

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA - BOUMERDES



Faculté des Sciences

**Thèse de Doctorat LMD**

Présentée par : M<sup>me</sup> **HAZAM Souad Epse MAHDI**

en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT LMD**

**Filière : Biotechnologie**

**Option : Biotechnologie Végétale**

**Techniques d'extraction et exploitation des potentialités  
biologiques des extraits de quelques plantes aromatiques  
locales vis-à-vis du *Varroa (Varroa destructor)***

*Devant le jury composé de :*

CHAHBAR Nora	Professeur	UMB. Boumerdès	Présidente
BELAIID Messaouda	Professeur	UMB. Boumerdès	Examinatrice
CHABANE Djamilia	Professeur	USTHB	Examinatrice
BENHABYLES Narimen	Maitre de Conférence A	UMB. Boumerdès	Examinatrice
AIT KAKI Sabrina	Professeur	UMB. Boumerdès	Directrice de thèse
CHEMAT Smain	Directeur de Recherche	CRAPC	Co-directeur de thèse

**Année universitaire : 2024 / 2025**

## ***Remerciements***

Tout d'abord, je tiens à remercier M<sup>me</sup> ADIDOU - CHAHBAR Nora, Vice-doyenne de la Faculté des Sciences de l'Université de Boumerdès, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes vifs remerciements sont également adressés à M<sup>me</sup> BELAID Messaouda, Professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, à M<sup>me</sup> CHABANE Djamilia, Professeur à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene Bab-Ezzouar et à M<sup>me</sup> BENHABYLES Narimen, Maître de conférences A, à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès ; pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner et d'évaluer ce travail de doctorat.

Mes sincères remerciements et mon profond respect vont à ma directrice de thèse, M<sup>me</sup> AIT KAKI - AIT SLIMANE Sabrina, à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour son encadrement ainsi que sa disponibilité et sa gentillesse. Je souhaite également exprimer ma sincère gratitude envers mon co-directeur de thèse, M. CHEMAT Smain, Directeur de Recherche au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (C.R.A.P.C.). Merci d'avoir accepté de m'accueillir dans votre équipe et de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire. Grâce à vous, notre collaboration s'est avérée très fructueuse et qui, j'espère, continuera. Merci pour votre soutien, vos conseils.

Je tiens à remercier le M. MOHAMMEDI Arezki, Professeur de Zoologie à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire mais également M<sup>me</sup> GHAFAR Intissar, doctorante en agronomie à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour son aide et ses conseils qui m'ont éclairée durant ces six années de thèse.

Je remercie chaleureusement M. Touati Salem, formateur, conseiller technique et expert en apiculture, à la Coopérative Agricole Polyvalente de Tizi-Ouzou (CAPTO), pour sa précieuse assistance technique en donnant de son temps et de ses abeilles, sa disponibilité constante et pour le partage d'idées qui ont considérablement amélioré ma réflexion scientifique et par conséquent la qualité de mon travail. Sa générosité et son esprit collaboratif ont été d'une aide inestimable.

Ma reconnaissance va également à M<sup>me</sup> SAHER Liza, Maître de Recherche au C.R.A.P.C., pour tes précieux conseils, tes encouragements constants et ta contribution scientifique. Sans toi, ce travail n'aurait jamais abouti.

Je tiens à remercier également M<sup>me</sup> KHEDIDJI Hassiba, docteur en agronomie, pour son aide à la réalisation des tests statistiques. Qu'elle trouve ici toutes mes reconnaissances.

Je souhaiterais adresser mille merci si ce n'est plus à mes chères collègues, amies et sœurs M<sup>me</sup> FODIL CHERIF Nawal et M<sup>me</sup> Jamila N. NAIT ABDALLAH, Maitres de Recherche au C.R.A.P.C., pour leur aide précieuse et pour la relecture complète du manuscrit ainsi que les corrections qu'elles ont apportées. Vos conseils, suggestions, vos encouragements et la confiance que vous m'avez accordée ont été des catalyseurs qui m'ont permis de surmonter les obstacles et à croire en ma capacité à mener à bien ce travail.

Je souhaite également remercier M. KHALDOUN Bachari et M. CHEBOUT Redouane, Directeur et Directeur-adjoint du CRAPC, ainsi que M. HAMITOUCHE Adhya-Eddine pour m'avoir encouragée à reprendre et à poursuivre mes études.

Ma reconnaissance va à ma collègue et amie M<sup>me</sup> Dechira Khadidja, Maitres de Recherche au C.R.A.P.C., pour sa gentillesse, sa générosité, sa rigueur scientifique, ses précieux conseils, ses encouragements et son support durant toutes ces années de thèse. Ce fut un réel enrichissement tant sur le plan professionnel que personnel.

Mes plus profonds remerciements s'adressent à M<sup>me</sup> Taibi Nadia et à M<sup>me</sup> Ghouila Zahia, Maitres de Recherche au C.R.A.P.C., pour leurs conseils précieux, leurs encouragements et leurs contributions scientifiques.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres de l'équipe prototypage du C.R.A.P.C., je pense notamment à M. ABBASSI Mohamed, M. HAFI Mansour et à M. DJEMAAL Faouzi pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée.

Je remercie infiniment M. ABOU MUSTAPHA Mohamed, M<sup>me</sup> KACED Amel, M<sup>me</sup> BOUKHELATA Nacéra, M<sup>me</sup> DEHINA Amina, M. BOUMECHHOUR Abdenour et M. AMRAOUI Rachid, ingénieurs et chercheurs au niveau du C.R.A.P.C., pour les analyses chimiques par CG/SM des échantillons d'huiles essentielles et pour leur aide dans l'interprétation des résultats.

Mes sincères remerciements vont à M<sup>me</sup> SID OTMANE Tassadit et à M<sup>me</sup> SAIHI Mahat, ancien chercheur à l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (I.N.R.A.A.), pour l'aide dont j'ai bénéficié lors de la réalisation des tests biologiques. Vos plantes et couvains ont été les bienvenus.

Je remercie également, M<sup>me</sup> OUKALI Zahia, doctorante en biotechnologie à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, pour son aide et ses conseils précieux.

Avant de finir, je remercie tous les collègues et amies qui m'ont soutenue et encouragée tout le long de ces années de thèse. Merci à : ZEMMACHE Safia, DJEMA Souhila, TOUATI Souad, BELMIRI Sara, BADRI Zola, BOUTAIBA Mouna et LERARI Djahida. Sans oublier mes collègues doctorants (biotechnologues et agronomes) affiliés au laboratoire VALCORE.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciement à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

*A la mémoire de mon cher père, toujours vivant dans mon cœur*

*A ma chère mère que Dieu la bénisse et la protège de tout mal*

*A mon mari*

*A mes chères sœurs et beaux-frères*

*A tous mes chères neveux et nièces*

*A la mémoire de mon beau-père*

*A ma belle-mère que Dieu la protège*

*A toute ma famille et ma belle famille*

# Avant-Propos

Les travaux de cette thèse ont donné lieu aux publications et communications suivantes :

## Publication internationale

**Hazam, S.,** Touati, S., Touati, L., Saher, L., Khedidji, H., Ait Kaki, S., & Chemat, S. (2024). Promising Algerian essential oils as natural acaricides against the honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology*, 92(1), 87–107. <https://doi.org/10.1007/s10493-023-00866-4>.

## Communications internationales

1. **Hazam, S.,** Ait Kaki, S., & Chemat, S. Microwave-assisted hydrodistillation and conventional hydrodistillation of the *Artemisia absinthium* essential oil: A comparative study. 1<sup>st</sup> International Congress on Analytical Chemistry, Electrochemistry and Separation Techniques. October 15<sup>th</sup>- 16<sup>th</sup>, 2022. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie.
2. **Hazam, S.,** Ait Kaki, S., & Chemat, S. Comparison of two techniques for *Pelargonium graveolens* essential oil extraction: conventional and innovative. First International Webinar on: Promotion and Exploitation of Plants of Ecological and Economic Interest. 15 et 16 Mars 2023. Université Abbes Laghrour de Khenchela, Algérie.

## Communications nationales

1. **Hazam, S.,** Ait Kaki, S., & Chemat, S. Chemical composition and pharmacological properties of wormwood essential oil. Colloque National sur la Valorisation des Plantes Aromatiques et Médicinales en Algérie, 20 & 21 Décembre 2022. Université Saad Dahleb de Blida, Algérie.
2. **Hazam, S.,** Ait Kaki, S., & Chemat, S. Rose-scented géranium essential oil (*Pelargonium graveolens*): extraction and chemical composition. 1er Webinaire national: Natural Products and Bioactive Compounds, an issue of sustainable development. 11 Mars 2023. Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, Algérie.

# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b>Chapitre 1 – Revue de l'état de l'art</b>	
<b>I. Monographie des plantes aromatiques et médicinales étudiées</b> .....	6
1. Famille des Astéraceae.....	6
1.1. Le genre <i>Artemisia</i> .....	6
1.1.1. <i>Artemisia herba alba</i> .....	7
1.1.1.1. Description botanique.....	7
1.1.1.2. Noms communs.....	8
1.1.1.3. Noms vernaculaires.....	8
1.1.1.4. Systématique.....	8
1.1.1.5. Habitat et distribution.....	9
1.1.1.6. Usages et propriétés biologiques.....	9
1.1.2. <i>Artemisia campestris</i> .....	9
1.1.2.1. Description botanique.....	9
1.1.2.2. Noms communs.....	10
1.1.2.3. Noms vernaculaires.....	10
1.1.2.4. Systématique.....	10
1.1.2.5. Habitat et distribution.....	11
1.1.2.6. Usages et propriétés biologiques.....	11
1.1.3. <i>Artemisia judaica</i> .....	11
1.1.3.1. Description botanique.....	11
1.1.3.2. Noms communs.....	12
1.1.3.3. Noms vernaculaires.....	12
1.1.3.4. Systématique.....	12
1.1.3.5. Habitat et distribution.....	13
1.1.3.6. Usages et propriétés biologiques.....	13
2. Famille des Rutaceae.....	13
2.1. Le genre <i>Ruta</i> .....	14
2.1.1. <i>Ruta montana</i> .....	14
2.1.1.1. Description botanique.....	14
2.1.1.2. Noms communs.....	15
2.1.1.3. Noms vernaculaires.....	15
2.1.1.4. Systématique.....	15
2.1.1.5. Habitat et distribution.....	16
2.1.1.6. Usages et propriétés biologiques.....	16
<b>II. Les huiles essentielles</b> .....	17
1. Historique.....	17
2. Définition d'une huile essentielle.....	17
3. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques d'une huile essentielle.....	18
4. Localisation de l'huile essentielle et son rôle dans la plante.....	18
5. Composition chimique des huiles essentielles.....	19
6. Notion de chémotype.....	20
7. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles.....	21
7.1. Les méthodes conventionnelles d'extraction des huiles essentielles.....	21
7.1.1. L'hydrodistillation.....	21
7.1.2. Inconvénients de l'hydrodistillation.....	22

7.2. Alternatives aux méthodes d'extraction traditionnelles (Extraction verte).....	22
7.2.1. Hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	23
8. Activités biologiques des huiles essentielles.....	24
8.1. Activité antimicrobienne des HEs.....	24
8.1.1. Activité antibactérienne des HEs.....	24
8.1.2. Activité antifongique des HEs.....	25
8.2. Activité insecticide des HEs.....	25
8.3. Activité répulsive des HEs.....	25
9. Toxicité des huiles essentielles.....	26
10. Utilisation des huiles essentielles en apiculture.....	26
<b>III. La biologie de l'hôte <i>Apis mellifera</i>.....</b>	<b>28</b>
1. Historique et origine de l'abeille domestique <i>Apis mellifera</i> .....	28
2. Position taxonomique de l'abeille domestique.....	28
3. Présentation des abeilles domestiques locales .....	29
4. Morphologie de l'abeille.....	29
5. Cycle de vie de l'abeille mellifère.....	31
6. Structure et organisation de la colonie d'abeilles.....	32
6.1. La reine et le processus de reproduction.....	32
6.2. Les faux-bourçons.....	33
6.3. Les ouvrières.....	33
7. Conditions environnementales dans la colonie d'abeilles.....	33
8. Les maladies de l'abeille.....	34
<b>IV. La varroase.....</b>	<b>36</b>
1. Historique .....	36
2. Morphologie et écologie du <i>Varroa destructor</i> .....	36
3. Le cycle de vie de <i>Varroa destructor</i> .....	37
a. Phase de reproduction.....	39
b. Phase de dispersion ou de phorésie.....	39
4. Effets du <i>V. destructor</i> sur son hôte .....	39
5. Effet de <i>Varroa destructor</i> sur la colonie d'abeilles.....	40
6. Evaluation de l'infestation par <i>Varroa destructor</i> .....	41
7. Moyens de lutte contre <i>Varroa destructor</i> .....	41
a. Lutte par acaricides synthétiques.....	41
b. Lutte par les méthodes biotechniques.....	42
c. Lutte par produits naturels.....	43
8. <i>Varroa destructor</i> et huiles essentielles.....	43
9. Toxicité des huiles essentielles vis-à-vis des abeilles.....	44

## **Chapitre 2 – Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation et leur caractérisation par CG/SM**

Introduction .....	46
<b>I. Matériel et méthodes.....</b>	<b>49</b>
1. Collecte du matériel végétal.....	49
2. Méthode de séchage des plantes.....	49
3. Extraction des huiles essentielles.....	49
3.1. Extraction des HEs par hydrodistillation conventionnelle.....	50
3.2. Extraction des HEs par hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	51
3.3. Détermination du rendement d'extraction des huiles essentielles.....	52
3.4. Identification des composants des huiles essentielles extraites par CG/SM.....	52
3.4.1. Principe de la méthode.....	52
3.4.2. Conditions d'analyse.....	53

3.4.3. Mode d'identification des pics du chromatogramme CG/SM.....	53
II. Résultats .....	55
1. Temps et rendements d'extraction.....	55
2. Détermination des compositions des huiles essentielles extraites.....	55
2.1. Composition de l'HE extraite de <i>Artemisia herba alba</i> .....	55
2.2. Composition de l'HE extraite de <i>Artemisia campestris</i> .....	58
2.3. Composition de l'HE extraite de <i>Artemisia judaica</i> .....	61
2.4. Composition de l'HE extraite de <i>Ruta montana</i> .....	63
III. Discussion .....	67
Conclusion .....	72

### **Chapitre 3 – Activité acaricide des huiles essentielles contre l'ectoparasite de l'abeille *Varroa destructor***

Introduction .....	74
I. Matériel et méthodes.....	77
1. Description du site de prélèvement du matériel animal.....	77
2. Description de la méthode de prélèvement des acariens ectoparasites.....	77
3. Description de la méthode de collecte des abeilles adultes.....	78
4. Conditions expérimentales.....	79
4.1. L'environnement.....	79
4.2. Dosage des produits chimiques.....	79
4.3. Acariens utilisés pour les tests.....	80
4.4. Age des ouvrières adultes utilisées pour les expériences de laboratoire.....	80
4.5. Considérations relatives au choix d'utilisation des abeilles nouvellement émergées pour des expériences en laboratoire.....	81
4.6. Validité des tests.....	81
4.7. Cages d'essai.....	81
4.8. Groupes d'essais et témoins .....	81
4.9. Matériel végétal testé.....	81
4.10. Témoin positif : Thymol.....	82
4.11. Choix des concentrations des huiles essentielles et du thymol.....	82
5. Test d'activité acaricide .....	83
6. Activité acaricide des huiles essentielles sur <i>Varroa destructor</i> .....	85
7. Toxicité aigue des huiles essentielles pour les adultes de <i>Apis mellifer</i> .....	86
8. Expression des résultats .....	87
8.1. Correction des taux de mortalité.....	87
8.2. Détermination des concentrations létales.....	87
8.3. Calcul des ratios de sélectivité.....	88
9. Analyse statistiques.....	88
II. Résultats .....	89
1. Activité acaricide des huiles essentielles sur <i>Varroa destructor</i> .....	89
1.1. Huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .....	89
1.2. Huile essentielle de <i>Artemisia campestris</i> .....	90
1.3. Huile essentielle de <i>Artemisia judaica</i> .....	90
1.4. Huile essentielle de <i>Ruta montana</i> .....	91
2. Evaluation de la toxicité aigue des HEs vis-à-vis les adultes de <i>Apis mellifer</i> .....	92
3. Détermination des concentrations létales et des ratios de sélectivité.....	96
III. Discussion.....	98
Conclusion.....	100

**Conclusion générale et perspectives**

102

**Références bibliographiques**

**Annexes**

**Résumé (Français, Anglais, Arabe)**

## Liste des abréviations

<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>HEs</b>	Huiles essentielles
<b>HD</b>	Hydrodistillation
<b>HDMO</b>	Hydrodistillation assistée par micro-ondes
<b>SFME</b>	Extraction sans solvant assistée par micro-ondes
<b>ESAM</b>	Extraction par solvant assistée par micro-ondes
<b>HDMV</b>	Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous-vide
<b>AFNOR</b>	Association française de normalisation
<b>ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>GRAS</b>	Généralement reconnu comme sûr
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>CG/SM</b>	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
<b>IR</b>	Indice de rétention
<b>NIST</b>	National institute of standards and technology
<b>HR</b>	Humidité relative
<b>CL</b>	Concentration létale
<b>RS</b>	Ratio de sélectivité
<b>ANOVA</b>	Analyse de la variance et de la variabilité
<b>NOAEL</b>	Dose sans effet nocif observé

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure I. 1 : Touffe de <i>Artemisia herba alba</i> . (a) Photographie d'un plan de <i>A. herba alba</i> dans son milieu naturel, (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de <i>A. herba alba</i> .....	8
Figure I. 2 : <i>Artemisia campestris</i> . (a) Photographie d'un plan de <i>A. campestris</i> dans son milieu naturel (b) Schéma illustrant les aspects morphologiques de <i>A. campestris</i> .....	10
Figure I. 3 : <i>Artemisia judaica</i> . (a) Photographie d'un plan de <i>Artemisia judaica</i> , (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de <i>A. judaica</i> .....	12
Figure I. 4 : <i>Ruta montana</i> . (a) Photographie originale de <i>R. montana</i> , (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de <i>R. montana</i> .....	15
Figure I. 5 : Schéma représentant le montage utilisé pour l'hydrodistillation.....	22
Figure I. 6 : Schéma montrant le montage utilisé pour la réalisation de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.....	23
Figure I. 7 : Morphologie de <i>Apis mellifera</i> .....	30
Figure I. 8 : Le cycle de vie de l'abeille.....	31
Figure I. 9 : Les différentes castes d'une colonie d'abeilles.....	32
Figure I. 10 : Morphologie de l'acarien <i>Varroa destructor</i> . Vues ventrales (à droite) et dorsales (à gauche) d'une femelle adulte (A) et d'un mâle (B).....	37
Figure I. 11. Schéma simplifié du cycle de vie de <i>Varroa destructor</i> .....	38

### Chapitre 2

Figure II. 1 : Schéma détaillant les six principes de l'éco-extraction.....	46
Figure II. 2 : Extraction des HEs par hydrodistillation conventionnelle. (a) Montage permettant l'extraction des HEs : ① Réfrigérant, ② évacuation d'eau de refroidissement ③ Dean Stark avec cohobage ④ ballon contenant le matériel végétal ⑤ chauffe-ballon ; (b) Refroidisseur d'eau ; (c) Agrandissement de la figure (a) montrant l'HE après extraction ①.....	50
Figure II. 3 : Montage utilisé pour l'extraction des HEs par HDMO.....	51
Figure II. 4 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de <i>Artemisia herba alba</i> extraites par HD et par HDMO.....	57
Figure II. 5 : : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de <i>Artemisia campestris</i> extraites par HD et par HDMO.....	60
Figure II. 6 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de <i>Artemisia judaica</i> extraite par HD et HDMO.....	62
Figure II. 7 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de <i>Ruta montana</i> extraite par HD et HDMO.....	64

### Chapitre 3

Figure III. 1 : Etapes de prélèvement des acariens <i>V. destructor</i> . (a) Désoperculation des alvéoles, (b) Récolte des nymphes aux yeux blancs à roses, (c) Récolte des acariens adultes.....	78
Figure III. 2 : Photographie illustrant des abeilles nouvellement émergées.....	79
Figure III. 3 : Exposition complète et simultanée des abeilles et des acariens selon le protocole de Ruffinengo <i>et al.</i> (2005).....	84
Figure III. 4 : Boîtes de Petri pour les tests sur le <i>Varroa</i> .....	86
Figure III. 5 : Cages pour les tests sur les abeilles.....	87
Figure III. 6 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$ ES) de <i>Varroa destructor</i> en fonction du temps et de la concentration de l'huiles essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .....	89
Figure III. 7 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$ ES) de <i>Varroa destructor</i> en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de <i>Artemisia campestris</i> .....	90
Figure III. 8 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$ ES) de <i>Varroa destructor</i> en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de <i>Artemisia judaica</i> .....	91
Figure III. 9 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigés moyens ( $\pm$ ES) de <i>Varroa destructor</i> en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de <i>Ruta montana</i> .....	92
Figure III. 10 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$ SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de <i>Artemisia herba alba</i> .....	93
Figure III. 11 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$ SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de <i>Artemisia campestris</i> .....	93
Figure III. 12 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$ SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de <i>Artemisia judaica</i> .....	94
Figure III. 13 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$ SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de <i>Ruta montana</i> .....	94
Figure III. 14 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$ SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de thymol.....	95

## Liste des tableaux

### Chapitre 1

Tableau I. 1 : Principaux composants des huiles essentielles.....	20
Tableau I. 2. Pathogènes de l'abeille.....	35
Tableau I. 3. Principaux acaricides synthétiques commerciaux.....	41

### Chapitre 2

Tableau II. 1 : Lieu et période de récolte des espèces de plantes étudiées.....	49
Tableau II. 2 : Conditions opératoires de l'analyse par CG/SM des HEs extraites.....	53
Tableau II. 3 : Rendements des procédés d'extraction des HEs par HD et HDMO.....	55
Tableau II. 4 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de <i>Artemisia herba alba</i> extraite par HD et HDMO.....	56
Tableau II. 5 : Composition chimique de l'HE de <i>Artemisia herba alba</i> obtenue par HD et HDMO.....	58
Tableau II. 6 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de <i>Artemisia campestris</i> extraite par HD et HDMO.....	59
Tableau II. 7 : Composition chimique de l'HE de <i>Artemisia campestris</i> obtenue par HD et HDMO.....	61
Tableau II. 8 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de <i>Artemisia judaica</i> extraite par HD et HDMO.....	62
Tableau II. 9 : Composition chimique de l'HE de <i>Artemisia judaica</i> obtenue par HD et HDMO.....	63
Tableau II. 10 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de <i>Ruta montana</i> extraite par HD et HDMO.....	64
Tableau II. 11 : Composition chimique de l'HE de <i>Ruta montana</i> obtenue par HD et HDMO.....	65
Tableau II. 12 : Récapitulatif des résultats globaux obtenus dans ce travail.....	72

### Chapitre 3

Tableau III. 1 : Concentrations des HEs et du thymol utilisées pour les bioessais.....	82
Tableau III. 2 : Estimation de la « dose sans effet nocif observé » (NOAEL) et des taux de mortalité moyens ( $\pm$ SD) des varroas (%) après 72 heures d'exposition.....	96
Tableau III. 3 : Valeurs des CL <sub>50</sub> ( $\mu$ L/mL) (+ IC 95 % entre parenthèses) des huiles essentielles et du thymol (contrôle positif) sur <i>Varroa destructor</i> et <i>Apis mellifera</i> et leur rapport de sélectivité à 24, 48 et 72 heures en utilisant la méthode d'exposition complète dans les conditions de laboratoire.....	97

# *Introduction générale*

Les plantes aromatiques et médicinales sont des sources importantes de métabolites secondaires qui ont un large éventail d'applications dans les industries cosmétique et pharmaceutique mais également dans la lutte contre les maladies végétales et humaines (**Pandey & Singh, 2017 ; Liaqat et al., 2018**). Ainsi, et selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 80 % de la population mondiale continue encore de recourir à la médecine traditionnelle et populaire, dont la majeure partie repose sur des remèdes à base de plantes (**Rolnik & Olas, 2021**). D'ailleurs, l'utilisation des plantes médicinales a fortement augmenté ces dernières années en raison de leur large acceptation par les consommateurs, de leur niveau de sécurité relativement élevé, de leur abondance locale et de leur faible coût d'acquisition très accessible (**Kadri et al., 2022**). Parmi les métabolites secondaires synthétisés par ces plantes, les huiles essentielles (HEs) occupent une place importante. En effet, les HEs et leurs principaux composants présentent un large éventail de propriétés bioactives parmi lesquelles les propriétés antimicrobiennes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, cicatrisantes et régénératrices et les propriétés insecticides et répulsives (**Isman & Machial, 2006 ; Isman, 2016 ; Porrini et al., 2017 ; Tutun et al., 2018**). En fait, ces HEs sont des composés hydrophobes et volatils qui sont principalement extraits et isolés de différentes parties de la plante (fleurs, feuilles, racines, écorce, graines, pelures, *etc.*), et ce, à l'aide de plusieurs méthodes classiques et avancées (**Wiese et al., 2018 ; Burger et al., 2019**). En effet, les méthodes conventionnelles et les plus couramment utilisées sont l'hydrodistillation, la distillation à la vapeur d'eau et l'extraction par solvant organique (**Drinic et al., 2020 ; Yu et al., 2021**). Notons cependant que les principales limites de ces technologies d'extraction conventionnelles sont la longue durée d'extraction, la consommation excessive d'énergie, l'exigence de solvants de haute pureté et la décomposition thermique des composés thermolabiles, ainsi que la faible efficacité de l'extraction dans certains cas (**Stratakos & Koidis, 2016 ; Zhang et al., 2021 ; Fragkouli et al., 2023**).

De nos jours, des techniques alternatives pour l'obtention des HEs ont été développées. Il s'agit notamment de l'extraction à l'eau sous-critique, l'extraction au dioxyde de carbone supercritique et l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) (**Drinic et al., 2020**). Ces méthodes se distinguent par leur rentabilité, leur durabilité, leur efficacité et leur capacité à produire des HEs aux caractéristiques identiques, voire améliorées (**Stratakos & Koidis, 2016**). Parmi ces innovations, l'HDMO se démarque par ses avantages significatifs, à savoir : i) un temps d'extraction réduit, ii) de

meilleurs rendements, iii) une plus grande concentration de composés oxygénés, iv) une faible empreinte environnementale, et v) des coûts d'exploitation réduits (**Drinic et al., 2020**).

Au cours de la floraison des plantes, les types, les teneurs et les proportions des composants aromatiques ont une forte influence sur l'attraction des pollinisateurs tels que les abeilles domestiques (**Zhang et al., 2021**). Ces dernières, et particulièrement les abeilles occidentales de l'espèce *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae), sont considérées comme les insectes pollinisateurs les plus importants au monde (**Gallai et al., 2009 ; Tihelka, 2018**). Originellement endémique d'Europe, d'Afrique et d'Asie occidentale, l'espèce *Apis mellifera* a été transportée, introduite et répandue dans le monde entier (**Requier et al., 2019**). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle crucial de la pollinisation par les abeilles dans le maintien de la biodiversité de nombreux écosystèmes et dans la production agricole. Elles favoriseraient ainsi la production d'une grande variété de produits alimentaires, notamment les fruits et légumes, tout en améliorant les rendements et la qualité des cultures (**Sanchez- Bayo & Goka, 2014 ; Fikadu, 2020 ; Havard et al., 2020**). Ainsi, une certaine synergie et un échange de bénéfices mutuels s'installent entre les abeilles et les plantes. En effet, les plantes dépendent des pollinisateurs pour assurer une fécondation efficace, ce qui les pousse par conséquent à attirer les abeilles grâce à des signaux olfactifs, visuels et gustatifs. En retour, les abeilles, essentielles au fonctionnement de leur colonie, s'appuient sur les plantes pour collecter le pollen, le nectar, la propolis et l'eau des fleurs qui leur sont nécessaires pendant la période de recherche de nourriture (**Bankova et al., 2018 ; Dolezal & Toth, 2018 ; Potrich et al., 2020**).

Au cours des dernières décennies, la santé des abeilles domestiques a été gravement menacée par de multiples facteurs de stress environnementaux, qu'ils soient biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs figurent la pollution, les changements climatiques, la perte d'habitat, la carence nutritionnelle, l'exposition aux pesticides et aux agents pathogènes (**Blacquièrre et al., 2012 ; Decourtye et al., 2019 ; Hristov et al., 2020 ; Kumar et al., 2020**). Parmi les agents pathogènes qui affectent la santé des abeilles, il existe : i) les bactéries des genres *Paenibacillus larvae* et *Melissococcus plutonius*, ii) les champignons et microsporidies dont *Ascosphaera apis* et *Nosema spp* et, iv) les acariens parasites et les virus associés, notamment *Acarapis woodi* et *Varroa destructor* (**Blacquièrre et al., 2012 ; Steinhauer et al., 2018 ; Harwood & Dolezal, 2020 ; Schittny et al., 2020**). Ce dernier acarien, *i.e.*, *Varroa destructor* Anderson et Trueman (2000) (Acari : Varroidae), est un ectoparasite obligatoire responsable de la varroase qui est la maladie la plus pathogène et la plus destructrice de l'abeille domestique occidentale *Apis mellifera*. Cette maladie a pour conséquence des pertes massives de colonies d'abeilles dans le monde entier particulièrement en hiver (**Hristov et al., 2020**). Cependant, depuis quatre décennies, la lutte contre cette maladie repose principalement

sur l'utilisation de pesticides de synthèse, notamment les bandes imprégnées d'acaricides synthétiques, dont l'efficacité dépend du climat, des conditions dans la ruche et des techniques d'application (Lozano *et al.*, 2019 ; Noel *et al.*, 2020). Par ailleurs, des études ont montré que leur utilisation massive favoriserait l'émergence de souches résistantes d'agents pathogènes et la contamination des produits de la ruche (Flesar *et al.*, 2010). Face à cette problématique, il est donc devenu urgent de remplacer ces pesticides de synthèse par des molécules naturelles plus sûres pour la santé humaine et pour l'environnement (Johnson *et al.*, 2010 ; Porrini *et al.*, 2017 ; Cipcigan *et al.*, 2020). Parmi ces alternatives, les HEs, les extraits de plantes, les acides organiques et les produits de l'abeille, tels que la propolis, représentent les produits naturels les plus fréquemment utilisés (Giovenazzo & Dubreuil, 2011 ; Sabahi *et al.*, 2017 ; Noel *et al.*, 2020). Ces composés, souvent appliqués comme fumigants dans la ruche ou comme traitements de contact, présentent une faible toxicité pour les abeilles et laisseraient peu de résidus dans les produits apicoles (Ebert *et al.*, 2007 ; Lin *et al.*, 2019).

En plus de la fumigation, les formulations à base d'HEs peuvent être utilisées comme, émulsions, granulés ou par pulvérisations directes (Saroj *et al.*, 2020). De plus, les huiles les plus importantes incluent l'huile de clou de girofle (eugénol), l'huile de thym (thymol, carvacrol), l'huile de menthe (menthol, pulégone), l'huile de citronnelle (citronellal, citral), l'huile de cannelle (cinnamaldéhyde), l'huile de romarin (1,8-cinéole) et l'huile d'origan (carvacrol) (Isman & Machial, 2006). Des formulations ont déjà été développées et mises sur le marché, comme par exemple celles dénommées ApiLife Var®, Thymovar® et Apiguard®, qui sont à base de thymol et qui ont été homologuées pour lutter contre *Varroa destructor*, (Bonnafé *et al.*, 2014 ; Glavan *et al.*, 2020).

Dans une démarche alliant respect de l'environnement, une chimie douce, verte et économique et la valorisation de ressources biologiques, nous avons orienté nos travaux de recherche sur l'étude de quelques plantes aromatiques et médicinales algériennes, notamment *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia campestris* L., *Artemisia judaica* et *Ruta montana*. Nos objectifs principaux étaient d'extraire leurs HEs et d'évaluer, en conditions de laboratoire, leur activité acaricide vis-à-vis de l'ectoparasite obligatoire de l'abeille *Varroa destructor*. Ainsi, l'ensemble des travaux réalisés sont rassemblés dans ce manuscrit et sont présentés sous forme de trois principaux chapitres distincts.

Le **premier chapitre** comprend une revue de la littérature décrivant les monographies des quatre espèces végétales étudiées, les concepts fondamentaux sur les huiles essentielles, ainsi que les différentes techniques d'extraction de ces HEs, qu'elles soient classiques ou innovantes. Nous y détaillons également la biologie de l'abeille *Apis mellifera intermissa*, son parasite *Varroa destructor*,

la varroase et les différentes approches existantes pour lutter contre cet ectoparasite.

Le **deuxième chapitre**, quant à lui, est relatif aux HEs et à leur extraction à partir des parties aériennes des plantes étudiées, et ce, à l'aide de deux techniques, à savoir l'hydrodistillation conventionnelle et l'hydrodistillation assistée par microondes, avec un accent mis sur la première méthode. Nous avons néanmoins comparé ces deux techniques en termes de rendement, de durée d'extraction et de composition chimique des HEs.

Enfin, le **troisième chapitre**, qui se distingue des autres par son originalité, est dédié à l'étude *in vitro* de l'activité acaricide des HEs extraites, par HD conventionnelle, contre *Varroa destructor*. Ce chapitre est également particulier car il renferme la première étude où la toxicité des HEs d'intérêt a été évaluée sur l'abeille domestique *Apis mellifera intermissa* afin d'en comprendre l'impact global. Ce dernier travail a d'ailleurs fait l'objet d'une publication scientifique dans un journal international.

# Chapitre 1 : *Revue de l'état de l'art*

Dans cette revue bibliographique, sera présentée une monographie détaillée des espèces végétales étudiées dans ce travail de recherche, à savoir *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica* et *Ruta montana*. Ceci commencera par une définition générale des huiles essentielles (HE) ainsi qu'une description des différentes méthodes d'extraction utilisées. Ensuite, l'accent sera mis sur les deux techniques étudiées dans ce travail. Il s'agit notamment de l'hydrodistillation conventionnelle (HD) et de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO). La biologie de l'abeille domestique locale, *Apis mellifera intermissa*, sera également explorée, et ce, en décrivant les nombreuses maladies auxquelles elle est exposée ainsi que les traitements utilisés pour les combattre. Enfin, nous nous focaliserons sur l'une de ces maladies, la varroase, qui fait l'objet de cette thèse et qui est causée par l'ectoparasite *Varroa destructor*.

# I. Monographie des plantes aromatiques et médicinales étudiées

L'Algérie qui, rappelons-le, couvre une superficie de 2 381 741 km<sup>2</sup>, représente le deuxième plus grand pays au monde et le pays d'Afrique, du monde arabe et du bassin méditerranéen le plus étendu. Il comprend ainsi une grande variété d'écosystèmes et de paysages dont les principaux sont : i) les plaines, vallées littorales et les petites chaînes de montagnes côtières au nord avec leur climat méditerranéen, ii) l'Atlas Tellien central et ses hauts plateaux et plaines semi-arides, et, iii) les massifs de l'Atlas sahélien, la fameuse porte du désert et le Sahara Algérien au Sud, caractérisés par leur climat désertique (**Ammar et al., 2020 ; Kadri et al., 2022**). Ainsi, cette diversité de climats, d'écosystèmes et de paysages cache, entre autres, une richesse floristique remarquable. En effet, la flore algérienne telle que récemment recensée et relatée dans la littérature comprend environ 3139 espèces réparties dans 150 groupes botaniques, parmi lesquels 653 espèces sont endémiques (**Zahnit et al., 2022**).

## 1. Famille des Astéraceae

La famille des astéraceae (ou Composées) est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, comprenant plus de 1600 genres et environ 25 000 espèces à travers le monde (**Rolnik & Olas, 2021**). La majorité de ces espèces sont herbacées, tandis qu'un nombre réduit est constitué d'arbustes et d'arbres (**Fragkouli et al., 2023**). Elles prospèrent dans une grande variété de climats, allant des déserts chauds aux environnements semi-désertiques froids ou chauds et sont présentes sur tous les continents, depuis les régions subpolaires jusqu'aux zones tropicales (**Raj et al., 2022**).

Ces plantes et leurs extraits agissent comme des produits chimiques naturels car ils contiennent des substances phytochimiques tels que les flavonoïdes, terpénoïdes, phénols, polyphénols, amides, aldéhydes et saponines (**Jaison et al., 2023**). De plus, elles sont reconnues pour leur puissante activité antioxydante, anti-inflammatoire et antimicrobienne, ainsi que pour leurs propriétés diurétiques et cicatrisantes (**Rolnik & Olas, 2021**). Par ailleurs, les HEs issues de certaines de ces espèces présentent des propriétés insecticide et fongicide (**Fragkouli et al., 2023**).

### 1.1. Le genre *Artemisia*

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Asteraceae, et constitue l'un des genres disséminés les plus vastes et les plus importants en raison de la diversité de ses espèces et de sa richesse phytochimique. Ce genre est divisé en deux sections principales : *Artemisia* et *Dracunculus*.

Il regroupe environ 500 espèces, connues sous des noms communs tels que l'armoise, l'estragon, ou le bois de ver. Ces espèces peuvent être bisannuelles, annuelles, vivaces, herbacées ou arbustives. Le nom générique « *Artemisia* » est dérivé d'Artémis, la déesse grecque de la chasse et de la nature sauvage.

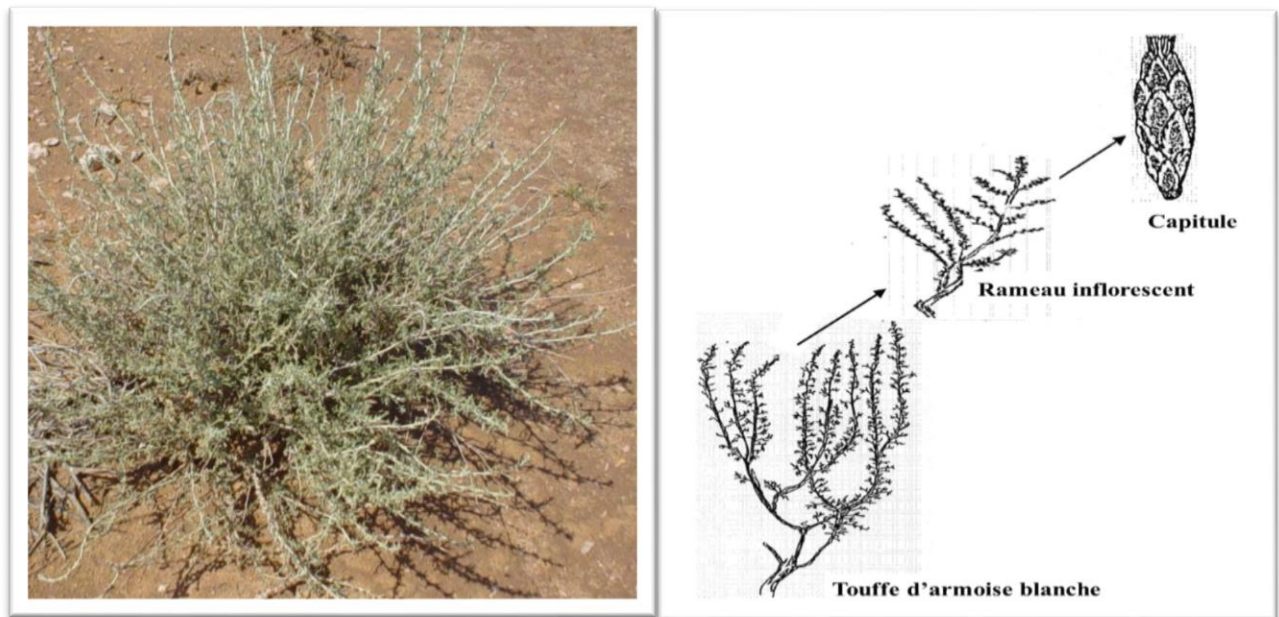
Les espèces du genre *Artemisia* renferment une large gamme de composés, notamment des polyphénols et des HEs, produites par des poils sécréteurs situés sur les organes aériens ainsi que par les canaux sécréteurs présents dans le parenchyme (Nigam *et al.*, 2019 ; Koul & Khatri, 2020 ; Bisht *et al.*, 2021 ; Ivănescu *et al.*, 2021). Ces espèces de *Artemisia* sont reconnues pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antitumorales, antispasmodique, antimicrobienne, insecticide, antipaludique, antifongique et antioxydantes. Elles sont traditionnellement utilisées pour le traitement de diverses maladies telles que le paludisme, l'hépatite, le cancer, l'inflammation ainsi que des infections fongiques, bactériennes et virales (Nigam *et al.*, 2019).

En Algérie, onze espèces distinctes de *Artemisia*, sont présentes, parmi lesquelles *A. herba-alba*, *A. campestris* ssp. eu-campestris, *A. campestris* ssp. glutinosa, *A. absinthium*, *A. atlantica*, *A. arborescens* L., *A. judaica* L., *A. atlantica*, *A. verlotorum*, *A. vulgaris* L., et *A. alba*. Ces espèces, sont généralement de petits arbustes qui atteignent une hauteur d'environ un mètre (Boukhalkhal *et al.*, 2018 ; Zahnit *et al.*, 2022).

### 1.1.1. *Artemisia herba alba*

#### 1.1.1.1. Description botanique

*Artemisia herba-alba* est une plante vivace de couleur vert-argent appartenant à la famille des Astéraceae (Cheraif *et al.*, 2020), atteignant une hauteur de 20 à 40 cm (Al-Wahaibi *et al.*, 2018). Les feuilles, fortement aromatiques, sont couvertes de fins poils glandulaires qui réfléchissent la lumière du soleil, donnant à la plante un aspect grisâtre. Les pousses stériles présentent des feuilles grises, pétiolées, ovales à orbiculaires, tandis que les pousses fleuries possèdent des feuilles plus petites et abondantes. Les fleurs sont sessiles, oblongues et effilées à la base, et chaque réceptacle porte de 2 à 5 fleurs hermaphrodites de couleur jaune (figure I. 1). La période de floraison de *Artemisia herba alba* s'étend généralement de septembre à décembre (Koul & Khatri, 2020).



**Figure I. 1 : Touffe de *Artemisia herba alba*.** (a) Photographie d'un plan de *A. herba alba* dans son milieu naturel (Chehema, 2006), (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de *A. herba alba* (Touil, 2012).

#### 1.1.1.2. Noms communs

*Artemisia herba alba* est souvent connue sous les noms de « thym des steppes » ou « semen contra de Barbarie » (Delille, 2007).

#### 1.1.1.3. Noms vernaculaires

Communément appelée armoise blanche, *Artemisia herba-alba* Asso ou est également connue sous les noms locaux suivants : chih-labyadh, chih-lahmar, chi-azgah, chiha, alala, seri, abelbel, azzere, zezzeri et ifsi (Delille, 2007 ; Cheraif *et al.*, 2020 ; Houti *et al.*, 2023).

#### 1.1.1.4. Systématique

Selon Quezel & Santa (1963), la classification systématique de *Artemisia herba alba* est la suivante :

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** Spermatophyte

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Gamopétales

**Ordre :** *Astérales*

**Famille :** Astéraceae

**Sous-famille :** Radiées

**Genre :** *Artemisia*

**Espèce :** *Artemisia herba alba*

#### **1.1.1.5. Habitat et distribution**

*Artemisia herba alba* est un arbuste nain pérenne, qui pousse dans les climats arides et semi-arides, avec une croissance rapide dans les zones sèches, chaudes et boueuses (Aljaiyash *et al.*, 2018 ; Abdelali *et al.*, 2022). Il est largement répandu dans la moitié nord du globe, incluant les steppes et déserts d'Afrique du Nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Libye et Égypte), du Moyen-Orient (Turquie, désert du Sinaï, Jordanie et Arabie Saoudite), ainsi qu'en Asie et dans le nord-ouest de l'Himalaya, en Europe (Espagne) et en Amérique du Nord (Houti *et al.*, 2023). En Algérie, *A. herba-alba* est particulièrement abondante dans les zones arides, steppiques et sahariennes (Bertella *et al.*, 2018).

#### **1.1.1.6. Usages et propriétés biologiques**

Cette espèce est utilisée traditionnellement pour traiter divers troubles gastriques tels que la diarrhée, les douleurs abdominales, les ulcères, la dyspepsie, les troubles hépatiques, ainsi que les infections fongiques, les piqûres d'insectes et de scorpions, et les empoisonnements. Ses propriétés antiseptiques, antispasmodiques et antitumorales lui confèrent une grande popularité. (Bekka-Hadji *et al.*, 2022 ; Kadri *et al.*, 2022). En effet, l'huile essentielle extraite de cette plante possède des propriétés antioxydantes, désinfectantes, antibactériennes, antileishmaniennes, anthelminthiques, nématocides et antispasmodiques (Aljaiyash *et al.*, 2018 ; Abdelali *et al.*, 2022). De plus, certaines études montrent que les HEs de *A. herba alba* peuvent être utilisées comme bioinsecticides écologiques (Aimad *et al.*, 2022).

### **1.1.2. *Artemisia campestris***

#### **1.1.2.1. Description botanique**

*Artemisia campestris* est un sous-arbrisseau vivace, spontané, aromatique et médicinal, pouvant atteindre entre 30 à 150 cm de hauteur. Ses tiges ramifiées et ascendantes forment des panicules. Elle est généralement rouge brunâtre et glabre, et devient lignifiée dans la partie inférieure tandis que la partie supérieure est pubescente (Dib *et al.*, 2016 ; Boutemak *et al.*, 2017). Les feuilles basales sont pinnatifides ou bipinnatifides avec des lobes linéaires et étroits. La face supérieure des feuilles est grise-bleuâtre et canescente, tandis que les pétioles varient en longueur (figure I. 2) (Al-Snafi, 2015).



**Figure I. 2 : *Artemisia campestris*.** (a) Photographie d'un plan de *A. campestris* dans son milieu naturel (Chehema, 2006) (b) Schéma illustrant les aspects morphologiques de *A. campestris* (site web, <http://www.atlasflore04.org>).

#### 1.1.2.2. Noms communs

Aurone des champs, aurone.

#### 1.1.2.3. Noms vernaculaires

*Artemisia campestris* L. est communément appelée degoufet, tgouft, alala, tedjouq, degouft, chaal, khiçoum, tagouft, tagoug et tieredjeli (Delille, 2007 ; Ammar *et al.*, 2020).

#### 1.1.2.4. Systématique

Selon Quezel & Santa (1963), la classification systématique de *Artemisia campestris* est la suivante :

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** Spermatophyte

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Gamopétales

**Ordre :** *Astérales*

**Famille :** Astéraceae

**Sous-famille :** Radiées

**Genre :** *Artemisia*

**Espèce :** *Artemisia campestris*

### 1.1.2.5. Habitat et distribution

*A. campestris* pousse dans les régions steppiques et désertiques (Mammeri *et al.*, 2022). Cette espèce est largement répandue en Asie, en Amérique du Nord, en Europe et en Afrique du Nord (Cheraif *et al.*, 2020).

### 1.1.2.6. Usages et propriétés biologiques

Le profil phytochimique de *A. campestris* L. révèle une forte concentration de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de coumarines, d'isocoumarines, d'acides gras, ainsi qu'une teneur élevée en huile essentielle. Cette plante est traditionnellement médicinale est utilisée pour traiter divers troubles notamment les problèmes digestifs, les douleurs d'estomac, les ulcères gastriques, les nausées, les douleurs menstruelles et l'hypertension (Boutemak *et al.*, 2017 ; Boukhalkhal *et al.*, 2018 ; Ammar *et al.*, 2020).

Les activités pharmacologiques couvrent une large gamme d'applications, incluant les effets antioxydants, antifongiques, insecticides, antibactériens, antimutagènes, antitumoraux, anthelminthiques et antihypertensifs (Dib *et al.*, 2016). En effet, les feuilles de cette plante sont souvent utilisées en macération dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antirhumatismales et antivenimeuses (Bisht *et al.*, 2021).

## 1.1.3. *Artemisia judaica*

### 1.1.3.1. Description botanique

*Artemisia judaica* est un petit arbuste vivace et odorant qui peut atteindre une hauteur de 1,5 m. Il est caractérisé par des fleurs jaunes et des feuilles pubescentes (Janackovic *et al.*, 2015 ; Ramdane *et al.*, 2017). Les feuilles, fortement aromatiques, sont grisâtres, disséquées, courtes et serrées. La plante présente des bases ligneuses avec des branches robustes et étalées, couvertes de poils laineux. Les têtes florales sont arrondies, serrées et composées de fleurons tubulaires (figure I. 3) (Benmansour *et al.*, 2016 ; Abu-darwish *et al.*, 2016).



**Figure I. 3 : *Artemisia judaica*.** (a) Photographie d'un plan de *Artemisia judaica* (Marakhova & Emam, 2022), (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de *A. judaica* (site web, [https://species.wikimedia.org/wiki/Artemisia\\_judaica](https://species.wikimedia.org/wiki/Artemisia_judaica)).

#### 1.1.3.2. Noms communs

Armoise de Judée.

#### 1.1.3.3. Noms vernaculaires

Il est connu sous le nom arabe de shaica, shih, Shih Sahrawi, Teherégélé et Tiherdjeli (Dob & Chelghoum, 2006 ; Acheuk *et al.*, 2017 ; Nigam *et al.*, 2019 ; Zeragui *et al.*, 2019).

#### 1.1.3.4. Systématique

Selon Quezel & Santa (1963), la classification systématique de *Artemisia judaica* est la suivante :

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** Spermatophyte

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Gamopétales

**Ordre :** *Asterales*

**Famille :** Astéraceae

**Sous-famille :** Radiées

**Genre :** *Artemisia*

**Espèce :** *Artemisia judaica*

### 1.1.3.5. Habitat et distribution

C'est une espèce qui pousse abondamment dans les déserts du sud de l'Algérie, ainsi qu'en Libye, en Égypte, notamment dans le désert du Sinaï et dans diverses régions du Moyen-Orient comme la Jordanie et l'Arabie Saoudite) (**Benmansour et al., 2016 ; Acheuk et al., 2017 ; Mohammed et al., 2022**). En Algérie, cette espèce couvre plus de 3 millions d'hectares, principalement dans les zones arides et semi-arides (**Ghanai et al., 2018**).

### 1.1.3.6. Usages et propriétés biologiques

Les propriétés médicinales de *Artemisia judaica* sont nombreuses et incluent l'amélioration de la vision, de la santé cardiovasculaire, de la force capillaire, de la structure des tissus conjonctifs et de l'apparence de la peau. Elle est également réputée pour renforcer le système immunitaire et réduire les risques d'athérosclérose, de cancer, d'arthrite et de troubles gastro-intestinaux (**Janackovic et al., 2015**). En outre, les études biologiques ont indiqué que les extraits de *A. judaica* possèdent des activités acaricide, allélopathique et antioxydante (**Benmansour et al., 2016**). Les HEs de *A. judaica* présentent des effets antihelminthiques, anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques, antihelicobacter, antioxydants, antimicrobiens, anti-angiogénique, insecticide. Elles augmentent également la concentration isotonique des muscles isolés de l'aorte, du duodénum et de la gorge (**Al-Wahaibi et al., 2018 ; Amin et al., 2019 ; Driouche et al., 2022 ; El-gohary et al., 2021**).

## 2. La famille des Rutaceae

La famille des Rutaceae (famille des agrumes) est particulièrement réputée pour son importance économique, notamment grâce aux agrumes cultivés, au bois et aux huiles aromatiques extraites des inflorescences et les feuilles. Ces huiles constituent une source précieuse de nombreuses substances médicinales (**Akkari et al., 2014 ; Coimbra et al., 2020**). Les Rutaceae sont présentes dans toute la région méditerranéenne ainsi que dans les régions tempérées et tropicales. Parmi elles, le genre *Ruta* étant le plus représentatif (**Akkari et al., 2014**). La famille des Rutaceae compte environ 150 genres et plus de 1600 espèces (**Bejaoui et al., 2019**). De nombreuses recherches ont été menées sur cette famille, mettant en lumière l'application potentielle de leurs composés naturels dans le traitement des maladies aussi diverses que la maladie d'Alzheimer, la dépression et le cancer, ainsi que dans le traitement des infections, grâce à leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, antileishmaniennes et antiplasmodiales (**Coimbra et al., 2020**).

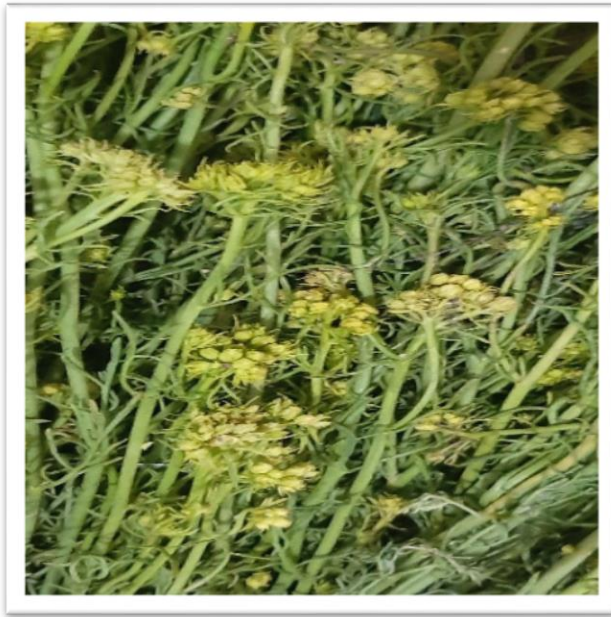
## 2.1. Le genre *Ruta*

L'un des genres étudiés de la famille des Rutaceae est *Ruta*, qui comprend des espèces d'arbustes vivaces à feuilles persistantes, fortement parfumées, que l'on trouve principalement dans les régions tempérées et tropicales, originaires de la région méditerranéenne. En effet, Bien que d'origine méditerranéenne, les espèces de *Ruta* sont largement répandues dans le monde entier (Coimbra *et al.*, 2020 ; Drioiche *et al.*, 2020). Il convient également de noter que le nombre d'espèces de *Ruta*, tel qu'il est revendiqué par divers auteurs, varie de huit à 160 espèces (Nahar *et al.*, 2021). En Algérie, ce genre est représenté par cinq espèces : *Ruta montana*, *Ruta chalepensis*, *Ruta graveolens*, *Ruta angustifolia* et l'espèce saharienne *Ruta tuberculata* (Mohammedi *et al.*, 2019). Parmi celles-ci, *Ruta chalepensis* L., *Ruta graveolens* L. et *Ruta montana* L. sont les trois espèces les plus répandues et les plus étudiées. Ces espèces sont également riches en HEs, ce qui contribue à leurs propriétés aromatiques, agrochimiques et médicinales (Nahar *et al.*, 2021). En fait, les espèces de *Ruta* sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses affections, notamment les troubles menstruels, les inflammations cutanées, les crampes et les douleurs auriculaires, la fatigue oculaire, les yeux douloureux. Elles sont également employées comme répulsifs contre les insectes. De plus, le genre *Ruta* possède plusieurs activités biologiques reconnues telles que les activités anti-inflammatoires, antiulcéreux, antidiabétiques, anti-diarrhéiques, antirhumatismales et antimicrobiennes (Bejaoui *et al.*, 2019).

### 2.1.1. *Ruta montana*

#### 2.1.1.1. Description botanique

*Ruta* est un genre de sous-arbrisseau vivace mesurant entre 20 et 60 cm de hauteur, réputé pour son parfum prononcé. Ses fleurs, de couleur jaune, possèdent deux verticilles d'étamines et sont bisexuées. La plante se distingue principalement par ses feuilles persistantes dotées de cavités sécrétoires contenant des huiles aromatiques, qui émettent une odeur dissuasive et ont un goût amer (figure I. 4) (Coimbra *et al.*, 2020).



**Figure I. 4 : *Ruta montana*.** (a) Photographie originale de *R. montana*, (b) Schéma illustrant les différents aspects morphologiques de *R. montana* (site web, <https://www.tela-botanica.org/flore>).

#### 2.1.1.2. Noms communs

Rue des montagnes.

#### 2.1.1.3. Noms vernaculaires

Elle est connue par les noms vernaculaires suivants : fidjel en arabe et aourmi en berbère (Hammiche & Azzouz, 2013 ; Mohammedi *et al.*, 2019).

#### 2.1.1.4. Systématique

Selon Quezel & Santa (1963), la systématique de *Ruta montana* est la suivante :

**Règne :** *Plantae*

**Embranchement :** Spermatophytes

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Dicotylédones

**Sous-classe :** Dialypétales

**Ordre :** *Sapindales*

**Famille :** *Rutaceae*

**Sous-famille :** *Rutoideae*

**Genre :** *Ruta*

**Espèce :** *Ruta montana*

#### **2.1.1.5. Habitat et distribution**

Les espèces de *Ruta* se trouvent principalement dans la région méditerranéenne mais elles poussent également dans les pays tropicaux et tempérés. Elles sont largement réparties géographiquement, notamment au Portugal, en Grèce, en Turquie, en Algérie, en Tunisie et au Maroc (Benali *et al.*, 2020 ; Drioiche *et al.*, 2020).

#### **2.1.1.6. Usages et propriétés biologiques**

Des études antérieures ont révélé que *R. montana* peut être considéré comme une source importante de composés bioactifs tels que des alcaloïdes, des coumarines, des flavonoïdes, des tanins et des huiles essentielles. Cette espèce est utilisée en médecine traditionnelle comme hypoglycémiant, antirhumatismale, anthelminthique, antiépileptique, antispasmodique, diurétique et antipyrétique (Mohammedi *et al.*, 2019 ; Drioiche *et al.*, 2020 ; Zeraib *et al.*, 2021). Les HEs de *R. montana* ont montré plusieurs activités biologiques incluant des effets antifongiques, antibactériens, antioxydants, insecticides, larvicides, nématocides, pesticides, phytotoxique et insectifuges (Mohammedi *et al.*, 2019 ; Nahar *et al.*, 2021).

## II. Les huiles essentielles

### 1. Historique

Depuis l'antiquité, il est reconnu que certaines espèces de plantes, environ 10 %, sont considérées comme « plantes aromatiques » en raison de leur capacité naturelle à produire des composés chimiques volatils à l'état de traces, que l'on peut extraire sous forme d'huiles essentielles (Stratakos & Koidis, 2016 ; Souiy, 2023). L'utilisation des parfums et des arômes remonte aux civilisations anciennes, où ils jouaient un rôle important dans les applications nutritionnelles, esthétiques et spirituelles notamment à l'époque pharaonique et dans la médecine traditionnelle chinoise (Li *et al.*, 2014 ; Costa Vieira *et al.*, 2016). Des composés aromatiques spécifiques, tels que les sesquiterpènes, présents dans les extraits d'encens, ont été découverts dans les bandages des momies, attestant de leur utilisation pour les rituels religieux. Les Grecs et les Romains ont également contribué à l'élaboration des bases de la distillation, notamment à travers l'invention de l'ambix, utilisé à la fois pour l'extraction et la distillation. Ils ont aussi développé des techniques simples de fumigation, comme l'usage de brindilles de lavande brûlées pour désinfecter les chambres de malades, technique qui fut également utilisée en Europe du Nord pour prévenir de la peste.

L'essor de l'aromathérapie a été fortement encouragé par la civilisation musulmane, avec des figures comme Geber (712-815) et Avicenne (930-1037), qui ont respectivement inventé l'alambic, la distillation et le réfrigérant. L'invention de la fiole florentine par Giovanni Battista Della Porta (1533-1615) a par la suite facilité la séparation des huiles essentielles et de l'eau après extraction ou distillation.

Depuis ces avancées, l'industrie des arômes a connu plusieurs évolutions : la popularité des parfums de cuir au XVI<sup>e</sup> siècle, la création de l'huile de bergamote et de néroli au XVII<sup>e</sup> siècle, le développement des premiers arômes synthétiques au XIX<sup>e</sup> siècle et l'apparition des parfumeurs célèbres au XX<sup>e</sup> siècle. Aujourd'hui, les huiles essentielles sont largement utilisées dans les domaines des parfumeries, des cosmétiques, de l'alimentation, des produits pharmaceutiques et des produits ménagers. De plus, elles jouent un rôle de plus en plus important en aromathérapie, psychothérapie et physiothérapie (Li *et al.*, 2014).

### 2. Définition d'une huile essentielle

Les HEs ont été définies en 1998 par l'Association française de normalisation (AFNOR) dans la norme ISO 9235, révisée en 2013, comme des produits obtenus à partir de matières premières végétales, principalement par distillation, ou uniquement par des procédés mécaniques pour les agrumes, soit par distillation "sèche" pour les bois. Après extraction, elles sont séparées de la phase aqueuse par des méthodes physiques (ISO 9235). Le terme "essence" fait référence aux parfums

exhalés, qui sont des sécrétions naturelles produites par différents organes des plantes et résultent de la présence de composés aromatiques volatils dans les cellules végétales. L'huile désigne la nature lipophile (c'est-à-dire hydrophobe) et visqueuse de ces substances, tandis que le terme "essentielle" indique leur préciosité et leur lien étroit avec les caractéristiques olfactives des plantes (**Turek & Stintzing, 2013 ; Li *et al.*, 2014 ; Dhifi *et al.*, 2016**). En outre, les huiles essentielles se distinguent des huiles fixes par leurs propriétés physico-chimiques : elles sont des mélanges complexes de composés organiques volatils liquides et lipophiles, de faible poids moléculaire. Leur volatilité est un critère majeur qui les différencie des huiles fixes (**Costa Vieira *et al.*, 2016 ; Severino *et al.*, 2018**). En fait, plusieurs facteurs influencent leurs propriétés physico-chimiques, comme le lieu et le moment de la collecte, le processus d'extraction, les conditions météorologiques, la nutrition des plantes et le stress subi. Des différences chimiques significatives peuvent exister entre les huiles essentielles extraites de différentes parties d'une même plante, bien que leur apparence soit similaires (**Carson & Hammer, 2011 ; Severino *et al.*, 2018**).

### **3. Caractéristiques et propriétés physico-chimiques d'une huile essentielle**

Les HEs sont les métabolites secondaires produits par les plantes aromatiques et sont constituées d'une combinaison complexe de plusieurs composants (**Gavahian *et al.*, 2019**). En effet, ce sont des composés naturels, liquides à température ambiante, très volatils et dotés d'une odeur agréable, de nature huileuse ou lipidique. De plus, elles ne représentent qu'une faible proportion du poids humide de la matière végétale, généralement environ 1 % (**Carson & Hammer, 2011**). Bien qu'elles soient peu solubles dans l'eau, elles sont solubles dans les graisses, l'alcool, les solvants organiques ainsi que d'autres substances hydrophobes (**Carson & Hammer, 2011 ; Rathore, 2017**). Ces huiles sont habituellement incolores ou légèrement colorées, mais elles sont sensibles à la lumière, à la chaleur et à l'air, ce qui les rend instables dans ces conditions (**Costa Vieira *et al.*, 2016**). En outre, leur densité relative est généralement inférieure à 1 %, sauf pour certaines huiles comme celles de cannelle, de saffran et de vétiver. Elles possèdent également un indice de réfraction et une activité optique relativement élevées (**Raut & Karuppaiyil, 2014 ; Dhifi *et al.*, 2016**).

### **4. Localisation de l'huile essentielle et son rôle dans la plante**

Les HEs sont produites dans des cellules spécialisées, généralement dans différentes parties des plantes, telles que les bourgeons, les pétales de fleurs, les feuilles, les tiges, les graines, les racines, la résine, le bois ou encore l'écorce (**Carson & Hammer, 2011 ; Rathore, 2017**). Aussi, elles sont généralement stockées dans des structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou près de la surface de la plante. Parmi ces structures, nous pouvons citer les cellules à huiles essentielles chez les Lauracées ou les Zingibéracées, les canaux sécréteurs chez les Apiacées ou les Astéracées, les

glandes ou les trichomes (poils glandulaires) chez les Lamiacées ainsi que les poches sécrétrices des Myrtacées ou des Rutacées (Carson & Hammer, 2011 ; Raut & Karuppayil, 2014 ; Bakkali Aissaoui *et al.*, 2018). Les huiles essentielles sont des produits du métabolisme secondaire des plantes jouant un rôle important dans leur maintien, adaptation et développement. Elles agissent comme des messagers internes ou des substances défensives, protégeant les plantes contre les pathogènes et les herbivores. De plus, elles émettent des substances volatiles qui attirent les ennemis naturels des herbivores ou des insectes pollinisateurs vers leurs plantes hôtes. Ces huiles contribuent également à la tolérance des plantes aux températures extrêmes, à l'adaptation au stress hydrique ainsi qu'à la gestion des carences en nutriments et en minéraux du sol (Chiasson & Beloin, 2007 ; Severino *et al.*, 2017 ; Bakkali Aissaoui *et al.*, 2018).

## 5. Composition chimique des huiles essentielles

Les HEs sont des mélanges complexes composés de substances de faible poids moléculaire, généralement inférieures à 500 daltons. Elles peuvent contenir entre 20 et 100 composés chimiques différents, issus de diverses classes telles que les terpénoïdes lipophiles, des phénylpropanoïdes, des lipides, des aldéhydes, des alcools et d'autres substances (Turek & Stintzing, 2013 ; Raut & Karuppayil, 2014 ; Gavahian *et al.*, 2019 ; Zhao *et al.*, 2023). La classification des composants des HEs se base sur leur concentration : 20-95 % sont considérés comme des composants majoritaires, 1-20 % comme secondaires, et <1 % comme des composants à l'état de traces (Mishra *et al.*, 2020). Phytochimiquement, les HEs contiennent des molécules très variées appartenant principalement à deux groupes chimiques par rapport à leurs voies métaboliques : les composés terpéniques (terpènes et leurs dérivés oxygénés) et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (tableau I. 1). Les principaux monoterpènes comprennent des alcools, aldéhydes, carbures, cétones, éthers, esters, peroxydes, phénols et lactones. Les principaux composés phytochimiques des groupes susmentionnés comprennent l' $\alpha$ -pinène, le menthol, le linalol, la carvone, le camphre, l'eucalyptol, la thuyone, le myrcène, le thymol, le cinéole, l'ascaridole et la népétalactone (Chellappandian *et al.*, 2018). Les monoterpènes, les sesquiterpènes et leurs dérivés oxygénés forment le groupe chimique le plus abondant dans les HEs (Raut & Karuppayil, 2014).

**Tableau I. 1 : Principaux composants des huiles essentielles (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).**

<b>Composant</b>	<b>Exemples</b>	<b>Exemples de plantes riches en ces composants</b>
<b>Terpènes</b>	Pinène, camphène, phellandrène, limonène, myrcène	Conifères, ombellifères, agrumes
<b>Sesquiterpènes</b>	Cardinène, sélinène, humulène, cédrène, chamazulène	Gousses de céleri, camomille vraie
<b>Phénols aromatiques</b>	Carvraçol, eugénol, thymol, gaïacol	Cannelle, romarin, menthe, fenouil
<b>Alcools aromatiques</b>	Terpinéol, menthol, cédrool, huile de lin, carotol	Citron, lavande, bois de santal
<b>Oxydes aromatiques</b>	1-8-cinéole, oxyde de linalol, menthofurane, ascaridol, safrol	Cardamome, menthe, eucalyptus
<b>Éther aromatique</b>	Chavicol de méthyle, salicylate de méthyle, cinnamate de méthyle, eugénol de méthyle, transanéthol	Basilic, clous de girofle, laurier
<b>Esters terpéniques et esters sans terpène</b>	Acétate de linalyle, acétate de bornyle, acétate de cinnamique, acétate de terpényle, acétate de néryle	Menthe poivrée, clous de girofle, cannelle
<b>Aldéhydes aromatiques et terpéniques</b>	Benzaldéhyde, citrole, vanilline, néral, citral	Cumin, anis, fenouil
<b>Cétones aromatiques</b>	Carvone, thuyone, camphone, verbénone, fenchone	Romarin, Artemisia, aneth

## **6. Notion de chémotype**

En effet, chaque huile essentielle est caractérisée par quelques composés majeurs qui peuvent atteindre des teneurs élevées, par rapport à d'autres composés présents à l'état de traces. Cependant, la composition de l'huile essentielle de deux plantes de la même espèce botanique, avec le même génome et le même phénotype, n'est pas constante. Des facteurs naturels peuvent être à l'origine de cette variabilité, ce qui entraîne l'apparition de plusieurs races chimiques ou chémotypes au sein d'une même espèce. Ces facteurs peuvent être intrinsèques, liés à la plante, ou extrinsèques, tels que le moment de la récolte, le cycle végétatif, la qualité du sol, les facteurs environnementaux, le climat, l'altitude et l'hygrométrie. En effet, pour une espèce donnée, l'étude de la variabilité chimique des huiles essentielles et la détermination de ses chémotypes sont primordiales, car elles peuvent déterminer non seulement des bioactivités différentes de ces extraits, mais aussi des signes de toxicité très différents (Zouari, 2013 ; Benomari *et al.*, 2023).

## 7. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles

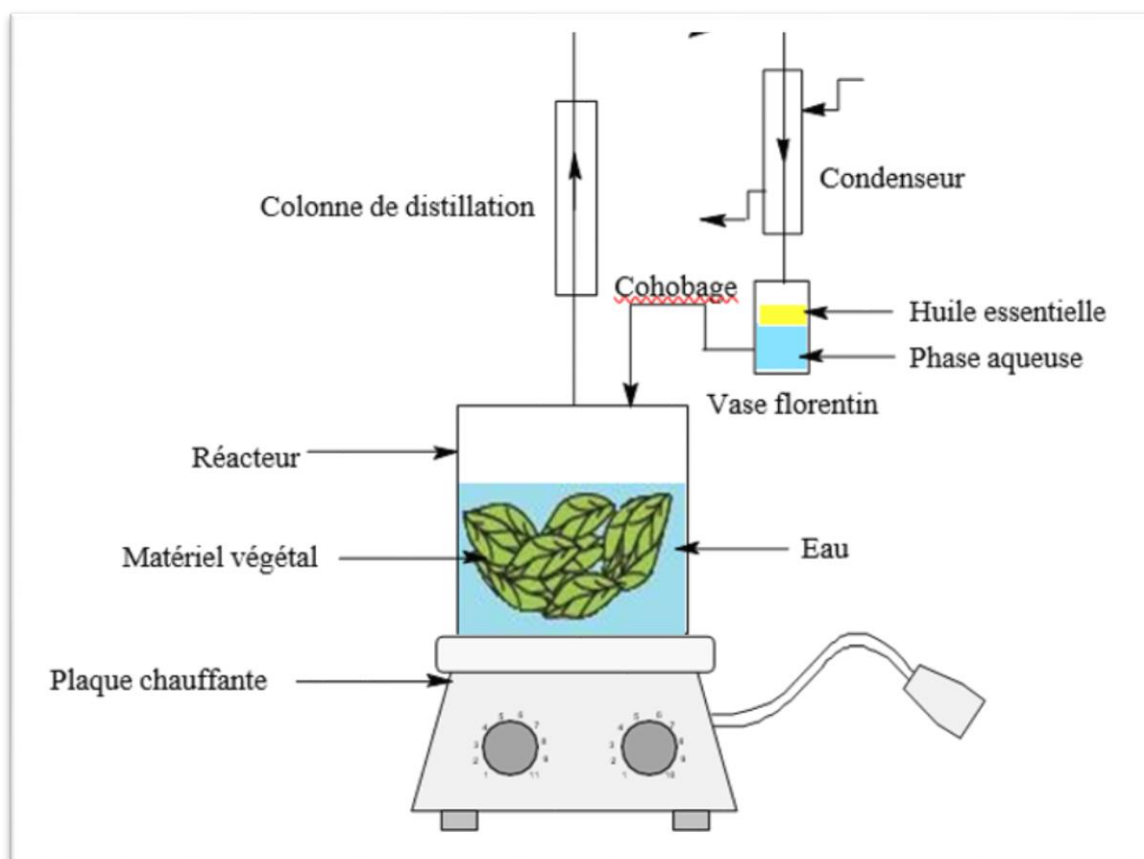
La méthode et les conditions d'extraction des huiles essentielles varient en fonction du type de matériel végétal et des caractéristiques souhaitées des extraits. La technique et les conditions d'extraction sont des étapes cruciales dans la production des huiles essentielles, car ils peuvent influencer directement leurs propriétés physicochimiques, détériorer les composés phytochimiques, réduire le rendement d'extraction, augmenter la consommation d'énergie et prolonger la durée du processus d'extraction (**Gavahian *et al.*, 2019**).

### 7.1. Les méthodes conventionnelles d'extraction des huiles essentielles

Plusieurs méthodes d'extraction ont été traditionnellement utilisées pour obtenir des huiles essentielles ; notamment la distillation, l'extraction par Soxhlet, l'extraction par solvant, la macération, l'enfleurage et la méthode de pressage à froid (**Murti *et al.*, 2023**). Historiquement, trois types de distillation ont été employés : la distillation à l'eau, la distillation eau-vapeur et la distillation à la vapeur. En plus de ces techniques traditionnelles, plusieurs méthodes améliorées sont utilisées, telles que la turbo-distillation, l'hydrodifusion, la distillation sous vide, la distillation continue, l'expression à froid, la distillation à sec et la distillation moléculaire (**Chemat & Lucchesi, 2006 ; Gavahian *et al.*, 2019**). Dans ce travail de thèse, l'hydrodistillation conventionnelle ou classique a été privilégiée.

#### 7.1.1. L'hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus simple et couramment utilisées pour l'extraction d'huiles essentielles à un coût raisonnable. Elle consiste à immerger des plantes dans de l'eau bouillante dans un alambic, permettant ainsi l'extraction des composés volatils par distillation azéotropique (**Burger *et al.*, 2019 ; Mahawer *et al.*, 2022**). Ces composés, dont le point d'ébullition varie généralement entre 100° C et 300° C, s'évaporent à une température proche de celle de l'eau (**Chemat & Cravotto, 2013 ; Reyes-Jurado *et al.*, 2014**) et sont ensuite condensées sous forme d'un mélange d'eau et d'huile. Après refroidissement, l'huile essentielle se sépare facilement de l'eau (figure I. 5) (**Chemat & Cravotto, 2013**). L'eau recondensée, appelée hydrosol ou hydrolat, contient des traces de composés volatils solubles. Dans le cas des fleurs, elle est connue sous le nom d'eau florale. Le processus de cohobation permet de réutiliser cette eau recondensée dans l'alambic pour minimiser les pertes d'ingrédients oxygénés (**Burger *et al.*, 2019**). Les facteurs qui influencent la quantité d'huile essentielle produite incluent la durée de distillation, la température, la pression et surtout la qualité du matériel végétal. Le rendement des huiles essentielles peut varier entre 0,005 % et 10 %, selon le type de plante et les conditions d'extraction (**Chemat & Cravotto, 2013**).



**Figure I. 5 : Schéma représentant le montage utilisé pour l'hydrodistillation (Chenni, 2016).**

### 7.1.2. Inconvénients de l'hydrodistillation

L'hydrodistillation, bien qu'efficace pour l'extraction d'huiles essentielles, présente plusieurs inconvénients. Elle est particulièrement énergivore, car elle nécessite de chauffer l'alambic et de refroidir les vapeurs générées, ce qui entraîne une consommation importante d'énergie. De plus, le procédé est long, pouvant durer plusieurs heures, ce qui prolonge le contact entre le matériel végétal et l'eau bouillante. Ce contact prolongé peut entraîner la thermo-décomposition des composés thermolabiles de l'huile essentielle, altérant ainsi les constituants aromatiques et dégradant la qualité du produit final. Ces phénomènes peuvent ajouter des notes secondaires non désirées, réduisant la pureté et les caractéristiques olfactives des huiles extraites (Burger *et al.*, 2019 ; Fragkouli *et al.*, 2023).

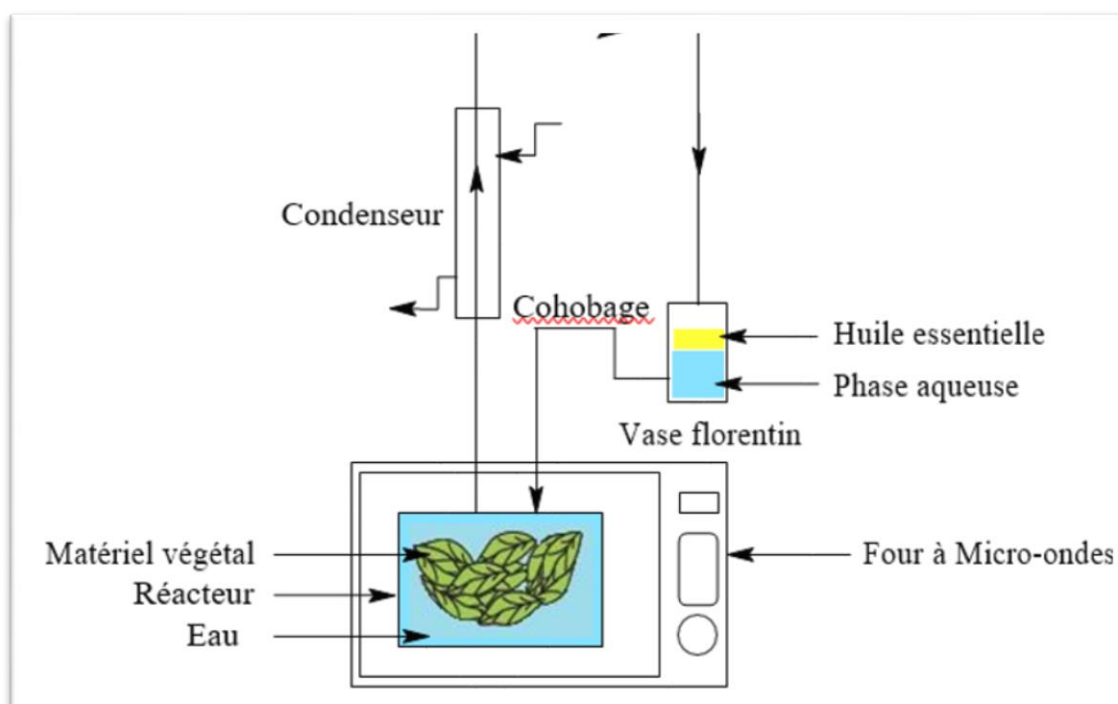
### 7.2. Alternatives aux méthodes d'extraction traditionnelles (Extraction verte)

En réponse aux limites des méthodes d'extraction traditionnelles, les scientifiques ont développé des alternatives plus écologiques et efficaces, communément appelées méthodes d'extraction verte. Ces techniques visent à réduire la consommation d'énergie, diminuer les coûts et améliorer la qualité des extraits. Ces techniques comprennent l'hydrodistillation assistée par micro-ondes, l'extraction par liquide sous pression, l'extraction assistée par ultrasons, l'extraction par fluides

super et sous-critiques, l'hydrodistillation ohmique et l'extraction assistée par enzyme (Filly *et al.*, 2016 ; Gavahian *et al.*, 2019 ; Murti *et al.*, 2023).

### 7.2.1. Hydrodistillation assistée par micro-ondes

L'utilisation de l'énergie des micro-ondes pour l'extraction a considérablement évolué depuis ses premières applications en 1986, comme l'ont montré les travaux de Gedye et Giguere pour la synthèse organique, et de Ganzler et Lane pour l'extraction d'échantillons biologiques. L'une des applications les plus notables est l'hydrodistillation par micro-ondes (HDMO), développée par Stashenko et ses collaborateurs en 2004. Ce procédé repose sur les principes de l'hydrodistillation classique, mais avec des avantages significatifs en termes de rapidité et d'efficacité énergétique. (Chemat & Lucchesi, 2006 ; Chemat & Cravotto, 2013). Contrairement à l'HD, où le chauffage est externe, dans l'HDMO, les micro-ondes chauffent directement le mélange solvant-échantillon grâce à des phénomènes tels que la rotation dipolaire et la conductance ionique. Cela permet un chauffage rapide et uniforme à l'intérieur de l'échantillon, réduisant considérablement le temps d'extraction tout en maintenant une qualité et des rendements comparables. Un autre avantage des micro-ondes est la capacité de briser les liaisons hydrogène faibles, ce qui facilite l'extraction des composés présents dans les structures cellulaires des plantes (Figure I. 6).



**Figure I. 6 : Schéma montrant le montage utilisé pour la réalisation de l'hydrodistillation assistée par micro-ondes.**

Une partie de l'équipement conventionnel, dans lequel le matériel végétal est immergé dans l'eau, est placée à l'intérieur de la cavité à micro-ondes, tandis que le refroidisseur et le système de récupération de l'huile essentielle sont situés à l'extérieur (Chenni 2016).

L'HDMO présente plusieurs atouts, notamment la réduction du volume de solvant et du temps de traitement, ce qui diminue l'impact environnemental en réduisant les émissions de CO<sub>2</sub>. De plus, elle est idéale pour l'extraction de composés thermolabiles, car la température reste relativement basse pendant tout le processus. Cela la rend particulièrement avantageuse pour des industries comme la parfumerie et la pharmaceutique, où la qualité des huiles essentielles est primordiale. (Reyes-Jurado *et al.*, 2014 ; Mahawer *et al.*, 2022 ; Murti *et al.*, 2023). Les avancées dans ce domaine ont permis le développement de plusieurs autres techniques d'extraction par micro-ondes, telles que l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, l'hydrodistillation par micro-ondes sous vide, l'hydrodistillation par micro-ondes, la distillation par micro-ondes à air comprimé, la distillation par micro-ondes dans l'espace de tête et l'hydrodistillation par micro-ondes sans solvant, élargissant ainsi les possibilités d'application des micro-ondes dans l'extraction des composés bioactifs. (Chemat & Lucchesi, 2006).

## 8. Activités biologiques des huiles essentielles

Les HEs et leurs principaux composants ont un large spectre de bioactivité, notamment des activités antibactériennes, antivirales, antiparasitaires, antimutagènes, anticancéreuses, antioxydantes, anti-inflammatoires, immunomodulatrices, antiprotozoaires antifongiques et insecticides et/ou insectifuges contre les bactéries et les champignons pathogènes, les infestations de tiques, les poux humains et les acariens, les ravageurs hématophages et certains ravageurs agricoles à corps mou, les insectes vecteurs et les acariens de l'abeille (Isman & Machial, 2006 ; Turek & Stintzing, 2013 ; Raut & Karuppayil, 2014 ; Isman, 2016 ; Porrini *et al.*, 2017 ; Tutun *et al.*, 2018 ; Gavahian *et al.*, 2019). Ci-dessous, seront détaillées les activités les plus importantes.

### 8.1. Activité antimicrobienne des HEs

En raison de leur volatilité, les HEs possèdent des propriétés anti-plasmodiales, antifongiques et antibactériennes. Elles ont une action puissante contre les bactéries Gram-positives et négatives. Certaines, présentaient une activité contre les bactéries pathogènes et les levures telles que *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *Candida albicans*. Des études récentes ont montré que les HEs éradiquent les bactéries qui provoquent la pneumonie, inhibent les moisissures dans les produits alimentaires et combattent les bactéries formant des biofilms (El-Tarabily *et al.*, 2021).

#### 8.1.1. Activité antibactérienne des HEs

Les mécanismes d'action antimicrobienne des huiles essentielles reposent principalement sur la perturbation des membranes plasmiques. En particulier, les terpènes qui agissent en modifiant le

potentiel membranaire semblent être liés à l'altération du potentiel membranaire provoquée par le transport d'ions et la liaison à d'autres molécules telles que les protéines membranaires. Certains composés d'huiles essentielles s'insèrent ou se lient à la bicouche lipidique avec une grande affinité, provoquant des modifications structurelles qui augmentent la perméabilité de la membrane. Cela entraîne des fuites cellulaires et perturbe l'homéostasie bactérienne (Mishra *et al.*, 2020 ; Alvarez-Martínez *et al.*, 2021 ; El-Tarabily *et al.*, 2021). En outre, d'autres mécanismes interviennent simultanément contre les bactéries pathogènes comme la perturbation de la perméabilité de la membrane cellulaire, la chélation des cations, la dissolution de la bicouche phospholipidique, la perturbation de la perméabilité cellulaire passive, la perturbation de l'action enzymatique, la réduction de la synthèse de l'ATP/hydrolyse de l'ATP, la désintégration de la membrane cytoplasmique (Saroj *et al.*, 2020).

### 8.1.2. Activité antifongique des HEs

Les champignons peuvent produire, en tant que métabolites secondaires, diverses substances chimiques appelées mycotoxines tout en générant un grand nombre de spores asexuées. Ces dernières années, l'efficacité des vapeurs d'HE pour inhiber les champignons a été largement étudiée. Ces vapeurs présentent un potentiel d'action à différentes étapes du cycle de vie fongique, y compris la germination, la croissance hyphale et la sporulation (Reyes-Jurado *et al.*, 2014). Les huiles essentielles agissent *via* plusieurs mécanismes sur les cellules fongiques, notamment la rupture de la paroi cellulaire, la dégradation de la membrane cytoplasmique, la fuite des matériaux cellulaires, la coagulation du cytoplasme, la rupture des protéines lipidiques et la diminution de la force motrice des protons (Saroj *et al.*, 2020).

### 8.2. Activité insecticide des HEs

Les HEs extraites des plantes représentent une alternative économique aux insecticides synthétiques couramment commercialisés (Chellappandian *et al.*, 2018). Elles sont reconnues pour leurs excellentes propriétés insecticides, acaricides et répulsives. Divers mécanismes d'action sont attribués aux huiles essentielles et leurs constituants, tels que leur effet répulsif et anti-appétant, l'inhibition de la mue et de la respiration, la réduction de la croissance et de la fécondité des insectes, ainsi que la perturbation de la formation de la cuticule (Bakkali Aissaoui *et al.*, 2018).

### 8.3. Activité répulsive des HEs

Il existe plusieurs HEs qui sont riches en monoterpènes et sont considérées comme des répulsifs extrêmement efficaces, notamment la citronnelle (*Cymbopogon flexuosus*, Poaceae), l'eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill., Myrtaceae), le romarin (*Rosmarinus officinalis* L.,

Lamiaceae)), vétiver (*Vetiveria zizanioides* L., Poaceae), le clou de girofle (*Eugenia caryophyllus* (Spreng.), Myrtaceae) et le thym (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae). Citant comme exemple, l'huile de cataire, extraite de *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae), est considérée comme un répulsif très efficace contre les moustiques, les abeilles et d'autres insectes volants (Souto *et al.*, 2021).

## 9. Toxicité des huiles essentielles

Les HEs sont considérées comme des substances phytochimiques sûres en raison de leur longue histoire d'utilisation pour l'alimentation, la parfumerie et la médecine depuis des milliers d'années (Chellappandian *et al.*, 2018). Leur utilisation récente a attiré encore plus d'attention dans le monde entier, car elles sont perçues comme non phytotoxiques, systémiques et facilement biodégradables. En outre, elles présentent des avantages pour la santé, car elles stimulent les mécanismes naturels de défense et de métabolisme de l'hôte, offrant ainsi des propriétés thérapeutiques intéressantes pour diverses applications médicales et cosmétiques (Reyes-Jurado *et al.*, 2014).

De plus, la sensibilisation croissante du public aux bienfaits des HEs pour la santé a entraîné une consommation d'huiles essentielles et de produits contenant des HEs. Par conséquent, de nombreuses industries (par exemple, les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques) utilisent ces précieuses matières naturelles dans la formulation de leurs produits (Turek & Stintzing, 2013 ; Gavahian *et al.*, 2019). De plus, selon le rapport récemment publié par Grand View Research, la demande mondiale d'HEs était d'environ 227 000 tonnes en 2018. Cette valeur devrait augmenter à un taux de croissance annuel composé de 8,6 % de 2019 à 2025 (Gavahian *et al.*, 2019). En ce qui concerne l'apport alimentaire, les HEs sont généralement considérées comme sûres (GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour l'usage auquel elles sont destinées (Turek & Stintzing, 2013).

## 10. Utilisation des huiles essentielles en apiculture

Les HEs ont montré d'importantes propriétés insecticides, nématocides, acaricides et larvicides (Aimad *et al.*, 2022). Elles présentent de nombreux effets sur les activités des acariens et des insectes : activités répulsives et antiféodales, réduction de la croissance et de la fécondité, rupture de la cuticule et inhibition de la mue et de la respiration (Ben Chaaban *et al.*, 2019). De plus, les HEs ainsi que les acides organiques, ont été intégrées comme méthodes de traitement pour lutter contre les maladies en apiculture. Bien qu'elles soient considérées comme des produits naturels, il est essentiel de respecter les doses prescrites. Les apiculteurs ont tendance à utiliser les HEs comme alternative aux médicaments de synthèse pour éviter la présence de résidus dans les produits apicoles

**(Topal *et al.*, 2020)**. Le thymol, un composant fréquemment utilisé en apiculture, est particulièrement apprécié pour son effet acaricide, bien tolérés par les abeilles. De plus, conformément à la réglementation de l'Union Européenne, il est classé comme médicament vétérinaire non toxique, ne nécessitant pas de seuil maximal de résidus dans les produits à base de miel **(Tutun *et al.*, 2018)**.

### III. La biologie de l'hôte *Apis mellifera*

Les abeilles mellifères, en particulier *Apis mellifera*, jouent un rôle vital dans la pollinisation de nombreuses plantes sauvages et cultures agricoles. Elles sont cruciales non seulement pour la production alimentaire mondiale mais aussi pour la préservation de la biodiversité. Ces abeilles font partie du groupe de pollinisateurs le plus économiquement important à l'échelle mondiale. La contribution économique de l'abeille mellifère à l'agriculture est immense, avec une valeur estimée à 20 milliards de dollars aux États-Unis et plus de 200 milliards de dollars à l'échelle mondiale (**Havard et al., 2020**).

#### 1. Historique et origine de l'abeille domestique *Apis mellifera*

Les abeilles mellifères *Apis mellifera* existent sur Terre depuis plus de 125 millions d'années, coévoluant probablement avec les plantes à fleurs (**Bankova et al., 2018**). Les abeilles mellifères occidentales (*Apis mellifera* L.), originaires d'Europe et d'Afrique, sont l'une des principales espèces pollinisatrices des cultures à travers le monde, après avoir été dispersées à l'échelle mondiale par l'activité humaine (**Stanley et al., 2020**). Aujourd'hui, ces abeilles habitent presque tous les écosystèmes, allant des forêts tropicales aux régions subarctiques d'Eurasie et d'Amérique du Nord. Le remarquable succès évolutif des abeilles mellifères repose sur deux facteurs principaux : leur organisation sociale très développée et les divers produits qu'elles fabriquent, essentiels à leur survie. Ces produits, tels que le miel, la cire et la propolis, jouent des rôles vitaux dans la colonie, non seulement comme source de nourriture, mais également pour la construction des alvéoles et la défense contre les prédateurs (**Bankova et al., 2018**).

#### 2. Position taxonomique de l'abeille domestique

Les abeilles appartiennent à l'ordre des hyménoptères, un groupe d'insectes qui comprend également les guêpes, les fourmis, les ichneumons, les chalcidés et les mouches à scie. Cet ordre englobe environ 25 000 espèces d'abeilles décrites, réparties en 11 familles, avec de nombreuses sous-familles, tribus et genres. La grande majorité des abeilles sont des espèces solitaires sans organisation sociale. Les abeilles mellifères, quant à elles, appartiennent à la famille des Apidae, laquelle comprend également d'autres espèces sociales comme les bourdons (sous-famille Bombinae) et les abeilles sans dard (sous-famille Meliponinae). Au sein de la famille Apinae, on retrouve la tribu Apini, qui inclut le genre *Apis* (**Devillers, 2002**). L'abeille domestique occidentale, *Apis mellifera* L., fait partie des onze espèces du genre *Apis*, toutes reconnues comme productrices de miel (**Aglagane et al., 2021**).

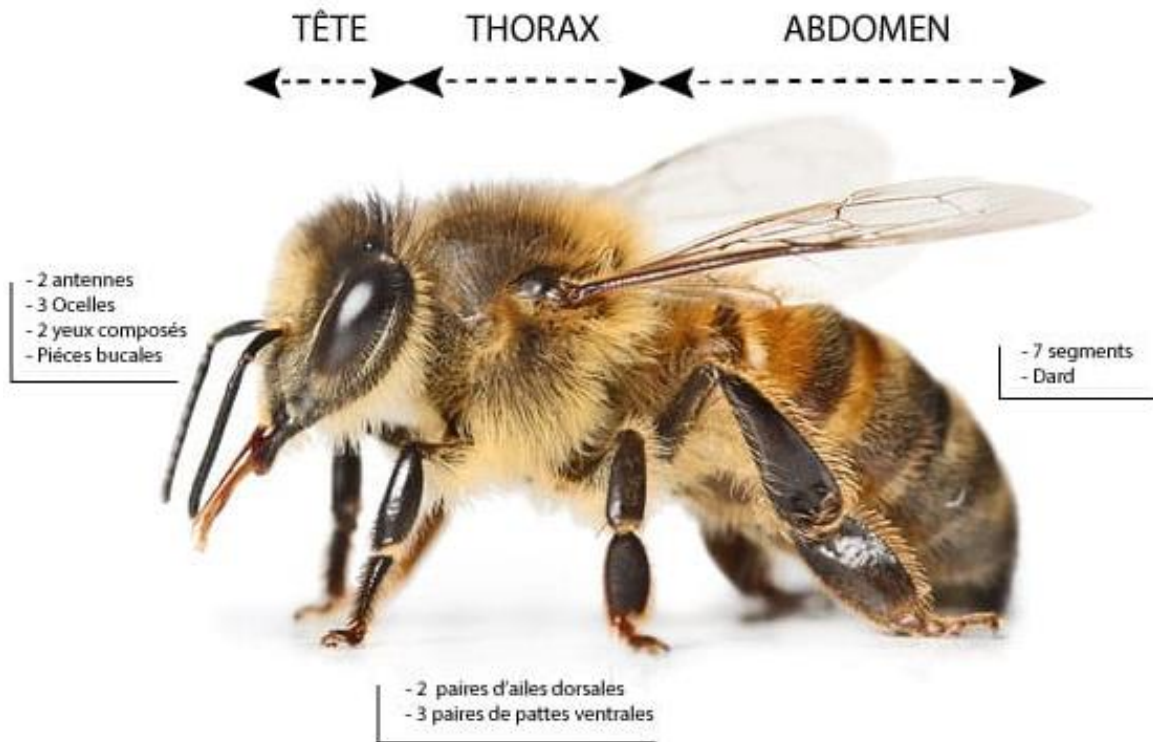
### 3. Présentation des abeilles domestiques locales

Les abeilles mellifères (Hymenoptera, Apidae) se répartissent en quatre lignées évolutives distinctes : la lignée méditerranéenne occidentale (M), qui comprend la sous-espèce d'Europe occidentale *Apis mellifera mellifera* ; la lignée méditerranéenne du Nord (C) ; la lignée africaine (A), regroupant les sous-espèces d'abeilles africaines ; et la lignée orientale (O), présente au Moyen-Orient, représentée principalement par les espèces caucasiennes (*Apis mellifera caucasica*) et turque (*Apis mellifera anatoliaca*). En Afrique du Nord, les populations d'abeilles sont classées en deux sous-espèces : *Apis mellifera intermissa*, également appelé « abeille tellienne » ou encore « abeille punique » (décrites par Buttel-Reepen 1906) et *Apis mellifera sahariensis* (décrites par Baldensperger 1924). L'abeille tellienne est présente en Tunisie, en Algérie et au Maroc, entre les montagnes de l'Atlas et les côtes méditerranéennes et atlantiques. Elle est de petite taille, de couleur noire, nerveuse, avec un comportement de défensif marqué, une utilisation abondante de la propolis et une tendance extrême à l'essaimage. Cette abeille semble être la seule race qui résiste aux conditions climatiques contrastées d'Afrique du Nord. En revanche, *A. mellifera sahariensis* est présente de Ain Sefra en Algérie à travers les oasis du Sahara au sud des montagnes de l'Atlas jusqu'à Figuig dans l'ouest du Maroc. Cette abeille est plus petite, avec une teinte jaunâtre-rougeâtre et montre une tendance modérée à l'essaimage. De plus, elle est moins agressive et utilise peu de propolis (Haccour, 1960 ; Grissa *et al.*, 1990 ; Adjlane & Haddad, 2014 ; Loucif-Ayad *et al.*, 2015 ; Ben Abdelkader, 2020 ; Chahbar & Hamadi, 2020).

### 4. Morphologie de l'abeille

Le corps de l'abeille est composé de trois parties principales : la tête, le thorax et l'abdomen, Chacune remplissant des fonctions ou des tâches spécifiques (figure I. 7).

✚ **La tête** : Elle comporte plusieurs pièces buccales et organes sensoriels tels que les yeux et les antennes. L'abeille possède cinq yeux : trois petits yeux à l'avant de la tête dites ocelles et deux grands yeux composés de chaque côté de la tête. La tête porte également une paire d'antennes, utilisées pour détecter les odeurs, les vibrations et pour la communication avec d'autres abeilles. Les pièces buccales comprennent les mandibules et la trompe. Les mandibules, solides et en forme de mâchoire, servent à diverses tâches comme manipuler la cire, mastiquer le pollen, récolter des résines, ou capturer des ennemis. La trompe, quant à elle, est un organe spécialisé dans la succion, conçu pour aspirer le nectar, mais elle est aussi utilisée pour récolter de l'eau, échanger de la nourriture avec d'autres abeilles, ou diffuser des substances comme des phéromones.



**Figure I. 7 : Morphologie de Apis mellifera**

(Site web, <https://mesabeilles.fr/les-abeilles/anatomie-et-biologie-dune-abeille>).

- ✚ **Le thorax** : le thorax de l'abeille est le principal centre de locomotion, est presque entièrement rempli de muscles puissants qui actionnent à la fois les ailes membraneuses et les pattes articulées. L'abeille mellifère possède trois paires de pattes. Les pattes avant sont principalement utilisées pour nettoyer la tête et collecter le pollen. Les pattes du milieu jouent un rôle crucial dans le nettoyage, notamment pour enlever le pollen des autres pattes. Les pattes arrière sont équipées d'une structure spécifique appelée corbeille à pollen, servant à transporter le pollen récolté. En plus des pattes, l'abeille mellifère dispose d'une paire d'ailes attachées à son thorax, facilitant son vol et ses déplacements.
  
- ✚ **L'abdomen** de l'abeille, plus volumineux que les autres parties du corps, abrite des organes essentiels à diverses fonctions, dont la digestion, la circulation et la défense. Le dispositif de défense, appelé appareil piqueur, est logé dans le dernier segment de l'abdomen, à l'intérieur d'une chambre de piqûre spéciale. Il s'agit d'un ovipositeur modifié (tube de ponte), est utilisé pour piquer. Le venin est produit par une glande à venin, qui s'élargit pour former un réservoir où le venin est stocké (Seeley, 1995 ; Kalman, 2004).

## 5. Cycle de vie de l'abeille mellifère

Les abeilles domestiques occidentales se développent à partir d'œufs pondus par la reine dans les cellules du rayon, ces œufs pouvant être fécondés ou non. Les œufs fécondés, placés dans des cellules d'ouvrières et de reines, et se développent en ouvrières et en reines en conséquence. Les œufs non fécondés, quant à eux, sont pondus dans des cellules hexagonales plus larges et évoluent en faux-bourçons adultes. Les abeilles mellifères présentent une métamorphose complète et passent par quatre stades de développement : l'œuf, la larve, la nymphe puis l'adulte (figure I. 8).

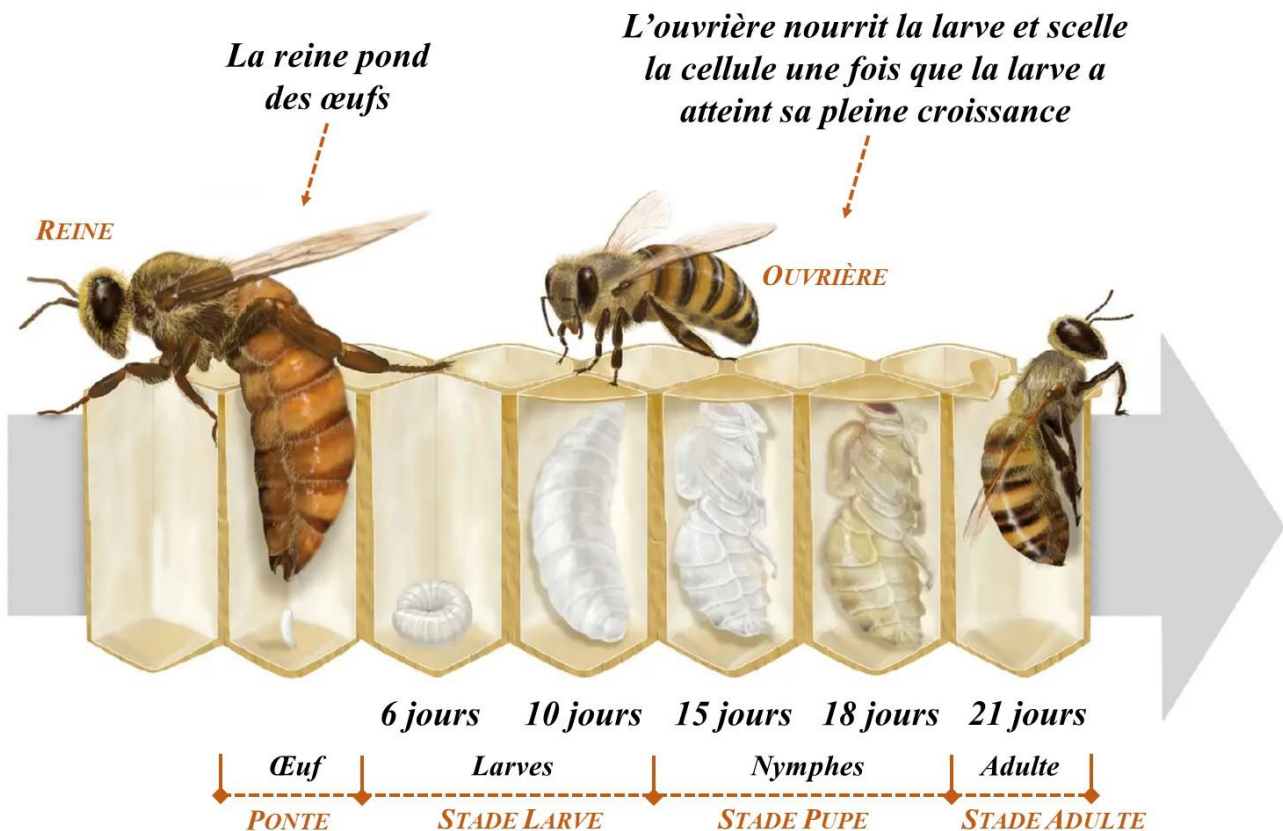


Figure I. 8 : Le cycle de vie de l'abeille (d'après : Mc Gregor, 2024).

Après environ trois jours, l'œuf éclot et une petite larve blanche et sans pattes apparaît. Cette larve, nourrie par les ouvrières pendant cinq jours, se développe ensuite en nymphe. Une fois que la nymphe est formée, elle est recouverte d'un opercule de cire pendant 13 jours pour achever sa transformation en adulte. En tout, une ouvrière met environ 21 jours pour passer du stade d'œuf à celui d'adulte. Le temps de développement varie en fonction de la température et du rôle futur de l'abeille. Par exemple, une reine émerge au bout de 16 jours, tandis qu'un faux-bourdon met environ 24 jours à devenir adulte. Ces durées peuvent aussi fluctuer selon les races d'abeilles et les conditions environnementales, influençant le rythme de chaque stade de développement (Rundassa, 2011).

## 6. Structure et organisation de la colonie d'abeilles

L'abeille mellifère commune est un insecte social qui niche dans des colonies comprenant généralement une seule reine, des faux-bourdon et de nombreuses ouvrières (figure I. 9) (Devillers, 2002).

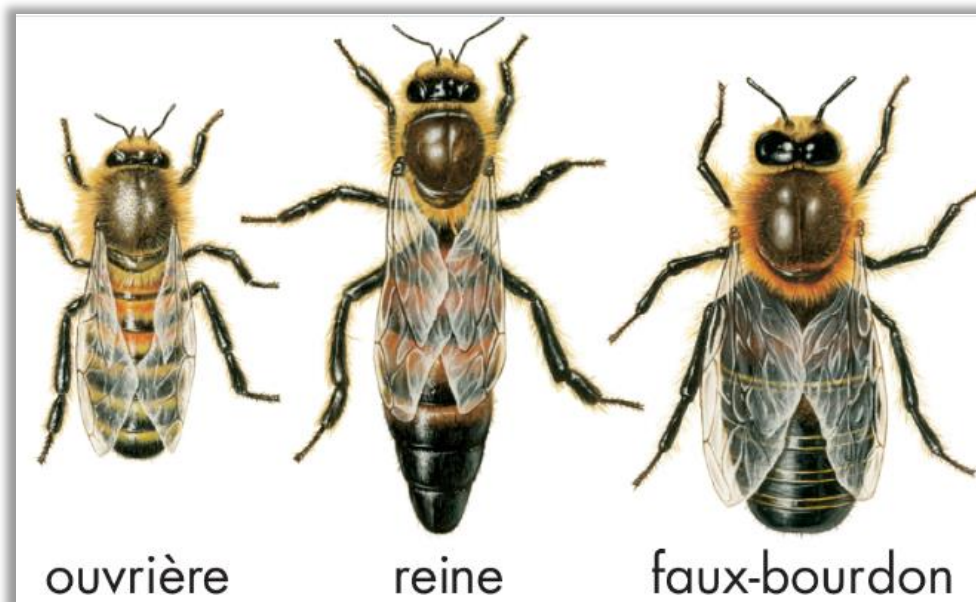


Figure I. 9 : Les différentes castes d'une colonie d'abeilles (Mc Gregor, 2024).

### 6.1. La reine et le processus de reproduction

La reine se distingue facilement des autres membres de la colonie. Son corps est large et, durant la période de ponte, son abdomen s'allonge considérablement. Ses ailes couvrent environ les deux tiers de son abdomen, contrairement aux ailes des ouvrières et des faux bourdons, qui une fois repliées, s'étendent presque jusqu'à l'extrémité de l'abdomen. Le thorax de la reine est légèrement plus imposant que celui d'une ouvrière, mais elle ne possède ni dispositifs pour collecter le pollen ni glandes de cire fonctionnelles. Son aiguillon, plus long que celui d'une ouvrière, est pourvu de barbes moins nombreuses et plus courtes. Sa fonction principale est de pondre des œufs et d'empêcher la reproduction des ouvrières par des phéromones. Si la reine cesse de produire ces phéromones ou de pondre, un de ses œufs les plus récents sera déplacé vers une cellule royale spécialement préparée pour faire éclore une nouvelle reine. La ponte débute généralement une semaine après l'accouplement et une reine peut continuer à pondre des œufs fécondés pendant la majeure partie de sa vie, souvent entre 2 et 5 ans. Lorsque la réserve de sperme s'épuise, les ouvrières se préparent à la remplacer ou à la supplanter. Pendant un certain temps, l'ancienne reine et sa nouvelle fille peuvent cohabiter dans la ruche après le remplacement (Devillers, 2002).

## 6.2. Les faux-bourçons

Les faux-bourçons sont les plus grandes abeilles de la colonie. Leur tête est beaucoup plus volumineuse que celle de la reine ou des ouvrières. Les faux-bourçons n'ont pas de dard, ni de corbeille à pollen, ni glandes cirières, ils sont conçus uniquement pour l'accouplement. Ils effectuent leur premier vol vers l'âge de 8 jours et atteignent leur maturité sexuelle vers l'âge de 12 jours. La colonie tolère seulement quelques faux-bourçons au printemps et en automne, un peu plus en été, mais aucun en hiver. En automne, les ouvrières les empêchent de réintégrer la ruche, les laissant mourir de faim. Leur durée de vie moyenne est de 8 semaines ou moins (Devillers, 2002).

## 6.3. Les ouvrières

Les ouvrières, plus petites que les autres membres de la colonie mais les plus nombreuses, sont des femelles dont les organes reproducteurs ne sont pas développés, et elles ne pondent pas d'œufs en conditions normales. Elles possèdent des structures spécialisées, telles que les glandes à couvain, les glandes odorantes, les glandes à cire et les corbeilles à pollen, qui leur permettent de réaliser toutes les tâches nécessaires à la vie de la ruche. Leurs tâches dépendent de leur âge, de leur génétique et des besoins de la colonie. Les abeilles ouvrières âgées de moins de 2 semaines, nettoient les cellules et nourrissent les larves grâce aux sécrétions de leurs glandes hypopharyngiennes, tout en prenant soin de la reine. Autour de 12 à 15 jours, leurs glandes cirières deviennent fonctionnelles et elles participent à la construction des rayons. Les abeilles plus âgées produisent le miel, le pollen, la cire et la propolis tout en utilisant leurs ailes pour ventiler la ruche. Bien que la ventilation puisse être assurée par des abeilles d'âges différents, elle est surtout réalisée vers 18 jours. Entre 15 à 20 jours, leur tâche consiste également à défendre la ruche et elles effectuent des vols d'orientation et de défécation. Après 3 semaines, les ouvrières deviennent butineuses, récoltant le pollen, le nectar, l'eau ou la propolis. Les collectrices d'eau peuvent représenter 10 % de l'ensemble des butineuses, mais ce nombre augmente considérablement en cas de stress thermique (Devillers, 2002).

## 7. Conditions environnementales dans la colonie d'abeilles

L'importance de la température et de l'humidité relative pour les abeilles mellifères est bien connue, et toutes les activités des colonies sont sous le contrôle de ces facteurs. La température appropriée pour les activités internes et externes se situent entre 33°C et 36°C, avec une température idéale de  $34,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$  (Abou-Shaara *et al.*, 2017). Toute variation en dehors de cette plage peut affecter le développement des stades immatures des abeilles mellifères, le taux d'émergence, la couleur des abeilles émergées, la morphologie des ailes, la capacité d'apprentissage, le cerveau des adultes et la prévalence des maladies. La température ambiante a également un effet sur l'activité de butinage. Quant à l'humidité relative, elle est essentielle pour le développement du couvain. Une

humidité relative d'environ 75 % à l'intérieur de la colonie peut être considérée comme étant convenable pour soutenir les stades immatures (**Abou-Shaara et al., 2012**).

## **8. Les maladies de l'abeille**

La santé des colonies d'abeilles mellifères est un pilier central du développement économique de l'apiculture (**Özkirim, 2012**). De nos jours, les abeilles font face à de nombreux pathogènes incluant bactéries, champignons, microsporidies et virus, ainsi qu'à divers ravageurs tels que les acariens parasites. Ces agents provoquent de multiples maladies (Tableau I. 2), qui affaiblissent les mécanismes de défense compromettant ainsi leur santé (**Damiani et al., 2014 ; Decourtye et al., 2019**).

D'Alvise et ses collaborateurs rapportent l'existence de plus de vingt virus, cinq ou plus de bactéries pathogènes, quatre champignons, quatre protozoaires parasites et trois acariens parasites touchant l'abeille (**D'Alvise et al., 2019**). La transmission de ces agents pathogènes peut se faire horizontalement ou verticalement (**Kevill et al., 2020**) et se produit entre les colonies et à l'intérieur des colonies, passant des parents aux progénitures par le biais du partage de nourriture (**Aronstein & Murray, 2010**), du contact pendant le butinage ou encore à travers les cadres et matériaux contaminés utilisés par les apiculteurs (**Borneck et al., 2010 ; Tauber et al., 2019 ; Schittny et al., 2020**). En effet, les maladies les plus récurrentes et destructrices affectant les abeilles domestiques sont la varroase, les maladies virales apparentées, la loque américaine, la loque grise et la nosérose. Le parasite *Varroa destructor* est considéré comme le ravageur le plus dangereux pour les colonies d'abeilles mellifères à l'échelle mondiale, attaquant différents stades de développement et castes de l'espèce *A. mellifera* (**Hristov et al., 2020**).

**Tableau I. 2. Pathogènes de l'abeille**

Agents pathogènes/parasites		Références
<b>Bactéries</b>	<i>Frischella perrara</i> <i>Paenibacillus larvae</i> <i>Melissococcus plutonius</i> <i>Pseudomonas apiseptica</i>	Mahaman <i>et al.</i> , 2002 ; Glenny <i>et al.</i> , 2017 ; D'Alvise <i>et al.</i> , 2019
<b>Champignons</b>	<i>Ascosphaera apis</i> <i>Penicillium sp.</i> <i>Aspergillus flaus</i> ; <i>A. fumigatus</i> <i>Bettsia alvei</i>	Mahaman <i>et al.</i> , 2002 ; Glenny <i>et al.</i> , 2017 ; Hristov <i>et al.</i> , 2020.
<b>Virus</b> (des familles <i>Dicistroviridae</i> et <i>Iflaviridae</i> )	Virus de la cellule de la reine noire Virus du lac Sinäi Virus de l'aile déformée Virus de la paralysie aiguë de l'abeille Virus de la paralysie chronique des abeilles Virus du sacbroïde Virus de la paralysie létale du puceron Virus de la paralysie aiguë israélienne Virus des invertébrés iridescents Virus de l'abeille du Cachemire Virus de l'aile nébuleuse	Mahaman <i>et al.</i> , 2002 ; Loucif-Ayad <i>et al.</i> , 2013 ; McMenamin & Genersch, 2015 ; Glenny <i>et al.</i> , 2017 ; D'Alvise <i>et al.</i> , 2019 ; Harwood & Dolezal, 2020 ; Hristov <i>et al.</i> , 2020.
<b>Microsporidie</b>	<i>Nosema apis</i> <i>Nosema ceranae</i>	Mahaman <i>et al.</i> , 2002 ; Adjlane <i>et al.</i> , 2016 ; Glenny <i>et al.</i> , 2017 ; D'Alvise <i>et al.</i> , 2019 ; Hristov <i>et al.</i> , 2020 ; Kidoud <i>et al.</i> , 2023.
<b>Acariens parasites</b>	Acarien ectoparasite : <i>Varroa destructor</i> ; <i>Varroa jacobsoni</i> , <i>Tropilaelaps clareae</i> Acarien de la trachée : <i>Acarapis woodi</i>	Mahaman <i>et al.</i> , 2002 ; McMenamin & Genersch, 2015 ; Adjlane <i>et al.</i> , 2016 ; Glenny <i>et al.</i> , 2017 ; D'Alvise <i>et al.</i> , 2019 ; Harwood & Dolezal, 2020 ; Hristov <i>et al.</i> , 2020 ; Belaid <i>et al.</i> , 2023 ; Ayad <i>et al.</i> , 2024.

## IV. La varroase

### 1. Historique

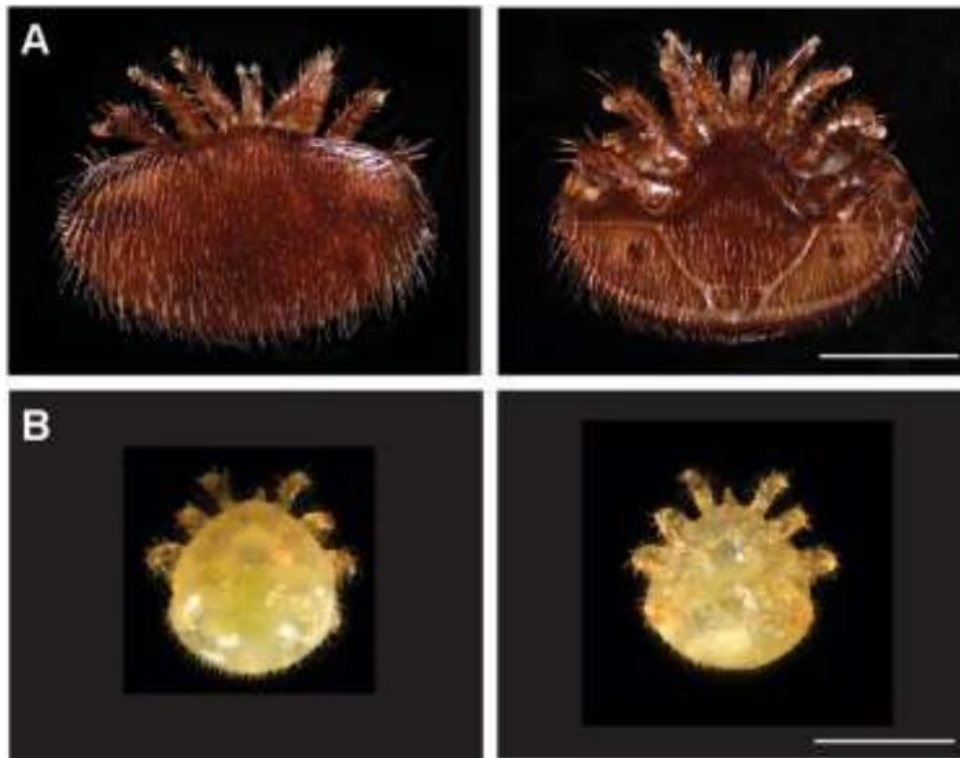
La varroase est la maladie la plus pathogène la plus dévastatrice pour l'abeille domestique occidentale *Apis mellifera*, provoquant des pertes massives de colonies, en particulier pendant hiver. L'agent responsable de cette maladie est l'acarien ectoparasite *Varroa destructor* (Anderson et Trueman), un parasite qui s'attaque aux abeilles adultes ainsi qu'aux larves, provoquant une baisse de leur immunité et une propagation accrue d'autres pathogènes. Ce parasite affaiblit les colonies en se nourrissant de l'hémolymph des abeilles, entraînant une réduction de la longévité des abeilles ouvrières et des reines, et en perturbant gravement la santé générale de la colonie. La seule grande région encore épargnée par la varroase est l'Australie, qui demeure exempte de *Varroa* (Van der Zee *et al.*, 2014 ; Pietropaoli & Formato, 2019 ; Brettell *et al.*, 2020 ; Hristov *et al.*, 2020 ; Aglagane *et al.*, 2021).

L'acarien *Varroa* a été découvert pour la première fois en 1904 par Oudemans, sous le nom de *Varroa jacobsoni* sur l'abeille asiatique *Apis cerana* en Indonésie, où il se reproduisait uniquement dans le couvain de faux-bourçons, sans causer de dommages significatifs aux colonies. Depuis lors, deux autres espèces d'acariens, *V. underwoodi* et *V. rindereri*, et sont présentes sur la plupart des espèces d'abeilles asiatiques. Ces espèces sont morphologiquement distinctes de *V. jacobsoni*. Lorsque l'abeille européenne ou occidentale (*A. mellifera*) a été introduite en Asie, *V. jacobsoni* a commencé à se reproduire non seulement sur les faux-bourçons mais aussi sur le couvain des ouvrières, entraînant des pertes massives dans les colonies. L'acarien s'est alors rapidement propagé en Europe, en Amérique du Nord, en Amérique du Sud, en Afrique, ainsi que dans la région Asie-Pacifique (Nazzi & Le Conte, 2016). En effet, il a atteint l'Europe dans les années 1960 et 1970, et l'Amérique du Nord à la fin des années 1980 où des différences entre *V. jacobsoni* ont été observées dans diverses régions. Les variations dans la forme et la taille des femelles adultes, leur biologie reproductive et l'interface parasite-hôte ont été enregistrées. En 2000, des études ont révélé que l'acarien précédemment identifié comme *V. jacobsoni*, qui infestait l'abeille domestique de l'Ouest, était en réalité une espèce différente. Cette nouvelle espèce a été renommée *Varroa destructor* par Anderson et Trueman (Sammataro, 2012 ; Brodschneider *et al.*, 2023).

### 2. Morphologie et écologie du *Varroa destructor*

Physiquement, les acariens *Varroa* sont de minuscules parasites externes de couleur rouge-brun. A l'âge adulte, il possède quatre paires de pattes munies de ventouses qui lui permettent de s'agripper au corps de l'abeille. Son corps aplati est recouvert de poils sensoriels qui lui permettent de percevoir son environnement. Il possède également des pièces buccales perforantes et suceuses, qui

lui servent à transpercer l'exosquelette de l'abeille et à se nourrir de son hémolymphe. La femelle mesure environ 1,1 mm de longueur et 1,6 mm de largeur, avec un poids oscillant entre 0,2 et 0,5 mg (poids vif, frais), selon son stade de ponte. Son corps est aplati, de couleur brunâtre. En comparaison, le mâle est plus petit, avec des dimensions d'environ 0,7 mm de longueur et 0,9 mm de largeur, et son corps arrondi est de couleur blanc jaunâtre (figure I. 10) (Sammataro, 2012 ; Chauhan *et al.*, 2021).

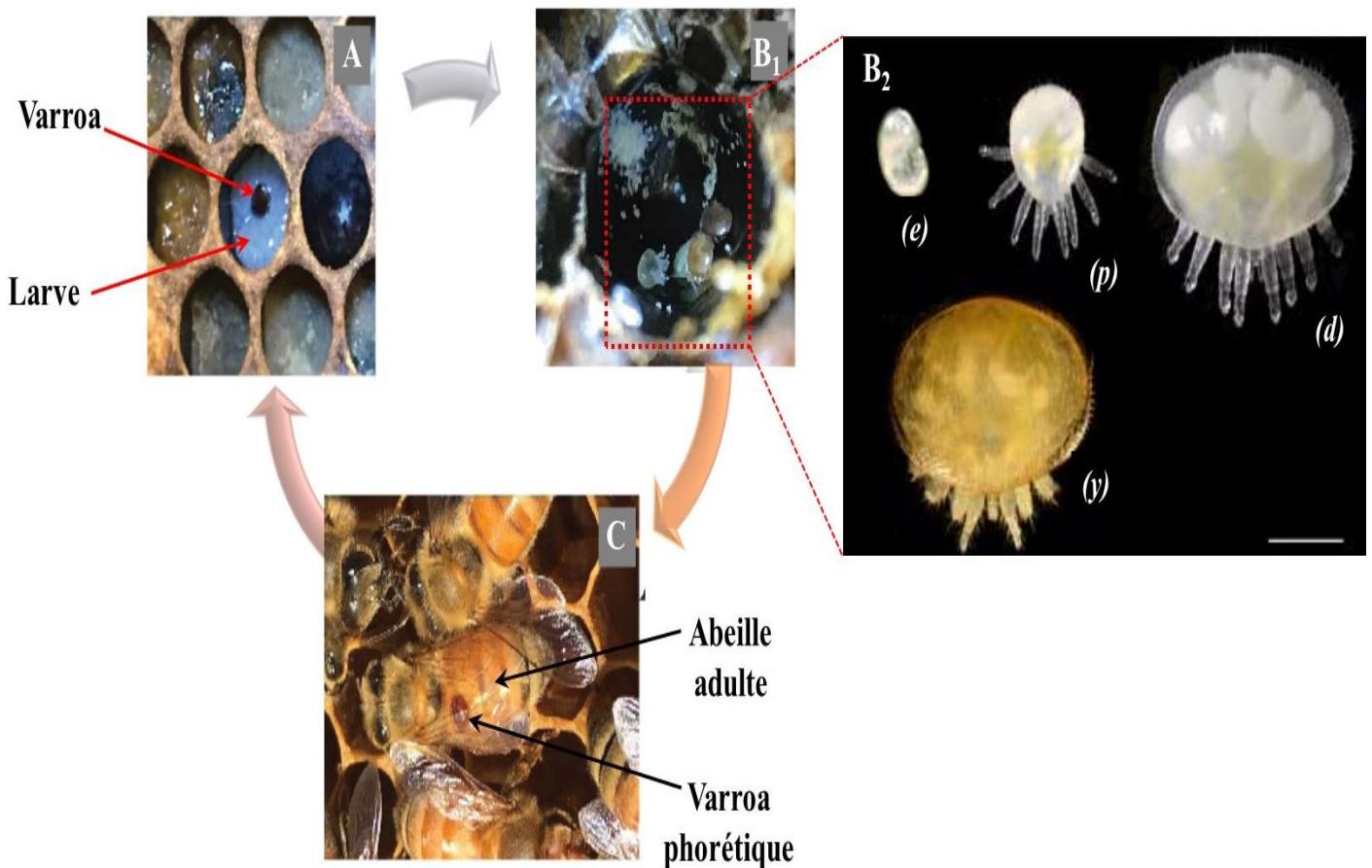


**Figure I. 10 : Morphologie de l'acarien *Varroa destructor*. Vues ventrales (à droite) et dorsales (à gauche) d'une femelle adulte (A) et d'un mâle (B).**

Le Varroa s'épanouit dans des conditions similaires à celles du nid des abeilles, avec une température optimale entre 34°C et 35°C. Des tests en laboratoire ont montré que l'acarien préfère des températures d'environ 32°C ± 2,9°C. L'humidité joue également un rôle crucial, avec un taux optimal situé entre 55 % et 70 %, bien que sa reproduction soit limitée lorsque l'humidité dépasse cette plage (Nazzi & Le Conte, 2016).

### **3. Le cycle de vie de *Varroa destructor***

Le cycle de vie de cet acarien comporte deux phases principales : i) la phase de dispersion (également appelée phase phorétique ou de phorésie), et ii) la phase de reproduction. La phase de dispersion se déroule sur l'abeille adulte, où l'acarien se déplace et survit en se nourrissant de son hôte. La phase de reproduction, quant à elle, se produit à l'intérieur des cellules de couvain (figure I. 11) (Nazzi & Le Conte, 2016 ; Piou *et al.*, 2016 ; Traynor *et al.*, 2020).



**Figure I. 11. Schéma simplifié du cycle de vie de *Varroa destructor*.**

(A) Pendant la phase de reproduction, une femelle gravide pénètre dans la cellule d'une larve ouvrière ou d'un faux-bourdon avant qu'elle ne soit operculée. (B<sub>1</sub>) Une fois la cellule operculée, l'acarien fondateur produit un fils et plusieurs filles qui s'accouplent entre frères et sœurs, tout en se nourrissant de la chrysalide de l'abeille (d'après : Reams & Rangel, 2022). (B<sub>2</sub>) Agrandissement de B<sub>1</sub> : Le cycle de vie du varroa comprend une métamorphose. Le développement d'une femelle débute par l'éclosion d'un œuf (e) en larve, qui se transforme ensuite en protonymph (p), en deutonymph (d) puis en jeune femelle adulte (y) (d'après : Mondet *et al.*, 2016). (C) À l'émergence de l'abeille adulte, les acariens quittent la cellule et entament la phase de dispersion, au cours de laquelle les femelles nouvellement gravides sont transportées par les abeilles pour atteindre une cellule de couvain d'abeille qu'elles envahiront, recommençant ainsi le cycle (Reams & Rangel, 2022 ; modifiée).

### 3.1. Phase de reproduction

La phase de reproduction de *Varroa destructor* comprend l'invasion des cellules de couvain par l'acarien, où il se nourrit des abeilles immatures, utilise un mimétisme chimique pour éviter d'être détecté par les abeilles ouvrières, la ponte et l'accouplement. Typiquement, les femelles *Varroa* infestent les larves d'abeilles du 5<sup>e</sup> stade, juste avant l'operculation de la cellule (7<sup>e</sup> -8<sup>e</sup> jour de la vie larvaire). Les larves de faux-bourçons sont préférées en raison de leur temps de développement plus long, mais les ouvrières sont également parasitées. Environ 70 heures après l'invasion, la femelle acarien pond d'abord un œuf mâle, puis des œufs femelles toutes les 30 heures. Jusqu'à cinq œufs (trois en moyenne) peuvent être pondus chez les larves d'ouvrières, tandis que six œufs peuvent être pondus dans celles de faux-bourçons. Les femelles acariens détectent les cellules au stade optimal grâce aux signaux chimiques émis par les larves. Les mâles, plus petits, s'accouplent avec leurs sœurs dans la cellule et meurent ensuite dans leur cellule natale (**Sammataro, 2012 ; Nazzi & Le Conte, 2016 ; Bubnič *et al.*, 2021**).

### 3.2. Phase de dispersion ou de phorésie

Lorsque l'abeille adulte émerge de la cellule de couvain, la femelle acarien et sa progéniture mature, quittent la cellule avec l'abeille vers une abeille nourricière. La durée de séjour des acariens sur les abeilles adultes varie de 2 à 8 jours, et dépend de la quantité de couvain, de la force de la colonie et d'autres facteurs. Les femelles *Varroa* peuvent accomplir deux ou trois cycles reproductifs au cours de leur vie. En l'absence de couvain, comme c'est le cas pendant les mois d'hiver, elles se fixent aux abeilles adultes, se cachant souvent entre les sternites abdominaux de l'abeille, un emplacement difficile à atteindre pour les autres abeilles. De plus, durant cette période, elles se nourrissent de manière intermittente de l'abeille hôte, jusqu'à ce que le couvain soit à nouveau disponible (**Sammataro, 2012 ; Nazzi & Le Conte, 2016**).

## 4. Effets du *V. destructor* sur son hôte

Une étude menée par Ramsey et ses collaborateurs a révélé que *Varroa destructor* ne se nourrit pas seulement de l'hémolymphe des abeilles mellifères, comme on le pensait auparavant, mais aussi de leur tissu corporel adipeux. Ce tissu est essentiel pour de nombreux processus chez des abeilles en bonne santé tels que la fonction immunitaire, la survie hivernale et la détoxification des pesticides (**Ramsey *et al.*, 2019**). Il a été découvert également que la salive de *Varroa* inhibe également la cicatrisation chez les abeilles, facilitant leur alimentation (**Sammataro, 2012**). Les microblessures sur la cuticule des abeilles et l'épuisement de leurs corps gras les rendent davantage vulnérables aux infections virales, fongiques et bactériennes (**De Carolis *et al.*, 2023**). De plus, cette maladie engendre divers effets individuels, parfois mortels (**Glenny *et al.*, 2017 ; Szczurek *et al.*,**

2020). Ces effets comprennent la diminution de l'hémolymphe, la transmission des virus, des malformations au niveau des pattes, ailes et segments corporels, une perte de poids, une réduction de la production de sperme et, par conséquent, une aptitude réduite à la reproduction. Ces impacts affaiblissent également les compétences des abeilles, en particulier leur capacité de vol et de butinage (Sammataro, 2012 ; Glenny *et al.*, 2017 ; Noel *et al.*, 2020 ; Szczurek *et al.*, 2020). En effet, les butineuses infestées présentent une diminution de l'apprentissage non associatif, et des difficultés d'orientation, nécessitant plus de temps pour retourner à la ruche ou ne revenant parfois pas du tout (Genersch, 2010). En plus, le développement des glandes hypopharyngiennes, essentielles à la transformation de la nourriture pour les larves et à la production de la gelée royale pour les reines, est réduit chez les abeilles ouvrières (Aglagane *et al.*, 2021).

### 5. Effet de *Varroa destructor* sur la colonie d'abeilles

La varroase, causée par *Varroa destructor*, affaiblit gravement les colonies d'abeilles mellifères, augmentant leur vulnérabilité aux maladies (Glenny *et al.*, 2017 ; Szczurek *et al.*, 2020). Cette infestation peut devenir plus dévastatrice lorsque l'acarien transmet des virus qui affectent les processus neuronaux des abeilles (Gregory *et al.*, 2005 ; Ogihara *et al.*, 2020). *Varroa destructor* est un vecteur de sept virus : virus de la paralysie aiguë de l'abeille, virus de l'abeille du Cachemire, virus de la paralysie aiguë de l'abeille israélienne, virus de la paralysie chronique de l'abeille, le virus du sacbroïde, virus *Varroa destructor*-1 et virus de l'aile déformée (Drescher *et al.*, 2017 ; Khan *et al.*, 2019 ; Brettell *et al.*, 2020). Ce dernier est considéré comme le plus pathogène pour les abeilles mellifères (Morfin *et al.*, 2020). Ainsi, une infestation modérée par le *Varroa* est reconnue comme un facteur majeur de déclin des colonies, compromettant leur reproduction et leur état de santé général (Hristov *et al.*, 2020). Pour réduire le stress lié à cette infestation, l'abeille mellifère génère une série de réponses au niveau de la colonie, fondamentalement avec des mécanismes physiques, tels que le comportement hygiénique des abeilles, l'enlèvement du couvain mort ou malade, l'isolement des individus affectés en les recouvrant d'une couche de propolis ou propolis, ou l'élimination de parasites *Varroa* (Flores *et al.*, 2021). Les colonies affaiblies par le *Varroa* contribuent à la dispersion des acariens vers des colonies plus saines. En l'absence de traitement, une forte infestation entraîne une mortalité totale en quelques semaines (Abd El- Wahab *et al.*, 2021). Certains auteurs ont quantifié l'impact économique du déclin des colonies d'abeilles mellifères, et d'autres pollinisateurs, comme les abeilles sauvages et les papillons, affecte l'agriculture mondiale ainsi que la production de miel et d'autres produits de la ruche (Vercelli *et al.*, 2023).

## 6. Evaluation de l'infestation par *Varroa destructor*

L'évaluation de l'infestation par *Varroa destructor* nécessite une surveillance régulière et précise pour prévenir la progression des infestations et réduire la mortalité des colonies d'abeilles (Flores *et al.*, 2021). Le suivi du taux d'infestation permet de choisir la période adéquate pour appliquer les traitements, de vérifier l'efficacité des stratégies de lutte et d'évaluer le potentiel génétique d'une colonie en termes de résistance au varroa (Pietropaoli *et al.*, 2021). Parmi les méthodes adoptées pour estimer le niveau d'infestation des colonies, on retrouve le lavage des abeilles avec de l'eau chaude ou savonneuse, ou avec de l'éthanol (75 %), qui détache les acariens des abeilles. La désoperculation du couvain est également employée pour évaluer la présence d'acariens à l'intérieur des cellules de couvain. La méthode du sucre glace permet de déloger les acariens sans tuer les abeilles, tandis que l'observation de la chute naturelle des acariens offre une estimation du taux d'infestation au fil du temps (Dietemann, 2013).

## 7. Moyens de lutte contre *Varroa destructor*

Il existe plusieurs méthodes disponibles pour lutter efficacement contre l'acarien *Varroa*. Il est recommandé d'adopter une approche combinant différents traitements et de pratiques de gestion apicole afin de ralentir le développement de résistance aux produits chimiques chez les acariens. L'usage d'un seul produit ou d'une seule technique ne doit pas être privilégié. Alternier les méthodes de lutte permet de maximiser l'efficacité des traitements et de protéger les colonies sur le long terme.

### 7.1. Lutte par acaricides synthétiques

De nombreux médicaments de synthèse ont été développés et utilisés pour traiter diverses pathologies des abeilles (Flesar *et al.*, 2010). Depuis plus de quarante ans, divers pesticides de synthèse (tableau I. 3) sont employés pour limiter les infestations de *Varroa*, comme le montrent plusieurs études (Gashout & Guzman-Novoa, 2009 ; Johnson *et al.*, 2010 ; Bonzini *et al.*, 2011 ; Giovenazzo & Dubreuil, 2011 ; Gregorc *et al.*, 2018 ; Tihelka, 2018 ; Noel *et al.*, 2020 ; Abd El-Wahab *et al.*, 2021).

**Tableau I. 3. Principaux acaricides synthétiques commerciaux.**

Pesticides	Nom commercial
Pyréthroïde taufluvalinate	Apistan®, Klartan®, Mavrik®, Gabon®
Pyréthroïde fluméthrine	Bayvarol®, Polyvar yellow®
Formamidine amitraz	Apivar®, Apitraz®, Varidol®
Organophosphoré coumaphos	Checkmite®, Asuntol®, Perizin®

Parmi les formulations couramment utilisées figurent les bandes imprégnées d'acaricides, dont l'efficacité dépend de facteurs environnementaux comme le climat et les conditions internes à la ruche et des techniques d'application (**Lozano et al., 2019**). En effet, ces traitements n'ont pas été toujours efficaces pour une élimination complète de l'acarien, car leur utilisation répétée et prolongée a favorisé le développement de résistances, notamment aux acaricides comme le fluvalinate et le coumaphos (**Bastos et al., 2008 ; Gashout & Guzman-Novoa, 2009 ; Gashout et al., 2020 ; Kast et al., 2020**). De plus, les acaricides ciblent uniquement la phase de dispersion de l'acarien et n'agissent pas durant sa phase de reproduction (**Noel et al., 2020**).

Aussi, l'utilisation d'acaricides organophosphorés et pyréthroïdes peut également menacer la santé des colonies en provoquant des troubles du comportement et de la mémoire, en altérant la recherche de nourriture et la navigation, et en réduisant la diversité, la reproduction et la longévité des abeilles mellifères (**Wu et al., 2012 ; Alburaki et al., 2018 ; Siviter et al., 2018 ; Decourtye et al., 2019**). De plus, ces acaricides peuvent s'accumuler dans les produits de la ruche affectant ainsi à leur qualité pour la consommation humaine (**Adameczyk et al., 2005 ; Antunez et al., 2008 ; Bravo et al., 2017**). Ces résidus peuvent également affecter le couvain des abeilles en contaminant la cire et le pain d'abeille (**Bonzini et al., 2011 ; Murcia Morales et al., 2020**), altèrent l'élevage des reines, le développement des larves d'ouvrières (**Kast et al., 2020**), peuvent aussi réduire la durée de vie des abeilles et augmenter le risque d'apparition de souches résistantes (**Antunez et al., 2008**). L'usage excessif et inapproprié de ces pesticides constitue une menace réelle pour les écosystèmes aquatiques et terrestres. En conséquence, cet usage contribue à la destruction de la biodiversité et compromet la durabilité environnementale (**Mahmood et al., 2016 ; Onwona-Kwakye et al., 2020**).

## **7.2. Lutte par les méthodes biotechniques**

Les méthodes biotechniques offrent des solutions durables pour traiter les infestations d'acariens. Elles comprennent le retrait du couvain de faux-bourçons, l'application de traitements thermiques sur les couvains ou les abeilles (hyperthermie), le retrait complet du couvain, le piégeage des rayons, le confinement des reines (mise en cage) (**Cengiz, 2018 ; Brodschneider et al., 2023 ; Vercelli et al., 2023**). Ces techniques demandent cependant un travail supplémentaire de l'apiculteur et impliquent une organisation rigoureuse des ressources d'exploitation, notamment en matière de main-d'œuvre (**Mancuso et al., 2020**).

### 7.3. Lutte par produits naturels

Face aux inconvénients majeurs des acaricides synthétiques, les chercheurs ont développé des alternatives regroupées sous le terme de « lutte intégrée » (**Aglagane et al., 2021**). Parmi les produits naturels les plus fréquemment utilisés figurent les huiles essentielles, les extraits de plantes, les acides organiques (tels que l'acide formique, l'acide oxalique et l'acide citrique) ainsi que les produits de la ruche comme la propolis (**Giovenazzo & Dubreuil, 2011 ; Sabahi et al., 2017 ; Noel et al., 2020 ; Chauhan et al., 2021**). Ces substances peuvent être appliquées comme fumigeant dans les ruches ou comme traitements de contact (**Ebert et al., 2007**). Des études antérieures, réalisées en laboratoire et sur le terrain ont mis en évidence l'efficacité de ces produits naturels. Les principales espèces végétales étudiées appartiennent aux familles des Myrtaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Lauraceae, Apiaceae et Liliaceae (**Gashout & Guzman-Novoa, 2009 ; Damiani et al., 2010 ; Damiani et al., 2014 ; Mahmood et al., 2014 ; Razavi et al., 2015 ; Iglesias et al., 2021 ; Drescher et al., 2017 ; Ramzi et al., 2017 ; Sabahi et al., 2017 ; Al Toufalia et al., 2018 ; Toomemaa, 2018 ; Lin et al., 2019 ; Jack et al., 2020 ; Sabahi et al., 2020**). En outre, les formulations à base de la substance active thymol (comme Apiguard et Thymovar) et celles combinant le thymol avec d'autres HEs (eucalyptol, camphre et menthol, ex. ApiLife VAR) sont également utilisées pour le traitement de *Varroa* et ont été approuvés comme médicaments vétérinaires dans de nombreux pays européens (**Blenau et al., 2012**).

### 8. *Varroa destructor* et huiles essentielles

Les HEs représentent une alternative prometteuse contre l'acarien ectoparasite, démontrant à la fois une grande efficacité et une innocuité environnementale (**Aglagane et al., 2021**). Depuis les années 1990, les chercheurs étudient le potentiel des HEs et de leurs composants pour lutter contre *V. destructor*, en laboratoire comme sur le terrain (**Begna et al., 2023**). Ces huiles agissent sur les arthropodes en perturbant le système octopaminergique (par exemple, l'eugénol de *Syzygium aromaticum*, l' $\alpha$ -terpinéol de *Pinus sylvestris*), les récepteurs GABA (le thymol de *Thymus vulgaris*) et les canaux ioniques à potentiel récepteur transitoire (TRP), ainsi qu'en inhibant les cytochromes P450 (CYP) (par exemple, le dillapiole d'*Anethum sowa*, les piperamides de *Piper spp.*) et l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase (AChE) (Fenchone de *Foeniculum vulgare*, S-carvone de *Mentha spicata*, linalol de *Citrus spp.*) (**Pavela & Benelli, 2016 ; Aglagane et al., 2021**). Néanmoins, peu d'études se sont intéressées à l'effet de ces substances volatiles sur *Varroa destructor*.

**Peng et al. (2015)** ont montré que l' $\alpha$ -terpinéol et le carvacrol provoquent une réaction répulsive en activant le canal ionique VdTRPA1 de l'acarien. De plus, Li et ses collaborateurs ont révélé qu'une exposition aiguë de cet acarien à l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* induit une réaction de stress caractérisée par une augmentation des bioactivités  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}$ , glutathion-S-transférase (GST) et superoxyde dismutase (SOD), avec l'inhibition de la capacité de détoxification de l'acarien (**Li et al., 2017**). De manière générale, les formulations à base d'huiles essentielles peuvent être utilisées comme de fumigeants, émulsions, granulés ou pulvérisations directes (**Saroj et al., 2020**). Parmi les HEs testées, on retrouve l'huile de clou de girofle (eugénol), l'huile de thym (thymol, carvacrol), l'huile de menthe (menthol, pulegone), l'huile de citronnelle (citronellal, citral), l'huile de cannelle (cinnamaldéhyde), l'huile de romarin (1,8-cinéole) et l'huile d'origan (carvacrol) (**Isman & Machial, 2006**). Des produits comme ApiLife Var®, Thymovar® et Apiguard®, à base de thymol, sont des formulations homologuées pour lutter contre *Varroa destructor* (**Bonnafé et al., 2014 ; Glavan et al., 2020**).

## 9. Toxicité des huiles essentielles vis-à-vis des abeilles

Généralement, les composés naturels sont reconnus pour leur biodégradabilité et leur respect de l'environnement, car ces huiles présentent une innocuité pour les organismes non ciblés et ne persiste pas dans le milieu naturel. De plus, plusieurs études ont montré que les HEs sont efficaces contre les acariens tout en étant sans danger pour les abeilles (**Begna et al., 2023**). Par ailleurs, les résidus des traitements naturels utilisés pour lutter contre les maladies des abeilles peuvent probablement modifier les caractéristiques organoleptiques des produits apicoles, notamment le goût et l'odeur du miel, ils ne présentent aucun un risque pour la santé et la sécurité des consommateurs (**Adamczyk et al., 2005 ; Serra Bonvehi et al., 2016**). Les résidus de thymol présents dans le pain d'abeille n'ont pas d'impact sur le développement des larves (**Charpentier et al., 2014**). De plus, lorsqu'ils sont utilisés conformément aux doses recommandées, ces traitements naturels se révèlent sans danger pour les abeilles, ne provoquant pas d'effets mutagènes ou génotoxiques (**Ebert et al., 2007 ; Pavela & Benelli, 2016**).

Chapitre 2 :  
*Extraction d'huiles essentielles par  
hydrodistillation et leur  
caractérisation par CG/SM*

## Introduction

L'extraction des HEs est généralement réalisée par deux principales techniques, à savoir : la distillation azéotropique (dont : l'hydrodistillation, l'hydrodiffusion et la distillation à la vapeur d'eau), et l'extraction par solvants. Cependant, ces méthodes traditionnelles sont généralement coûteuses et extrêmement consommatrices d'énergie et de solvants (Elyemni *et al.*, 2019). L'utilisation de ces techniques conventionnelles pour la détermination de la composition chimique de l'HE est par ailleurs controversée, et ce, en raison de la transformation possible des composés actifs de l'arôme sous l'effet de la chaleur, de la vapeur et du pH. De plus, il s'avère que les pertes et la dégradation de certains composés volatils à cause des longs temps d'extraction, ainsi que la dégradation de composés insaturés ou d'esters par des effets thermiques ou hydrolytiques sont les principaux inconvénients de ces méthodes d'extraction (Moradalizadeh *et al.*, 2013 ; Moradi *et al.*, 2018). C'est pour cela qu'au cours de la dernière décennie, il y a eu une demande croissante de nouvelles techniques d'extraction pouvant être automatisées tout en répondant aux six principes de l'extraction verte (figure II.1) afin d'éviter toute pollution et de réduire le coût de la préparation des échantillons. Ces principes reposent sur un approvisionnement raisonné en matière végétale (principe 1), la réduction de la consommation de solvant (principe 2) et d'énergie (principe 3), une production de déchets aussi faible que possible (principe 4) et une durée du procédé d'extraction réduite (principe 5) et enfin l'obtention d'un extrait naturel et sain (principe 6) (Chemat & Lucchesi, 2006 ; Angoy *et al.*, 2020).

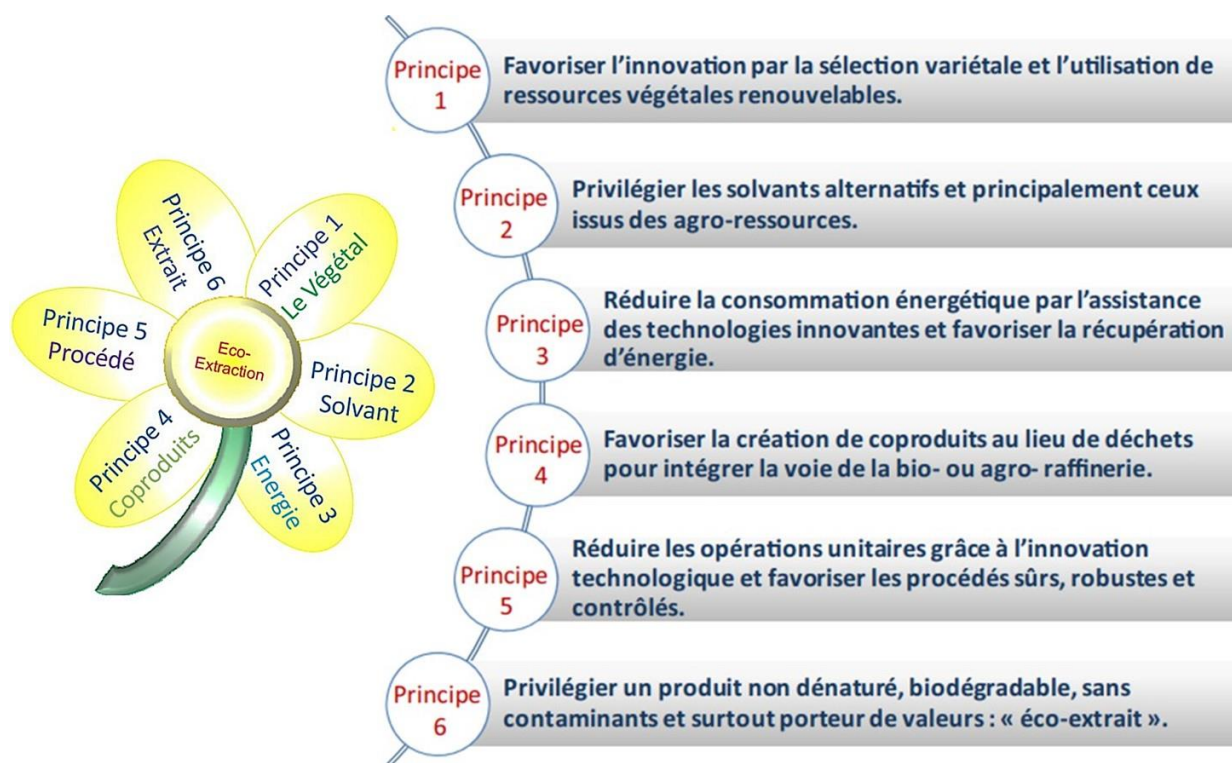


Figure II. 1 : Schéma détaillant les six principes de l'éco-extraction (Fabiano-Tixier & Culioli, 2013).

Récemment, une grande attention a été accordée à l'application du chauffage diélectrique par micro-ondes dans de nombreux processus de l'industrie chimique et alimentaire afin de remplacer les méthodes classiques d'extraction des HEs (**Moradalizadeh et al., 2013**). En fait, il s'avère que l'énergie des micro-ondes est largement utilisée dans les laboratoires de chimie depuis les années 1986. Ainsi, les chercheurs ont étudié le potentiel de cette source d'énergie non conventionnelle pour des applications synthétiques, analytiques et de traitement. Actuellement, plus de 3000 articles scientifiques documentent l'utilisation du chauffage diélectrique dans la synthèse des produits chimiques et plus de 1000 articles documentent son utilisation dans l'extraction des molécules bioactives. L'extraction assistée par micro-ondes est une technologie qui repose sur un mécanisme de chauffage par friction. De plus, elle est peu coûteuse et fonctionne bien dans les conditions atmosphériques (**Souiy, 2023**). Les progrès réalisés dans le domaine de l'extraction des HEs par micro-ondes ont permis de mettre au point plusieurs techniques telles que l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESAM), l'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous-vide (HDMV), l'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO), la distillation par micro-ondes à air comprimé (DMAC), l'espace de tête micro-ondes (ETM), et l'hydrodistillation par micro-ondes sans solvant (HDMOSS) (**Chemat & Lucchesi, 2006**).

En outre, la propriété d'accumulation des HEs chez les plantes se retrouve chez des familles spécifiques répartis dans tout le règne végétal, notamment chez les pinacées (pins et sapins), les cupressacées (bois de cèdre) et chez les angiospermes. Cependant, le taxon de plantes le plus important pouvant accumuler des HEs est celui des dicotylédones telles que *Asteraceae* (camomille), *Apiaceae* (coriandre), *Géraniaceae* (géranium), *Lamiaceae* (menthe), *Illiciaceae* (anis), *Lauraceae* (cannelle), *Rosaceae* (rose), *Sandatalaceae* (santal), *Myrtaceae* (eucalyptus), *Myristicaceae* (noyer), *Oleaceae* (jasmin), et *Rutaceae* (citron). En revanche, les monocotylédones quant à elles sont principalement représentées par les familles des *Zingiberaceae* (gingembre) et des *Poaceae* (vétiver) (**Souiy, 2023**).

Ce travail s'est ainsi focalisé sur l'extraction et la caractérisation d'HEs de plantes de notre pays, l'attention a particulièrement été portée sur quatre plantes de la flore algérienne en raison de leur usage traditionnel local important et leur disponibilité. Ces dernières appartiennent aux espèces et genres suivants : *Artemisia herba-alba* Asso, *Artemisia campestris* L., *Artemisia judaica* et *Ruta montana*. De plus, l'extraction des HEs de ces dites plantes a été réalisée principalement par hydrodistillation conventionnelle (HD). Ces huiles ont par la suite été analysées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) afin d'en déterminer la composition chimique. En parallèle à cela, et afin de déterminer si la technique d'extraction des HEs avait une

influence sur leur composition, la technique d'hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO) a également été utilisée. Une attention particulière a notamment été portée sur le rendement et le temps d'extraction.

## I. Matériel et méthodes

### 1. Collecte du matériel végétal

Les parties aériennes de *A. herba alba*, *A. campestris*, *A. judaica* et *R. montana* ont été récoltées de manière aléatoire (problème de déplacement en raison de la pandémie de COVID-19) en Algérie pendant la période de floraison de ces plantes (Tableau II.1).

**Tableau II. 1 : Lieu et période de récolte des espèces de plantes étudiées.**

Famille	<i>Astéraceae</i>			<i>Rutaceae</i>
Espèce	<i>Artemisia herba alba</i>	<i>Artemisia campestris</i>	<i>Artemisia judaica</i>	<i>Ruta montana</i>
Nom commun	Chih, Chiha	Dgouft	Chih, Chouhiya	Fidjel el-djbel
Période de récolte	Octobre 2021	Octobre 2021	Avril 2021	Mai 2021
Lieu de récolte	Taadmit, Djelfa	Ain Roumia, Djelfa	Tamanrasset	Ferdjioua, Mila
Géolocalisation	34°16'60.00"N / 2°58'60.00"E	34°21'2.28"N / 3°13'43.33"E	22°47'6"N / 5°31'22.001"E	36°24'40.00"N / 5°56'15.07"E

De plus, l'identification taxonomique du matériel végétal étudié a été confirmée par le Prof. Benhouhou Salima, Maître de conférences au niveau du département de Botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie d'Alger (Algérie). Par ailleurs, cette identification a été effectuée selon la nomenclature de **Quezel & Santa (1963)**, puis validée par l'index synonymique des plantes d'Afrique du Nord.

### 2. Méthode de séchage des plantes

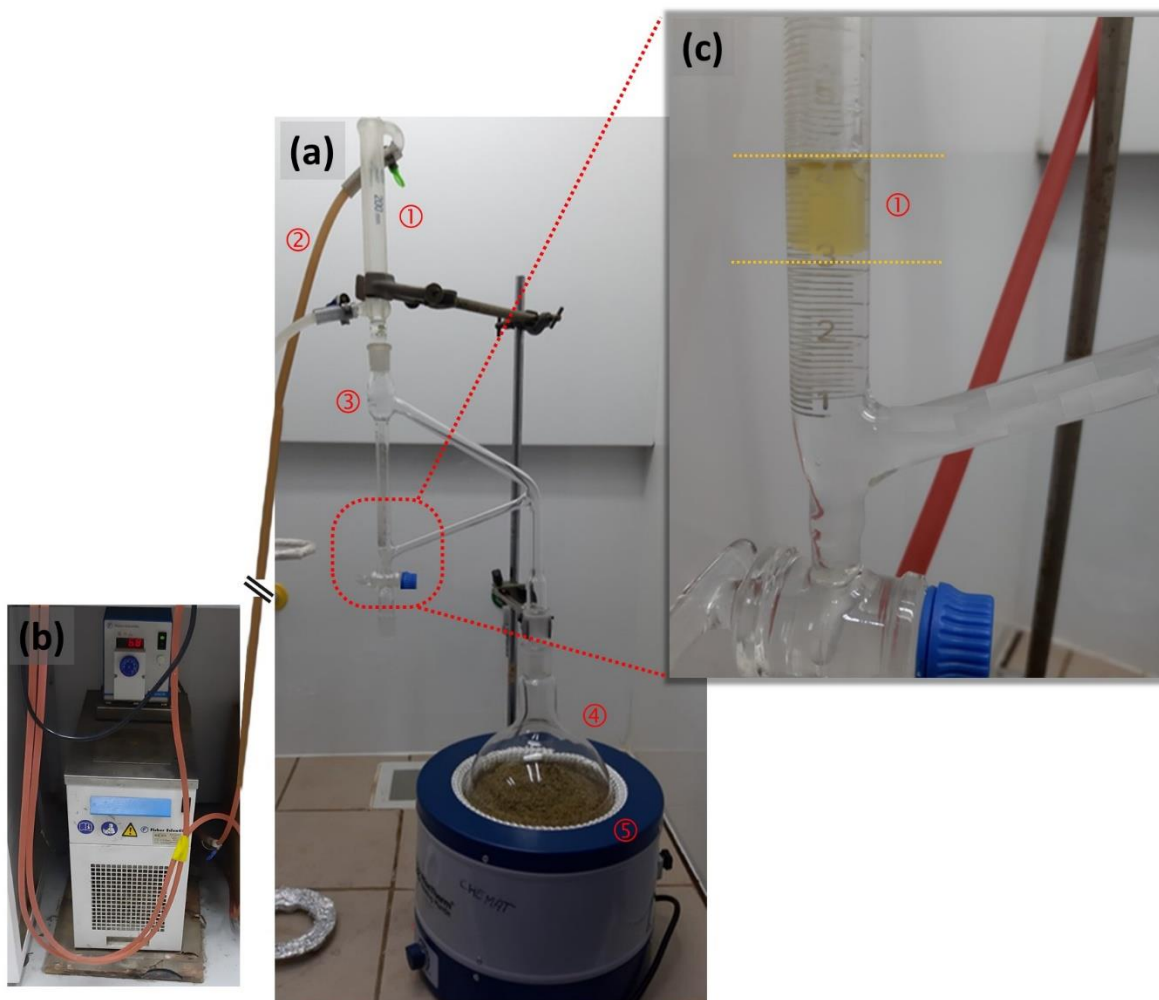
Les parties aériennes entières des espèces végétales étudiées ont été séchées à l'ombre et à température ambiante pendant une dizaine de jours, puis conservées dans des sacs en papiers dans les mêmes conditions.

### 3. Extraction des huiles essentielles

Cette partie de ce travail de thèse a été effectuée au sein du laboratoire Extraction et séparation de principes actifs à partir de plantes médicinales du Centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques (CRAPC).

### 3.1. Extraction des HEs par hydrodistillation conventionnelle

Un échantillon de 500 g de matériel végétal séché a été broyé à l'aide d'un broyeur électrique (Moulinex AR110830) extemporanément à l'extraction. Puis, il a été soumis à l'hydrodistillation (figure II. 2), à l'aide d'un système de type Clevenger modifié, utilisant un chauffe-ballon comme source de chaleur (450 W, 60 Hz), pendant 3 à 4 h, jusqu'à récupération totale de l'HE.



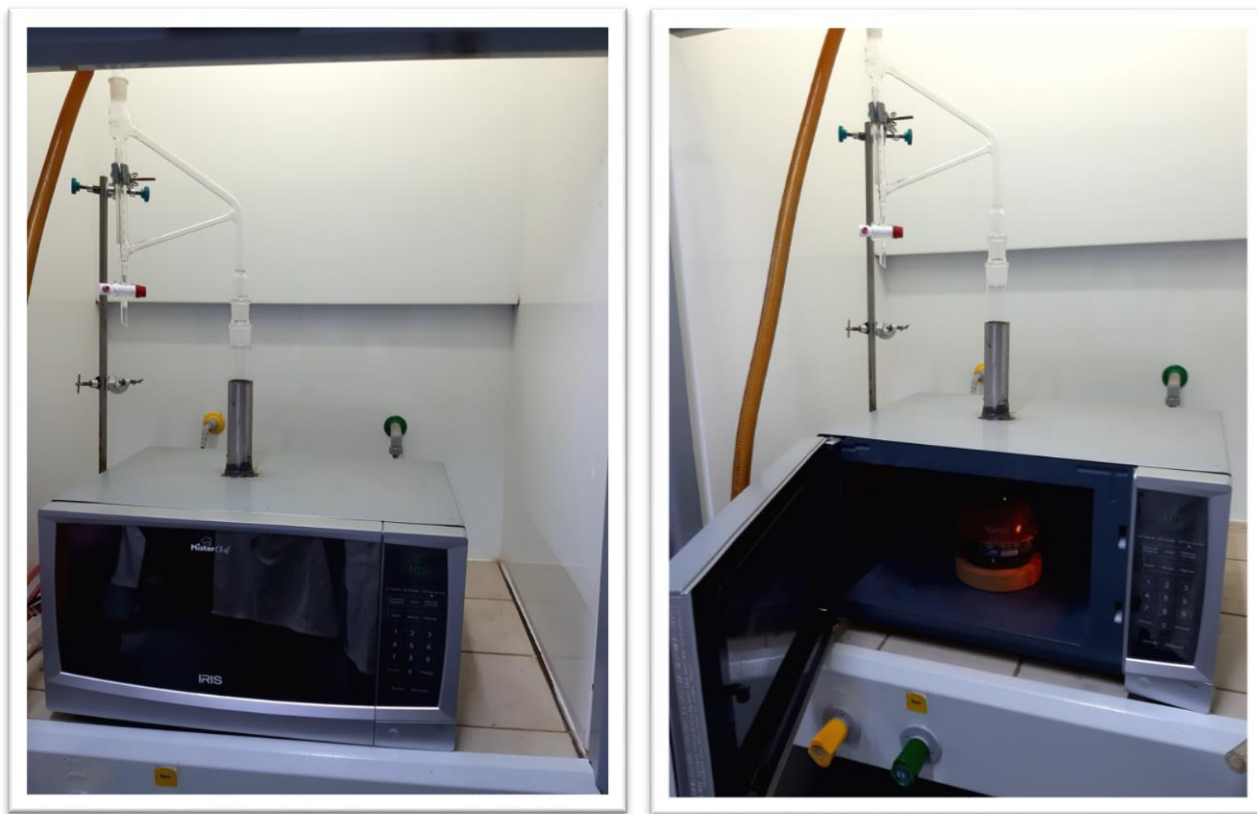
**Figure II. 2 : Extraction des HEs par hydrodistillation conventionnelle.**

**(a) Montage permettant l'extraction des HEs :** ① Réfrigérant, ② évacuation d'eau de refroidissement ③ Dean Stark avec cohobage ④ ballon contenant le matériel végétal ⑤ chauffe-ballon ; **(b) Refroidisseur d'eau ; (c) Agrandissement de la figure (a) montrant l'HE après extraction ①.**

Une fois récupérée, l'HE est mise dans un flacon en verre ambré auquel est ajoutée une quantité définie de sulfate de sodium anhydre, afin d'éliminer toutes traces éventuelles d'eau. Puis, le flacon est hermétiquement scellé. Enfin, l'HE est maintenue à l'obscurité et à 4 °C jusqu'à utilisation ultérieure.

### 3.2. Extraction des HEs par hydrodistillation assistée par micro-ondes

Dans ce procédé d'extraction par HDMO, la source d'énergie utilisée est un four à micro-ondes. Dans ce travail un four microondes domestique (Iris, model : Mister Chef) a été modifié afin de l'adapter aux besoins expérimentaux, et ce, en perçant un trou en son sommet afin d'être en mesure de le combiner à un appareil de type Clevenger (figure II. 3).



**Figure II. 3 : Montage utilisé pour l'extraction des HEs par HDMO.**

Ce four microondes modifié fonctionne à une fréquence de 2450 MHz avec une puissance maximale de 900 W et une alimentation électrique de 230 V à 50 Hz. Comme dans le cas de l'hydrodistillation conventionnelle, une quantité de matériel végétal séché, *i.e.*, 50 g, est finement broyée puis placée dans un ballon d'une capacité de 1000 mL contenant lui-même 750 mL d'eau distillée. Notons cependant que contrairement à l'HD, aucune agitation ou rotation n'est possible à l'intérieur du four microondes dans le cas de l'HDMO. L'ensemble des extractions par HDMO sont par la suite menées sous pression atmosphérique pendant 45 minutes (étape de chauffage incluse) et à une puissance de 450 W. L'HE est enfin recueillie dans un flacon en verre ambré, puis séchée sur un lit de sulfate de sodium anhydre et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation. Les expériences ont été réalisées en trois répétitions et la valeur moyenne du rendement a été rapportée.

### 3.3. Détermination du rendement d'extraction des huiles essentielles

Le rendement d'extraction de chaque HE a été exprimé en pourcentage (%) du rapport entre la masse de l'HE (en g) et la masse de la matière végétale séchée (en g). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque expérimentation et la valeur moyenne du rendement a été rapportée (AFNOR, 1986). Il a été calculé par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = \left( \frac{M_{HE}}{M_S} \right) \times 100$$

Où :

$R_{HE}$  : rendement d'HE en (%) ;

$M_{HE}$  : Masse de l'HE obtenue en gramme ;

$M_S$  : Masse de matériel végétal sec utilisée en gramme.

### 3.4. Identification des composants des huiles essentielles extraites par CG/SM

#### 3.4.1. Principe de la méthode

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) est une technique hybride combinant la chromatographie en phase gazeuse (CG) et la spectrométrie de masse (SM), permettant l'analyse de composés volatils, de faible masse et thermostables dans les conditions de la CG (Mandal *et al.*, 2015).

Dans cette technique, un chromatographe en phase gazeuse utilise une colonne capillaire (logée dans un four) aux dimensions et aux caractéristiques spécifiques pour séparer les composés. La température est augmentée pour injecter les molécules, nécessitant leur volatilité à cette température d'injection. À mesure que la température du four s'élève, les composés du mélange sont élués séquentiellement selon leurs propriétés chimiques distinctives, ce qui permet leur séparation lors de leur passage dans la colonne. Une fois séparés, les composés atteignent la chambre d'ionisation du spectromètre de masse.

L'ionisation par impact électronique (EI) à une énergie fixe de 70 eV est couramment utilisée pour générer des ions fragmentaires. L'analyseur de masse trie ces fragments en fonction de leur rapport masse/charge, produisant un chromatogramme qui associe les données de temps de rétention des composés et leurs ions fragmentés (l'ion moléculaire intact est rarement observé) (Chevalier & Sommerer, 2011).

Les spectres de masse obtenus via la CG/SM offrent des informations détaillées sur la structure moléculaire grâce à l'interprétation des fragmentations d'ions. Ces spectres peuvent être comparés à des bases de données étendues, comme celles de Wiley ou du NIST, contenant des centaines de milliers de spectres de référence pour identifier les composés (Chevalier & Sommerer, 2011 ; Mandal *et al.*, 2015).

### 3.4.2. Conditions d'analyse

La détermination de la composition des HEs extraites a été réalisée à l'aide d'un système CG/SM constitué d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent HP 6890 Plus, couplé à un spectromètre de masse Agilent HP 5973. Les conditions expérimentales utilisées sont résumées dans le tableau II. 2.

**Tableau II. 2 : Conditions opératoires de l'analyse par CG/SM des HEs extraites.**

Paramètres	Caractéristique
Energie d'ionisation	70 eV
Colonne capillaire	HP-5MS
Phase stationnaire	5 % phényle 95 % diméthylpolysiloxane
Longueur	30 m
Diamètre interne	0,25 mm
Epaisseur de phase	0,25 µm
Température de l'injecteur	250 °C
Gaz vecteur	Hélium (He)
Débit	0,5 mL/min
Programmation du four	8 min à 60° C 60° C à 250° C (à raison de 2° C/ min) 10 min à 250° C
Quantité injectée	0,2 µl
Mode d'injection	Split 1:80
Délai de solvant	3,5 min

### 3.4.3. Mode d'identification des pics du chromatogramme CG/SM

Un mélange d'hydrocarbures n-alcanes (C7-C30) a été analysé séparément dans des conditions chromatographiques similaires à celles utilisées pour l'analyse des échantillons de cette étude, et ce, en utilisant la même colonne capillaire HP-5MS. Par la suite, l'identification des composants volatils séparés a été réalisée en : i) faisant correspondre leurs spectres de masse enregistrés à ceux stockés dans les bases de données des bibliothèques intégrées Wiley et NIST ; et,

ii) en comparant l'indice de rétention (IR) de chaque composé, calculé par rapport à la série des n-alcanes (C<sub>8</sub>-C<sub>29</sub>), à ceux retrouvés dans la littérature (Adams, 2017). Ces IRs sont alors calculés selon la formule suivante :

$$\mathbf{IR} = 100 \mathbf{n} + 100 \left( \frac{t_{Rc} - t_{Rn}}{t_{Rn+1} - t_{Rn}} \right)$$

Où :

**IR** : est l'indice de rétention du composé étudié ;

**t<sub>Rc</sub>** : est le temps de rétention du composé étudié ;

**t<sub>Rn</sub>** : est le temps de rétention de l'alcane contenant "n" atomes de carbone et dont le pic précède celui du composé étudié;

**t<sub>Rn+1</sub>** : est le temps de rétention de l'alcane contenant "n+1" atomes de carbone et dont le pic sort après celui du composé étudié.

**n et n+1** : correspondent au nombre de carbones des hydrocarbures paraffiniques (n-alcanes).

## II. Résultats

### 1. Temps et rendements d'extraction

Ce travail a permis de mettre en évidence que l'extraction par HDMO permettait de réduire considérablement le temps d'extraction en le divisant par quatre. En effet, il a été démontré que l'extraction par HDMO nécessitait 45 minutes, alors que celle par HD conventionnelle devaient se réaliser en 180 minutes. Cependant, en termes de rendements, les deux types de procédés d'extraction des HEs donnent des rendements similaires (tableau II. 3).

**Tableau II. 3 : Rendements des procédés d'extraction des HEs par HD et HDMO.**

Plantes	Extraction par HD (180 min)	Extraction par HDMO (45 min)
<i>A. herba alba</i>	2,20 ± 0,09 %	2,27 ± 0,1 %
<i>A. campestris</i>	0,59 ± 0,04 %	0,61 ± 0,09 %
<i>A. judaica</i>	0,84 ± 0,02 %	0,83 ± 0,04 %
<i>R. montana</i>	0,67 ± 0,06 %	0,70 ± 0,04 %

Notons qu'indépendamment de la technique d'extraction utilisée, le rendement le plus élevé a été obtenu avec *A. herba alba*, suivi par *A. judaica*, *R. montana* et enfin *A. campestris* par rapport au poids secs de la matière végétale.

### 2. Détermination des compositions chimiques des huiles essentielles extraites

#### 2.1. Composition de l'HE extraite de *Artemisia herba alba*

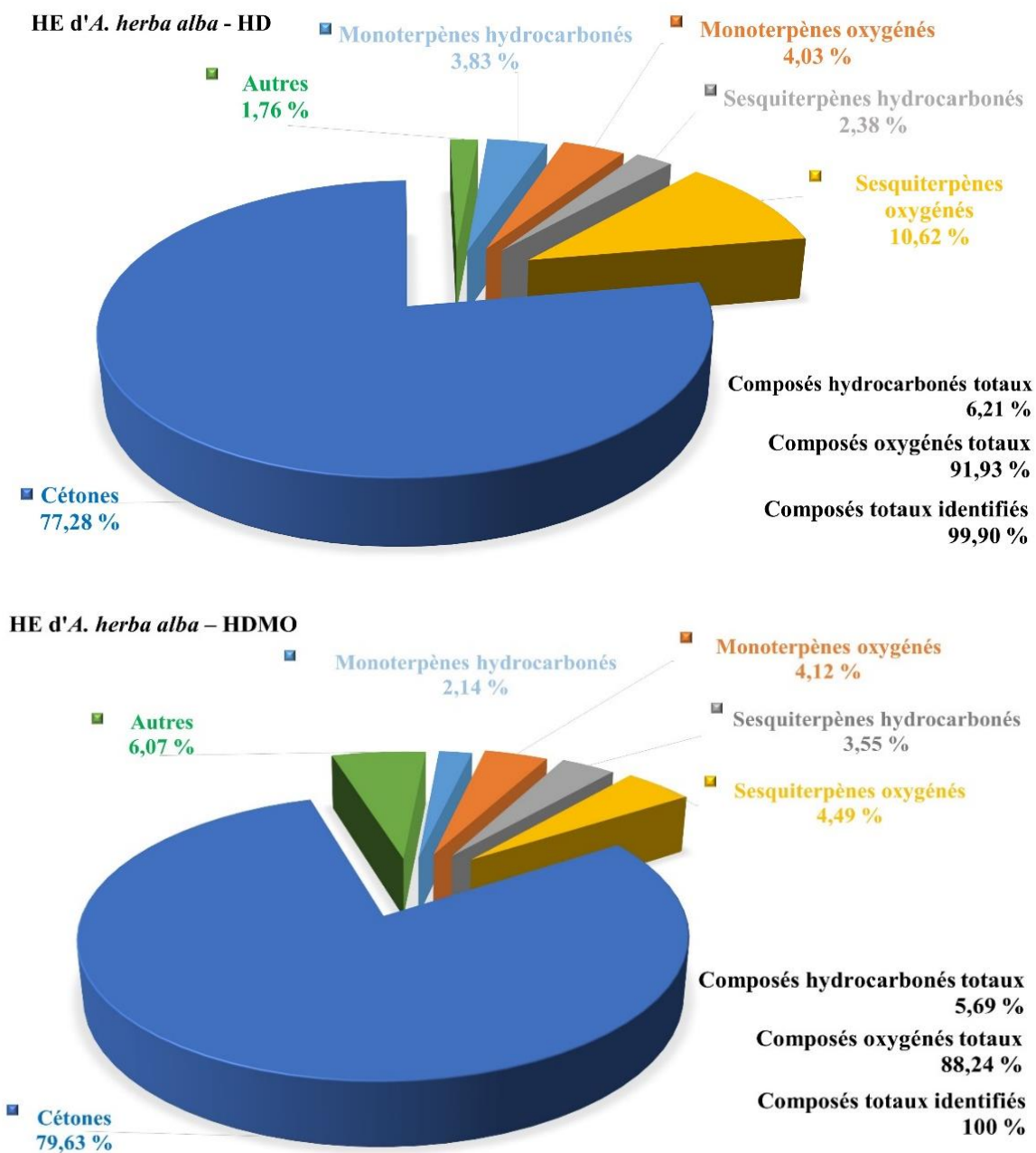
L'analyse par CG/SM des HEs de *Artemisia herba alba* obtenues à l'aide des deux techniques d'extraction HD et HDMO a permis de mettre en évidence la présence de divers types de composés (tableau II. 4 et figure II. 4). Elle a également permis d'identifier la totalité de ces composés quelle que soit la technique d'extraction (99,90 % par HD et 100 % par HDMO) (Chromatogrammes en annexe 1).

**Tableau II. 4 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de *Artemisia herba alba* extraite par HD et HDMO.**

Groupes de composés	Technique d'extraction / pourcentage	
	HD (%)	HDMO (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	3,83	2,14
Monoterpènes oxygénés	4,03	4,12
Sesquiterpènes hydrocarbonés	2,38	3,55
Sesquiterpènes oxygénés	10,62	4,49
Cétones	77,28	79,63
Autres	1,76	6,07
<b>Composés hydrocarbonés totaux</b>	<b>6,21</b>	<b>5,69</b>
<b>Composés oxygénés totaux</b>	<b>91,93</b>	<b>88,24</b>
<b>Composés identifiés totaux</b>	<b>99,90</b>	<b>100</b>

Ainsi, et de manière générale, l'HE de *Artemisia herba alba* obtenue par HD semble contenir une faible quantité de composés hydrocarbonés, avec un taux de 6,21 %, comparativement aux composés oxygénés qui semblent bien plus majoritaires, avec un taux de 91,93 %.

Il s'avère également que la majorité de ces derniers soit représentée principalement par des cétones avec un taux de 77,28 %, des sesquiterpènes oxygénés (10,62 %) et des monoterpènes oxygénés (4,03 %). Dans le cas de l'extraction de l'HE de *A. herba alba* par HDMO, l'analyse par CG/SM a révélé une composition chimique générale identique, avec le même type de groupe de composés, mais cependant des quantités et des pourcentages différents que ceux obtenus avec HD ont été observés. Il s'agit plus particulièrement du groupe des cétones avec un taux un peu plus élevé, de l'ordre de 79,63 %, pour l'HDMO contre 77,28 % pour l'HD. Et inversement dans le cas du groupe des sesquiterpènes oxygénés le taux de plus faible de l'ordre de 4,49 % a été obtenu avec la technique HDMO contre 10,62 % obtenu par la technique HD.



**Figure II. 4 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de *Artemisia herba alba* extraites par HD et par HDMO.**

Maintenant si l'on s'intéresse de plus près à la composition détaillée de l'HE de *A. herba alba* obtenue par HD, on observe qu'au total, vingt-et-un (21) composés ont été identifiés dans les HEs par CG/SM (Tableau II. 5).

**Tableau II. 5 : Composition chimique de l'HE de *Artemisia herba alba* obtenue par HD et HDMO.**

N°	Composants	IR	HD (%)	HDMO (%)
1	Santolina triène	906	0,53	0,36
2	Camphène	946	1,35	0,73
3	Bêta-pinène	974	1,44	0,79
4	Bêta-phellandrène	1025	0,51	0,26
5	1,8-Cinéole	1026	1,84	0,92
6	Bêta-thujone	1112	0,87	1,58
7	Chrysanthène	1124	0,38	0,57
8	<b>Camphre</b>	1141	<b>9,09</b>	<b>13,05</b>
9	Borneol	1165	0,86	1,25
10	Terpinen-4-ol	1174	0,33	0,55
11	Trans-piperitol	1207	0,29	0,51
12	Cis-carveol	1226	0,71	0,89
13	Bêta-caryophyllène	1408	1,46	2,42
14	Germacrene D	1484	0,92	1,13
15	<b>Davana éther</b>	1450	<b>5,10</b>	<b>0,52</b>
16	<b>Davanone</b>	1587	<b>66,94</b>	<b>64,43</b>
17	<b>Davanol D1</b>	1615	<b>3,02</b>	<b>2,07</b>
18	Davanol D2	1627	0,83	0,43
19	Muurolol (epi-alpha)	1640	0,89	0,57
20	Alpha-Bisabolol	1685	0,78	0,90
21	<b>Caryophyllène acetate</b>	1701	<b>1,76</b>	<b>6,07</b>

\* les composés en gras correspondent aux composés majoritaires

Parmi ces 21 composés, le davanone (qui est une *cétone* sesquiterpénique) et le camphre sont majoritaires avec des taux de 66,94 % et 9,09 %, respectivement. Des quantités bien plus faibles de l'ordre de 5,10 %, 3,02 %, 1,76 % ont été obtenues pour les composés suivants : davana éther, davanol D1 et caryophyllène acetate, respectivement. Dans le cas de l'extraction de l'HE de *A. herba alba*, le nombre de composés identifiés sont identiques à ceux obtenus par HD, *i.e.*, 21, mais à des proportions différentes. Les quantités de Davanone sont d'ailleurs similaires avec des taux de 66,94 % et 64,43 % pour les extractions par HD et HDMO, respectivement.

## 2.2. Composition de l'HE extraite de *Artemisia campestris*

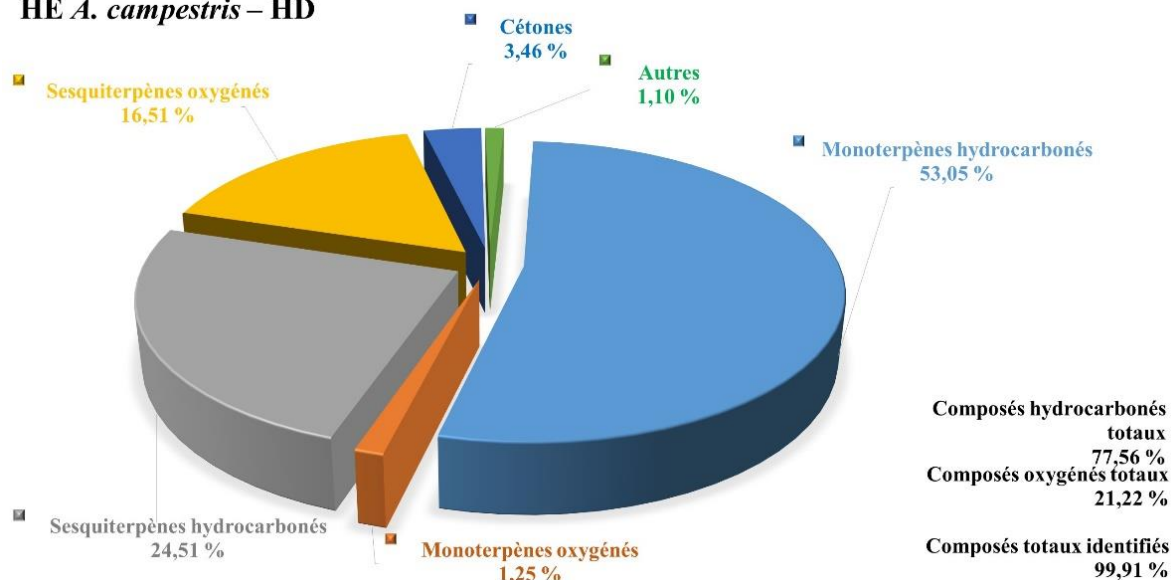
L'HE extraite à partir des parties aériennes de *Artemisia campestris* par HD contient relativement peu de composés oxygénés (21,22 %) et elle est plus riche en composés hydrocarbonés (77,56 %). En effet, les monoterpènes hydrocarbonés sont les plus abondants avec un taux de 53,05 %, ajouté à cela, on note la présence de 24,51 % de sesquiterpènes hydrocarbonés (tableau II. 6 et figure II. 5).

**Tableau II. 6 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de *Artemisia campestris* extraite par HD et HDMO**

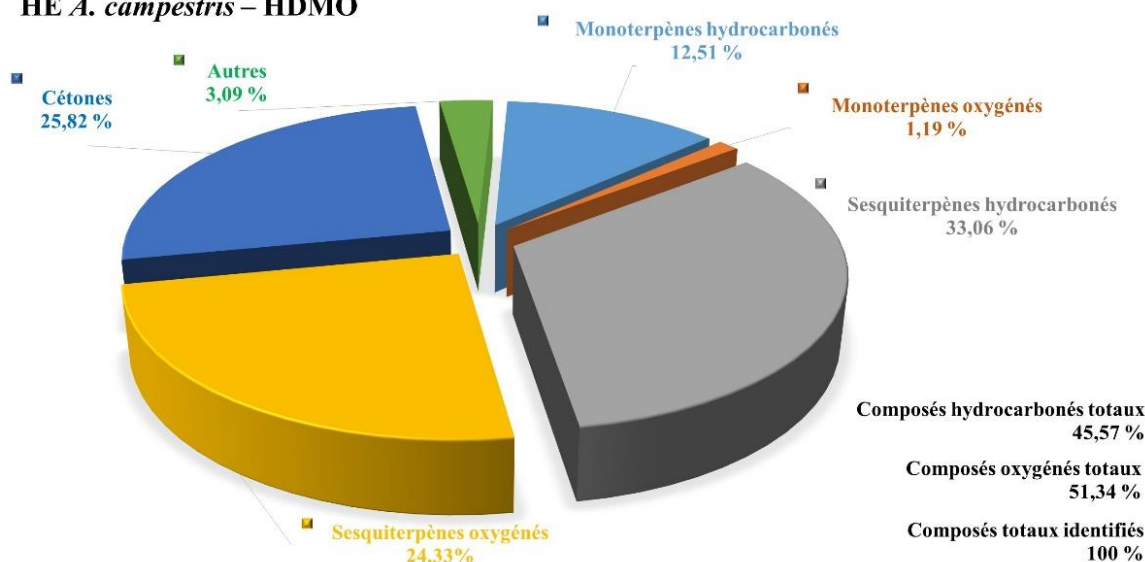
Groupes de composés	Technique d'extraction / pourcentage	
	HD (%)	HDMO (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	53,05	12,51
Monoterpènes oxygénés	1,25	1,19
Sesquiterpènes hydrocarbonés	24,51	33,06
Sesquiterpènes oxygénés	16,51	24,33
Cétones	3,46	25,82
Autres	1,10	3,09
<b>Composés hydrocarbonés totaux</b>	<b>77,56</b>	<b>45,57</b>
<b>Composés oxygénés totaux</b>	<b>21,22</b>	<b>51,34</b>
<b>Composés identifiés totaux</b>	<b>99,88</b>	<b>100</b>

En revanche, dans le cas de l'HE de *A. campestris* extraite par HDMO, les proportions des groupes de composés sont quelque peu différentes de celle de l'HE de la même plante mais extraite par HD (Chromatogrammes en annexe 2). Les composés hydrocarbonés sont majoritaires et particulièrement les sesquiterpènes (24,33 %). Les monoterpènes hydrocarbonés sont également présents à un taux de l'ordre de 12,51 %, bien inférieur à celui obtenu par HD. L'HE de *A. campestris* extraite par HDMO comprend néanmoins des composés oxygénés tels que les sesquiterpènes et les cétones aux proportions quasi identiques à savoir 24,33 % et 25,82 %, respectivement.

### HE *A. campestris* – HD



### HE *A. campestris* – HDMO



**Figure II. 5 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de *Artemisia campestris* extraites par HD et par HDMO.**

En se basant également sur les résultats des analyses par CG/MS, vingt-neuf (29) constituants chimiques ont été identifiés dans les HEs de *A. campestris* quelle que soit la méthode d'extraction utilisée (tableau II. 7). Dans l'HE extraite par HD, le composé majoritaire est le bêta-pinène avec un taux de l'ordre de 19,51 %. Dans le cas de l'HE extraite par HDMO, la composition est identique à la précédente mais à des proportions différentes. Ainsi, l'extraction de l'HE de *A. campestris* par HDMO semble plus favoriser les composés oxygénés tels que le davanone, composé majoritaire de cette extraction et qui est présent à un taux de 24,15 % contre 2,68 % pour l'extraction par HD conventionnelle.

**Tableau II. 7 : Composition chimique de l'HE de *Artemisia campestris* obtenue par HD et HDMO.**

N°	Composants	IR	HD (%)	HDMO (%)
1	<b>Alpha-pinene</b>	932	<b>7,11</b>	<b>0,40</b>
2	Sabinene	969	1,03	0,49
3	<b>Béta-pinene</b>	974	<b>19,51</b>	<b>2,19</b>
4	Alpha-phellandrene	1002	2,43	0,79
5	<b>p-Cymene</b>	1020	<b>8,11</b>	<b>4,49</b>
6	<b>D-limonene</b>	1024	<b>4,91</b>	<b>1,03</b>
7	Beta-phellandrene	1025	1,00	0,49
8	Beta-ocimene (Z)	1032	1,18	0,46
9	Beta-ocimene (E)	1044	1,79	0,70
10	<b>γ-terpinène</b>	1054	<b>5,98</b>	<b>1,47</b>
11	Terpinen-4-ol	1174	1,25	1,19
12	Alpha-copaene	1374	1,00	1,25
13	Jasmone-E	1390	0,78	1,67
14	Beta-caryophyllene	1408	0,94	1,25
15	Trans-beta-caryophyllene	1464	1,02	1,32
16	γ-Muurolene	1478	1,56	0,43
17	<b>Gamma-curcumene</b>	1481	<b>4,69</b>	<b>6,66</b>
18	<b>Germacrene D</b>	1484	<b>4,90</b>	<b>12,12</b>
19	Alpha-curcumene	1479	1,41	0,76
20	<b>Bicyclgermacrene</b>	1500	<b>3,32</b>	<b>3,30</b>
21	Alpha-farnesene	1505	1,51	2,12
22	Gamma-cadinene	1513	1,27	1,55
23	Delta-cadinene	1522	2,89	2,30
24	<b>Globulol</b>	1590	<b>7,49</b>	<b>8,35</b>
25	<b>Davanone</b>	1587	<b>2,68</b>	<b>24,15</b>
26	<b>Cedrol (epi)</b>	1618	<b>3,52</b>	<b>4,58</b>
27	γ-Eudesmol	1630	1,19	1,87
28	<b>α-Cadinol</b>	1652	<b>4,31</b>	<b>9,53</b>
29	Tridecenol acetate (2E)	-	1,10	3,09

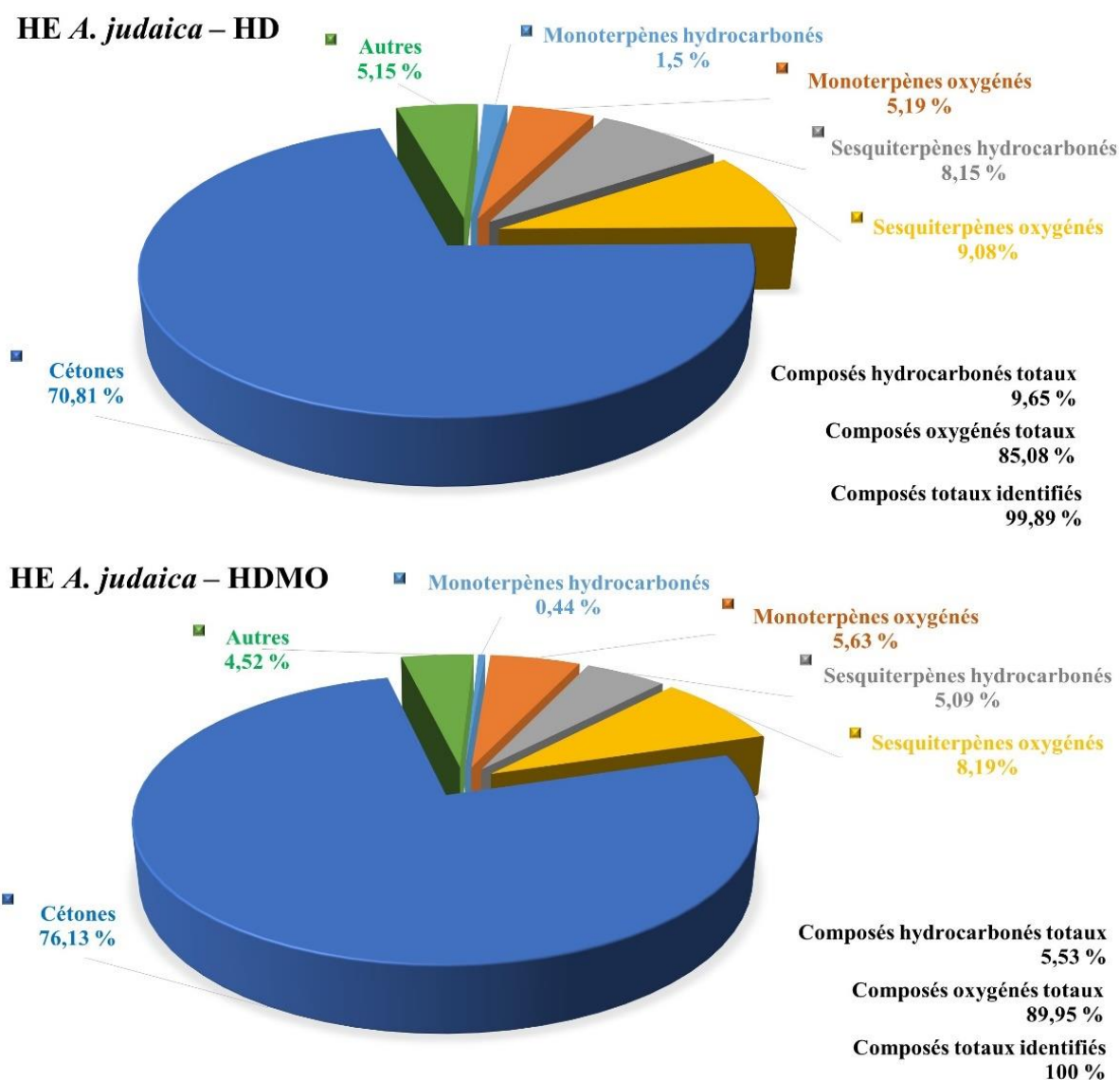
\* les composés en gras correspondent aux composés majoritaires

### 2.3. Composition de l'HE extraite de *Artemisia judaica*

L'analyse par CG/SM de la composition phytochimique de l'HE de *Artemisia judaica* extraite par HD a révélé la présence majoritaire de composés oxygénés (85,08 %). Comparativement à ces derniers, les composés hydrocarbonés semblent nettement moins abondants avec un taux de 9,65 % (tableau II. 8 et figure II. 6). En effet, 70,81 % des composés isolés de cette HE et identifiés par CG/SM sont des cétones, 9,08 % des sesquiterpènes oxygénés et 5,19 % des monoterpènes oxygénés. En revanche, les sesquiterpènes et monoterpènes hydrocarbonés ne sont présents qu'à de faibles quantités, à savoir 8,15 % et 1,5 %, respectivement. En ce qui concerne l'HE de *Artemisia judaica* extraite par HDMO, les taux des divers groupes de composés identifiés sont similaires et quasi équivalents à ceux obtenus pour l'HE extraite par HD (Chromatogrammes en annexe 3).

**Tableau II. 8 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de *Artemisia judaica* extraite par HD et HDMO**

Groupes de composés de l'HE	Technique d'extraction / pourcentage	
	HD (%)	HDMO (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	1,5	0,44
Monoterpènes oxygénés	5,19	5,63
Sesquiterpènes hydrocarbonés	8,15	5,09
Sesquiterpènes oxygénés	9,08	8,19
Cétones	70,81	76,13
Autres	5,15	4,52
<b>Composés hydrocarbonés totaux</b>	<b>9,65</b>	<b>5,53</b>
<b>Composés oxygénés totaux</b>	<b>85,08</b>	<b>89,95</b>
<b>Composés identifiés totaux</b>	<b>99,89</b>	<b>100</b>



**Figure II. 6 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de *Artemisia judaica* extraite par HD et HDMO.**

Au total, vingt-six (26) phyto-constituants ont été identifiés par CG/SM après extraction (99,89 % pour l'extraction par HD et 100 % pour celle par HDMO) (tableau II. 9).

**Tableau II. 9 : Composition chimique de l'HE de *Artemisia judaica* obtenue par HD et HDMO.**

N°	Composants	IR	HD (%)	HDMO (%)
1	Alpha-pinene	932	0,61	0,11
2	Alpha-phellandrene	1002	0,18	0,03
3	Alpha-terpinene	1014	0,32	0,12
4	p-cimene	1020	0,39	0,18
5	Cis-Linalool oxide	1067	0,33	0,17
6	Menth-2-en-1-ol (cis-p)	1118	0,16	0,12
7	Trans-piperitol	1207	0,64	0,43
8	Davanone nor	1228	1,43	1,13
9	<b>Pepiritone</b>	1249	<b>68,71</b>	<b>74,59</b>
10	Buccocamphor	-	1,01	0,83
11	<b>Thymol</b>	1289	<b>3,05</b>	<b>4,08</b>
12	Davanafuran	1414	0,54	0,62
13	(E)- $\beta$ -Farnesene	1454	0,54	0,72
14	Caryophyllene 9-epi-E	1464	0,53	0,62
15	Cinnamic acid	1452	1,44	1,79
16	<b><math>\delta</math>-Cadinene</b>	1522	<b>6,33</b>	<b>3,01</b>
17	Cadina-1,4-diene (trans)	1533	0,75	0,74
18	<b>(-)-globulol</b>	1590	<b>2,78</b>	<b>2,82</b>
19	Davanone	1587	0,67	0,41
20	Cinnamaldehyde (hydro)	1599	1,05	0,59
21	Gossonorol	1636	1,35	0,97
22	Cadinol (epi-alpha)	1638	0,60	0,53
23	Bêta-Eudesmol	1649	1,55	1,23
24	<b>Methyl jasmonate Z</b>	1648	<b>2,12</b>	<b>1,52</b>
25	Cedren-13-ol	1688	1,58	0,97
26	Junicedranol	1692	1,22	1,67

\* les composés en gras correspondent aux composés majoritaires

Ainsi, les données présentées dans le tableau II. 9 montrent clairement que le pepiritone, une cétone monoterpénique, est majoritairement abondant dans l'HE de *Artemisia judaica* qu'il ait été obtenu par HD (68,71 %) ou par HDMO (74,59 %). D'autres composés intéressants pour ce travail, sont également présents mais à des quantités moindres, il s'agit notamment du  $\delta$ -cadinene (HD : 6,33 % et HDMO : 3,021 %) et le thymol (HD : 3,05 % et HDMO : 4,08 %).

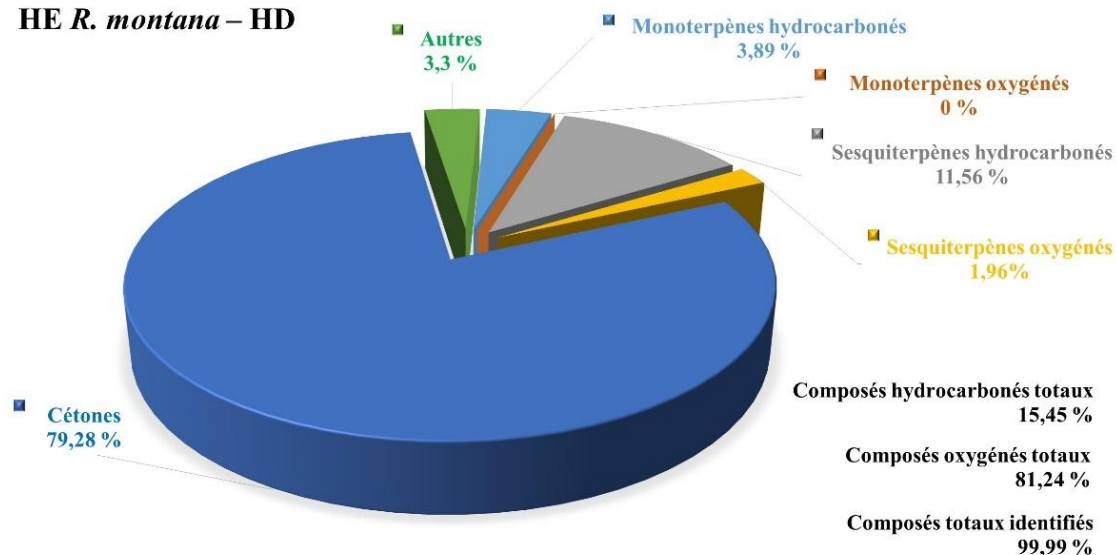
#### 2.4. Composition de l'HE extraite de *Ruta montana*

L'HE de la plante algérienne *Ruta montana* extraite par HD semble être riche en composés oxygénés qui sont majoritaires avec un taux de l'ordre de 81,24 % (tableau II. 10 et figure II. 7) (Chromatogrammes en annexe 4).

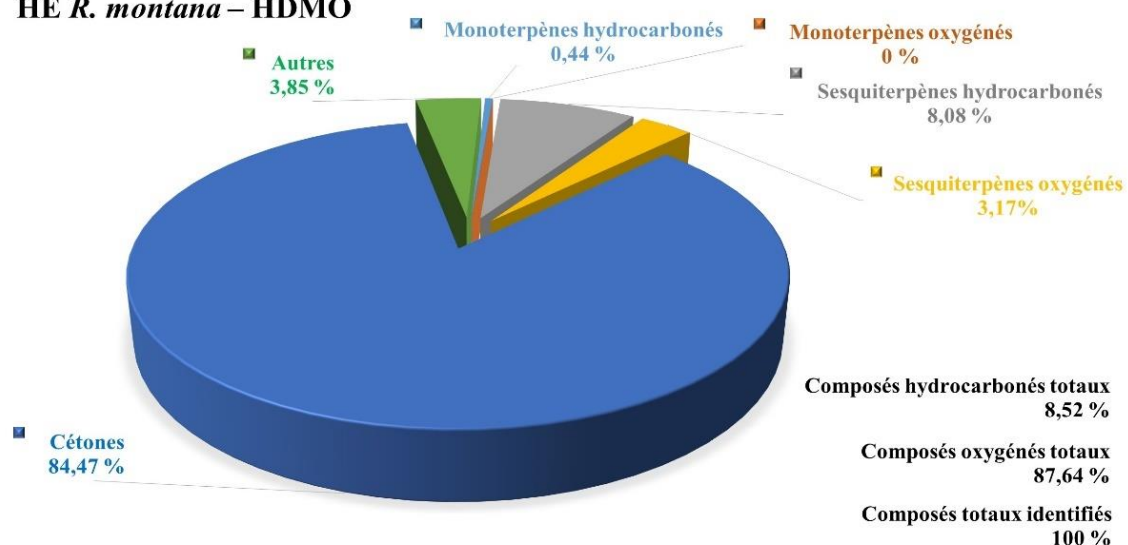
**Tableau II. 10 : Répartition des principaux groupes de composés constituant l'HE de *Ruta montana* extraite par HD et HDMO.**

Groupes de composés	Technique d'extraction / pourcentage	
	HD (%)	HDMO (%)
Monoterpènes hydrocarbonés	3,89	0,44
Monoterpènes oxygénés	0	0
Sesquiterpènes hydrocarbonés	11,56	8,08
Sesquiterpènes oxygénés	1,96	3,17
Cétones	79,28	84,47
Autres	3,30	3,85
<b>Composés hydrocarbonés totaux</b>	<b>15,45</b>	<b>8,52</b>
<b>Composés oxygénés totaux</b>	<b>81,24</b>	<b>87,64</b>
<b>Composés identifiés totaux</b>	<b>99,99</b>	<b>100</b>

**HE *R. montana* – HD**



**HE *R. montana* – HDMO**



**Figure II. 7 : Répartition en secteurs des compositions générales des HEs de *Ruta montana* extraite par HD et HDMO.**

Ainsi, l'analyse de cette HE par CG/MS a révélé que dans ce groupe de composés oxygénés, les cétones sont les plus abondantes (79,28 %). De manière intéressante, l'HE de *R. montana* ne semble pas contenir de monoterpènes oxygénés (0 %) et très peu de sesquiterpènes oxygénés (1,96 %). Les composés hydrocarbonés quant à eux sont également présents mais à des taux bien plus faibles que les composés précédemment cités (15,45 %). Dans ce groupe de composés, les sesquiterpènes sont majoritaires (11,56 %) puis viennent les monoterpènes (3,89 %). Dans le cas de l'extraction de l'HE de *R. montana* par HDMO, même si les groupes de composés majoritaires semblent être similaires à ceux obtenus pour l'extraction par HD, leurs quantités semblent néanmoins légèrement différentes. De plus, l'extraction par HDMO, à l'instar de l'extraction par HD, n'a pas permis de mettre en évidence de monoterpènes hydrocarbonés. Par ailleurs, il est observé que la technique d'analyse par CG/MS a permis d'isoler et d'identifier l'ensemble des (à 99,99 % pour HD et à 100 % pour HDMO), vingt (20) composés présentes dans l'HE de *R. montana* (tableaux II. 10 et II. 11).

**Tableau II. 11 : Composition chimique de l'HE de *Ruta montana* obtenue par HD et HDMO**

N°	Composants	IR	HD (%)	HDMO (%)
1	Sabinene	969	1,94	0,17
2	D-limonene	1024	1,95	0,27
3	2-Nonanone	1087	1,15	0,66
4	2-Decanone	1190	1,77	1,60
5	<b>2-undecanone</b>	1293	<b>70,09</b>	<b>76,35</b>
6	<b>2-Undecanol</b>	1301	<b>2,18</b>	<b>2,66</b>
7	2-Dodecanone	1389	0,97	0,83
8	<b>Caryophyllene</b>	1408	<b>3,00</b>	<b>2,18</b>
9	<b>Z-β-Farnesene</b>	1440	<b>7,35</b>	<b>4,72</b>
10	Alpha-humulene	1452	0,18	0,12
11	alpha-Farnesene	1505	0,70	0,76
12	trans-gamma-bisabolene	1514	0,33	0,30
13	<b>2-Nonen-4-one</b>	-	<b>2,46</b>	<b>1,58</b>
14	Maaliol	1566	0,14	0,23
15	Tridecanol	1570	0,87	0,93
16	<b>2,4-Pentanedione</b>	-	<b>2,84</b>	<b>3,45</b>
17	Tetradecanal	1611	0,25	0,26
18	gamma-eudesmol	1630	0,52	0,76
19	Methyl tetradecanoate	1722	0,28	0,25
20	Pentadecanol	1773	1,02	1,93

\* les composés en gras correspondent aux composés majoritaires

Parmi ces molécules, le 2-undécanone est largement majoritaire (70,09 % pour l'extraction par HD et 76,35 % pour l'extraction par HDMO). Notons aussi que le Z- $\beta$ -Farnésène, un sesquiterpène hydrocarboné, est présent mais à de plus faibles taux (7,35 % pour l'extraction par HD et 4,72 % pour l'extraction par HDMO).

### III. Discussion

Des HEs ont été extraite à partir des quatre plantes algériennes séchées à l'air libre, et ceci par hydrodistillation conventionnelle et par la méthode d'hydrodistillation assistée par micro-ondes. Le rendement en HE de *Artemisia herba alba* obtenue par HD conventionnelle ( $2,20 \% \pm 0,09 \%$ ), à partir de plantes collectées dans la région de Djelfa, semble se situer dans la même fourchette ( $0,41-2,30 \%$ ) que celui obtenu par le groupe Espagnol de Salido et ses collaborateurs (**Salido et al., 2004**). Ce même rendement est cependant beaucoup plus élevé que ceux rapportés dans d'autres études de la région MENA (Moyen-Orient et Afrique du Nord) avec les taux compris entre  $0,33-1,18 \%$  (**Dob & Benabdelkader, 2006 ; Hudaib & Aburjai, 2006 ; Lakehal et al., 2017 ; Amor et al., 2019 ; Aimad et al., 2022 ; Kadri et al., 2022**). En ce qui concerne l'HE de *A. campestris* (région de Djelfa) le rendement d'extraction obtenu dans ce travail est de l'ordre de  $0,59 \% \pm 0,04 \%$ . La littérature relate une grande variabilité des rendements pour des extractions utilisant cette même plante en Algérie mais similaires ( $0,52 \%$ ) à celui obtenu à Laghouat (**Cheraif et al., 2020**). Ce même rendement est cependant beaucoup plus élevé ( $0,1 \%$ ) que celui obtenu dans la même région d'étude (**Dob et al., 2005**), mais plus faible ( $0,88 \%$ ) par rapport aux données de Boutemak et ses collaborateurs (**Boutemak et al., 2017**). Le rendement en HE de *Artemisia judaica* ( $0,84 \pm 0,02 \%$ ) extraite d'une plante collectée à Tamanrasset (Algérie) est plus élevé que celui obtenu à Illizi en Algérie ( $0,7 \%$ ) (**Dob & Chelghoum, 2006**) ou en Egypte ( $0,7 \%$ ) (**Abd-Elhady, 2012**). Il est néanmoins beaucoup plus faible que celui obtenu ( $2 \%$ ) en Algérie dans la même région d'étude (Tamanrasset) (**Driouèche et al., 2022**), ou que celui obtenu ( $1,71 \%$ ) pour *A. judaica* extraite en Arabie Saoudite (**Mohammed et al., 2022**). Enfin, le rendement en HE de *R. montana* de  $0,67 \pm 0,06 \%$  est faible par rapport aux rendements précédemment rapportés par d'autres études, compris entre  $0,26-2,5 \%$ , et ce, à partir de plantes collectées dans les régions d'Oran et de Batna (Algérie), de Sfax (Tunisie), et de Taza (Maroc) (**Kambouche et al., 2008 ; Hammami et al., 2015 ; Benali et al., 2020 ; Zeraib et al., 2021**).

Par ailleurs, il a été démontré dans ce travail que la variation du procédé d'extraction n'a pas affecté le rendement en HE, et ce, dans le cas des quatre plantes algériennes étudiées. En effet, il a été observé dans ce travail que pour les deux procédés d'extraction HD et HDMO, la température d'extraction est égale à la température d'ébullition de l'eau sous pression atmosphérique (*i.e.*,  $100^{\circ} \text{C}$ ). Ainsi, afin d'atteindre cette température et d'obtenir la distillation de la première gouttelette d'HE, il est nécessaire de chauffer pendant 40 à 45 minutes dans le cas de l'extraction par HD alors que ce même temps est réduit de dix (10) fois dans le cas de l'extraction par HDMO, et qui ne nécessite en réalité que 4 à 5 minutes. Par ailleurs, ce résultat est soutenu par des études qui ont rapporté que la chaleur générée par le chauffage aux micro-ondes implique un gradient de pression partielle des composés volatils et une surchauffe interne conduisant à la fragilisation ou à la rupture des parois

cellulaires plus rapidement et plus efficacement (**Elyemni et al., 2019**). Néanmoins, il est important de souligner que même si un temps d'extraction de 180 minutes au moyen de l'HD conventionnelle, semble donner un rendement similaire qu'un temps d'extraction de 45 minutes par HDMO, il n'en demeure pas moins, que le taux des composés retrouvés dans le chémotype d'une seule et même plante peut varier.

En outre, en se basant sur les résultats et les compositions détaillés de l'analyse des HE par CG/SM, il a été possible de mettre en évidence que l'HE de *A. herba alba*, collectée dans la wilaya de Djelfa et extraite par HD, présente un chémotype comprenant majoritairement du davanone (66,9 %), suivi du camphre (9,1 %) et du davana éther (5,1 %). Ce résultat est corroboré par les données de la littérature sur l'HE de *A. herba alba* collectée dans la même région que celle de cette étude (**Abdelali et al., 2023**) ou sur celle provenant de cette même plante mais, cette fois-ci collectée dans la wilaya de Laghouat (**Cheraif et al., 2020**). Il semblerait également que l'HE de *A. herba alba* récoltée en Espagne présenterait des teneurs très élevées en davanone (**Salido et al., 2004**). Cependant, certaines études ont mis en évidence des compositions variées avec des composés majeurs identifiés différents de ceux obtenus dans ce travail comme l' $\alpha$  et le  $\beta$ -thujone, le camphre, le 1,8-cinéole, la chrysanthénone et l'acétate de cis-chrysanthényle, pour des chémotypes de *A. herba alba* provenant d'Algérie et plus particulièrement des wilayas de Biskra (**Bezza et al., 2010**), de Batna (**Bertella et al., 2018**), de Béjaïa (**Bekka-Hadji et al., 2022**), et de M'Sila (**Belhattab et al., 2014**), de Tunisie (**Younsi et al., 2017**), de Libye (**Janačković et al., 2015**) et du Maroc (**Aljaiyash et al., 2018 ; Aimad et al., 2022 ; Houti et al., 2023**). Notons néanmoins que ces derniers composés sont présents dans l'HE de *A. herba alba* extraite dans ce travail mais à des quantités relativement faibles (< 10 %).

L'étude de l'HE de *Artemisia campestris* obtenue par HD a révélé une teneur élevée en  $\beta$ -pinène (19,5 %), p-cimène (8,1 %), globulol (7,5 %),  $\alpha$ -pinène (7,1 %) et  $\delta$ -terpinène (6,0 %). L'abondance des  $\beta$ -pinène dans cette HE est en accord avec les études précédentes réalisées sur des plantes de *A. campestris* collectées en Algérie dans les régions de Djebel Amour (25,6 %) (**Boulanouar et al., 2013**), de Sétif (15,2%) (**Ammar et al., 2020**), et de Laghouat (20,7 %) (**Cheraif et al., 2020**) ; ou de Tunisie (36,4 %) (**Abidi et al., 2018**), ou même du Portugal (54,5 %) (**Rocha et al., 2021**). Néanmoins, il a été rapporté dans la littérature que l'HE extraite de *A. campestris* collectée dans la même wilaya (Hassi Bahbah, Djelfa) que l'espèce étudiée dans ce travail (Ain Roumia, Djelfa) est de chémotype camphre avec un taux de 41,95 % (**Mammeri et al., 2022**). Alors que d'autres études ont révélé que le germacrène D est le principal constituant de cette HE pour les cultivars collectés en Tunisie (**Younsi et al., 2017**) et au Maroc (**Al Jahid et al., 2017**). Enfin, *A. campestris* récoltée en Turquie fait également état d'un profil d'HE différent dont les principaux composés sont

le 1,2-déhydro-acénaphthylène (20,7 %), la trémétone (15,8 %) et la capilline (10,4 %) (**Baykan Erel et al., 2012**).

Dans le cas de l'HE de *A. judaica* collectée dans la wilaya de Tamanrasset, le pipéritone (68,7 %) est le composé le plus abondant dans cette HE, suivi du  $\delta$ -cadinène (6,3 %) et du thymol (3,1 %). Ce résultat est en accord avec le taux élevé de pipéritone dans les plantes collectées dans la même wilaya mais à des taux variés de l'ordre de 65,88 % et 91,8 % (**Ghanai et al., 2018 ; Driouche et al., 2022**) ou dans la wilaya d'Illizi (61,9 %) (**Dob & Chelghoum, 2006**). Citant également d'autres parties de la région MENA (Afrique du Nord et au Moyen-Orient) : Egypte (32,4 %) (**Abd-Elhady, 2012**) et (43,8 %) (**El-Gohary et al., 2021**), Libye (30,2 %) (**Janačković et al., 2015**), Jordanie (30,4 %) (**Abu-darwish et al., 2016**) et Arabie Saoudite (31,99 %) (**Mohammed et al., 2022**). En outre, Al-Wahaibi et ses collaborateurs ont rapporté que le  $\beta$ -eudesmol (13,1 %), l'acide hexadécanoïque (5,7 %) et le spathulénol (3,7 %) étaient les principaux composés de cette HE d'Arabie Saoudite (**Al-Wahaibi et al., 2018**).

Enfin, l'HE extraite par HD à partir de *R. montana* collectée dans la wilaya de Mila, semble être dominée par la cétone aliphatique 2-undécanone avec une teneur très élevée (70,1 %). Les autres constituants majeurs détectés sont le Z- $\beta$ -farnésène (7,4 %), et caryophyllène (3,0 %). Ce résultat est en accord avec celui rapporté par Mohammedi et al., ayant mis en évidence la présence de plus de 78,5 % de 2-undécanone chez les plantes de *R. montana* provenant de régions semi-arides (M'sila et Djelfa) par rapport à celles des régions humides ( $\leq 30,3$  %) (Boumerdes et Tizi Ouzou) (**Mohammedi et al., 2019**). Cependant, certaines études ont mis en évidence des taux de 2-undécanone plus importants que ceux obtenus dans l'HE de *R. montana*. Il s'agit notamment de plantes collectées en Algérie dans les wilayas de Tipaza (**Boutoumi et al., 2009**) et Blida (**Fekhar et al., 2017**), en Tunisie (**Bejaoui et al., 2019**) et au Maroc (**Benali et al., 2020 ; Driouche et al., 2020**). Hammami et ses collaborateurs, ont néanmoins rapporté que *R. montana* provenant de Tunisie pouvait présenter une composition différente de celle obtenue, à savoir : le 1-butène (38,3 %), le méthylcyclopropane (15,5 %), le 2-butène (22,6 %) et l'oxyde de caryophyllène (8,2 %) (**Hammami et al., 2015**).

De manière générale, les résultats obtenus dans cette étude montrent l'influence de l'origine de la plante étudiée dans la composition chimique de son HE. Par ailleurs, la variation et la diversité des rendements en huiles essentielles et de la composition chimique au sein d'un même cultivar sont associées à plusieurs facteurs, notamment les conditions climatiques et environnementales, la géologie du sol, le moment de la récolte ainsi que les méthodes de séchage et d'extraction (**Zeragui et al., 2019 ; Mohammed et al., 2022 ; Mohanty et al., 2023**). Ainsi, dans le but de mettre en évidence une éventuelle variabilité de composition chimique des huiles essentielles obtenues des

parties aériennes des quatre espèces étudiées, nous avons effectué des extractions par deux techniques différentes ; une conventionnelle qui est l'hydrodistillation et une autre innovante dite hydrodistillation assistée par micro-ondes.

Cela a d'ailleurs été démontré dans cette étude par les résultats de l'analyse par CG/MS de chaque HE extraite aussi bien par HD conventionnelle que par HDMO. En effet, qualitativement, les résultats de l'analyse par CG/SM des HEs extraites indiquent qu'il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne les constituants ainsi que leur pourcentage global obtenus par HD et par HDMO. Ainsi, les constituants majeurs des HEs de *Artemisia herba alba*, de *Artemisia judaica* et de *Ruta montana* sont les cétones. En revanche, l'analyse chromatographique des HEs de *Artemisia campestris* a donné deux profils différents. Le beta-pinène était le composé le plus abondant dans l'huile essentielle obtenue par HD, tandis que le davanone était le principal composant de l'huile extraite par HDMO. Les composés les plus dominants détectés dans l'huile essentielle de *A. campestris* sont les mêmes pour les deux méthodes d'extraction étudiées, mais l'ordre d'abondance est différent pour l'alpha-pinène, le beta-pinène, le p-cimene, le  $\gamma$ -terpinène, le germacrène D, le davanone et l' $\alpha$ -Cadinol. Des observations similaires ont été faites lors de l'extraction de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* par HD et par HDMO (**Djouahri et al., 2013**). De plus, une autre étude récente a démontré des différences significatives dans la quantité de composés majeurs des HE de trois espèces médicinales de *Curcuma* (*Curcuma alismatifolia*, *Curcuma aromatica* et *Curcuma xanthorrhiza*) extraites par hydrodistillation conventionnelle (HD) et par extraction sans solvant assistée par micro-ondes (SFME) (**Mohanty et al., 2023**). Cela est probablement dû aux différentes conditions de chauffage auxquelles sont soumises les herbes dans les deux méthodes, qui sont un facteur déterminant dans la composition chimique de l'huile essentielle extraite, entraînant une réduction des réactions thermiques et hydrolytiques par rapport à l'hydrodistillation, qui utilise de grandes quantités d'eau et d'énergie. En raison des différentes températures atteintes dans chaque procédé, la variation de méthode peut entraîner la disparition de certains composés ou une abondance différente d'une méthode à l'autre (**Cardoso-Ugarte et al., 2013 ; Mohanty et al., 2023**).

A notre connaissance, la présente étude peut être considérée comme le premier rapport sur la composition chimique des HEs obtenues par la technique HDMO à partir de trois (03) espèces de plantes algériennes, à savoir ; *Artemisia campestris*, *A. judaica* et *R. montana*. Quant à *Artemisia herba alba*, à ce jour, il n'existe qu'une seule étude rapportant un chémotype différent de cette plante provenant de la commune de Boussaâda (wilaya de M'Sila). Cette dernière étant composée de camphre (49,3 et 48,1 % par HD et HDMO, respectivement), de 1,8-cineole (13,4–12,4 % par HD et HDMO, respectivement), de borneol (7,3 - 7,1 % par HD et HDMO, respectivement), de pinocarvone

(5,6–5,5 % par HD et HDMO, respectivement), de camphène (4,9–4,5 % par HD et HDMO, respectivement) et de chrysanthénone (3,2–3,3 % par HD et HDMO, respectivement). Ceci étant particulièrement lié à la différence de la répartition géographique du matériel végétal. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que l'HDMO permettrait d'obtenir une huile dans un délai très court, avec des rendements similaires, des qualités comparables et une économie d'énergie substantielle à l'HD conventionnelle (**Dahmani-Hamzaoui & Baaliouamer, 2010**). A l'instar de l'HE de *Artemisia herba alba*, très peu d'études relatent l'extraction de l'HE de *A. judaica* par HDMO. Néanmoins, les travaux d'Elshamy et ses collaborateurs ont montré que les HEs de l'espèce de *A. judaica* collectée en Egypte, présentaient le même profil chromatographique quelle que soit la méthode d'extraction utilisée. Cette HE présente comme principaux composants : la pipéritone (33 % et 34 % par HD et HDMO, respectivement), la 3-bornanone (28,5 % et 32,8 % par HD et HDMO, respectivement), et à de moindres proportions : le p-cymen-8-ol, le 1-bornéol et l'isophorone. Aussi, l'extraction par HDMO s'est avérée plus efficace pour l'extraction de certains cétones et alcools comme la pipéritone et le thymol (**Elshamy et al., 2021**). Ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans ce travail.

Il est également intéressant de constater que l'HDMO semble être plus efficace pour isoler la plupart des composés oxygénés. Certaines études ont d'ailleurs confirmé que les teneurs en composés oxygénés de l'huile obtenue par des méthodes assistées par microondes sont plus élevées que celles de l'huile obtenue par des méthodes conventionnelles (**Chemat & Lucchesi, 2006 ; Bousbia et al., 2009 ; Jiang et al., 2013 ; Jeyaratnam et al., 2016 ; Moradi et al., 2018 ; Boukhatem et al., 2020 ; Hassanein et al., 2020 ; Mande & Sekar, 2020 ; Memarzadeh et al., 2020 ; Mohanty et al., 2023**). De manière générale, une HE contient un pourcentage élevé de composés organiques qui peuvent être facilement absorbés par le rayonnement de l'énergie des microondes. Les composés organiques qui sont oxygénés sont souvent classés comme des composés à moment dipolaire élevé qui ont tendance à absorber plus d'énergie micro-ondes à travers un solvant polaire (l'eau) et peuvent par conséquent être libérés des organes sécréteurs plus facilement, contrairement aux hydrocarbures monoterpéniques qui ont un moment dipolaire faible (**Bousbia et al., 2009 ; Jeyaratnam et al., 2016 ; Elyemni et al., 2019**). Par ailleurs, le chauffage pendant l'HD conventionnelle est réalisé par un transfert de chaleur graduel du milieu chauffant vers l'intérieur des échantillons, tandis que le chauffage par micro-ondes est basé sur deux phénomènes : i) la conduction ionique et, ii) la rotation dipolaire. Aussi, il est directement lié à la constante diélectrique du milieu utilisé. L'eau étant un solvant dont la constante diélectrique est élevée, elle entraîne donc un échauffement rapide dans le processus HDMO (**Drinic et al., 2020**). De plus, la chaleur générée par le chauffage aux micro-ondes implique un gradient de pression partielle des composés volatils et une surchauffe interne conduisant à la fragilisation ou à la rupture des parois cellulaires plus rapidement

et plus efficacement (**Elyemni et al., 2019**). Ainsi, les dégradations thermiques et hydrolytiques des composés oxygénés sont limitées relativement à l'HD qui utilise une grande quantité d'eau. De plus, il a été retrouvé dans la littérature que les composés oxygénés qui sont subdivisés en alcools, phénols, aldéhydes, cétones, esters, éthers et époxydes, sont plus odorants et plus précieux que les hydrocarbures en termes de contribution à la fragrance et aux propriétés thérapeutiques d'une huile essentielle qui sont considérés comme des paramètres clés de sa qualité (**Bousbia et al., 2009 ; Elyemni et al., 2019 ; Radivojac et al., 2020**).

Afin de récapituler les résultats globaux de l'analyse des diverses HE par CG/MS et de justifier sur le choix de la technique à utiliser pour la suite des travaux de recherche, le tableau récapitulatif suivant a été tracé (tableau II. 12) :

**Tableau II. 12 : Récapitulatif des résultats globaux obtenus dans ce travail**

Technique Plantes	Composés hydrocarbonés (%)				Composés hydrocarbonés totaux (%)		Composés oxygénés (%)						Composés oxygénés totaux (%)	
	Monoterpènes		Sesquiterpènes				Monoterpènes		Sesquiterpènes		Cétones			
	HD	HDMO	HD	HDMO	HD	HDMO	HD	HDMO	HD	HDMO	HD	HDMO	HD	HDMO
<i>A. herba alba</i>	3,83	2,14	2,38	3,55	6,21	5,69	4,03	4,12	10,62	4,49	77,28	79,63	<b>91,93</b>	<b>88,24</b>
<i>A. campestris</i>	53,05	12,51	24,51	33,06	<b>77,56</b>	<b>45,57</b>	1,25	1,19	16,51	24,33	3,46	25,82	21,22	51,34
<i>A. judaica</i>	1,5	0,44	8,15	5,09	9,65	5,53	5,19	5,63	9,08	8,19	70,81	76,13	<b>85,08</b>	<b>89,95</b>
<i>R. montana</i>	3,89	0,44	11,56	8,08	<b>15,45</b>	<b>8,52</b>	0	0	1,96	3,17	79,28	84,47	<b>81,24</b>	<b>87,64</b>

Ainsi, dans ce travail nous avons choisi une méthode d'extraction des HEs de manière à obtenir des huiles aux compositions variées avec trois riches en composés oxygénés (*A. herba alba*, *A. judaica* et *R. montana*) et une autre huile riche en composés hydrocarbonés (*A. campestris*). L'HD conventionnelle a donc été favorisée pour la suite de ce travail par rapport à l'HDMO.

## Conclusion

Les résultats de cette étude ont révélé que l'extraction des HE par HDMO est fort intéressante en raison de : i) la réduction significative du temps d'extraction, et, ii) la réduction de la quantité de solvant et par conséquent la consommation en énergie. Ils ont néanmoins mis en évidence l'absence de changements significatifs dans les rendements des et la composition chimique de l'HE quel que soit le mode d'extraction. De plus, la qualité des huiles extraites est améliorée grâce à l'augmentation de taux des composés oxygénés.

# Chapitre 3 : *Activité acaricide des huiles essentielles contre l'ectoparasite de l'abeille *Varroa destructor**

Les résultats des travaux décrits dans ce chapitre ont fait l'objet d'un article scientifique publié dans le journal « *Experimental and applied acarology* », intitulé « Promising Algerian essential oils as natural acaricides against the honey bee mite *Varroa destructor* (Acari : Varroidae) ».

## Introduction

L'abeille domestique occidentale, *Apis mellifera* L. (Hyménoptère : Apidae), est le principal pollinisateur d'une grande variété de cultures agricoles et constitue la principale source de produits apicoles tels que le miel, la propolis, le pollen et la gelée royale (**Abd El-Wahab et al., 2021 ; Flores et al., 2021**).

Au cours des dernières décennies, les pertes dramatiques de colonies d'abeilles domestiques ont été principalement attribuées à divers facteurs de stress biotiques et abiotiques, tels que la perte d'habitat, l'exposition aux pesticides, la mauvaise nutrition, les pratiques apicoles, les changements climatiques, ainsi que les agents pathogènes invasifs (**Glenny et al., 2017 ; Almecija et al., 2020**). Parmi ses parasites, l'acarien mésostigmatide ectoparasite cosmopolite *Varroa destructor* Anderson et Trueman (Acari : Varroidae) est considéré comme la principale menace pathologique (**Giacobino et al., 2014 ; Erban et al., 2015 ; Alburaki et al., 2018**). Cet acarien affecte directement les abeilles adultes et le couvain en se nourrissant de leur hémolymphe et de leurs tissus adipeux (**Ramsey et al., 2019 ; Slowinska et al., 2019 ; Traynor et al., 2020 ; Piou et al., 2023**) tout en agissant comme un vecteur de plusieurs virus, ce qui entraîne l'effondrement de la colonie en 2 à 3 ans (**Mondet et al., 2020**). De plus, à l'échelle individuelle, la varroase provoque des effets très néfastes sur les abeilles, tels que des malformations, la déshydratation du corps, une perte de poids, une réduction de la durée de vie, des problèmes olfactifs, une immunosuppression ainsi qu'une altération de la capacité de voler et de se nourrir (**Noël et al., 2020 ; Sabahi et al., 2020 ; Khan & Ghramh, 2021**).

En raison de ces effets et pertes dramatiques, divers acaricides synthétiques ont été largement utilisés pour lutter contre le *Varroa*, tels que les pyréthrinoïdes (tau-fluvalinate et fluméthrine), les organophosphates (coumaphos) et la formamidine (amitraz) (**Li et al., 2017 ; Riva et coll., 2019**).

Il convient néanmoins de mentionner que leur grande efficacité est atténuée par le développement de la résistance de *V. destructor*, la contamination des produits de la ruche par des résidus chimiques de ces acaricides, ainsi que par les effets néfastes sur la santé des abeilles domestiques et sur l'environnement (**Riva et al., 2019 ; Noël et al., 2020**). Récemment, les composés naturels, en particulier les acides organiques, les huiles essentielles végétales (HE) et leurs dérivés, ont suscité un grand intérêt en tant qu'alternatives potentiellement sûres, écologiques et efficaces aux acaricides conventionnels (**Vilarem et al., 2021**). En effet, les HEs sont connues pour leur efficacité à large spectre, avec des effets ovicides, larvicides, adulticides et répulsifs contre les ectoparasites (**Abbas et al., 2018**). L'application d'HEs pourraient perturber les activités des insectes et des

acariens, entraînant des effets anti-appétit, des retards de croissance et de reproduction, des ruptures de la cuticule, des problèmes d'exuviation ainsi qu'une répression respiratoire (**Ben Chaaban et al., 2019**). Ramzi et ses collaborateurs ont constaté que certaines HEs tendent à améliorer le comportement de toilettage des abeilles domestiques (**Ramzi et al., 2017**). Le thymol, en particulier, est un exemple de bioacaricide largement utilisé par les apiculteurs pour traiter les colonies d'abeilles domestiques infestées par *V. destructor*. Il est également reconnu pour son action anti-acarienne et sa capacité à réprimer les activités de reproduction et de croissance (**Lindberg et al., 2000 ; Singh, 2014**).

En tant que source d'HEs végétales, de nombreuses plantes ont été utilisées pour extraire des composés organiques efficaces et actifs, tant à l'échelle mondiale qu'en Algérie. Parmi ces plantes algériennes, les genres *Artemisia* (Asteraceae) et *Ruta* (Rutaceae) se distinguent particulièrement. *Artemisia* comprendrait plus de 500 espèces diverses, dont la majorité est reconnue comme une source importante d'HEs (**Hu et al., 2019**). De manière générale, les espèces de *Artemisia* sont caractérisées par de multiples propriétés biologiques, notamment des activités antibactériennes, antifongiques, antivirales (**Abad et al., 2012**), antiprotozoaires, anthelminthiques, anti-inflammatoires, cytotoxiques, antitumorales, insecticides et répulsives (**Ivănescu et al., 2021**). Godara et ses collaborateurs (**Godara et al., 2013 ; Godara et al., 2015**) ont rapporté que les extraits de *Artemisia absinthium* présentent une activité acaricide contre les tiques *Rhipicephalus sanguineus* et *Hyalomma anatolicum*. De plus, un taux de mortalité élevé a été observé lors de l'utilisation d'un extrait de *Artemisia sieberi* pour lutter contre *V. destructor* (**Ashrafi Parchin et al., 2012**). Des essais sur le terrain utilisant des extraits de *Artemisia annua* et de *A. absinthium* contre *V. destructor* ont révélé un effet miticide puissant (**Rasool et al., 2017 ; Allabergenova et al., 2021**). Les HEs extraites de *A. annua* et *Artemisia verlotiorum* ont également montré une activité répulsive significative contre le *Varroa* dans des conditions de laboratoire (**Conti et al., 2020**).

Le genre *Ruta* comprend 40 espèces, riches en HEs qui contiennent principalement des cétones aliphatiques, telles que la 2-undécanone et la 2-nonanone (**Nahar et al., 2021**). Les espèces *Ruta spp.* ont été largement identifiées pour leurs propriétés antiparasitaires, stomachiques, digestives, vermifuges et molluscicides (**Ferhat et al., 2014**), ainsi que leurs effets antiseptiques, antispasmodiques, anthelminthiques (**Haddouchi et al., 2013**), insecticides et larvicides (**Boutoumi et al., 2009 ; Majdoub et al., 2014**). Castagnino Laércio & Orsi ont démontré que l'huile volatile de *Ruta graveolens* est efficace pour réduire l'infestation par *V. destructor* et diminuer le taux de mortalité des colonies d'abeilles mellifères parasitées (**Castagnino Laércio & Orsi, 2012**).

Dans cette partie, nous avons évalué la toxicité aiguë *in vitro* des huiles essentielles obtenues à partir de quatre plantes algériennes, à savoir *Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia campestris* L., *Artemisia judaica* L. et *Ruta montana* L. contre *V. destructor*. De plus, la détermination du profil phytochimique de chaque HE à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a permis d'identifier les principaux composés susceptibles de contribuer à l'effet acaricide prononcé.

A notre connaissance, il s'agit du premier travail portant sur l'activité acaricide des HEs de *A. campestris*, *A. judaica* et *R. montana* dans la lutte contre *V. destructor*, tandis que l'HE isolée de *A. herba alba* provenant d'une autre région a été récemment testée *in vitro* (**Alahyane et al., 2022**).

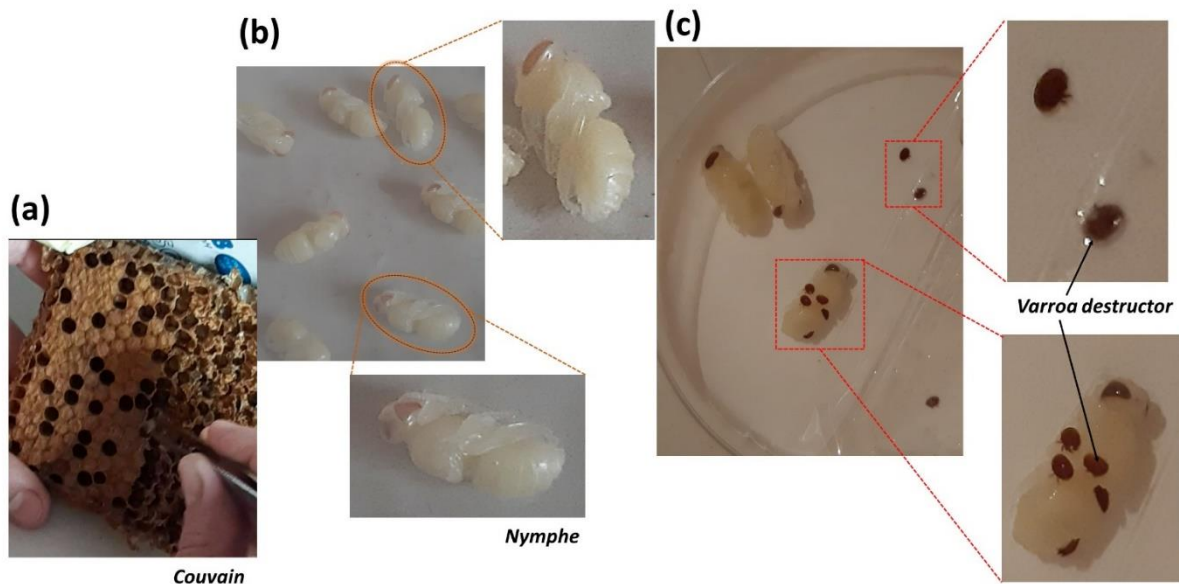
## **I. Matériel et méthodes**

### **1. Description du site de prélèvement du matériel animal**

Les ouvrières et les nymphes de *Apis mellifera intermissa*, ainsi que les femelles adultes d'acariens *V. destructor*, ont été collectées au printemps et à l'été 2022, période où les acariens étaient abondants. Les prélèvements ont été effectués à partir des ruches situées dans un rucher appartenant à la Coopérative Agricole Polyvalente de Tizi-Ouzou (CAPTO), antenne de Taboukert, dans la région de Tizi Rached, wilaya de Tizi-Ouzou en Algérie (36°42'17.0"N, 4°06'07.3"E). Les mêmes pratiques de gestion ont été appliquées à toutes les colonies d'abeilles expérimentales, qui n'avaient pas été traitées contre *V. destructor* pendant au moins six mois. Des rayons operculés d'ouvrières ou de faux bourdons ont été retirés des colonies au niveau du rucher puis transportés au laboratoire.

### **2. Description de la méthode de prélèvement des acariens ectoparasites**

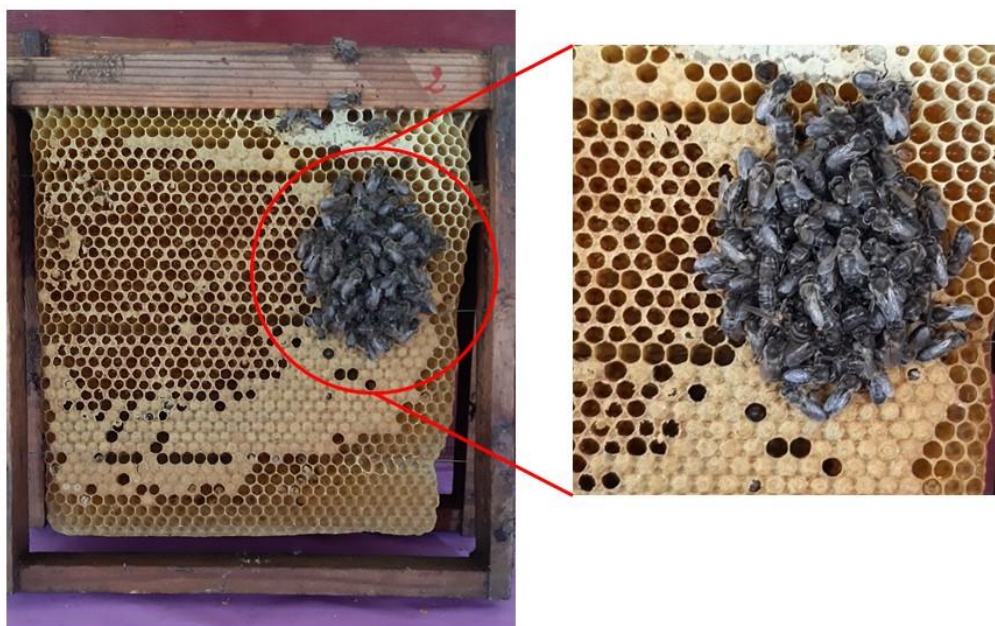
Les femelles adultes de *V. destructor* ont été collectées pendant leur stade de reproduction et non pas pendant le stade de dispersion, afin de minimiser la variabilité des conditions physiologiques et physiques des acariens. Les cellules de couvain ont été désoperculées individuellement à l'aide d'une pince fine, puis inspectées pour détecter la présence d'acariens adultes. Ces derniers ont été prélevés délicatement sur les larves et les nymphes non pigmentées à l'aide d'un pinceau fin, conformément à la méthode décrite par Dietemann et ses collaborateurs (**Dietemann et al., 2013**). Les acariens collectés ont été conservés dans des boîtes de Petri avec quelques nymphes d'abeilles (aux yeux blancs à roses) servant comme substrat alimentaire afin d'éviter leur dessiccation, et ont été immédiatement utilisés pour les bioessais (figure III. 1). Les acariens qui venaient de muer, ceux qui étaient faibles ou présentaient des anomalies ont été écartés de la sélection. Ce protocole a été rigoureusement suivi, car il permet de collecter des acariens moins traumatisés que ceux obtenus avec d'autres méthodes (**Dietemann et al., 2013**).



**Figure III. 1 : Etapes de prélèvement des acariens *V. destructor*.** (a) Désoperculation des alvéoles, (b) Récolte des nymphes aux yeux blancs à roses, (c) Récolte des acariens adultes.

### 3. Description de la méthode de collecte des abeilles adultes

Les abeilles ouvrières nouvellement émergées ont été prélevées à partir des colonies saines, car les jeunes abeilles sont moins exposées aux conditions de la ruche et de l'environnement que leurs aînées. Les cadres de couvain d'ouvrières scellés, qui montraient des signes d'émergence d'abeilles (dans 1 à 2 jours) ont été transportés dans des boîtes ventilées vers un incubateur de laboratoire maintenu à 34 °C et 60 ± 10% d'humidité relative (HR). Une fois les jeunes abeilles émergées (Figure III. 2), elles ont été délicatement inspectées à l'aide d'une pince en plastique pour vérifier l'absence d'acariens, puis placées dans des cages d'élevage en plastique, où elles ont été nourries avec une solution de saccharose à 50 % (p/v).



**Figure III. 2 : Photographie illustrant des abeilles nouvellement émergées.**

#### **4. Conditions expérimentales**

La littérature sur le sujet met en évidence plusieurs aspects critiques à considérer lors de la réalisation de bioessais sur le *Varroa*, notamment les conditions environnementales, les produits chimiques testés et l'origine des acariens.

##### **4.1. L'environnement**

L'acarien *V. destructor* vit dans la ruche, où les conditions environnementales sont rigoureusement contrôlées. Pour obtenir une représentation fidèle de la réaction de l'acarien vis-à-vis d'un produit chimique donné, il est essentiel de le tester dans des conditions similaires, à savoir une température d'environ 32-35 °C et une humidité relative d'environ 70 % (Williams *et al.*, 2013). Dans notre travail, nous avons utilisé un incubateur fabriqué de manière artisanale. Il est équipé d'un régulateur de température et d'humidité, afin de recréer des conditions optimales permettant de maintenir en vie à la fois les abeilles et les acariens tout au long de l'essai. En effet, des tests préliminaires réalisés avec une étuve ordinaire de laboratoire n'ont pas permis de maintenir les acariens en vie pendant l'expérimentation.

##### **4.2. Dosage des produits chimiques**

Les études dose-réponse, dans lesquelles l'activité biologique d'un composé est évaluée à différentes doses sur une échelle logarithmique, sont indispensables dans la recherche actuelle.

### 4.3. Acariens utilisés pour les tests

Dans les études d'écologie chimique, il est essentiel d'utiliser des acariens qui participent directement au processus étudié (par exemple, pour une étude sur l'invasion des cellules, il faut sélectionner des acariens spécifiquement impliqués dans l'invasion des cellules de couvain). Dans les études sur l'efficacité des acaricides, il est crucial de tester les acariens à un stade de vie correspondant à celui qui sera exposé au produit étudié. Contrairement à de nombreux autres arthropodes pour lesquels des bioessais sont utilisés, il n'existe actuellement aucune méthode d'élevage artificiel du *Varroa*. Cela rend la standardisation difficile, en particulier pour collecter des acariens homogènes en termes d'âge, d'état physiologique, de statut d'accouplement, etc. Une solution à ce défi consiste à utiliser des acariens qui se trouvent tous au même stade de leur cycle de vie garantissant ainsi une plus grande cohérence dans les résultats des bioessais (**Dietemann et al., 2013**).

Selon l'étude menée par **Milani (1995)**, qui a comparé les acariens *Varroa* prélevés à différents stades de couvain et sur des abeilles adultes, aucune différence significative n'a été observée entre les acariens de différents stades de couvain (à l'exception des nymphes à corps sombres, où des acariens adultes nouvellement mués peuvent être présents). Cependant, lorsque des acariens provenant d'abeilles adultes ont été testés, une réponse différente et plus variable a été notée, accompagné d'une augmentation de la mortalité naturelle. En conséquence, les acariens prélevés sur des abeilles adultes ne doivent pas être utilisés, du moins au début de l'automne (**Williams et al., 2013**).

### 4.4. Âge des ouvrières adultes utilisées pour les expériences de laboratoire

La physiologie des ouvrières adultes varie considérablement en fonction de leur âge. Par exemple, les modifications de la réponse immunitaire de l'hôte et la morphologie au fil du temps peuvent influencer leur résistance aux maladies et leur susceptibilité aux parasites. Le choix de l'âge des abeilles dépendra uniquement de l'objectif de l'expérience et est souvent lié à la méthode de collecte. Il est essentiel pour les chercheurs de s'assurer que les individus expérimentaux sont d'un âge homogène. Si ce n'est pas le cas, les individus d'âge variés ou indéterminé doivent être répartis uniformément dans toutes les cages. Il est également important de noter que les ouvrières ne doivent pas être collectées pendant et/ou dans les huit semaines suivant l'application d'un traitement antiparasitaire ou de lutte contre les parasites des abeilles mellifères. Dans notre étude, nous avons utilisé des abeilles adultes nouvellement émergées (**Williams et al., 2013**).

#### **4.5. Considérations relatives au choix d'utilisation des abeilles nouvellement émergées pour des expériences en laboratoire**

La collecte d'ouvrières nouvellement émergées, telle que décrite par **Winston (1987)**, est une méthode simple et précise permettant d'obtenir un grand nombre d'adultes d'un âge homogène. Ces adultes nouvellement émergés représentent une source importante d'individus relativement « propres », étant moins exposés aux conditions de la ruche et de l'environnement que les adultes plus âgés. De plus, ils sont particulièrement adaptés pour étudier les effets possibles du traitement sur la longévité des abeilles ou sur le développement de parasites à l'intérieur de l'hôte, car ils peuvent être maintenus en laboratoire pendant plusieurs semaines (**Williams et al., 2013**).

#### **4.6. Validité des tests**

Le taux de mortalité moyenne pour le nombre total du contrôle négatif ne doit pas dépasser 10 % à la fin de l'essai (**Recommandation de OECD/OCDE 214, 1998**).

#### **4.7. Cages d'essai**

Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser des cages en plastique pour les tests sur les abeilles et des boîtes de Petri en plastique pour les tests sur le *Varroa*. Ces cages sont faciles à nettoyer et bien ventilées. Il est important que la taille des cages d'essai soit adaptée au nombre d'abeilles, de manière à leur offrir un espace suffisant.

#### **4.8. Groupes d'essais et témoins**

Le nombre de concentrations et de répétitions testées doit satisfaire aux exigences statistiques nécessaires pour déterminer la  $CL_{50}$  avec des limites de confiance de 95 %. En général, cinq doses dans une série géométrique, avec un facteur ne dépassant pas 2,2 et couvrant l'intervalle de la  $CL_{50}$ , sont nécessaires pour l'essai. Chaque concentration d'essai doit être administrée à un minimum de trois groupes d'essai, chacun composé de dix abeilles (**Recommandation de OECD/OCDE 214, 1998**).

#### **4.9. Matériel végétal testé**

Les huiles essentielles utilisées pour les tests de toxicité ont été extraites par hydrodistillation à partir de quatre plantes aromatiques : *Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia campestris* L., *Artemisia judaica* L. et *Ruta montana* L.

#### 4.10. Témoin positif : thymol

Le thymol (2-isopropyl-5-méthylphénol) est un monoterpène phénolique principalement présent dans les espèces de thym, et constitue l'un des composés majeurs de l'huile essentielle de thym. C'est un composé cristallin incolore, caractérisé par une forte odeur et une solubilité dans l'alcool et d'autres solvants organiques, mais une faible solubilité dans l'eau (Kowalczyk *et al.*, 2020). Dérivé du cymène et isomère du carvacrol, le thymol possède une odeur épicée-herbale, légèrement médicinale, rappelant le thym. Son goût est décrit comme piquant, caustique, doux, médicinal et épicé (Salehi *et al.*, 2018). En apiculture, le thymol est utilisé depuis des décennies pour lutter contre l'acarien *V. destructor*, avec un succès variable. Bien qu'il se trouve naturellement en faibles concentrations dans le miel, il était autrefois supposé ne pas laisser de résidus dans les produits apicoles. Cependant, des études récentes ont mis en évidence la présence de résidus de thymol dans le miel et la cire d'abeille (Glavinic *et al.*, 2022).

#### 4.11. Choix des concentrations des huiles essentielles et du thymol

Le choix des concentrations des huiles essentielles et du thymol (utilisé comme témoin positif) s'est basé sur plusieurs tests préliminaires. Pour chaque huile essentielle obtenue et à partir d'une concentration initiale, six concentrations différentes ont été sélectionnées, variant selon la plante d'origine ainsi que pour le thymol. Les solutions ont été préparées en diluant les huiles essentielles dans de l'éthanol à 96 % (Tableau III.1).

**Tableau III. 1 : Concentrations des HEs et du thymol utilisées pour les bioessais**

HE testés et contrôle positif	Concentrations ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) utilisées pour les tests contre <i>Varroa destructor</i>	Concentrations ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) utilisées pour les tests contre <i>Apis mellifera</i>
<i>Artemisia herba alba</i>	0,25 - 0,5 - 1 - 2,5 - 5 - 10	2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20 - 30
<i>Artemisia campestris</i>	1 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20	10 - 20 - 25 - 30 - 35 - 40
<i>Artemisia judaica</i>	1 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20	5 - 10 - 12,5 - 15 - 17,5 - 20
<i>Ruta montana</i>	1 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20	10 - 12,5 - 15 - 17,5 - 20 - 22,5
Thymol	0,21 - 0,41 - 0,62 - 0,82 - 1,03 - 2,06	1,03 - 1,29 - 1,55 - 2,06 - 2,58 - 3,09

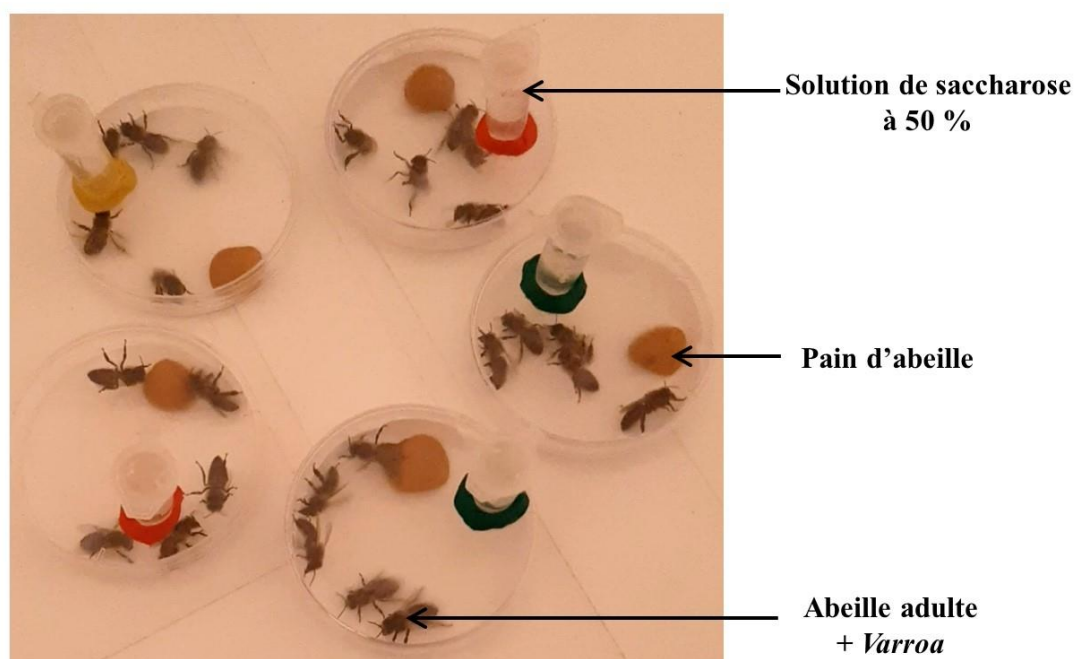
## 5. Test d'activité acaricide

Pour tester l'activité acaricide des quatre huiles essentielles vis-à-vis du *Varroa* ainsi que leur toxicité pour les abeilles, nous avons suivi le protocole d'exposition complète simultanée du parasite et de son hôte aux acaricides naturels, tel que décrit par **Ruffinengo et al. (2005)**. Ce test utilise des boîtes de Pétri en plastique (60 x 20 mm) comme cages d'essai.

Les solutions d'huiles essentielles ont été préparées en les diluant dans de l'éthanol à 96% afin d'obtenir une concentration souhaitée. Une gamme de six concentrations, allant de 0,5 à 25  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a été utilisée pour chaque huile essentielle. Ensuite, 1 mL de chaque solution a été uniformément déposé à l'aide d'une micropipette sur un papier filtre recouvrant le fond de la boîte de Pétri. Une fois le solvant évaporé, cinq abeilles adultes nouvellement émergées (âgées de 0 à 3 jours) et cinq femelles d'acariens *Varroa* adhérentes prélevées à partir de cellules de couvain ont été placées dans chaque boîte de Pétri.

Les abeilles et les acariens ont été exposés aux huiles essentielles pendant 72 heures. Chaque cage munie d'un tube Eppendorf rempli d'une solution de saccharose à 50 % (p/v) ainsi qu'une petite quantité de pain d'abeille (un mélange de pollen d'abeille polyfloral dans une solution de saccharose à 50 %) fourni comme supplément alimentaire (Figure III. 3). Selon **Gregorc et al. (2019)**, il est crucial que les abeilles adultes aient accès à l'eau sucrée (saccharose) pour répondre à leurs propres besoins caloriques. Les bioessais ont été réalisés en laboratoire à température ambiante. A la fin des tests, les boîtes ont été incubées à  $30 \pm 1$  °C et à une HR de  $60 \pm 10$  %.

Pour chaque traitement, des contrôles positifs et négatifs ont été inclus. Les traitements de contrôle positif comprenaient des boîtes de Pétri traitées avec du thymol, tandis que les contrôles négatifs comprenaient des boîtes traitées uniquement avec de l'éthanol. Cinq répétitions ont été réalisées pour chaque unité expérimentale. Le nombre de *Varroa* morts et d'abeilles mortes a été déterminé après inspection visuelle du fond des boîtes après 24, 48 et 72 heures.



**Figure III. 3 : Exposition complète et simultanée des abeilles et des acariens selon le protocole de Ruffinengo *et al.* (2005).**

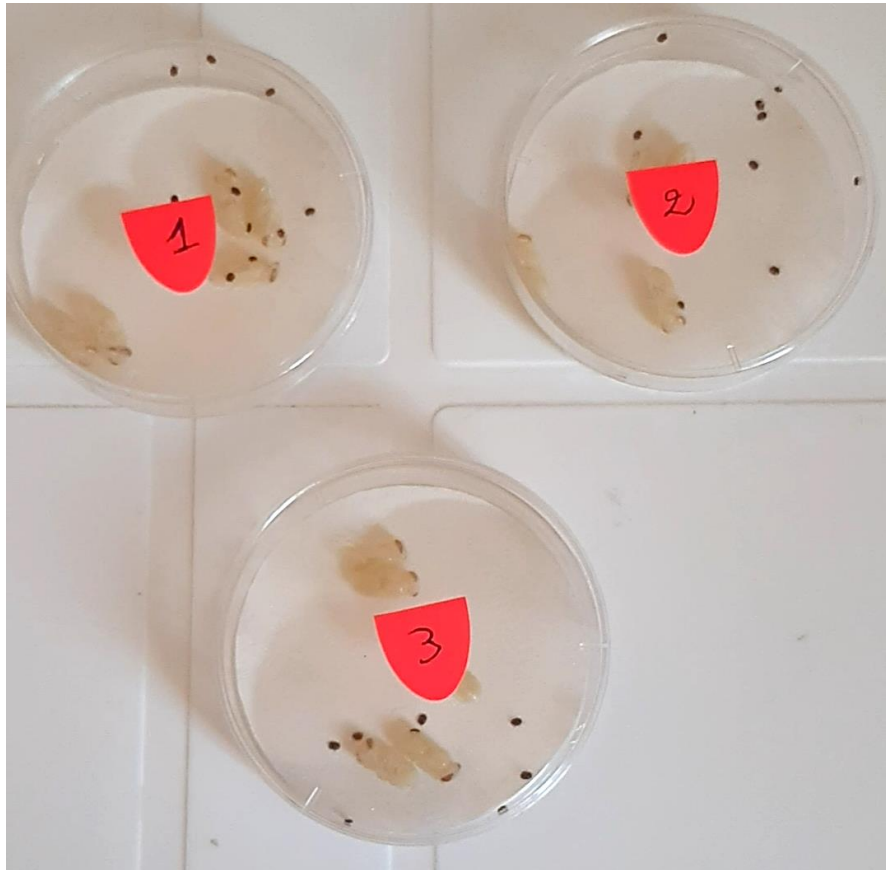
Cependant, après seulement 24 heures, des taux de mortalité excessivement élevés ont été observés chez les abeilles testées, même dans le groupe de contrôle négatif. Les abeilles n'ont pas pu survivre dans cet environnement artificiel, qui ne reflétait pas de leurs conditions naturelles. Par conséquent, il a donc été nécessaire de développer un protocole plus approprié.

De plus, une interaction significative entre les impacts de la cage, du nourrisseur et de l'alimentation sur la santé des abeilles a été constatée. En réponse, le protocole de **Chaimanee *et al.* (2021)** a été adopté pour les expériences sur les abeilles, utilisant les cages décrites par **Huang *et al.* (2014)**, qui simulent mieux l'environnement naturel des abeilles. **Huang *et al.* (2014)** ont utilisé une combinaison qui englobe des cages d'**Evans *et al.* (2009)**, une seringue de 5 ml comme nourrisseur et un régime alimentaire composé de sirop de saccharose et de pain d'abeille, ce qui a montré le meilleur résultat pour améliorer la survie des abeilles en cage. Les cages d'**Evans *et al.* (2009)** ont ainsi présenté les meilleures performances en termes de survie des abeilles au cours des expériences. De plus, il était impossible de tester simultanément les acariens et les abeilles dans ces cages, car les acariens s'échappaient par les trous conçus pour la respiration des abeilles. Par conséquent, les acariens ont été traités dans des boîtes de Petri fermées, selon le protocole de **Ruffinengo *et al.* (2005)**, en utilisant des nymphes d'abeilles comme substrat alimentaire afin d'empêcher la dessiccation et la mortalité des acariens pendant toute la durée des tests. Tous les acariens et les abeilles ont été traités de manière similaire, en utilisant la méthode d'exposition complète.

La mortalité des acariens a été examinée à l'aide d'une lentille convexe portable ( $\times 10$ ) à différents intervalles de temps. Les acariens étaient considérés comme morts s'ils ne bougeaient pas lorsqu'ils étaient sondés avec un pinceau fin. Les abeilles mellifères étaient jugées mortes lorsqu'une immobilité totale était observée après un examen délicat à la lumière ambiante à l'extérieur de l'incubateur. Les expériences ont été conduites pendant 72 heures, avec des contrôles de mortalité effectués toutes les 24 heures, soit après 24 heures, 48 heures et 72 heures du traitement. Le pourcentage de mortalité calculé est la moyenne des valeurs obtenues à partir des trois répétitions.

## **6. Activité acaricide des huiles essentielles sur *V. destructor***

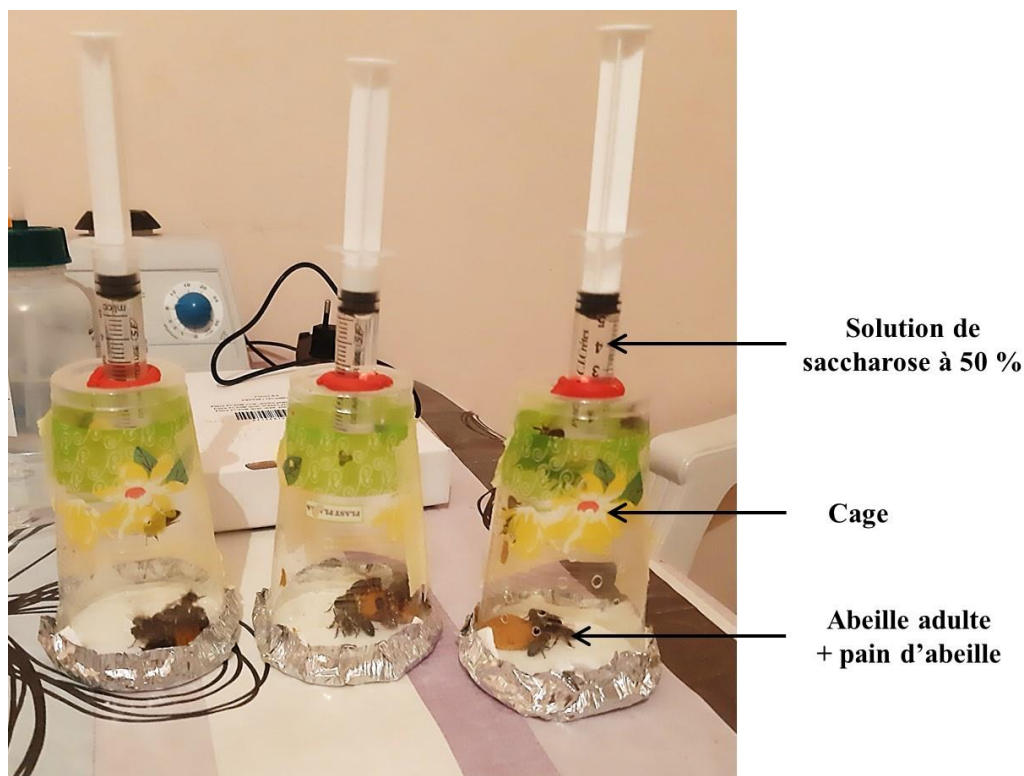
Les bioessais sur les huiles essentielles contre *V. destructor* ont été réalisés selon un protocole modifié décrit précédemment par **Ruffinengo *et al.* (2005)**. En bref, six solutions d'HEs avec des concentrations allant de 0,25 à 20  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ont été préparées en diluant ces dernières dans de l'éthanol à 96 %, puis 1 mL de chaque solution a été étalé uniformément à l'aide d'une micropipette sur un papier filtre qui couvrait toute la surface inférieure d'une boîte de Pétri (6 cm de diamètre, 2 cm de haut). Après évaporation du solvant, 10 acariens *V. destructor* et 5 nymphes d'abeilles ont été placés dans chaque boîte de Pétri sur la surface du papier filtre en favorisant le contact direct avec la solution. Les boîtes ont été scellées avec du parafilm et recouvertes avec leurs couvercles pour empêcher les acariens de s'échapper. L'expérience a été réalisée à température ambiante. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement (huile) et chaque concentration, et le pourcentage de mortalité a été exprimé comme une valeur moyenne (Figure III. 4). L'éthanol 96% a été utilisé comme contrôle négatif et le thymol comme contrôle positif en utilisant six concentrations allant de 0,21 à 2,06  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Toutes les boîtes ont été incubées à  $30 \pm 1$  °C et  $60 \pm 10\%$  HR pendant 72 h. La mortalité des acariens a été vérifiée 24, 48 et 72 h après l'exposition initiale. Les acariens qui n'ont pas bougé lorsqu'ils ont été sondés avec un pinceau fin ont été considérés comme morts.



**Figure III. 4 : Boîtes de Petri pour les tests sur le *Varroa*.**

### **7. Toxicité aigue des huiles essentielles pour les adultes de *Apis mellifera***

La toxicité des HEs pour les abeilles ouvrières a été évaluée selon le protocole de **Chaimanee *et al.* (2021)**, avec quelques modifications. Six concentrations d'HEs, allant de 2,5 à 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , ont été préparées par dilution dans de l'éthanol à 96 %. Ensuite, 1 mL de chaque solution a été appliquée sur du papier filtre couvrant le fond des cages en plastique décrites par **Evans *et al.* (2009)**. Dix abeilles adultes nouvellement émergées ont été placées dans chaque cage après évaporation du solvant. Une seringue de 5 ml remplie d'une solution de saccharose à 50 % (p/v) a été mise à disposition ad libitum au-dessus de la cage, tandis qu'une petite quantité de pain d'abeille a été fournie comme complément alimentaire au fond de la cage, conformément à la méthode décrite par **Huang *et al.* (2014)**. L'éthanol et le thymol, avec six concentrations allant de 1,03 à 3,09  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ont été utilisés respectivement comme contrôle négatif et positif. Chaque traitement a été répété trois fois, soit un total de 30 abeilles (Figure III. 5). Les cages ont été placées dans les mêmes conditions environnementales que celles utilisées pour l'activité acaricide contre *V. destructor*. La mortalité a été vérifiée par inspection visuelle 24, 48 et 72 heures après l'exposition initiale.



**Figure III. 5 : Cages pour les tests sur les abeilles.**

## **8. Expression des résultats**

### **8.1. Correction des taux de mortalité**

Quelle que soit le protocole appliqué, l'efficacité des différentes concentrations des HEs est exprimée en pourcentages de mortalité des abeilles et des acariens. Cependant, il existe toujours une mortalité naturelle qui s'ajoute à celle provoquée par les substances toxiques. Par conséquent, ces pourcentages ont été corrigés en tenant compte de la mortalité observée dans le lot de témoin négatif, en utilisant la formule d'**Abbott (1925)** décrite par l'équation suivante :

$$P_c = 100 \times \left[ \frac{(P_0 - P_t)}{(100 - P_t)} \right]$$

Où :

$P_c$  représente la mortalité corrigée en %,  $P_t$  représente la mortalité observée dans le contrôle négatif, et  $P_0$  est la mortalité observée dans le lot testé.

### **8.2. Détermination des concentrations létales**

Les pourcentages des mortalités corrigés sont transformés en valeurs probit afin d'évaluer les concentrations létales 50 ( $CL_{50}$ ). Ces  $CL_{50}$  représentent les concentrations, calculées statistiquement, des substances capables de provoquer la mort de 50% des individus d'un même lot.

### 8.3. Calcul des ratios de sélectivité

Les concentrations létales d'HEs et de thymol utilisés seuls ne suffisent pas à déterminer l'efficacité d'un acaricide. Le facteur clé pour comparer l'efficacité d'un produit par rapport à un autre est le calcul du ratio de sélectivité (RS). Ce ratio est une indication des limites de sécurité chimique, calculées en divisant la CL<sub>50</sub> pour les abeilles mellifères par la CL<sub>50</sub> pour *V. destructor*. Si le RS est inférieur ou égal à 1, cela indique que l'HE n'est pas sélective pour l'hôte. En revanche, si le RS est supérieur à 1, l'HE est considéré comme sélective ou inoffensive pour l'hôte (Stanley & Preetha, 2016 ; Begna *et al.*, 2023).

$$RS = \frac{CL_{50} A. mellifera}{CL_{50} V. destructor}$$

## 9. Analyse statistique

Les différences entre les groupes ont été analysées par ANOVA à deux facteurs, suivie du test de Tukey pour comparer les quatre concentrations en commun (1-10 µL/mL) en ce qui concerne la mortalité de *V. destructor*. Les données moyennes de mortalité corrigées ont été soumises à une analyse probit pour calculer la CL<sub>50</sub> avec des intervalles de confiance (IC) de 95 %. La distribution normale des données des six concentrations testées a été vérifiée à l'aide du test de Shapiro-Wilk. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM-SPSS v.28.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Afin d'établir une relation concentration-réponse et d'estimer la concentration la plus élevée d'HE n'induisant pas une mortalité des abeilles significativement supérieure à celle observée chez le lot témoin NOAEL (dose sans effet nocif observé) (Medrzycki *et al.*, 2013), une ANOVA à deux facteurs suivi d'un test post-hoc de Tukey ont été appliqués. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism v.6.01 pour Windows. Pour tous les tests, le seuil de signification ( $\alpha$ ) a été fixé à 0,05. La NOAEL a été utilisée comme l'une des étapes clés dans les méthodologies d'évaluation des risques.

## II. Résultats

### 1. Activité acaricide des huiles essentielles sur *V. destructor*

#### 1.1. Huile essentielle de *Artemisia herba alba*

La figure III.6 représente le taux de mortalité corrigé de *V. destructor* en fonction du temps pour différentes concentrations de l'HE testé. Le taux de mortalité des acariens dans le contrôle négatif était satisfaisant variant entre 0 et 6,7 %, sachant qu'un test est rejeté si le taux de mortalité dans le lot témoin dépasse 10 %. Le test d'ANOVA révèle que la concentration en HE ( $F_{3,36} = 92,7$  ;  $P < 0,001$ ) et le temps d'exposition ( $F_{2,36} = 3,7$  ;  $P < 0,05$ ) ont un effet significatif sur la mortalité des acariens, mais leur interaction n'en a pas ( $F_{6,36} = 0,7$  ;  $P > 0,05$ ). Après 24 h d'application d'une solution d'HE de 2,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  le taux de mortalité était  $65,51 \pm 21,53$  %, supérieur à celui obtenu après 72 h d'exposition à une concentration de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $25 \pm 10,71$  %). Une mortalité totale (100 %) a été observée pour des concentrations élevées d'HEs, telles que 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  après 72 h et 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  indépendamment de la durée d'exposition qui a été significativement plus élevée que dans les autres traitements.

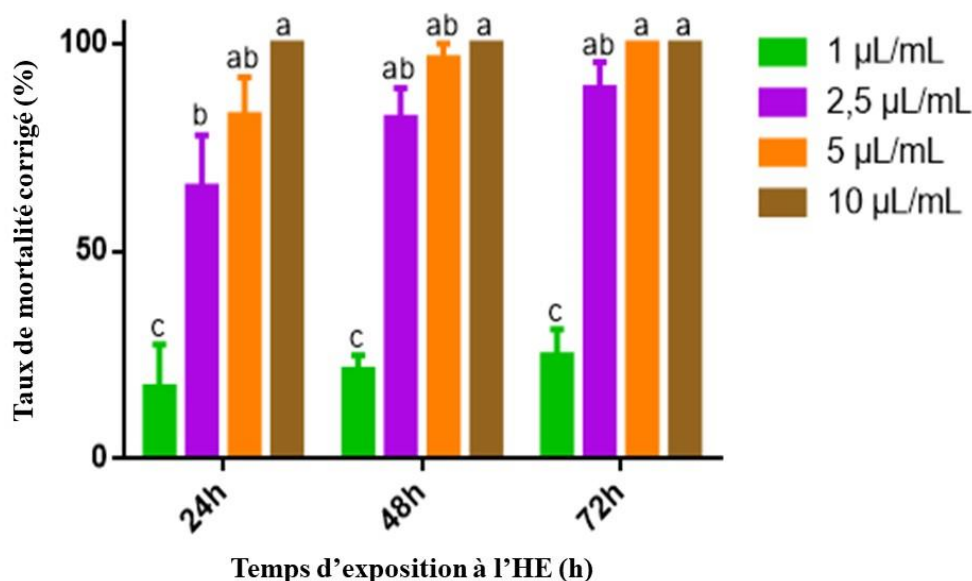
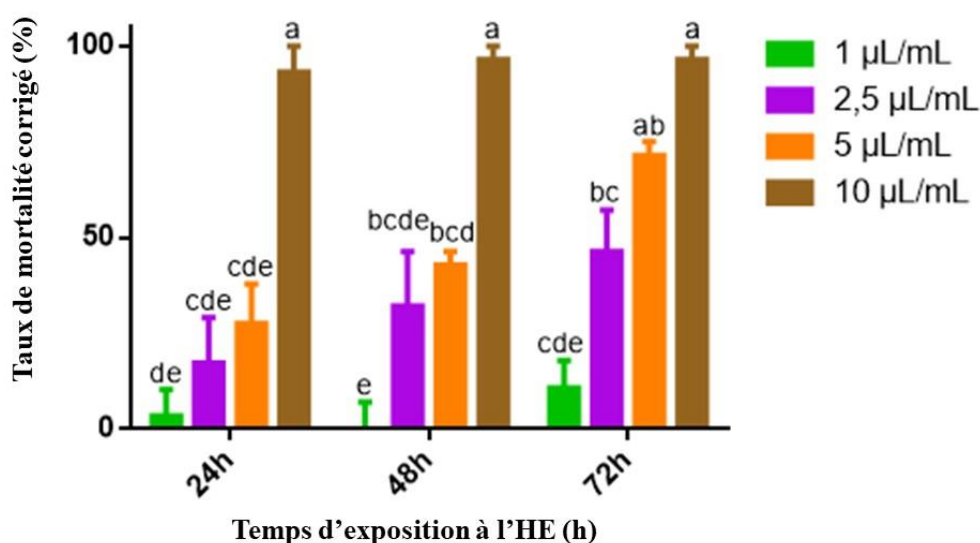


Figure III. 6 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$  ES) de *Varroa destructor* en fonction du temps et de la concentration de l'huiles essentielle de *Artemisia herba alba*. Les moyennes à l'intérieur d'un même panneau, dont les lettres sont différentes, sont significativement différentes (test HDS de Tukey :  $P < 0,05$ ).

## 1.2. Huile essentielle de *Artemisia campestris*

La mortalité des acariens a été influencée par la concentration d'HE de *A. campestris* ( $F_{3,36} = 63,6$  ;  $P < 0,001$ ) ainsi que par la durée d'exposition ( $F_{2,36} = 6,5$  ;  $P < 0,05$ ), mais il n'y a pas eu d'effet significatif de leur interaction ( $F_{6,36} = 1,4$  ;  $P > 0,05$ ) (Figure III. 7). A une concentration de 5  $\mu\text{L/mL}$ , la mortalité a atteint  $71,43 \pm 6,18$  % après 72 h d'exposition, ce qui est supérieure à celle observée après 24 h d'exposition ( $27,59 \pm 17,92$  %). Un taux de mortalité élevé de  $96,42 \pm 06,19$  % a été atteint après 48 h d'exposition à 10  $\mu\text{L/mL}$ , et ces résultats différents significativement de celui des autres traitements (Figure III. 7).

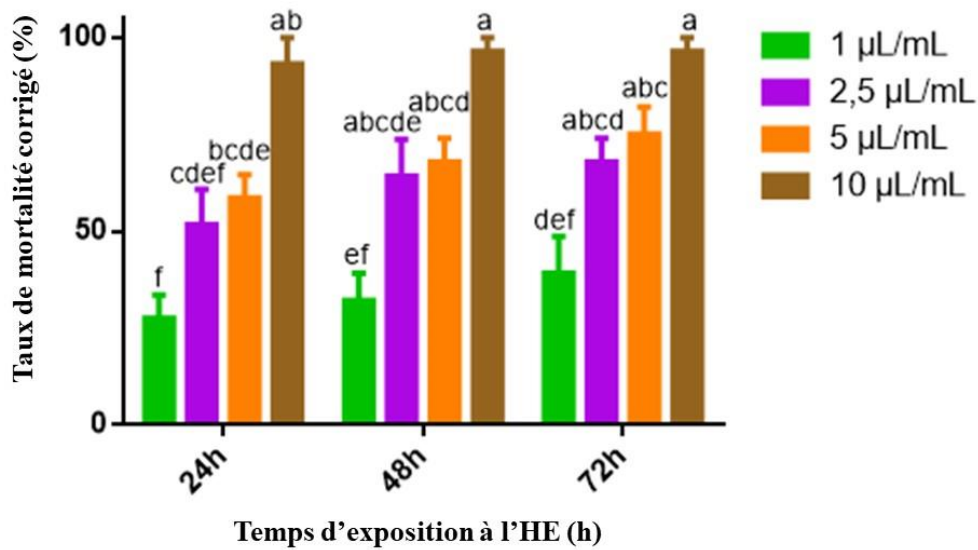


**Figure III. 7 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$  ES) de *Varroa destructor* en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de *Artemisia campestris*. Les moyennes à l'intérieur d'un même panneau, dont les lettres sont différentes, sont significativement différentes (test HDS de Tukey :  $P < 0,05$ ).**

## 1.3. Huile essentielle de *Artemisia judaica*

Le taux de mortalité des acariens a été significativement influencé par la concentration de l'huile essentielle utilisée ( $F_{3,36} = 40,1$  ;  $P < 0,001$ ). Cependant, il n'a pas été affecté par la durée d'exposition ( $F_{2,36} = 2,9$  ;  $P > 0,05$ ), ni par l'interaction entre le temps d'exposition et la concentration de l'huile ( $F_{6,36} = 0,23$  ;  $P > 0,05$ ) (Figure III. 8). Les résultats ont montré des taux de mortalité élevés pour toutes les concentrations testées. Pour chaque concentration, les taux de mortalité à 48 et 72 heures n'ont pas présenté de différences par rapport à ceux observés 24 heures après le traitement. A une concentration de 10  $\mu\text{L/mL}$ , le taux de mortalité était significativement plus élevé que celui obtenu à 1  $\mu\text{L/mL}$ , et ce, quelle que soit la durée d'exposition, avec des valeurs respectives de 93,10

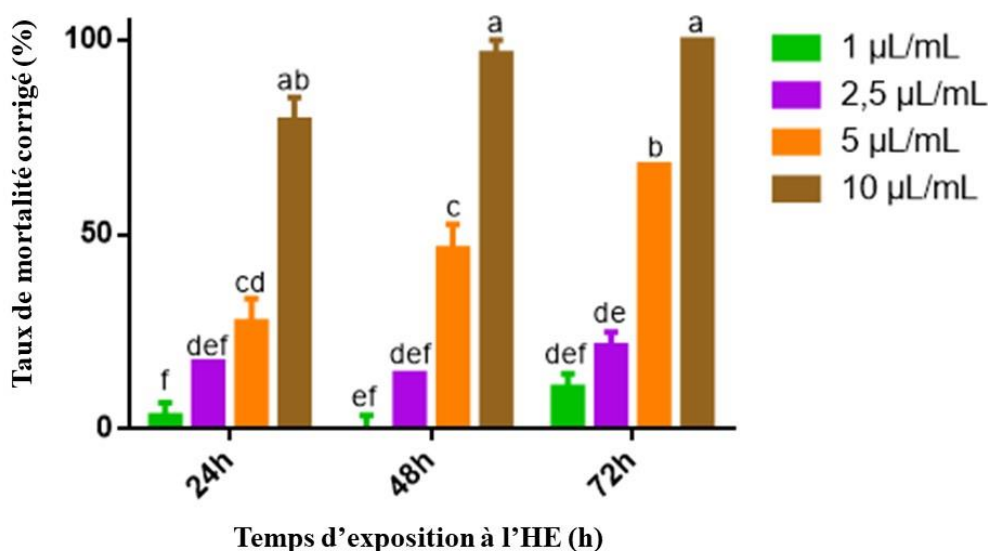
$\pm 11,94$  à  $96,42 \pm 06,19$  % pour  $10 \mu\text{L}/\text{mL}$  et de  $27,59 \pm 10,34$  à  $39,8 \pm 16,36$  % pour  $1 \mu\text{L}/\text{mL}$  (Figure III. 8).



**Figure III. 8 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigé moyen ( $\pm$  ES) de *Varroa destructor* en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de *Artemisia judaica*. Les moyennes à l'intérieur d'un même panneau, dont les lettres sont différentes, sont significativement différentes (test HDS de Tukey :  $P < 0,05$ ).**

#### 1.4. Huile essentielle de *Ruta montana*

Le taux de mortalité de *V. destructor* est influencé par la concentration de l'HE de *R. montana* ( $F_{3,36} = 312,5$  ;  $P < 0,001$ ), par le temps d'exposition ( $F_{2,36} = 23,0$  ;  $P < 0,001$ ) ainsi que par l'interaction entre ces deux facteurs ( $F_{6,36} = 5,5$  ;  $P < 0,05$ ) (Figure III. 9). La mortalité enregistrée augmente en fonction de la concentration et de la durée d'exposition. De manière évidente, une concentration de  $10 \mu\text{L}/\text{mL}$  a présenté le taux de mortalité le plus élevé, qui a été significativement différent de celui observé pour les autres concentrations, quelle que soit la durée d'exposition (Figure III. 9).

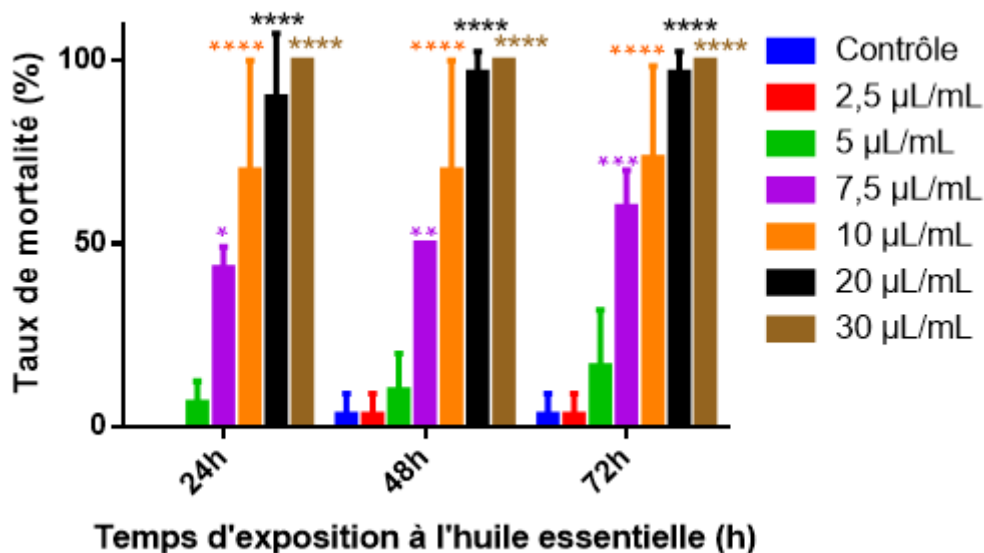


**Figure III. 9 : Histogramme montrant la cinétique du taux de mortalité corrigés moyens ( $\pm$  ES) de *Varroa destructor* en fonction du temps et de la concentration de l'huile essentielle de *Ruta montana*. Les moyennes à l'intérieur d'un même panneau, dont les lettres sont différentes, sont significativement différentes (test HDS de Tukey :  $P < 0,05$ ).**

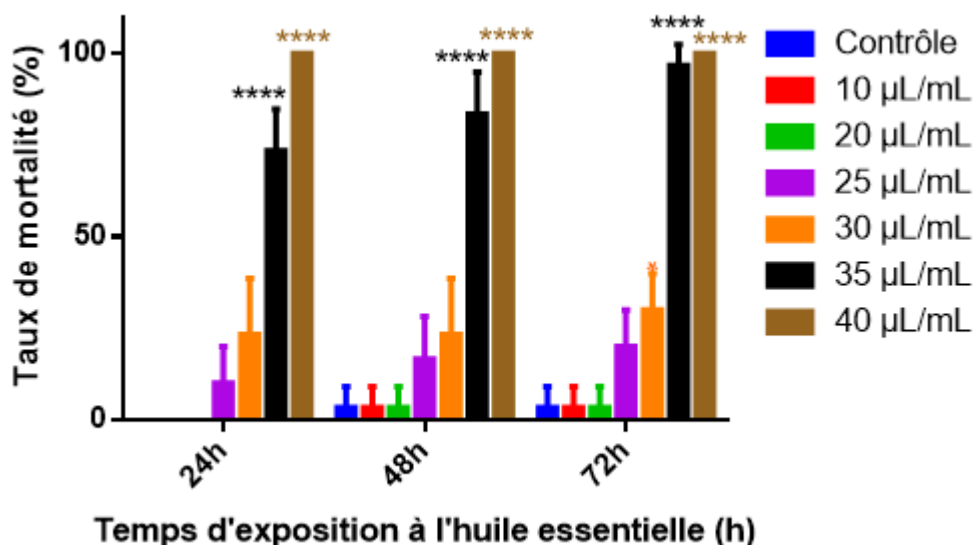
## 2. Evaluation de la toxicité aiguë des HEs vis-à-vis les adultes de *Apis mellifera*

Les taux de mortalité des abeilles adultes exposées pendant 24, 48 et 72 heures à diverses concentrations des quatre huiles essentielles et du thymol ont été mesurés (Figures III.10, III.11, III.12, III.13 et III.14).

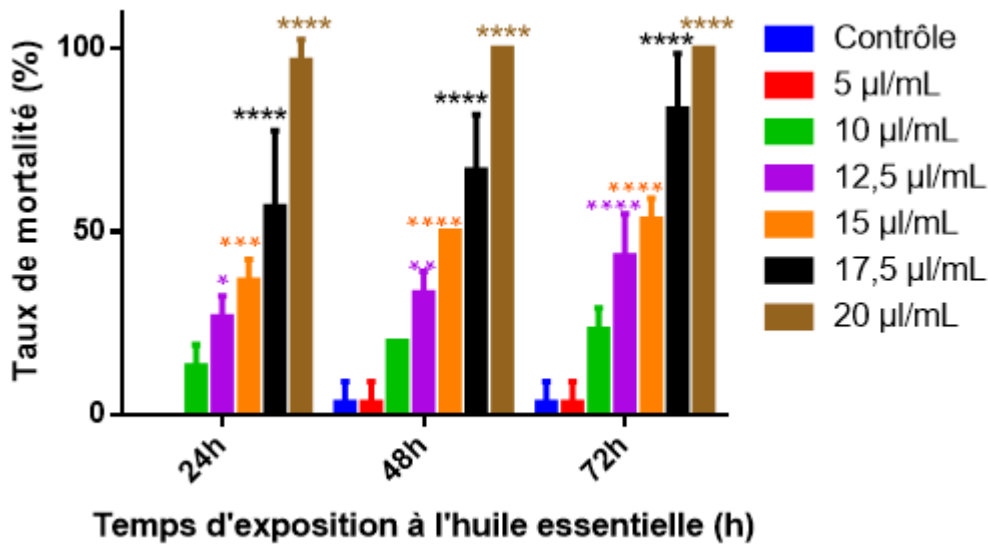
Les résultats obtenus montrent clairement le caractère insecticide de ces HEs, puisque le taux de mortalité des abeilles adultes augmente significativement en fonction des concentrations testées et de la durée d'exposition, par rapport au témoin. Selon le facteur concentration, l'effet est hautement significatif qui atteint 100 % de mortalité après 24 heures seulement d'exposition à des concentrations d'HEs de *Artemisia herba alba*, de *Artemisia campestris*, de *Artemisia judaica*, de *Ruta montana* et de thymol de 30 µL/mL, 40 µL/mL, 20 µL/mL, 22,5 µL/mL et 3,09 µL/mL respectivement. De même, selon le facteur durée d'exposition, les analyses statistiques montrent également un effet significatif sur la mortalité des adultes après 24 h d'exposition aux HEs et au thymol alors qu'un effet hautement significatif est enregistré après 72 h de traitement.



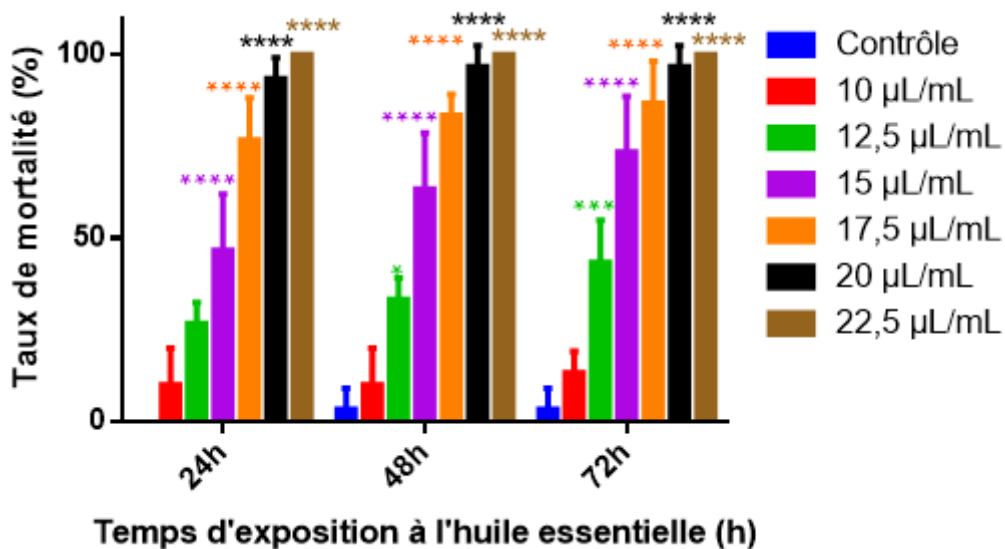
**Figure III. 10 :** Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$  SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de *Artemisia herba alba*. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au contrôle négatif (c'est-à-dire l'éthanol) (test HSD de Tukey) : \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $0,0001 < p < 0,001$  ; \*\* $0,001 < p < 0,01$  ; \* $0,01 < p < 0,05$ ).



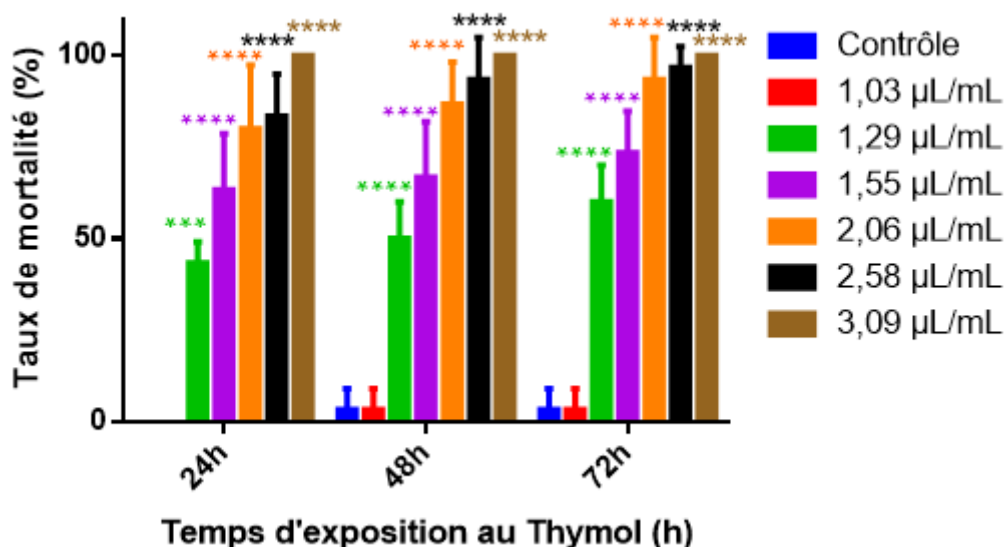
**Figure III. 11 :** Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$  SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de *Artemisia campestris*. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au contrôle négatif (c'est-à-dire l'éthanol) (test HSD de Tukey) : \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $0,0001 < p < 0,001$  ; \*\* $0,001 < p < 0,01$  ; \* $0,01 < p < 0,05$ ).



**Figure III. 12 :** Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$  SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de *Artemisia judaica*. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au contrôle négatif (c'est-à-dire l'éthanol) (test HSD de Tukey) : \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $0,0001 < p < 0,001$  ; \*\* $0,001 < p < 0,01$  ; \* $0,01 < p < 0,05$ ).



**Figure III. 13 :** Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$  SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de l'huile essentielle de *Ruta montana*. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au contrôle négatif (c'est-à-dire l'éthanol) (test HSD de Tukey) : \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $0,0001 < p < 0,001$  ; \*\* $0,001 < p < 0,01$  ; \* $0,01 < p < 0,05$ ).



**Figure III. 14 : Histogramme montrant le taux de mortalité moyen ( $\pm$  SD) (%) d'abeilles adultes exposées à une gamme de concentrations de thymol.** Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au contrôle négatif (c'est-à-dire l'éthanol) (test HSD de Tukey) : \*\*\*\* $p < 0,0001$  ; \*\*\* $0,0001 < p < 0,001$  ; \*\* $0,001 < p < 0,01$  ; \* $0,01 < p < 0,05$ ).

Par ailleurs, la NOAEL (dose sans effet toxique observé), c'est-à-dire la concentration la plus élevée à laquelle la mortalité des abeilles mellifères n'est pas significativement différente de celle du groupe témoin, a été déterminée pour chaque HE ainsi que pour le thymol (utilisé comme témoin positif), 72 heures après traitement (Tableau III.2). Simultanément, les taux de mortalité de *V. destructor* observés pour ces valeurs de NOAEL ont été notés, avec des pourcentages allant de 96,7 jusqu'à 100 %. Le traitement par solvant (contrôle négatif) a provoqué une mortalité négligeable des abeilles (de 0 à 3,3 %). Parmi les cinq HE testées, l'HE de *A. campestris* a montré la NOAEL la plus élevée (25 µL/mL) indiquant une faible toxicité pour les abeilles domestiques. En résumé, toutes les huiles volatiles testées ont démontré un effet acaricide satisfaisant tout en présentant une toxicité acceptable pour les abeilles.

**Tableau III. 2 : Estimation de la « dose sans effet nocif observé » (NOAEL) et des taux de mortalité moyens ( $\pm$  SD) des varroas (%) après 72 heures d'exposition.**

Huile essentielle	NOAEL ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	Mortalité du <i>Varroa</i> (%)
<i>Artemisia herba alba</i>	5	100 $\pm$ 00
<i>A. campestris</i>	25	100 $\pm$ 00
<i>A. judaica</i>	10	96,66 $\pm$ 5,77
<i>Ruta montana</i>	10	100 $\pm$ 00
Thymol	1,03	100 $\pm$ 00

### 3. Détermination des concentrations létales et des ratios de sélectivité

Les valeurs des  $CL_{50}$  des HEs contre *V. destructor* et les abeilles ouvrières nouvellement émergées ont été déterminées à partir des taux de mortalité corrigés, en utilisant une analyse probit (Tableau III.3). Les HEs les plus toxiques pour les acariens *Varroa* après 24 heures sont celles de *A. herba alba* et de *A. judaica* suivies par *A. campestris* et *R. montana* ( $LC_{50} = 2.025$  à  $5.725 \mu\text{L}/\text{mL}$ ). Cette tendance s'est maintenue après 48 h ( $LC_{50} = 1.538$  à  $4.92 \mu\text{L}/\text{mL}$ ) et 72 h ( $LC_{50} = 1.347$  à  $3.549 \mu\text{L}/\text{mL}$ ), bien que ses valeurs soient toujours plus enlevées que celle du témoin positif, le thymol ( $LC_{50} = 0.447$  à  $0.375 \mu\text{L}/\text{mL}$ ). Il est important de noter que tous les HEs testées présentent une très faible toxicité pour les abeilles mellifères, tout en restant moins toxiques pour ces dernières et pour les acariens *V. destructor* que le thymol (Tableau III.3).

Par ailleurs, les ratios de sélectivité (RS), ont révélés que l'HE de *A. campestris* est la plus sélective 72 heures après traitement (RS = 10.77), suivie de celle de *A. judaica* (RS = 8.78). Des valeurs plus modérées ont été observées pour l'HE de *A. herba alba* (RS = 5,62) et celle de *R. montana* (RS = 3.73). Comparativement, le thymol (témoin positif), a montré les plus faibles valeurs de RS : 3.42 (24 h), 3.64 (48 h) et 3.65 (72 h). Les huiles essentielles testées sont donc plus sélectives que le thymol.

**Tableau III. 3 : Valeurs des CL<sub>50</sub> (µL/mL) (+ IC 95 % entre parenthèses) des huiles essentielles et du thymol (contrôle positif) sur *Varroa destructor* et *Apis mellifera* et leur rapport de sélectivité à 24, 48 et 72 heures en utilisant la méthode d'exposition complète dans les conditions de laboratoire**

HE	Espèces	24 h	48 h	72 h
Thymol	<i>V. destructor</i>	0,447 (0,299–0,594)	0,400 (0,332–0,464)	0,375 (0,301–0,445)
	<i>A. mellifera</i>	1,531 (1,098–1,93)	1,456 (1,164–1,731)	1,370 (1,033–1,664)
	Ratio de sélectivité	3,42	3,64	3,65
<i>Artemisia herba alba</i>	<i>V. destructor</i>	2,025 (1,809–2,265)	1,538 (1,389–1,704)	1,347 (1,226–1,483)
	<i>A. mellifera</i>	8,726 (7,019–10,864)	8,245 (7,327–9,306)	7,569 (6,576–8,672)
	Ratio de sélectivité	4,31	5,36	5,62
<i>A. campestris</i>	<i>V. destructor</i>	5,26 (3,082–8,261)	4,204 (2,679–5,848)	2,781 (2,466–3,102)
	<i>A. mellifera</i>	31,718 (29,389–34,194)	31,146 (27,917–34,66)	29,951 (26,178–34,035)
	Ratio de sélectivité	6,03	7,41	10,77
<i>A. judaica</i>	<i>V. destructor</i>	2,466 (1,196–3,777)	1,895 (0,814–2,944)	1,517 (0,819–2,183)
	<i>A. mellifera</i>	15,184 (12,785–18,617)	14,246 (11,976–16,668)	13,323 (11,453–14,975)
	Ratio de sélectivité	6,15	7,51	8,78
<i>Ruta montana</i>	<i>V. destructor</i>	5,725 (3,96–8,101)	4,92 (4,021–5,845)	3,549 (2,069–5,286)
	<i>A. mellifera</i>	14,463 (13,388–15,498)	13,931 (13,517–14,334)	13,231 (12,799–13,642)
	Ratio de sélectivité	2,52	2,83	3,73

### III. Discussion

Pour évaluer la toxicité aiguë des HEs vis-à-vis du *V. destructor*, nous avons utilisé la méthode d'exposition complète dans des boîtes de Pétri fermées. Selon **Maggi et al. (2010)**, lors d'une exposition complète, l'action des HEs sur les acariens se manifeste par contact, fumigation et ingestion.

Un agent varroacide efficace doit combiner une toxicité élevée pour les acariens avec une faible létalité pour les abeilles domestiques (**Brasceso et al., 2017**). Nos essais biologiques *in vitro* ont démontré que les quatre HEs testées exercent un puissant effet acaricide dépendant de la concentration et du temps d'exposition contre *V. destructor*. En revanche, la toxicité des HEs pour les abeilles domestiques adultes s'est révélée relativement faible. Les valeurs NOAEL ont été calculées pour *A. campestris* (25 µL/mL), *A. judaica* (10 µL/mL), *R. montana* (10 µL/mL) et *A. herba alba* (5 µL/mL). A ces concentrations, la létalité de *V. destructor* variait de 96,7 à 100 %. Ces résultats indiquent clairement que les HEs testées sont inoffensives pour les ouvrières d'*A. mellifera* tout en étant efficaces pour contrôler *V. destructor*.

L'indice de sélectivité est un paramètre clé pour évaluer le potentiel acaricide en tenant compte des valeurs de CL<sub>50</sub> calculées pour les acariens et les abeilles. Le thymol, un traitement biologique couramment utilisé dans l'apiculture pour lutter contre le *Varroa* à travers le monde (**Damiani et al., 2009 ; Glavinic et al., 2022**), a été utilisé comme contrôle positif dans cette étude. Après 24 heures d'exposition, le thymol présentait un RS de 3,42, inférieur à celui de *A. judaica* (6,15), *A. campestris* (6,03) et *A. herba alba* (4,31), mais supérieur à celui de *R. montana* (2,52). Le RS du thymol a légèrement augmenté pour atteindre 3,65 après 72 heures d'exposition. Nos résultats concordent avec ceux de **Hýbl et al. (2021)**, qui ont observé un RS de 3,2 après 72 heures d'exposition. Les valeurs RS les plus élevées à la fin de l'expérience ont été enregistrées pour *A. campestris* (RS = 10,77) et *A. judaica* (RS = 8,78), suivies de *A. herba alba* (RS = 5,62) et de *R. montana* (RS = 3,73). Toutes ces valeurs sont comparables à celles rapportées dans la littérature (**Conti et al., 2020 ; Hýbl et al., 2021**).

Nos résultats ont révélé que l'HE de *A. campestris* possédait la plus forte activité acaricide contre *V. destructor*. Des études antérieures ont déjà examiné son action anthelminthique (**Abidi et al., 2018 ; Akkari et al., 2014**), et plus récemment, **Ammar et al. (2020)** ont exploré son effet insecticide contre *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica* et *Spodoptera littoralis*. Les résultats ont montré une activité larvicide contre *C. quinquefasciatus* (CL<sub>50</sub> = 45,8 mg/L) et une toxicité envers les adultes *M. domestica* (DL<sub>50</sub> = 99,8 µg/adulte). L'HE de *Artemisia campestris* est dominée par les

monoterpènes (53,1 %), des composées connus pour leur impact sur la reproduction des acariens (**Imdorf et al., 1999**). Plusieurs études ont notamment confirmé l'efficacité des monoterpènes contre *V. destructor* (**Fassbinder et al., 2002 ; Gashout & Guzmán-Novoa, 2009**), ainsi que contre les tiques, telles que les adultes de *Hyalomma marginatum* (**Cetin et al., 2010**) et les nymphes de *Ixodes ricinus* (**Thorsell et al., 2006**). De plus, une récente étude a montré que les HEs riches en  $\beta$ -pinène, issues de *Citrus spp.*, similaires à notre huile essentielle de *A. campestris* présentaient une forte activité acaricide contre *V. destructor* (**Bava et al., 2021**). Par ailleurs, **Da Camara et al. (2020)** ont démontré la toxicité du  $\beta$ -pinène, du p-cimène, de l' $\alpha$ -pinène et du  $\gamma$ -terpinène contre le tétranyque à deux points, *Tetranychus urticae*, via des tests biologiques par fumigation et par contact résiduel.

L'huile essentielle de *Artemisia judaica*, avec une teneur élevée en cétones (70,8 %), a également démontré un bon effet acaricide *in vitro* contre *V. destructor*. Il s'agit dans le présent travail de la première étude rapportant cette activité. **El-Sharabasy (2010)** a testé des extraits bruts de *A. judaica* (utilisant des solvants organiques tels que l'éthanol, l'acétone et l'éther de pétrole) contre *T. urticae* concluant qu'ils présentaient une forte activité acaricide. D'autres propriétés ont également été attribuées à l'HE de *A. judaica*, notamment des actions antimicrobiennes, insecticides, anti-appétentes et antifongiques (**Mohamed & Abdelgaleil, 2008 ; Benmansour et al., 2016**). Le pipéritone, constituant 68,7 % de cette huile, semble être le principal responsable de l'activité acaricide observée. **Abdelgaleil et al. (2008)** ont démontré les activités insecticides ( $DL_{50} = 0,68$   $\mu\text{g/larve}$ ) et anti-appétentes du pipéritone contre *S. littoralis*. De la même manière, le pipéritone issue de *Cymbopogon schoenanthus* a montré une efficacité notable sur le coléoptère des graines *Callosobruchus maculatus* avec une  $CL_{50} = 1,6$   $\mu\text{L/L}$  (**Ketoh et al., 2006**).

L'huile essentielle de *A. herba alba* a démontré une toxicité remarquable vis-à-vis du *V. destructor* avec un ratio de sélectivité de 5,62 après 72 heures d'exposition. **Alahyane et al. (2022)** ont également mis en évidence l'activité acaricide de l'HE de *A. herba alba* sur *V. destructor in vitro*, par fumigation. Ils ont signalé une forte toxicité de cette HE pour les nymphes de *A. mellifera* ( $CL_{50} = 10,53$   $\mu\text{L/L}$  d'air), bien qu'aucune donnée concernant la toxicité pour les adultes de *A. mellifera* n'a été rapportée. Récemment, l'HE de *A. herba alba* s'est révélée très prometteuse en tant qu'agent acaricide contre les tiques *I. ricinus*, avec une  $CL_{50} = 0,3$   $\mu\text{L/cm}^2$  après 2 heures d'exposition (**Elmhalli et al., 2021**). De plus, cette HE a montré un effet répulsif très significatif contre les adultes de l'insecte des denrées stockées *Rhyzopertha dominica*, avec une moyenne de répulsion de 58,35 % (**Arab et al., 2022**). Par ailleurs, **El-Seedi et al. (2017)** ont révélé que l'huile essentielle de *A. herba alba* avec comme composé majoritaire le pipéritone (26,5%), exerce un fort comportement répulsif, allant jusqu'à 84,2 % contre *Ixodes ricinus*.

L'HE de *Ruta montana* a montré une efficacité relativement moindre contre le *Varroa* par rapport aux HEs du genre *Artemisia*, mais ses résultats demeurent supérieurs à ceux du thymol. Actuellement, il n'existe aucun rapport dans la littérature sur l'activité acaricide de l'HE de *R. montana*. Cependant, **Bouzeraa et al. (2019)** ont mis en évidence ses propriétés toxiques et répulsives contre les larves d'*Ephestia kuehniella*. De plus, l'extrait hydrométhanolique de *R. montana* a démontré un effet larvicide significatif sur les vecteurs du plasmodium aviaire, *Culiseta longiareolata* (**Bouabida & Dris, 2022**). Une étude ethnobotanique menée au Portugal par **Carvalho da Silva et al. (2023)**, a également suggéré que *R. graveolens* est considéré comme agent ectoparasiticide pour les chiens et le bétail. Par ailleurs, des preuves supplémentaires corroborent les effets insecticides et répulsifs des HEs de diverses espèces de *Ruta* (**Conti et al., 2013 ; Akkari et al., 2014 ; Tampe et al., 2016 ; Achimón et al., 2022 ; Wang et coll., 2022**). Le 2-undécanone, principal composé de l'HE de *R. montana*, pourrait être à l'origine de cet effet acaricide, en raison de ses propriétés antifongiques, anti-inflammatoires et répulsives contre les insectes (**Liu et al., 2015 ; Bailly, 2023**).

Notre résultat le plus marquant est que, en plus des monoterpènes, bien documentés pour leur activité acaricide contre l'acarien *V. destructor*, les cétones telles que la pipéritone, la davanone et le 2-undécanone peuvent être considérées comme des candidats naturels prometteurs pour combattre *V. destructor*, grâce à leur bonne tolérance par les abeilles et de leur puissant effet varroacide.

## Conclusion

La varroase causée par *Varroa destructor* Anderson et Trueman est la maladie la plus pathogène et la plus destructrice pour l'abeille domestique occidentale, *Apis mellifera*. Dans cette partie, nous avons examiné l'activité acaricide de quatre huiles essentielles extraites des parties aériennes de quatre espèces végétales algériennes autochtones : *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica* et *Ruta montana*. Les HEs ont été obtenues par hydrodistillation, puis leur toxicité contre *V. destructor* et *A. mellifera* a été évaluée en utilisant la méthode d'exposition complète. Il est notable que les valeurs de la CL<sub>50</sub> associées aux taux de mortalité des abeilles, ont révélé que toutes les huiles testées possédaient une efficacité acaricide significative avec des ratios de sélectivité de 10,77 ; 8,78 ; 5,62 et 3,73 pour *A. campestris*, *A. judaica*, *A. herba alba*, et *R. montana*, respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles du thymol (RS = 3,65), utilisé comme contrôle positif. Ces résultats suggèrent que ces HEs pourraient être envisagées comme acaricides vétérinaires d'origine végétale pour lutter contre la varroase sur le terrain.

# *Conclusion générale et perspectives*

Cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation de quatre espèces végétales aromatiques et médicinales algériennes, appartenant à deux familles botaniques distinctes, les *Asteraceae* pour les espèces *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica* et les *Rutaceae* avec l'espèce *Ruta montana*. Ces quatre espèces ont été choisies en raison de leur appartenance à des familles de plantes largement reconnues dans la littérature pour leurs composés majeurs les plus efficaces contre les insectes nuisibles. Ce choix a également été motivé par l'absence et la rareté d'études portant sur l'activités acaricide de leurs HEs. A notre connaissance, cette étude est la première à caractériser, à la fois, la composition chimique des HEs extraites par HDMO des trois espèces *Artemisia campestris*, *A. judaica* et *R. montana*, tout en évaluant l'activité acaricide de leurs HEs obtenues par HD conventionnelle contre l'ectoparasite de l'abeille *Varroa destructor*. Une partie de ces travaux a été valorisée par une publication dans la revue internationale à comité de lecture *Experimental and Applied Acarology* (Annexe 5).

Dans la première phase de ce travail, nous avons procédé à l'extraction des HEs à partir des parties aériennes des plantes sélectionnées en utilisant la méthode d'HD conventionnelle. Par la suite, une caractérisation par CG/SM a été réalisée sur ces HEs afin d'en déterminer les compositions phytochimiques. Les rendements d'extraction, calculés par rapport au poids secs de la matière végétale utilisée, ont montré des variations entre les espèces :  $2,20 \pm 0,09$  % pour *A. herba alba*,  $0,59 \pm 0,04$  % pour *A. campestris*,  $0,84 \pm 0,02$  % pour *A. judaica*, et,  $0,67 \pm 0,06$  % pour *R. montana*. L'analyse détaillée des compositions chimiques des HEs par CG/SM a révélé des chémotypes distincts pour chaque HE. En effet, l'HE de *A. herba alba*, collectée dans la wilaya de Djelfa et extraite par HD, présente un chémotype comprenant majoritairement du davanone (66,9 %), suivi du camphre (9,1 %) et du davana éther (5,1 %). Alors que l'étude de l'HE de *A. campestris*, provenant également de la wilaya de Djelfa et obtenue par HD, se distingue par une teneur élevée en  $\beta$ -pinène (19,5 %), p-cimène (8,1 %), globulol (7,5 %),  $\alpha$ -pinène (7,1 %) et en  $\delta$ -terpinène (6,0 %). Dans le cas de *A. judaica* collectée dans la wilaya de Tamanrasset, l'HE extraite par HD est dominée par le pipéritone (68,7 %), suivi du  $\delta$ -cadinène (6,3 %) et du thymol (3,1 %). Enfin, quant à l'HE extraite par HD à partir de *R. montana* collectée dans la wilaya de Mila, présente une très forte concentration d'une cétone aliphatique, la 2-undécanone (70,1 %), avec comme autres constituants majeurs détectés le Z- $\beta$ -farnésène (7,4 %) et le caryophyllène (3,0 %). Ainsi, ces résultats mettent en évidence des profils chimiques variés, reflétant la diversité phytochimique de ces espèces et leur potentiel biologique distinct.

Afin d'évaluer la variabilité de composition chimique des HEs des quatre espèces étudiées, nous avons également procédé à leur extraction en utilisant une technique innovante dite HDMO. Bien que l'HD conventionnelle sur une durée de 180 minutes produise des rendements similaires à ceux obtenus en seulement 45 minutes par HDMO, il n'en demeure pas moins que cette étude a mis en évidence que le taux des composés retrouvés dans le chémotype d'une seule et même plante peut varier. Cela a d'ailleurs été démontré dans cette étude par les résultats de l'analyse par CG/ S Mde chaque HE extraite aussi bien par HD conventionnelle que par HDMO. En effet, qualitativement, il n'y avait pas de différence significative dans les constituants majeurs des HEs de *Artemisia herba alba*, de *Artemisia judaica* et de *Ruta montana* obtenus par HD et par HDMO. Dans ces huiles, les cétones restent les composés dominants, avec des pourcentages globaux similaires.

En revanche, l'analyse chromatographique des HEs de *Artemisia campestris* a révélé deux chémotypes distincts : l'HE obtenue par HD est principalement constituée de beta-pinène tandis que l'HE extraite par HDMO est dominée par le davanone. Il est également intéressant de noter que l'HDMO semble être plus efficace pour isoler la plupart des composés oxygénés. Les résultats de cette étude ont révélé que l'extraction des HEs par HDMO est fort intéressante en raison de : i) la réduction significative du temps d'extraction, et, ii) la réduction de la quantité de solvant et par conséquent la consommation en énergie, iii) l'amélioration de la qualité des huiles extraites grâce à l'augmentation de taux des composés oxygénés. Ainsi, dans ce travail nous avons choisi une méthode d'extraction des HEs de manière à obtenir des huiles aux compositions variées avec trois riches en composés oxygénés (*A. herba alba*, *A. judaica* et *R. montana*) et une autre huile riche en composés hydrocarbonés (*A. campestris*).

Dans la deuxième phase de ce travail, nous avons étudié l'effet acaricide des HEs obtenues par HD dans des conditions de laboratoire vis-à-vis de l'acarien *Varroa destructor*. L'HD conventionnelle a été privilégiée pour la suite de ce travail par rapport à l'HDMO en raison de la composition chimique des HEs obtenues. Pour évaluer la toxicité aiguë des HEs contre *V. destructor* et *Apis mellifera*, nous avons utilisé la méthode d'exposition complète. De plus, les taux de mortalité des acariens et des abeilles ont été évalués après 24, 48 et 72 heures. Nos essais biologiques *in vitro* contre *V. destructor* ont démontré que les quatre HEs testées exercent un puissant effet acaricide dépendant de leurs concentrations et du temps d'exposition. En revanche et de manière très intéressante, les valeurs NOAEL calculées pour *A. campestris* (25 µL/mL), *A. judaica* (10 µL/mL), *R. montana* (10 µL/mL) et *A. herba alba* (5 µL/mL) ont révélé que la toxicité de ces HEs pour les abeilles domestiques adultes est relativement faible. De plus, à ces mêmes concentrations, la létalité de *V. destructor* variait de 96,7 à 100 %. Ces résultats indiquent clairement que les HEs testées sont

inoffensives pour les ouvrières de *A. mellifera* tout en étant efficaces pour contrôler le *V. destructor* à la même concentration. Par ailleurs, ces résultats suggèrent que les huiles les plus appropriées sont celles de *A. campestris* et de *Artemisia judaica*, suivies de celles de *A. herba alba* et de *Ruta montana*. En outre, ces HEs ont montré une tendance à l'augmentation de la valeur du rapport sélectif au fil du temps. La particularité de toutes ces HEs semblent résider dans le fait qu'elles sont meilleures que le thymol, qui est couramment utilisé dans la pratique apicole. Outre les substances bien connues pour leur effet acaricide comme le thymol et la  $\beta$ -pinène, d'autres composants semblent potentiellement intéressants pour la lutte contre le *Varroa*, en particulier les cétones telles que le davanone, le pipéritone et le 2-undécane, qui sont les principaux composés des HEs testées dans ce travail.

Les travaux réalisés dans cette thèse ont apporté des résultats encourageants et prometteurs sur l'effet acaricide des HEs des quatre plantes étudiées vis-à-vis du *V. destructor*. Comme perspectives de ce travail, des études supplémentaires visant à confirmer et/ou à approfondir certaines hypothèses peuvent être envisagées :

- ✓ Etudier la composition chimique de ces HEs en utilisant d'autres techniques d'extraction innovantes ;
- ✓ Continuer l'étude phytochimique sur ces espèces afin d'isoler et de purifier les constituants chimiques responsables de leur activité acaricide ;
- ✓ Faire des tests sur des individus d'abeilles d'âge et de caste variés ;
- ✓ Suivre les travaux par des essais en conditions de terrain *in situ* afin d'optimiser le mode de délivrance, la durée d'exposition, l'état de la colonie (avec ou sans couvain) ainsi que l'influence des conditions climatiques sur l'activité acaricide de ces HEs ;
- ✓ Tester les HEs extraites par HDMO et comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus par HD ;
- ✓ Une autre étude histologique approfondie serait nécessaire afin de connaître le mode d'action de ces HEs sur les tissus de l'acarien.

*Références  
bibliographiques*

## Références bibliographiques

1. Abad, M. J., Bedoya, L. M., Apaza, L., & Bermejo, P. (2012). The *Artemisia* L. genus: A review of bioactive essential oils. *Molecules* 17 (3), 2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>.
2. Abbas, A., Zahid Abbas, R., Masood, S., Iqbal, Z., Kasib Khan, M., Kashif Saleemi, M., Asif Raza, M., Shahid Mahmood, M., Ali Khan, J., & ud Din Sindhu, Z. (2018). Acaricidal and insecticidal effects of essential oils against ectoparasites of veterinary importance. *Aromaticas*. 17 (5). [www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl).
3. Abbott, W.B. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*18, 265–267.
4. Abdelgaleil, S. A. M., Abbassy, M. A., Belal, A. S. H., & Abdel Rasoul, M. A. A. (2008). Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia judaica* L. *Bioresour. Technol.* 99(13), 5947–5950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.043>.
5. Abdelali, K. S., Souttou, K., Elhassani, M. K., & Aissaoui, L. (2022). Chemical composition of *Artemisia herba alba* essential oil and its larvicidal and pupicidal effects against *Culex pipiens* (Diptera; Culicidae). <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1519765/v1>.
6. Abdelali, K. S., Souttou, K., Kacimi-Elhassani, M., Aissaoui, L., & Bendachou, H. (2023). Chemical composition of *Artemisia herba-alba* essential oil and its larvicidal and pupicidal effects against *Culex pipiens* (Diptera ; Culicidae). *Actual. Biol*, 45(118), 1–12. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v45n118a01>.
7. Abd-Elhady, H. (2012). Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* l. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Plant Protection Research*, 52(3), 347–352. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0057-9>.
8. Abd El-Wahab, T. E., Shalaby, S. E. M., Al-Kahtani, S. N., Al Naggar, Y., Jamal, Z. A., & Masry, S. H. D. (2021). Mode of application of acaricides against the ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) infesting honeybee colonies, determines their efficiencies and residues in honey and beeswax. *Journal of King Saud University - Science*, 33(1). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101236>.
9. Abidi, A., Sebai, E., Dhibi, M., Alimi, D., Rekik, M., B'chir, F., Maizels, R. M., & Akkari, H. (2018). Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. *Veterinary Parasitology*, 263, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.10.003>.
10. Abou-Shaara, H. F., Al-Ghamdi, A. a., & Mohamed, A. a. (2012). Tolerance of two honey bee races to various temperature and relative humidity gradients. *Environmental and Experimental Biology*, 10, 133–138.

11. Abou-Shaara, H. F., Owayss, A. A., Ibrahim, Y. Y., & Basuny, N. K. (2017). A review of impacts of temperature and relative humidity on various activities of honey bees. *Insectes Sociaux*, 64(4), 455–463. <https://doi.org/10.1007/s00040-017-0573-8>.
12. Abu-Darwish, M. S., Cabral, C., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Zulfiqar, A., Khan, I. A., Efferth, T., & Salgueiro, L. (2016). Chemical composition and biological activities of *Artemisia judaica* essential oil from southern desert of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 191, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.023>.
13. Acheuk, F., Lakhdari, W., Abdellaoui, K., Belaid, M., Allouane, R., & Halouane, F. (2017). Phytochemical Study and Bioinsecticidal Effect of the Crude Ethonolic Extract of the Algerian Plant *Artemisia Judaica* L. (Asteraceae) Against the Black Bean Aphid, *Aphis Fabae* Scop. *The Journal "Agriculture and Forestry,"* 63(1). <https://doi.org/10.17707/agricultforest.63.1.11>
14. Achimón, F., Peschiutta, M. L., Brito, V. D., Beato, M., Pizzolitto, R. P., Zygadlo, J. A., & Zunino, M. P. (2022). Exploring Contact Toxicity of Essential Oils against *Sitophilus zeamais* through a Meta-Analysis Approach. *Plants*. 11 (22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/plants11223070>.
15. Adamczyk, S., Lázaro, R., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., & Herrera, A. (2005). Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-Varroa treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10085–10090. <https://doi.org/10.1021/jf051813f>.
16. Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. ed. 4.1. ISBN 978-1-932633-21-4.
17. Adjlane, N. & Haddad, N. (2014). The first data on hygienic behavior of *Apis mellifera intermissa* in Algeria. *J Biol Earth Sci.* 4 (1): B1 -B5. ISSN : 2084-3577.
18. Adjlane, N., Dainat, B., Gauthier, L., & Dietemann, V. (2016). Atypical viral and parasitic pattern in Algerian honey bee subspecies *Apis mellifera intermissa* and *A. m. sahariensis*. *Apidologie*. 47 (5), 631–641. <https://doi.org/10.1007/s13592-015-0410-x>.
19. AFNOR (1986). Recueil de normes françaises : Huiles essentielles. Association française de normalisation - 2e éd, Paris la Défense. ISBN: 2-12-177521-8 (Br.): 380 F.
20. Aglagane, A., Laghzaoui, E. M., Ben Elfakir, S., Er-Rguibi, O., Abbad, A., El Mouden, E. H., & Aourir, M. (2021). Essential oils as sustainable control agents against *Varroa destructor* (Acari, Varroidae), an ectoparasitic mite of the western honeybees *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae): Review of recent literature (2010-onwards). *International Journal of Acarology*, 47(5), 436–445. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.1936631>.
21. Aimad, A., Bourhia, M., Hana, H., Sanae, R., Salamatullah, A. M., Soufan, W., Rihan, H. Z., Ouahmane, L., Youness, E. A., Nouredine, E., & Mohamed, F. (2022). Essential Oils from *Artemisia herba alba* Asso., *Maticaria Recutita* L., and *Dittrichia Viscosa* L. (Asteraceae): A

- Promising Source of Eco-Friendly Agents to Control *Callosobruchus maculatus* Fab. Warehouse Pest. *Journal of Chemistry*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2373460>.
22. Akkari, H., Rtibi, K., B'chir, F., Rekek, M., Darghouth, M. A., & Gharbi, M. (2014). In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Veterinary Research Communications*, 38(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9609-y>.
23. Alahyane, H., Ouknin, M., Aboussaid, H., el Messoussi, S., Costa, J., & Majidi, L. (2022). Biological activities of essential oils from Moroccan plants against the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Int. J. Acarol.* 48 (1), 50–56. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.2015436>.
24. Alburaki, M., Chen, D., Skinner, J. A., Meikle, W. G., Tarpy, D. R., Adamczyk, J., & Stewart, S. D. (2018). Honey bee survival and pathogen prevalence: from the perspective of landscape and exposure to pesticides. *Insects*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/insects9020065>.
25. Al Jahid, A., Essabaq, S., Elamrani, A., Blaghen, M., & Jamal Eddine, J. (2017). Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and the Hydro-alcoholic Extract of *Artemisia campestris* L. Leaves from Southeastern Morocco. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 6(5–6), 393–405. <https://doi.org/10.1080/22311866.2016.1268068>.
26. Aljaiyash, A., Kasrati, A., Alaoui Jamali, C., & Chaouch, A. (2018). Effect of cultivation on chemical composition and bioactivities of essential oils from *Artemisia herba-alba* Asso grown in Morocco. *Biochemical Systematics and Ecology*, 81, 74–79. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.10.001>.
27. Allabergenova, A., Turganbayeva, G., & Nurseitova, M. (2021). Control of *Varroa Destructor* in Kazakhstan. *Arch. Razi Inst.* 76 (5), 1163–1171. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.355621.1704>.
28. Almecija, G., Poirot, B., Cochard, P., & Suppo, C. (2020). Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France. *Exp. Appl. Acarol.* 82 (1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00535-w>.
29. Al-Snafi, A. E. (2015). The Pharmacological Importance of *Bellis Perennis* - A Review. *Inter. J. of Phytotherapy*, 5(2), 63–69.
30. Al Toufalia, H., Scandian, L., Shackleton, K., & Ratnieks, F. L. W. (2018). Towards integrated control of varroa: 4) varroa mortality from treating broodless winter colonies twice with oxalic acid via sublimation. *Journal of Apicultural Research*, 57(3), 438–443. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1454035>.
31. Álvarez-Martínez, F. J., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.

32. Al-Wahaibi, L. H. N., Mahmood, A., Khan, M., & Alkhatlan, H. Z. (2018). Comparative study on the essential oils of *Artemisia judaica* and *A. herba-alba* from Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 2053–2065. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.004>.
33. Amin, S. M., Hassan, H. M., El Gendy, A. E. N. G., El-Beih, A. A., Mohamed, T. A., Elshamy, A. I., Bader, A., Shams, K. A., Mohammed, R., & Hegazy, M. E. F. (2019). Comparative chemical study and antimicrobial activity of essential oils of three *Artemisia* species from Egypt and Saudi Arabia. *Flavour and Fragrance Journal*, 34(6), 450–459. <https://doi.org/10.1002/ffj.3525>.
34. Ammar, S., Noui, H., Djamel, S., Madani, S., Maggi, F., Bruno, M., Romano, D., Canale, A., Pavela, R., & Benelli, G. (2020). Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides? *Environmental Science and Pollution Research*, 27(21), 26594–26604. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09064-w>.
35. Amor, G., Caputo, L., La Storia, A., De Feo, V., Mauriello, G., & Fechtali, T. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. *Molecules*, 24 (22). <https://doi.org/10.3390/molecules24224021>.
36. Angoy, A., Ginies, C., Goupy, P., Bornard, I., Ginisty, P., Sommier, A., Valat, M., & Chemat, F. (2020). Development of a green innovative semi-industrial scale pilot combined microwave heating and centrifugal force to extract essential oils and phenolic compounds from orange peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 61(March), 102338. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102338>.
37. Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., & Zunino, P. (2008). Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Veterinary Microbiology*, 131(3–4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.011>.
38. Arab, R., Lemeailbi, N., & Benhissen, S. (2022). Repellent activity of essential oils from *Artemisia herba alba* Asso. and *Teucrium polium* L. against tow stored product insects. *Nat. Volatiles & Essent. Oils*. 9 (1): 1508-1515.
39. Aronstein, K. A., & Murray, K. D. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S20–S29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>.
40. Ashrafi Parchin, R., Bahraminejad, S., Ashrafi Parchin, M. & Ebadollahi, A. (2012). Toxic effect of a selection of medicinal plant products against the parasitic bee mite *Varroa destructor*. *J. Med. Plant Res*. 6 (14), 2807-2811. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1344>.

41. Ayad, A. S., Benchaabane, S., Daas, T., Smagghe, G., & Loucif-Ayad, W. (2024). Assessment of Efficacy of Algerian Propolis against the Parasitic Mite *Varroa destructor* and Safety for Honey Bees by Spray Treatment. *Insects*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.3390/insects15010075>.
42. Bailly, C. (2023). *Ruta angustifolia* Pers. (Narrow-Leaved Fringed Rue): Pharmacological Properties and Phytochemical Profile. *Plants*, 12, 827. <https://doi.org/10.3390/plants12040827>.
43. Bakkali Aissaoui, A., Amrani, A. El, Zantar, S., & Toukour, L. (2018). Activité acaricide des huiles essentielles du *Mentha pulegium*, *Origanum compactum* et *Thymus capitatus* sur l'acarien phytophage *Tetranychus urticae* Koch (Acari : Tetranychidae). *European Scientific Journal, ESJ*, 14(3), 118. <https://doi.org/10.19044/esj.2018.v14n3p118>.
44. Bankova, V., Popova, M., & Trusheva, B. (2018). The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry*, 155(July), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.07.007>.
45. Bastos, E. M. A. F., Simone, M., Jorge, D. M., Soares, A. E. E., & Spivak, M. (2008). In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(3), 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.10.007>.
46. Bava, R., Castagna, F., Piras, C., Palma, E., Cringoli, G., Musolino, V., Lupia, C., Perri, M. R., Statti, G., Britti, D., & Musella, V. (2021). In vitro evaluation of acute toxicity of five citrus spp. Essential oils towards the parasitic mite *Varroa destructor*. *Pathogens*, 10, 1182. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091182>.
47. Baykan Erel, Ş., Reznicek, G., Şenol, S. G., Karabay Yavaşoğlu, N. Ü., Konyalioğlu, S., & Zeybek, A. U. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36(1), 75–84. <https://doi.org/10.3906/biy-0912-27>.
48. Begna, T., Ulziibayar, D., & Bisrat, D. (2023). Acaricidal toxicity of four essential oils, their predominant constituents, their mixtures against *Varroa* mite, and their selectivity to honey bees (*Apis cerana* and *A. mellifera*). *Insects*, 14, 735–750. <https://doi.org/10.3390/insects14090735>.
49. Bejaoui, Y., Abderrabba, M. & Ayadi, S. (2019). Biological study from *Ruta* plants extracts growing in Tunisia. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 38(2), 85–89.
50. Bekka-Hadji, F., Bombarda, I., Djoudi, F., Bakour, S., & Touati, A. (2022). Chemical Composition and Synergistic Potential of *Mentha pulegium* L. and *Artemisia herba alba* Asso. Essential Oils and Antibiotic against Multi-Drug Resistant Bacteria. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031095>
51. Belaid, M., Chahbar, N., Acheuk, F., Ouidah, A., Aomiche, M. O. (2023). Bacterial ectomicroflora of *Varroa destructor*, ectoparasite of honeybee, collected in the apiary of Boumerdes (Algeria). *AGROFOR International Journal*, 8 (2). <https://doi.org/10.7251/AGRENG2302024B>.

52. Belhattab, R., Amor, L., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Cristina Figueiredo, A. (2014). Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(2), 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.042>.
53. Ben Abdelkader, F. (2020). Situation of Beekeeping in North Africa. *Journal of Apitherapy and Nature* ; 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.35206/jan.719721>;
54. Benali, T., Habbadi, K., Khabbach, A., Marmouzi, I., Zengin, G., Bouyahya, A., Chamkhi, I., Chtibi, H., Aanniz, T., Achbani, E. H., & Hammani, K. (2020). GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea odorata* subsp. *pectinata* and *Ruta montana* essential oils and their potential use as food preservatives. *Foods*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/foods9050668>.
55. Ben Chaaban, S., Hamdi, S. H., Mahjoubi, K., & Jemâa, J. M. Ben. (2019). Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Epehestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126(3), 237–246. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00218-8>.
56. Benmansour, N., Benmansour, A., El Hanbali, F., González-Mas, M. C., Blázquez, M. A., El Hakmaoui, A., & Akssira, M. (2016). Antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria against multi-drug resistant bacteria from clinical origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(2), 137–142. <https://doi.org/10.1002/ffj.3291>.
57. Benomari, F. Z., Sarazin, M., Chaib, D., Pichette, A., Boumghar, H., Boumghar, Y., & Djabou, N. (2023). Chemical Variability and Chemotype Concept of Essential Oils from Algerian Wild Plants. *Molecules*, 28(11), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules28114439>.
58. Bertella, A., Benlahcen, K., Abouamama, S., Pinto, D. C. G. A., Maamar, K., Kihal, M., & Silva, A. M. S. (2018). *Artemisia herba-alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. *Industrial Crops and Products*, 116, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.064>.
59. Bezza, L., Mannarino, A., Fattarsi, K., Mikail, C., Abou, L., Hadji-Minaglou, F., & Kaloustian, J. (2010). Composition chimique de l'huile essentielle de *Artemisia herba-alba* provenant de la région de Biskra (Algérie). *Phytotherapie*, 8(5), 277–281. <https://doi.org/10.1007/s10298-010-0576-3>.
60. Bisht, D., Kumar, D., Kumar, D., Dua, K., & Chellappan, D. K. (2021). Phytochemistry and pharmacological activity of the genus *Artemisia*. In *Archives of Pharmacal Research*, 44 (5). Pharmaceutical Society of Korea. <https://doi.org/10.1007/s12272-021-01328-4>.
61. Blacquièrre, T., Smagghe, G., Van Gestel, C. A. M., & Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), 973–992. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-0863-x>.

62. Blenau, W., Rademacher, E., & Baumann, A. (2012). Plant essential oils and formamidines as insecticides/ acaricides: What are the molecular targets? *Apidologie*, 43 (3), 334–347. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0108-7>.
63. Bonnafé, E., Drouard, F., Hotier, L., Carayon, J., Marty, P., Treilhou, M., & Armengaud, C. (2014). Effect of a thymol application on olfactory memory and gene expression levels in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2616-2>.
64. Bonzini, S., Tremolada, P., Bernardinelli, I., Colombo, M., & Vighi, M. (2011). Predicting pesticide fate in the hive (part 1): Experimentally determined  $\tau$ -Fluvalinate residues in bees, honey and wax. *Apidologie*, 42(3), 378–390. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0011-2>.
65. Borneck, R., Viry, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2010). Honey bee colony losses in the Jura Region, France and related pathogens. *Journal of Apicultural Research*, 49(4), 334–336. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.4.06>.
66. Bouabida, H., & Dris, D. (2022). Phytochemical constituents and larvicidal activity of *Ruta graveolens*, *Ruta montana* and *Artemisia absinthium* hydro-methanolic extract against mosquito vectors of avian plasmodium (*Culiseta longiareolata*). *S. Afr. J. Bot.* 151, 504-511. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.017>.
67. Boukhalkhal, S., Gourine, N., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S., & Yousfi, M. (2018). Variability of the chemical composition and the antioxidant activity of the essential oils of two subspecies of *Artemisia campestris* L. growing in Algeria. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1829–1842. <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9797-1>.
68. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2020). Solvent-free microwave extraction: an eco-friendly and rapid process for green isolation of essential oil from lemongrass. *Natural Product Research*, 36(2), 664–667. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1795852>.
69. Boulanouar, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., & Miguel, M. G. (2013). Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.01.020>.
70. Bousbia, N., Abert Vian, M., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2009). Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chemistry*, 114(1), 355–362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.106>.
71. Boutemak, K., Benali, N., & Moulai-Mostefa, N. (2017). Optimization of combination of steam distillation and solvent extraction of *Artemisia campestris* essential oil using RSM. *International Research Journal of Public and Environmental Health*, 4(10), 259–269. <https://doi.org/10.15739/irjpeh.17.030>.

72. Boutoumi, H., Moulay, S., & Khodja, M. (2009). Essential Oil from *Ruta montana* L. (Rutaceae) Chemical Composition, Insecticidal and Larvicidal Activities. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 12(6), 714–721. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643780>.
73. Bouzeraa, H., Bessila-Bouzeraa, M., & Labeled, N. (2019). Repellent and fumigant toxic potential of three essential oils against *Ephestia kuehniella*. *Biosyst. Divers.* 27 (4), 349–353. <https://doi.org/10.15421/011946>.
74. Brasesco, C., Gende, L., Negri, P., Szawarski, N., Iglesias, A., Eguaras, M., Ruffinengo, S., & Maggi, M. (2017). Assessing in vitro acaricidal effect and joint action of a binary mixture between essential oil compounds (Thymol, phellandrene, eucalyptol, cinnamaldehyde, myrcene, carvacrol) over ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J. Apic. Sci.* 61 (2), 203–215. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0008>.
75. Bravo, J., Carbonell, V., Sepúlveda, B., Delporte, C., Valdovinos, C. E., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2017). Antifungal activity of the essential oil obtained from *Cryptocarya alba* against infection in honey bees by *Nosema ceranae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 149, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.012>.
76. Brettell, L. E., Riegler, M., O'Brien, C., & Cook, J. M. (2020). Occurrence of honey bee-associated pathogens in Varroa-free pollinator communities. *Journal of Invertebrate Pathology*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107344>.
77. Brodschneider, R., Schlagbauer, J., Arakelyan, I., Ballis, A., Brus, J., Brusbardis, V., Cadahía, L., Charrière, J. D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Cornelissen, B., da Costa, C. A., Danneels, E., Danihlík, J., Dobrescu, C., Evans, G., Fedoriak, M., Forsythe, I., Gregorc, A., ... Gray, A. (2023). Spatial clusters of *Varroa destructor* control strategies in Europe. *Journal of Pest Science*, 96(2), 759–783. <https://doi.org/10.1007/s10340-022-01523-2>.
78. BuBnič, J., MoosBeckhofer, R., Prešern, J., Moškrič, A., Giovanni forMato, G., Marco PietroPaoli, M., GreGorc, A., Necati Muz, M., and Smodiš škerl, M. I. (2021). Three pillars of Varroa control. *Apidologie*, 52:1305–1333. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00903-4>.
79. Burger, P., Plainfossé, H., Brochet, X., Chemat, F., & Fernandez, X. (2019). Extraction of natural fragrance ingredients: history, overview and future trends. *Chemistry and Biodiversity*, 16 (10). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900424>.
80. Cardoso-Ugarte, G. A., Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 47(1), 63–72. <https://doi.org/10.1080/08327823.2013.11689846>.
81. Carson, C. F. & Hammer, K. A. (2011). Antibacterial and antifungal activities of essential oils. *In Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1002/9780470976623.ch11>.

82. Carvalho da Silva, R., Meisel, L., Farinha, N., Póvoa, O., & de Mello-Sampayo, C. (2023). Parasiticides: Weapons for Controlling Microbial Vector-Borne Diseases in Veterinary Medicine; The Potential of Ethnobotanic / Phytoparasiticides: An Asset to One Health. *Antibiotics*. 12 (2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020341>.
83. Castagnino Laércio, B., & de Oliveira Orsi, R. (2012). Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas Natural products for the control of the mite *Varroa destructor* in Africanized bees. *Pesq. agropec. bras., Brasília*. 47 (6), 738-744.
84. Cengiz, M. M. (2018). Effectiveness of combining certain biotechnical methods with thymol treatment against *Varroa destructor* infestation. *African Journal of Agricultural Research*, 13 (47), 2735–2740. <https://doi.org/10.5897/ajar2018.13572>.
85. Cetin, H., Cilek, J. E., Oz, E., Aydin, L., Deveci, O., & Yanikoglu, A. (2010). Acaricidal activity of *Satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and  $\gamma$ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 170 (3–4): 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.031>.
86. Chahbar, N., & Hamadi, K. (2020). Les abeilles domestiques locales et l'environnement. Un modèle parfait pour la sensibilisation environnementale. *L'éducateur*, 23(March), 136–143. <https://www.researchgate.net/publication/350322586>.
87. Chaimanee, V., Warrit, N., Boonmee, T., & Pettis, J. S. (2021). Acaricidal activity of essential oils for the control of honeybee (*Apis mellifera*) mites *Tropilaelaps mercedesae* under laboratory and colony conditions. *Apidologie*, 52(3), 561–575. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00843-z>.
88. Charpentier, G., Vidau, C., Ferdy, J. B., Tabart, J., & Vetillard, A. (2014). Lethal and sub-lethal effects of thymol on honeybee (*Apis mellifera*) larvae reared in vitro. *Pest Management Science*, 70(1), 140–147. <https://doi.org/10.1002/ps.3539>.
89. Chauhan, A., Student, P. G., Dabhi, M. V., Jyotshna, R., & Patnaik, P. (2021). Review on *Varroa* mite: An invasive threat to apiculture industry. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 535–539. <http://www.entomoljournal.com>.
90. Chehma, A. (2006). Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien. Laboratoire de recherche : protection des écosystèmes en zones arides et semi-arides. Université Kasdi Merbah de Ouergla. p141.
91. Chellappandian, M., Vasantha-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Karthi, S., Thanigaivel, A., Ponsankar, A., Kalaivani, K., & Hunter, W. B. (2018). Botanical essential oils and uses as mosquitocides and repellents against dengue. *Environment International*, 113(October 2017), 214–230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.12.038>.

92. Chemat, F., & Cravotto, G. (2013). Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice (Google eBook). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4830-3>.
93. Chemat, F., & Lucchesi, M. E. (2006). Microwave-assisted extraction of essential oils. *In* *Microwaves in Organic Synthesis: Second Edition*. 2, 959–985. ISBN: 3-527-31452-0. <https://doi.org/10.1002/9783527619559.ch22>.
94. Chenni, M. (2016). Etude comparative de la composition chimique et de l'activité biologique de l'huile essentielle des feuilles du basilic "*Ocimum basilicum* L." extraite par hydro-distillation et par micro-ondes. Thèse de Doctorat en chimie moléculaire : analyse, modélisation, synthèse. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella.
95. Cheraif, K., Bakchiche, B., Gherib, A., Bardaweel, S. K., Ayvaz, M. Ç., Flamini, G., Ascrizzi, R., & Ghareeb, M. A. (2020). Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants. *Molecules*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/molecules25071710>.
96. Chevalier, F., Sommerer, N. (2011). Analytical Methods | Mass Spectrometric Methods. *In* *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00019-4>.
97. Chiasson, H. et Beloin, N. (2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre ». *Bulletin de la Société d'entomologie du Québec. Antennae*, 14 (2006), 12–15.
98. Cipcigan, M. C., İvgin Tunca, R., Kösoğlu, M., Margaoan, R., & Topal, E. (2020). The use of medicinal aromatic plants against bee diseases and pests. *Bee Studies- Apiculture Research Institute*, 12(1), 5–11. <https://doi.org/10.51458/bstd.2021.2>.
99. Coimbra, A. T., Ferreira, S., & Duarte, A. P. (2020). Genus *Ruta*: A natural source of high value products with biological and pharmacological properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 260, 113076. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113076>.
100. Conti, B., Bocchino, R., Cosci, F., Ascrizzi, R., Flamini, G., & Bedini, S. (2020). Essential oils against *Varroa destructor*: a soft way to fight the parasitic mite of *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 774–782. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1790790>.
101. Conti, B., Leonardi, M., Pistelli, L., Profeti, R., Ouerghemmi, I., & Benelli, G. (2013). Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), an arbovirus vector. *Parasitology Research*, 112(3), 991–999. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3221-2>.
102. Costa Vieira, G. H., Dias, B. B. and Ozório Leonel, D. C. (2016). Essential oils : Properties, applications, extraction methods, and perspectives. *In* *Essential oils: Historical significance, chemical composition and medicinal uses and benefits*. Nova Science Publishers, Inc. New York. ISBN: 978-1-63484-351-5.

103. Da Camara, C. A. G., Da, G., Lima, S., de Moraes, M. M., da Silva, M. M. C., de Melo, J. P. R., dos Santos, M. L., & Fagg, C. W. (2020). Chemical composition and acaricidal activity of essential oils and selected terpenes from two species of *Psidium* in the Cerrado biome of Brazil against *Tetranychus*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 19 (1), 15 – 28. <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.1.2>.
104. Dahmani-Hamzaoui, N., & Baaliouamer, A. (2010). Chemical composition of algerian *Artemisia herba-alba* essential oils isolated by microwave and hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Research*, 22(6), 514–517. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700386>.
105. D’Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M., & Hasselmann, M. (2019). Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecology and Evolution*, 9(18), 10241–10252. <https://doi.org/10.1002/ece3.5544>.
106. Damiani, N., Gende, L. B., Bailac, P., Marcangeli, J. A., & Eguaras, M. J. (2009). Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitol. Res.* 106 (1), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1639-y>.
107. Damiani, N., Fernández, N. J., Maldonado, L. M., Álvarez, A. R., Eguaras, M. J., & Marcangeli, J. A. (2010). Bioactivity of propolis from different geographical origins on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Parasitology Research*, 107(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1829-7>.
108. Damiani, N., Fernández, N. J., Porrini, M. P., Gende, L. B., Álvarez, E., Buffa, F., Brasesco, C., Maggi, M. D., Marcangeli, J. A., & Eguaras, M. J. (2014). Laurel leaf extracts for honeybee pest and disease management: Antimicrobial, microsporidial, and acaricidal activity. *Parasitology Research*, 113(2), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3698-3>.
109. De Carolis, A., Newmark, A. J., Kim, J., Cazier, J., Hassler, E., Pietropaoli, M., Robinette, C., Formato, G., & Song, J. (2023). Results of an international survey for risk assessment of honey bee health concerning *Varroa* management. *Applied Sciences (Switzerland)*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/app13010062>.
110. Decourtye, A., Alaux, C., Le Conte, Y., & Henry, M. (2019). Toward the protection of bees and pollination under global change: present and future perspectives in a challenging applied science. *Current Opinion in Insect Science*, 35(March 2020), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.07.008>.
111. Dellile, L. (2007). Les plantes médicinales d’Algérie. Berti Editions.
112. Devillers, J. (2002). The ecological importance of honey bees and their relevance to ecotoxicology. In *Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals*. Taylor & Francis Inc, New York. ISBN 0-203-27408-3.

113. Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., & Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3(4), 25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>.
114. Dib, I., Angenot, L., Mihamou, A., Ziyat, A., & Tits, M. (2016). *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. *Journal of Herbal Medicine*, 7 : 1–10. Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.10.005>.
115. Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52 (1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>.
116. Djouahri, A., Boudarene, L., & Meklati, B. Y. (2013). Effect of extraction method on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oil from the leaves of Algerian *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Industrial Crops and Products*, 44, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.021>.
117. Dob, T., & Benabdelkader, T. (2006). Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 18(6), 685–690. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699206>.
118. Dob, T., & Chelghoum, C. (2006). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia judaica* L. from Algeria. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(2), 343–347. <https://doi.org/10.1002/ffj.1641>.
119. Dob, T., Dahmane, D., Berramdane, T., & Chelghoum, C. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *Pharmaceutical Biology*, 43(6), 512–514. <https://doi.org/10.1080/13880200500220664>.
120. Dolezal, A. G., & Toth, A. L. (2018). Feedbacks between nutrition and disease in honey bee health. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 26, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.006>.
121. Drescher, N., Klein, A. M., Neumann, P., Yañez, O., & Leonhardt, S. D. (2017). Inside honeybee hives: Impact of natural propolis on the ectoparasitic mite *Varroa destructor* and viruses. *Insects*, 8 (1), 1–18. <https://doi.org/10.3390/insects8010015>.
122. Drinić, Z., Pljevljakušić, D., Živković, J., Bigović, D., & Šavikin, K. (2020). Microwave-assisted extraction of *O. vulgare* L. spp. hirtum essential oil: Comparison with conventional hydro-distillation. *Food and Bioproducts Processing*, 120(2006), 158–165. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.011>.
123. Drioiche, A., Amine, S., boutahiri, S., Saidi, S., Ailli, A., Rhafouri, R., Mahjoubi, M., El Hilali, F., Mouradi, A., Eto, B., & Zair, T. (2020). Antioxidant and antimicrobial activity of essential oils and phenolic extracts from the aerial parts of *Ruta montana* L. of the Middle Atlas

- Mountains-Morocco. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 23(5), 902–917. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1829995>.
124. Driouèche, A., Boutoumi, H., Benmansour, N., & Lettreuch, H. (2022). Hemi-synthesis of thione and thiol derivatives from *Artemisia judaica* L. essential oil, and antimicrobial tests. *Kemija u Industriji*, 5–6. <https://doi.org/10.15255/kui.2021.062>.
125. Ebert, T. A., Kevan, P. G., Bishop, B. L., Kevan, S. D., & Downer, R. A. (2007). Oral toxicity of essential oils and organic acids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 46(4), 220–224. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2007.11101398>.
126. El-Gohary, A. E., Elsayed, A. A. A., El-Garf, I. A., Sabry, R. M., Khalid, K. A., & Ahmed, S. S. (2021). Evaluation of essential oils in two *Artemisia* species that are grown wildly in eastern desert of Egypt. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 24(2), 186–192. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.1923574>.
127. Elmhalli, F., Garboui, S. S., Karlson, A. K. B., Mozūraitis, R., Baldauf, S. L., & Grandi, G. (2021). Acaricidal activity against *Ixodes ricinus* nymphs of essential oils from the Libyan plants *Artemisia herba alba*, *Origanum majorana* and *Juniperus phoenicea*. *Vet. Parasitol. Reg. Stud.* 24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100575>.
128. El-Seedi, H. R., Azeem, M., Khalil, N. S., Sakr, H. H., Khalifa, S. A. M., Awang, K., Saeed, A., Farag, M. A., AlAjmi, M. F., Pålsson, K., & Borg-Karlson, A. K. (2017). Essential oils of aromatic Egyptian plants repel nymphs of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 73 (1), 139–157. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0165-3>.
129. Elshamy, A., Abd-ElGawad, A., Mohamed, T., El Gendy, A. E. N., Abd El Aty, A. A., Saleh, I., Moustafa, M. F., Hussien, T. A., Pare, P. W., & F. Hegazy, M. E. (2021). Extraction development for antimicrobial and phytotoxic essential oils from asteraceae species: *Achillea fragrantissima*, *Artemisia judaica* and *Tanacetum sinaicum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 36(3), 352–364. <https://doi.org/10.1002/ffj.3647>.
130. El-Sharabasy, H. M (2010). Acaricidal activities of *Artemisia judaica* L. extracts against *Tetranychus urticae* Koch and its predator *Phytoseiulus persimilis* Athias Henriot (Tetranychidae : Phytoseiidae). *J. Biopestic.* 3 (2), 514 – 519.
131. El-Tarabily, K. A., El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Arif, M., Batiha, G. E., Khafaga, A. F., Elwan, H. A. M., Elnesr, S. S., & E. Abd El-Hack, M. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(9), 5145–5156. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.05.033>.
132. Elyemni, M., Louaste, B., Nechad, I., Elkamli, T., Bouia, A., Taleb, M., Chaouch, M., & Eloutassi, N. (2019). Extraction of Essential Oils of *Rosmarinus officinalis* L. by Two Different

Methods: Hydrodistillation and Microwave Assisted Hydrodistillation. *Scientific World Journal*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/3659432>.

133. Erban, T., Harant, K., Hubalek, M., Vitamvas, P., Kamler, M., Poltronieri, P., Tyl, J., Markovic, M., & Titera, D. (2015). In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep13907>.
134. Evans, J. D., Chen, Y. P., Prisco, G. di, Pettis, J., & Williams, V. (2009). Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *J. Apic. Res.* 48 (4), 300–302. <https://doi.org/10.1080/00218839.2009.11101548>.
135. Fabiano-Tixier, A. S., & Culioli, G. (2013). Chimie des substances naturelles et chimie de l' environnement. L'actualité chimique- Septembre 2013- n° 377.
136. Fassbinder, C., Grodnitzky, J., & Coats, J. (2002). Monoterpenoids as possible control agents for *Varroa destructor*. *J. Apic. Res.* 41 (3–4), 83–88. <https://doi.org/10.1080/00218839.2002.11101073>.
137. Fekhar, N., Boutoumi, H., Krea, M., Moulay, S., Asma, D., & Benmaamar, Z. (2017). Thionation of essential oils from Algerian *Artemisia herba-alba* L. and *Ruta montana* L.: Impact on their antimicrobial and insecticidal activities. *Chemistry Journal of Moldova*, 12(2), 50–57. <https://doi.org/10.19261/cjm.2017.410>.
138. Ferhat, M., Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2014). Comparative compositions of essential oils of three *Ruta* species growing in different soils. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (3), 735–738. ISSN : 2528-2028.
139. Fikadu, Z. (2020). Pesticides use, practice and its effect on honeybee in Ethiopia: a review. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 40 (3), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00114-x>.
140. Filly, A., Fabiano-Tixier, A. S., Louis, C., Fernandez, X., & Chemat, F. (2016). Water as a green solvent combined with different techniques for extraction of essential oil from lavender flowers. *Comptes Rendus Chimie*, 19(6), 707–717. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.01.018>.
141. Flesar, J., Havlik, J., Kloucek, P., Rada, V., Titera, D., Bednar, M., Stropnický, M., & Kokoska, L. (2010). In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus larvae* and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*, 145(1–2), 129–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.03.018>.
142. Flores, J. M., Gámiz, V., Jiménez-Marín, Á., Flores-Cortés, A., Gil-Lebrero, S., Garrido, J. J., & Hernando, M. D. (2021). Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Research in Veterinary Science*, 135(January), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.001>.

143. Fragkouli, R., Antonopoulou, M., Asimakis, E., Spyrou, A., Kosma, C., Zotos, A., Tsiamis, G., Patakas, A., & Triantafyllidis, V. (2023). Mediterranean plants as potential source of biopesticides: An overview of current research and future trends. *Metabolites*, *13*(9). <https://doi.org/10.3390/metabo13090967>.
144. Gallai, N., Salles, J. M., Settele, J., & Vaissière, B. E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, *68*(3), 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>.
145. Gashout, H. A., & Guzmán-Novoa, E. (2009). Acute toxicity of Essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Apicultural Research*, *48*(4), 263–269. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.4.06>.
146. Gashout, H. A., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P. H., & Correa-Benítez, A. (2020). Impact of sublethal exposure to synthetic and natural acaricides on honey bee (*Apis mellifera*) memory and expression of genes related to memory. *Journal of Insect Physiology*, *121*(December 2019), 104014. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104014>.
147. Gavahian, M., Sastry, S., Farhoosh, R., & Farahnaky, A. (2019). Ohmic heating as a promising technique for extraction of herbal essential oils: Understanding mechanisms, recent findings, and associated challenges. *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 91). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.09.001>.
148. Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*(SUPPL. 1), S10–S19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>.
149. Ghanai, R., Houmani, Z., & Houmani, N. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of *Artemisia campestris* ssp. *glutinosa* (J. Gay) Batt. and *A. judaïca* ssp. *sahariensis* (Chev.) Species Endemic to the Algerian Sahara. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *21*(3), 779–788. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1484819>.
150. Giacobino, A., Cagnolo, N. B., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Salto, C., & Signorini, M. (2014). Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Prev. Vet. Med.* *115* (3–4), 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.002>.
151. Giovenazzo, P., & Dubreuil, P. (2011). Evaluation of spring organic treatments against *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies in eastern Canada. *Experimental and Applied Acarology*, *55*(1), 65–76. <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9447-3>.

152. Glavan, G., Novak, S., Božič, J., & Jemec Kokalj, A. (2020). Comparison of sublethal effects of natural acaricides carvacrol and thymol on honeybees. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166(March). <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104567>.
153. Glavinic, U., Blagojevic, J., Ristanic, M., Stevanovic, J., Lakic, N., Mirilovic, M., & Stanimirovic, Z. (2022). Use of Thymol in *Nosema ceranae* Control and Health Improvement of Infected Honey Bees. *Insects*. 13 (7). <https://doi.org/10.3390/insects13070574>.
154. Glenny, W., Cavigli, I., Daughenbaugh, K. F., Radford, R., Kegley, S. E., & Flenniken, M. L. (2017). Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS ONE*, 12(8), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182814>.
155. Godara, R., Parveen, S., Katoch, R., Yadav, A., Verma, P. K., Katoch, M., Kaur, D., Ganai, A., Raghuvanshi, P., & Singh, N. K. (2013). Acaricidal activity of extract of *Artemisia absinthium* against *Rhipicephalus sanguineus* of dogs. *Parasitol. Res.* 113 (2), 747–754. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3704-9>.
156. Godara, R., Parveen, S., Katoch, R., Yadav, A., Katoch, M., Khajuria, J. K., Kaur, D., Ganai, A., Verma, P. K., Khajuria, V., & Singh, N. K. (2015). Acaricidal activity of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* against *Hyalomma anatolicum* ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 65 (1), 141–148. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9843-6>.
157. Gregorc, A., Alburaki, M., Sampson, B., Knight, P. R., & Adamczyk, J. (2018). Toxicity of selected acaricides to honey bees (*Apis mellifera*) and Varroa (*Varroa destructor* anderson and trueman) and their use in controlling Varroa within honey bee colonies. *Insects*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/insects9020055>.
158. Gregory, P. G., Evans, J. D., Rinderer, T., & De Guzman, L. (2005). Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by *Varroa* mites. *Journal of Insect Science*, 5, 1–5. <https://doi.org/10.1673/031.005.0701>.
159. Grissa, K., Cornuet, J. M., Msadda, K., Fresnaye, J., Grissa, K., Cornuet, J. M., Msadda, K., & Etude, J. F. (1990). Etude biométrique de populations d'abeilles tunisiennes. *Apidologie*, 21 (4), 303-310. hal-00890839.
160. Haccour, P. (1960). Recherche sur la race d'abeille saharienne au Maroc. C.R. Soc. Sci. Nat. Phys. Extrait La Belgique Apicole. 25 (1-2) : 13-18.
161. Haddouchi, F., Chaouche, T. M., Zaouali, Y., Ksouri, R., Attou, A., & Benmansour, A. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem.* 141 (1), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>.

162. Hammami, I., Smaoui, S., Hsouna, A. Ben, Hamdi, N., & Triki, M. A. (2015). *Ruta montana* L. leaf essential oil and extracts: Characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall disease. *EXCLI Journal*, 14, 83–94. <https://doi.org/10.17179/excli2014-655>.
163. Hammiche, V., & Azzouz, M. (2013). The rues: Ethnobotany, phytopharmacology and toxicity. *Phytotherapie*, 11(1), 22–30. <https://doi.org/10.1007/s10298-013-0751-9>.
164. Harwood, G. P., & Dolezal, A. G. (2020). Pesticide – Virus interactions in honey bees: drivers of bee declines. *Viruses*, 12(5), 566. <https://doi.org/10.3390/v12050566>.
165. Hassanein, H. D., El-Gendy, A. E. N. G., Saleh, I. A., Hendawy, S. F., Elmissiry, M. M., & Omer, E. A. (2020). Profiling of essential oil chemical composition of some Lamiaceae species extracted using conventional and microwave-assisted hydrodistillation extraction methods via chemometrics tools. *Flavour and Fragrance Journal*, 35(3), 329–340. <https://doi.org/10.1002/ffj.3566>.
166. Havard, T., Laurent, M., & Chauzat, M. (2020). Impact of stressors on honey bees (*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae): Some guidance for research emerge from a meta-analysis. *Diversity*, 12 (7), 1–13. <http://doi.org/10.3390/d12010007>.
167. Houti, H., Ghanmi, M., Satrani, B., Mansouri, F. El, Cacciola, F., Sadiki, M., & Boukir, A. (2023). Moroccan endemic *Artemisia herba-alba* essential oil: GC-MS analysis and antibacterial and antifungal investigation. *Separations*, 10(1), 59. <https://doi.org/10.3390/separations10010059>.
168. Hristov, P., Shumkova, R., Palova, N., & Neov, B. (2020). Factors associated with honey bee colony losses: A mini-review. *Veterinary Sciences*, 7(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040166>.
169. Hu, J., Wang, W., Dai, J., & Zhu, L. (2019). Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. *Ind Crops Prod*. 128, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.076>.
170. Huang, S. K., Csaki, T., Doublet, V., Dussaubat, C., Evans, J. D., Gajda, A. M., Gregorc, A., Hamilton, M. C., Kamler, M., Lecocq, A., Muz, M. N., Neumann, P., Özkirim, A., Schiesser, A., Sohr, A. R., Tanner, G., Tozkar, C. Ö., Williams, G. R., Wu, L., ... Chen, Y. P. (2014). Evaluation of cage designs and feeding regimes for honey bee (Hymenoptera: Apidae) laboratory experiments. *Journal of Economic Entomology*, 107(1), 54–62. <https://doi.org/10.1603/EC13213>.
171. Hudaib, M. M., & Aburjai, T. A. (2006). Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 301–304. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699096>.
172. Hýbl, M., Bohatá, A., Rádsetoulalová, I., Kopecký, M., Hoštičková, I., Vaníčková, A., & Mráz, P. (2021). Evaluating the Efficacy of 30 Different Essential Oils against *Varroa destructor*

- and Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). *Insects*, 12 (11). <https://doi.org/10.3390/insects12111045>.
173. Iglesias, A., Gimenez Martinez, P., Ramirez, C., Mitton, G., Meroi Arcerito, F. R., Fangio, M. F., Churio, M. S., Fuselli, S., Fanovich, A., Eguaras, M., & Maggi, M. (2021). Valorization of hop leaves for development of eco-friendly bee pesticides. *Apidologie*, 52(1), 186–198. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00808-8>.
174. Imdorf, A., Bogdanov, S., Ibáñez Ochoa, R., & Calderone, N. W. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30, 209–228.
175. Isman, M. B. (2016). Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. *ACS Symposium Series*, 1218, 13–26. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2016-1218.ch002>.
176. Isman, M. B., & Machial, C. M. (2006). Chapter 2 Pesticides based on plant essential oils: from traditional practice to commercialization. *Advances in Phytomedicine*, 3(C), 29–44. [https://doi.org/10.1016/S1572-557X\(06\)03002-9](https://doi.org/10.1016/S1572-557X(06)03002-9).
177. Ivănescu, B., Burlec, A. F., Crivoi, F., Roșu, C., & Corciovă, A. (2021). Secondary metabolites from *Artemisia* genus as biopesticides and innovative nano-based application strategies. *Molecule*, 26 (10). <https://doi.org/10.3390/molecules26103061>.
178. Jack, C. J., Dai, P. L., van Santen, E., & Ellis, J. D. (2020). Comparing four methods of rearing *Varroa destructor* in vitro. *Experimental and Applied Acarology*, 80(4), 463–476. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00488-0>.
179. Jaison, J. P., Balasubramanian, B., Gangwar, J., James, N., Pappuswamy, M., Anand, A. V., Al-Dhabi, N. A., Valan Arasu, M., Liu, W. C., & Sebastian, J. K. (2023). Green synthesis of bioinspired nanoparticles mediated from plant extracts of Asteraceae family for potential biological applications. *Antibiotics*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030543>.
180. Janačković, P., Novaković, J., Soković, M., Vujisić, L., Giweli, A. A., Stevanović, Z. D., & Marin, P. D. (2015). Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. herba-alba* and *A. arborescens* from Libya. *Archives of Biological Sciences*, 67(2), 455–466. <https://doi.org/10.2298/ABS141203010J>.
181. Jeyaratnam, N., Nour, A. H., & Akindoyo, J. O. (2016). Comparative study between hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation for extraction of *Cinnamomum cassia* oil. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 11(4), 2647–2652.
182. Jiang, Z. T., Feng, X., Li, R., & Wang, Y. (2013). Composition Comparison of Essential Oils Extracted by Classical Hydro distillation and Microwave-assisted Hydrodistillation from *Pimenta dioica*. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 16(1), 45–50. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2013.764178>.

183. Johnson, R. M., Ellis, M. D., Mullin, C. A., & Frazier, M. (2010). Pesticides and honey bee toxicity - USA. *Apidologie*, 41 (3), 312–331. <https://doi.org/10.1051/apido/2010018>.
184. Kadri, M., Yahia, A., Goubi, S., Mekhedmi, N. E., Selmane, M., & Chemsas, A. E. (2022). Chromatography analysis, in vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso of Boussaâda, Algeria. *Biodiversitas*, 23(9), 4424–4431. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230907>.
185. Kalman, B. (2004). The life cycle of a honeybee. Crabtree publishing company. ISBN: 9780778706649, 0778706648.
186. Kambouche, N., Merah, B., Bellahouel, S., Bouayed, J., Dicko, A., Derdour, A., Younos, C., & Soulamani, R. (2008). Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta montana* L. essential oil from Algeria. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 593–595. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0515>.
187. Kast, C., Kilchenmann, V., & Droz, B. (2020). Distribution of coumaphos in beeswax after treatment of honeybee colonies with CheckMite® against the parasitical mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, 51(1), 112–122. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00724-6>.
188. Ketoh, G. K., Koumaglo, H. K., Glitho, I. A., & Huignard, J. (2006). Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 77 (7–8), 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.031>.
189. Kevill, J. L., Lee, K., Goblirsch, M., McDermott, E., Tarpay, D. R., Spivak, M., & Schroeder, D. C. (2020). The pathogen profile of a honey bee queen does not reflect that of her workers. *Insects*, 11(6), 1–14. <https://doi.org/10.3390/insects11060382>.
190. Khan, S. U., Anjum, S. I., Ansari, M. J., Khan, M. H. U., Kamal, S., Rahman, K., Shoaib, M., Man, S., Khan, A. J., Khan, S. U., & Khan, D. (2019). Antimicrobial potentials of medicinal plant's extract and their derived silver nanoparticles: A focus on honey bee pathogen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26 (7), 1815–1834. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.02.010>.
191. Khan, K. A., & Ghramh, H. A. (2021). An investigation of the efficacy of hygienic behavior of various honey bee (*Apis mellifera*) races toward *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) mite infestation. *J. King Saud Univ. Sci.* 33 (3), 101393. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101393>.
192. Kidoud, B., Chahbar, A. N., Chahbar, M., Tefiel, H., Khaoula, B., & Gaouar, S. B. S. (2023). First molecular detection and geographical distribution of *Nosema apis* & *Nosema ceranae* in indigenous honey bees reared in Algeria. *Genetics & Biodiversity Journal*. 7 (2), 141–150. <https://doi.org/10.46325/gabj.v7i2.343>.

193. Koul, B., Khatri, T. (2020). The *Artemisia* Genus: Panacea to Several Maladies. In Bioactive natural products in drug discovery. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-1394-7>.
194. Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>.
195. Kumar, G., Singh, S., & Pramod Kodigenahalli Nagarajaiah, R. (2020). Detailed review on pesticidal toxicity to honey bees and its management. *Modern Beekeeping - Bases for Sustainable Production*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91196>.
196. Lakehal, S., Chaouia, C. & Benrebiha, F. Z. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba* asso. from Djelfa. *Revue Agrobiologia*, 7(2): 491-501. ISSN (Print): 2170-1652. e-ISSN (Online): 2507-7627.
197. Li, L., Lin, Z. G., Wang, S., Su, X. L., Gong, H. R., Li, H. L., Hu, F. L., & Zheng, H. Q. (2017). The effects of clove oil on the enzyme activity of *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(5), 996–1000. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.052>.
198. Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F. (2014). Chapter 1: History, Localization and Chemical Compositions. In Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability. <http://www.springer.com/series/10045>.
199. Liaqat, I., Riaz, N., Saleem, Q. U. A., Tahir, H. M., Arshad, M., & Arshad, N. (2018). Toxicological evaluation of essential oils from some plants of Rutaceae family. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4394687>.
200. Lin, Z., Su, X., Wang, S., Ji, T., Hu, F. L., & Zheng, H. Q. (2019). Fumigant toxicity of eleven Chinese herbal essential oils against an ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) of the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, 59(2), 204–210. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1688493>.
201. Lindberg, C. M., Melathopoulos, A. P., & Winston, M. L. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J. Econ. Entomol.* 93 (2), 189–198. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.189>.
202. Liu, X. C., Liu, Q., Chen, X. B., Zhou, L., & Liu, Z. L. (2015). Larvicidal activity of the essential oil from *Tetradium glabrifolium* fruits and its constituents against *Aedes albopictus*. *Pest Manag. Sci.* 71 (11), 1582–1586. <https://doi.org/10.1002/ps.3964>.
203. Loucif-Ayad, W., Chefrou, A., Algharibeh, M., Haddad, N. (2013). First detection of Deformed wing virus of honeybees in Algeria. *Phytoparasitica*. 41, 445–447. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0307-z>.

204. Loucif-Ayad, W., Achou, M., Legout, H., Alburaki, M., & Garnery, L. (2015). Genetic assessment of Algerian honeybee populations by microsatellite markers. *Apidologie*, 46(3), 392–402. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0331-0>.
205. Lozano, A., Hernando, M. D., Uclés, S., Hakme, E., & Fernández-Alba, A. R. (2019). Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. *Food Chemistry*, 274(April 2018), 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.055>.
206. Maggi, M. D., Ruffnengo, S. R., Gende, L. B., Sarlo, E. G., Eguaras, M. J., Bailac, P. N., & Ponzi, M. I. (2010). Laboratory evaluations of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et perry essential oil against *Varroa destructor*. *J. Essent. Oil Res.* 22 (2), 119–122. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700278>.
207. Mahaman, B. D., Harizanis, P., Filis, I., Antonopoulou, E., Yialouris, C. P., & Sideridis, A. B. (2002). A diagnostic expert system for honeybee pests. *Computers and Electronics in Agriculture*, 36(1), 17–31. [https://doi.org/10.1016/S0168-1699\(02\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1699(02)00069-8).
208. Mahawer, K. S., Himani, Arya, S., Kumar, R., & Prakash, O. (2022). Extractions methods and biological applications of essential oils. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102955>.
209. Mahmood, R., Asad, S., Raja, S., Ul Moshin, A., Wagchoure, E. S., Sarwar, G., Islam, N., & Ahmad, W. (2014). Control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) by using Plant Oils and Extract. *Pakistan J. Zool*, 46(3), 609-615.
210. Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., and Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. *In Plant, soil and microbes: Volume 1: Implications in crop science*, 1–366. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3>.
211. Majdoub, O., Dhen, N., & Souguir, S. (2014). Chemical Composition of *Ruta chalepensis* essential oils and their Insecticidal Activity against *Tribolium castaneum*. *Tunis. J. Plant Prot.* 83 (1).
212. Mammeri, B., Bahri, F., Kouidri, M., Boudani, B., & Arioui, F. (2022). Evaluation of chemical composition, anti-inflammatory, antibacterial activity and synergistic effect between antibiotics and the essential oil of *Artemisia campestris*. *Journal of Applied Biological Sciences E*, 16(2), 230–247. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6590285>.
213. Mancuso, T., Croce, L., & Vercelli, M. (2020). Total brood removal and other biotechniques for the sustainable control of varroa mites in honey bee colonies: Economic impact in beekeeping farm case studies in Northwestern Italy. *Sustainability (Switzerland)*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/su12062302>.
214. Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Essentials of botanical extraction: Principles and applications. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-02889-4>.

215. Mande, P., & Sekar, N. (2020). Comparison of chemical composition, antioxidant and antibacterial activity of *Callistemon citrinus* skeels (bottlebrush) essential oil obtained by conventional and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 230–244. <https://doi.org/10.1080/08327823.2020.1794721>.
216. Marakhova, A. I. & Emam, E. M. (2022) A Study of active medicinal plant (*Artemisia judaica*) against *Staphylococcus aureus*. *Clinical Research and Clinical Trials*, 5(5), 01–07. <https://doi.org/10.31579/2693-4779/092>.
217. Mc Gregor & Emmett, S. (2024). "Western honeybee". *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/animal/western-honeybee>. Accessed 22 August 2024.
218. Mc Menamin, A. J., & Genersch, E. (2015). Honey bee colony losses and associated viruses. *Current Opinion in Insect Science*, 8, 121–129. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.015>.
219. Medrzycki, P., Giffard, H., Aupinel, P., Belzunces, L. P., Chauzat, M. P., Claßen, C., Colin, M. E., Dupont, T., Girolami, V., Johnson, R., Conte, Y. le, Lückmann, J., Marzaro, M., Pistorius, J., Porrini, C., Schur, A., Sgolastra, F., Delso, N. S., van der Steen, J. J. M., ... Vidau, C. (2013). Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52 (4). International Bee Research Association. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>.
220. Memarzadeh, S. M., Gholami, A., Pirbalouti, A. G., & Masoum, S. (2020). Bakhtiari savory (*Satureja bachtiarica* Bunge.) essential oil and its chemical profile, antioxidant activities, and leaf micromorphology under green and conventional extraction techniques. *Industrial Crops and Products*, 154. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112719>.
221. Milani, N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26(5), 415–429. <https://doi.org/10.1051/apido:19950507>.
222. Mishra, A. P., Devkota, H. P., Nigam, M., Adetunji, C. O., Srivastava, N., Saklani, S., Shukla, I., Azmi, L., Shariati, M. A., Melo Coutinho, H. D., & Mousavi Khaneghah, A. (2020). Combination of essential oils in dairy products: A review of their functions and potential benefits. *Lwt*, 133(March), 110116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110116>.
223. Mohamed, M. I. E., & Abdelgaleil, S. A. M. (2008). Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Appl. Entomol. Zool.* 43 (4), 599–607. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.599>.
224. Mohammed, H. A., Qureshi, K. A., Ali, H. M., Al-omar, M. S., Khan, O., & Mohammed, S. A. A. (2022). Bio-evaluation of the wound healing activity of *Artemisia judaica* L. as part of the plant's use in traditional medicine; phytochemical, antioxidant, anti-Inflammatory, and

antibiofilm properties of the plant's essential oils. *Antioxidants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020332>.

225. Mohammedi, H., Mecherara-Idjeri, S., & Hassani, A. (2019). Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta montana* L. collected from different geographical regions in Algeria. *Journal of Essential Oil Research*, 32(1), 23–36. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1660238>.
226. Mohanty, S., Ray, A., Naik, P. K., Sahoo, A., Jena, S., Das, P. K., Patnaik, J., Panda, P. C., & Nayak, S. (2023). Variation in Yield, Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil of Three *Curcuma* Species: A Comparative Evaluation of Hydrodistillation and Solvent-Free Microwave Extraction Methods. *Molecules*, 28(11). <https://doi.org/10.3390/molecules28114434>.
227. Mondet, F., Maisonnasse, A., Kretzschmar, A., Alaux, C., Vallon, J., Basso, B., Dangleant, A., Le Conte, Y. (2016). Varroa : son impact, les méthodes d ' évaluation de l ' infestation et les moyens de lutte. *Innovations Agronomiques*, 53, 63-80.
228. Mondet, F., Beaurepaire, A., McAfee, A., Locke, B., Alaux, C., Blanchard, S., Danka, B., & le Conte, Y. (2020). Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *Int. J. Parasitol.* 50 (6–7), 433–447. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>.
229. Moradalizadeh, M., Samadi, N., & Rajaei, P. (2013). Comparison of Hydrodistillation, Microwave Hydrodistillation and Solvent Free Microwave Methods in analysis of the essential oils from aerial parts of *Haplophyllum robustum* Bge. By GC/MS method. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(9), 1058–1067. <http://www.ijabbr.com>.
230. Moradi, S., Fazlali, A., & Hamed, H. (2018). Microwave-assisted hydro-distillation of essential oil from rosemary: Comparison with traditional distillation. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(1), 22–28.
231. Morfin, N., Goodwin, P. H., & Guzman-Novoa, E. (2020). Interaction of field realistic doses of clothianidin and *Varroa destructor* parasitism on adult honey bee (*Apis mellifera* L.) health and neural gene expression, and antagonistic effects on differentially expressed genes. *PLoS ONE*, 15(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229030>.
232. Murcia Morales, M., Gómez Ramos, M. J., Parrilla Vázquez, P., Díaz Galiano, F. J., García Valverde, M., Gámiz López, V., Manuel Flores, J., & Fernández-Alba, A. R. (2020). Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. *Science of the Total Environment*, 710, 136288. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136288>.

233. Murti, Y., Jain, D., Semwal, B. C., Singh, S., Janmeda, P., & Bhaskar, P. (2023). Innovative methods for extraction of essential oils from medicinal plants. *International Journal of Secondary Metabolite*, 10(2), 190–230. <https://doi.org/10.21448/ijsm.1121860>.
234. Nahar, L., El-Seedi, H. R., Khalifa, S. A. M., Mohammadhosseini, M., & Sarker, S. D. (2021). Ruta essential oils: Composition and bioactivities. *Molecules*, 26 (16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164766>.
235. Nigam, M., Atanassova, M., Mishra, A. P., Pezzani, R., Devkota, H. P., Plygun, S., Salehi, B., Setzer, W. N., & Sharifi-Rad, J. (2019). Bioactive compounds and health benefits of *Artemisia* species. *Natural Product Communications*, 14(7). <https://doi.org/10.1177/1934578X19850354>.
236. Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the major ectoparasite of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, 61, 417–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>.
237. Noël, A., Le Conte, Y., & Mondet, F. (2020). *Varroa destructor*: How does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerging Topics in Life Sciences*, 4 (1), 45–57. Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190125>.
238. Ogihara, M. H., Yoshiyama, M., Morimoto, N., & Kimura, K. (2020). Dominant honeybee colony infestation by *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) K haplotype in Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 55(2), 189–197. <https://doi.org/10.1007/s13355-020-00667-w>.
239. Onwona-Kwakye, M., Hogarh, J. N., & Van den Brink, P. J. (2020). Environmental risk assessment of pesticides currently applied in Ghana. *Chemosphere*, 254, 126845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126845>.
240. Özkirim, A. (2012). Seasonal microflora, especially winter and spring. Chapter 2. *In Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solutions*. ISBN-13: 978-1-4398-7941-2.
241. Pandey, A. K., & Singh, P. (2017). The Genus *Artemisia*: a 2012–2017 literature review on chemical composition, antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of essential oils. *Medicines*, 4 (3), 68. <https://doi.org/10.3390/medicines4030068>.
242. Pavela, R., & Benelli, G. (2016). Essential oils as ecofriendly biopesticides ? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.005>.
243. Peng, G., Kashio, M., Morimoto, T., Li, T., Zhu, J., Tominaga, M., & Kadowaki, T. (2015). Plant-derived tick repellents activate the honey bee ectoparasitic mite TRPA1. *Cell Reports*, 12(2), 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.025>.
244. Pietropaoli, M., & Formato, G. (2019). Acaricide efficacy and honey bee toxicity of three new formic acid-based products to control *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 824–830. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1656788>.

245. Pietropaoli, M., Gajger, I. T., Costa, C., Gerula, D., Wilde, J., Adjlane, N., Sánchez, P. A., Škerl, M. I. S., Bubnič, J., & Formato, G. (2021). Evaluation of two commonly used field tests to assess *Varroa destructor* infestation on honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*(10), 1–12. <https://doi.org/10.3390/app11104458>.
246. Piou, V., Tabart, J., Urrutia, V., Hemptinne, J. L., & Vétillard, A. (2016). Impact of the phoretic phase on reproduction and damage caused by *Varroa destructor* (Anderson and Trueman) to its host, the european honey bee (*Apis mellifera* L.). *PLoS ONE*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153482>.
247. Porrini, M. P., Garrido, P. M., Gende, L. B., Rossini, C., Hermida, L., Marcángeli, J. A., & Eguaras, M. J. (2017). Administración oral de aceites esenciales y componentes principales : Estudio sobre la supervivencia de abejas melíferas y el desarrollo de *Nosema ceranae*. *Journal of Apicultural Research*, *56*(5), 616–624. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1348714>.
248. Potrich, M., Silva, R. T. L. da, Maciel, R. M. A., Costa-Maia, F. M., Lozano, E. R., Rossi, R. M., Martins, J. R., & Dallacort, S. (2020). Are plant extracts safe for honey bees (*Apis mellifera*)? *J. Apic. Res.*, *59* (5), 844–851. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1735733>.
249. Quezel, P. & Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie. CNRS éd. Paris. Vol 2, 566 -1170 p.
250. Radivojac, A., Bera, O., Micić, D., Đurović, S., Zeković, Z., Blagojević, S., & Pavlić, B. (2020). Conventional versus microwave-assisted hydrodistillation of sage herbal dust: Kinetics modeling and physico-chemical properties of essential oil. *Food and Bioproducts Processing*, *123*, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.06.015>.
251. Raj, S. P., Solomon, P. R., & Thangaraj, B. (2022). Biodiesel from flowering plants. Chapitre 6; P 77. ISBN 978-981-16-4774-1, ISBN 978-981-16-4775-8 (eBook) <https://doi.org/10.1007/978-981-16-4775-8>.
252. Ramdane, F., El Ouassis, D., Hammami, M., Essid, R., Sobti, A., Hrizat, N. E. H., Ben Amara, S., Fares, N., Hadj Mohammed, M., Ould Hadj Mohamed, D., Limam, F. (2017). Chemical composition and biological effects of essential oil of *Artemisia judaica* an endemic plant from central Sahara of Algeria Hoggar. *International Journal of Biosciences (IJB)*, *10*(1), 16–23. <https://doi.org/10.12692/ijb/10.1.16-23>.
253. Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & Van Engelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(5), 1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>.

254. Ramzi, H., Ismaili, M. R., Aberchane, M., & Zaanoun, S. (2017). Chemical characterization and acaricidal activity of *Thymus satureioides* C. & B. and *Origanum elongatum* E. & M. (Lamiaceae) essential oils against *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae). *Industrial Crops and Products*, 108, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.031>.
255. Rasool, K., Rozy Rasool, S.-K., Ahad, I., & Rasool, R. (2017). Efficacy of various botanicals and chemicals on ectoparasitic mite, *Varroa destructor* feeding on European honey bee, *Apis mellifera*. *J. Entomol. Zool.* 5 (5), 589–595.
256. Rathore, H. S. (2017). Green pesticides for organic farming: occurrence and properties of essential oils for use in pest control. Section I; Essential oils as green pesticides. In *Green pesticides handbook: Essential oils for pest control*. Taylor & Francis Group, LLC. <https://doi.org/10.1201/9781315153131>.
257. Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014). A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.
258. Razavi, S. M., Asadpour, M., Jafari, A., & Malekpour, S. H. (2015). The field efficacy of *Lepidium latifolium* and *Zataria multiflora* methanolic extracts against *Varroa destructor*. *Parasitology Research*, 114(11), 4233–4238. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4661-2>.
259. Reams, T., & Rangel, J. (2022). Understanding the Enemy: A review of the genetics, behavior and chemical ecology of *Varroa destructor*, the parasitic mite of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, 22(1). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieab101>.
260. Recommendation de l'OECD/OCDE N° 214. OECD Guidelines for the testing of chemicals. Honeybees, acute contact toxicity test. Adoptée 21 Septembre 1998.
261. Requier, F., Garnery, L., Kohl, P. L., Njovu, H. K., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., & Steffan-Dewenter, I. (2019). The conservation of native honey bees is crucial. *Trends in Ecology and Evolution*, 34(9), 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.04.008>.
262. Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7 (3), 275–297. Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>.
263. Riva, C., Suzanne, P., Charpentier, G., Dulin, F., Halm-Lemeille, M. P., & Sopkova-de Oliveira Santos, J. (2019). In silico chemical library screening and experimental validation of novel compounds with potential varroacide activities. *Pestic. Biochem. Physiol.* 160, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.012>.
264. Rocha, M. I., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Pereira, C., Moreira, P., Salgueiro, L., & Figueirinha, A. (2021). Chemical characterization and bioactive potential of *Artemisia*

- campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcang. essential oil and hydrodistillation residual water. *Journal of Ethnopharmacology*, 276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114146>.
265. Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>.
266. Ruffinengo, S., Eguaras, M., Floris, I., Faverin, C., Bailac, P., & Ponzi, M. (2005). LD<sub>50</sub> and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *J. Econ. Entomol.* 98 (3), 651–655. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.651>.
267. Rundassa, D. B. (2011). Proteomic analysis of honeybee (*A. mellifera*) caste determinations. Thèse de Doctorat. Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation.
268. Sabahi, Q., Gashout, H., Kelly, P. G., & Guzman-Novoa, E. (2017). Continuous release of oregano oil effectively and safely controls *Varroa destructor* infestations in honey bee colonies in a northern climate. *Experimental & Applied Acarology*, 72(3), 263–275. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0157-3>.
269. Sabahi, Q., Morfin, N., Emsen, B., Gashout, H. A., Kelly, P. G., Otto, S., Merrill, A. R., & Guzman-Novoa, E. (2020). Evaluation of dry and wet formulations of oxalic acid, thymol, and oregano oil for *Varroa* Mite (Acari: Varroidae) control in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, 113(6), 2588–2594. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa218>.
270. Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. del M., Segura-Carretero, A., Fathi, H., Nasrabadi, N. N., Kobarfard, F., & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy Research*, 32(9), 1688–1706. <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>.
271. Salido, S., Valenzuela, L. R., Altarejos, J., Noguerras, M., Sánchez, A., & Cano, E. (2004). Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(3), 265–277. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.09.002>.
- 272.
273. Sammataro, D. (2012). Global status of honey bee mites. Chapter 5. *In* Honey Bee Colony Health: Challenges and Sustainable Solutions. ISBN-13: 978-1-4398-7941-2.
274. Sanchez-Bayo, F., & Goka, K. (2014). Pesticide residues and bees - A risk assessment. *PLoS ONE*, 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094482>.
275. Saroj, A., Oriyomi, O. V., Nayak, A. K., & Haider, S. Z. (2020). Phytochemicals of plant-derived essential oils: A novel green approach against pests. *In* Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819304-4.00006-3>.

276. Schittny, D., Yañez, O., & Neumann, P. (2020). Honey bee virus transmission via hive products. *Veterinary Sciences*, 7(3), 9–11. <https://doi.org/10.3390/VETSCI7030096>.
277. Seeley, T. D. (1995). The wisdom of the hive. The Social Physiology of Honey Bee Colonies. ISBN 0-674-95376-2.
278. Serra Bonvehí, J., Ventura Coll, F., & Ruiz Martínez, J. A. (2016). Residues of essential oils in honey after treatments to control *Varroa destructor*. *Journal of Essential Oil Research*, 28(1), 22–28. <https://doi.org/10.1080/10412905.2015.1076741>.
279. Severino, P., Acioli, F. R. D., Cardoso Cordeiro, J., do Céu Teixeira, M., Santini, A., Kovačević, A. B. and Souto, E. B. (2018). Essential oils with antimicrobial properties formulated in lipid nanoparticles: Review of the state of the art. In Section I: Essential oils for Treatment of different microbial diseases. In *Essential Oils and Nanotechnology for Treatment of Microbial Diseases*. Taylor & Francis Group, LLC. ISBN: 13: 978-1-1386-3072-7.
280. Singh, D. (2014). Management of mite pests in honeybee colonies through botanicals. *Advances in Plant Biopesticides*. 271–277. Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_13).
281. Siviter, H., Koricheva, J., Brown, M. J. F., & Leadbeater, E. (2018). Quantifying the impact of pesticides on learning and memory in bees. *Journal of Applied Ecology*, 55(6), 2812–2821. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13193>.
282. Slowinska, M., Nynca, J., Bak, B., Wilde, J., Siuda, M., Cieresko, A. (2019). 2D-DIGE proteomic analysis reveals changes in haemolymph proteome of 1-day-old honey bee (*Apis mellifera*) workers in response to infection with *Varroa destructor* mites. *Apidologie*. 50 : 632–656. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00674-z>.
283. Souiy, Z. (2023). Essential oil extraction process. In *Essential Oils - Recent Advances, New Perspectives and Applications*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.113311>.
284. Souto A. L., Sylvestre, M., Tölke, E. D., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M. and Cebrián-Torrejón, G. (2021). Plant-derived pesticides as an alternative to pest management and sustainable agricultural production: Prospects, applications and challenges. *Molecules*, 26(1), 4835. <http://doi.org/10.1080/23312025.2017.1404274>.
285. Stanley, D. A., Msweli, S. and Johnson, S. D. (2020). Native honeybees as flower visitors and pollinators in wild plant communities in a biodiversity hotspot. *Ecosphere* 11(2) : e02957. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2957>.
286. Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M. P., & vanEngelsdorp, D. (2018). Drivers of colony losses. *Curr. Opin. Insect Sci.*, 26, 142–148. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.004>.

287. Stratakos, A. C., & Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. *In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Elsevier Inc. Chapitre 4. P 31 – 38. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00004-3>.
288. Szczurek, A., Maciejewska, M., Zajiczek, Ż., Bąk, B., Wilk, J., Wilde, J., & Siuda, M. (2020). The effectiveness of *Varroa destructor* infestation classification using an e-nose depending on the time of day. *Sensors (Switzerland)*, 20(9). <https://doi.org/10.3390/s20092532>.
289. Tampe, J., Parra, L., Huaiquil, K., & Quiroz, A. (2016). Potential repellent activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* (Linnaeus) from Chile against *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 16 (1).
290. Tauber, J. P., Collins, W. R., Schwarz, R. S., Chen, Y., Grubbs, K., Huang, Q., Lopez, D., Peterson, R., & Evans, J. D. (2019). Natural product medicines for honey bees: Perspective and protocols. *Insects*, 10 (10). <https://doi.org/10.3390/insects10100356>.
291. Thorsell, W., Mikiver, A., & Tunón, H. (2006). Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. *Phytomedicine*. 13 (1–2), 132–134. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.008>.
292. Tihelka, E. (2018). Effects of synthetic and organic acaricides on honey bee health: A review. *Slovenian Veterinary Research*, 55(3), 114–140. <https://doi.org/10.26873/SVR-422-2017>.
293. Toomemaa, K. (2018). The synergistic effect of weak oxalic acid and thymol aqueous solutions on *Varroa* mites and honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 58(1), 37–52. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1486695>.
294. Topal, E., Cornea-Cipcigan, M., Tunca, R. Í., Kosoglu, M., & Margaoan, R. (2020). The use of medicinal aromatic plants against bee diseases and pests. *Bee Studies*. 12(1), 5-11.
295. Touil, S. (2012). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Artemisia herba alba* Asso et *Artemisia campestris* de la région aride de Djelfa. Mémoire de magistère. Université Saad Dahleb de Blida.
296. Traynor, K. S., Mondet, F., de Miranda, J. R., Techer, M., Kowallik, V., Oddie, M. A. Y., Chantawannakul, P., & McAfee, A. (2020). *Varroa destructor*: A complex parasite, crippling honey bees worldwide. *Trends in Parasitology*, 36(7), 592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>.
297. Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of essential oils: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>.
298. Tutun, H., Koç, N., & Kart, A. (2018). Plant Essential Oils Used Against Some Bee Diseases. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*. 6(1), 34–45. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v6i1.34-45.1502>.

299. Van Der Zee, R., Brodschneider, R., Brusbardis, V., Charrière, J. D., Chlebo, R., Coffey, M. F., Dahle, B., Drazic, M. M., Kauko, L., Kretavicius, J., Kristiansen, P., Mutinelli, F., Otten, C., Peterson, M., Raudmets, A., Santrac, V., Seppälä, A., Soroker, V., Topolska, G., ... Gray, A. (2014). Results of international standardised beekeeper surveys of colony losses for winter 2012-2013: Analysis of winter loss rates and mixed effects modelling of risk factors for winter loss. *Journal of Apicultural Research*, 53(1), 19–34. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.1.02>.
300. Vercelli, M., Croce, L., & Mancuso, T. (2023). Biotechnical control of *Varroa* in honey bee colonies: A trade-off between sustainable beekeeping and profitability? *Insects*, 14(10). <https://doi.org/10.3390/insects14100830>.
301. Vilarem, C., Piou, V., Vogelweith, F., & Vétillard, A. (2021). *Varroa* destructor from the laboratory to the field: Control, biocontrol and ipm perspectives—a review. *Insects* 12 (9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/insects12090800>.
302. Wang, S., Li, S. C., Cheng, F. S., Ren, T., Fan-Li, Mei, D. H., Gao, K., Song, Q. Y. (2022) Antifungal, Repellency, and Insecticidal Activities of *Cymbopogon distans* and *Ruta graveolens* Essential Oils and Their Main Chemical Constituents. *Chem. Biodivers.* 19 (10): e202200351. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200351>.
303. Wiese, N., Fischer, J., Heidler, J., Lewkowski, O., Degenhardt, J., & Erler, S. (2018). The terpenes of leaves, pollen, and nectar of thyme (*Thymus vulgaris*) inhibit growth of bee disease-associated microbes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32849-6>.
304. Williams, G. R., Alaux, C., Costa, C., Csáki, T., Doublet, V., Eisenhardt, D., Fries, I., Kuhn, R., McMahon, D. P., Medrzycki, P., Murray, T. E., Natsopoulou, M. E., Neumann, P., Oliver, R., Paxton, R. J., Pernal, S. F., Shutler, D., Tanner, G., Van Der Steen, J. J. M., & Brodschneider, R. (2013). Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 52, Issue 1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.04>
305. Winston, M. L. (1987). The biology of the honey bee. Harvard University Press; Cambridge, USA. 281 pp.
306. Wu, J. Y., Smart, M. D., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2012). Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *Journal of Invertebrate Pathology*, 109(3), 326–329. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.005>.
307. Younsi, F., Mehdi, S., Aissi, O., Rahali, N., Jaouadi, R., Boussaid, M., & Messaoud, C. (2017). Essential Oil Variability in Natural Populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (Asso) and Incidence on Antiacetylcholinesterase and Antioxidant Activities. *Chemistry and Biodiversity*, 14(7). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700017>.

308. Yu, F., Wan, N., Zheng, Q., Li, Y., Yang, M., & Wu, Z. (2021). Effects of ultrasound and microwave pretreatments on hydrodistillation extraction of essential oils from Kumquat peel. *Food Science and Nutrition*, 9(5), 2372–2380. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2073>.
309. Zahnit, W., Smara, O., Bechki, L., Bensouici, C., Messaoudi, M., Benchikha, N., Larkem, I., Awuchi, C. G., Sawicka, B., & Simal-Gandara, J. (2022). Phytochemical profiling, mineral elements, and biological activities of *Artemisia campestris* L. grown in Algeria. *Horticulturae*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8100914>.
310. Zeraib, A., Boudjedjou, L., Suici, N., Benmeddour, T., Rahal, K., & Fercha, A. (2021). Synergistic effects of *Ruta montana* (Clus.) l. essential oil and antibiotics against some pathogenic bacteria. *Journal of Phytology*, 13, 101–107. <https://doi.org/10.25081/jp.2021.v13.7088>.
311. Zeragui, B., Hachem, K., Halla, N., & Kahloula, K. (2019). Essential oil from *Artemisia judaica* L. (ssp. sahariensis) flowers as a natural cosmetic preservative: Chemical composition, and antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(3), 685–694. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1649200>.
312. Zhao, Q., Zhu, L., Wang, S., Gao, Y., & Jin, F. (2023). Molecular mechanism of the anti-inflammatory effects of plant essential oils: A systematic review. *Journal of Ethnopharmacology*, 301, 115829. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115829>.
313. Zhang, H., Yan, H., Li, Q., Lin, H., & Wen, X. (2021). Identification of VOCs in essential oils extracted using ultrasound- and microwave-assisted methods from sweet cherry flower. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80891-0>.
- Zouari, N. (2013). Essential Oils Chemotypes: A Less Known Side. *Medicinal & Aromatic Plants*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000e145>.

*Annexes*

# Les chromatogrammes des HEs analysés par CG-SM

## Annexe 1

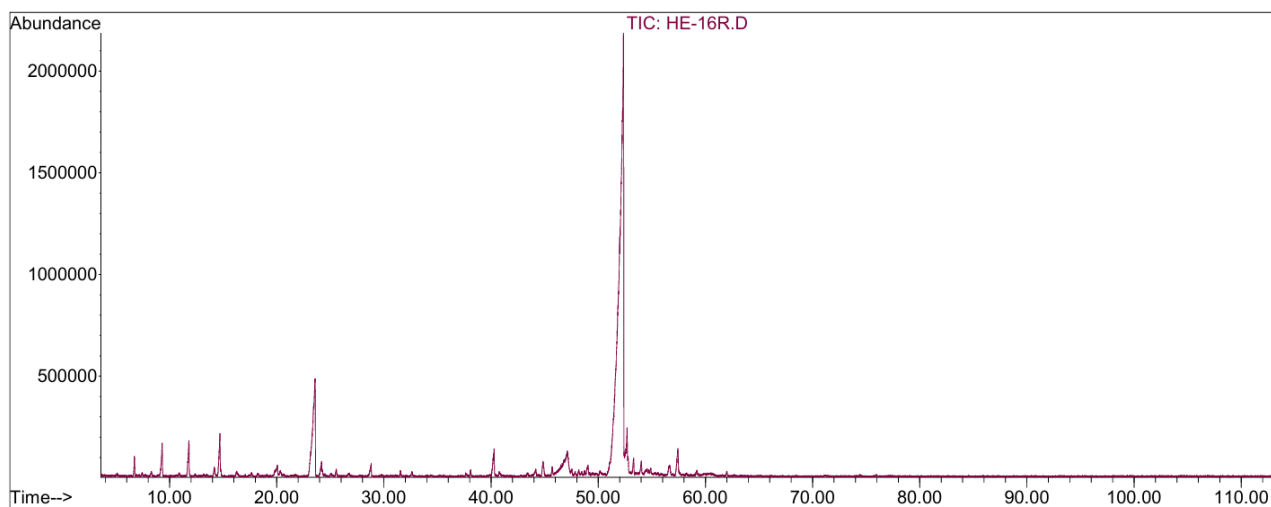


Figure 1 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia herba alba* extraite par HD

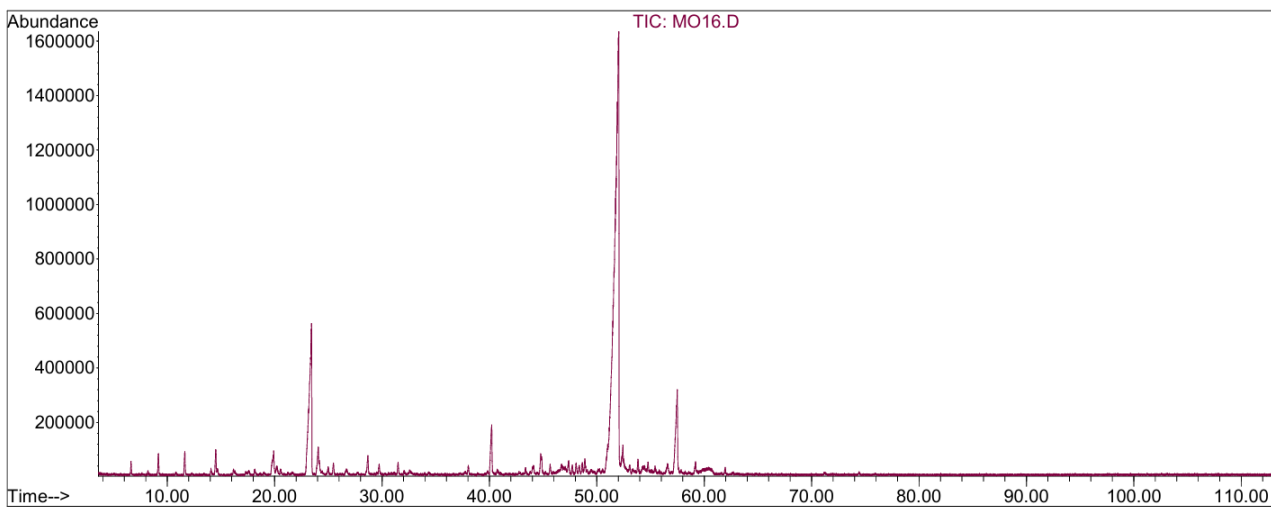


Figure 2 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia herba alba* extraite par HDMO

## Annexe 2

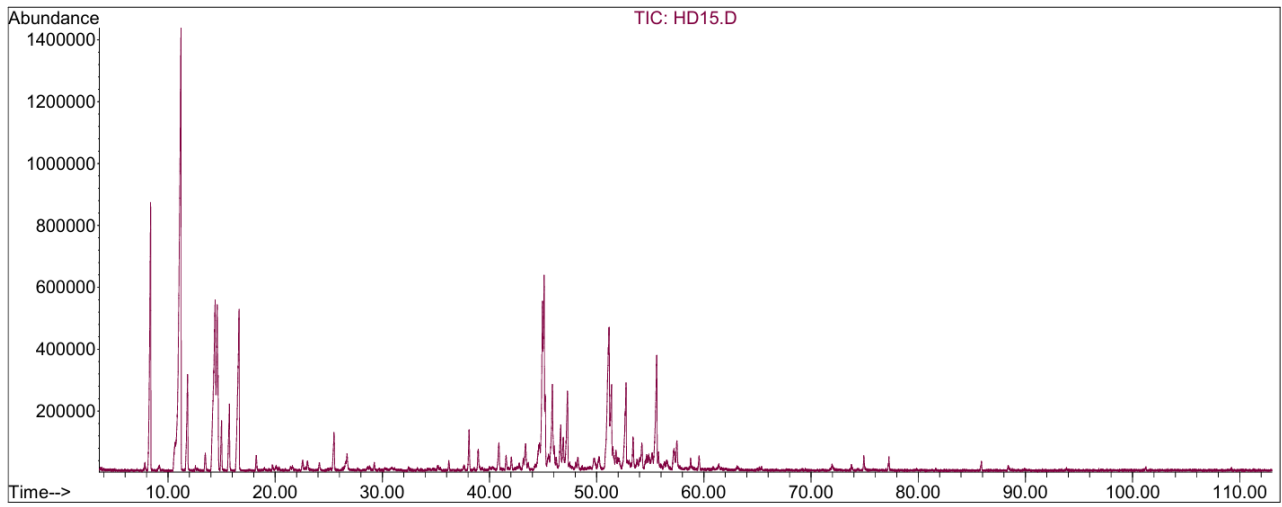


Figure 1 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia campestris* extraite par HD

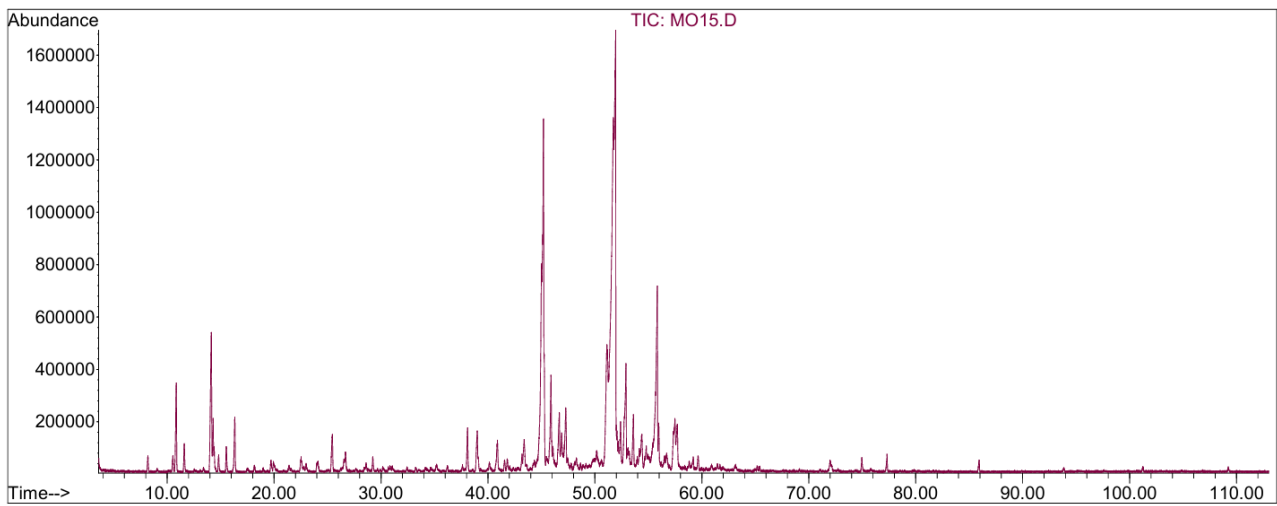
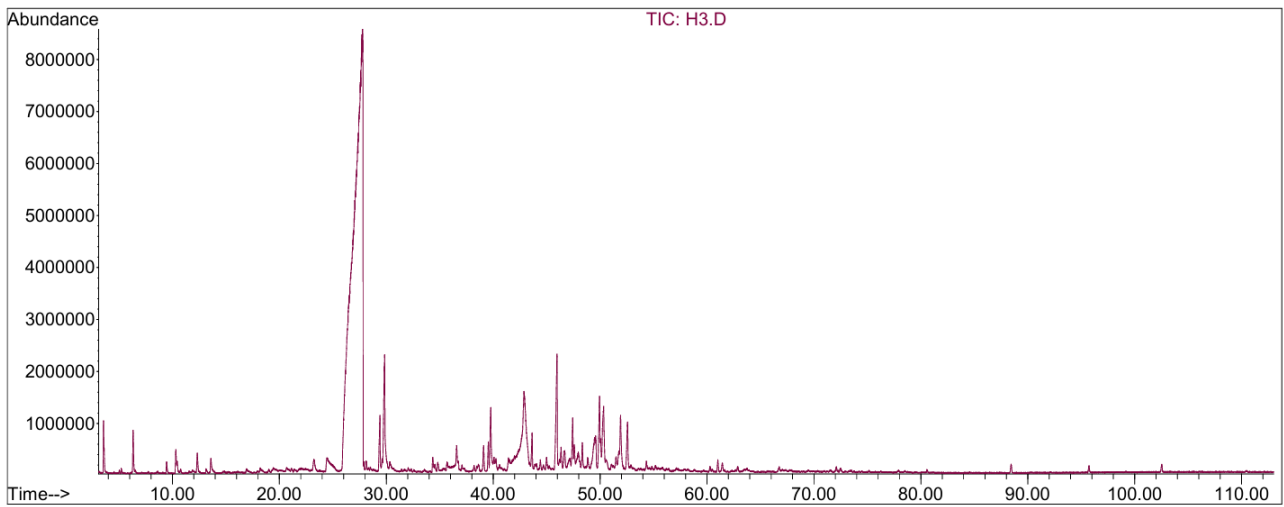
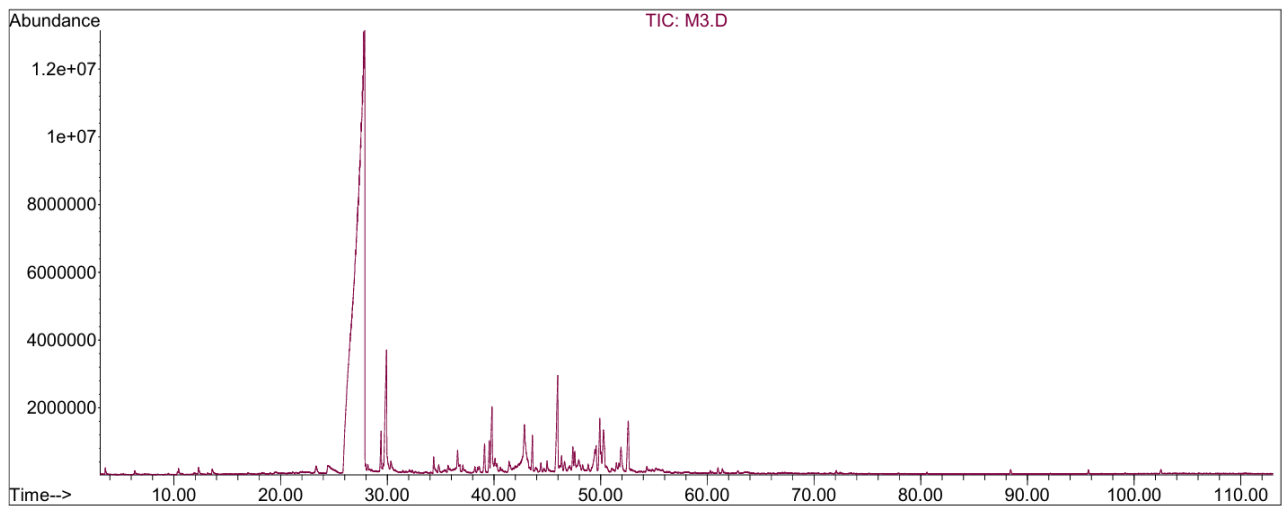


Figure 2 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia campestris* extraite par HDMO

### Annexe 3

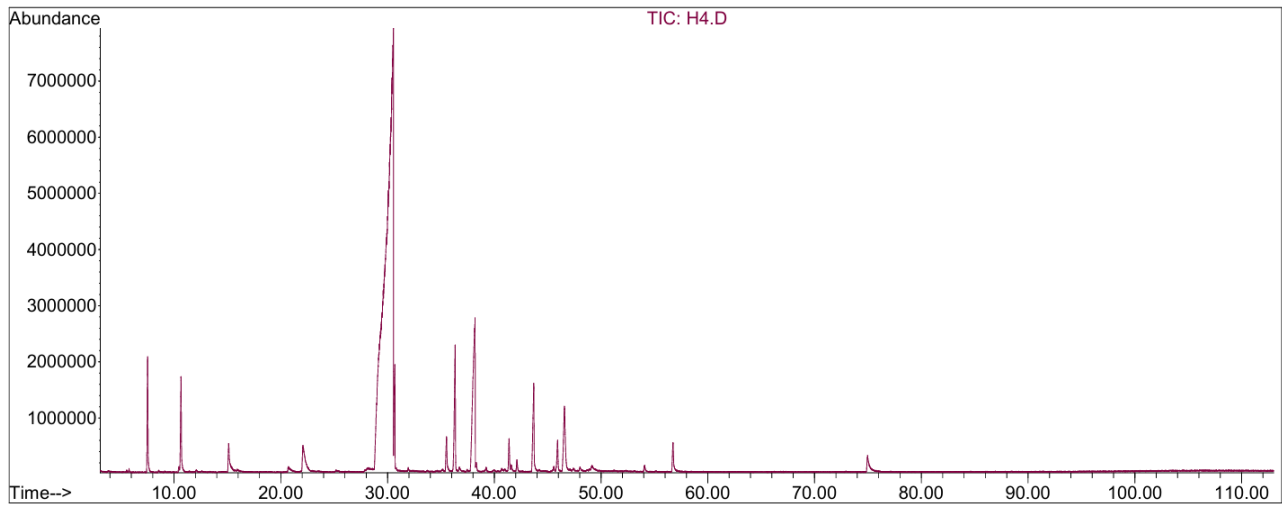


**Figure 1 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia judaica* extraite par HD**

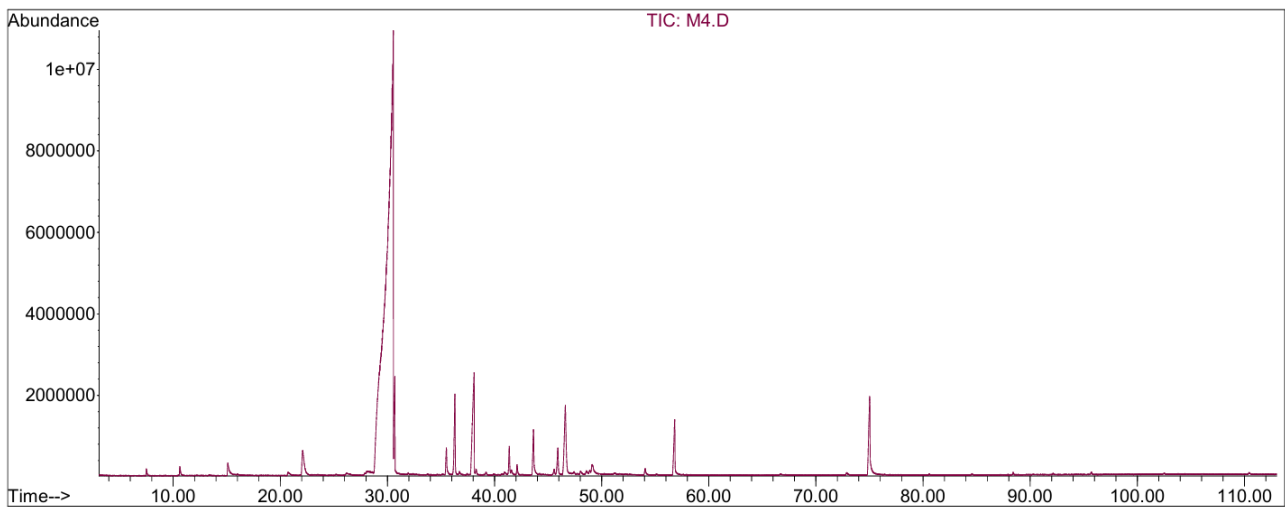


**Figure 2 : Chromatogramme de l'HE de *Artemisia judaica* extraite par HDMO**

## Annexe 4



**Figure 1 : Chromatogramme de l'HE de *Ruta montana* extraite par HD**



**Figure 2 : Chromatogramme de l'HE de *Ruta montana* extraite par HDMO**



## Promising Algerian essential oils as natural acaricides against the honey bee mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)

Souad Hazam<sup>1,2</sup> · Salem Touati<sup>3</sup> · Lounis Touati<sup>2</sup> · Liza Saher<sup>2</sup> · Hassiba Khedidji<sup>1</sup> · Sabrina Ait Kaki<sup>1</sup> · Smain Chemat<sup>2</sup>

Received: 3 June 2023 / Accepted: 9 November 2023  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2023

### Abstract

Varroosis induced by *Varroa destructor* Anderson and Trueman represents the most pathogenic and destructive disease affecting the western honey bee, *Apis mellifera*. In this study, we investigated the acaricidal activity against the *Varroa* mite using essential oils (EOs) from the aerial parts of four autochthonous Algerian herbal species, namely *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica* and *Ruta montana*. EOs were obtained by means of hydrodistillation and their composition was characterized by gas chromatography–mass spectrometry. The toxicity of the selected EOs toward *V. destructor* and *A. mellifera* adult honey bees was evaluated using the complete exposure method. The results indicate the predominance of davanone (66.9%) in *A. herba alba*,  $\beta$ -pinene (19.5%) in *A. campestris*, piperitone (68.7%) in *A. judaica* and 2-undecanone (70.1%) in *R. montana* EOs. Interestingly, the LC<sub>50</sub> values coupled to bee mortality rates revealed that all tested oils exhibited significant acaricidal efficiency with selectivity ratio (SR) values of 10.77, 8.78, 5.62 and 3.73 for *A. campestris*, *A. judaica*, *A. herba alba*, and *R. montana*, respectively. These values were better than that of thymol (SR=3.65), the positive control. These findings suggest that these EOs could be used as plant-derived veterinary acaricides to control varroosis in field conditions.

**Keywords** Acaricidal activity · *Apis mellifera* · *Varroa destructor* · Essential oils · Complete exposure method

✉ Souad Hazam  
s.hazam@univ-boumerdes.dz

<sup>1</sup> Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCOR), Faculty of Sciences, University of M'hamed Bougara, Boumerdes, Algeria

<sup>2</sup> Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC), Zone Industrielle de Bousmail, PB 384, Tipaza 42004, Algeria

<sup>3</sup> Multipurpose Agricultural Cooperative of Tizi-Ouzou (CAPTO), Tizi-Ouzou, Algeria

## Introduction

The western honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), is the most important pollinator of a wide variety of agricultural crops and the main source of bee products such as honey, propolis, pollen and royal jelly (Abd El-Wahab et al. 2021; Flores et al. 2021). In recent decades, dramatic honey bee colony losses are recorded to be linked mainly to several biotic and abiotic stressors like habitat loss, pesticides exposure, poor nutrition, bee-keeping practices, climatic changes and invasive pathogens (Glenny et al. 2017; Almecija et al. 2020). Amongst its parasites, the cosmopolitan ectoparasitic mesostigmatid mite *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Acari: Varroidae) is marked as the major pathological threat (Giacobino et al. 2014; Erban et al. 2015; Alburaki et al. 2018). This mite affects directly both adult bees and brood by feeding on their hemolymph and fat body tissue (Ramsey et al. 2019; Slowinska et al. 2019; Traynor et al. 2020; Piou et al. 2023) and acts as a viral vector, which leads to the colony's collapse within 2–3 years (Mondet et al. 2020). Besides, on an individual scale, varroosis induces very harmful effects getting to malformation, dehydration of the body and weight drop, lifespan decrease, olfactory sensation problem, immunosuppression as well as alteration of flying and foraging ability (Noël et al. 2020; Sabahi et al. 2020; Khan and Ghramh 2021).

As a consequence of these dramatic effects and losses, various synthetic acaricides have been largely used to fight *Varroa* mite such as pyrethroids (tau-fluvalinate and flumethrin), organophosphate (coumaphos), and formamidine (amitraz) (Li et al. 2017; Riva et al. 2019). Nevertheless, it should be mentioned that their high efficacy is faded by *V. destructor* resistance development, the contamination of beehive products by chemical residues of these acaricides, as well as detrimental effects on honey bee health and the environment (Riva et al. 2019; Noël et al. 2020). Recently, natural compounds, especially organic acids, herbal essential oils (EOs) and derivatives have attracted a lot of attention as potentially safe, eco-friendly and efficient alternatives to conventional acaricides (Vilarem et al. 2021). Indeed, EOs are believed to have a broad-spectrum efficacy with ovicidal, larvicidal, adulticidal and ectoparasite-repellent effects (Abbas et al. 2018). The application of EOs is reported to trigger disorders in insect and mite activities, which include antifeedant activity, growth and reproduction deficiency, breakage of cuticle as well as exuviation and respiration repression (Ben Chaaban et al. 2019). Ramzi et al. (2017) found that certain EOs tend to enhance the honey bee grooming behavior. Notably, thymol is a good example of a bioacaricide that is used by beekeepers to treat honeybee colonies infested by *V. destructor* known for its mite antifeedant and repression of reproduction and growth activities (Lindberg et al. 2000; Singh 2014).

As a source of herbal EOs, several plants have been used to extract efficient and active organic compounds worldwide and in Algeria as well. Among these Algerian plants, we can distinguish the genera *Artemisia* (Asteraceae) and *Ruta* (Rutaceae). *Artemisia* is reportedly comprising > 500 diverse species, most of which have been recognized as an important source of EOs (Hu et al. 2019). Overall, *Artemisia* species are characterized by multiple biological properties including antibacterial, antifungal, antiviral (Abad et al. 2012), anti-protozoal, anthelmintic, anti-inflammatory, cytotoxic, antitumor, insecticidal and repellent activities (Ivănescu et al. 2021). Godara et al. (2013, 2015) reported that extracts from *Artemisia absinthium* exhibit acaricidal activity against the ticks *Rhipicephalus sanguineus* and *Hyalomma anatolicum*. Furthermore, a high mortality rate was recorded by the use of

*Artemisia sieberi* extract to control *V. destructor* (Ashrafi Parchin et al. 2012). Field trials of extracts from *Artemisia annua* and *A. absinthium* against *V. destructor* revealed a potent miticidal effect (Rasool et al. 2017; Allabergenova et al. 2021). EOs extracted from *A. annua* and *Artemisia verlotiorum* revealed a significant repellent activity against *Varroa* under laboratory conditions (Conti et al. 2020).

The genus *Ruta* comprises 40 species, highly rich in EOs that contain mainly aliphatic ketones, e.g., 2-undecanone and 2-nonanone (Nahar et al. 2021). *Ruta* spp. have been widely identified as antiparasitic, stomachic, digestive, vermifuge and molluscicidal (Ferhat et al. 2014), antiseptic, antispasmodic, anthelmintic (Haddouchi et al. 2013), insecticidal and larvicidal agents (Boutoumi et al. 2009; Majdoub et al. 2014). Castagnino Laércio and Orsi (2012) demonstrated that *Ruta graveolens* volatile oil is effective to reduce the honey bee colonies infestation by *V. destructor* and decrease the mortality rate of parasitized honey bees.

In this study, we assessed the in vitro acute toxicity of EOs obtained from four Algerian plants – i.e., *Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia campestris* L., *Artemisia judaica* L. and *Ruta montana* L. – against *V. destructor*. In addition, the determination of the phytochemical profile of each EO using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) will help to identify their major compounds that might contribute to the pronounced acaricidal effect. To the best of our knowledge, this is the first work on the acaricidal activity of EOs from *A. campestris*, *A. judaica* and *R. montana* in the *Varroa* mite control, whereas EO isolated from *A. herba alba* from a different region has recently been tested in vitro by Alahyane et al. (2022).

## Materials and methods

### Plant material

Aerial parts including leaves, flowers and stems of *A. herba alba*, *A. campestris*, *A. judaica* and *R. montana* were harvested in Algeria during the flowering period (Table 1). The taxonomic identification was confirmed by Prof. Benhouhou Salima, Department of Botany, Higher National Agronomic School of Algiers (Algeria) according to the Quezel and Santa (1969) nomenclature and validated by the synonymic index of the North Africa plants. The aerial parts were dried in the dark at room temperature.

A sample of 500 g dried plant material was ground just before extraction with an electrical grinder (Moulinex AR110830) then submitted for hydrodistillation using a Clevenger-modified system for 3–4 h until total recovery of the oil. The latter was then dried over anhydrous sodium sulphate before being stored in a sealed dark glass vial and maintained at 4 °C until GC analysis and acaricidal assays. The extraction yield was expressed as a percent of the ratio between EO mass (g) per dried plant material mass (g). Experiments were performed in triplicate and the yield mean value was reported.

### Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis

Identification of EO composition has been performed using a GC-MS system (Agilent HP 6890 Plus gas chromatograph coupled with a Agilent HP 5973 mass spectrometer). The col-

**Table 1** Description of plants used in this study

Family	Plant species	Local name	Harvesting place and time	Latitude/longitude	Bioactivities	References
Asteraceae	<i>Artemisia herba alba</i>	Chih, Chiha	Taadmit, Djelfa – Oct 2021	34°16'60.00"N / 2°58'60.00"E	Antioxidant, disinfectant, antibacterial, antileishmanial, anthelmintic, nematocidal, and antispasmodic properties	Abdelali et al. 2023
	<i>A. campestris</i>	Dgouft	Ain Roumia, Djelfa – Oct 2021	34°21'2.28"N / 3°13'43.33"E	Antioxidant, insecticidal, antitumor and antifungal activities	Rocha et al. 2021
	<i>A. judaica</i>	Chih, Chouhiya	Taman-rasset – Apr 2021	22°47'6"N / 5°31'22.001"E	Anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, anti-helicobacter, anthelmintic, antipyretic, and analgesic properties	Amin et al. 2019
Rutaceae	<i>Ruta montana</i>	Fidjel el-djbel	Ferdji-oua, Mila – May 2021	36°24'40.00"N / 5°56'15.07"E	Antioxidant, antimicrobial, pesticidal, larvicidal, insecticidal and insect-repellent properties	Nahar et al. 2021

umn used was a capillary HP-5MS (5% phenyl 95% dimethylpolysiloxane) column (30 m length, 0.25 mm internal diameter and 0.25 µm film thickness; Agilent Technologies, USA). A sample of 0.2 µl was injected in split mode (ratio 1/80) at which the GC injector temperature was set at 250 °C. Helium (He) was used as a carrier gas at 0.5 mL/min and the oven temperature program started at 60 °C, where it was held isothermally for 8 min before being increased to 250 °C (at 2 °C/min) and held isothermally for 10 min. The ionization energy was set at 70 eV and a solvent delay of 3.5 min. The identification was achieved by matching the recorded mass spectra with those stored in Wiley and NIST library data and by comparing each compound's retention index relative to n-alkanes (C<sub>8</sub>–C<sub>29</sub>) with those in the literature (Adams 2017).

## Mites and bees

*Apis mellifera intermissa* (belonging to the African Lineage A) workers and pupae, and adult females of *V. destructor* mites collected during the spring and summer of 2022, when mites were abundant, from hives placed in an apiary and kindly donated by the Multi-purpose Agricultural Cooperative of Tizi-Ouzou (CAPTO) situated in the region of Tizi-Rached, province of Tizi-Ouzou in Algeria (36°40'42.5316"N, 4°12'28.9512"E). The same management practices were applied to all experimental bee colonies that were kept untreated against *V. destructor* for at least 6 months. Sealed brood worker or drone combs were removed from colonies at the apiary then moved to the laboratory. *Varroa destructor* adult females were collected in their reproductive stage instead of their dispersal stage in

order to avoid mites' variability in physiology and fitness. Brood cells were individually uncapped using fine forceps and inspected for adult mite's presence. Mites were picked up from larvae and non-pigmented pupae using a fine paintbrush as described previously by Dietemann et al. (2013). Collected mites were kept in Petri dishes with some bee pupae (white to pink eyes) as food substrate, to prevent mite's desiccation, and used immediately for bioassays. Mites that appeared to be newly molted, weak or abnormal were purposely discarded from selection. This protocol has been precisely chosen because it allows the collection of less traumatized mites than those obtained with other methods (Dietemann et al. 2013). Newly emerged worker honey bees were selected from healthy bee colonies (the younger population is less exposed to hive and environmental conditions than the older one). Frames of sealed worker brood showing signs of emerging bees within 1–2 days were transported into ventilated boxes to the laboratory incubator (34 °C and 60 ± 10% RH). Once young bees have emerged, they were gently inspected with plastic tweezers to confirm the absence of mites before being distributed into plastic rearing cup cages supplied with a 50% (w/v) sucrose feeding solution.

### **Acaricidal activity on *Varroa destructor***

Essential oil bioassays against *V. destructor* were conducted according to a modified protocol previously described by Ruffinengo et al. (2005). Briefly, six EO concentrations ranging from 0.25 to 20 µL/mL were prepared in ethanol 96%, then 1 mL of each solution was uniformly spread using a micropipette onto a filter paper that covered the full bottom surface of a Petri dish (6 cm diameter, 2 cm high). After solvent evaporation, 10 mites and five bee pupae (white to pink eyes) were placed in each Petri dish on the surface of the filter paper favoring direct contact with the solution. The dishes were sealed with parafilm and covered with a lid to prevent mite escape. The experiment was carried out at room temperature. Three replicates were realized for each treatment and dose, and the mortality percentage was expressed as a mean value. Ethanol 96% was used as the negative control and thymol as the positive control using six concentrations ranging from 0.21 to 2.06 µL/mL. All treated mites were incubated at 30 ± 1 °C and 60 ± 10% RH for 72 h. Mortality of mites was checked at 24, 48 and 72 h following the initial exposure. Mites that did not move when probed with a fine paintbrush were considered dead.

### **Toxicity of essential oils on *Apis mellifera* adults**

The EOs toxicity to worker bees was tested using Chaimanee et al. (2021) protocol that was partly modified. Six EO concentrations ranging from 2.5 to 40 µL/mL were prepared. Then, 1 mL solution was pipetted onto filter paper covering the bottom of the plastic cup cages described by Evans et al. (2009). Ten newly emerged adult bees were placed into each cage after solvent evaporation. A 5-mL syringe filled with 50% (w/v) sucrose solution was supplied *ad libitum* on the top of the cage whereas a small amount of beebread (a mixture of polyfloral bee pollen in 50% sucrose solution) was supplied as a dietary supplement at the bottom of the cage as described by Huang et al. (2014). Ethanol and thymol with six concentrations ranging from 1.03 to 3.09 µL/mL were included as negative and positive control, respectively. Three replicates were conducted for each treatment for a total of 30 bees. The cages were placed under the same environmental conditions as those used for the acaricidal

activity against *V. destructor*. Mortality was checked by visual inspection at 24, 48 and 72 h following initial exposure. Mortality data, at the various dosages, is used as a measure of the respective medium lethal concentrations ( $LC_{50}$ , i.e., the lethal dose that causes the death of half a population) whereas selectivity ratio (SR) is used to compare efficacy among tested EOs. SR is expressed as a ratio between mite and bee toxicity:

$$SR = LC_{50 \text{ A. mellifera}} / LC_{50 \text{ V. destructor}}$$

### Statistical analysis

Bee and mite mortality rates were corrected for mortality against the control using Abbott's (1925) formula:  $P_c = 100 \times (P_o - P_i) / (100 - P_i)$ , where  $P_c$  is the corrected mortality (%),  $P_i$  is the mortality observed in the control, and  $P_o$  is the mortality observed in the test. Differences between groups were analyzed by two-way ANOVA and Tukey's honestly significant difference (HSD) test for the four concentrations in common (1–10  $\mu\text{L/mL}$ ) for *V. destructor* mortality. The average corrected mortality data were subjected to a probit analysis for calculating the  $LC_{50}$  at 95% confidence intervals (CI); normal distribution of the data of the six concentrations tested was verified using the Shapiro-Wilk test. Statistical analysis was conducted using IBM-SPSS v.28.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

In order to establish a dose-response relationship and to estimate the highest concentration of EOs at which it did not induce bee mortality significantly higher than that observed in controls (NOAEL, no observed adverse effect level; Medrzycki et al. 2013), a two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test were applied. Then, it was plotted in Graph Pad Prism v.6.01 for Windows.

For all tests the significance threshold ( $\alpha$ ) was 0.05. NOAEL was used as part of the most important steps in risk assessment methodologies.

## Results

### Chemical composition of essential oils

Essential oil yield was highly variable. The highest yield was recorded in *A. herba alba* (mean  $\pm$  SD =  $2.20 \pm 0.09\%$ ), followed by *A. judaica* ( $0.84 \pm 0.02\%$ ), *R. montana* ( $0.67 \pm 0.06\%$ ) and *A. campestris* ( $0.59 \pm 0.04\%$ ) on a dry-weight basis. Volatile compound identification revealed 29 compounds representing 99.9% of the total *A. campestris* EO (Table 2). Monoterpene hydrocarbons represented the major fraction including  $\beta$ -pinene (19.5%), *p*-cimene (8.1%),  $\alpha$ -pinene (7.1%) and  $\delta$ -terpinene (6.0%) as the major compounds. In parallel, we noted that ketones were the predominant fraction in EOs from *A. herba alba*, *A. judaica* and *R. montana* of which davanone (66.9%), piperitone (68.7%) and 2-undecanone (70.1%) were the chief constituents (Table 2).

**Table 2** Chemical composition of the essential oils of *Artemisia campestris*, *A. herba alba*, *A. judaica*, and *Ruta montana*

Components	RI <sup>a</sup>	% Relative area <sup>b</sup>			
		<i>A. campestris</i>	<i>A. herba alba</i>	<i>A. judaica</i>	<i>R. montana</i>
Santolina triene	906	-	0.53	-	-
$\alpha$ -pinene	932	7.11	-	0.61	-
Camphene	946	-	1.35	-	-
Sabinene	969	1.03	-	-	1.94
$\beta$ -pinene	974	19.51	1.44	-	-
$\alpha$ -phellandrene	1002	2.43	-	0.18	-
$\alpha$ -terpinene	1014	-	-	0.32	-
p-Cymene	1020	8.11	-	0.39	-
D-limonene	1024	4.91	-	-	1.95
$\beta$ -phellandrene	1025	1.00	0.51	-	-
1,8-Cineole	1026	-	1.84	-	-
$\beta$ -ocimene (Z)	1032	1.18	-	-	-
$\beta$ -ocimene (E)	1044	1.79	-	-	-
$\gamma$ -terpinene	1054	5.98	-	-	-
Cis-Linalool oxide	1067	-	-	0.33	-
2-Nonanone	1087	-	-	-	1.15
$\beta$ -thujone	1112	-	0.87	-	-
Menth-2-en-1-ol (cis-p)	1118	-	-	0.16	-
Chrysanthenone	1124	-	0.38	-	-
Camphor	1141	-	9.09	-	-
Borneol	1165	-	0.86	-	-
Terpinen-4-ol	1174	1.25	0.33	-	-
2-Decanone	1190	-	-	-	1.77
Trans-piperitol	1207	-	0.29	0.64	-
Cis-carveol	1226	-	0.71	-	-
Davanone nor	1228	-	-	1.43	-
Pepiritone	1249	-	-	68.71	-
Thymol	1289	-	-	3.05	-
2-Undecanone	1293	-	-	-	70.09
2-Undecanol	1301	-	-	-	2.18
$\alpha$ -copaene	1374	1.00	-	-	-
2-Dodecanone	1389	-	-	-	0.97
Jasmone-E	1390	0.78	-	-	-
$\beta$ -caryophyllene	1408	0.94	1.46	-	3.00
Davanafuran	1414	-	-	0.54	-
Z- $\beta$ -Farnesene	1440	-	-	-	7.35
Davana ether	1450	-	5.10	-	-
Cinnamic acid	1452	-	-	1.44	-
$\alpha$ -humulene	1452	-	-	-	0.18
(E)- $\beta$ -Farnesene	1454	-	-	0.54	-
Trans- $\beta$ -caryophyllene	1464	1.02	-	0.53	-
$\gamma$ -Muurolene	1478	1.56	-	-	-
$\alpha$ -curcumene	1479	1.41	-	-	-
$\gamma$ -curcumene	1481	4.69	-	-	-
Germacrene D	1484	4.90	0.92	-	-
Bicyclogermacrene	1500	3.32	-	-	-

**Table 2** (continued)

Components	RI <sup>a</sup>	% Relative area <sup>b</sup>			
		<i>A. campestris</i>	<i>A. herba alba</i>	<i>A. judaica</i>	<i>R. montana</i>
$\alpha$ -farnesene	1505	1.51	-	-	0.70
$\gamma$ -cadinene	1513	1.27	-	-	-
trans- $\gamma$ -bisabolene	1514	-	-	-	0.33
$\delta$ -cadinene	1522	2.89	-	6.33	-
Cadina-1,4-diene (trans)	1533	-	-	0.75	-
Maaliol	1566	-	-	-	0.14
Tridecanol	1570	-	-	-	0.87
Davanone	1587	2.68	66.94	0.67	-
Globulol	1590	7.49	-	2.78	-
Cinnamaldehyde (hydro)	1599	-	-	1.05	-
Tetradecanal	1611	-	-	-	0.25
Davanol D1	1615	-	3.02	-	-
Cedrol (epi)	1618	3.52	-	-	-
Davanol D2	1627	-	0.83	-	-
$\gamma$ -Eudesmol	1630	1.19	-	-	0.52
Gossonorol	1636	-	-	1.35	-
Cadinol (epi- $\alpha$ )	1638	-	-	0.60	-
Muurolol (epi- $\alpha$ )	1640	-	0.89	-	-
Methyl jasmonate Z	1648	-	-	2.12	-
$\beta$ -Eudesmol	1649	-	-	1.55	-
$\alpha$ -Cadinol	1652	4.31	-	-	-
$\alpha$ -Bisabolol	1685	-	0.78	-	-
Cedren-13-ol	1688	-	-	1.58	-
Junicedranol	1692	-	-	1.22	-
Caryophyllene acetate	1701	-	1.76	-	-
Tridecenol acetate (2E)	1703	1.10	-	-	-
Methyl tetradecanoate	1722	-	-	-	0.28
Pentadecanol	1773	-	-	-	1.02
Buccocamphor	-	-	-	1.01	-
2-Nonen-4-one	-	-	-	-	2.46
2,4-Pentanedione	-	-	-	-	2.84
Monoterpene hydrocarbons (%)		53.05	3.83	1.50	3.89
Oxygenated monoterpenes (%)		1.25	13.12	5.20	-
Sesquiterpene hydrocarbons (%)		24.51	2.38	8.17	11.56
Oxygenated sesquiterpenes (%)		16.51	10.62	9.07	1.96
Ketones (%)		3.46	68.19	70.81	79.26
Total identified compounds (%)		99.88	99.90	99.90	99.99

<sup>a</sup>Retention index relative to n-alkanes from literature (Adams 2017)<sup>b</sup>Relative area percentage (peak area relative to the total peak area)

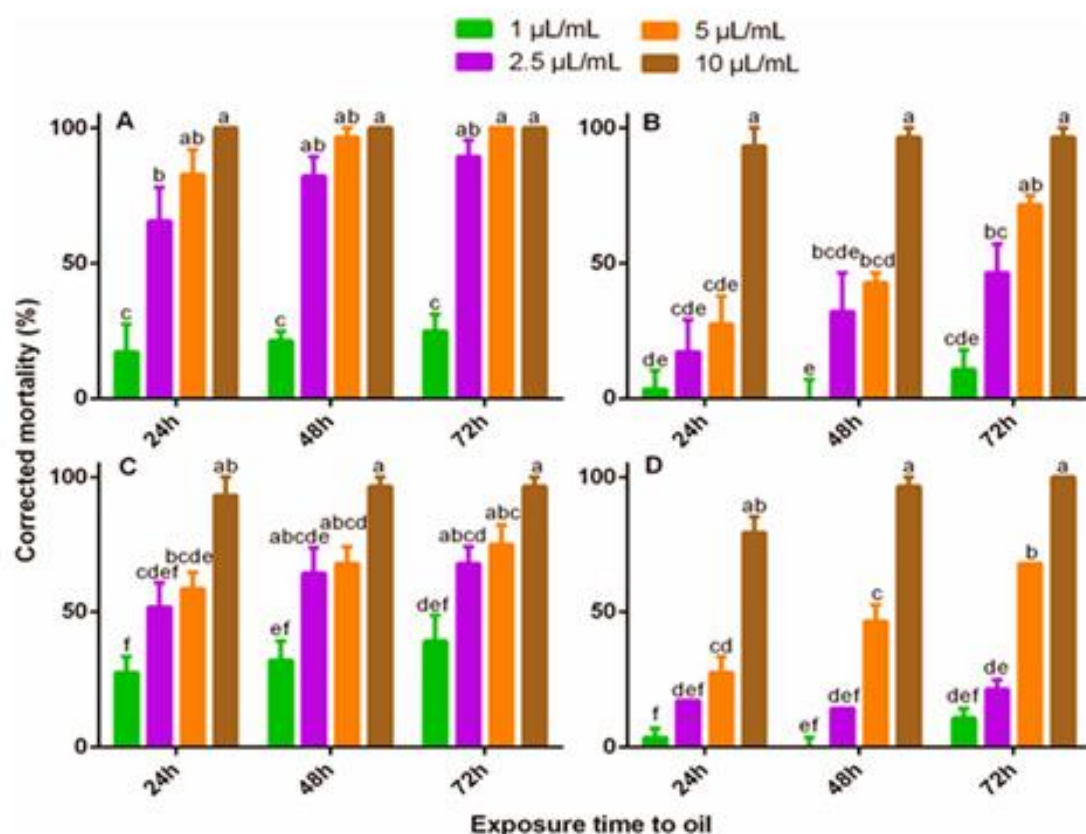
## Acaricidal activity of essential oils on *Varroa destructor*

### *Artemisia herba Alba* essential oil

Figure 1A shows *V. destructor* corrected mortality rates as a function of time at different concentrations of the tested EO. Mite mortality in the control was satisfactory in the range of 0–6.7%, less than the 10% threshold to reject the test. ANOVA indicates that EO concentration ( $F_{3,36} = 92.7$ ,  $P < 0.001$ ) and exposure time ( $F_{2,36} = 3.7$ ,  $P < 0.05$ ) have a strong effect on mite mortality, but not their interaction ( $F_{6,36} = 0.7$ ,  $P > 0.05$ ). Mortality rate after 24 h of the application of 2.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $65.51 \pm 21.53\%$ ) was higher than that obtained after 72 h of exposure for 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  ( $25 \pm 10.71\%$ ). Complete mortality (100%) was registered for high concentrations, such as 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  for 72 h and 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  irrespective of exposure time – significantly higher than in the treatments (Fig. 1A).

### *Artemisia campestris* essential oil

Mite mortality was affected by the *A. campestris* EO concentration ( $F_{3,36} = 63.6$ ,  $P < 0.001$ ) and exposure time ( $F_{2,36} = 6.5$ ,  $P < 0.05$ ), but not by their interaction ( $F_{6,36} = 1.4$ ,  $P > 0.05$ ) (Fig. 1B). For 5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , the mortality reached  $71.43 \pm 6.18\%$  after 72 h of exposure, much higher than that reached after 24 h of exposure ( $27.59 \pm 17.92\%$ ). A high mortality rate of



**Fig. 1** Mean (+SE) corrected mortality rates of *Varroa destructor* as a function of time and of the concentration of essential oils of (A) *Artemisia herba alba*, (B) *A. campestris*, (C) *A. judaica*, and (D) *Ruta montana*. Means within a panel capped with different letters are significantly different (Tukey's HSD test:  $P < 0.05$ )

96.42±06.19% was reached after 48 h of exposure to 10 µL/mL which differed significantly from that of the other treatments (Fig. 1B).

#### **Artemisia Judaica essential oil**

The developmental mortality rate of the mite is concentration dependent ( $F_{3,36} = 40.1$ ,  $P < 0.001$ ) but is not affected by exposure time ( $F_{2,36} = 2.9$ ,  $P > 0.05$ ), nor by the interaction of time and concentration ( $F_{6,36} = 0.23$ ,  $P > 0.05$ ) (Fig. 1C). High mortality rates were recorded for all the tested concentrations. For each concentration, mortality rates at 48 and 72 h were not different compared to that after 24 h post-treatment. Mortality rate for 10 µL/mL was significantly higher than that of 1 µL/mL irrespective of exposure time, ranging from 93.10±11.94 to 96.42±06.19% and from 27.59±10.34 to 39.28±16.36%, respectively (Fig. 1C).

#### **Ruta Montana essential oil**

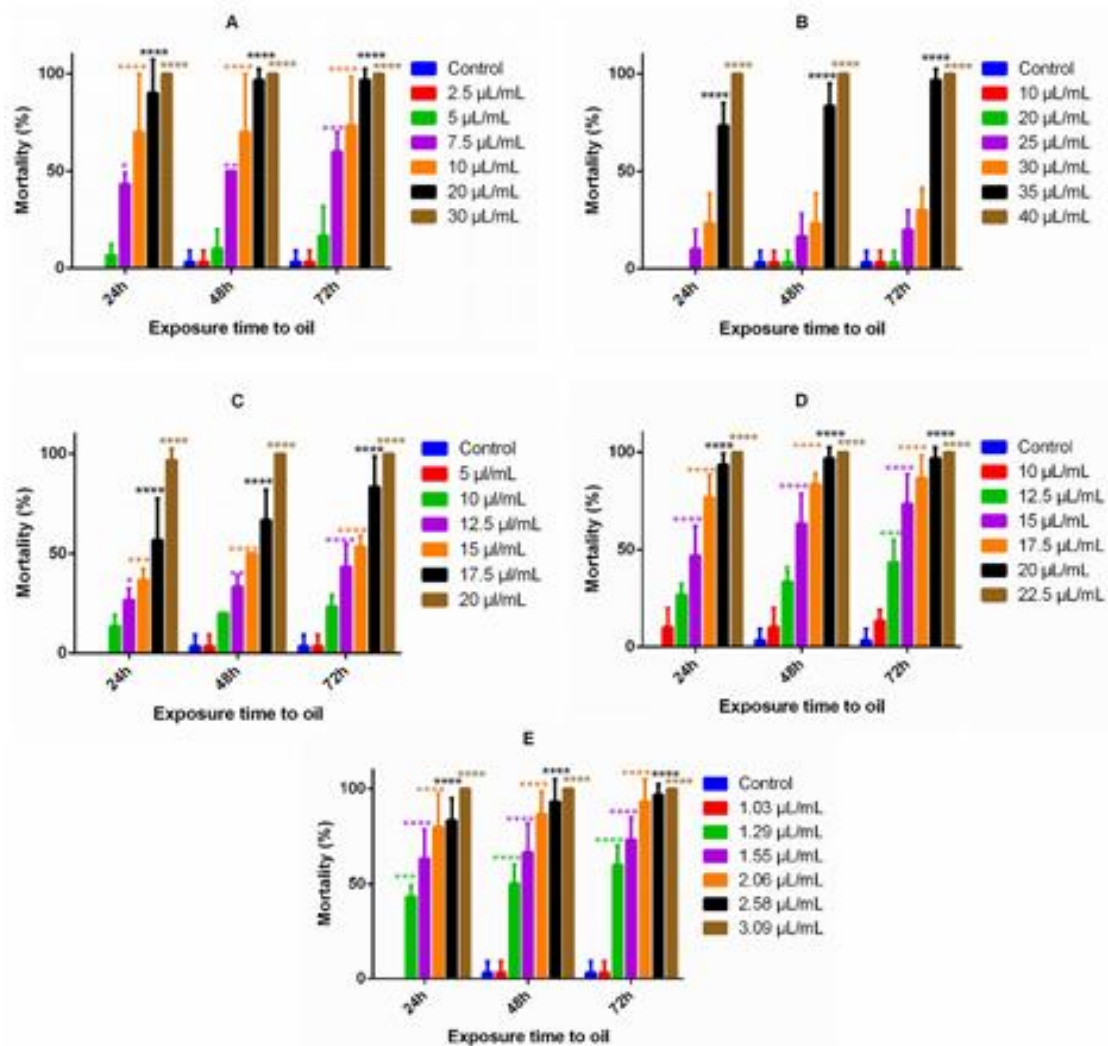
The *V. destructor* mortality rate is influenced by the concentration of *R. montana* EO ( $F_{3,36} = 312.5$ ,  $P < 0.001$ ), the exposure time ( $F_{2,36} = 23.0$ ,  $P < 0.001$ ) as well as by their interaction ( $F_{6,36} = 5.5$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 1D). The mortality recorded increased with an increase in concentration and in time of exposure. Clearly, 10 µL/mL had the highest mortality rate which differed significantly from that of the other concentrations for each exposure time (Fig. 1D).

#### **Apis mellifera adults: toxicity evaluation**

Mortality rates of adult honey bees exposed for 24, 48 and 72 h to a range of concentrations of the four essential oils were determined (Fig. 2). In addition, NOAEL, the highest concentration at which honey bee mortality is not significantly different from the control group, was determined for each EO and thymol after 72 h post treatment (Table 3). In parallel, *V. destructor* mortality rates recorded for these NOAEL values were indicated and were apparently important ranging from 96.7 to 100% (Table 3). The solvent control treatment caused negligible mortality of bees (0–3.3%). The NOAEL of *A. campestris* EO was the highest with a value of 20 µL/mL among the five tested products, indicating that it had the lowest toxicity to honey bees. On that account, all volatile oils tested had a satisfactory acaricidal effect and an acceptable toxicity to bees.

#### **Determination of lethal concentrations and selectivity indexes**

The  $LC_{50}$  values for EOs against *V. destructor* and newly-emerged worker bees were calculated based on the corrected rates of mortality using probit analysis (Table 4). The greatest toxicity of the EOs to *Varroa* mites was observed for *A. herba alba* and *A. judaica* followed by *A. campestris* and *R. montana* after 24 h ( $LC_{50} = 2.025$ – $5.725$  µL/mL), 48 h ( $LC_{50} = 1.538$ – $4.92$  µL/mL) and 72 h ( $LC_{50} = 1.347$ – $3.549$  µL/mL), but less toxic than the positive control ( $LC_{50} = 0.447$ – $0.375$  µL/mL). Note that all tested EOs had a very low toxicity to honey bees, they were even less toxic to both *V. destructor* mites and newly-emerged honey bees than the positive control (Table 4).



**Fig. 2** Mean (+SD) mortality (%) of adult honey bees exposed to a range of concentrations of essential oils of (A) *Artemisia herba alba*, (B) *A. campestris*, (C) *A. judaica*, and (D) *Ruta montana*, and (E) thymol (positive control). Asterisks indicate significant differences compared to the resp. negative control (i.e., ethanol) (Tukey's HSD test: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\*\* $0.0001 < p < 0.001$ , \*\* $0.001 < p < 0.01$ , \* $0.01 < p < 0.05$ )

**Table 3** Estimated 'no observed adverse effect level' (NOAEL) and mean ( $\pm$ SD) *Varroa* mortality rates (%) after 72 h of exposure

Essential oil	NOAEL ( $\mu\text{L/mL}$ )	<i>Varroa</i> mortality (%)
<i>Artemisia herba alba</i>	5	100 $\pm$ 0.0
<i>A. campestris</i>	25	100 $\pm$ 0.0
<i>A. judaica</i>	10	96.66 $\pm$ 5.77
<i>Ruta montana</i>	10	100 $\pm$ 0.0
Thymol	1.03	100 $\pm$ 0.0

**Table 4** LC<sub>50</sub> (μL/mL) values (+95% CI in parentheses) of essential oils and thymol (positive control) on *Varroa destructor* and *Apis mellifera* and their selectivity ratio at 24, 48 and 72 h using complete exposure method under laboratory conditions

EO	Species	24 h	48 h	72 h
Thymol	<i>V. destructor</i>	0.447 (0.299–0.594)	0.400 (0.332–0.464)	0.375 (0.301–0.445)
	<i>A. mellifera</i>	1.531 (1.098–1.93)	1.456 (1.164–1.731)	1.370 (1.033–1.664)
	Selectivity ratio	3.42	3.64	3.65
<i>Artemisia herba alba</i>	<i>V. destructor</i>	2.025 (1.809–2.265)	1.538 (1.389–1.704)	1.347 (1.226–1.483)
	<i>A. mellifera</i>	8.726 (7.019–10.864)	8.245 (7.327–9.306)	7.569 (6.576–8.672)
	Selectivity ratio	4.31	5.36	5.62
<i>A. campestris</i>	<i>V. destructor</i>	5.26 (3.082–8.261)	4.204 (2.679–5.848)	2.781 (2.466–3.102)
	<i>A. mellifera</i>	31.718 (29.389–34.194)	31.146 (27.917–34.66)	29.951
	Selectivity ratio	6.03	7.41	(26.178–34.035) 10.77
<i>A. judaica</i>	<i>V. destructor</i>	2.466 (1.196–3.777)	1.895 (0.814–2.944)	1.517 (0.819–2.183)
	<i>A. mellifera</i>	15.184 (12.785–18.617)	14.246	13.323
	Selectivity ratio	6.15	(11.976–16.668) 7.51	(11.453–14.975) 8.78
<i>Ruta montana</i>	<i>V. destructor</i>	5.725 (3.96–8.101)	4.92 (4.021–5.845)	3.549 (2.069–5.286)
	<i>A. mellifera</i>	14.463 (13.388–15.498)	13.931	13.231
	Selectivity ratio	2.52	(13.517–14.334) 2.83	(12.799–13.642) 3.73

By far, the highest selectivity ratio values were reached at 72 h post-treatment by *A. campestris* EO (SR=10.77) followed by *A. judaica* EO (SR=8.78) whereas moderate values were recorded for *A. herba alba* EO (SR=5.62) and *R. montana* EO (SR=3.73). Essential oils appear to be more selective than thymol (positive control), which presented the lowest SR values of 3.42 (24 h), 3.64 (48 h) and 3.65 (72 h).

## Discussion

*Artemisia herba alba* EO yield (2.2%) appears to be in the same range as results from Spain (0.41–2.30%; Salido et al. 2004) but much higher than those reported in other studies of the MENA (Middle East and North Africa) region (0.33–1.18%; Dob and Benabdelkader 2006; Hudaib and Aburjai 2006; Lakehal et al. 2017; Amor et al. 2019; Aimad et al. 2022; Kadri et al. 2022). The literature indicated high variability of EO yields for *A. campestris* from Algeria where our yield of 0.59% is similar to that obtained by Cheraif et al. (2020) from Laghouat, Algeria (0.52%), much higher than that obtained from Djelfa, Algeria region (0.1%) (Dob et al. 2005), but much lower compared to Boutemak et al. (2017) data (0.88%).

*Artemisia judaica* EO yield (0.84%) was higher than that given by both Dob and Chelghoum (2006) and Abd-Elhady (2012) from Algeria (0.7%) and Egypt (0.7%), respectively. In addition, it was much lower than that obtained by Driouche et al. (2022) from Algeria (2%) and Mohammed et al. (2022) from Saudi Arabia (1.71%). Similarly, the obtained EO yield of *R. montana* of 0.67% is low compared to previously reported yields (0.26–2.5%; Kambouche et al. 2008; Hammami et al. 2015; Bouzeraa et al. 2019; Benali et al. 2020; Zeraib et al. 2021).

According to GC-MS data, our *A. herba alba* EO belongs to the davanone chemotype (66.9%) followed by camphor (9.1%) and davana ether (5.1%). In fact, our result matched data from Abdelali et al. (2023) of *A. herba-alba* originating from the same locality, from

Cheraif et al. (2020) for the Laghouat region (Algeria) and from Salido et al. (2004) for southern Spain, which also had very high davanone contents. Other chemotypes of *A. herba alba* from Algeria, Tunisia, Libya and Morocco contain various compositions with major compounds identified as  $\alpha$  and  $\beta$ -thujone, camphor, 1,8-cineole, chrysanthenone and cis-Chrysanthenyl acetate (Janačković et al. 2015; Younsi et al. 2017; Aljaiyash et al. 2018; Bekka-Hadji et al. 2022). These compounds are present in our EO but in relatively small amounts (<10%). *Artemisia campestris* EO revealed a high content of  $\beta$ -pinene (19.5%), *p*-cimene (8.1%), globulol (7.5%),  $\alpha$ -pinene (7.1%) and  $\delta$ -terpinene (6.0%). Abundance of  $\beta$ -pinene in this EO is in agreement with previous studies on *A. campestris* from Algeria (15.2%), Tunisia (36.4%) and Portugal (54.5%) (Abidi et al. 2018; Ammar et al. 2020; Rocha et al. 2021), whereas other studies revealed that germacrene D is the major constituent for cultivars from Tunisia and Morocco (Al Jahid et al. 2016; Younsi et al. 2017). A different EO profile is reported by Baykan Erel et al. (2012) with 1,2-dehydro acenaphthylene (20.7%), tremetone (15.8%), and capillin (10.4%) as major compounds. Piperitone (68.7%) was the major compound of *A. judaica* followed by  $\delta$ -cadinene (6.3%) and thymol (3.1%), which is in agreement with the high percentage of piperitone in plants collected from both Tamanrasset (91.8%) and Ilizi (61.9%) regions in Algeria (Dob and Chelghoum 2006; Drioueche et al. 2022) and other parts of the MENA region (Abd-Elhady 2012; Abu-darwish et al. 2016; Mohammed et al. 2022). Al-Wahaibi et al. (2018) reported  $\beta$ -eudesmol (13.1%), hexadecanoic acid (5.7%) and spathulenol (3.7%) as major compounds in this EO from Saudi Arabia. Essential oil from *R. montana* samples is found to be dominated by the aliphatic ketone 2-undecanone (70.1%) followed by *Z*- $\beta$ -farnesene (7.4%) and caryophyllene (3.0%). This result is in agreement with the >78.5% of 2-undecanone in semi-arid regions compared to those from humid regions ( $\leq$ 30.3%; Mohammedi et al. 2019). Hammami et al. (2015) have reported other main components of this EO from Tunisia, namely 1-butene (38.3%), methylcyclopropane (15.5%), 2-butene (22.6%) and caryophyllene oxide (8.2%). Overall, variation and diversity in EO yields and chemical composition within the same cultivar are associated with several factors including climate and environmental conditions, soil geology, harvesting time as well as drying and extraction methods (Zeragui et al. 2019; Mohammed et al. 2022).

For the evaluation of the acute toxicity of EOs for *V. destructor*, the complete exposure method in closed Petri dishes was selected. According to Maggi et al. (2010), in complete exposure, EOs action on mites occurred by contact, fumigation and also through ingestion. An effective varroacidal agent has to present high toxicity to the mites in combination with low lethality to honey bees (Brasacco et al. 2017). Our in vitro bioassays showed that the four tested EOs overall have a potent concentration- and exposure time-dependent acaricidal effect against *V. destructor*.

On the other hand, EOs' toxicity for honey bee adults was quite low – NOAEL values were calculated for *A. campestris* (25  $\mu$ L/mL), *A. judaica* (10  $\mu$ L/mL), *R. montana* (10  $\mu$ L/mL) and *A. herba alba* (5  $\mu$ L/mL), and at these concentrations *V. destructor* lethality ranged from 96.7 to 100%. These results indicate clearly the safety of the tested EOs for *A. mellifera* honey bee workers and their efficacy to control *V. destructor*.

Selectivity index is a key parameter to evaluate the miticidal potential based on the LC<sub>50</sub> values calculated for both mites and bees. Thymol, an organic treatment largely used in bee-keeping practice for *Varroa* control worldwide (Damiani et al. 2009; Glavinic et al. 2022) was used as positive control. After 24 h of exposure, thymol had a SR of 3.42, lower than

that of *A. judaica* (6.15), *A. campestris* (6.03) and *A. herba alba* (4.31), and higher than that of *R. montana* (2.52). The SR value of thymol showed a slight increase to 3.65 after 72 h of exposure. Our results are in agreement with the 3.2 after 72 h of exposure found by Hýbl et al. (2021). The highest SR values at the end of the experiment were attributed to *A. campestris* (SR=10.77) and *A. judaica* (SR=8.78) followed by *A. herba alba* (SR=5.62) and *R. montana* (SR=3.73) – these values are in the same range with some reported in the literature (Conti et al. 2020; Hýbl et al. 2021).

Our findings indicated that *A. campestris* EO possessed the strongest acaricidal activity against *V. destructor*. Some studies had investigated its anthelmintic action (Abidi et al. 2018; Akkari et al. 2014), and recently, Ammar et al. (2020) explored its insecticidal effect against *Culex quinquefasciatus*, *Musca domestica*, and *Spodoptera littoralis*. Results showed larvicidal activity against *C. quinquefasciatus* and *M. domestica* with  $LC_{50}=45.8$  mg/L and  $LD_{50}=99.8$  µg/adult, respectively. *Artemisia campestris* EO was dominated by monoterpenes (53.1%) that are thought to act on the mite's capability to reproduce (Imdorf et al. 1999). Notably, several studies have confirmed the effectiveness of monoterpenes against *V. destructor* (Fassbinder et al. 2002; Gashout and Guzmán-Novoa 2009), and also against ticks such as *Hyalomma marginatum* adults (Cetin et al. 2010) and *Ixodes ricinus* nymphs (Thorsell et al. 2006). A recent study showed that β-pinene-rich EOs from *Citrus* spp. similar to our *A. campestris* EO presented a potent acaricidal activity towards *V. destructor* (Bava et al. 2021). Da Camara et al. (2020) demonstrated the toxicity of β-pinene, *p*-cimene, α-pinene and γ-terpinene against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*, both by fumigation and residual contact bioassays.

*Artemisia judaica* oil with high amount of ketones (70.8%) also has a good in vitro acaricidal effect towards *V. destructor*. Our study is the first reporting this activity. El-Sharabasy (2010) tested crude *A. judaica* extracts (using ethanol, acetone and petroleum ether organic solvents) against *T. urticae* and concluded strong acaricidal activity. Other properties were also attributed to its EO such as antimicrobial, insecticidal, antifeedant and antifungal action (Mohamed and Abdelgaleil 2008; Benmansour et al. 2016). High piperitone content of 68.7% in *A. judaica* EO incriminates its responsibility in the pronounced miticidal activity. Abdelgaleil et al. (2008) demonstrated insecticidal ( $LD_{50}=0.68$  µg/larva), and antifeedant activities of piperitone against *S. littoralis*. In the same way, piperitone from *Cymbopogon schoenanthus* expressed pronounced efficacy on the seed beetle *Callosobruchus maculatus* with  $LC_{50}=1.6$  µL/L (Keto et al. 2006).

Essential oil from *A. herba alba* achieved a noteworthy toxicity on *V. destructor* with SR=5.62 at 72 h post treatment. Alahyane et al. (2022) also demonstrated acaricidal activity of *A. herba alba* EO on *V. destructor* in vitro, by fumigation. Still, they also reported a high fumigant toxicity of this EO to *A. mellifera* pupae ( $LC_{50}=10.53$  µL/L air); no toxicity data on *A. mellifera* adults were reported. Recently, *A. herba alba* EO was found to exhibit a very promising outlook as an acaricidal agent on *I. ricinus* ticks with  $LC_{50}=0.3$  µL/cm<sup>2</sup> after 2 h exposure (Elmhalli et al. 2021). El-Seedi et al. (2017) revealed that oils rich in piperitone exert a high repellent behavior up to 84.2% against *I. ricinus*.

*Ruta montana* EO had a relatively low efficacy in varroa control compared to the *Artemisia* EOs; however, it performed still better than thymol. Currently, no reports in literature about *R. montana* EO acaricidal activity exist. Bouzeraa et al. (2019) pointed at toxic and repellent properties against *Ephestia kuehniella* larvae of *R. montana* EO. The larvicidal effect of the hydro-methanolic extract of *R. montana* on vectors of the avian plasmodium

*Culiseta longiareolata* was significant (Bouabida and Dris 2022). An ethnobotanical survey by Carvalho da Silva et al. (2023) in Portugal, portrayed *R. graveolens* with ectoparasiticide power for dogs and livestock. More evidences touted insecticidal and repellent effects of EOs from various *Ruta* species (Conti et al. 2013; Akkari et al. 2014; Tampe et al. 2016; Achimón et al. 2022; Wang et al. 2022). Apparently, 2-undecanone, the major compound in *R. montana* EO, might be responsible for that miticidal effect due to its antifungal, anti-inflammatory, and insect repellent properties (Liu et al. 2015; Bailly 2023).

Our most surprising finding was that, besides monoterpenes which are well documented for their acaricidal activity against the honey bee pest mite *V. destructor*, ketones (piperitone, davanone and 2-undecanone) may be considered as promising natural candidates to fight *V. destructor* due to the good tolerance by bees and their strong varroacidal effect.

These findings must be followed up with trials in field conditions in order to optimize the delivery mode, exposure period, colony status (with or without brood) as well as the influence of climate conditions. The abundance of these plant species to beekeepers and relatively easy processing method to obtain their EOs make them practical and cost-effective parts of an integrated pest management control strategy to fight this parasitic mite and help protect the economically relevant honey bees.

**Acknowledgements** The authors would like to gratefully acknowledge Intissar Ghaffar, Jamila Nait Abdallah, Khadija Dechira, Nawal Fodil Cherif and Tassadit Sid Otmanc for their precious help and their support of the study.

**Author Contributions** Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Visualization were performed by Souad HAZAM. Resources: Salem TOUATI and Lounis TOUATI. Formal analysis: Liza SAHER and Hassiba Khedidji. Conceptualization, Supervision, Writing – review & editing, Validation: Sabrina AIT KAKI. Supervision, Writing – review & editing, Validation: Smain CHEMAT.

**Funding** The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

**Data Availability** The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Declarations

**Ethics approval** Not applicable.

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P (2012) The *Artemisia* L. Genus: a review of bioactive essential oils. *Molecules* 17(3):2542–2566. <https://doi.org/10.3390/molecules17032542>
- Abbas A, Zahid Abbas R, Masood S, Iqbal Z, Kasib Khan M, Kashif Saleemi M, Asif Raza M, Shahid Mahmood M, Ali Khan J, ud Din Sindhu Z (2018) & Acaricidal and insecticidal effects of essential oils against ectoparasites of veterinary importance. *Aromaticas* 17(5). [www.blaepma.usach.cl](http://www.blaepma.usach.cl)
- Abbott WB (1925) A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18:265–267
- Abd El-Wahab TE, Shalaby SEM, Al-Kahtani SN, al Naggat Y, Jamal ZA, Masry SHD (2021) Mode of application of acaricides against the ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) infesting honeybee colonies, determines their efficiencies and residues in honey and beeswax. *J King Saud Univ Sci* 33(1). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.101236>

- Abd-Elhady H (2012) Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia Judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Plant Prot Res* 52(3):347–352. <https://doi.org/10.2478/v10045-012-0057-9>
- Abdelali KS, Souttou K, Kacimi-Elhassani M, Aissaoui L, Bendachou H (2023) Chemical composition of *Artemisia herba-alba* essential oil and its larvicidal and pupicidal effects against *Culex pipiens* (Diptera; Culicidae). *Actual Biol* 45(118):1–12. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v45n118a01>
- Abdelgaleil SAM, Abbassy MA, Belal ASH, Abdel Rasoul MAA (2008) Bioactivity of two major constituents isolated from the essential oil of *Artemisia Judaica* L. *Bioresour Technol* 99(13):5947–5950. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.043>
- Abidi A, Sebai E, Dhibi M, Alimi D, Rekik M, B'chir F, Maizels RM, Akkari H (2018) Chemical analyses and anthelmintic effects of *Artemisia campestris* essential oil. *Vet Parasitol* 263:59–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.10.003>
- Abu-Darwish MS, Cabral C, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Zulficar A, Khan IA, Efferth T, Salgueiro L (2016) Chemical composition and biological activities of *Artemisia Judaica* essential oil from southern desert of Jordan. *J Ethnopharmacol* 191:161–168. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.023>
- Achimón F, Peschiutta ML, Brito VD, Beato M, Pizzolitto RP, Zygadlo JA, Zunino MP (2022) Exploring contact toxicity of essential oils against *Sitophilus zeamais* through a meta-analysis approach. *Plants* 11 (22). <https://doi.org/10.3390/plants11223070>
- Adams RP (2017) Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. ed. 4.1. ISBN 978-1-932633-21-4
- Aimad A, Bourhia M, Hana H, Sanae R, Salamattullah AM, Soufan W, Rihan HZ, Ouahmane L, Youness EA, Nouredine E, Mohamed F (2022) Essential oils from *Artemisia herba Alba* Asso., *Maticaria Recutita* L., and *Dittrichia Viscosa* L. (Asteraceae): a promising source of eco-friendly agents to control *Callosobruchus maculatus* Fab. Warehouse pest. *J Chem*. <https://doi.org/10.1155/2022/2373460>
- Akkari H, Rtibi K, B'chir F, Rekik M, Darghouth MA, Gharbi M (2014) In vitro evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Res Commun* 38(3):249–255. <https://doi.org/10.1007/s11259-014-9609-y>
- Al Jahid A, Essabaq S, Elamrani A, Blaghen M, Jamal Eddine J (2016) Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the hydro-alcoholic extract of *Artemisia campestris* L. leaves from southeastern Morocco. *JBAPN* 6(5–6):393–405. <https://doi.org/10.1080/22311866.2016.1268068>
- Al-Wahaibi LHN, Mahmood A, Khan M, Alkhatlan HZ (2018) Comparative study on the essential oils of *Artemisia judaica* and *A. herba-alba* from Saudi Arabia. *Arab. J. Chem* 13 (1): 2053–2065. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.004>
- Alahyane H, Ouknin M, Aboussaid H, el Messoussi S, Costa J, Majidi L (2022) Biological activities of essential oils from Moroccan plants against the honey bee ectoparasitic mite, *Varroa destructor*. *Int J Acarol* 48(1):50–56. <https://doi.org/10.1080/01647954.2021.2015436>
- Alburaki M, Chen D, Skinner JA, Meikle WG, Tarpy DR, Adamczyk J, Stewart SD (2018) Honey bee survival and pathogen prevalence: from the perspective of landscape and exposure to pesticides. *Insects* 9(2):1–15. <https://doi.org/10.3390/insects9020065>
- Aljaiyash A, Kasrati A, Alaoui Jamali C, Chaouch A (2018) Effect of cultivation on chemical composition and bioactivities of essential oils from *Artemisia herba-alba* asso grown in Morocco. *Biochem Syst Ecol* 81:74–79. <https://doi.org/10.1016/j.bsc.2018.10.001>
- Allabergenova A, Turganbayeva G, Nurseitova M (2021) Control of *Varroa destructor* in Kazakhstan. *Arch Razi Inst* 76(5):1163–1171. <https://doi.org/10.22092/ari.2021.355621.1704>
- Almecija G, Poirot B, Cochard P, Suppo C (2020) Inventory of *Varroa destructor* susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France. *Exp Appl Acarol* 82(1):1–16. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00535-w>
- Amin SM, Hassan HM, El Gendy AENG, El-Beih AA, Mohamed TA, Elshamy AI, Bader A, Shams KA, Mohammed R, Hegazy MEF (2019) Comparative chemical study and antimicrobial activity of essential oils of three *Artemisia* species from Egypt and Saudi Arabia. *Flavour Fragr. J* 34(6):450–459. <https://doi.org/10.1002/ffj.3525>
- Ammar S, Noui H, Djamel S, Madani S, Maggi F, Bruno M, Romano D, Canale A, Pavela R, Benelli G (2020) Essential oils from three Algerian medicinal plants (*Artemisia campestris*, *Pulicaria arabica*, and *Saccocalyx satureioides*) as new botanical insecticides? *Environ Sci Pollut Res* 27(21):26594–26604. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09064-w>
- Amor G, Caputo L, la Storia A, de Feo V, Mauriello G, Fechtali T (2019) Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. *Molecules*. 24 (22). <https://doi.org/10.3390/molecules24224021>
- Ashrafi Parchin R, Bahraminejad S, Ashrafi Parchin M, Ebadollahi A (2012) Toxic effect of a selection of medicinal plant products against the parasitic bee mite *Varroa destructor*. *J Med Plant Res* 6(14):2807–2811. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1344>

- Bailly C (2023) *Ruta Angustifolia* Pers. (narrow-Leaved Fringed Rue): pharmacological properties and phytochemical profile. *Plants* 12:827. <https://doi.org/10.3390/plants12040827>
- Bava R, Castagna F, Piras C, Palma E, Cringoli G, Musolino V, Lupia C, Perri MR, Statti G, Britti D, Musella V (2021) In vitro evaluation of acute toxicity of five *Citrus* spp. Essential oils towards the parasitic mite *Varroa destructor*. *Pathogens*. 10: 1182. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091182>
- Baykan Erel Ş, Reznicek G, Şenol SG, Karabay Yavaşoğlu N Ü, Konyalıoğlu S, Zeybek AU (2012) Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turk J Biol* 36(1):75–84. <https://doi.org/10.3906/biy-0912-27>
- Bekka-Hadji F, Bombarda I, Djoudi F, Bakour S, Touati A (2022) Chemical composition and synergistic potential of *Mentha pulegium* L. and *Artemisia herba Alba* asso. Essential oils and antibiotic against multi-drug resistant bacteria. *Molecules* 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031095>
- Ben Chaaban S, Hamdi SH, Mahjoubi K, ben Jemâa JM (2019) Composition and insecticidal activity of essential oil from *Ruta graveolens*, *Mentha pulegium* and *Ocimum basilicum* against *Ectomyelois Cera-toniae* Zeller and *Ephestia Kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J Plant Dis Prot* 126(3):237–246. <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00218-8>
- Benali T, Habbadi K, Khabbach A, Marmouzi I, Zengin G, Bouyahya A, Chamkhi I, Chtibi H, Aanniz T, Achbani EH, Hammani K (2020) GC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities of *Achillea odorata* subsp. pectinata and *Ruta montana* essential oils and their potential use as food preservatives. *Foods*. 9 (5). <https://doi.org/10.3390/foods9050668>
- Benmansour N, Benmansour A, el Hanbali F, González-Mas MC, Blázquez MA, el Hakmaoui A, Akssira M (2016) Antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia Judaica* L. from Algeria against multi-drug resistant bacteria from clinical origin. *Flavour Fragr J* 31(2):137–142. <https://doi.org/10.1002/ffj.3291>
- Bouabida H, Dris D (2022) Phytochemical constituents and larvicidal activity of *Ruta graveolens*, *Ruta Montana* and *Artemisia absinthium* hydro-methanolic extract against mosquito vectors of avian plasmodium (*Culiseta longiareolata*). *S Afr J Bot* 151:504–511. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.017>
- Boutemak K, Benali N, Moulai-Mostefa N (2017) Optimization of combination of steam distillation and solvent extraction of *Artemisia campestris* essential oil using RSM. *Int Res J Pub Environ Health* 4(10):259–269. <https://doi.org/10.15739/irjpeh.17.030>
- Boutoumi H, Moulay S, Khodja M (2009) Essential oil from *Ruta Montana* L. (Rutaceae) chemical composition, insecticidal and larvicidal activities. *J Essent Oil-Bear Plants* 12(6):714–721. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2009.10643780>
- Bouzeraa H, Bessila-Bouzeraa M, Labeled N (2019) Repellent and fumigant toxic potential of three essential oils against *Ephestia Kuehniella*. *Biosyst Divers* 27(4):349–353. <https://doi.org/10.15421/011946>
- Brasacco C, Gende L, Negri P, Szawarski N, Iglesias A, Eguaras M, Ruffinengo S, Maggi M (2017) Assessing in vitro acaricidal effect and joint action of a binary mixture between essential oil compounds (Thymol, phellandrene, eucalyptol, cinnamaldehyde, myrcene, carvacrol) over ectoparasitic mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *J Apic Sci* 61(2):203–215. <https://doi.org/10.1515/JAS-2017-0008>
- Carvalho da Silva R, Meisel L, Farinha N, Póvoa O, de Mello-Sampayo C (2023) Parasiticides: weapons for controlling microbial vector-borne Diseases in veterinary medicine; the potential of ethnobotanic / phytoparasiticides: an asset to one health. *Antibiotics* 12(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020341>
- Castagnino Laércio B, de Oliveira Orsi R (2012) Produtos naturais para o controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas africanizadas natural products for the control of the mite *Varroa destructor* in africanized bees. *Pesq Agropec bras Brasília* 47(6):738–744
- Cetin H, Cilek JE, Oz E, Aydin L, Devenci O, Yanikoglu A (2010) Acaricidal activity of *Satureja Thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and  $\gamma$ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 170(3–4):287–290. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.031>
- Chaimanee V, Warrit N, Boonmee T, Pettis JS (2021) Acaricidal activity of essential oils for the control of honeybee (*Apis mellifera*) mites *Tropilaelaps mercedesae* under laboratory and colony conditions. *Apidologie* 52(3):561–575. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00843-z>
- Cheraif K, Bakchiche B, Gherib A, Bardaweel SK, Ayvaz MÇ, Flamini G, Ascrizzi R, Ghareeb MA (2020) Chemical composition, antioxidant, anti-tyrosinase, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of essential oils of six Algerian plants. *Molecules* 25(7). <https://doi.org/10.3390/molecules25071710>
- Conti B, Leonardi M, Pistelli L, Profeti R, Ouergemmi I, Benelli G (2013) Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (Rutaceae) against *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae), an arbovirus vector. *Parasitol Res* 112(3):991–999. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3221-2>
- Conti B, Bocchino R, Cosci F, Ascrizzi R, Flamini G, Bedini S (2020) Essential oils against *Varroa destructor*: a soft way to fight the parasitic mite of *Apis mellifera*. *J Apic Res* 774–782. <https://doi.org/10.1080/000218839.2020.1790790>

- da Camara CAG, Da G, Lima S, de Moraes MM, da Silva MM, C, de Melo JPR, dos Santos ML, Fagg CW (2020) Chemical composition and acaricidal activity of essential oils and selected terpenes from two species of *Psidium* in the Cerrado biome of Brazil against *Tetranychus*. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 19(1):15–28. <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.1.2>
- Damiani N, Gende LB, Bailac P, Marcangeli JA, Eguaras MJ (2009) Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Parasitol Res* 106(1):145–152. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1639-y>
- Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD (2013) Standard methods for *Varroa* research. *J Apic Res* 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Dob T, Benabdelkader T (2006) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* aso grown in Algeria. *J Essent Oil Res* 18(6):685–690. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699206>
- Dob T, Chelghoum C (2006) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia Judaica* L. from Algeria. *Flavour Fragr J* 21(2):343–347. <https://doi.org/10.1002/ffj.1641>
- Dob T, Dahmane D, Berramdane T, Chelghoum C (2005) Chemical composition of the essential oil of *Artemisia campestris* L. from Algeria. *Pharm Biol* 43(6):512–514. <https://doi.org/10.1080/13880200500220664>
- Driouèche A, Boutoumi H, Benmansour N, Lettreuch H (2022) Hemi-synthesis of thione and thiol derivatives from *Artemisia Judaica* L. essential oil, and antimicrobial tests. *Kem Ind* 5–6. <https://doi.org/10.15255/kui.2021.062>
- El-Seedi HR, Azeem M, Khalil NS, Sakr HH, Khalifa SAM, Awang K, Saeed A, Farag MA, AlAjmi MF, Pålsson K, Borg-Karlson AK (2017) Essential oils of aromatic Egyptian plants repel nymphs of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 73(1):139–157. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0165-3>
- El-Sharabasy HM (2010) Acaricidal activities of *Artemisia Judaica* L. extracts against *Tetranychus Urticae* Koch and its predator *Phytoseiulus Persimilis* Athias Henriot (Tetranychidae: Phytoseiidae). *J Biopestic* 3(2):514–519
- Elmhalli F, Garbouli SS, Karlson AKB, Mozūraitis R, Baldauf SL, Grandi G (2021) Acaricidal activity against *Ixodes ricinus* nymphs of essential oils from the Libyan plants *Artemisia herba Alba*, *Origanum majorana* and *Juniperus phoenicea*. *Vet Parasitol Reg Stud* 24. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100575>
- Erban T, Harant K, Hubalek M, Vitamvas P, Kamler M, Poltronieri P, Tyl J, Markovic M, Titera D (2015) In-depth proteomic analysis of *Varroa destructor*: Detection of DWV-complex, ABPV, VdMLV and honeybee proteins in the mite. *Sci Rep* 5. <https://doi.org/10.1038/srep13907>
- Evans JD, Chen YP, Prisco G di, Pettis J, Williams V (2009) Bee cups: Single-use cages for honey bee experiments. *J. Apic. Res* 48 (4): 300–302. <https://doi.org/10.1080/00218839.2009.11101548>
- Fassbinder C, Grodnitzky J, Coats J (2002) Monoterpenoids as possible control agents for *Varroa destructor*. *J Apic Res* 41(3–4):83–88. <https://doi.org/10.1080/00218839.2002.11101073>
- Ferhat M, Kabouche A, Kabouche Z (2014) Comparative compositions of essential oils of three *Ruta* species growing in different soils. *J Mater Environ Sci* 5(3):735–738 ISSN: 2528 – 2028
- Flores JM, Gámiz V, Jiménez-Marín Á, Flores-Cortés A, Gil-Lebrero S, Garrido JJ, Hernando MD (2021) Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Res Vet Sci* 135:85–95. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.01.001>
- Gashout HA, Guzmán-Novoa E (2009) Acute toxicity of essential oils and other natural compounds to the parasitic mite, *Varroa destructor*, and to larval and adult worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Apic Res* 48(4):263–269. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.4.06>
- Giacobino A, Cagnolo NB, Merke J, Orellano E, Bertozzi E, Masciangelo G, Pietronave H, Salto C, Signorini M (2014) Risk factors associated with the presence of *Varroa destructor* in honey bee colonies from east-central Argentina. *Prev Vet Med* 115(3–4):280–287. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.04.002>
- Glavinic U, Blagojevic J, Ristanic M, Stevanovic J, Lakic N, Mirilovic M, Stanimirovic Z (2022) Use of thymol in *Nosema ceranae* control and health improvement of infected honey bees. *Insects* 13(7). <https://doi.org/10.3390/insects13070574>
- Glenny W, Cavigli I, Daughenbaugh KF, Radford R, Kegley SE, Flenniken ML (2017) Honey bee (*Apis mellifera*) colony health and pathogen composition in migratory beekeeping operations involved in California almond pollination. *PLoS ONE* 12(8):1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182814>
- Godara R, Parveen S, Katoch R, Yadav A, Verma PK, Katoch M, Kaur D, Ganai A, Raghuvanshi P, Singh NK (2013) Acaricidal activity of extract of *Artemisia absinthium* against *Rhipicephalus sanguineus* of dogs. *Parasitol Res* 113(2):747–754. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3704-9>
- Godara R, Parveen S, Katoch R, Yadav A, Katoch M, Khajuria JK, Kaur D, Ganai A, Verma PK, Khajuria V, Singh NK (2015) Acaricidal activity of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* against *Hyalomma anatolicum* ticks. *Exp Appl Acarol* 65(1):141–148. <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9843-6>

- Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chem* 141(1):253–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.007>
- Hammami I, Smaoui S, Hsouna A, ben, Hamdi N, Triki MA (2015) *Ruta Montana* L. leaf essential oil and extracts: characterization of bioactive compounds and suppression of crown gall Disease. *EXCLI J* 14:83–94. <https://doi.org/10.17179/excli2014-655>
- Hu J, Wang W, Dai J, Zhu L (2019) Chemical composition and biological activity against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Artemisia brachyloba* essential oil. *Ind Crops Prod* 128:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.076>
- Huang SK, Csaki T, Doublet V, Dussaubat C, Evans JD, Gajda AM, Gregorc A, Hamilton MC, Kamler M, Lecocq A, Muz MN, Neumann P, Özkirim A, Schiesser A, Sohr AR, Tanner G, Tozkar CÖ, Williams GR, Wu L, ..., Chen YP (2014) Evaluation of cage designs and feeding regimes for honey bee (Hymenoptera: Apidae) laboratory experiments. *J Econ Entomol* 107(1):54–62. <https://doi.org/10.1603/EC13213>
- Hudaib MM, Aburjai TA (2006) Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *J Essent Oil Res* 18(3):301–304. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699096>
- Hýbl M, Bohatá A, Rádsetoulalová I, Kopecký M, Hoštičková I, Vaničková A, Mráz P (2021) Evaluating the efficacy of 30 different essential oils against *Varroa destructor* and honey bee workers (*Apis mellifera*). *Insects*. 12 (11). <https://doi.org/10.3390/insects12111045>
- Imdorf A, Bogdanov S, Ibáñez Ochoa R, Calderone NW (1999) Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie* 30:209–228
- Ivănescu B, Burlec AF, Crivoi F, Roșu C, Corciovă A (2021) Secondary metabolites from *Artemisia* Genus as biopesticides and innovative nano-based application strategies. *Molecules* 26(10). <https://doi.org/10.3390/molecules26103061>
- Janačković P, Novaković J, Soković M, Vujisić L, Giweli AA, Stevanović ZD, Marin PD (2015) Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Artemisia judaica*, *A. Herba-Alba* and *A. arborescens* from Libya. *Arch. Biol. Sci* 67 (2): 455–466. <https://doi.org/10.2298/ABS141203010J>
- Kadri M, Yahia A, Goubi S, Mekhedmi NE, Selmane M, Chems A AE (2022) Chromatography analysis, in vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oil of *Artemisia herba-alba* Asso of Boussaâda, Algeria. *Biodiversitas* 23(9):4424–4431. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230907>
- Kambouche N, Merah B, Bellahouel S, Bouayed J, Dicko A, Derdour A, Younos C, Soulimani R (2008) Chemical composition and antioxidant potential of *Ruta Montana* L. essential oil from Algeria. *J Med Food* 11(3):593–595. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.0515>
- Ketoh GK, Koumaglo HK, Glietho IA, Huignard J (2006) Comparative effects of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil and piperitone on *Callosobruchus maculatus* development. *Fitoterapia*. 77 (7–8): 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.05.031>
- Khan KA, Ghramh HA (2021) An investigation of the efficacy of hygienic behavior of various honey bee (*Apis mellifera*) races toward *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) mite infestation. *J King Saud Univ Sci* 33(3):101393. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101393>
- Lakehal S, Chaouia C, Benrebhiha FZ (2017) Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Artemisia herba-alba* asso. From Djelfa. *Revue Agrobiologia* 7(2):491–501 ISSN (Print): 2170 – 1652, e-ISSN (Online)
- Li L, Lin ZG, Wang S, Su XL, Gong HR, Li HL, Hu FL, Zheng HQ (2017) The effects of clove oil on the enzyme activity of *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae). *Saudi J Biol Sci* 24(5):996–1000. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.052>
- Lindberg CM, Melathopoulos AP, Winston ML (2000) Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. *J Econ Entomol* 93(2):189–198. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.2.189>
- Liu XC, Liu Q, Chen XB, Zhou L, Liu ZL (2015) Larvicidal activity of the essential oil from *Tetradium glabrifolium* fruits and its constituents against *Aedes albopictus*. *Pest Manag Sci* 71(11):1582–1586. <https://doi.org/10.1002/ps.3964>
- Maggi MD, Ruffinengo SR, Gende LB, Sarlo EG, Eguaras MJ, Bailac PN, Ponzi MI (2010) Laboratory evaluations of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et perry essential oil against *Varroa destructor*. *J Essent Oil Res* 22(2):119–122. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700278>
- Majdoub O, Dhen N, Souguir S (2014) Chemical Composition of *Ruta chalepensis* essential oils and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum*. *Tunis J Plant Prot* 83(1)
- Medrzycki P, Giffard H, Aupinel P, Belzunces LP, Chauzat MP, Claßen C, Colin ME, Dupont T, Girolami V, Johnson R, Conte Y le, Lückmann J, Marzaro M, Pistorius J, Porrini C, Schur A, Sgolastra F, Delso NS, van der Steen JJ, Vidau M (2013) C Standard methods for toxicology research in *Apis mellifera*. *J. Apic. Res.* 52 (4). International Bee Research Association. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.14>

- Mohamed MIE, Abdelgaleil SAM (2008) Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Appl Entomol Zool* 43(4):599–607. <https://doi.org/10.1303/aez.2008.599>
- Mohammed HA, Qureshi KA, Ali HM, Al-omar MS, Khan O, Mohammed SAA (2022) Bio-evaluation of the wound healing activity of *Artemisia Judaica* L. as part of the plant's use in traditional medicine; phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, and antibiofilm properties of the plant's essential oils. *Antioxidants* 11(2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020332>
- Mohammedi H, Mecherara-Idjeri S, Hassani A (2019) Variability in essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Ruta Montana* L. collected from different geographical regions in Algeria. *J Essent Oil Res* 32(1):23–36. <https://doi.org/10.1080/10412905.2019.1660238>
- Mondet F, Beaurepaire A, McAfee A, Locke B, Alaux C, Blanchard S, Danka B, le Conte Y (2020) Honey bee survival mechanisms against the parasite *Varroa destructor*: a systematic review of phenotypic and genomic research efforts. *Int J Parasitol* 50(6–7):433–447. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.03.005>
- Nahar L, El-Seedi HR, Khalifa SAM, Mohammadhosseini M, Sarker SD (2021) *Ruta* essential oils: composition and bioactivities. *Molecules* 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164766>
- Noël A, le Conte Y, Mondet F (2020) *Varroa destructor*: how does it harm *Apis mellifera* honey bees and what can be done about it? *Emerg Top Life Sci* 4(1):45–57. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190125>
- Piou V, Vilarem C, Blanchard S, Strub JM, Bertile F, Bocquet M, Arafah K, Bulet P, Vétillard A (2023) Honey bee larval hemolymph as a source of key nutrients and proteins offers a promising medium for *Varroa destructor* artificial rearing. *Int J Mol Sci* 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512443>
- Quezel P, Santa S (1969) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales ». Tome I, Paris
- Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbranson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, Hawthorne D, van Engelsdorp D (2019) *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc Natl Acad Sci USA* 116(5):1792–1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Ramzi H, Ismaili MR, Aberchane M, Zaanoun S (2017) Chemical characterization and acaricidal activity of *Thymus satureioides* C. & B. and *Origanum elongatum* E. & M. (Lamiaceae) essential oils against *Varroa destructor* Anderson & Trueman (Acari: Varroidae). *Ind Crops Prod* 108:201–207. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.031>
- Rasool K, Rozy Rasool SK, Ahad I, Rasool R (2017) Efficacy of various botanicals and chemicals on ectoparasitic mite, *Varroa destructor* feeding on European honey bee, *Apis mellifera*. *J Entomol Zool* 5(5):589–595
- Riva C, Suzanne P, Charpentier G, Dulin F, Halm-Lemeille MP, Sopkova-de Oliveira Santos J (2019) In silico chemical library screening and experimental validation of novel compounds with potential varroacide activities. *Pestic Biochem Physiol* 160:11–19. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.05.012>
- Rocha MI, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Pereira C, Moreira P, Salgueiro L, Figueirinha A (2021) Chemical characterization and bioactive potential of *Artemisia campestris* L. subsp. *maritima* (DC) Arcang. Essential oil and hydrodistillation residual water. *J Ethnopharmacol* 276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114146>
- Ruffinengo S, Eguaras M, Floris I, Faverrin C, Bailac P, Ponzi M (2005) LD<sub>50</sub> and repellent effects of essential oils from Argentinian wild plant species on *Varroa destructor*. *J Econ Entomol* 98(3):651–655. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-98.3.651>
- Sabahi Q, Morfin N, Emsen B, Gashout HA, Kelly PG, Otto S, Merrill AR, Guzman-Novoa E (2020) Evaluation of dry and wet formulations of oxalic acid, thymol, and oregano oil for *Varroa* Mite (Acari: Varroidae) control in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *J Econ Entomol* 113(6):2588–2594. <https://doi.org/10.1093/jec/toaa218>
- Salido S, Valenzuela LR, Altarejos J, Nogueras M, Sánchez A, Cano E (2004) Composition and intraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem Syst Ecol* 32(3):265–277. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.09.002>
- Singh D (2014) Management of mite pests in honeybee colonies through botanicals. *Advances in Plant Biopesticides* 271–277. Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2006-0_13)
- Slowinska M, Nynca J, Bak B, Wilde J, Siuda M, Cierieszko A (2019) 2D-DIGE proteomic analysis reveals changes in haemolymph proteome of 1-day-old honey bee (*Apis mellifera*) workers in response to infection with *Varroa destructor* mites. *Apidologie* 50:632–656. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00674-z>
- Tampe J, Parra L, Huaiquil K, Quiroz A (2016) Potential repellent activity of the essential oil of *Ruta chalepensis* (Linnaeus) from Chile against *Aegorhinus superciliosus* (Guérin) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Soil Sci. Plant Nutr* 16 (1)
- Thorsell W, Mikiver A, Tunón H (2006) Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L. *Phytomedicine*. 13 (1–2): 132–134. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.04.008>

- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A (2020) *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling Honey bees Worldwide. *Trends Parasitol* 36(7):592–606. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.04.004>
- Vilarem C, Piou V, Vogelweith F, Vétillard A (2021) *Varroa destructor* from the laboratory to the field: control, biocontrol and ipm perspectives—a review. *Insects* 12(9). <https://doi.org/10.3390/insects12090800>
- Wang S, Li SC, Cheng FS, Ren T, Fan-Li, Mei DH, Gao K, Song QY (2022) Antifungal, repellency, and insecticidal activities of *Cymbopogon distans* and *Ruta graveolens* essential oils and their main chemical constituents. *Chem Biodivers* 19(10):e202200351. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200351>
- Younsi F, Mehdi S, Aissi O, Rahali N, Jaouadi R, Boussaid M, Messaoud C (2017) Essential oil variability in natural populations of *Artemisia campestris* (L.) and *Artemisia herba-alba* (asso) and incidence on antiacetylcholinesterase and antioxidant activities. *Chem Biodivers* 14:7. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700017>
- Zeragui B, Hachem K, Halla N, Kahloula K (2019) Essential oil from *Artemisia Judaica* L. (ssp. *sahariensis*) flowers as a natural cosmetic preservative: chemical composition, and antioxidant and antibacterial activities. *J Essent Oil-Bear Plants* 22(3):685–694. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1649200>
- Zeraib A, Boudjedjou L, Suici N, Benmeddour T, Rahal K, Fercha A (2021) Synergistic effects of *Ruta Montana* (Clus.) L. essential oil and antibiotics against some pathogenic bacteria. *J Phyto* 13:101–107. <https://doi.org/10.25081/jp.2021.v13.7088>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

## Résumé

Le présent travail a valorisé quatre espèces algériennes (*Artemisia herba-alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica* et *Ruta montana*) à travers l'étude phytochimique et les activités biologiques de leurs huiles essentielles (HEs). Celles-ci ont été extraites par hydrodistillation conventionnelle (HD) et hydrodistillation assistée par micro-ondes (HDMO), et leur composition a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Les rendements d'extraction obtenus par HD varient entre 0,59 % et 2,20 %, avec une prédominance de composés spécifiques : davanone (66,9 %),  $\beta$ -pinène (19,5 %), pipéritone (68,7 %) et 2-undécanone (70,1 %) pour *A. herba-alba*, *A. campestris*, *A. judaica* et *R. montana*, respectivement. Les résultats montrent une composition chimique similaire entre HD et HDMO pour *A. herba-alba*, *A. judaica* et *R. montana*. Cependant, pour *A. campestris*, HDMO a révélé un chémotype différent dominé par le davanone. Les tests biologiques *in vitro* ont démontré un puissant effet acaricide dépendant de la concentration et du temps d'exposition des HEs contre *Varroa destructor*, avec des ratios de sélectivité (RS) favorables par rapport au thymol (RS = 3,65), utilisé comme témoin positif. Les RS des HEs étaient de 10,77 pour *A. campestris*, 8,78 pour *A. judaica*, 5,62 pour *A. herba-alba* et 3,73 pour *R. montana*. Ces résultats suggèrent que ces HEs pourraient être des alternatives prometteuses aux acaricides chimiques pour la lutte contre la varroase dans les conditions *in situ*.

**Mots clés :** Huiles essentielles, Plantes aromatiques, Hydrodistillation conventionnelle, Activité acaricide, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, Méthode d'exposition complète.

## Abstract

This study highlighted the value of four Algerian species (*Artemisia herba-alba*, *Artemisia campestris*, *Artemisia judaica*, and *Ruta montana*) through the phytochemical analysis and biological activities of their essential oils (EOs). These oils were extracted using conventional hydrodistillation (HD) and microwave-assisted hydrodistillation (HDMO), and their composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The extraction yields obtained via HD ranged between 0.59% and 2.20%, with specific dominant compounds: davanone (66.9%),  $\beta$ -pinene (19.5%), pipéritone (68.7%), and 2-undecanone (70.1%) for *A. herba-alba*, *A. campestris*, *A. judaica*, and *R. montana*, respectively. The results indicated similar chemical compositions between HD and HDMO for *A. herba-alba*, *A. judaica*, and *R. montana*. However, for *A. campestris*, HDMO revealed a different chemotype dominated by davanone. *In vitro* biological tests demonstrated a potent acaricidal effect of the EOs against *Varroa destructor*, dependent on concentration and exposure time. The selectivity ratios (SRs) were favorable compared to thymol (SR = 3.65), used as a positive control. The SRs for the EOs were 10.77 for *A. campestris*, 8.78 for *A. judaica*, 5.62 for *A. herba-alba*, and 3.73 for *R. montana*. These findings suggest that these EOs could be promising plant-derived alternatives to chemical acaricides for controlling varroosis under field conditions.

**Key words:** Essential oils, Aromatic plants, Conventional hydrodistillation, Acaricidal activity, *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, Complete exposure method.

## ملخص

يسلط هذا العمل الضوء على قيمة أربع أنواع نباتية جزائرية (*Artemisia herba-alba*، *Artemisia judaica*، *Artemisia campestris* و *Ruta montana*) من خلال دراسة تركيبها الكيميائي الحيوي والنشاطات البيولوجية لزيوتها الأساسية (HES). تم استخراج هذه الزيوت باستخدام التقطير المائي التقليدي (HD) والتقطير المائي المدعوم بالميكروويف (HDMO)، وتم تحليل تركيبها باستخدام كروماتوغرافيا الغاز المقترنة بمطياف الكتلة (CG/MS). تراوحت نسب الاستخلاص بواسطة التقطير التقليدي بين 0.59% و 2.20%، مع سيطرة مركبات محددة: دافانول (66.9%)، بيتا-بينين (19.5%)، بيبيريتون (68.7%) و 2-أوندكانون (70.1%) لأنواع *A. herba-alba*، *A. campestris*، *A. judaica* و *R. montana* على التوالي. أظهرت النتائج تشابهًا في التركيب الكيميائي بين الزيوت المستخلصة بواسطة HD و HDMO بالنسبة لـ *A. herba-alba*، *A. judaica* و *R. montana*. ومع ذلك، أظهر التحليل الكيميائي لـ *A. campestris* باستخدام HDMO نمطًا كيميائيًا مختلفًا يهيمن عليه الدافانول. أظهرت الاختبارات البيولوجية المخبرية *in vitro* تأثيرًا قويًا للزيوت الأساسية كمبيد للقراد يعتمد على التركيز ومدة التعرض ضد *Varroa destructor*. أظهرت نسب الانتقائية (RS) نتائج إيجابية مقارنة بالثيمول (RS = 3.65) المستخدم كمعيار إيجابي. كانت قيم RS للزيوت الأساسية كالتالي: 10.77 لـ *A. campestris*، 8.78 لـ *A. judaica*، 5.62 لـ *A. herba-alba* و 3.73 لـ *R. montana*. تشير هذه النتائج إلى أن هذه الزيوت قد تكون بدائل واعدة للمبيدات الكيميائية لمكافحة الفاروا في ظروف الحقل.

**الكلمات المفتاحية:** الزيوت الأساسية، النباتات العطرية، التقطير المائي التقليدي، النشاط المبيد للقراد، *Apis mellifera*، *Varroa destructor*، طريقة التعرض الكامل.

