 8: 362–72.

Elaissi A, Rouis Z, Salem NAB, Mabrouk S, Salem YB, Salah KBH, et al. Chemical composition of 8 *Eucalyptus* species' EOs and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *Complement Altern Med.* 2012; 12: 81.

El Bridge K, Davidson J, Harwood C, Van Wyck G. *Eucalyptus* domestication and breeding. Clarendon Press. Oxford ; 1993.

Ellis JD and Zettlnalen CM. Varroa mite, *Varroa destructor* Anderson et Trueman (Arachnida : Acari : varroidae). EENY-473. 2010.

Erman WF. Chemistry of the monoterpènes in : P.G. Gassman (Ed) *Studies in Organic Chemistry*. Vol II A and B, Marcel Dekker, New York; 1985.

Faucon JP, Drajnudel P, Chauzat MP, Aubert M. Contrôle de l'efficacité du médicament Apivard ND contre *Varroa destructor* de l'abeille domestique. *Revue Med Vét.* 2007 ; 158(6) : 283-90.

Fernandez N et Coinneau Y. Maladies, parasites et d'autres ennemis de l'abeille domestique. Ed Atlantica; 2007.

Filomeno C.A, Barbosa LCA, Pereir JL, Pinheiro AL, Fidencio PH, Montanari RM. The chemical diversity of *Eucalyptus* spp. essential oils from plants grown in Brazil. *Chem. Biodiver.* 2016.

Finney D. Probit analysis, third ed. Cambridge University Press, Cambridge; 1971.

Fischetti FJ. Flavoring materials. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; 2010.

Foudil-Cherif Y. Etude comparative des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *camaldulensis*. Thèse de Magister. U.S.T.H.B, Alger ; 1991.

Franchomme et Penoel D. L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles, Roger Jallois éditeur. Limoges ; 1990.

Fratini F, Casella S, Leonardi M, Pisseri F, Ebani VV, Pistelli L, et al. Antibacterial activity of EOs, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia*. 2014; 96: 1–7.

Frey E, Schnell H, and Rosenkran P. Invasion of *Varroa destructor* mites into mite free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. *J of Apicul Res*. 2011; 50(2):138-44.

Gallai N, Salles JM, Vaissiere B E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econom*. 2009 ; 68: 810-21.

Garneau FX. Le matériel végétal et les huiles essentielles. Laseve-UQAC, Chicoutimi (Québec) ; 2004.

Garnero J. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Ed Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France ; 1991.

Garnier N et Dodinet E. Une offrande de ciste dans une tombe carthaginoise (VIe-Ve s. av. J.-C.). Une approche interdisciplinaire alliant archéo-ethnobotanique et chimie organique analytique. *Revue d'Archéométrie*. 2013.

Geetha S, Thavamany PJ, Chiew SP, Thong OM. Interference from ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *J. Adv. Pharmacol. Technol Res*. 2013; 4: 179-80.

Ghnaya AB, Hanana M, Amri I, Balti H, Gargouri S, Jamoussi B, et al. Chemical composition of *Eucalyptus erythrocorys* EOs and evaluation of their herbicidal and antifungal activities. *J. Pest Sci*. 2013 ; 86: 571–77.

Gende LB, Maggi M, Van Baren C, Dileolira A, Bandoni A, Fritz R, et al. Antimicrobial and miticide activities of Eucalyptus essential oils obtained from different Argentina regions. *Spanish J of Agric Res*. 2010; 8(3): 642-600.

Gerhard K, Przemeck H, Mattsson J, Christian S, Hardtke Z, Sung R, et al. Studies on the role of the Arabidopsis gene *monopteros* in vascular development and plant cell axialization . J of Physiol Plant. 1993; 11: 165-.

Ghaffar A, Yameen M, Kiran S, Kamal S, Jalal F, Munir R B, et al. Chemical Composition and *in-vitro* Evaluation of the Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils Extracted from Seven *Eucalyptus* Species. Molecules. 2015; 20: 20487–98.

Ghasemi V, Maharrami S, Tamasb G. Biological activity of some essential oils against *Varroa destructor* (Acari: varroidae) an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae). Exp Appl Acarol. 2011 ; 55(2): 147-54.

Ghomari FN, Kouache B, AROUS A, CHERCHALI S. Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles. Nat et Technol, Scie Agron et Biol. 2014 ; 10 : 34-38.

Giacomelli A, Pietropaoli M, Carvelli A, Lacoconi F, Formato G. Combination of thymol treatment (Apiguard[®]) and caging the queen technique to fight *Varroa destructor*. Apidol. 2016 ; 47(4) : 606-16.

Gildo P. Précis de phytothérapie, Larousse Encyclopédie, MEMO Edition Alpen ; 2006.

Giovenazzo P. Application d'une stratégie de lutte intégrée contre le parasite *Varroa destructor* dans les colonies mellifères du Québec. Thèse de Doctorat en sciences vétérinaires. Université de Montréal ; 2011.

Goetz P. Aromathérapie en pathologie digestive. Phytotherapy 2007; 5(1): 21-24

Golestani, MR, Rad M, Bassami M, Afkhami-Goli A. Analysis and evaluation of antibacterial effects of new herbal formulas, AP-001 and AP-002, against *Escherichia coli* O157:H7. Life Sci. 2015 ; 135: 22–26.

Goucem -Khelfane K. Etude de l'activité insecticide de quelques huiles essentielles et des poudres de quelques plantes à l'égard de la bruche du haricot *Acanthoceltes obtectus* Say

(Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) et des composés volatil de différentes de la plante hôte (*Phaseolus vulgaris* L). Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mameri, Tizi Ouzou, Algérie ; 2014.

Grissa K, Crnuet JM, Msadda K, Fresney J. Etude biométriques des populations d'abeilles Tunisiennes. *Apidol.* 1990 ; 21: 303-10.

Grobov OF. La varroase de l'abeille mellifera. *Apiacta.* 1976 ; 11: 145-48.

Grupta MP, Monge A, Karistas G, Lopez de Cerain A, Solis PN, Leon E. Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity and DNA interactio. *Int J Pharmacol.* 1996; 34 : 123-27.

Gunatilaka AL. Natural Products in Plants, Chemical Diversity. Southwest Center for Natural Products Research, University of Arizona, Tucson, Arizona; 2008.

Guzman-Novoa E, Eccles L, Calveta Y, Mc Gowan J, Kelly PG, Correa -Benitez A. *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada. *Apidol.* 2010 ; 41:443–50.

Habbi-Cherifi A. Etude de la dynamique du parasite *Varroa destructor* de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) et évaluation de l'efficacité de quelques huiles essentielles dans la lutte contre ce parasite. Mémoire de Magister en Sciences Biologiques. Université Mouloud Mameri, Tizi Ouzou, Algérie ; 2014.

Hamburger M and Hostettman K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry.* 1991; 30: 3864-74.

Hamdi SH, Hedjal-Chebheb M, Kellouche A, Khouja ML, Boudabous A, Jemaa JMB. Management of three pests' population strains from Tunisia and Algeria using *Eucalyptus* essential oils. *Ind Crop and Prod.* 2015; 74: 551–56.

Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usmay LA. Essential oils: its medicinal and pharmacological uses. *Int J of Current Res.* 2011; 3: 86-98.

Harkat-Madouri L, Boudria A, Khodir M, Bey-Ould Z, Si Saida K, Rigouc PD, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Ind Crops and Prod.* 2015; 78: 148-53

Harwig J and Scott P. Brine shrimp (*Artemia salina*. L) larvae as a -screening system for fungul toxinx. *Appl Microbiol.* 1971; 21: 1011-16.

Health H.B. Source Book of Flavors. Springer, XXVI; 1981.

Hegazi AG and Abd El-Hady FK. Influence of honey on the suppression of human low density lipoprotein (LDL) peroxidation (in vitro) Evid Based BMC. *Complement Altern Med.* 2009; 6: 113–21.

Heinrich G, Schultze W, Pfab I, Bottger M. The site of essential oil biosynthesis in *Poncirus trifoliolate* and *Monarda fistulosa*. *Physiol Veg.* 1983; 21: 257-68

Henry M, Beguin M, Requier F, Rollin O, Odonx JF, Aupinel P, et al. A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science.* 2012; 336: 348-50.

Hubert R. Epices et aromates. Tec et Doc, Lavoisier, APRIA., Paris ; 1992.

Hurtel JM. Noix de muscade, *Myristica fragrans*, fiche médicale sur cette épice aphrodisiaque et son huile essentielle antiseptique, phytomania : phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles. *Phytomania com.* 2006.

Iftandis MD. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite into honey bee (*Apis mellifera*) broad cells. *Apidol.* 1988; 19: 387-96.

Ilbert H, Hoxha V, Sahi L, Courivaud A, Chailan C. Le marché des plantes aromatiques et médicinales : analyse des tendances du marché mondial et des stratégies économiques en

Albanie et en Algérie. Options méditerranéennes, n°73, série B : Etudes et Recherches, France Agri Mer ; 2016.

Imad HH, Israa AI, Hawraa JK. 2015. Gas chromatography mass spectrum and fourier transform infrared spectroscopy analysis of methanolic extract of *Rosmarinus officinalis* leaves. J. of Pharmacogn and Phytotherapy. 2015; 7(6): 90-106.

Indorf A, Charriere JD, Bachoffen B. Efficacy checking of the *Varroa jacobsoni* control methods by means of oxalic acid. Apisacta XXXII. 1997; 89-91.

Indorf A., Bogdanov S., Rubeniba A., Calderone N.W. Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. In honey bee colonies. Apidol. 1999; 30: 209-28.

Indorf A, Charriere JD, Bogdanov S, Bogdanov S. Stratégie de lutte alternative contre *Varroa destructor* en Europe centrale. Apisacta. 2003 ; (38) : 258-85.

Inouye S, Abe S, Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. Phytotherapy. 2007; 5 : 2-4.

INRF. La forêt Algérienne, édité par l'Institut National de la Recherche Forestière, Bainem, Alger ; 1996.

Iqbal M. International Trade in Non-Wood Forest Products: An Overview, Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1993.

Ismane M.B. Leads and prospects for the development of a new botanical insecticides, in R.M.Roc and R. J Kuhr (eds). Rev in Pest Toxicol. 1995; 3: 1-20.

James RR and Xu J. Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. J Invertebr Pathol. 2012; 109: 175-82.

Jaki B, Oojala J, Burjih R, Sticher O. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharm Biol.* 2000; 37: 138-43.

Jemaa JMB, Haouel S, Khouja ML. Efficacy of *Eucalyptus* EOs fumigant control against *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) under various space occupation conditions. *J. Stored Prod. Res.* 2013; 53: 67-71.

Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Annals of Neurology.* 2003; 53(3): 523-38.

Johnson, R. Recent Honey Bee Colony Declines, rapport présenté le 26 mars 2007 au congrès américain par le MAAREC ; 2007.

Karemu CK, Ndung'u MW, Githua M. Repellent effects of EOs from selected *Eucalyptus* species and their major constituents against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Int J Trop Insect Sci.* 2013 ; 33: 188-94.

Kempf M, Eveillard M, Kowalczyk F, Rossines E, Panhelleux G, Jolyullon ML. Etude de la sensibilité de 224 bactéries isolées d'infections hospitalières vis-à-vis des composés JCA 250 et JCA 251 à base d'huiles essentielles issus de la recherche Aroma Technologie. *Pathol Biol.* 2011 ; 59(1) : 39-43.

Kesbi A. Etude des propriétés physico chimiques et évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* dans la région de OUARGLA. Mémoire de fin d'étude. Université Kasdi Merbah , Ouargla, Algérie ; 2011.

Kevan PG, Clark EA, Thomas VG. Insect pollinators and sustainable agriculture. *Am J Alter Agric.* 1990; 5(1): 13-22.

Kim NS et Lee DS. Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2002; 982(1): 31-47.

Koç AN, Silici SKF, Hormet OHT, Manus-Buldu H, Ercal BD. Antifungal activity of the honey bee products against *Candida* ssp. And *Trichosporon* ssp. Med Food. 2011; 14(1-2): 128-34.

Koul O, Walia S, Dhaliwal G. Essential oils as pesticides: potential and constraints. Biopest Int. 2008; 4(1): 63-84.

Koumad S, Study of the population dynamic of *Varroa destructor* in Algeria. Best JHAMC. 2015 ; 1(2): 69-76.

Koziol N. Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora* :qualité, efficacité et toxicité. Thèse pour obtenir le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine, France; 2015.

Krupke CH, Hunt GJ, Eitzer D, Andino G, Given K. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. Plos One. 2012 ; 7(1).

Labeste L. Protocole de traitement aux huiles essentielles – activité acaricide sur le *Varroa*. Apiservices -La Galerie Virtuelle Apicole; 2013.

Lahlou M. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. Phytotherapy Res. 2004 ; 18 : 435-48.

Lamarti A, Badoc A, Deffreux ., Carde JP. Biogenèse des monoterpènes II- La chaîne isoprénique. Bull Soc Pharm Bordeaux. 1994 ; 133 : 79-99.

Laurent J C et Santa L. Etude du développement larvaire de *Varroa jacobsoni* Oudemans. Apidol. 1987 ; 18(2) : 53-60.

Le Conte Y et Faucon J. P. Les maladies de l'abeille domestique. Le Courrier de la Nature. 2002 ; 186 : 28-32.

Leguene S. Réhabilitation de l'arboretum de Draa Naga (Constantine). Mémoire de fin d'étude, Master 2, Université Constantine 1, Algérie ; 2014.

Le Hir A, Chaumeil J-C, Brossard D. Pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments Editeur : Elsevier Masson ; 2009.

Le Hir A, Chaumeil J-C, Brossard D. Pharmacie galénique , Bonnes pratiques de fabrication des médicaments Editeur : Elsevier Masson (10ème édition) ; 2016.

Luis, A, Duarte A, Gominho J, Domingues F, Duarte AP. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. Ind Crops Prod. 2016; 79: 274-82.

Loucif-Ayad W, Achou M, Legout H, Alburaki M, Garnery L, Genetic assessment of Algerian honey bee populations by microsatellite markers. Apidol. 2014.

Loomis D et Croteau R. Biochemistry of Terpenoids: A Comprehensive Treatise. In: P. K. Stumpf and E. E. Conn (eds) .The Biochemistry of Plants. Lipids: Structure and Function. 1980; 4: 364-10.

Lucchesie M E. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université de La Réunion ; 2005.

Lucia A, Licastro S, Zerba E, Gonzalaz AP, Masuh H. Sensitivity of *Aedes aegypti* adults (Diptera: Culicidae) to the vapors of *Eucalyptus* EOs. Bioresour Technol. 2009 ;100, 6083-87.

Luciardi MC, Pérez Hernandez MV, Muruaga N, Bardon A, Arena ME, Cartagena M. Volatiles from Subtropical Convolvulaceae That Interfere with Bacterial Cell-to-Cell Communication as Potential Antipathogenic Drugs. Evid Based Complement Alternat Med.2016.

Macedo ITF, Bevilaqua CML, Oliveira LMB, Camurça-Vasconcelos ALF, Vieira LS, Oliveira FR, et al. Ovicidal and larvicidal activity in vitro of *Eucalyptus globulus* EOs on *Haemonchus contortus*. Rev Bras Parasitol Vet. 2009; 18: 62–66.

Mac Laughlin JL, Chang CJ, Smith DL. “Bench-top” bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: Rahman A, ed, Nat Prod Chem. 1991; 9: 383-409.

Mac Laughlin JL, Lingling L, Rogers LL, Anderson JE. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. Sage Journals. 1998; 32(2): 531-24.

Maciel MV, Morais SM, Bevilaqua CML, Silva RA, Barros RS, Sousa RN, et al. Chemical composition of *Eucalyptus* ssp. Essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia congipalpis*. Vet Parasitol. 2010; 167: 1-7.

Maggi M, Gendel L, Russo K, Fritz R, Eguarras MJ. Bioactivity of *Romarinus officinalis* essential oils against *Apis mellifera*, *Varroa destructor* and *Paenibacillus* larvae related to the drying treatment of the plant material. Nat Prod Res. 2010; 25(4): 397-406.

Maggi M, Ruffinengo S, Gendel L, Eguarras MJ. Laboratory evaluation of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et Perry, essential oils against *Varroa destructor*. J of Essent Oil Res. 2011; 22(2): 119-22.

Mahmoud R, Asad S, Raja S, Ul Moshina , Wagchoure ES, Sarwar G, et al. Control of *Varroa destructor* (Acari: varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: apidae) by using plant oils extract. Pakistan J Zool. 2014; 46(3): 609-15.

Mamoun S M AEK, Mohamed Abd El Fattah R, Ezzat Taha M S, Elsherbiny E A, El-Khateeb AY. Application of GC/EIMS in Combination with Semi-Empirical Calculations for Identification and Investigation of Some Volatile Components in Basil Essential Oil. Int J of Mass Spectro and Chromato. 2016; 4: 14-25.

Mann J. Secondary Metabolism. Clarendon Press, 2 édition., J. Mann : Secondary Metabolism. Clarendon Press; 1987.

Martin SJ. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud in worker brood of the honey bee *Apis mellifera* L. under natural conditions. *Exp Appl Acarol.* 1994; 18: 87-100.

Martin SJ, Hughfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, et al. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. *Science.* 2012; 336(6086): 1304-06.

Martinez-Evaristo XC, Barboa Flores J, Wong corral FJ, Cabral Torres FA. Insecticidal Efficacy and Repellency of Oregano (*Lippia palmeri*) Essential Oil for Control of *Sitophilus zeamais* and *Prostephanus truncatus* in Stored Maize. *Southwestern Entomologist.* 2015 ; 40(4):713-20.

Martinez M, Delramo J, Torreblanca A, Diaz-Mayaux J. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia partenogenetica*. *Aquaculture.* 1998 ; 172: 315-25.

Martini MC et Seiller M. Edition Tec et Doc. Editions médicales internationales, Paris, Lavoisier ; 1999.

Marzoug HNB, Bouajila J, Ennajjar M, Lebrihi A, Mathieu F, Couderc F, et al. *Eucalyptus* (*gracilis*, *oleosa*, *salubris*, and *salmonophloia*) EOs: Their chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities. *J. Med. Food.* 2010, 13: 1005-12.

May J, Chan CH, King A, Williams L, French GL. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J of Antimicrobial Chemother.* 2000; 45(5): 639-43.

Marzoukia H, EL Aissib A, Khaldic A, Bouzidd S, Falconieri D, Marongiu B, at al. Pirasa A. Seasonal and geographical variation of *Laurus nobilis* L. essential oil from Tunisia. *The Open Nat Prod J.* 2009; 2: 86-91.

Mehani M et Segni L. Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus camaldulensis* sur certaines bactéries pathogènes. *Annales Sci et Technol.* 2014 ; 6(1).

Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S. In Vitro Antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. Int J Microbiol. 2016 : 1–8.

Metro A. Les *Eucalyptus* dans le monde méditerranéen. Ed : Masson et Cie, Paris ; 1970.

Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, Mac Laughlin JI. Brine shrimp : A convenient general bioassay for active plant constituents. Plant Med. 1982 ; 45: 31-34.

Meziane H. L'*Eucalyptus* en Algérie: un arbre controversé. Rev La forêt Algérienne. 1996 ; 1 : 5-10.

Michael AS, Tompson CG, Abramovitz M. *Artemia salina* as a test organism for a bioassay. Science. 1956 : 123-464.

Millet F. 2010. Les Formes Galéniques et les Huiles Essentielles. Phytotherapy. 2010; 8 : 33-36.

Miresmailli S, Bradbury R, Isman MB. Comparative toxicity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and blends of its major constituents against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: tetranychidae). Pest manag Sci. 2006; 62(4): 336-71.

Mohammed A, Penghui L, Guangbiao S, Daofu C, Xiaochun W, Jian Z. Transcriptome and metabolite analyses reveal the complex metabolic genes involved in volatile terpenoid biosynthesis in garden sage (*Salvia officinalis*). Scientific Reports. 2017 ; 7(16074).

Mohammedi Z. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd. Tlemcen ; 2006.

Monzote FL, Alarcon O, Setzer WN. Activity of Cuban propolis extracts on *Beishmania amazonensis* and *Trichomonas vaginalis*. Nat Prod Commun. 2011; 6(7): 973-76.

Moritz F and Jordan N. Selection of resistance against *Varroa jacobsoni*. Appl Acrol. 1992 ; 16: 345-53.

Moritz F, De Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Newman P, Paxton RJ. Research strategies to improve honey bee health in Europe. Apidol. 2010; 41 : 227-42.

Morrow PA and Fox LR. Effects of variation in *Eucalyptus* essential oil yield on insect growth and grazing damage . Oecologia. 1980; 45: 209-19.

Moshi MJ, Innocent E, Magadula JJ, Otieno DF, Weisheit A, Mbabazi PK, et al. Brine shrimp toxicity of some plants used as traditional medicines in Kagera Region, north western Tanzania. Tanz J H Res. 2010, 12, 63-67.

Mousseux M. Test de toxicité sur les larves d'*Artemia salina*, entretien d'un élevage de Baleines. Deust Aquaculture, Rapport de stage. Université Française du Pacifique. Centre Universitaire de Nouvelle Calédonie, 1995.

Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. 2011. Antibacterial activity of EOs from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Pharm Biol. 2011 ; 49: 893–99.

Nait Achour K. Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces d'*Eucalyptus* poussant dans la région de Tizi Ouzou. Mémoire de Magister ; 2012.

Najeh SM, Hussein MH, Khodairy MM, Awad MA. 2011. Occurrence of *Varroa* mites inside honeybee colonies and control it using volatile oils. Res J of Agric and Biol Sci. 2011; 7(1): 89-97.

Namiki M. Antioxidants/Antimutagens in food. Crit Rev in Food Sci Nut. 1990; 24(4): 273-300.

Nedji N. Effets des acaricides sur l'abeille domestique *Apis mellifera* intermissa et analyse antimicrobienne de la propolis et du miel. Doctorat 3^{em} cycle en biologie animale et environnementale. Université Badji Mokhtar. Annaba, Algérie ; 2015.

NF ISO 280 (mars 1999) : Huiles essentielles – Détermination de l'indice de réfraction. Essential oils. Determination of refractive index. (Indice de classement : T75-112)

NF ISO 1242 (décembre 1999) : Huiles essentielles – Détermination de l'indice d'acide. Essential oils – Determination of acid value. (Indice de classement : T75-103).

NF T 75-006 – 5 février 1998 : Matières premières aromatiques d'origine naturelle – Vocabulaire. Aromatic natural raw materials. Vocabulary. (Indice de classement : T75-006).

Nicolle D. An illustrated guide to Australian's gum blossoms. Australian Geographic ; 2010.

Olayinka AJ, Olawumi OO, Olalekan AM, Abimbola AS, Idiat ID, Theophilus OA. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north-central Nigeria. J Nat Prod Plant Resour. 2012; 2(1): 1-8.

Oldroyd BP. 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni* a new parasite of western honey bees. Trend Ecol Evol. 1999; 14: 312-15.

Olle M and Bender I, 2010. The content of oils in Umbelliferous crops and its formation. Agron Res. 2010 ; 8 (3) : 687-96.

OMS. Règlements des médicaments à base de plantes: la situation dans le monde. Organisation Mondiale de la Santé ; 1998.

Orsatti CL and Sforcin JM. Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice. Nat Prod Res. 2011; 1: 1-8.

Orsi RO, Farnedes A, Bankova V, Sforcin JM. The effects of Brazilian and Bulgarian propolis in vitro against *Salmonella tphi* and their synergism with antibiotics acting on the ribosome. *Nat Prod Res.* 2011; 1: 1-8.

Oudemans AC. On a new genus and species of parasitic Acari: Note from Leyden Museum. 1904; 24: 216-22.

Pant M, Dubey S, Patanjali PK, Naik SN, Sharma S. Insecticidal activity of *Eucalyptus* oil nanoemulsion with karanja and jatropa aqueous filtrates. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2014; 91: 119-27.

Parra LA, Yhebra RS, Sardinas IG, Buela LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomed.* 2001; 8, 395-400.

Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. *Nosema aranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidol.* 2007; 38: 558-65.

Pelka M., Danzl C., Distler W., Petschett A. A new screening test toxicity testing of dental materials. *J Dent.* 2000; 28: 341-345.

Pessolato AG, Martins DD, Ambrosio CD, Mançanares CA, De Carvalho AF. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. *Burns.* 2011; 37(7): 1192-1201.

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Goncalves MJ, Costa De-Oliveira S, Cavaleiro C, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida Aspergillus* and dermatophyte species. *J of Med Microbiol.* 2006; 55:1367-73.

Pinto FA, Souza GK, Serrao JE. Parasitic of *Varroa destructor* (Acari : varroidae) on *hypopharyngeal glanda* of Africanized *Apis mellifera* (Hymnoptera: apidae). *Sociobiol.* 2011; 59: 769-78.

Pissuthanan S, Plianbangchang P, Pissuthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. Brine shrimp lethality activity of Thai medicinal plants in the family Meliaceae. Naresuan Uni J. 2004 ; 12 : 13-18.

Prost JP. Apiculture: connaître l'abeille – conduire le rucher. 6^{ème} édition, Edition Baillière ; 1990.

Quazi Saheli S, Chandhury F, Musbahuddin AM. Brine Shrimp Lethality Assay. Bangladesh J Pharmacol. 2017; 12: 186-89.

Quezel P et Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Edition du centre nationale de la recherche scientifique. 1962 ; 2 : 1170.

Rader R, Howlett BG, Cuningham SA, Westcott DA, Newstrom-Lloyd LE, Walker MK, et al. Alternative pollinator taxa are equally efficient but not as the honey bee in mass-flowering crop. J of Appl Ecolo. 2009; 46: 1080-87.

Ramzani H, Singh HP, Batish DB, Kohli RK. Antifungal activity of volatile oil of *Eucalyptus citriodora* . Fitoterapia. Elsevier; 2002.

Randhawa MA and Al Ghamdi MS. Anticancer activity of *Nigetta sativa* (Black seed)- A review. The American J of Chinese Med. 2011; 39(36): 1075-91.

Ravazzi G. Abeilles et apiculture. Ed De Vecchi ; 1996.

Razafindrazaka AD. Les insectes associés aux ruchers : Etude bioécologique des abeilles. Inventaire, impacts et moyens de contrôle des bio agresseurs. Travail à l'Université d'Antsiranana, Madagascar ; 2011.

Recrosio P. 2010. Le miel et ses bienfaits médicaux. Res. 2010; 15: 23-28.

Refaei GS. Evaluation of some natural substances against *Varroa destructor* infesting honey bee, *Apis mellifera* in Egypt. Egypt J agric. Res. 2011; 89(1).

Rezaie A, Parker RD, Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? *Dig Di Sci.* 2007; 52(9): 2015-21.

Ribeiro JC, Ribeiro WLC, CAMURC A, Vasconcelosa AL, Macedoa ITF, Santos JML, et al. 2014. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. *Vet Parasitol.* 2014 ; 204 : 243-48.

Riondet J. L'Apiculture mois par mois ; 2010

Roh HS, Lee BH, Park CG. Acaricidal and repellent effects of myrtacean EOs and their major constituents against *Tetranychus urticae* (Tetranychidae). *J Asia Pac Entomol.* 2013 ;16 :245-49.

Robard I. Plantes Médicinales d'Outre - Mer et Pharmacopées: Aspects Juridiques, Economiques et Culturels. *Phytothérapie.* 2004 ; 2: 16 - 21.

Robaux P. Varroa et Varroatose. Edition Oppida ; 1986.

Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *View issue Toc.* 2009; 182(2): 314-30.

Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann I. Biology and control of *Varroa destructor*. *J of Invert Pathol.* 2010; 103: 96-119.

Ruberto G and Baratta MT. Antioxydant activity of selected essential oil component in two lipid model systems. *Food Chem.* 1993; 69(8): 167-74.

Ruffinengo S., Eguaras M., Bailac P., Torres J., Basualdo M., Pouzi M., 2001. Essential oils in the control of *Varroa destructor* and evaluation in laboratory conditions. *Proc 37th Int Apicul Congr Durban.* South Africa.

Russo S, Cabrera N, Chludil H, Yaber-Grass M, Leicah S. Insecticidal activity of young and mature leaves essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chi J Agric Res.* 2015; 75: 375–79.

Samataro D, Needham G, Degrand –Hoffman G, Warotell G. The effects of some volatile plant oils on *Varroa* mites (Acari: varroidae) in honey bee colonies (Hymenoptera: apidae). Department of Entomology, University Park; 1998.

Samate Abdoul D. Composition chimique d’huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soudanienne du Burkina Faso : Valorisation. thèse de Doctorat, Univ.de Ouagadougou, Burkina Faso ; 2001.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetson N, Morillon A, Weise C, et al. Methylation of histone H3K4 mediates association of the ISW 1P ATTP ase with chromatin. *Mol Cell.* 2003; 12(5): 1325-32.

Sartorelli P, Marquioreto AA, Baroli MEL, Liwa PRH, Moreno. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from species of *Eucalyptus (robusta – saligna)*. *Phytotherapy.* 2007; 21 (3): 231-33.

Schneider P and Dreischer W. Einfluss der parasitierung durch die milbe hypopharynxdrussen und die lebens-dauer von *Apis mellifera*. *Apidol;* 18(1):101-10.

Sebei K, Sakouhi F, Herchi W, Khouja ML, Boukhchina S. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species EOs leaves. *Biol. Res.* 2015: 48: 7.

Sen-Sung Ch, Chin-Gi H, Ying-J Ch, Jane-Jane Y, Wei-June, Ch, Shang-Tzen Ch. Chemical compositions and larvicidal activities of leaf essential oils from two *Eucalyptus* species. *Biores.Technol.* 2009; 100: 452–56.

Shahi C, Leitch M, Laforest S. Marketing Intelligence System for Small-Scale Essential Oils Industry of North-Western Ontario’, IUFRO 3.08 Small Scale Forestry Symposium Proceedings, pp. 227 – 236, Morgantown, West Virginia; 2009.

Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Agric Food Chem.* 2005; 53(20): 7749-59.

Sharma N, Gupta PC, Singh A, Rao CV. Brine shrimp Bioassay of *Pentapetes phoenicea* Linn. and *Ipomoea carnea* Jacq. leaves. *Der Pharm Lett.* 2013; 5: 162-67.

Shengping PJYQQ and Lihua LCW. Study of the niche transition of lesser Asian mite (*Tropilaelaps clareae*) in honey bee colony just after infection desynchronisation of larger varroa mite (*Varroa destructor*). *Apiculture of China.* 2011.

Shutler D, Head K, Burger-Mac Lellan M, Clwell A, Levitt N, Ostigui GR. Honey bee *Apis mellifera* parasites in the absence of *Nosema ceranae* Fungi and *Varroa destructor*. *J Plos Org.* 2014 ; 10 : 1371.

Simoneau A. Virus chez les abeilles in l'Abeille Fédération des Apiculteurs du Québec. 2001 ; 22 (2).

Simoneau A. MAQAP-CQIASA, Laboratoire de Pathologie Animale. L'assemblage; 2004.

Sleet RB and Brendel L K. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia naupilii* for use in developmental toxicology. *Ecotoxicol Env Safety.* 1983 ; 7: 435-46.

Smadja J. (2009). Les Huiles Essentielles Colloque GP3A – Tananarive.

Smallfield B. Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Res.* 2001; 45: 4.

Smith CK, Moore CA, Alahi EN, Smart, ÂT, Hotchkiss SA. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 168: 189-99.

Sosa B, Bornancin A, Tubaro A, Loggia RD. Topical anti-inflammatory activity of an innovative aqueous formulation of actichelated propolis us two commercial propolis formulations. *Phytotherapy Res.* 2007; 21: 823-26.

Spurgeon SL and Porter JW. Biosynthesis of carotenoids. In: Porter JW, Spurgeon SL, eds. *Biosynthesis of isoprenoid compounds*, vol2. New York: John Wiley & Sons; 1981.

Steflitsch W and Steflitsch M. Clinical aromatherapy. *Journal of Men's Health.* 2008; 5(1): 2-4.

Straub P. Faune et Flore. L'abeille sentinelle écologique in *Science Direct Com.* 2007.

Taleb-Toudert K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptear : Bruchidae). Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mameri, Tizi Ouzou, Algérie ; 2015.

Tardieu V. L'étrange silence des abeilles, Edition Belin ; 2009.

Tobler M and Schneider E. Standardisation of herbal medecines - the natural way, illustrated by the example of fresh plant preparations. *Zeitschrift für Phytotherapy.* 2001; 22: 1-12.

Togola A, Silvie P, Seck PA, Menozzi P, Nwilene FE, Glitho IA, et al. Efficacité des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de *Cymbopogon citratus* dans la protection du riz stocké contre IOBC/WPRS. *Bulletin.* 2014; 98: 203-11.

Toloza AC, Lucia A, Zerba E, Masuh H, Picollo MI. *Eucalyptus* essential oil toxicity against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitol Res.* 2010 ; 106 : 409– 14.

Tomczak C. Utilisation du miel dans le traitement des plaies. Thèse de doctorat vétérinaire. Université Claude Bernard, Lyon. France. Winter colony losses in Poland. *J of Apicul Res.* 2010 ; 49: 126-28.

UNAF: l'Union Nationale de l'Apiculture Française

Ünlü M, Daferara D, Dönm E, Polissiou M, Tepe B, Sökmen A. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia*. *J of Ethnopharmacol.* 2002 ; 83, 117–21.

Vandame R. Importance de l'hybridation de l'hôte dans la tolérance à un parasite. Cas de l'acarien *Varroa jacobsoni* chez les races d'abeilles *Apis mellifera* Européennes et Africanisées en climat tropical humide du Mexique. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard, Lyon 1 ; 1996.

Van Engelsdorp D, Cox Foster D, Frazier M, Ostiguy N, Hayes J. Fall Dwindle Disease: Investigations into the Causes of Sudden and Alarming Colony Losses Experienced by Beekeepers in the Fall of 2006.

Van Engelsdorp D, Saegerman EG, Mullin C, Hanbruge C, Neguyai E, Frasier BK, et al. Colony collapse disorder: descriptive study. *Plos One.* 2009; 4: 64-81.

Van Engelsdorp D and Mexner MD. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may be affect them. *Invertebr Pathol.* 2010; 103: 80-95.

Van Haecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short term toxicity test with *Artemia naupilii*. *Ecotoxicol Env Safety.* 1981; 5: 382-87.

Vassart S. Les huiles Essentielles .Ed. I.P.I, Besancon ; 2009.

Villagrand J et Kapik B. Etude préliminaire sur l'évolution de *Phoracantha semipunctata* Fab : ravageur des forêts Algériennes. C.N.R.E.F ; 1981

Vratnica BD, Đakov T, Šukovic D, Damjanovic J. Antimicrobial Effect of Essential Oil Isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. Czech J Food Sci. 2011; 29: 277–84.

Wang Z, Li L, Ding TI, Zhou X, Wang L, Zhang H, et al. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. J chromat. 2006; 1102 (1-2): 11-17.

Wanyoike GN, Chlabra SC, Langat-Thoruwa CC, Omar SA. Brine shrimp toxicity and antispasmodial activity of five Kenyan medicinal plants. J Ethnopharmacol. 2004 ; 90: 129-33.

Wendeling SLP. *Varroa destructor* (Anderson et Trueman, 2000), Un acarien ectoparasite de l'abeille domestique *Apis mellifera* LINNAEUS, 1758. Revue bibliographique et contribution à l'étude de sa reproduction. Thèse pour le Doctorat vétérinaire. Faculté de Créteil, 2012.

Wilkinson D and Smith GC. A model of the mite parasite *Varroa destructor* on honey bees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite populations growth . Ecol Model. 2002; 148: 263-75.

Whitahorn PR, O'Connor S, Wackers FL, Goulson D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. Science. 2012; 336: 351-52.

Xin Chao L, Qi Zhi L, Wang Peng S, Zhi Long L. Evaluation of activity of the essential oil of *Eucalyptus robusta* Smith leaves and its constituents compound against over *Wintering cocopsyllachinensis* (Yang et Li) (Hemipta: psyllidae). J of Enthomol and Zool Stud. 2014; 2(4): 27-31.

Yang, Y, Choi, H, Choi, W, Clark, JM, Ahn Y. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). J Agric Food Chem. 2004; 52 : 2507–11.

Yones DA, Bakir HY, Bayoumi SAL. 2016. Chemical composition and efficacy of some selected plant oils against *Pediculus humanus capitis* in vitro. Parasitol Res. 2016 ; 115: 3209-18.

Zeraia L. Protection de la flore: liste et localisation des espèces rares, très rares et rarissimes d'Algérie. Document Interne, INRF ; 1983.

ANNEXES

Annexe 1 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par (l'HE Er + thymol)

Numéro Ruche	01 au 30/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	101	108	107	94	102	116	153	117	96
R2	87	73	97	97	70	90	73	85	83
R3	79	106	138	96	105	108	107	101	91

Annexe 2 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par l'HE Er

Numéro Ruche	01 au 30/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	27	27	19	42	25	35	45	37	49
R2	10	35	6	51	49	6	35	32	0
R3	60	47	31	19	18	48	13	8	15

Annexe 3 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par le thymol

Numéro ruche	01 au 03/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	32	28	31	30	52	27	28	34	12
R2	24	35	25	32	29	31	25	34	42
R3	44	45	46	46	35	39	42	45	35

Annexe 4 :

Nombre de *Varroas* morts dans le lot contrôle de la chute naturelle

Numéro ruche	01 au 03/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	1	2	3	6	3	3	12	8	9
R2	2	3	4	7	5	10	10	7	15
R3	3	1	8	0	12	6	13	10	9

Annexe 5 :

Nombre de *Varroas* morts pour Er dans les différents lots de traitement exprimé en moyenne \pm écart type

Traitements	Moyenne \pm écart type
HE Er + thymol	99,26 \pm 3,83
Thymol	34,37 \pm 6,51
HE Er	29,22 \pm 1,82
Contrôle	6,37 \pm 1,011

Annexe 6 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par (l'HE Es + thymol)

Numéro Ruche	01 au 03/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	49	27	35	39	102	48	104	67	53
R2	41	57	54	48	145	74	150	90	50
R3	55	81	100	54	146	57	121	59	43

Annexe7 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par l'HE Es

Numéro Ruche	01 au 30/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	28	12	10	34	5	10	25	19	20
R2	18	12	12	19	12	3	15	22	27
R3	17	8	6	14	20	12	18	16	11

Annexe 8 :

Nombre de *Varroas* morts pour Es dans les différents lots de traitement exprimé en moyenne \pm écart type

Traitements	Moyenne \pm écart type
<i>E. sideroxylon</i> + thymol	72,19 \pm 6,94
Thymol	34,37 \pm 6,51
<i>E.sideroxylon</i>	15,74 \pm 2,28
Contrôle	6,37 \pm 1,011

Annexe 9 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par l'HE Eg + thymol

Numéro Ruche	01 au 30/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	42	36	46	48	42	57	100	120	82
R2	42	47	53	58	59	50	70	50	30
R3	56	62	50	141	50	46	40	35	36

Annexe 10 :

Nombre de *Varroas* morts durant le traitement des ruches par l'HE Eg

Numéro Ruche	01 au 30/11	03 au 05/11	05 au 07/11	07 au 10/11	10 au 12/11	12 au 14/11	14 au 17/11	17 au 19/11	19 au 21/11
R1	23	14	18	20	14	23	23	18	12
R2	17	17	16	17	14	17	15	15	12
R3	12	5	5	15	11	13	17	20	18

Annexe 11 :

Nombre de *Varroas* morts pour Eg dans les différents lots de traitement exprimé en moyenne \pm écart type

Traitements	Moyenne \pm écart type
<i>E. globulus</i> + thymol	57,33 \pm 6,33
Thymol	34,37 \pm 6,51
<i>E. globulus</i>	15,56 \pm 2,71
Contrôle	6,37 \pm 1,011

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد التركيب الكيميائي السمية و التأثير القاتل للاوكالبتوس روبوستا سيديروكسيلون و غلوبولوس المزروعة في الجزائر .

تم استخدام اختبار الروبيان المميت و خلايا النحل المصابة بفاروا ديستروكتور لتقييم السمية و التأثير القاتل للزيوت الأساسية. أعطى التقطير البخاري لاوراق النباتات روبوستا سيديروكسيلون و غلوبولوس المرذودات التالية على الترتيب : 0.83% 1.09% 0.93%
كشفت تحليل الكروماتوغرافيا الغازية و طيف الحننه عن فصل 13 مركبا من روبوستا و 36 مركبا من سيديروكسيلون و 39 مركبا لغلوبولوس . المكونات الأساسية لروبوستا و سيديروكسيلون و غلوبولوس كانت على الترتيب :

[1,8-cinéole (65,97%), p-cymène (7,83%) et o-cymène (4,75%)]

[1,8-cinéole (20,57 %), octane (4,83%) et p-cymène (1,35%)]

[1,8-cinéole (78,45%), o-cymène (2,18%) et isopinocarvéole (1,74%)]

اختبار الروبيان المميت للزيوت الأساسية لروبوستا و سيديروكسيلون و غلوبولوس أعطى قيمة عالية السمية كانت على الترتيب : 67,55 - 34,80 -9,42 CL50 (µg/ ml)

أكدت الاختبارات الميدانية على خلايا النحل المصابة بفيروس فاروا فعالية الزيوت الأساسية لهذه النباتات و التيمول كعوامل قاتلة لفاروا. بالإضافة الى ذلك استخدام المزيج زيت اساسي + تيمول كان الاكثر فعالية من الزيت الاساسي للاوكالبتوس وحده او التيمول وحده . اخيرا قد يكن استخدام التركيب الزيت الاساسي للاوكالبتوس + تيمول بديلا صالحا للمعالجة التجارية القائمة على التيمول.

الكلمات المفتاحية : الزيت الأساسي للأوراق, السمية, التركيب الكيميائي , *Eucalyptus ssp - V. destructor*

Abstract

The study was aimed to determine the chemical composition, toxicity effect and field varroacidal efficacy of essential oil from leaf of *Eucalyptus robusta* (Er), *Eucalyptus sideroxylon* (Es) and *Eucalyptus globulus* (Eg) grown in Algeria. The brine shrimp lethality (BSL) assay and bee hives infected by *Varroa destructor* were used to assess the toxicity and acaricidal effect, respectively. Steam distillation of (Er), (Es) and (Eg) leaves yielded 0.83%, 1.09 % and 0.93% (v/w) of essential oil (EO) respectively. GC/MS Analysis revealed 13 compounds for (Er), 36 for (Es) and 39 for (Eg). The main constituents for Er EO were 1,8-cineole (65,97%), p-cymene (7,83%) and o-cymene (4,75%), for Es EO 1,8-cineole (20,57%), octane (4.83%) and p-cymene (1,35%), and for Eg EO, 1,8-cineole (78.45 %), o-cymene (2.18 %), and isopinocarveole (1.74 %). The BSL assay of Er EO, Es EO and Eg EO revealed a highly toxic value of LC50 ($\mu\text{g/ml}$): 9.42, 34.80 and 67.55 respectively. Furthermore, field efficacy testing on bee hives infected with *Varroa destructor* has confirmed the effectiveness of *Eucalyptus robusta* essential oil (Er EO), (Es EO) and (Eg EO) and thymol ($p < 0, 05$) as varroacidal agents. Moreover (EEO + thymol) association was more effective than EEO or thymol alone. Finally the use of (EEO + thymol) may constitute a viable alternative to the thymol based commercial treatment.

Key words: *Eucalyptus spp*, essential oil, toxicity, BSL Test, GC/MS, *Varroa destructor*.

Résumé

L'objectif de cette étude est la détermination de la composition chimique et l'évaluation de la toxicité et de l'effet acaricide de l'huile essentielle d'*Eucalyptus robusta* (Er), d'*Eucalyptus sideroxylon* (Es) et d'*Eucalyptus globulus* (Eg) d'Algérie. Le test de létalité de la crevette de saumure (Brine Shrimp Lethality Test: BSL) et les ruches d'abeilles infectées par *Varroa destructor* ont été utilisés. La distillation à la vapeur d'eau des feuilles sèches de (Er), (Es) et (Eg) a donné les rendements respectifs suivants : 0,83%, 1,09% et 0,93%. L'analyse CPG / SM a révélé 13 composés pour (Er), 36 pour (Es) et 39 pour (Eg). Les constituants principaux pour l'HE Er étaient 1,8-cinéole (65,97%), p-cymène (7,83%) et o-cymène (4,75%), pour l'HE Es 1,8-cinéole (20,57 %) et p-cymène (1,35%) et enfin pour l'HE Eg 1,8-cinéole (78,45%), o-cymène (2,18%) et isopinocarveole (1,74%). Le test BSL des huiles essentielles d'Er, Es et Eg a révélé une valeur de CL50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) hautement toxique de 9,42, 34,80 et 67,55 respectivement. En outre, des tests effectués sur le terrain sur des ruches d'abeilles infectées par *Varroa destructor* ont confirmé l'efficacité des huiles essentielles d'Er, Es et Eg et du thymol ($p < 0,05$) en tant qu'agents varroacides. De plus l'association (HE E + thymol) était plus efficace que l'HE E ou le thymol seul. Enfin, l'utilisation de l'association (HE + thymol) peut constituer une alternative viable au traitement commercial de la varroase à base de thymol.

Mots clés: *Eucalyptus* spp, huile essentielle, toxicité, BSL Test, CPG/SM, *Varroa destructor*.

Article

DE GRUYTER
OPEN

Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences

Formerly ANNALES UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKLODOWSKA, SECTIO DDD, PHARMACIA

journal homepage: <http://www.curipms.umlub.pl/>

Chemical composition, toxicity, and acaricidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil from Algeria

GHANIA ATMANI-MERABET^{1,2,3*}, ABDELMALIK BELKHIRI^{1,2}, MOHAMED ABDESLAM DEMS⁴,
ABDELJALLIL LALAOUNA¹, ZAKARIA KHALFAOUI⁵, BOUZID MOSBAH⁶

¹ Departments of Dental Surgery and Pharmacy, Laboratory of Pharmacognosy, Salah Boubnider University Constantine 3, Algeria

² Laboratory of Pharmacology and Toxicology, Mentouri University Constantine 1, Algeria

³ Departments of Chemistry, Faculty of Sciences, Mentouri University Constantine 1, Algeria

⁴ Biotechnology Research Centre (Crbt Constantine), Constantine, Algeria

⁵ Technical Institute of Breeding (ITE Hamma Bouziane), Constantine, Algeria

⁶ Forest Conservation in Constantine, Algeria

ARTICLE INFO

Received 18 December 2017

Accepted 15 February 2018

Keywords:

Eucalyptus globulus,
leaf essential oil,
thymol,
toxicity,
Varroa destructor.

ABSTRACT

The study was aimed at determining the chemical composition, toxicity effect and field varroacidal efficacy of the essential oil distilled from the leaf of *Eucalyptus globulus* (Eg) grown in Algeria. Brine shrimp lethality (BSL) assay and bee hives infected by *Varroa destructor* were used to assess the toxicity and acaricidal effect, respectively. Steam distillation of leaves yielded 0.93 % (v/w) of essential oil (EO). GC/MS Analysis revealed 39 compounds, essentially oxygenated monoterpenes (86.01%). The main constituents of the oil were 1,8-cineole (78.45 %), o-cymene (2.18 %), isopinocarveole (1.74 %), α-pinene (1.69 %), pinocarpone (1.34%) and veridiflorol (1.31%). The BSL assay revealed a highly toxic value of LC₅₀ (67.55 µg/mL). Furthermore, field efficacy testing on bee hives infected with *Varroa destructor* has confirmed the effectiveness of *Eucalyptus globulus* essential oil (EgEO) or thymol as varroacidal agents. Moreover, a EgEO + thymol association was more effective than EgEO or thymol alone. Finally, the use of EgEO + thymol may constitute a viable alternative to the thymol-based commercial treatment.

INTRODUCTION

Varroa destructor is an ectoparasite that contributes to the collapse of bee colonies, resulting in economic losses and ecological problems related to the role of bees as the most important pollinators on Earth [1]. Varroosis has been treated by methods that include special apiculture practices (mesh floors, smoke, selection of resistant bees etc.) biological and chemical approaches [2-4]. Synthetic pesticides have been widely used throughout the world, however, they have often proved to be harmful to the environment and pose potential risks of contamination of honey and other hive products with chemical residues [5]. There is also clear evidence for the evolution of resistance in *Varroa* mite populations to conventional pesticides [6]. Given this situation, where the number of infected bee colonies is increasing steadily, there is an urgent need for an effective and environmentally-friendly means of control available to beekeepers. This problem has led to the appearance of several programs

of prospecting natural products with anti-varroa potential [7-10]. Commercially available botanical products include formulations based on natural molecules such as camphor, thymol, and eucalyptol. Thymol-based formulations (e.g. Apiguard®, Thymovar®) are particularly effective, with a percentage that exceeds 90% [11]. Although thymol treatment has been shown to be effective in neutralizing mites, volatility problems have arisen [12], and treatment based solely on thymol may generate the potential resistance of *V. destructor* [13]. A special practice of local beekeeping in the forest regions of Skikda (city by the sea, 471 km from Algiers) is to combine conventional treatments with aromatic plants for better efficiency and lasting effect, thus, *Eucalyptus* leaves are used as fumigation in nearby hives. The efficacy of this traditional practice is plausible given the many scientific studies supporting the insecticidal properties of *Eucalyptus* essential oils [10-14].

A large number of *Eucalyptus* species have been introduced in Algeria, notably by the French settlers from 1864 to 1876 [15]. *Eucalyptus globulus* of the Myrtaceae family,

* Corresponding author

e-mail: mgachimie2014@hotmail.com

also known as Tasmanian blue gum or blue gum, is one of the species originated from Australia which has well acclimated in Algeria, especially in the northern part where it found a favorable climate for its development. *Eucalyptus* leaves are largely used in the Algerian folk medicine for a range of therapy conditions. For instance, vapor from a hot water extract of the dried leaves is inhaled to retrieve symptoms associated with respiratory infections, such as cold, flue and sinus congestion [16].

The chemical composition of EgEO has revealed more than twenty compounds with 1,8-cineole, α -pinene and δ -limonene as major constituents [17,18]. EgEO is also widely used in modern cosmetics, food and pharmaceutical industries [19]. EgEO was shown to possess anti-inflammatory, analgesic, antiviral, antimicrobial, antioxidant and insecticidal activities [20,21]. Moreover, it has exhibited a varroacidal activity against *V. destructor* [1,2,9,10]. Essential oils components offer an attractive alternative to synthetic acaricides for the control of *V. destructor*. They are generally inexpensive and most pose few health risks. It is on this basis that we have studied the chemical composition, the acaricidal and toxic effects of the essential oil extracted from the leaves of *Eucalyptus globulus*.

This study is initiated on the basis that thymol is a product whose efficacy in the control of mites is established and that this effect could be potentiated by combining it with local *Eucalyptus* essential oils. The ultimate goal is to develop new products which are more efficient, but, above all, will overcome the problem of increasing pest resistance to treatments.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and distillation

Leaves were collected in April 2014 at the herbarium of "Draa Naga" Djbel El Ouahch, located at 15 km east of Constantine, Algeria. The study area (Draa Naga herbarium) is situated between the longitude X1: 6°42'5", X2: 6°42'30" and the latitude Y1: 36°20'45", Y2: 36°22'15". *Eucalyptus globulus* was identified by a taxonomist (Dr Bouzid Mosbah) and the voucher specimen (Eg006501) was deposited for future reference at the herbarium of the Constantine Forestry Conservation. Essential oil was extracted from fresh leaves (1400 g) by steam distillation using a Clevenger apparatus for 4 hours. Distilled oil was immediately dried over anhydrous sodium sulfate and stored in screw-capped dark glass vials at 4°C until further testing.

GC/MS analysis

Essential oil extracted from the leaves of *Eucalyptus globulus* was analysed by a gas chromatograph coupled with mass spectrometer "GC/MS" (Agilent System HP-5MS.) as described below: Capillary chromatographic column of 30 m (length), 0.25 mm (diameter), and 25 μ m (film thickness)], with apolar stationary phase of 5% phenyl and 95% dimethyl polysiloxane. Column compartment temperature was programmed from 50 to 200°C for 10°C/min; GC/MS interface was maintained at 230°C and the ionization source at 150°C; Helium was used as gas vector with a flow of 0.5 ml/min; Injection volume was 0.5 μ l; MS ionisation energy was 70eV

with scan band of 45-400 u. The essential components were tentatively identified by comparison with mass spectra data (MS) obtained from NIST-Wiley-MS library and confirmed by comparison with Kovats index on HP-5MS column.

BIOACTIVITY

Brine Shrimp lethality assay

The brine shrimp lethality (BSL) assay was used to predict the toxicity of the essential oil, as previously described [22]. Different concentrations (1000, 100, 10, 1 ppm) of EgEO were prepared using dimethyl sulfoxide (DMSO 1%). After 48 h, a drop of DMSO and 4 ml of sea water were added to each of the sample bottles containing the oil sample; Ten brine shrimp larvae of *Artemia salina* were carefully counted into each of the sample bottles and the volume of the sea water was made up to 5 ml. Tests for each concentration was done four times, and a control experiment containing 5 ml of sea water, a drop of DMSO and ten brine shrimp larvae was set along side. The experiment was maintained at room temperature for 24 hrs, the number of surviving larvae were counted and recorded, and the data obtained were subjected to Finney's probit analysis to determine the "LC50" of the oil.

ACARICIDAL ACTIVITY

Experimental apiary

This Experiment was conducted in an apiary located in nearby Azzaba (36°45'41.1"N, 7°03'50.3"E). Langstroth type hives of bees (*Apis mellifera*) whose colonies were infected with *V. destructor* were randomly assigned into four batches: batch 1 to 3 was treated with (1ml/hive/week) of each of EgEO, thymol, and EgEO + thymol (v/v) [2]. Batch 4 was used as a control (untreated hives).

Collection, counting and analysis

The method followed is the biological method deemed "raised diapers" or "covers background" [2,3]. This method is designed to track and count the fallen mites. Vaseline greased diapers are first placed in the hive, then removed and carefully examined with a hand lens to detect the dead *Varroa*. This method lasts 21 days, during which the counting is done every two days. After each count, the diapers are thoroughly cleaned and then replaced. The essential oil is deposited on a cardboard tab of 1 mm thickness to a width of 4 cm and a length of 20 cm, the deposited volume is 1 ml [2]. The tab is inserted through the main entrance of the hive; the treatment is repeated at the 7th day and then continues to the 14th day. The results are expressed in means of mortality \pm standard deviation. The temperature during the experiment varied between 20°C and 22°C.

RESULTS AND DISCUSSION

Yield of essential oil

The essential oil extracted from the Eg leaves was yellow colored and had a camphor-like smell and pleasant odor, as previously described [17,23]. The extraction yield of essential oil was 0.96 %, a value within the range of those

previously reported [24-27]. Of note, disparity of yields in the same species can be linked to genetic and environmental factors, time of collection and extraction method [28].

GC/MS analysis of essentials oils

The results of the GC/MS analysis revealed 39 compounds (Table 1), essentially oxygenated monoterpenes (86.01%), monoterpenes (5.74%), monoterpenes alcohols (4.05%) and sesquiterpenes alcohols (2.74%) (Table 2). The main constituents of the oil were 1,8-cineole (78.45 %), o-cymene (2.18 %), isopinocarveole (1.74 %), α -pinene (1.69 %), pinocarvone (1.34%) and veridiflorol (1.31%).

Table 1. Chemical composition of leaf essential oil of *E.globulus*

Compounds	KI	% composition
1,8-cineole	1030	78.45
o-cymene	1026	2.18
Isopinocarveole	1226	1.74
alpha-pinene	939	1.69
alpha-terpineol	1189	1.36
Pinocarvone	1165	1.34
Veridiflorol	1593	1.31
(+) spathulenol	1578	1.05
trans-p-mentha-1 (7), 8-dien-2-ol	1185	0.79
methyl benzene	773	0.77
Camphene	954	0.7
cis-p-mentha-1 (7),8-dien-2-ol	1235	0.51
4-terpineol	1177	0.5
1-phellandrene	1003	0.35
thymol	1290	0.28
Ledol	1569	0.28
trans-carveol	1217	0.22
butylester	2388	0.17
D-carvone	1243	0.16
alpha-selinene	1498	0.14
beta-myrcene	991	0.13
Myrtenol	1327	0.13
2-beta-pinene	979	0.12
Valencene	1496	0.11
gamma-terpinene	1060	0.1
Isospathulenol	1644	0.1

KI: compounds were tentatively identified by comparison with mass spectra data (MS) obtained from NIST-Wiley library and confirmed by comparison with Kovats index on HP-5MS column. **(%) composition:** percentage of concentrations based on peak area integration

Table 2. The percentage of particular groups of *E. globulus* essential oil components

Groups	Percentage (%)
Monoterpenes	5.47
Oxygenated monoterpenes	78.45
Monoterpenes alcohols	4.05
Monoterpenes ketones	3.41
Monoterpenes aldehydes	0.1
Sesquiterpenes	0.65
Sesquiterpenes alcohols	2.74
Aromatic hydrocarbons	0.87
Aldehydes	0.16
Esters	0.27

Previous investigations of EgEO have revealed various chromatographic profiles with different percentages of 1,8-cineole [29]. For example, EgEO samples from Brazil and Australia showed a high amount of 1,8-cineole, with an average of 85 and 90 %, respectively [30,31]. In contrast, an analysis of a *Eucalyptus* oil sample from Argentina displayed a moderate percentage of 60% [32], while those of Morocco and Kenya gave a low percentage - with an average of 22.4 and 17.22%, respectively [26,33]. Studies from Algerian EgEO collected from different sites revealed a variability in the composition from 47.05 to 53.3% [23,34]. These variations in Algeria EgEO and those of elsewhere denote the existence of several chemotypes, as previously reported [29].

BIOACTIVITY

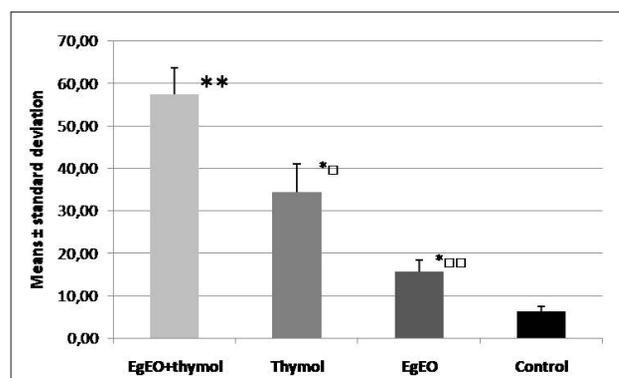
Toxicity and acaricidal activity

The result of the brine shrimp lethality assay of EgEO is shown in (Table 3). The (BSL) test revealed a value of "LC50" of 67.55 $\mu\text{g/mL}$. According to the toxicity scale established previously by Clarkson *et al.*, the value of "LC50" obtained for EgEO is considered as highly toxic [35]. It is worth noting that the toxicity of our EO is lower than that obtained from a Nigerian sample which showed on the same assay an "LC50" value of 9.59 $\mu\text{g/mL}$ [24]. The Nigerian EO has a different composition, with terpinen-4-ol at 23.46% and δ -terpinene at 17.01% as predominant components, while 1,8-cineole was present with only a 2.52%. This low value of 1,8-cineole suggest that other constituents of the Nigerian EgEO might contribute to its toxicity.

Table 3. Brine shrimp lethality assay of leaf extracts of *E. globulus* essential oil

Plant extract	Dose ($\mu\text{g/mL}$)	Nbre of tested shrimps	Nbre of survivors	"LC50" ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. globulus</i>	1	40	13	67.55
	10	40	20	
	100	40	25	
	1000	40	32	

The results of the field acaricidal testing of EgEO are shown in (Figure 1). All treated infected bee hives have showed significant fall of *Varroa destructor* compared to the control. The EgEO + thymol-treated batch showed as being the most efficient in removing the ectoparasite compared to the thymol ($p = 0.05$) and EgEO ($p = 0.006$) batches.



Value of fallen *Varroa* expressed as means \pm SD (n=3);

(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) value vs control;

(□ $p < 0.01$, □ $p < 0.05$) value vs (EgEO \pm thymol) treatment

Figure 1. Number of dead *Varroa* expressed as means \pm SD

However, no significant difference was observed between the thymol and the EgEO treated batches. Despite the situation that EgEO alone has a lower value of fallen *Varroa* (15.60 ± 2.70) than that of thymol (34.37 ± 6.56), the difference is not significant ($p=0.07$).

Several studies have been conducted world-wide, to understand the effectiveness of essential oils against *Varroa destructor* [29]. Aromatic species such as *Ferula assa-foetida*, *Allium sativum*, *Sisymbrium aromaticum*, *Piper aduncum*, *Thymus* spp., *Eucalyptus* spp. has been tested successfully against the ectoparasite [29]. The acaricidal activity of EOs from *E. camaldulensis* on *V. destructor* mite was also investigated, and a LD50 of 1.74 $\mu\text{L/L}$ was found [8]. A previous study using *Eucalyptus globulus* EO at a level of 10 μL , has showed an acaricidal effect of 45.75% of dead *Varroa* [10]. Our result revealed a slightly lower toxic effect toward the ectoparasite than the last study. This difference may be justified by the more important number of repeated treatments used by this study [10]. Finally, all these studies have outlined the usefulness of an EgEO treatment against *Varroa destructor*.

Despite the fact that the thymol treated group has shown a higher percentage of fallen *Varroa* than that of EgEO, no statistically difference between the two groups was observed. One of the reasons might be linked to the high variability detected in the apiary. To overcome this issue, the number of hives and apiaries that form such a study must be raised to obtain a better understanding of the effects of the applied treatments. It should be underlined that the most important fall of the ectoparasite was recorded with the association of EgEO + thymol. This result is significant and raises other crucial issues. Among the raised questions is whether the observed effect of EgEO is attributable or not to 1,8-cineole?, if this is the case, it will be interesting to investigate the association of thymol + 1,8-cineole as a potential acaricide.

CONCLUSION

The chemical analysis of EgEO revealed a composition dominated by oxygenated monoterpenes in the main, represented by 1,8-cineole. Our study has confirmed that an EgEO + thymol association was more effective in reducing the ectoparasite populations than was EgEO or thymol alone. This result is interesting in that the use of EgEO+thymol may constitute a viable alternative to thymol-based commercial treatment. Finally, the use of a natural pesticide is of immense significance in view of the environmental and toxicological implications of the indiscriminate use of synthetic pesticides and in view of the need to overcome the problem of the increasing pesticide resistance of *V. destructor*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Mr. Mokadem Hamadi, a private beekeeper, who allowed us to use a part of his apiary for experimental purposes.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Kluser S, Neumann P, Chauzat MP, Pettis JS. Global honey bee colony disorder and other threats to insect pollinators. UNEP Emerging Issues 1, Kenya; 2002:1-12.
2. Labeste L. Protocole de traitement aux huiles essentielles – activité acaricide sur le *Varroa*. Apisevices-Galerie Virtuelles Apicoles, France; 2013.
3. Ghomari FN, Kaouache B, Arous A, Cherchali S. Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles. Revue Nature et Technologie: B-Sci Agro et Bio. 2014;10:34-8.
4. Adjlane N, El Ounass J, Haddad N. Situation de l'apiculture en Algérie: facteurs menaçants la survie de colonies d'abeilles locales *Apis mellifera* Intermissa. J. Arthropod-Born.Dis. 2016;10(4):501-8.
5. Bogdanov S, Charriere JD, Imdorf A, Kilchenmann V. Determination of residues in honey after treatment with formic and oxalic acid under field conditions. Apido. 2002;33:399-9.
6. Umpiérrez ML, Santos E, González A, Rossini C. Plant essential oils as potential control agents of varroaosis. Phytochem Rev. 2011;10(2):227-4.
7. Abdelwahab TE, Ebadah MA, Zidan EW, Evaluation of some volatile plant oils and maurik against *Varroa destructor* in honey bee colonies. J of Appl Sci Res. 2006;2(8):514-21.
8. Ghasemi V, Moharramipour S, Tahmasbi G. Biological activity of some plant EOs against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), an ectoparasitic mite of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). Exp Appl Acarol. 2011;55:147-54.
9. Mahmoud R, Asad S, Raja S, UL Moshina A, Wagchoure ES, Sarwar G, et al. Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera*. (Hymenoptera: Apidae) by using Plant Oils and Extract. Pakistan. J. Zool 2014;46(3):609-15.
10. Habbi-Cherif Aïssa. Etude de la dynamique du parasite *Varroa destructor* de l'abeille domestique (*Apis mellifera*) et évaluation de l'efficacité de quelques huiles essentielles dans la lutte contre ce parasite. Mémoire de Magister, Université MouloudMameri,TiziOuzou, Algria; 2014.
11. Coffey MF, Breen J.Efficacy of ApilifeVar® and Thymovar® against *Varroa destructor* as an autumn treatment in a cool climate. J of Apicu Res. 2013;52(5):210-18.
12. Shahrouzi R. La varroatose en Iran. Abeilles & c^{ie}, 2004;103:24-25.
13. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. Biology and control of *Varroa destructor*. J of Invert Patho. 2010;103:96-119.
14. Shengping PJYQQ, Lihua LCW. Study of the niche transition of lesser Asian mite (*Tropilaelapsclareae*) in honey bee colony just after infection desynchronization of larger varroa mite (*Varroa destructor*). Apicul of China. 2011.
15. Boulekbache-Makhlouf L, Meudec E, Chibane M, Mazaauric JP, Cheyner V, Slimani S, et al. Analysis of phenolic compounds in fruit of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria by high-performance liquid chromatography diode array detection mass spectrometry. J. Agric. FoodChem. 2010;58:12615-24.
16. Cermelli, A. Fabio, G. Fabio, P. Quaglio,P. Effect of *Eucalyptus* essential oil on respiratory bacteria and viruses. Current Microbiology. 2008;56(1),89-92.
17. Boukhatem MN, Amine FM, Kameli A, Saidi F, Walid KS, Bouziane M. Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida (Algeria) origin. Int Let Chem Phys Astro. 2014;17:303-15.
18. Batish DR, Singh HP, KohliRK, Kaur S. *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. Forest Ecol. Manag. 2008;256:2166-74.
19. Goldbeck J, do Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentinia AM, da Silva WP. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. Ind Crops Prod. 2014;60:304-9.

20. Ramos AS, Ribeiro JB, Teixeira BG, Ferreira JLP, Silva JRA, Ferreira AA et al. Hydroxylation of 1,8-cineole by *Mucorra mannianus* and *Aspergillus niger*. *Braz. J. Microbiol.* 2015;46(1):261-64.
21. Rossi YE, Palacios SM. Insecticidal toxicity of *Eucalyptus cinerea* essential oil and 1,8-cineole against *Musca domestica* and possible uses according to the metabolic response of flies. *Ind Crops Prod.* 2015;63:133-37.
22. Mac Laughlin JL, Rogers LL. *Drug Information Journal.* 1998:513.
23. Harkat-Madouri L, Boudria A, Khodir M, Bey-Ould Z, Si Saida K, Rigouc PD, et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Ind Crops and Prod.* 2015;78:148-53.
24. Olayinka AJ, Olawumi OO, Olalekan AM, Abimbola AS, Idiat ID, Theophilus OA. Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north -central Nigeria. *J Nat Prod Plant Resour.* 2012;2(1):1-8.
25. Russo S, Cabrera N, Chludil H, Yaber-Grass M, Leicach S. Insecticidal activity of young and mature leaves essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chi J Agric Res.* 2015;75:375-79.
26. Derwich E, Benziane Z, Boukir A. GC/MS analysis of volatile constituents and antibacterial activity of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* in Atlas Median from Morocco. *Adv Nat Appl Sci.* 2009;3:305-13.
27. Mossi AJ, Astolfi V, Kubiak G, Lerin L, Zanella C, Toniazzo G et al. Insecticidal and repellency activity of essential oil of *Eucalyptus sp.* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). *J Sci Food Agr.* 2011;91:273-77.
28. Bruneton J. *Pharmacognosie - Phytochimie, Plantes Médicinales*, 2ème éd., Tec et Doc. Editions Médicales Internationales, Paris; 2008:1188.
29. Barbosa LCA, Filomeno CA, Teixeira RR. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. *Essential Oils. Molecules.* 2016;21(12):1671.
30. Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leitem RC, Furlong J, Fortes ICP. Acaricide effect of *Eucalyptus* spp. EOs and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. *Braz J Vet Res Ann. Sci.* 2002;39:247-53.
31. Yang Y, Choi H, Choi W, Clark JM, Ahn Y. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *J Agric Food Chem.* 2004;52:2507-11.
32. Lucia A, Licastro S, Zerba E, Masuh H. Yield, chemical composition, and bioactivity of EOs from 12 species of *Eucalyptus* on *Aedes aegypti* larvae. *Entomol Exp Appl.* 2008;129:107-14.
33. Karemu, C.K., Ndung'u, M.W., Githua, M. Repellent effects of EOs from selected *Eucalyptus* species and their major constituents against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Trop. Insect Sci.* 2013;33:188-94.
34. Taleb-Toudert K. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mameri, Tizi Ouzou, Algeria; 2015.
35. Gende L, Maggi M, van Baren C, di Leo A, Bandoni A, Fritz R et al. Antimicrobial and miticide activities of *Eucalyptus globulus* essential oils obtained from different Argentine regions. *Spa J of Apicul Res.* 2010;8(3).