Université catholique de Louvain
Ecole de biologie

Université de Namur
Département de biologie

Etude du potentiel de deux huiles essentielles dans le cadre de la protection des denrées stockées contre *Sitophilus granarius*

Noël Laura

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme
de Master en Biologie des Organismes et Ecologie

Confidentiel

Promoteur: Thierry Hance (Earth and Life Institute, UCLouvain)
Encadrant: Sébastien Demeter (Earth and Life Institute, UCLouvain)

Année académique 2019-2020

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce à plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

Premièrement, je tiens à remercier mon encadrant, Sébastien Demeter pour sa confiance, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Deuxièmement, je remercie Olivier Lebbe pour son aide technique, sa bienveillance et sa disponibilité.

Je tiens aussi à remercier mon promoteur, Thierry Hance pour ses conseils avisés.

Ensuite, je remercie Stamatios Nicolis pour sa précieuse aide en codage et mon initiation en python.

Guillaume Le Goff pour ses conseils en statistiques.

Le Support en Méthodologie et Calcul Statistique de l'UCLouvain et tout particulièrement Catherine Rasse et Gilles Mordant pour avoir tant bien que mal trouvé un modèle statistique adéquat aux données complexes fournies.

Enfin, je tiens à remercier ma mère, mon beau-père et mes amis pour leur soutien au quotidien.

Etude du potentiel de deux huiles essentielles dans le cadre de la protection des denrées stockées contre *Sitophilus granarius*

Par Noël Laura

Résumé

Après la récolte, les grains doivent être stockés durant une durée plus ou moins longue. Pour limiter les pertes durant ce stockage (5 à 10 % dans les zones tempérées), les silos sont traités à l'aide d'insecticides chimiques. Cependant, la toxicité de ces produits, l'acquisition de résistance ainsi que la prise de conscience des consommateurs mènent à de nouvelles législations et à une diminution du nombre de produits autorisés sur le marché.

Au vu de cette situation, il est nécessaire de trouver des alternatives aux traitements insecticides usuellement utilisés. Parmi les pistes explorées, les huiles essentielles représentent un espoir pour la lutte contre les ravageurs. Bien que prometteur, le développement d'insecticides à base d'huiles essentielles doit faire face à différents challenges tels que le coût, la toxicité pour l'homme, la sélectivité, la variabilité de composition, les résidus ainsi que la mise à l'échelle du traitement.

Le présent mémoire s'inscrit comme une extension du projet « OILPROTECT ». Il a été réalisé sur une espèce de ravageur primaire cosmopolite, *Sitophilus granarius*.

Au terme des expériences, les deux huiles étudiées ont montré un pouvoir insecticide insuffisant pour une utilisation telles quelles à grande échelle. De nombreuses mises au point doivent encore être réalisées. Bien qu'elles n'agissent pas par fumigation comme certaines huiles, leur évaporation est très rapide exposées à l'air ambiant, ce qui diminue fortement leur rémanence. Il est donc nécessaire de mettre au point une solution insecticide à de plus faibles doses (problème de coût) et avec une plus longue rémanence. Par exemple, une synergie avec une molécule moins chère pourrait largement augmenter l'efficacité des huiles. Dans l'idéal, une formulation qui diminue l'évaporation et augmente la toxicité de contact et d'ingestion devrait être développée.

De plus, les deux huiles ont montré un pouvoir répulsif à de faibles concentrations. Cet aspect est à prendre en compte pour la mise au point d'un insecticide étant donné que de telles concentrations pourraient conduire les insectes à fuir la zone traitée et ainsi fuir le contact avec l'huile.

Study of the potential of two essential oils for the protection of stored grains against *Sitophilus granarius*

By Noël Laura

Abstract

After harvesting, the grains must be stored for a longer or shorter period of time. To limit losses during this storage (5-10% in temperate zones), the silos are treated with chemical insecticides. However, the toxicity of these products, the development of resistance as well as consumer awareness are leading to new legislation and a reduction in the number of products allowed on the market.

In view of this situation, it is necessary to find alternatives to the insecticide treatments usually used. Among the options explored, essential oils represent a potential source of progress in the fight against pests. Although promising, the development of insecticides based on essential oils must face various challenges such as cost, human toxicity, selectivity, variability of composition, residues as well as the scaling up of the treatment.

This thesis is an extension of the "OILPROTECT" project. It was carried out on a cosmopolitan primary pest species, *Sitophilus granarius*.

At the end of the experiments, the two oils studied showed insufficient insecticidal power for large-scale use as such. Many further developments still need to be carried out. Although they do not act by fumigation like some oils, their evaporation is very rapid when placed in the ambient air, which greatly reduces their persistence. It is therefore necessary to develop an insecticide solution at lower doses (cost problem) and with a longer persistence. For example, a synergy with a cheaper molecule could greatly increase the effectiveness of oils. Ideally, a formulation that decreases evaporation and increases contact and ingestion toxicity should be developed.

In addition, both oils have shown repellency at low concentrations. This should be considered when developing an insecticide since such concentrations could lead insects to flee the treated area and thus escape contact with the oil.

Table des matières

1 Introduction générale 1
2 Alternatives aux insecticides 3
3 Caractéristiques des huiles essentielles 6
3.1 Extraction et coût 6
3.2 Toxicité 7
3.3 Sélectivité 8
3.4 Composition 9
3.5 Mise à l'échelle 10
3.6 Résidus 11
4 Stockage et traitement 11
5 Huiles sélectionnées 12
6 Insecte modèle 13
6.1 Biologie de *Sitophilus granarius* 14
7 Description des objectifs et hypothèses 15
7.1 Composition chimique 16
7.2 Toxicité 16
A. Doses létales globales 17
B. Mode d'action 17
C. Molécules principales 18
7.3 Impact de l'aération 19
7.4 Répulsion 19
7.5 Rémanence 21
8 Matériel et méthode 21
8.1 Matériel biologique 21
8.2 Huiles essentielles 22
8.3 Analyse GC-MS et molécules principales 22
8.4 Toxicité 22
A. Doses létales globale 26

Confidentiel

B. Mode d'action 26
C. Molécules principales 26
8.5 Impact de l'aération 27
8.6 Répulsion 27
8.7 Rémanence 30
9 Résultats 31
9.1 Analyse GC-MS 31
9.2 Toxicité 32
A. Doses létales globales 32
B. Mode d'action 33
C. Molécules principales 33
9.3 Impact de l'aération 34
9.4 Répulsion 35
9.5 Rémanence 39
10 Discussion 43
10.1 Analyse GC-MS 43
10.2 Toxicité 45
A. Doses létales globales 45
B. Mode d'action 46
C. Molécules principales 47
10.3 Impact de l'aération 48
10.4 Répulsion 50
10.5 Rémanence 53
11 Conclusion et perspectives 55
12 Annexes 56
Bibliographie 70

Confidentiel

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : HISTOGRAMME MONTRANT LA DUREE DE TOUTES LES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DE *S. GRANARIUS*, DE L'ŒUF A LA PUPE, DANS UNE GAMME DE TEMPERATURES ET D'HUMIDITES RELATIVES……15

FIGURE 2 : ILLUSTRATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE REPULSION……..20

FIGURE 3 : ILLUSTRATION DU DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE PULVERISATION (TOUR DE BURGERJON)……23

FIGURE 4 : ILLUSTRATION DU DISPOSITIF QUI PERMET D'ISOLER LES INSECTES DES GRAINS AFIN D'ETUDIER LE POUVOIR INSECTICIDE DE LA FUMIGATION……26

FIGURE 5 : ILLUSTRATION DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL QUI PERMET UNE AÉRATION DES GRAINS AFIN D'ÉTUDIER LE POUVOIR INSECTICIDE……..27

FIGURE 6 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISE POUR FILMER LES INSECTES……..28

FIGURE 7 : ILLUSTRATION D'UNE TRAJECTOIRE ANALYSEE PAR LE CODE PYTHON……29

FIGURE 8 : PLOT DE LA SOUSTRACTION DU TEMPS PASSE DANS L'HUILE PAR RAPPORT A L'ACETONE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'HUILE *C. CASSIA*……...36

FIGURE 9 : PLOT DE LA SOUSTRACTION DU TEMPS PASSE DANS L'HUILE PAR RAPPORT A L'ACETONE, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'HUILE *C. ZEYLANICUM*……..38

FIGURE 10 : TAUX DE MORTALITE MOYEN (%) (N=10) EN FONCTION DE LA DUREE D'AERATION POST-TRAITEMENT (0, 30 ET 180 MINUTES) POUR L'HUILE *CINNAMOMUM CASSIA*…….……..39

FIGURE 11 : COURBES D'EVAPORATION REALISEES EN BOITES DITES « OUVERTES » (COUVERCLE TROUE D'UNE TULLE) ET EN BOITES SANS COUVERCLE TRAITEES AVEC UN TRAITEMENT DE 4,13 ±0,28 MG DE *C. CASSIA*……..40

FIGURE 12 : TAUX DE MORTALITE MOYEN (%) (N=10) EN FONCTION DE LA DUREE D'AERATION POST-TRAITEMENT (0, 30 ET 360 MINUTES) POUR L'HUILE *CINNAMOMUM ZEYLANICUM*……..41

FIGURE 13 : COURBES D'EVAPORATION REALISEES EN BOITES DITES « OUVERTES » (COUVERCLE TROUE D'UNE TULLE) ET EN BOITES SANS COUVERCLE TRAITEES AVEC UN TRAITEMENT DE 12,7 ±0,9MG DE *C. ZEYLANICUM*……...42

FIGURE 14 : EXEMPLE D'UN SILO VERTICAL ET D'UN TYPE D'AERATION POSSIBLE……50

FIGURE 15 : DISTANCE PARCOURUE ET TEMPS DE REPOS (MOYENNES) POUR *SITOPHILUS GRANARIUS* SOUMIS A L'EUGENOL (CONTROLE, LD50 AND LD90 ESTIMEES) DURANT 10 MINUTES……52

FIGURE 16 : PISTES REPRESENTATIVES MONTRANT L'ACTIVITE DE MARCHE DE *SITOPHILUS GRANARIUS* SUR UNE PERIODE DE 10 MINUTES SUR DES ARENES EN PAPIER-FILTRE A MOITIE IMPREGNEES D'EUGENOL……...53

Confidentiel

FIGURE 17 : MORTALITE (%) DE *SITOPHILUS GRANARIUS* SUITE A L'APPLICATION DE *CARUM COPTICUM* EN HUILE ET SOUS FORME DE NANOGEL……54

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : ILLUSTRATION DES PRIX MOYENS DES HUILES ESSENTIELLES (LISTE NON EXHAUSTIVE)……..6

TABLEAU 2 : ILLUSTRATION DES TOXICITES AIGUES (CHEZ LE RAT) PAR VOIE ORALE (LD50 EN MG/KG) DE DIFFERENTES MOLECULES PRESENTES DANS LES HUILES ESSENTIELLES ET DANS LES INSECTICIDES……..7

TABLEAU 3 : MOYENNE DES LD95 DES TROIS REPLICATS PAR HUILE AINSI QUE L'ECART-TYPE CORRESPONDANT……..…30

TABLEAU 4 : RESULTATS DE L'ANALYSE GC-MS DE L'HUILE *C. CASSIA*…….31

TABLEAU 5 : RESULTATS DE L'ANALYSE GC-MS DE L'HUILE *C. ZEYLANICUM*……...…32

TABLEAU 6 : TOXICITE DE *C. CASSIA* ET *C. ZEYLANICUM* SUR *SITOPHILUS GRANARIUS* EN 24 HEURES EN CONDITION « SCELLEE CONTACT »……...32

TABLEAU 7 : TOXICITE DES MOLECULES PRINCIPALES DE *C. CASSIA* (*TRANS*-CINNAMALDEHYDE) ET *C. ZEYLANICUM* (EUGENOL) COMPAREES A LA TOXICITE DE LEURS HUILES CORRESPONDANTES SUR *SITOPHILUS GRANARIUS* EN 24 HEURES EN CONDITION « SCELLEE CONTACT »……..…...33

TABLEAU 8 : RESUME DES TESTS DE STUDENT (DF=4, BILATERAL, P=0.05) DES COMPARAISONS ENTRE LA MORTALITE DE L'HUILE ET CELLE DE SA MOLECULE PRINCIPALE…….34

TABLEAU 9 : TOXICITE DE *C. CASSIA* ET *C. ZEYLANICUM* SUR *SITOPHILUS GRANARIUS* EN 24 HEURES EN CONDITION « SCELLE CONTACT » ET « OUVERT »……34

TABLEAU 10 : RESUME DU TEST DE TUKEY DES CONTRASTES PAR PAIRE POUR L'HUILE *C. CASSIA* A DIFFERENTES CONCENTRATIONS…….36

TABLEAU 11 : RESUME DU TEST DE TUKEY DES CONTRASTES PAR PAIRE POUR L'HUILE *C. ZEYLANICUM* A DIFFERENTES CONCENTRATIONS……...39

TABLEAU 12 : MISE EN RELATION DE LA DIMINUTION DE LA MORTALITE (%) SELON L'ACCROISSEMENT DES DUREES D'AERATION PAR RAPPORT A L'ACCROISSEMENT DE L'EVAPORATION SANS COUVERCLE (%) POUR L'HUILE *C. CASSIA* AVEC UN TRAITEMENT DE 4,13 ±0,28 MG……..41

TABLEAU 13 : MISE EN RELATION DE LA DIMINUTION DE LA MORTALITE (%) SELON L'ACCROISSEMENT DES DUREES D'AERATION PAR RAPPORT A L'ACCROISSEMENT DE L'EVAPORATION SANS COUVERCLE (%) POUR L'HUILE *C. ZEYLANICUM* POUR UN TRAITEMENT DE 12,7 ±0,9 MG……..42

TABLEAU 14 : COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR GC-MS A GEMBLOUX AVEC LA FICHE GC-MS FOURNIE PAR PRANAROM POUR *C. CASSIA*……..43

TABLEAU 15 : COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS PAR GC-MS A GEMBLOUX AVEC LA FICHE GC-MS FOURNIE PAR PRANAROM POUR *C. ZEYLANICUM*……..44

Confidentiel

TABLEAU 16 : ENSEMBLE DES LD50 ET LD95 (MG) DES HUILES ETUDIEES ET DE LEURS MOLECULES PRINCIPALES CORRESPONDANTES SUR *SITOPHILUS GRANARIUS* EN 24 HEURES EN CONDITION « SCELLEE CONTACT »……48

TABLEAU 17 : SENSIBILITE D'ADULTES *S. ORYZAE* EXPOSES A 0,7 MG/CM² D'HUILE DE *C. CASSIA* DURANT 24 HEURES, SOUS DIFFERENTS TRAITEMENTS……...49

TABLEAU 18 : TABLEAU RECAPITULATIF DE LA MORTALITE RELEVEE POUR *C. CASSIA* ET *C. ZEYLANICUM* (%) APRES CERTAINES DUREES D'AERATION AINSI QUE LEURS ECARTS TYPE……54

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : RELEVE DES MOYENNES DES TEMPERATURES (°C) ET DE L'HUMIDITE RELATIVE (%) AINSI QUE LEURS ECART-TYPES LORS DES DIFFERENTS REPLICATS DES COURBES (N°) DANS LES DIFFERENTES CONDITIONS

ANNEXE 2 : CODE PYTHON PERMETTANT D'APPLIQUER L'EQUATION DE HILL AUX DONNEES ET AINSI OBTENIR LES COURBES DE MORTALITE AINSI QUE LES LD50, 90 ET 95. CODE REALISE PAR STAMATIOS NICOLIS (ULB).

ANNEXE 3 : RESULTATS PRINCIPAUX DES SCREENING PRELIMINAIRES DE REPULSION POUR LES HUILES *C. CASSIA* ET *C. ZEYLANICUM*.

ANNEXE 4 : TABLEAU REPRENANT LA TEMPERATURE ET L'HUMIDITE RELATIVE RELEVEES PAR LE HOBO LORS DES EXPERIENCES DE REPULSION.

ANNEXE 5 : CODE PYTHON UTILISE POUR L'ANALYSE COMPORTEMENTALE DE REPULSION, REALISE PAR STAMATIOS NICOLIS (ULB).

ANNEXE 6 : RESULTATS DE L'ANALYSE GC-MS DE *CINNAMOMUM CASSIA* (LOT CCB114) PAR PRANAROM.

ANNEXE 7 : RESULTATS DE L'ANALYSE GC-MS DE *CINNAMOMUM ZEYLANICUM* (LOT BCVL107) PAR PRANAROM.

ANNEXE 8 : COURBES DE MORTALITE POUR *C. ZEYLANICUM* EN CONDITION SCELLEE.

ANNEXE 9 : COURBES DE MORTALITE POUR *C. CASSIA* EN CONDITION SCELLEE.

ANNEXE 10 : COURBES DE MORTALITE POUR LA MOLECULE PRINCIPALE DE *C. CASSIA* (LE *TRANS*-CINNAMALDEHYDE) EN CONDITION SCELLEE.

ANNEXE 11 : COURBES DE MORTALITE POUR LA MOLECULE PRINCIPALE DE *C. ZEYLANICUM* (L'EUGENOL) EN CONDITION SCELLEE.

ANNEXE 12 : COURBES DE MORTALITE POUR *C. ZEYLANICUM* EN CONDITION OUVERTE.

ANNEXE 13 : COURBES DE MORTALITE POUR *C. CASSIA* EN CONDITION OUVERTE.

Confidentiel

1 Introduction générale

Dans une période de croissance démographique importante, il est crucial d'apporter une attention particulière au maintien constant des ressources alimentaires. Outre la mise en place d'une agriculture durable et rentable dans le but d'augmenter la production (tout en maintenant un équilibre des milieux agricoles), les pertes liées aux indésirables doivent aussi être limitées (Ferry *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci, les insectes ravageurs jouent un rôle prépondérant. Au total, ce sont plus de 20 000 espèces de ravageurs des champs et des stocks qui sont responsables de la perte d'un tiers de la production alimentaire mondiale (Rajashekar *et al.*, 2012). Sur champs, les insectes herbivores peuvent être responsables de pertes allant de 10 à 20% des principales cultures (Ferry *et al.*, 2004). De surcroit, de nombreux insectes s'attaquent aux ressources stockées comme les grains en silo, le cas qui sera étudié dans la suite de ce document. Pour ceux-ci, les pertes durant le stockage sont estimées entre 5 à 10% dans les zones tempérées alors qu'elles peuvent atteindre 20 à 30% dans les zones tropicales (Haque *et al.*, 2000). Parmi les espèces ravageuses des denrées stockées, on peut citer le capucin du grain (*Rhyzopertha dominica*), le sylvain (*Oryzeaphilus surinamensis*) ou le charançon du blé (*Sitophilus granarius*). Ce dernier sera l'espèce cible de cette étude.

Par ailleurs, il faut noter que la consommation directe des denrées n'est pas la seule source de perte liée à ces ravageurs. A celle-ci s'ajoutent les contaminations par l'accumulation d'exuvies, de toiles et de cadavres qui rendent les grains impropres à la consommation. De plus, la présence d'insectes peut engendrer des modifications de température et d'humidité dans les masses de grains avec pour conséquence la création de «points chauds», propices aux champignons causant des pertes supplémentaires (Rajashekar *et al.*, 2012). L'infestation du grain par les insectes ravageurs conduit donc à une perte en quantité mais aussi en qualité. Gorham (1991) atteint une estimation de 75% de perte en prenant en compte cette contamination en plus de la consommation par les insectes. Cependant, ces chiffres restent indicatifs étant donné qu'il est difficile d'estimer de telles pertes sur une échelle mondiale.

Malgré les importantes pertes potentielles durant le stockage, cette période reste inévitable afin de fournir des céréales en continu (Godart *et al.*, 2018). C'est pourquoi des moyens de lutte contre ces ravageurs ont été mis en place. Traditionnellement, les plantes locales étaient utilisées pour leur caractère répulsif ou insecticide. Ces techniques sont encore utilisées dans certaines régions. Par exemple, en Afrique de l'Est, les feuilles d'un arbuste sauvage, l'*Ocimum suave* et les clous de girofle (*Eugenia Aromatic*) sont utilisés pour protéger les grains entreposés. Les poussières inertes mélangées aux grains sont aussi utilisées depuis

Confidentiel

des siècles tout comme les huiles végétales ou la poudre de plantes séchées (Golob, 1997). Par exemple, dans le nord du Cameroun, le niébé (*Vigna unguiculata* L.) est mélangé à de la cendre (Regnault-Roger, 1997; Rajashekar *et al.*, 2012).

Dans les années 50, les pays industrialisés ont connu l'avènement des insecticides de synthèses remplaçant ces anciennes techniques. L'un des avantages non négligeables de ces insecticides est l'efficacité de ces produits qui détruisent rapidement tous les stades de vie de nombreux insectes. Quelques exemples peuvent être cités tels que le bromure de méthyle, la phosphine, les cyanogènes, la deltaméthrine, le formiate d'éthyle ou le fluorure de sulfuryle (Rajashekar *et al.*, 2012). Pourtant, fin du 20ème siècle, leur utilisation est remise en question suite à leurs impacts sur l'environnement et la santé, la présence de résidus toxiques sur les grains, ou bien encore suite à l'apparition de résistances chez les insectes visés (Golob, 1997; Shaaya & Rafaeli, 2007; Darwish *et al.*, 2013; Korunić, 2013).

Le bromure de méthyle et la phosphine sont de bons exemples de cette situation. Le bromure de méthyle était largement utilisé pour son large spectre d'action et son coût restreint. Cependant, en 1991, il a été identifié comme l'une des plus grandes sources anthropiques de dégagement de brome dans l'atmosphère, mettant en péril la couche d'ozone. Le brome du bromure de méthyle est 60 fois plus destructeur que le chlore des chlorofluorocarbures (Schafer, 1999). C'est pour cette raison que son utilisation a été peu à peu interdite (e.g. Shaaya & Rafaeli, 2007; Rajendran & Sriranjini, 2008; Hamza *et al.*, 2016; Polatoğlu & Karakoç, 2016).

De ce fait, l'emploi de la phosphine, qui était déjà important, a considérablement augmenté lors de l'élimination progressive du bromure de méthyle sur le marché (Ducom, 2006). La phosphine est d'ailleurs le fumigeant le plus utilisé dans le monde (De Souza *et al.*, 2016; Fleurat-lessard, 2018; Plata-Rueda *et al.*, 2018). Ce gaz insecticide produit à partir d'un générateur solide de phosphure d'aluminium ou de magnésium agit sur deux enzymes qui régulent l'entrée de l'oxygène dans la mitochondrie : le cytochrome oxydase et la catalase. En bloquant leur action, la phosphine induit la formation de superoxydes, puissant agent biocide (Ducom, 2006). Ce produit permet un traitement curatif ou préventif face à de nombreuses espèces (Fleurat-lessard, 2018; Plata-Rueda *et al.*, 2018). Cependant, des mécanismes de résistance se développent lorsque les traitements sont appliqués en trop faibles concentrations. Une illustration de cette résistance est la nécessité d'augmenter les concentrations utilisées. Par exemple, en Australie, la concentration minimale pour bloquer les enzymes pour toutes les espèces confondues est passée de 25 ppm en 1990 à plus de 100 ppm en 2004. Dans de

Confidentiel

nombreux pays, comme la France, le Royaume-Uni ou l'Australie, la concentration utilisée est de 200 ppm (Ducom, 2006).

La toxicité de ces produits, l'acquisition de résistance ainsi que la prise de conscience grandissante des consommateurs mènent à de nouvelles législations et à la recherche d'alternatives aux insecticides (e.g. Shaaya and Rafaeli, 2007; Regnault-Roger, Vincent and Arnason, 2012; Korunić, 2013). D'ailleurs, le nombre de composés autorisés sur le marché diminue au fur et à mesure que la législation se durcit, retirant certains produits et empêchant l'introduction de nouveaux (Shaaya & Rafaeli, 2007). Au niveau européen, la directive 91/414/CEE règlemente l'autorisation, la mise sur le marché, l'utilisation et le contrôle des produits phytopharmaceutiques depuis 1991. Mais ce n'est que dans son Plan fédéral de Développement Durable 2000-2004 que la Belgique a introduit un programme structuré de réduction de pesticides agricoles. L'objectif de ce programme étant de « mettre en œuvre la décision du Parlement européen et du conseil du 22 juillet 2002 qui impose de « réduire les incidences des pesticides sur la santé humaine et l'environnement et, d'une manière plus générale, parvenir à une utilisation plus durable de ces substances ainsi qu'à une réduction globale des risques et de l'utilisation des pesticides dans une mesure qui permet la protection nécessaire des cultures » » (Arrêté royal, 2005).

2 Alternatives aux insecticides

Dans ce cadre, la recherche d'alternatives est importante. Plusieurs pistes pour la protection des céréales stockées sont proposées dans la littérature scientifique. Outre les traitements au CO_2 (Caliboso *et al.*, 1994) ou à la chaleur (Fleurat-Lessard, 2016), le développement de plantes *trans*géniques (Abouseadaa *et al.*, 2015), l'utilisation de poussières inertes (Golob, 1997; Darwish *et al.*, 2013; Korunić, 2013) et le développement d'insecticides à base d'huiles essentielles sont explorés, séparément ou conjointement. Les avantages et les limites de ces techniques sont développées ci-dessous.

La première alternative, le **traitement au CO_2**, permet de réduire drastiquement les risques pour les travailleurs, l'environnement ainsi que les risques de résidus sur les grains (Caliboso *et al.*, 1994). Cependant, cette technique demande des infrastructures hermétiques, ce qui est peu réalisable à faible coût à grande échelle. Cette technique est donc peu développée.

Le **traitement par la chaleur** est quant à lui, plus documenté. En général, une température de 50 degrés est le minimum requis pour diminuer drastiquement les populations d'insectes. Cependant, cette technique demande énormément d'énergie et présente des risques

Confidentiel

de dommages aux équipements à plus long terme ainsi qu'une dénaturation possible des grains. Pour diminuer ces coûts, l'utilisation de la chaleur serait plutôt à coupler avec une autre technique comme par exemple les poussières inertes (Prazic-Golic *et al.*, 2011).

Troisièmement, le développement de **plantes *trans*géniques** est une autre solution envisagée. Par exemple, des essais ont été réalisés sur des plants de blé. L'ajout du gène codant pour l'avidine, une protéine originellement présente dans le blanc d'œuf et ayant une forte affinité pour la biotine, permet à la plante de résister aux insectes ravageurs au champ mais aussi lors du stockage. En effet, les insectes n'ayant pas de voies de synthèse pour la biotine, un apport extérieur est nécessaire. Cependant, l'avidine empêchant l'acquisition de cette biotine, une alimentation riche en avidine est donc létale. Par ailleurs, cette protéine est dénaturée lors de la cuisson, ce qui la rend inoffensive pour l'homme. Sans compter sur le fait qu'elle est naturellement présente dans notre alimentation (e.g. blancs d'œufs). Lors de leurs tests sur *Sitophilus granarius*, 100% des individus sont décédés après 21 jours dans ce blé *trans*génique. Bien que ces résultats soient encourageants, d'autres tests devront être réalisés afin de connaitre la toxicité pour l'homme d'une ingestion de grande quantité d'avidine. De plus, l'acceptation du public à une telle plante génétiquement modifiée et l'acquisition de résistances sont difficiles à prédire (Abouseadaa *et al.*, 2015).

Une quatrième alternative envisagée est l'utilisation de **poussières inertes**. Ces poussières peuvent être classées selon la taille des particules et leur composition (e.g. silice, kaolin, sable, *etc*.). Cette technique a été initialement développée dans les petites structures de stocks de grains des pays en voie de développement où la disponibilité et le faible coût de ces poussières sont déterminants (Golob, 1997). Ensuite, la terre de diatomées et les aérogels de silice ont été développés.

De nombreuses études ont été menées pour déterminer le pouvoir insecticide de ces différentes poussières inertes. Celles-ci comportent de très petits pores internes qui leur confèrent la capacité physique d'absorber les molécules de cire (lipides) de l'épicuticule d'insectes, ce qui entraine la dessiccation et *in fine* la mort de l'insecte (Korunić, 2013). Ce mode d'action est donc plus lent que le contact direct avec des insecticides mais il représente aussi une plus faible toxicité pour les mammifères. De plus, étant donné que le mécanisme est essentiellement physique et non métabolique, le risque de résistance est faible. De par son mécanisme, cette technique est plus efficace à faible humidité. La terre de diatomée a aussi un pouvoir répulsif (Korunić, 2013). Son action est différente selon les espèces d'insectes et les types de contenants (Korunić, 2013). Cela peut s'expliquer, par exemple, par les différences

Confidentiel

d'anatomie et de physiologie (e.g. les petits insectes ayant une grande surface corporelle pour un petit volume perdent plus rapidement d'importantes quantités d'eau) (Korunić, 2013).

Cependant, l'utilisation pratique de ces poussières inertes est limitée par l'accroissement de l'usure des machines dû à l'abrasion mais aussi par la réduction de la fluidité du grain, la réduction de la masse volumique (poids spécifique) du grain, l'inefficacité dans certaines situations (e.g. humidité des grains élevée) et suite aux risques de santé qui accompagnent l'inhalation des poussières (Korunić, 2013). Toutefois, ces poussières inertes (e.g. Dryacide) peuvent potentiellement accompagner d'autres méthodes. Par exemple, il a été montré que l'ajout de poussière (100 g/m²) sur le haut de silos permettrait d'augmenter la fumigation en limitant les fuites de gaz (e.g. phosphine dans un système d'aération SIROFLO) (Winks and Russell, 1994 in Golob, 1997). Aussi, dans certains cas, la combinaison d'un traitement aux poussières inertes et aux huiles essentielles permet d'obtenir un meilleur pouvoir insecticide que ces traitements distincts (e.g. Yang *et al.*, 2010; Ziaee *et al.*, 2014). C'est le cas par exemple de l'huile d'Ajowan *Carum copticum* L. (Apiacae) qui induit une excitation des insectes et donc un plus grand contact avec les poussières. Par ce processus, la quantité d'huile et de poussières nécessaires est diminuée ainsi que le coût de la technique. Alors que la rémanence et l'efficacité sont augmentées (Ziaee *et al.*, 2014a).

Enfin, les insecticides à base de végétaux représentent un espoir pour la lutte contre les ravageurs de grains. Les plantes et plus particulièrement leur réduction sous forme **d'huiles essentielles**, sont connues pour leurs diverses actions insecticides et répulsives face à de nombreuses espèces (Regnault-Roger, 1997). D'abord considérées comme des déchets métaboliques, les métabolites secondaires présents dans les huiles essentielles se sont révélés être responsables d'une multitude de fonctions telles que la diminution des pertes hydriques, la communication interspécifique (e.g. attraction des pollinisateurs) ou encore la défense contre les ravageurs (e.g. champignons, microorganismes, insectes) via des mécanismes de diminution d'ovoposition, d'inhibition de la digestion, *etc*. (Regnault-Roger, 1997; Shaaya & Rafaeli, 2007). Ces dernières années, les recherches se multiplient afin d'utiliser ces qualités au service de l'Homme. En effet, alors que les articles scientifiques abordant ce sujet ne représentaient que 1,43% de la littérature sur les insecticides en 1980, ce nombre atteint les 21,38% en 2012 et l'intérêt ne cesse de croître (Isman & Grieneisen, 2014; Haddi *et al.*, 2017; Plata-Rueda *et al.*, 2018). Cependant, de nombreux challenges doivent être relevés avant de pouvoir commercialiser un produit final à base d'huiles essentielles (Tripathi *et al.*, 2009; Rajashekar *et al.*, 2012; Isman, 2016b; Haddi *et al.*, 2017). Ceux-ci seront repris au point suivant.

Confidentiel

3 Caractéristiques des huiles essentielles

Bien que prometteur, le développement des insecticides à base d'huiles essentielles doit faire face à différents challenges scientifiques et pratiques tels que le coût du produit, la toxicité, la sélectivité, la composition et la mise à l'échelle industrielle (e.g. Isman, 2016). Ces différents points sont développés dans cette section.

3.1 Extraction et coût

Les huiles essentielles sont définies comme le produit issu d'une extraction via différentes techniques telles que la distillation à la vapeur d'eau ou à sec ou encore par pressage mécanique à froid des plantes. Ces techniques sont décrites depuis l'antiquité. Elles ont été améliorées avec des techniques modernes telles que l'extraction par fluide supercritique ou assistée par micro-ondes (Regnault-Roger *et al.,* 2012). Malgré cette modernisation des techniques, l'extraction reste coûteuse étant donné qu'elle nécessite souvent de grands volumes de matière végétale (rendement <1%) et de hautes températures (Regnault-Roger *et al.*, 2012). Le prix dépend donc directement du rendement d'extraction de l'espèce concernée ainsi que de la qualité de la plante source, de la méthode d'extraction, et de l'utilisation finale du produit (Haddi *et al.,* 2017). Un ordre de grandeur est donné dans le tableau 1 ci-dessous.

A l'heure actuelle, le prix des huiles essentielles constitue un frein important à leur utilisation comme insecticide. Les recherches continuent afin de développer une technique qui permettrait de diminuer le prix des huiles essentielles sur le marché. Celle-ci devrait respecter des critères de reproductibilité, de pureté du produit final, de consommation d'énergie, de solvant ainsi qu'un rendement, des coûts de production et un temps d'extraction raisonnables (Haddi *et al.*, 2017).

Tableau 1 Illustration des prix moyens des huiles essentielles (liste non exhaustive).

Nom scientifique de l'huile	**Prix moyen en US$/kg selon Hance & Demeter (2018)**
Allium sativum L.	130-250
Cinnamomum cassia L.	35
Cinnamomum zeylanicum J. Presl.	150-200
Cymbopogon citratus DC. Stapf	17-37
Lavandula intermedia	35
Mentha arvensis L.	13

Confidentiel

3.2 Toxicité

En général, la toxicité des huiles essentielles pour les mammifères est assez faible, ce qui leur confère un avantage face aux insecticides conventionnels. La toxicité des composants des huiles peut être évaluée chez les mammifères par administration orale de ces composants chez le rat (Tableau 2). Par exemple, les LD_{50} du cinnamaldéhyde et de l'eugénol sont respectivement estimées à 1910-2600 mg/kg (poids corporel) et 2420-2970 mg/kg (Jenner *et al.*, 1964). Peu de composants des huiles essentielles testées ont une LD_{50} inférieure à 2000 mg/kg (Regnault-Roger *et al.*, 2012), bien que certains d'entre eux puissent être toxiques comme le pulegone présent dans l'huile de *Mentha pulegium* L. (Isman, 2016b). Sa teneur maximale dans l'alimentation humaine est d'ailleurs règlementée (Parlement Européen, 2008). A titre de comparaison, la toxicité orale de la deltaméthrine (insecticide) est largement supérieure avec une LD_{50} de 87 mg/kg (European Commission, 2002). Pour l'homme, l'empoisonnement mortel par ingestion ou l'inhalation de phosphine est possible à une concentration de 2,8 mg/l (environ 2000 ppm dans l'air) en un très court temps (non précisé) (Bond, 1984).

Tableau 2 Illustration des toxicités aigues (chez le rat) par voie orale (LD50 en mg/kg) de différentes molécules présentes dans les huiles essentielles (haut du tableau) et dans les insecticides (bas du tableau).

Molécules	LD50 (mg/kg) orale	Références
Cinnamaldéhyde	1910-2600	Jenner et al. (1964)
Eugénol	2420-2970	Jenner et al. (1964)
Linalool	2440-3180	Jenner et al. (1964)
Pulegone	**470**	Isman (2016)
Carène	5000	NCBI (2019a)
Coumarine	**505-920**	Jenner et al. (1964)
Carvone	1260-2130	Jenner et al. (1964)
Deltaméthrine	**87**	European commission (2002)
Phosphine	**40,5**	NCBI (2019b)

Cette faible toxicité permet d'ailleurs à l'huile de cannelle (70% à 90% de cinnamaldéhyde) d'être classés dans la catégorie GRAS (Generally Recognized As Safe) de la Food and Drug Administration aux Etats-Unis pouvant ainsi être utilisée dans l'industrie alimentaire (e.g. arômes) (Haddi et al., 2017). En Europe, le cinnamaldéhyde est autorisé dans l'alimentation mais des restrictions sont appliquées à la coumarine, composant secondaire de l'huile de cannelle de Chine (Parlement Européen, 2008 ; European Food Safety, 2009). Cependant, la détermination de la toxicité d'une huile essentielle est difficile à réaliser étant donné que leur composition varie. Ces évaluations sont donc plutôt à titre indicatif. Ainsi, la

Confidentiel

majorité des huiles essentielles ont une LD_{50} comprise entre 2000 et 5000 mg/kg (toujours chez le rat). Moins d'une douzaine ont une faible toxicité avec des LD_{50} comprises entre 1000 et 2000 mg/kg (e.g. *Origanum vulgare*, *Satureja hortensis*). Et quelques-unes ont une toxicité modérée à forte comme le bolbo (*Peumus boldus* Mol.) qui a une LD_{50} de 130 mg/kg mais qui cause des convulsions dès 70 mg/kg (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

Au niveau écotoxicologique, les huiles essentielles semblent montrer moins de risques que les insecticides. En effet, elles présentent une faible persistance dans l'environnement au vu de leur faible demi-vie (biodégradable, sensibilité à la lumière et à la chaleur) (Shivanandappa & Rajashekar, 2014). Cependant, cela peut représenter un inconvénient lors de l'utilisation industrielle étant donné que cette caractéristique conduit à la multiplication des traitements dans le temps et *in fine* des doses utilisées (Haddi *et al.*, 2017). Les huiles essentielles ne semblent pas se bioaccumuler ou se bioamplifier comme peuvent le faire certains insecticides de synthèse (Rajashekar *et al.*, 2012; Shivanandappa & Rajashekar, 2014). En revanche, elles peuvent s'avérer allopathiques et phytotoxiques. Cependant, cela ne s'applique pas réellement dans le cadre d'un traitement de grains en silo (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

Un autre argument poussant à l'utilisation d'insecticides à base d'huiles essentielles est la perception naturelle du produit par les consommateurs qui est, pour eux, synonyme de sécurité. Cette notion est à nuancer en fonction des molécules et dans tous les cas, le meilleur moyen d'assurer l'utilisation des huiles essentielles en toute sécurité est de comprendre leurs mécanismes d'action et donc les espèces sensibles et de déterminer les meilleurs paramètres d'utilisation (e.g. moyen d'application, dose, rémanence, *etc*.) (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

Pour résumer, les huiles essentielles posent des problèmes de toxicité et d'écotoxicité moins élevés que les insecticides actuels. Cependant, la variabilité de leur composition et leur mode d'utilisation doit être soigneusement étudié.

3.3 Sélectivité

En général, les symptômes observés à la suite d'un traitement aux huiles essentielles sont l'hyperactivité, des convulsions, la tétanie, la paralysie (« knockdown ») et enfin la mort. Les mécanismes exacts sont peu connus mais au vu de ces symptômes, des modes d'action neurotoxiques sont envisagés comme par exemple le dysfonctionnement des synapses GABA (e.g. thymol), la perturbation de l'adenyl-cyclase (e.g. eugenol), de l'acétylcholine estérase (e.g. 1,8-cineole) ou du système octopaminergique (Shaaya & Rafaeli, 2007; Regnault-Roger *et al.*, 2012). Ce dernier mécanisme constitue une cible intéressante à développer dans un

Confidentiel

contexte d'insecticide étant donné que ces récepteurs ne sont pas présents chez les mammifères. Ainsi, une huile agissant via ce mécanisme présenterait une sélectivité pour les insectes et donc une toxicité faible à absente pour les mammifères. Par exemple, l'eugénol présent dans l'huile de *Cinnamomum zeylanicum* se fixerait sur les récepteurs octopaminergiques à la place de l'octopamine, ce qui perturberait le système nerveux des insectes (Haddi *et al.*, 2017).

D'autres mécanismes, moins sélectifs sont décrits tels que celui du cinnamaldéhyde, composant principal de l'huile de *Cinnamomum cassia*, qui agirait quant à lui sur le système de production d'énergie, interférant éventuellement avec l'absorption ou l'utilisation de glucose (Re *et al.*, 2000 in Haddi, Oliveira and Faroni, 2017). La somme des différents modes d'action de leurs composants définit l'efficacité des huiles essentielles. D'ailleurs des études de synergies sont réalisées afin de trouver des groupes de composants qui, ensemble, auraient une plus grande efficacité (e.g. Isman, 2016; Pavela, 2015; Haddi *et al.*, 2017). Cet ensemble permettrait aussi de diminuer le risque d'acquisition de résistance lors d'utilisations répétées d'huiles essentielles (Haddi *et al.*, 2017).

D'autre part, certains composants ont montré différents effets selon les espèces. Par exemple, les huiles de cannelle (*C. cassia* ou *C. zeylanicum*) peuvent être utilisées pour lutter contre différentes espèces telles que des moustiques (e.g. larvicide pour *Aedes aegypti*), mouches (e.g. *Musca domestica*), acariens (e.g. *Dermatophagoides farina*), nématodes (e.g. *Bursaphelenchus xylophilus*). Ces huiles peuvent être insecticides ou répulsives par exemple (Haddi *et al.*, 2017). De même, une même molécule n'a pas toujours la même activité sur les différents stades du cycle biologique d'un insecte (Ngamo & Hance, 2007). Cette importante diversité d'espèces cibles interroge les mécanismes d'action. C'est pourquoi ces derniers doivent être étudiés afin de discerner les cibles de l'insecticide ainsi que sa toxicité pour l'homme.

3.4 Composition

Premièrement, contrairement aux insecticides de synthèse dont la composition est souvent basée sur un seul composé actif, les huiles essentielles sont constituées d'une multitude de molécules naturelles (jusqu'à plus de 80) en plus ou moins grande proportion (Isman, 2016b; Haddi *et al.*, 2017). Or l'action insecticide d'une huile peut être due à une molécule présente en faible quantité alors que la molécule dominante n'en aura pas ou peu. De plus, cette toxicité peut être due à l'interaction de plusieurs composés en des quantités bien définies. Cette complexité peut cacher des effets de synergies ou d'antagonismes qu'il faut comprendre afin

Confidentiel

de les utiliser à des fins commerciales (Pavela, 2015; Isman, 2016b). C'est pour cette raison que des études réalisent des expériences en séparant les constituants de certaines huiles (e.g. Plata-Rueda *et al.*, 2018) et en testant leur efficacité en mélange.

Deuxièmement, la variabilité entre les individus d'une même espèce de plante ne permet pas d'obtenir une composition identique après chaque extraction d'huile. Cela peut être dû au stade de développement de la plante, son état physiologique, l'organe prélevé, les conditions climatiques, le type de sol, les variations saisonnières ou simplement dû aux différents chémotypes présents au sein d'une même espèce (Regnault-Roger *et al.*, 2012; Isman & Grieneisen, 2014). D'ailleurs, cette variabilité dépendante d'un grand nombre de facteurs est l'une des limitations à la comparaison entre les études (Polatoğlu *et al.*, 2015). Par contre, cette complexité de formulation semble être un avantage étant donné qu'elle pourrait permettre de diminuer la capacité de résistance contrairement aux produits contenant un seul constituant actif. Par contre, cette complexité et variabilité de composition peuvent conduire à des difficultés d'homologation des futurs produits (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

3.5 Mise à l'échelle

Au-delà des préoccupations scientifiques, il est nécessaire de s'interroger sur les législations en vigueur ainsi que la stabilité du produit, les coûts de production et la disponibilité des ressources en grande quantité afin d'avoir une vue d'ensemble de la problématique et des débouchés possibles pour, par exemple, la Belgique (Isman, 2016b). En effet, les huiles essentielles sont déjà commercialisées dans certains domaines tels que la parfumerie, les cosmétiques, les détergents, la pharmacologie ou l'industrie alimentaire (e.g. aromes) (Regnault-Roger, 1997). Cependant, l'échelle de production que demande une utilisation massive est différente. D'ailleurs, aux prix actuels du marché, les huiles essentielles restent limitées à une utilisation domestique ou pour les denrées de grande valeur (Regnault-Roger *et al.*, 2012).

La stabilité du produit final doit être assurée durant une période de minimum deux ans (période généralement respectée par les autres produits du marché). Cependant, bien que certaines huiles aient des propriétés antioxydantes, d'autres sont sensibles à l'oxydation. De plus, les propriétés volatiles des huiles essentielles demandent des précautions adaptées. Ainsi, une composition particulière, un contenant non poreux et le plus inerte possible permettraient d'obtenir les meilleurs résultats en termes de stabilité. Celle-ci peut être évaluée via des tests à court terme, à hautes températures (e.g. 50 degrés durant 90 jours) (Isman, 2016b).

Confidentiel

3.6 Résidus

L'analyse des potentiels résidus doit être réalisée afin de s'assurer que ceux-ci ne sont pas toxiques (Isman, 2016a; Haddi *et al.*, 2017). De plus, il est possible que les huiles essentielles laissent une odeur ou un gout caractéristique qui devra être limité et ensuite accepté par les consommateurs. C'est le cas par exemple de la cannelle qui a une forte odeur (Haddi *et al.*, 2017).

4 Stockage et traitement

De manière générale, le stockage permet d'assurer la maturation des grains avant l'utilisation, d'approvisionner les usines tout au long de l'année et de réguler les marchés (IGEAT *et al.*, 2017). Ce stockage peut être primaire (à la ferme) ou secondaire (chez un organisme stockeur). Dans le premier cas, cela peut être temporaire (*trans*ition vers un organisme stockeur) ou définitif (utilisation des grains à la ferme). En Wallonie, le stockage secondaire semble être le plus répandu (IGEAT *et al.*, 2017). C'est donc ce type de stockage qui sera décrit ci-dessous. Il existe plusieurs types de silos qui sont habituellement divisés en deux catégories divergentes par certaines caractéristiques : les verticaux et les horizontaux. Les silos horizontaux semblent être plus propices au développement de populations de ravageurs (Barrier-Guillot *et al.*, 2014).

Quel que soit le type de silo, les grains sont d'abord échantillonnés afin de contrôler leur taux d'humidité, leur qualité et la présence d'insectes. Les résultats de ces analyses définiront les traitements à effectuer avant la mise en silo (e.g. ventilation, dépoussiérage, nettoyage, séchage, traitement insecticide). En silo, une première barrière contre l'infestation des insectes est l'utilisation de la ventilation afin de diminuer la température des grains et ainsi ralentir la respiration du grain qui est une source d'humidité et de moisissures, ce qui raccourcit la durée de conservation des céréales (IGEAT *et al.*, 2017). La technique de refroidissement la plus répandue est la ventilation à l'air ambiant. Cela consiste à refroidir les grains en y insufflant de l'air ambiant lorsque sa température est inférieure de 7 à 10°C à celle du grain. En général, ce refroidissement passe par trois paliers selon les saisons : été (objectif 20°C), automne (objectif 12°C) et hiver (objectif 5°C). Cette technique se base sur le fait que à 12°C, les insectes cessent de se reproduire et ont une activité ralentie. Et après plusieurs mois à une température de 5°C, les populations d'insectes meurent en grande partie (Barrier-Guillot *et al.*, 2014). Le fait de limiter la différence de température avec l'extérieur diminue aussi une source de condensation

Confidentiel

qui augmenterait l'humidité des grains (IGEAT *et al.*, 2017). Les détails techniques ne seront pas abordés dans ce travail.

Outre cette technique thermique, une deuxième technique de lutte est le traitement par pulvérisation des silos. Ceux-ci ont pour but d'éliminer les ravageurs sans altérer la qualité des grains. Il existe différentes techniques de lutte : biologiques, physiques, mécaniques et chimiques mais la lutte chimique reste la méthode la plus largement répandue. Elle peut avoir lieu via un insecticide de contact (e.g. deltaméthrine) ou par fumigation (e.g. phosphine) (Rajashekar *et al.*, 2012). Dans le premier cas, le grain est recouvert d'une pellicule de produit insecticide qui agit par contact avec les insectes. L'objectif étant donc d'optimiser le contact entre les insectes et les grains. La répartition uniforme de l'insecticide est cruciale. Celui-ci peut se faire par nébulisation à l'aide d'un compresseur par exemple. Un désavantage de ces insecticides est qu'ils agissent sur les formes libres d'insectes mais peu sur les formes cachées telles que les œufs ou les larves (e.g. *S. granarius*) bien que leur longue rémanence permette d'atteindre les jeunes individus après leur émergence. A contrario, le gaz toxique libéré lors d'un traitement par fumigation est capable de pénétrer à l'intérieur des grains et ainsi tuer toutes les formes du ravageur. Cependant, alors que ce pouvoir gazeux est un avantage dans ce cas, il nécessite aussi une parfaite étanchéité des structures contenant le grain. De plus, ce type de traitement entraîne de plus grands risques de contamination du personnel (FAO, 1992).

Le traitement peut avoir lieu à différents moments. Premièrement, les silos vides sont traités afin de tuer tous les insectes potentiellement présents. Deuxièmement, les grains peuvent être systématiquement traités avant la mise en silos ou en fonction de son infestation. Troisièmement, si le grain est infesté à la sortie du silo, ils sont à nouveau traités.

Des traitements curatifs alternatifs à base d'huiles essentielles sont en cours de mise au point. Ceux-ci, pourraient être appliqués selon les mêmes techniques de contact ou de fumigation mais certaines caractéristiques des huiles essentielles, développées au point 3, entrainent un processus de mise au point relativement long.

5 Huiles sélectionnées

Le présent mémoire s'inscrit comme une extension du projet « OILPROTECT » débuté en mars 2017. Les huiles étudiées ici sont celles qui ont montré un grand potentiel insecticide ainsi qu'un bon rapport efficacité/coût parmi une cinquantaine d'huiles testées durant la première partie du projet. Il s'agit de *Cinnamomum cassia* L. et *Cinnamomum*

Confidentiel

zeylanicum J. Presl. (Hance & Demeter, 2019). Ces deux huiles sont considérées comme une bonne base de développement de futurs insecticides.

Cinnamomum cassia, aussi appelée *Cinnamomum aromaticum Nees* ou Cannelle de Chine, est extraite des rameaux du cannelier de chine. La molécule principale est le *trans*-cinnamaldehyde. Différentes molécules secondaires peuvent être retrouvées dans l'huile et interagir avec la molécule principale. Parmi celles-ci, l'acétate de cinnalyle, le 2-methoxycinnamaldehyde ou le copaène (Haddi *et al.*, 2017)

La deuxième huile, *Cinnamomum zeylanicum*, aussi appelée *Cinnamomum verum* J. Presl (vrai cannelle), est extraite des feuilles du cannelier de Ceylan (Haddi *et al.*, 2017). L'eugénol est la molécule principale, parmi des molécules secondaires telles que le *trans*-cinnamaldehyde ou le linalool. Dans la suite de ce travail, la composition exacte des lots d'huiles utilisés sera analysée par GC-MS.

Les molécules principales de ces huiles ont déjà été largement étudiées sur de nombreuses espèces, dans divers domaines allant de l'antibactérien à l'insecticide en passant par l'antifongique. Par exemple, le *trans*-cinnamaldéhyde (molécule principale du *C. cassia*) est connu pour avoir un pouvoir anti-bactérien contre un certain nombre de bactéries à Gram positif et à Gram négatif (e.g. *S. aureus* et *S. epidermidis*) (Jia *et al.*, 2011 in Haddi *et al.*, 2017).

6 Insecte modèle

Il existe de nombreuses espèces ravageuses des denrées stockées. L'étude en profondeur de toutes ces espèces est techniquement impossible (e.g. temps, maintien de différents élevages, *etc*.). C'est pourquoi après des expériences préliminaires sur trois principaux ravageurs (le charançon du blé (*Sitophilus granarius* L.), le capucin du grain (*Rhyzopertha dominica* F.) et le sylvain (*Oryzeaphilus surinamensis* L.)), l'équipe du projet OILPROTECT a décidé de sélectionner le charançon du blé (Hance & Demeter, 2019). Ce choix peut s'expliquer par différentes raisons.

Premièrement, l'argument avancé par l'équipe est que parmi les trois espèces testées lors de la première partie du projet, *S. granarius* est la plus résistante des trois espèces étudiées (Hance & Demeter, 2019). Par conséquent, le développement d'un insecticide efficace contre cette espèce devrait permettre de contrôler les autres espèces, moins résistantes. Ce raisonnement est à nuancer avec les données de la littérature qui semblent désigner *Tribolium castaneum* H. comme le ravageur le plus tolérant à diverses huiles (Ebadollahi & Mahboubi, 2011).

Confidentiel

Deuxièmement, *Sitophilus granarius* est considéré comme l'un des insectes ravageurs les plus présents (Surtees, 1963), nuisibles et destructeurs dans le monde (Darwish *et al.*, 2013). *S. granarius* est un ravageur primaire, ce qui signifie qu'il est capable d'attaquer des grains sains. Ce type de ravageurs est considéré comme le plus nuisible étant donné qu'il permet l'installation des ravageurs dits « secondaires », qui ne sont pas capables de se développer sur des grains sains (e.g. *Oryzeaphilus surinamensis*) (Darwish *et al.*, 2013; Fleurat-lessard, 2018).

Troisièmement, de par sa vitesse de développement, de grandes populations peuvent être rapidement obtenues. Cela peut être un avantage pour la création et l'entretien d'élevage standardisés pour les expérimentations mais cette caractéristique accentue aussi l'impact ravageur de cette espèce (Darwish *et al.*, 2013).

6.1 Biologie de *Sitophilus granarius*

Sitophilus granarius est un coléoptère de la famille des *Dryophthoridae* (Muséum national d'Histoire naturelle, 2019). Il est présent essentiellement dans les grains de blé et d'orge dans les régions froides à tempérées et particulièrement en région méditerranéenne. Dans les régions plus chaudes, il est plutôt restreint aux régions de plus hautes altitudes (Barry, 1981). Comme dit précédemment, les adultes sont capables de se nourrir de grains sains, entiers et d'y déposer leurs œufs (Surtees, 1963). Après l'ovoposition, la femelle rebouche le trou avec un bouchon de mucus. Ce bouchon est la seule marque extérieure visible d'une infestation du grain. Normalement, il n'y a qu'un œuf par grain mais dans le cas ou plusieurs œufs seraient présents, il y a rarement plus d'une larve qui arrive au stade adulte (cannibalisme). Dans ce cas, la durée de développement de la larve survivante est légèrement plus longue (Barry, 1981).

Au nombre de quatre, l'ensemble des stades de développement larvaires se déroulent dans le grain. En effet, après l'éclosion, les premiers stades se nourrissent des tissus du grain en creusant des galeries. À la fin du quatrième stade, la larve utilise un mélange d'excréments et de sécrétions larvaires pour fermer la galerie afin de former une cellule nymphale. La larve passe alors par un stade prépupal avant de former une pupe. Ensuite, l'adulte reste quelques jours dans le grain avant d'émerger. Cette durée peut varier selon la température. Par exemple, Barry (1981) a observé une durée de 5 à 80 jours en passant de 25 à 12,5 degrés. En effet, la durée du cycle de vie diminue lorsque la température et l'humidité augmentent. Selon Howe (1965), *S. granarius* est une espèce ayant besoin d'un minimum d'humidité (50 r.h). Son optimum de température se trouve entre 26 et 30°C avec un taux d'accroissement de 15 (facteur de multiplication par génération).

Confidentiel

Au laboratoire d'Ecologie des interactions et Contrôle biologique du pôle Biodiversité de l'Earth and life Institute (UCLouvain), les élevages qui sont maintenus dans une étuve à 28°C et 80% d'humidité relative ont un cycle de vie estimé à 34 jours (Hance & Demeter, 2018). Cette durée est cohérente avec les données présentes dans la littérature (Barry, 1981) et ces conditions permettent une plus grande productivité de l'élevage (Eastham & Mccully, 1943 in Barry, 1981). La Figure 1 illustre cette variabilité au sein des différents stades, en prenant en compte différentes températures et humidités relatives. L'adulte vit environ 30 semaines, bien que certains individus dépassent largement cette moyenne (Barry, 1981).

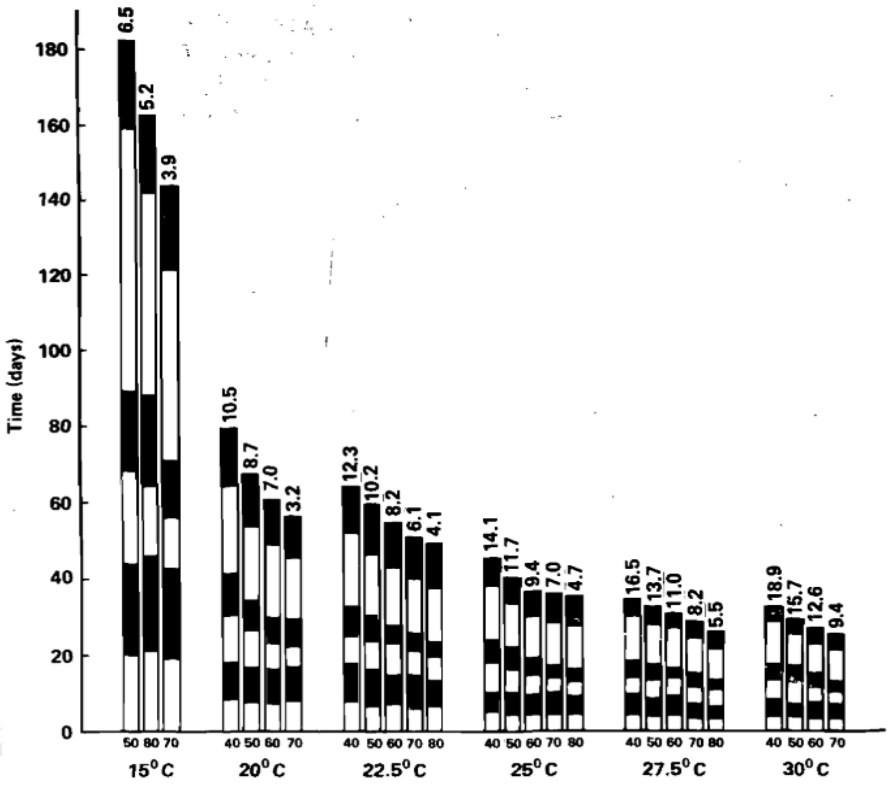


Figure 1 Histogramme montrant la durée de toutes les étapes du développement de S. granarius, de l'œuf à la pupe, dans une gamme de températures et d'humidités relatives. Les bandes noires et blanches alternées représentent les étapes successives du développement, avec le stade œuf à la base et la pupe au sommet (Eastham & Segrove, 1947 in Barry C., 1981).

7 Description des objectifs et hypothèses

Comme dit précédemment, ce mémoire est réalisé dans le cadre du projet OILPROTECT du laboratoire « Earth and life Institute » dont l'objectif est de mettre au point un produit insecticide à large spectre, à base d'huiles essentielles, permettant de protéger les silos de céréales des ravageurs (Hance & Demeter, 2018). Pour se faire, différentes tâches ont été listées, certaines ont déjà été réalisées alors que d'autres doivent l'être durant la suite du projet.

L'intitulé des différentes tâches, telles qu'énoncées dans le premier rapport, est repris ci-dessous :

- Tâche n° 1 : mise en place des élevages et leur maintien durant tout le projet
- Tâche n° 2 : Sélection des huiles essentielles à tester
- Tâche n° 3 : Analyse du comportement des trois espèces cibles dans des conditions de mini-silo
- Tâche n° 4 : Analyse de la toxicité des huiles sélectionnées sur les trois espèces concernées
- Tâche n° 5 : Détermination des mécanismes d'action des terpènes impliqués
- Tâche n° 6 : Analyse des effets répulsifs des huiles essentielles
- Tâche n° 7 : Pré-formulation et analyse de la persistance de l'activité des huiles essentielles
- Tâche n° 8 : Intégration du système et optimisation dans silo expérimental de 1L

Suite à la phase exploratoire, une seule espèce de ravageur (*Sitophilus granarius*) et un certain nombre d'huiles ont été retenus. Ce mémoire s'appuiera sur cette base ainsi que sur les connaissances récoltées dans la littérature scientifique, et s'intéressera particulièrement à la toxicité, la répulsion et la rémanence de deux huiles (C. *cassia* et C. *zeylanicum*). Les choix réalisés sont argumentés dans les points 5 et 6. Ainsi, ma participation sera essentiellement liée aux tâches n°4, 5 et 6 à travers différents aspects énoncés ci-dessous. Les questions abordées et les hypothèses posées seront développées avec la méthodologie utilisée dans les sous-points ci-dessous.

7.1 Composition chimique

La composition chimique des huiles essentielles variant selon de nombreux paramètres, il est essentiel de procéder à une analyse des huiles achetées afin de connaitre leur composition exacte (proportion des différentes molécules présentes) et ainsi pouvoir tirer des conclusions des résultats obtenus. Cette analyse est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette technique est largement utilisée dans la littérature comme prérequis aux différentes expériences de toxicité (e.g. Kordali *et al.*, 2006; Haddi *et al.*, 2017).

7.2 Toxicité

L'étude de la toxicité des huiles essentielles s'axera sur les questions suivantes :

- Les huiles essentielles étudiées ont-elles une toxicité assez élevée que pour être utilisées en tant qu'insecticide à grande échelle ?

- Quel est le mode d'action de ces huiles ?

- Est-ce que la molécule principale de ces huiles est responsable de leur toxicité ?

A ces trois questions, s'ajoute l'influence d'un facteur extérieur : l'aération, pour répondre à la question suivante :

Confidentiel

- L'aération volontaire des grains a-t-elle un impact sur l'efficacité du traitement ?

Les points qui suivent développent les différentes hypothèses liées à ces questions ainsi que la méthode utilisée pour les tester.

A. Doses létales globales

L'objectif principal est d'évaluer **la toxicité des huiles étudiées**. L'hypothèse est la suivante : « Les huiles essentielles sélectionnées ont un assez grand pouvoir insecticide à faible concentration (toxicité) pour être utilisées à grande échelle ».

Cela sera évalué par la réalisation de courbes de mortalité par pulvérisation d'huile en tour de Burgerjon sur des boîtes de grains contenant des insectes. Bien que la littérature soit en majorité consacrée à des tests d'application topique ou de fumigation, cette technique de pulvérisation a été choisie car elle se rapproche plus des conditions réelles de traitements en silo. Elle implique le contact des insectes avec les gouttelettes pulvérisées, le gaz dégagé et les grains traités.

Ces courbes de mortalité permettront de déterminer les LD50 et LD95, c'est-à-dire les concentrations qui tuent, respectivement, 50 et 95 pourcents des insectes en une durée déterminée (dans ce cas-ci, en 24h). Ces valeurs permettent *in fine*, d'estimer la quantité de traitement à appliquer sur les grains en termes de millilitres par tonne. Si par hypothèse, les huiles sélectionnées sont de bons insecticides, elles auront des LD50 et LD95 faibles, se rapprochant des prescriptions liées aux insecticides actuels. Par exemple, il est conseillé d'utiliser 42 à 84 ml de Talisma UL pour traiter une tonne de grains (100% de mortalité). Après conversion, cela correspond à une LD100 d'environ 0.0005 à 0.0011 g pour notre dispositif (14.48 g de grains traités) (Biosix SA, 2018).

Un témoin positif a été envisagé avec un insecticide chimique de synthèse pour déterminer une valeur de référence, cependant les mesures de sécurité nécessaires ne sont pas rassemblées dans le laboratoire pour utiliser ce type de produit.

B. Mode d'action

La deuxième hypothèse est la suivante : « La toxicité totale d'une huile essentielle correspond à la somme de la toxicité par contact, par ingestion[1] et par fumigation ». Ainsi, **le**

[1] Dans ce travail, la toxicité par ingestion est étudiée conjointement avec la toxicité de contact étant donné que les insectes sont placés dans des grains traités et peuvent donc les consommer.

Confidentiel

mode d'action des huiles sera considéré. En effet, les huiles essentielles peuvent avoir une certaine toxicité via ces différentes voies (e.g. Regnault-Roger, 1997). Dans un contexte pratique de stockage en silo, il est important de connaitre la part de chaque toxicité pour les huiles sélectionnées afin d'éventuellement adapter les règles d'application du traitement. Par exemple, le manque d'étanchéité des silos et les aérations volontaires pourraient limiter la toxicité par fumigation (IGEAT *et al.*, 2017).

L'objectif ici est de déterminer la part de toxicité par **fumigation** afin de la comparer à la toxicité totale obtenue au point A (fumigation + contact + ingestion). Pour ce faire, le même protocole qu'au point A a été utilisé, excepté que les insectes n'ont pas été mis en contact avec l'huile (voir matériel et méthode point 8.4).

Logiquement, la somme des modes d'action induirait une toxicité plus importante que la fumigation seule. Une LD50 plus faible est donc attendue pour le traitement avec les insectes en contact avec les grains (scellé contact) étant donné qu'ils sont exposés à une toxicité par contact, ingestion et fumigation. Pour la condition « fumigation », la LD50 pourrait être égale ou plus élevée[2] que la LD50 en condition « scellé contact » (voir matériel et méthode point 8.4.B). Dans le premier cas, cela pourrait s'expliquer par le fait que le gaz est entièrement responsable de la mortalité. Dans le deuxième cas, cela pourrait signifier que la fumigation ne représente qu'une part de la mortalité. Au plus la LD50 augmente dans cette condition, au plus la fumigation aurait un faible rôle dans le pouvoir insecticide de l'huile.

C. Molécules principales

Pour continuer l'analyse de toxicité des huiles étudiées, il est intéressant de savoir quelles molécules sont responsables de cette toxicité. En effet, la toxicité d'une huile peut être due à sa molécule principale, à un complexe de plusieurs molécules ou à une molécule qui n'est pas la molécule majoritaire (Isman, 2016b). C'est pour cette raison que des études réalisent des expériences en séparant les constituants de certaines huiles (e.g. Plata-Rueda *et al.*, 2018). Dans le cadre de ce mémoire, l'hypothèse est que la molécule principale est responsable de l'entièreté de la toxicité de l'huile.

En pratique, les proportions de chaque molécule au sein des huiles utilisées seront connues suite à la GC-MS effectuée initialement. A partir des résultats obtenus, des tests de toxicité des molécules principales seront réalisés afin d'obtenir des courbes de mortalité comme

[2] Peu de probabilité que le LD50 soit plus faible étant donné que l'efficacité insecticide ne pourrait pas être plus forte en retirant l'ingestion et le contact. Une valeur LD50 plus faible serait une valeur incohérente.

Confidentiel

décrit au point 7.2 (§ 1). Ces courbes pourront être comparées aux courbes de mortalité des huiles entières afin de déterminer si l'activité insecticide de l'huile est due essentiellement à la molécule principale. Pour donner un exemple, si la molécule principale correspond à 70 % de la composition de l'huile, on peut s'attendre à ce que la LD50 de la molécule principale corresponde à 70 % de la LD50 de l'huile. Autrement, il est possible que ce soient les interactions entre les composants de l'huile ou d'autres molécules minoritaires qui sont responsables de cette activité insecticide (e.g. synergie). Dans ce cas, ce ratio ne pourrait pas être démontré.

7.3 Impact de l'aération

En parallèle, **l'influence de l'aération** est analysée. Dans les silos, l'aération volontaire des grains est l'une des techniques de conservation du grain étant donné qu'elle régule la température et l'humidité, ce qui permet notamment de lutter contre les ravageurs. Les huiles étant constituées de composés volatiles, il est probable que cette technique influence le traitement. L'hypothèse est la suivante : une aération plus ou moins élevée devrait avoir un impact sur l'évaporation du produit et donc sur la fraction restante à l'état liquide, impactant directement la toxicité à court terme. L'objectif sera donc de quantifier cet aspect. Cependant, les limites pratiques obligent à simplifier le protocole à deux degrés d'aération extrêmes : total (boîtes ouvertes) et nul (boîtes scellées). En boîte ouverte, la forte aération des grains devrait diminuer l'efficacité du traitement. Ainsi, la LD50 avec une aération extrême sera plus élevée. D'un autre côté, l'aération nulle devrait permettre un plus grand pouvoir fumigeant et donc une plus grande toxicité (LD50 plus faible).

7.4 Répulsion

Au cours de l'évolution, de nombreuses plantes ont développé des composés permettant de moduler le comportement des insectes (Shaaya & Rafaeli, 2007; Bassolé & Juliani, 2012). Ainsi, les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils pouvant avoir un caractère répulsif ou attractif vis-à-vis des ravageurs. L'attraction du ravageur vers les grains traités permettrait une augmentation du contact et donc de la mortalité. La répulsion, quant à elle, pourrait soit induire une diminution du contact suite à une fuite des insectes dans les zones de refuges (e.g. couche de grains non traités) s'il en existe, soit augmenter le contact avec le traitement en poussant les insectes à se déplacer. Le premier cas peut être illustré avec le thym, *Thymus vulgaris* L. dans les expériences menées dans le projet OILPROTECT où les insectes étaient tellement repoussés qu'ils se réfugiaient hors des grains (Hance & Demeter, 2019). Le

Confidentiel

deuxième cas se rapproche de l'effet de l'Ajowan *Carum copticum L.* qui induit une excitation des insectes et donc un plus grand contact avec les poussières comme cité précédemment (Ziaee *et al.*, 2014a). Cet aspect pourrait donc fortement influencer l'efficacité de l'insecticide. Aussi, dans le cas d'une répulsion importante, l'huile essentielle pourrait être utilisée comme traitement préventif afin d'éloigner les ravageurs des grains.

L'objectif de cette partie est d'étudier le pouvoir répulsif des huiles *C. cassia* et *C. zeylanicum*. La première hypothèse est que les huiles testées sont répulsives. Si cette première hypothèse est affirmée, le second objectif est de déterminer la limite de répulsion (µL/cm²) de ces huiles, soit la valeur au-dessus de laquelle l'huile est répulsive mais en dessous de laquelle elle ne l'est plus.

Cela sera réalisé à l'aide d'observations comportementales de *S. granarius* en boîte de Pétri (divisée en deux zones, une traitée par une huile essentielle (+ acétone) et la deuxième traitée par l'acétone uniquement). Dans le cas où la concentration utilisée est très répulsive, l'insecte devrait passer la totalité de son temps dans la zone sans huile de la boîte de Pétri (Figure 2A et A bis). Alors que si la concentration appliquée n'est pas répulsive, l'insecte devrait avoir le même comportement que dans les témoins négatifs, c'est-à-dire, un déplacement sur toute la surface (Figure 2B et B bis). Entre ces valeurs, il est possible d'appliquer une concentration qui induirait un comportement intermédiaire : certains insectes

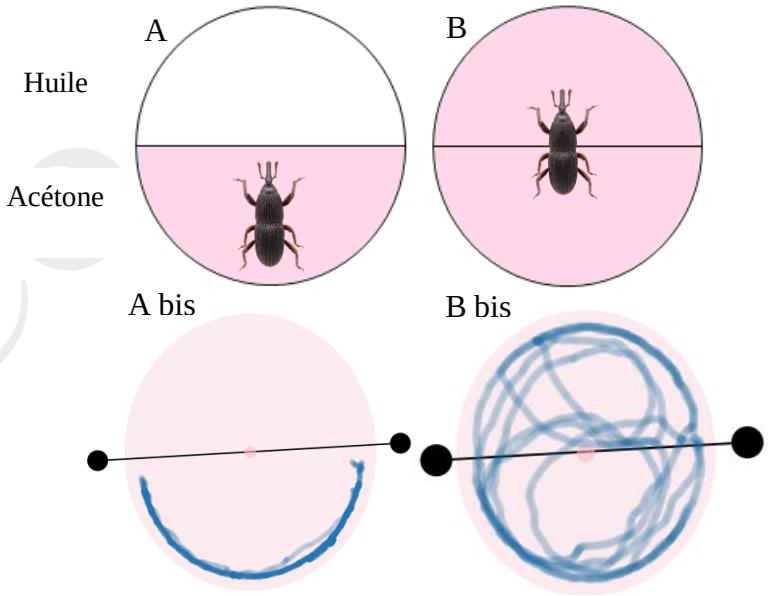


Figure 2 Illustration du dispositif expérimental de répulsion. La moitié supérieure de la boîte de Pétri est imprégnée d'huile (+acétone) alors que l'autre moitié est imprégnée d'acétone. Sur les figures A et B, la couleur représente la surface où l'insecte se déplace. A: l'huile est très répulsive. B : l'huile n'est pas répulsive. Les figures bis sont des exemples de trajectoires (ligne bleu) probables dans les conditions correspondantes (A ou B).

Confidentiel

éviteraient la zone traitée alors que d'autres seraient indifférents ou montrerait une légère préférence. Cela peut aussi être dû à la variabilité individuelle des comportements.

7.5 Rémanence

L'un des avantages des huiles essentielles, en termes de résidus sur le matériel traité, est leur faible persistance dans l'environnement au vu de leur faible demi-vie et leur biodégradabilité (Regnault-Roger *et al.*, 2012). A cela s'ajoutent leur photosensibilité et leur grande volatilité. *In fine*, il est crucial de trouver un équilibre entre cette faible persistance dans l'environnement et l'efficacité du traitement des grains à plus ou moins long terme. Dans ce cadre, la rémanence des huiles doit être étudiée.

L'hypothèse est la suivante : « au plus la durée d'aération qui sépare le traitement des grains et la mise en contact avec les insectes est longue, au plus la mortalité sera faible ». En pratique, la mortalité causée par la LD95 sera comparée entre différents durées d'aération.

8 Matériel et méthode

8.1 Matériel biologique

Un élevage standardisé est entretenu durant toute la durée des expérimentations afin d'obtenir des individus d'âges connus et relativement proches. Cela prévient un effet âge lors des expériences. Les conditions d'élevage optimum ont été choisies suite aux expériences de mise au point du projet OILPROTECT (Barry C., 1981; Hance & Demeter, 2018).

En pratique, deux nouvelles jarres sont mises en route chaque mercredi contenant chacune 400 grammes de grains de blé (*Triticum aestivum* L.) et 10 millilitres d'insectes (environ 1500 insectes). Les jarres sont ensuite maintenues dans une étuve à 28 degrés et 80 pourcents d'humidité relative, dans le noir durant deux semaines pour permettre aux individus de pondre dans les grains avant de les retirer par tamisage. Ensuite, tous les mercredis, les jarres ayant dépassé le 30ème jour (post mise des adultes) sont tamisées afin de récolter les jeunes individus sortis des grains infestés. Cette technique permet d'obtenir des individus ayant entre 1 et 7 jours. Ceux-ci sont conservés dans d'autres jarres afin d'être utilisés du lundi au jeudi de la semaine suivante. Les expériences de toxicité sont donc réalisées sur des individus ayant entre 5 et 15 jours. Pour rappel, l'espérance de vie de *S. granarius* est de environ 30 semaines (Barry, 1981).

Pour les expériences de répulsion demandant un nombre d'individus moins élevé, une jarre est tamisée tous les jours du lundi au vendredi afin de fournir des individus d'un même

Confidentiel

âge du mardi au vendredi. Les expériences de répulsion sont donc réalisées sur des individus ayant tous 7 jours.

8.2 Huiles essentielles

Les huiles proviennent de chez Pranarom et sont conservées à température ambiante, à l'abri de la lumière dans des bouteilles en aluminium. Les mêmes lots sont utilisés pour toutes les expériences. *Cinnamomum cassia* (lot CCB114) est une huile issue d'une méthode biologique et originaire de Chine. *Cinnamomum zeylanicum* (lot BCVL107) est originaire de Madagascar.

8.3 Analyse GC-MS et molécules principales

La composition des huiles est analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire de Chimie des Molécules Naturelles de l'Université de Liège (Gembloux), sur une Agilent 5973 Network Mass selective detector, équipée du colonne HP5 apolaire de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, et de débit 1,2 mL/min (Hélium). Un programme de température a été appliqué tel que : température initiale de 50°C pendant 1 minute puis une rampe de température de 3°C/min jusque 240°C et 240°C pendant 2 minutes. Le tout avec un délai solvant de 5 minutes. Les pics obtenus sont analysés à l'aide du logiciel MSD Chemstation (version 2004).

Suite à cette analyse, la molécule principale de chaque huile a été identifiée : le *trans*-cinnamaldéhyde (lot STBJ0622) et l'eugénol (lot MKCH5601), respectivement molécules principales de *Cinnamomum cassia* et *Cinnamomum zeylanicum.* Ces molécules pures sont fournies par Sigma-Aldrich et sont conservées au frigo (±5°C). Le *trans*-cinnamaldéhyde est produit en Chine et l'eugénol est produit en Allemagne. Les mêmes lots sont utilisés pour toutes les expériences.

8.4 Toxicité

Un protocole général de pulvérisation est appliqué pour les points 8.4 A, B, C et 8.5. Celui-ci est décrit ci-dessous ainsi que la méthode statistique commune à ces points. Les particularités de chaque condition seront énumérées dans les points correspondants.

Confidentiel

La méthode d'application de l'huile choisie est la pulvérisation à l'aide d'une tour de Burgerjon. Quatre boîtes sont traitées par pulvérisation : 3 boîtes de pétri contenant 14,48 grammes de grains (±0.29g) en monocouche et 20 insectes[3], et une boîte vide (Figure 3).

Figure 3 Illustration du dispositif expérimental de pulvérisation (Tour de Burgerjon)

Cette dernière est pesée avant et après la pulvérisation afin de connaitre la quantité d'huile présente par boîte[4].

En pratique, un certain volume est placé dans un tips dans le pistolet de pulvérisation. Une fois la pulvérisation terminée, une minute est laissée au nuage pour retomber sur les boîtes. Après traitement, les boîtes sont stockées dans une étuve à 28 degrés et 80 pourcents d'humidité relative.

La mortalité est déterminée 24 heures après le traitement. A noter que certains individus sont capables de bouger une antenne ou une patte mais incapable de se mouvoir, ils sont qualifiés de « Knocked out » ou KO. Ces individus ne sont pas morts mais ils semblent incapables de poursuivre une vie normale (déplacement, reproduction, *etc.*). Sur bases des précédents travaux de l'équipe du projet OILPROTECT, les KO sont considérés comme étant

[3] Excepté dans le cas de la fumigation où les insectes sont ajoutés directement après la pulvérisation, dans une petite cage afin d'éviter le contact avec les grains.

[4] Un test a permis de vérifier que lors d'une même pulvérisation, la quantité d'huile déposée sur chaque boite était équivalente avec une variation de 5,34% pour 10 pulvérisations à 4 mg de *C. cassia*.

Confidentiel

morts. En effet, ils ont montré que 89 pourcents des individus KO (provoqués par un traitement par le myrte commun, *Myrtus communis* L.) finissaient par mourir après 24 heures sur grain sain (Hance & Demeter, 2018). Afin de discriminer les KO des vivants et des morts, les individus sont placés sous binoculaire sous une lumière vive orientée vers leurs yeux.

Pour chaque condition, une première étape de mise au point a eu lieu pour déterminer les doses qui provoquent une mortalité de 0 et 100 pourcents des insectes. Après cela, les courbes de mortalité sont tracées sur base de plusieurs doses entre ces deux extrêmes. Chaque courbe est répliquée trois fois. Celles-ci sont analysées à l'aide de deux modèles décrit ci-dessous.

En plus des 75 boîtes traitées par courbe, six boîtes contenant une même quantité de grains et 20 insectes représentent les témoins négatifs. Elles ne sont pas traitées et fournissent donc la mortalité naturelle. Dans le cas où la mortalité moyenne des 6 témoins est supérieure ou égale à 5 %, les données de l'expérience correspondantes sont corrigées selon l'équation d'Abbott, visible ci-dessous (Abbott, 1925; World Health Organization, 2016).

$$Mortalité\ corrigée\ (\%) = \frac{\text{mortalité dans le traitement (\%)} - \text{mortalité dans le témoin(\%)}}{100 - \text{mortalité dans le témoin (\%)}}$$

La température et l'humidité ont été enregistrées durant toute la durée de l'expérience, à l'aide d'un HOBO® temp/RH logger UX100-003. Les données ont été récoltées via le logiciel HOBOware et sont visibles en Annexe 1.

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide de deux modèles. Un premier modèle permet une meilleure estimation des LD50 et LD95 par courbe. C'est sur base des résultats de ce modèle que les LD95 de l'expérience rémanence ont été déterminées. Tandis qu'un modèle plus complexe a permis d'analyser les différences statistiques entre les différentes modalités.

1er modèle :

Dans ce premier modèle, des courbes de mortalité sont réalisées selon une fonction de type « Hill » telle que :

$$M = \frac{c^n}{K^n + c^n}$$

Avec n : l'exposant de coopérativité entre la mortalité et la dose
c : la dose d'huile appliquée (mg)
K : la valeur seuil (LD50) (mg)

En pratique un code python est utilisé afin d'appliquer cette équation aux données. Celui-ci est visible en Annexe 2.

Confidentiel

Dans ce cas-ci, une courbe de mortalité est constituée de 25 points, soit 25 moyennes des 3 boîtes traitées lors d'une même pulvérisation. Les moyennes sont utilisées étant donné que les boîtes traitées lors d'une même pulvérisation ne peuvent pas être considérées comme des réplicats indépendants. Ensuite, les LD50 et LD95 sont calculés par courbe. Avec ce modèle, on obtient donc 3 valeurs de LD50 ainsi que 3 valeurs de LD95 par condition (une huile avec un certain traitement).

2ème modèle :

Le fait de ne pas pouvoir techniquement répéter exactement les mêmes doses entre les 3 courbes empêche d'utiliser les méthodes d'analyse habituelles pour le traitement de données de mortalité. C'est pour cela qu'un modèle linéaire généralisé mixte (fonction logistic) a été construit. Celui-ci reprend l'effet de l'huile sur la mortalité mais aussi le traitement (dose), le groupe (scellé, ouvert ou la molécule seule) ainsi que l'effet aléatoire lié au fait que 3 boîtes sont traitées lors d'une même pulvérisation (données non-indépendantes). Cette dernière caractéristique, contrairement au modèle précédent, permet d'analyser les 75 points par courbe et non via leurs moyennes. Ce modèle s'écrit comme ceci : mortalité ~ huile + groupe + traitement + effet aléatoire lié au réplicat + bruit.

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-(\alpha + \underbrace{\beta_1 \mathbb{1}(\text{huile } 2)}_{a} + \underbrace{\gamma_k}_{b} + \underbrace{\delta\ dose}_{c} + \underbrace{\tilde{\varepsilon}(rep)}_{d} + \varepsilon)}}$$

Avec Y : la mortalité estimée par le modèle
α : valeur moyenne pour « molécule » dans « huile 1 »
β_1 : coefficient de l'effet huile 1 par rapport à l'huile 2
$\mathbb{1}$: fonction indicatrice
γ_k : coefficient par groupe avec k= nombre de modalité – 1
δ: coefficient dose
$\tilde{\varepsilon}(rep)$: erreur liée au réplicat
ε : bruit

Et avec a : l'effet huile
b : l'effet groupe (scellé, molécule, ouvert)
c : l'effet dose
d : le facteur erreur

Ce modèle est utilisé pour comparer statistiquement les différentes modalités entre elles (ouvert vs scellé ou la molécule seule vs l'huile).

Confidentiel

A. Doses létales globale

La dose létale globale englobe tous les modes d'action de l'huile (fumigation, contact et ingestion). Pour la déterminer, les boîtes traitées selon le protocole décrit ci-dessous sont scellées à l'aide de parafilm directement après le traitement afin de conserver le gaz au sein de la boîte et simuler des conditions de faible aération comme celles retrouvées au cœur d'un silo de grains (hors aération). Les boîtes scellées permettent aussi d'avoir des conditions standards en termes d'aération. Les insectes sont mis en contact avec le grain avant la pulvérisation. Ils subissent donc le traitement en même temps que les grains. Une courbe est réalisée trois fois par huile.

B. Mode d'action

Cette manipulation a été réalisée selon le protocole décrit au point 8.4. Cependant, l'objectif de cette partie étant de déterminer le pouvoir insecticide de la fumigation, les insectes ont dès lors été enfermés dans des boîtes grillagées contenant des grains sains et placées au sein de la boîte de pétri ayant préalablement été traitée (Figure 4). Ce dispositif permet aux insectes d'être en contact avec les gaz dégagés par le traitement mais empêche tous contacts avec l'huile en tant que telle. Les boîtes sont scellées. Au vu des résultats de la première courbe (voir résultats au point 9.2), cette manipulation a été réalisée une seule fois par huile.

Figure 4 Illustration du dispositif qui permet d'isoler les insectes des grains afin d'étudier le pouvoir insecticide de la fumigation.

C. Molécules principales

Dans le cas des molécules pures, seule la condition telle que décrite au point 8.4.A a été réalisée. Les boîtes de Pétri sont scellées immédiatement après le traitement et les insectes sont en contact avec le grain avant la pulvérisation. Ceci a été réalisé selon le protocole décrit au point 8.4, en triplicat. Les résultats sont comparés aux résultats du point 8.4.A en prenant compte du pourcentage de la molécule principale déterminée par l'analyse GC-MS.

Confidentiel

Des tests de Student ont été réalisés afin de comparer les moyennes des LD50 et LD95 des molécules principales avec ces valeurs pour l'huile correspondante. Pour se faire, les LD50 et LD95 des huiles ont été corrigées par un facteur correspondant à la proportion de la molécule principale dans l'huile (0,79 pour *C. cassia* et 0,76 pour *C. zeylanicum*). L'objectif étant de déterminer si ces valeurs sont significativement différentes.

Une analyse supplémentaire a été réalisée à l'aide du deuxième modèle décrit au point 8.4 afin de comparer les courbes entières.

8.5 Impact de l'aération

Afin d'étudier l'impact de l'aération sur le traitement, le protocole décrit au point 8.4 a été appliqué avec une variante : les couvercles en verre scellés ont été remplacés par des couvercles en plastique percé d'une tulle (ø 5 cm) permettant l'aération des boîtes (Figure 5). Cette expérience a été réalisée en triplicat sur les 2 huiles étudiées.

Figure 5 Illustration du dispositif expérimental qui permet une aération des grains afin d'étudier le pouvoir insecticide.

8.6 Répulsion

Afin de déterminer le caractère répulsif de l'huile, un adulte non sexé *S. granarius* est placé au centre d'une boîte de Pétri (ø 9 cm) dont le sol est recouvert de deux demis papiers filtres de sorte à recouvrir toute la surface. Différents tests ont été réalisés : (1) acétone – acétone, (2) acétone – *C. cassia* ou *C. zeylanicum*. Le traitement huile est constitué de plusieurs concentrations d'un mélange huile/acétone. Le premier traitement est le contrôle négatif : les individus devraient se déplacer aléatoirement dans toute la boîte. Cette manipulation permet de vérifier que le dispositif n'influence pas le déplacement de l'insecte (e.g. lumière, pente, *etc*.).

Des screening préliminaires ont orienté le choix des concentrations testées (Annexe 3) et du volume de solution à appliquer. Ainsi, chaque demi papier filtre est traité avec 300 µL de solution ou d'acétone, appliqué uniformément à la micropipette. Un temps de 30 secondes est

nécessaire afin de permettre l'évaporation de l'acétone qui sert initialement de solvant. Quatre concentrations par huile ont été retenues telles que : *C. zeylanicum* 0.5%, 1%, 3%, 6% et *C. cassia* 0.01%, 0.025%, 0.05%, 0.1% soit, converti en µL/cm², respectivement, pour *C. zeylanicum* 0.0236, 0.0472, 0.1415, 0.2829 et pour *C. cassia* 0.0005, 0.0012, 0.0024, 0.0047. Les dilutions ont été réalisées à partir d'huile 100% et d'acétone. Les conditions sont toujours réalisées dans le même ordre : acétone puis *C. zeylanicum* (concentrations croissantes) et *C. cassia* (concentrations croissantes). Les gants sont changés entre les différentes huiles afin d'éviter les contaminations. Deux séries de 9 vidéos ont été réalisées par après-midi. Dans un objectif de diminuer l'impact potentiel de facteurs extérieurs (biais), plusieurs dispositions ont été prises : les manipulations se dérouleront toujours entre 13h30 et 16h, dans une pièce à température et humidité stables (cf. Annexe 4) sur des individus de exactement 7 jours et dans un caisson opaque, sur une plaque lumineuse à lumière rouge (Figure 6). L'objectif de ce caisson étant de plonger l'individu dans des conditions stables et obscures étant donné que *S. granarius* ne perçoit pas la lumière rouge, tout en conservant une certaine visibilité pour la caméra.

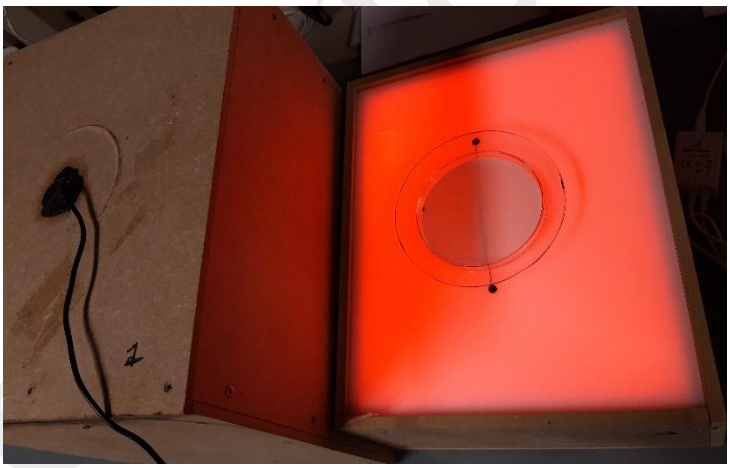


Figure 6 Dispositif expérimental utilisé pour filmer les insectes. La boîte de Pétri divisée en deux zones, est recouverte d'une plaque en verre transparente afin d'éviter la fuite de l'insecte et posée sur une plaque lumineuse à lumière rouge. L'insecte est déposé au centre de la boîte de Pétri au début de l'expérience. Le caisson contenant la caméra est opaque.

La boîte est placée à une place déterminée dans ce dispositif, l'acétone à droite pour une série, et à gauche pour la deuxième[5]. De cette façon, le choix préférentiel de l'insecte pour une zone ne sera pas lié à un coté mais bien au traitement. De plus, la température et l'humidité ont été enregistrées durant toute la durée de l'expérience, à l'aide d'un HOBO® temp/RH logger UX100-003. Les données ont été récoltées via le logiciel HOBOware et analysées via Excel.

[5] Excepté le premier jour, où une seule série qui a été réalisée (avec l'acétone à droite).

La moyenne et l'écart type sont calculés afin de vérifier la stabilité des conditions de la pièce lors de toutes les expériences.

Le comportement de l'insecte est filmé durant 5 minutes à l'aide d'une webcam Logitech HD pro C920 fixée au plafond du caisson. Les réglages vidéo sont réalisés via le logiciel Logitech Capture tels que : luminosité à 203, contraste à 89, mise au point sur 25, netteté au maximum et les autres paramètres au minimum. La webcam enregistre à 25 frames par seconde soit 7500 frames par vidéo.

La vidéo est analysée à l'aide d'un code python (Annexe 5) qui permet de compter le nombre de secondes que l'insecte passe dans une zone. La boîte de pétri est divisée en 2 zones en passant au niveau de la séparation entre les deux papiers filtres. Ce nombre de secondes est ensuite converti en pourcentage de temps par rapport à l'entièreté de la vidéo. A côté de cela, un schéma reprenant la trajectoire de l'insecte dans la boîte est visible. Au plus il passe de temps à un endroit, au plus la couleur est intense (Figure 7).

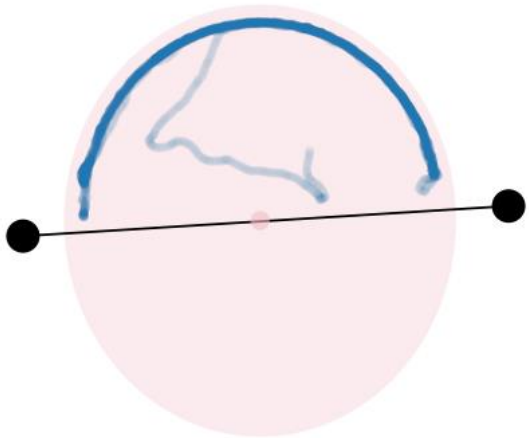


Figure 7 Illustration d'une trajectoire analysée par le code python. Dans ce cas-ci, le traitement à l'huile est en dessous. Cette illustration permet de visualiser un passage plus intense (couleur plus foncée) sur le haut de la boite alors que la trajectoire plus centrale est un passage simple (couleur plus claire).

Pour faciliter l'analyse, le pourcentage de temps passé sur le papier filtre traité à l'huile est soustrait au pourcentage de temps passé sur le papier filtre traité à l'acétone. La différence obtenue traduit alors une préférence pour la zone traitée à l'huile dans le cas où cette différence est négative. Dans le cas d'une différence positive, cela signifie que l'insecte passe plus de temps sur la zone traitée à l'acétone. L'intervalle de confiance est calculé sur les moyennes de chaque concentration et une analyse des variances à un facteur (ANOVA) sur le logiciel R version 3.5.3 (©R Foundation for Statistical Computing, 2019) permet de comparer les moyennes. Tous les tests sont appliqués avec un seuil de significativité de 0.05. Cette technique statistique est inspirée d'articles de Le Goff *et al.* (2012b; a).

8.7 Rémanence

Les boîtes de Pétri contenant des grains ont été traitées selon le protocole de pulvérisation décrit au point 8.4.A, à la différence que les boîtes traitées ne contiennent pas d'insectes.

La dose utilisée pour traiter les boîtes correspond à la moyenne des LD95 des trois courbes ± son écart type pour chaque huile (en condition scellée-contact) (Tableau 3). Cette valeur a été retenue étant donné que, pour des causes techniques, la dose exacte appliquée n'est pas déterminable. En effet, le volume pulvérisé n'est pas directement lié à la dose mesurée par pesée des boîtes. Pour un même volume mis dans la tour, une certaine variabilité est observée sur la dose déposée sur les boîtes entre différentes actions de pulvérisation. Il est donc techniquement impossible de pulvériser plusieurs fois une dose précise.

Tableau 3 Moyenne des LD95 des trois réplicats par huile ainsi que l'écart-type correspondant.

	C. cassia	***C. zeylanicum***
Intervalle de dose (mg)	4,13 ±0,28	12,7 ±0,9

Normalement, ces valeurs devaient correspondre aux résultats du point toxicité (9.2.A) soit le calcul des moyennes et écart type selon le premier modèle. Cependant, pour une raison de timing, cette expérience a été réalisée avant l'obtention des résultats actuels. Pour les doses utilisées ici, les LD95 ont été calculés en prenant en compte les 75 points par courbe. Alors que les résultats présentés finalement au point 9.2.A sont obtenus sur base de l'analyse des courbes comme étant 25 moyennes de 3 points. Une légère différence est donc observée bien que celle-ci reste minime.

Pour *C. zeylanicum*, un screening de mortalité a aussi été réalisé afin de tester le protocole. Ce screening a permis d'appuyer le choix des temps (50% de mortalité après 30 min d'aération).

Dix pulvérisations ont été réalisées par huile. Par pulvérisation, il y a trois boîtes traitées. L'une représente le témoin positif : les insectes sont directement ajoutés, la boîte est scellée et mise à l'étuve. Les deux autres représentent un gradient de temps d'aération : elles sont dotées d'un couvercle « ouvert » comme décrit dans la Figure 5 au point 8.4.B durant une durée déterminée au préalable via une expérience préliminaire. Ces durées sont de 30 minutes et 3 heures pour *C. cassia* et 30 minutes et 6 heures pour *C. zeylanicum*. Après cette aération à température ambiante (valeurs exactes au point 9.5), 20 insectes sont ajoutés par boîte avant de sceller et mettre à l'étuve (28°C et 80% HR). Pour toutes les boîtes, la mortalité est relevée 24 heures après l'ajout des insectes. Six boîtes non traitées contenant 20 insectes et la même

Confidentiel

quantité de grain représentent le témoin négatif. Elles sont directement scellées et mises à l'étuve 24 heures.

9 Résultats

9.1 Analyse GC-MS

a. Cinnamomum cassia

Les résultats complets de l'analyse GC-MS sont visibles dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Selon cette analyse, la molécule principale est le *trans*-cinnamaldéhyde et représente 87,81 % de l'huile. Les autres molécules sont retrouvées en faible quantité. Les plus importantes sont le cinnamaldehyde, le o-methoxy-cinnamaldehyde et l'alpha-copaene avec respectivement 3.38, 3.70 et 1.59 %. Ces résultats ont été comparés avec l'analyse GC-MS réalisée par l'entreprise Pranarom qui fournit les huiles. Leurs résultats sont visibles en Annexe 6 et seront discutés au point 10.1.a.

Tableau 4 Résultats de l'analyse GC-MS de l'huile C. cassia. Le nom des molécules identifiées est suivi de leurs numéros CAS correspondants ainsi que de la probabilité que ce soit cette molécule (MQ) et du pourcentage de cette molécule dans l'huile.

Molécules	***N° CAS***	***MQ***	***%***
Alpha-pinène	80-56-8	97	0,115628
Camphène	79-92-5	94	0,082281
Benzaldehyde	100-52-7	96	0,986393
Limonene	138-86-3	62	0,106882
2-hydroxy-benzaldehyde	90-02-8	97	0,561257
p-methoxystyrene	637-69-4	87	0,228571
Hydrocinnamaldehyde	104-53-0	97	0,899066
Cinnamaldehyde	104-55-2	96	3,379908
o-methoxybenzaldehyde	135-02-4	99	0,349348
Trans-cinnamaldehyde	14371-10-9	97	**87,80871**
Alpha-copaene	3856-25-5	99	1,580609
Delta-cadinene	483-76-1	98	0,199168
o-methoxy-cinnamaldehyde	1504-74-1	97	3,702177

b. Cinnamomum zeylanicum

Comme pour le point précédent, les résultats complets de l'analyse GC-MS sont visibles dans le tableau ci-dessus (Tableau 5). Selon cette analyse, la molécule principale est l'eugénol et représente 75,37 % de l'huile. Parmi les autres molécules on retrouve, entre autres, le caryophyllene l'isoeugenol, l'aceteugenol, du linalool L ou encore du cinnamaldehyde, respectivement à 4.85, 2.16, 2.21, 2.24 et 1,14 %. Ces résultats ont été comparés avec l'analyse GC-MS réalisée par l'entreprise Pranarom qui fournit les huiles. Leurs résultats sont visibles en Annexe 7 et seront discutés au point 10.1.b.

Tableau 5 Résultats de l'analyse GC-MS de l'huile C. zeylanicum. Le nom des molécules identifiées est suivi de leurs numéros CAS correspondants ainsi que de la MQ (probabilité que ce soit cette molécule) et du pourcentage de cette molécule dans l'huile.

Molécules	***N° CAS***	***MQ***	***%***
Alpha-thujene	2867-05-2	94	0,152999
Alpha-pinène	80-56-8	96	1,223465
Camphène	79-92-5	97	0,326614
2-Beta-Pinene	127-91-3	96	0,232218
l-Phellandrene	99-83-2	95	1,803014
Alpha-terpinène	99-86-55	98	0,11183
Benzène	527-84-4	95	1,176758
Beta-Phellandrene	555-10-2	87	1,219207
Linalool L	78-70-6	97	2,241973
Alpha-Terpinéol	98-55-5	91	0,267205
Cinnamaldehyde	14371-10-9	98	1,143478
Safrole	94-59-7	98	0,944021
Eugenol	97-53-0	98	**75,37393**
Alpha-Copaene	3856-25-5	99	0,878161
Phenol	5912867	98	0,396197
Caryophyllene	87-44-5	99	4,85202
rans-Cinnamyl acetate	21040-45-9	98	0,445335
Isoeugenol	5932-68-3	98	2,163523
Alpha-Humulene	6753-98-6	98	0,914389
Aceteugenol	93-28-7	98	2,212049
Caryophyllene oxide	1139-30-6	96	0,270012
Benzyl-benzoate	120-51-4	98	1,651602

9.2 Toxicité

A. Doses létales globales

Les 3 courbes de mortalité par huile en condition « scellée contact » sont visibles en Annexe 9Annexe 8. Les LD50 et LD95 ont été déterminées avec le premier modèle présenté au point 8.4. Ensuite, une moyenne de celles-ci, par huile et condition a été calculée. Ces moyennes sont reprises dans le Tableau 6.

Tableau 6 Toxicité de C. cassia et C. zeylanicum sur Sitophilus granarius en 24 heures en condition « scellée contact ». Les doses létales (LD50 et LD95) en mg sont reprises avec leurs intervalles de confiance (n=3).

Condition	**Dose létale**	***C. cassia***	***C. zeylanicum***
Scellée contact	LD50	1,9 ±0,01	6,04 ±0,18
	LD95	4,25 ±0,72	12,70 ±0,78

L'huile *C. cassia* a des valeurs de LD50 et LD95 plus faibles que *C. zeylanicum*, elle semble donc plus toxique pour *S. granarius* en 24 heures en condition « scellée contact ».

Confidentiel

B. Mode d'action

L'expérience de fumigation a été réalisée en traitant les boîtes avec des doses nettement supérieures aux LD95 obtenues précédemment en condition « scellée contact ». Soit un maximum de 20,1 mg de *C. cassia* (LD95 scellé contact de 4,25 ±0,01 mg) et 24,7 mg de *C. zeylanicum* (LD95 scellé contact de 12,70 ±0,78 mg). Malgré ces doses, un maximum de 1,67 % de mortalité[6] a pu être relevé pour 2 doses dans le cas de *C. zeylanicum* et pour 7 doses pour *C. cassia.* A noter que la faible mortalité relevée ne correspond pas aux doses les plus élevées. Aucune mortalité n'a été relevée dans les témoins négatifs. Etant donné cette très faible mortalité, l'expérience n'a pas été répliquée.

C. Molécules principales

Les 3 courbes de mortalité par molécule principale sont visibles en Annexe 10. Calculés comme au point A, les résultats de toxicité pour les molécules principales des deux huiles étudiées sont repris dans le Tableau 7.

Tableau 7 Toxicité des molécules principales de C. cassia (trans-cinnamaldehyde) et C. zeylanicum (eugénol) comparées à la toxicité de leurs huiles correspondantes sur Sitophilus granarius en 24 heures en condition « scellée contact ». Les doses létales (LD50 et LD95) en mg sont reprises avec leurs intervalles de confiance (n=3).

Condition	**Dose létale**	***Trans-cinnamaldehyde***	***C. cassia***	***Eugénol***	***C. zeylanicum***
Scellée contact	LD50	1,91 ±0,27	1,9 ±0,01	5,62 ±0,65	6,04 ±0,18
	LD95	3,31 ±0,31	4,25 ±0,72	11,28 ±0,19	12,70 ±0,78

Les LD50 et 95 de la molécule principale de *C. cassia* (*trans*-cinnamaldehyde) sont plus faibles que ceux de la molécule principale de *C. zeylanicum* (eugénol). Le *trans*-cinnamaldehyde est donc plus toxique que l'eugénol pour *S. granarius* en 24 heures.

Des tests de Student ont été réalisés afin de comparer les moyennes des LD50 et LD95 des molécules principales avec ces valeurs pour l'huile correspondante. L'objectif étant de déterminer si ces valeurs sont significativement différentes. Les résultats sont visibles dans le Tableau 8.

[6] Calculée en faisant la moyenne de mortalité des 3 boites d'une même pulvérisation donc une seule présentait 1 individu décédé sur n=20.

Confidentiel

Tableau 8 Résumé des tests de Student (df=4, bilatéral, P=0.05) des comparaisons entre la mortalité de l'huile et celle de sa molécule principale. Les intervalles de confiances sont entre crochets, avec les p-valeurs en dessous.

Dose létale	*C. cassia* et *Trans*-cinnamaldéhyde	*C. zeylanicum* et eugénol
LD50	[-0.35 ; 1.14] pvaleur = 0.22	[-0.19 ; 2.25] pvaleur = 0.08
LD95	[-0.87 ; 0.71] pvaleur = 0.79	[0.43 ; 2.82] pvaleur = 0.02

Ces tests de Student n'ont pas permis, excepté pour la LD95 de *C. zeylanicum*, de mettre en évidence une différence significative entre la mortalité causée par l'huile et celle causée par sa molécule principale. Selon ces résultats, la molécule principale cause la même mortalité que l'huile correspondante pour *C. cassia*. Pour *C. zeylanicum*, cela ne semble pas être le cas pour la LD95. De plus, la p-valeur pour la LD50 de la comparaison pour cette même huile est plus faible que les p-valeurs observées pour *C. cassia*. Cependant, ces tests de Student sont peu puissants étant donné qu'ils ne comparent que 2 groupes de 3 moyennes.

Un modèle plus complexe, décrit au point 8.4, permet de comparer la totalité des courbes entre elles. Ce deuxième modèle rejoint les conclusions du test de Student pour *C. cassia*. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre la mortalité causée par cette huile et sa molécule principale (p-valeur=0.569). Par contre, pour *C. zeylanicum*, le modèle montre une différence significative avec la mortalité causée par sa molécule principale (p-valeur= $9{,}99.10^{-4}$). Ce résultat rejoint la conclusion du test de Student et sera discuté plus loin.

9.3 Impact de l'aération

Les 3 courbes de mortalité par huile en condition ouvert sont visibles en Annexe 12 Annexe 13. Calculés comme pour le point précédent, les résultats de toxicité pour la condition « ouverte » comparées à la condition « scellée contact » sont présentés dans le Tableau 9.

Tableau 9 Toxicité de C. cassia et C. zeylanicum sur Sitophilus granarius en 24 heures en condition « scellé contact » et « ouvert ». Les doses létales (LD50 et LD95) en mg sont reprises avec leurs intervalles de confiance (n=3).

Condition	Dose létale	Scellée contact	*Ouvert*
C. cassia	LD50	1,9 ±0,01	7,74 ±0,18
	LD95	4,25 ±0,01	15,62 ±0,72
C. zeylanicum	LD50	6,04 ±0,18	13,80 ±0,57
	LD95	12,70 ±0,78	26,45 ± 2,14

Confidentiel

On constate que, comme en condition « scellée contact », *C. cassia* a aussi des LD50 et LD95 plus faibles que *C. zeylanicum*. L'intervalle de confiance de la LD95 de *C. zeylanicum* est important. Cela s'explique par le manque de données à 100% de mortalité, ce qui a induit une extrapolation trop importante par le modèle. Une illustration est disponible en Annexe 12. Les LD95 dans cette condition sont de 24.91, 25.15 et 29.28. En supprimant cette dernière valeur on obtient un LD95 de 25,03 ±0,14 mg, ce qui correspond à une valeur plus proche de la réalité. Cette LD95 est à confirmer par de nouvelles expériences.

En comparant les deux conditions, on constate que les doses létales en condition « ouvert » sont plus grandes que les doses létales en condition « scellé contact ». L'aération présente dans la condition couvercle « ouvert » conduit à une mortalité significativement inférieure à la condition scellée, pour une même dose.

Cette comparaison a aussi été réalisée grâce au deuxième modèle (GLM). Sans surprise, celui-ci conclu à une différence hautement significative entre les deux conditions, pour les deux huiles avec une p-valeur inférieure à 2.10^{-16}.

9.4 Répulsion

Le témoin, constitué de deux zones traitées à l'acétone a été analysé en dehors des analyses statistiques par huile. Les statistiques descriptives montrent qu'en moyenne la différence de temps entre le temps passé d'un côté de la boîte par rapport à l'autre est de - 2,90 %. Pour un témoin parfait, dans lequel l'insecte passerait le même temps de part et d'autre de la boîte, cette valeur serait de 0 % soit 50 % du temps passé sur le papier filtre traité avec l'huile soustrait à 50 % du temps passé sur celui traité à l'acétone. Notre témoin négatif se rapproche donc fortement d'un témoin parfait en termes de moyenne, montrant l'absence de biais dans le dispositif. L'intervalle de confiance et la médiane ont aussi été calculés et sont respectivement égaux à 12,68 % et 2,77 %.

Confidentiel

a. Cinnamomum cassia

Graphiquement, la figure représentant la relation entre les moyennes des différences par concentration (Figure 8) permet de voir un impact de la concentration sur le temps passé sur la zone traitée à l'acétone. En effet, au plus la différence est positive, au plus l'insecte passe de temps dans l'acétone.

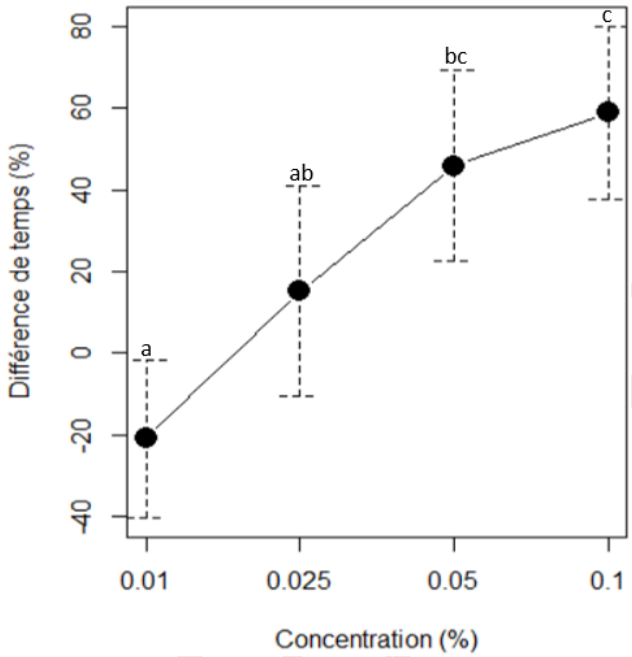


Figure 8 Plot de la soustraction du temps passé dans l'huile par rapport à l'acétone (en moyenne, n=21), en fonction de la concentration de l'huile C. cassia. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les concentrations ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (Tukey HDS test, P<0.05).

La concentration a un effet significatif selon l'ANOVA ($F = 10.85$, $df = 4$, $P = 2{,}9.10^{-7}$). Cependant, selon le test Post-Hoc, seules deux concentrations sont significativement différentes du témoin négatif. L'ensemble des contrastes est repris dans la Tableau 10.

*Tableau 10 Résumé du test de Tukey reprenant les intervalles de confiance et le taux de significativité (0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ') des contrastes par paire pour l'huile C. cassia à différentes concentrations (cc en %). Les concentrations ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (Tukey HDS test, P<0.05).*

[cc] (%)	**Témoin (a)**	**0,01 (a)**	**0,025 (ab)**	**0,05 (bc)**	**0,1 (c)**
0,01	[-57,49 ; 21,52]				
0,025	[-21,45 ; 57,57]	[-3,90 ; 75,99] (.)			
0,05	[9,27 ; 88,29] (**)	[26,82 ; 106,70] (***)	[-9,22 ; 70,66]		
0,1	[22,18 ; 101,20] (***)	[39,73 ; 119,61] (***)	[3,69 ; 83,57] (*)	[-27,03 ; 52,85]	

Confidentiel

Sur base du test de Tukey, on peut noter que les concentrations 0,05 et 0,1 % sont significativement différentes du témoin et de la concentration 0,01 %. Sur base de l'analyse graphique, ces concentrations semblent répulsives étant donné que leurs moyennes et leurs intervalles de confiance sont positifs.

La concentration 0,025 % a une moyenne de différences supérieure à 0 mais son intervalle de confiance est en partie dans la zone négative. De plus, elle n'est pas significativement différente du témoin. Il est donc difficile de conclure sur son caractère répulsif.

La conclusion pour l'analyse de la concentration 0,01 % est mitigée. D'un côté, le contraste de Tukey ne détecte pas de différence statistique avec le témoin. D'un autre côté, l'analyse graphique montre une moyenne de différence négative ainsi qu'un intervalle de confiance entièrement dans les négatifs. Ce qui pourrait mener à la conclusion que cette concentration a une tendance attractive ou neutre. Un plus grand nombre de réplicats pourrait permettre d'appuyer l'une ou l'autre tendance.

Confidentiel

b. Cinnamomum zeylanicum

Graphiquement, les moyennes des différences pour les trois premières concentrations (0.5, 1 et 3 %) semblent similaires (Figure 9). L'ANOVA à un facteur reprenant toutes les

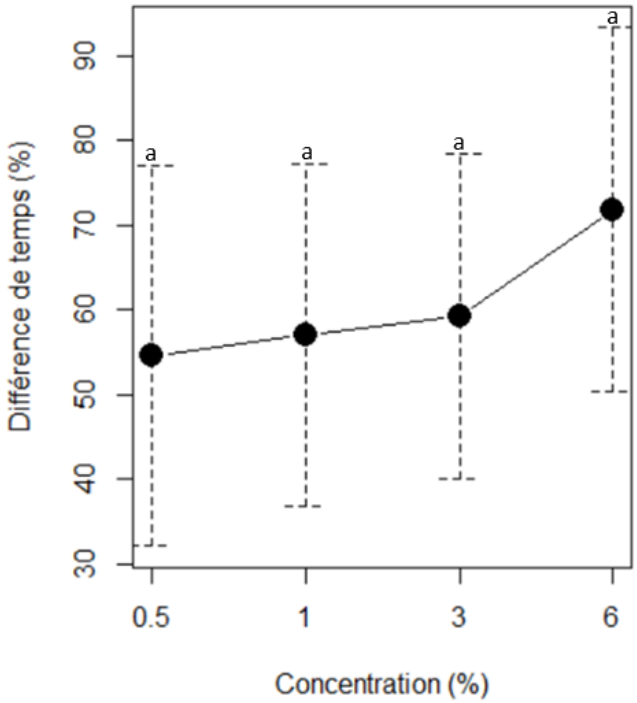


Figure 9 Plot de la soustraction du temps passé dans l'huile par rapport à l'acétone (en moyenne, n=21), en fonction de la concentration de l'huile C. zeylanicum. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les concentrations ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (Tukey HDS test, P<0.05)

concentrations et le témoin a permis de mettre en évidence un effet de la concentration ($F = 9.62$, $df = 4$, $P = 1{,}27.10^{-6}$) mais lorsque l'ANOVA est réalisée uniquement sur les concentrations testées, l'ANOVA est non significative ($F = 0.589$, $df = 3$, $P = 0.624$).

Quant à lui, le test de Tukey (Tableau 11) a montré une différence significative entre toutes les concentrations et le témoin mais aucune différence entre ces concentrations entre elles.

Confidentiel

*Tableau 11 Résumé du test de Tukey reprenant les intervalles de confiance et le taux de significativité (0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ') des contrastes par paire pour l'huile C. zeylanicum à différentes concentrations (cc en %). Les concentrations ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes (Tukey HDS test, P<0.05).*

[cc] (%)	Témoin (a)	0,5 (b)	1 (b)	3 (b)	6 (b)
0,5	[20,46 ; 94,42] (***)				
1	[22,96 ; 96,92] (***)	[-34,48 ; 39,48]			
3	[25,12 ; 99,08] (***)	[-32,31 ; 41,64]	[-34,82 ; 39,14]		
6	[37,74 ; 111,70] (***)	[-19,70 ; 54,20]	[-22,20 ; 51,75]	[-24,36 ; 49,60]	

Par contre, toutes les concentrations ont une moyenne et un intervalle de confiance se situant dans la partie positive de la différence (action répulsive).

9.5 Rémanence

a. Cinnamomum cassia

Le taux de mortalité moyen a été calculé pour chaque durée post-traitement sur base des 10 réplicats. Aucune mortalité n'a été détectée dans les 6 témoins négatifs. Au vu de la mortalité dans le témoin positif (pas d'aération après le traitement), la dose appliquée de 4,13 ±0,28 mg d'huile correspond effectivement bien au LD95 de l'huile comme décrit précédemment (Figure 10).

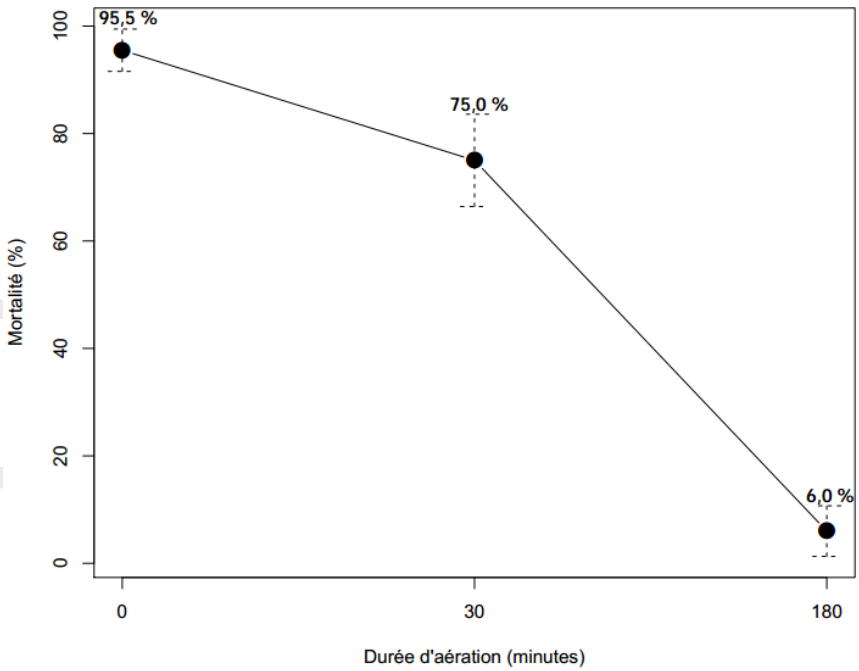


Figure 10 Taux de mortalité moyen (%) (n=10) en fonction de la durée d'aération post-traitement (0, 30 et 180 minutes) pour l'huile Cinnamomum cassia. Les boites sont traitées avec 4,13 ±0,28 mg d'huile. La température moyenne durant l'aération est de 22,94±0,02°C et l'humidité relative est de 21,27±0,73. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les valeurs situées au-dessus de ces barres représentent les moyennes calculées.

Graphiquement, les durées d'aération semblent avoir un effet significativement différent. Cela est confirmé par l'ANOVA (F = 531,32, df = 2, P = $5{,}619.10^{-16}$). Un test de Tukey a aussi montré que chaque durée d'aération avait un effet significativement différent des autres sur le pourcentage de mortalité avec une pvaleur inférieure à 0.0001 pour les contrastes 180 min VS 0 min et 30 min. Le contraste 30 min VS 0 min a quant à lui une pvaleur de 0.0000248.

Une diminution de 20,5 % de mortalité est observée après 30 minutes d'aération alors que cette diminution s'élève à 89,5 % après 180 minutes. Ces résultats peuvent être mis en relation avec les courbes d'évaporation de l'huile réalisée préalablement (Figure 11, Tableau 12). En effet, sans couvercle, l'évaporation moyenne (n=3) observée en conditions similaires (21,92 ±0,03°C et 48,86 ±0,38 HR) (sans couvercle) était de 26 et 85,9 %, respectivement pour 30 et 180 minutes d'aération. A noter que l'aération appliquée pour cette manipulation est sans couvercle et que les courbes d'aération (Figure 11) sont fournies à titre indicatif étant donné qu'elles ne sont pas exactement dans les mêmes conditions (température différant de 1°C). D'un point de vue pratique, cela est impossible à réaliser par un expérimentateur seul.

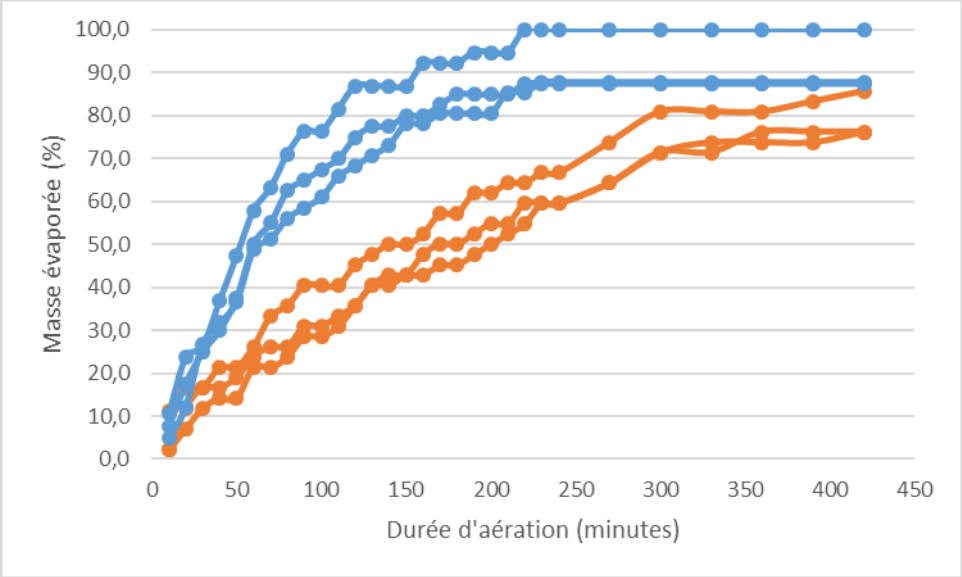


Figure 11 Courbes d'évaporation réalisées en boites dites « ouvertes » (couvercle troué d'une tulle) en orange et en boites sans couvercle en bleu traitées avec un traitement de 4,13 ±0,28 mg de C. cassia (n=3 par condition). Ces mesures ont été réalisées à 21,92 ±0,03°C et 48,86 ±0,38 HR.

Tableau 12 Mise en relation de la diminution de la mortalité (%) selon l'accroissement des durées d'aération par rapport à l'accroissement de l'évaporation sans couvercle (%) pour l'huile C. cassia avec un traitement de 4,13 ±0,28 mg avec n=3 par condition. Une estimation de la quantité d'huile restante après aération a été réalisée ainsi qu'une estimation de la mortalité correspondante (%). basée sur les résultats du point 8.4

Durée d'aération (minutes) (t_x)	Mortalité t_0 – Mortalité t_x (%)	Evaporation (sans couvercle) (%)	Estimation de la quantité restante après aération (mg)	Estimation de la mortalité correspondante (%)
0	0	0	0	95
30	-20,5	26	3,06	78
180	-89,5	85,9	0,58	5

b. Cinnamomum zeylanicum

Le taux de mortalité moyen a été calculé pour chaque durée post-traitement sur base des 10 réplicats. Aucune mortalité n'a été détectée dans les 6 témoins négatifs. Au vu de la mortalité dans le témoin positif (pas d'aération après le traitement), la dose appliquée de 12,7 ±0,9 mg d'huile semble légèrement inférieure à la LD95 de l'huile (Figure 12).

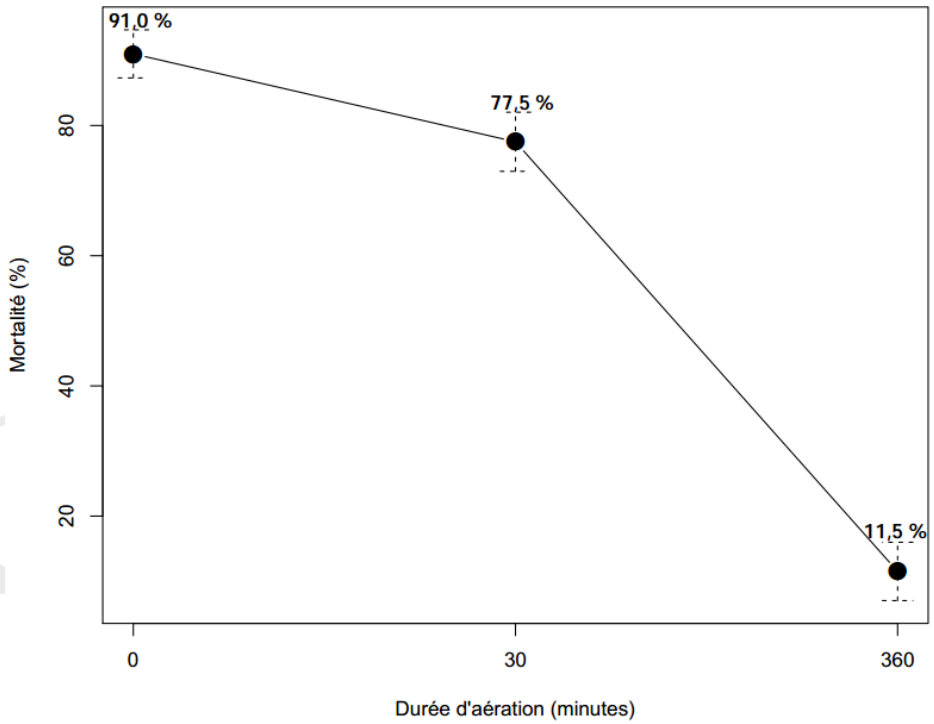


Figure 12 Taux de mortalité moyen (%) (n=10) en fonction de la durée d'aération post-traitement (0, 30 et 360 minutes) pour l'huile Cinnamomum zeylanicum. Les boites sont traitées avec 12,7 ±0,9mg d'huile. La température moyenne durant l'aération est de 22,69±0,05°C et l'humidité relative est de 29,9±0,2. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95%. Les valeurs situées au-dessus de ces barres représentent les moyennes calculées.

Graphiquement, les durées d'aération semblent avoir un effet significativement différent. Cela est confirmé par l'ANOVA (F = 492,74, df = 2, P = $2{,}512.10^{-16}$). Un test de Tukey a aussi montré que chaque durée d'aération avait un effet significativement différent des autres sur le pourcentage de mortalité avec une pvaleur inférieure à 0.0001 pour tous les contrastes.

Une diminution de la mortalité moyenne de 13,5 % est observée après 30 minutes d'aération (sans couvercle). Cette diminution s'élève à 79,5 % après 360 minutes dans les mêmes conditions. Ces résultats ne correspondent pas à l'évaporation observée lors de la manipulation réalisées préalablement en conditions similaires (21,73 ±0,03°C et 32,70 ±0,017 HR) (Figure 13), comme le montre le Tableau 13.

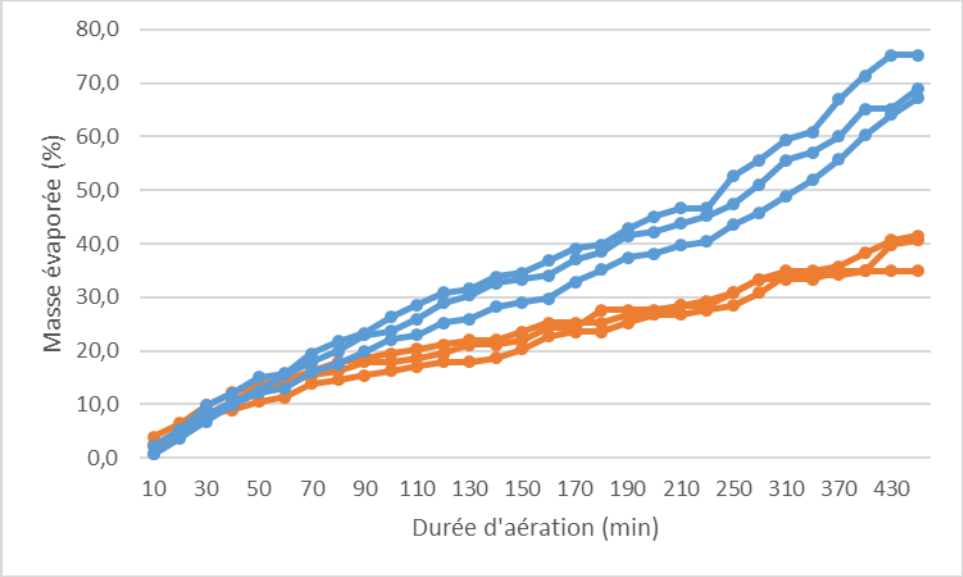


Figure 13 Courbes d'évaporation réalisées en boites dites « ouvertes » (couvercle troué d'une tulle) en orange et en boites sans couvercle en bleu traitées avec un traitement de 12,7 ±0,9mg de C. zeylanicum (n=3 par condition). Ces mesures ont été réalisées à 21,73 ±0,03°C et 32,70 ±0,017 HR.

Tableau 13 Mise en relation de la diminution de la mortalité (%) selon l'accroissement des durées d'aération par rapport à l'accroissement de l'évaporation sans couvercle (%) pour l'huile C. zeylanicum pour un traitement de 12,7 ±0,9 mg avec n=3 par condition. Une estimation de la quantité d'huile restante après aération a été réalisée ainsi qu'une estimation de la mortalité correspondante (%) basé sur les résultats du point 8.4.

Durée d'aération (minutes) (t_x)	**Mortalité t_0 - Mortalité t_x (%)**	**Evaporation (sans couvercle) (%)**	**Estimation de la quantité restante après aération (mg)**	**Estimation de la mortalité correspondante (%)**
0	0	0	0	95
30	-13,5	8,3	11,64	90
360	-79,5	60,0	5,08	30

Par exemple, la mortalité après 360 minutes d'aération diminue fortement (-79,5 %) alors que selon la courbe d'évaporation, seulement 37,8 % de l'huile se serait évaporés. Cependant, cet écart peut être dû au fait que les courbes n'aient pas été réalisées le même jour que l'expérience de rémanence et donc, pas exactement aux mêmes conditions de température et d'humidité relative.

10 Discussion

10.1 Analyse GC-MS

a. Cinnamomum cassia

La comparaison des résultats de la GC-MS réalisée à Gembloux avec celle réalisée par Pranarom sur le même lot permet de mettre en évidence certaines différences. L'analyse par Pranarom permet d'identifier des molécules faiblement présentes dans l'huile (à 0,01 %) alors que notre analyse est moins précise (à 0,1 %). Cette différence entre les techniques conduit à identifier un plus grand nombre de molécules par la technique de Pranarom, la plus précise. Les résultats complets sont disponibles dans l'Annexe 6.

En ce qui concerne les molécules identifiées par notre analyse, elles sont effectivement présentes dans l'autre analyse sauf 3 molécules : le 2-hydroxy-benzaldehyde, le p-methoxystyrene, l'hydrocinnamaldehyde. Ces molécules peuvent être des erreurs d'identification avec le logiciel d'analyse (MSD Chemstation).

Aussi, certaines molécules présentes à plus de 0,5 % dans l'analyse par Pranarom ne sont pas identifiées dans notre analyse : aldehyde salicylique (0,69 %), le benzenepropanal (0,78 %) et alcool phenylethylique (0,98 %).

Tableau 14 Comparaison des résultats obtenus par GC-MS à Gembloux avec la fiche GC-MS fournie par Pranarom pour C. cassia. Seules les molécules identifiées dans la première GC-MS sont reprises dans ce tableau. Le % représente la proportion de la molécule dans l'huile en pourcentage. L'analyse complète des huiles par Pranarom est disponible en Annexe 6. La différence absolue est calculée afin de visualiser l'écart entre les pourcentages des 2 GC-MS. Les valeurs en gras sont celles des % de la molécule principale.

Molécules	***N° CAS***	***MQ***	***%***	***% selon Pranarom***	***Différence (absolue)***
Alpha-pinène	80-56-8	97	0,12	0,08	0,04
Camphène	79-92-5	94	0,08	0,05	0,03
Benzaldehyde	100-52-7	96	0,99	1,14	0,15
Limonene	138-86-3	62	0,11	0,04	0,07
2-hydroxy-benzaldehyde	90-02-8	97	0,56		
p-methoxystyrene	637-69-4	87	0,23		
Hydrocinnamaldehyde	104-53-0	97	0,90		
Cinnamaldehyde	104-55-2	96	3,38	0,34	3,04

Confidentiel

o-methoxybenzaldehyde	135-02-4	99	0,35	0,42	0,07
Trans-cinnamaldehyde	14371-10-9	97	**87,81**	**79,89**	7,92
Alpha-copaene	3856-25-5	99	1,58	0,80	0,78
Delta-cadinene	483-76-1	98	0,20	0,29 (avec le γ-cadinene)	0,09
o-methoxy-cinnamaldehyde	1504-74-1	97	3,70	5,26	1,56

Au-delà de ces différences, les pourcentages de présence peuvent être comparés. Ces différences, en valeurs absolues, sont présentes dans le Tableau 14. Pour certaines molécules, la différence est relativement faible. Cependant pour la molécule principale et le cinnamaldehyde, cette différence s'élève, respectivement à 7,92 % et 3,04 %.

Suite à l'identification de ces différences entre les résultats des deux techniques, la suite des analyses se fera sur base des résultats de Pranarom, jugés plus précis et exacts.

b. Cinnamomum zeylanicum

Pour les mêmes raisons que pour l'huile précédente, un plus grand nombre de molécules a été identifié par la technique de Pranarom, plus précise. Les résultats complets sont disponibles dans l'Annexe 7. Dans le sens inverse, trois molécules identifiées par notre analyse ne sont pas retrouvées dans l'analyse par Pranarom. Le benzène et le phénol pourraient être des contaminants.

Par contre, les différences de pourcentage entre les molécules identifiées par chaque technique sont généralement assez faibles. Pour la molécule principale, la différence est de 1%. Bien que ces résultats semblent relativement corrects, au vu des résultats obtenus pour l'autre huile, la suite des analyses se fera sur base des résultats de Pranarom, jugés plus précis et exacts.

Tableau 15 Comparaison des résultats obtenus par GC-MS à Gembloux avec la fiche GC-MS fournie par Pranarom pour C. zeylanicum. Seules les molécules identifiées dans la première GC-MS sont reprises dans ce tableau. Le % représente la proportion de la molécule dans l'huile en pourcentage. L'analyse complète des huiles par Pranarom est disponible en Annexe 7. La différence absolue est calculée afin de visualiser l'écart entre les pourcentages des 2 GC-MS. Les valeurs en gras sont celles des % de la molécule principale.

Molécules	***N° CAS***	***MQ***	***%***	***% par Pranarom***	***Différence (absolue)***
Alpha-thujene	2867-05-2	94	0,15	0,14	0,01
Alpha-pinène	80-56-8	96	1,22	1,06	0,16
Camphène	79-92-5	97	0,33	0,34	0,01
2-Beta-Pinene	127-91-3	96	0,23	0,33	0,10
l-Phellandrene	99-83-2	95	1,80	1,33	0,47
Alpha-terpinène	99-86-55	98	0,11	0,12	0,01
Benzène	527-84-4	95	1,18		
Beta-Phellandrene	555-10-2	87	1,22	0,44	0,78

Confidentiel

Linalool L	78-70-6	97	2,24	2,27	0,03
Alpha-Terpinéol	98-55-5	91	0,27	0,3	0,03
Cinnamaldehyde	14371-10-9	98	1,14	1,23	0,09
Safrole	94-59-7	98	0,94	0,99	0,05
Eugenol	97-53-0	98	**75,37**	**76,43**	1,06
Alpha-Copaene	3856-25-5	99	0,88	0,57	0,31
Phenol	5912867	98	0,40		
Caryophyllene	87-44-5	99	4,85	3,56	1,29
trans-Cinnamyl acetate	21040-45-9	98	0,45	1,45	1,00
Isoeugenol	5932-68-3	98	2,16		
Alpha-Humulene	6753-98-6	98	0,91	0,58	0,33
Aceteugenol	93-28-7	98	2,21	1,79	0,42
Caryophyllene oxide	1139-30-6	96	0,27	0,42	0,15
Benzyl-benzoate	120-51-4	98	1,65	3,18	1,53

10.2 Toxicité

A. Doses létales globales

Au vu des résultats de LD50 et LD95 obtenus, *C. cassia* semble être plus efficace que *C. zeylanicum* dans les conditions testées. Le LD95 de *C. cassia* est trois fois inférieur à celui de *C. zeylanicum*, ce qui signifie qu'il faut une dose trois fois inférieure pour atteindre la même mortalité. *C. cassia* semble donc être une huile plus efficace en 24 heures, dans ces conditions. Cependant, des nuances sont à apporter. Premièrement, il est possible que l'huile tue plus rapidement les insectes. Il serait intéressant de réaliser le même protocole avec des durées d'exposition plus courtes et plus longues. Deuxièmement, *C. zeylanicum* a peut-être, à plus long terme une meilleure efficacité, ce qui permettrait de diminuer la dose appliquée (e.g. 95% de mortalité après 48 heures d'exposition à la LD50 24 heures). Bien que le traitement idéal soit un traitement qui tue ou rend KO rapidement les insectes afin de limiter leur reproduction et leur dispersion au sein du silo, dans les couches de grains non traitées par exemple. Ces aspects sont donc à approfondir.

Ensuite, bien que *C. cassia* ait un effet insecticide, nos données doivent être remises à l'échelle d'un traitement en silo afin d'évaluer la faisabilité d'un traitement à grande échelle. Pour la moyenne des LD95 obtenues en condition scellée contact pour *C. cassia*, soit 4,25 mg de traitement pour une boîte contenant 14,48 grammes de grains, on peut estimer qu'il faudrait 278,47 ml d'huile pure pour tuer 95 % de *S. granarius* en 24 heures dans une tonne de grains. Cette conversion est une évaluation basée sur la densité de l'huile mais elle n'est pas précise étant donné qu'elle est basée sur des conditions de laboratoire et demande une phase de scaling up pour être vérifiée. En effet, en réalité, les silos ne sont pas étanches (e.g. évaporation) et on

Confidentiel

peut difficilement extrapoler que le traitement de centaines de tonnes de grains équivaudra au traitement de 14,48 grammes de grains. Ces estimations doivent donc être prises comme une base de travail future et devront faire l'objet de recherches ultérieures.

Quoi qu'il en soit, ces résultats sont loin des doses d'insecticides chimiques utilisés actuellement comme le Talisma UL (42 à 84 ml/tonne) (Biosic SA., 2018) indiquant une activité insecticide 4 à 9 fois moindre dans le cas de *C. cassia*. Ce facteur étant plus important pour *C. zeylanicum*.

De nombreuses recherches doivent encore être réalisées afin d'obtenir un traitement insecticide essentiellement basé sur cette huile. Notamment, une recherche de synergies entre cette huile et un autre composant naturel (e.g. huile végétale) pourrait permettre de diminuer la quantité d'huile dans le traitement et ainsi diminuer le prix. Aussi, des tests de mortalité sur d'autres espèces de ravageurs (champignons et insectes) pourraient fournir une vision plus globale de l'efficacité de l'huile.

B. Mode d'action

L'objectif de cette expérience est d'isoler la part de mortalité due à la fumigation afin de la comparer à la toxicité totale. Les résultats ont montré que malgré des doses d'huile nettement supérieures aux LD95 en condition « scellée contact », seule une très faible mortalité a pu être observée. Cette mortalité étant dispersée aléatoirement au sein des différentes doses, il n'a pas été montré que la fumigation avait un pouvoir insecticide sur *S. granarius* en 24 heures. L'hypothèse selon laquelle « la toxicité totale d'une huile essentielle correspond à la somme de la toxicité par contact, par ingestion et par fumigation. » semble donc fausse selon nos expériences. Dans notre protocole en boîte de Pétri, il semblerait que la fumigation n'ait pas ou peu de part dans la toxicité totale.

Pour rappel, l'expérience se déroule en boîtes scellées afin d'empêcher l'évaporation de l'huile et maintenir le gaz à l'intérieur de la boîte. Les insectes sont en contact avec le gaz mais pas avec les grains traités étant donné qu'ils sont confinés dans une boîte grillagée. Selon nos résultats, le pouvoir fumigeant de ces huiles en 24 heures serait donc nul malgré des doses s'élevant à 20,1 mg et 24.7 mg d'huile, pour une boîte de 78,5 cm^3 soit 0,256 mg/cm^3 pour *C. cassia* et 0,315 mg/cm^3 pour *C. zeylanicum*.

Aucune donnée sur le pouvoir fumigeant des huiles entières *C. cassia* et *C. zeylanicum* sur *S. granarius* n'a été trouvée dans la bibliographie afin de comparer avec nos résultats.

Confidentiel

Par contre, une notion doit être soulignée : le pouvoir fumigeant peut varier d'une espèce à l'autre. En effet, Rozman *et al.* (2007), ont testé le pouvoir fumigeant de plusieurs huiles et molécules. Ils ont montré que, pour une dose de 0,1 µL/720 cm^3 d'air, l'eugénol est capable de tuer, par fumigation, en 24 heures, 85 ±8,6 % de *Sitophilus oryzea*, 80 ±12,2 % de *Rhyzopertha dominica* mais seulement 12,5 ±6,29 % de *Tribolium castaneum.* Ce constat est encore plus flagrant avec d'autres composants comme le bornéol ou le thymol qui tuent 70 à 90 % des premières espèces mais 0 % de *Tribolium castaneum* à la même concentration, en 24 heures (Rozman *et al.*, 2007). Les expériences de fumigation de *C. cassia* et *C. zeylanicum* devraient donc être reproduites sur d'autres espèces de ravageurs afin d'évaluer leur efficacité en fonction de l'espèce.

Par contre, cette même équipe (2006), avec le même protocole de fumigation, a montré que l'eugénol est capable de tuer 97 ±2 % de *S. granarius* en 24 heures (Rozman *et al.*, 2006). Ces résultats posent questions par rapport aux résultats obtenus ci-dessus. Nos différences de protocoles (papier filtre VS boîte de Pétri pulvérisée) pourraient être une cause.

Dans un contexte pratique de stockage en silo, la toxicité par fumigation permettrait d'atteindre l'entièreté du silo via les gaz. Dans ce cas-ci, si la fumigation n'a pas d'effet insecticide, le traitement doit être appliqué de sorte que les insectes soient physiquement en contact avec l'huile. Les techniques de pulvérisation actuelles semblent adaptées à ce mode d'action (principalement insecticides de contact).

Dans notre protocole en boîte de Pétri, il semblerait que l'huile ait un effet insecticide principalement par contact et ingestion. Il serait intéressant de réaliser deux autres expériences. Une première permettrait de dissocier le pouvoir insecticide du contact et de l'ingestion. Une seconde suivrait les protocoles classiques de fumigation (papier filtre suspendu) afin de comparer avec les résultats obtenus en boîtes de Pétri. Cette dernière permettrait de confirmer les résultats ci-dessus via un autre protocole.

C. Molécules principales

L'objectif de ce paragraphe est de savoir si la molécule principale est responsable de l'entièreté de la toxicité de l'huile. En théorie, si cette hypothèse est confirmée, la LD50 de la molécule devrait correspondre à 76,43 % de la LD50 de l'huile dans le cas de *C. zeylanicum* et 79,5 % pour *C. cassia.*

Confidentiel

Au vu des tests de Student réalisés pour comparer les doses létales obtenues via le premier modèle, la mortalité causée par *C. cassia* correspond à la mortalité causée par sa molécule principale. Par contre, pour *C. zeylanicum*, le test de Student a montré une différence significative entre la mortalité causée par la LD95 de l'eugénol et celle causée par *C. zeylanicum*. Ce résultat est discuté plus bas, avec les résultats du deuxième modèle. Un tableau récapitulatif des LD relevées est visible ci-dessous (Tableau 16). Le deuxième modèle rejoint les conclusions du premier modèle.

Tableau 16 Ensemble des LD50 et LD95 (mg) des huiles étudiées et de leurs molécules principales correspondantes (gras) sur Sitophilus granarius en 24 heures en condition « scellée contact ». Les valeurs après le ± correspond à leurs intervalles de confiance (n=3).

Traitement	LD50	LD95
C. cassia	1,9 ±0,01	4,25 ±0,72
Trans-cinnamaldehyde	**1,91** ±0,27	**3,31** ±0,31
C. zeylanicum	6,04 ±0,18	12,70 ±0,78
Eugénol	**5,62** ±0,65	**11,28** ±0,19

Si les LD de *C. zeylanicum* sont ramenées à la proportion d'eugénol (76,43 %), on obtient une LD50 de 4,6 et une LD95 de 9,7. La comparaison de ces résultats avec les LD de la molécule pure conduit à la conclusion que l'huile est plus efficace que la molécule pure. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la molécule principale interagit avec un autre composant, ce qui conduit à un plus grand effet insecticide (e.g. synergie). Cette hypothèse est à vérifier à l'aide d'expériences supplémentaires telles que des tests de mortalité de la molécule principale avec certains composants secondaires (e.g. caryophyllene (4,85%), aceteugenol (2,21%), isoeugenol (2,16%), *etc.*). Cela permettrait d'identifier une potentielle interaction entre ces molécules.

De plus, au vu de la variabilité entre les courbes, des expériences supplémentaires devront aussi être réalisées afin de comparer la toxicité de l'eugénol et de l'huile. Celles-ci permettraient de confirmer la différence d'efficacité.

En conclusion, il semblerait que la molécule principale de *C. cassia* soit responsable de la totalité de la toxicité de l'huile alors que pour *C. zeylanicum*, la molécule principale semble moins efficace que l'huile entière.

10.3 Impact de l'aération

Comme attendu, la dose nécessaire en condition ouverte pour tuer la même proportion d'individus qu'en condition scellée est plus importante. Pour les LD95, la dose est 2 à 4 fois

Confidentiel

supérieure en condition ouverte selon l'huile envisagée. Cette baisse d'efficacité n'est pas due à la fumigation, cette possibilité ayant été éliminée au point précédent. L'explication peut venir des courbes d'évaporation. La valeur de l'augmentation est plus importante pour *C. cassia*. Tout d'abord, *C. cassia* semble s'évaporer plus rapidement que *C. zeylanicum*, ce qui pourrait expliquer la plus grande augmentation nécessaire. Ensuite, cette courbe d'évaporation permet de montrer la rapidité de l'évaporation des deux huiles ce qui expliquerait que la dose nécessaire pour tuer 95 % des individus en 24 heures en condition ouverte doive être plus grande qu'en condition scellée. Comme développé plus loin, la quantité d'huile restante (fraction liquide) dans les boîtes de Pétri diminue fortement au cours du temps. Cela entraine donc une diminution de la mortalité. La fumigation n'est pas prise en compte ici étant donné que les expériences précédentes ont montré une absence de toxicité par fumigation. De plus, les grains pourraient potentiellement absorber une part de l'huile et ainsi réduire la fraction liquide. Cependant, cet aspect n'a pas été étudié.

Les résultats sont cohérents avec les résultats de Kim *et al.* (2003) sur des individus de l'espèce *S. oryzae* (Tableau 17).

Tableau 17 Sensibilité d'adultes S. oryzae exposés à 0,7 mg/cm² d'huile de C. cassia durant 24 heures, sous différents traitements. Chaque valeur représente la moyenne de 5 réplicats, chacun contenant 20 insectes (n=100) (Kim et al., 2003).

Traitements	Mortalité moyenne (%) ±écart type
Boîte fermée, insectes en contact	100 ±0
Boîte ouverte, insectes en contact	33 ±3,3

Dans cet article, 20 individus sont placés dans un récipient recouvert d'une tulle. Le traitement est appliqué sur du papier filtre (Whatman No. 2) et placé au fond d'une tasse en polyéthylène. Les insectes sont en contact avec le papier filtre (Kim *et al.*, 2003), il n'y a donc pas d'influence du grain comme dans notre protocole. Ils observent une forte diminution de la mortalité dans la condition ouverte. Pour une même dose, la mortalité diminue de 67 % en passant de boîte fermée à boîte ouverte. Cependant, cette équipe attribue cette baisse de mortalité à la fumigation alors que nos expériences montrent que la fumigation n'a pas ou très peu de pouvoir insecticide.

La mise en évidence d'un impact fortement négatif de l'évaporation de l'huile due à l'aération sur la toxicité du traitement pour *S. granarius* pose question dans le cadre de l'utilisation des huiles en silo de céréales. En effet, dans les silos, il existe des cheminées d'air[7]

[7] Chemins préférentiels de l'air

Confidentiel

constituées des nombreux espaces d'air entre les grains. Plus les grains sont gros, plus l'aération peut être importante entre les grains. Pour donner un ordre de grandeur, le volume d'air dans une masse de blé représente environ 30 % du volume total (St-Pierre *et al*., 2014). La couche superficielle du silo est encore plus soumise à l'aération et donc à l'évaporation de l'huile. La couche superficielle et les cheminées d'aération, plus sensibles à cette aération, sont donc des zones où le traitement pourrait être moins efficace et créer des zones refuges. Une illustration d'un type d'aération possible dans un silo vertical est visible ci-dessus (Figure 14). A noter que les *S. granarius* ont tendance à suivre un géotropisme négatif lorsqu'ils sont perturbés (mouvement des grains, *etc*.). Cette réaction les mène donc dans la zone la plus aérée et donc la plus susceptible d'avoir perdu une partie, plus ou moins importante, de la dose du traitement. La dose appliquée initialement doit donc prendre en compte cette possible perte due à l'aération et au grand pouvoir volatile des huiles essentielles (étape de scaling up).

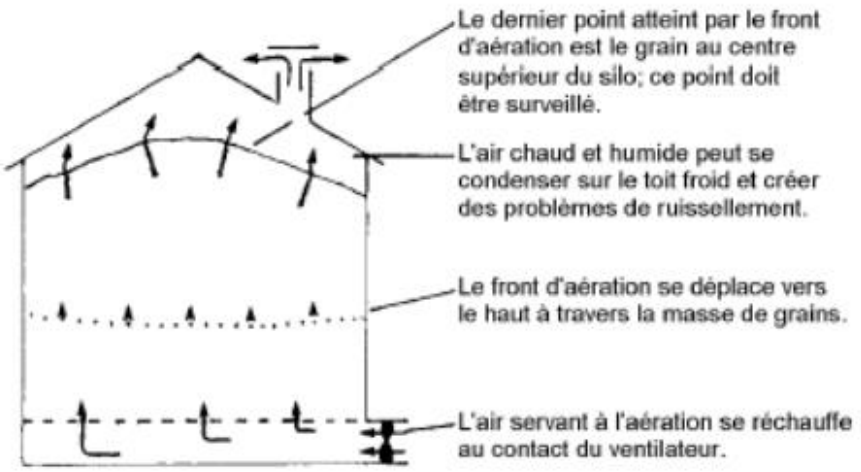


Figure 14 Exemple d'un silo vertical et d'un type d'aération possible. Les flèches noires représentent le sens de l'air (Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales, 2019).

10.4 Répulsion

a. Cinnamomum cassia

Les différences de temps passée de chaque côté, calculées précédemment nous indique un pouvoir répulsif dans le cas où leur valeur est positive. Dans le cas de *C. cassia*, le caractère répulsif a été mis en évidence. En effet, une concentration de 0,05 %, soit 0,0024 µL/cm² est répulsive (>50 % du temps dans l'acétone) pour 76 % des réplicats. Pour 43 % des réplicats l'huile est très répulsive (>90 % du temps dans l'acétone). Cependant, une importante variabilité est observée. Celle-ci pourrait potentiellement être réduite en augmentant le nombre de réplicats.

La concentration la plus faible testée (0.01 % soit 0.0005µL/cm²) a une moyenne des différences négatives (-20). Cela pourrait mener à la conclusion que cette concentration est attractive. En effet, lors de l'analyse des résultats brutes, seuls 4 réplicats (n=21) montrent un plus grand pourcentage de temps passé dans l'acétone alors que dans 9 réplicats, l'insecte passe plus de 60 % du temps dans l'huile. On pourrait s'attendre à ce que plus la concentration est faible, moins l'huile est répulsive mais dans ce cas elle semble avoir une tendance attractive. Des expériences ultérieures devraient être réalisées afin de vérifier cette tendance à basse concentration. De telles observations ont déjà eu lieu comme par exemple, dans une étude sur *Trialeurodes ricini* M. (un hémiptère), la concentration la plus élevée (1 %) d'eucalyptus citronné *Corymbia citriodora* H. avait un effet attractif plus faibles que la concentration précédente de 0,5 %. Dans cet article, ils proposent que des concentrations plus élevées *trans*formeraient l'effet attractif en un effet répulsif (Hussein *et al.*, 2017). Cette hypothèse est à vérifier en réalisant un plus grand nombre de réplicats avec plus de concentrations inférieures et intermédiaires. A noter qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le témoin et cette concentration de 0,01%. Cependant, si cette tendance attractive à faible concentration se confirme, cela pourrait être utile en silo. Les insectes seraient attirés par l'huile pour finir par entrer en contact et subir la toxicité de contact.

La limite de répulsion, c'est-à-dire la concentration en dessous de laquelle l'huile n'est plus répulsive et au-dessus de laquelle elle est totalement répulsive, est difficile à déterminer sur base de nos résultats. Elle pourrait se situer autour de 0,025 % soit 0,0012 µL/cm².

Le manque d'étude similaire ne permet pas la comparaison de nos données avec d'autres résultats de la bibliographie.

b. Cinnamomum zeylanicum

Contrairement à *C. cassia*, toutes les concentrations testées sont répulsives et aucune différence significative n'a pu être détectée entre ces concentrations. Ces résultats sont inattendus par rapport aux screening réalisés précédemment mais semblent cohérents. Face à ces résultats, le screening semble erroné, ce qui conduit à une mauvaise estimation des concentrations à tester pour déterminer la limite de répulsion. Dans ce cas-ci, on peut suggérer que cette limite se trouve sous 0,0236 µL/cm² mais on ne peut pas l'estimer plus précisément.

Confidentiel

Aucune donnée de répulsion sur cette huile n'a été trouvée sur *S. granarius* dans la bibliographie. Par contre, sa molécule principale (eugénol) a été testée à ses LC50 (0,0109 µL/cm²) et LC90 (0,0225 µL/cm²) (24h) sur *S. granarius*. Cette étude analyse la distance parcourue par l'insecte durant 10 minutes ainsi que son temps de repos. Pour la LD50, la distance parcourue n'est pas significativement différente du contrôle alors que le temps de repos est plus faible. Par contre pour la LD90, la distance parcourue et le temps de repos sont plus faibles (Figure 15) (Plata-Rueda *et al.*, 2018).

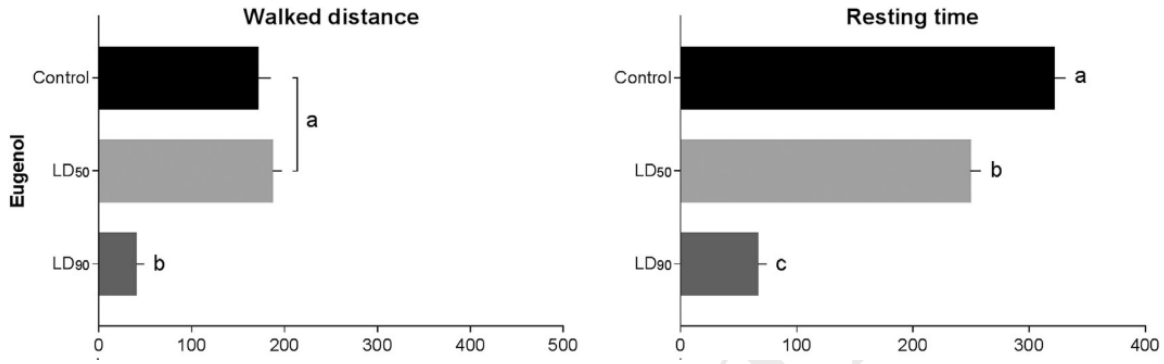


Figure 15 Distance parcourue et temps de repos (moyennes) pour Sitophilus granarius soumis à l'eugénol (Contrôle, LD50 and LD90 estimées) durant 10 minutes Les lettres correspondent à une contraste de Tukey (P < 0.05) (Plata-Rueda et al.*, 2018).*

Ce même article illustre les parcours représentatifs des insectes soumis au LC50 et LC90 (Figure 16). Dans cette figure, l'eugénol, à 0,0225 µL/cm² (LD90) semble répulsif, or notre concentration la plus faible testée est de 0,0236 µL/cm² d'huile soit, si on prend en compte la proportion de poids de l'eugénol, 0,018 µL/cm² d'eugénol. Notre valeur la plus faible de d'eugénol dans *C. zeylanicum* est donc légèrement supérieure à une valeur qualifiée de répulsive pour l'eugénol.

Confidentiel

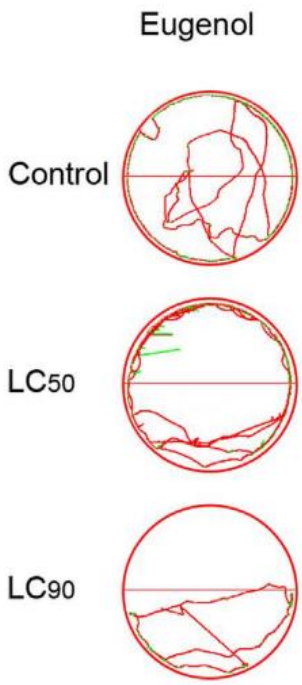


Figure 16 Pistes représentatives montrant l'activité de marche de Sitophilus granarius sur une période de 10 minutes sur des arènes en papier-filtre à moitié imprégnées d'eugénol (moitié supérieure de chaque arène). Les pistes rouges indiquent une vitesse de marche élevée. Les pistes vertes indiquent une vitesse faible (initiale) (Plata-Rueda et al.*, 2018).*

Pour conclure, *C. zeylanicum* est une huile répulsive aux concentrations testées (de 0,0236 à 0,2829 µL/cm²). Ce pouvoir répulsif peut être dû à sa molécule principale qui est elle-même répulsive à faible concentration. Cependant, le manque de données bibliographiques limite la détermination exacte de la limite de répulsion. Des expériences complémentaires devraient être réalisée avec des concentrations plus faibles et plus fortes que celles testées ici ainsi qu'en augmentant le nombre de réplicats.

10.5 Rémanence

L'étude de la rémanence a eu lieu avec deux timings différents selon les huiles. La mortalité causée par *C. cassia* a été étudiée après 30 et 180 minutes d'aération alors que pour *C. zeylanicum*, les durées choisies étaient de 30 et 360 minutes. Ces différentes durées d'aération ont été choisies sur base des courbes d'évaporation selon lesquelles *C. cassia* semblait s'évaporer plus rapidement. Cependant, ces courbes ayant été réalisées un autre jour (températures et humidités légèrement différentes) et sur du verre[8], ces données restent à titre indicatif. Le palier à 30 minutes permet de comparer les huiles entre elles.

[8] Etant donné qu'il est impossible de faire ça sur du grain au vu de ses qualités hygroscopiques.

Confidentiel

Tableau 18 Tableau récapitulatif de la mortalité relevée pour C. cassia et C. zeylanicum (%) après certaines durées d'aération ainsi que leurs écarts type.

Durée d'aération	*C. cassia*	*C. zeylanicum*
T0 (pas d'aération)	95,5 ±5,5%	91,0 ±5,16%
30 min	75,0 ±12,01%	77,5 ±6,35%
180 min (Ou 360 min pour *C. zeylanicum*)	6,0 ±6,58%	11,5 ±6,25%

L'expérience a montré que les deux huiles s'évaporaient rapidement (Tableau 18). L'ordre de grandeur est relativement similaire après 30 minutes d'aération. Par contre, *C. cassia* montre une évaporation plus rapide. Après 180 minutes d'aération à température ambiante, en limitant les courants d'air, la dose qui tuait 95.5 % des individus n'en tue plus que 6 %. Ces résultats sont obtenus dans le cas extrême d'une monocouche de grains laissés à l'air libre mais ces résultats posent la question de l'impact des aérations volontaires sur l'efficacité du traitement à l'échelle d'un silo. Une solution doit donc être trouvée, par exemple en mettant au point une formulation qui permettrait de diminuer la volatilité de l'huile. L'augmentation de la dose d'huile pour contrer cette aération semble impossible étant donné que la dose nécessaire noierait les grains. Une solution plus pratique serait l'arrêt de l'aération du silo durant 24 heures post-traitement afin de diminuer cette évaporation.

Il existe une technologie prometteuse (nanogel) qui permettrait d'augmenter la rémanence des huiles essentielles, comme le montre la Figure 17 (Ziaee *et al.*, 2014b). Cette technologie est composée de nanoparticules de diamètre variable (ici de 20 à 150 nm), d'acide myristique et de chitosane avec une structure noyau-enveloppe qui renferme l'huile à libérer. Cette technique demande encore certaines mises au point (Ziaee *et al.*, 2014b). De plus, la rémanence

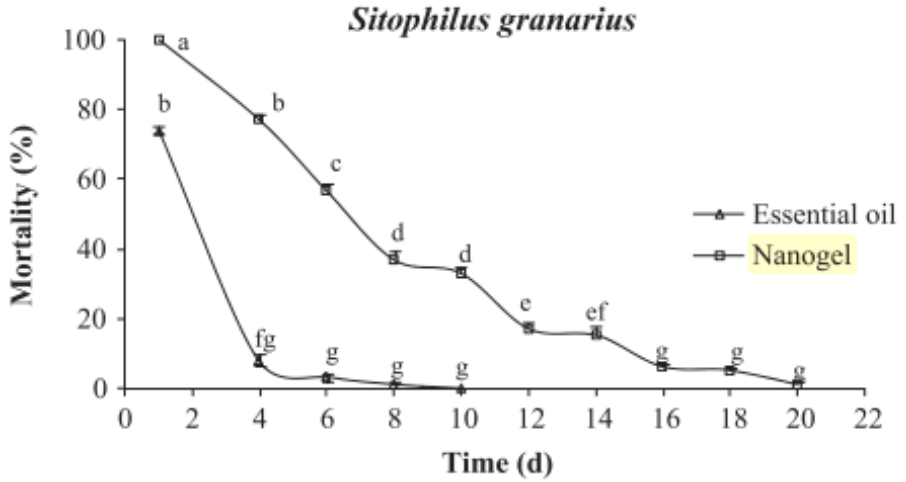


Figure 17 Mortalité (%) de Sitophilus granarius suite à l'application de Carum copticum sous forme d'huile et de nanogel (Ziaee et al.*, 2014b).*

Confidentiel

est permise par une lente libération de l'huile par fumigation. Au vu des résultats précédents, cette technologie ne semble pas appropriée pour les huiles étudiées ici.

11 Conclusion et perspectives

En conclusion, les huiles étudiées ont présenté un pouvoir insecticide intéressant mais insuffisant pour être utilisées pures à grande échelle. Une formulation adéquate pourrait permettre d'améliorer leur rapport cout/efficacité comme par exemple la découverte de synergies ou l'utilisation d'adjuvants permettant de diminuer l'évaporation.

Entre les deux huiles testées, *Cinnamomum cassia* semble avoir un plus grand potentiel insecticide en 24 heures ce qui permet de rapidement tuer ou rendre KO les individus et ainsi les garder dans la zone traitée. Cette caractéristique est importante quand on sait que l'huile est répulsive et ne semble pas avoir de pouvoir insecticide par fumigation. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de connaitre la toxicité des deux huiles après un plus long temps d'exposition bien que l'efficacité dans le temps semble diminuer (évaporation importante et faible rémanence)

Parmi les alternatives proposées aux insecticides, les huiles essentielles doivent encore relevés de nombreux défis. Cependant, plusieurs pesticides à base d'huile essentielle de cannelle existent déjà sur le marché du particulier (e.g. Cinnarure, Citrokinnamon 50-30, *etc.*) (Haddi *et al.*, 2017). Des recherches complémentaires doivent être réalisées afin de juger de la possible utilisation des huiles de *Cinnamomum cassia* et/ou *Cinnamomum zeylanicum* dans la lutte contre le ravageur *Sitophilus granarius*, et ensuite, contre d'autres ravageurs des grains stockés. Par exemple, suite aux informations récoltées dans ce mémoire, il serait intéressant d'analyser les possibles synergies entre les huiles ou entre les molécules ainsi que comparer les résultats obtenus sur *S. granarius* avec d'autres espèces de ravageurs.

Confidentiel

12 Annexes

Huile	Condition	Température (°C)	Humidité relative (%)	N°
C. *cassia*	Scellé contact	NA	NA	1
	Scellé contact	23,39 ±0,21	43,05 ±0,60	2
	Scellé contact	NA	NA	3
	Fumigation	22,99 ±0,07	54,17 ±0,29	
	Ouvert	23,95 ±0,10	41,20 ±0,99	1
	Ouvert	23,49 ±0,33	32,94 ±1,50	2
	Ouvert	23,46 ±0,35	33,10 ±1,67	3
C. *zeylanicum*	Scellé contact	24,21 ±0,28	45,47 ±3,42	1
	Scellé contact	25,71 ±0,16	44,05 ±0,82	2
	Scellé contact	24,54 ±0,10	50,44 ±0,53	3
	Fumigation	22,80 ±0,15	50,85 ±0,70	
	Ouvert	22,11 ±0,18	43,49 ±0,43	1
	Ouvert	22,25 ±0,17	43,28 ±0,28	2
	Ouvert	22,56 ±0,22	54,92 ±1,86	3
Trans-cinnamaldéhyde	Scellé	23,36 ±0,24	45,99 ±1,04	1
	Scellé	24,17 ±0,38	32,00 ±2,52	2
	Scellé	24,30 ±0,63	36,56 ±0,88	3
Eugénol	Scellé	24,15 ±0,12	29,06 ±0,38	1
	Scellé	22,80 ±0,27	47,73 ±0,45	2
	Scellé	22,69 ±0,04	34,56 ±0,61	3

Annexe 1 Relevé des moyennes des températures (°C) et de l'humidité relative (%) ainsi que leurs écart-types lors des différents réplicats des courbes (n°) dans les différentes conditions. NA : manque du matériel d'enregistrement lors de ces manipulations.

Confidentiel

```
import numpy as np
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt

from scipy.optimize import curve_fit

x1 =pd.read_excel('Nomdufichier.xlsx', sheet_name='Feuil3')

def func(x, K, n):
    return 1.*x**n/(K**n+x**n)

def fit(x, y):
    popt, pcov = curve_fit(func,x, y)
    residuals = y - func(x,*popt)
    ss_res = np.sum(residuals**2)
    ss_tot = np.sum((y-np.mean(y)**2))
    r_squared = 1 - (ss_res / ss_tot)
    r2 = np.round(r_squared, 3)
    z = np.linspace(0, 6 , 1001)
    z1 = z**popt[1]/(popt[0]**popt[1]+z**popt[1])
    ld50 = np.round(popt[0], 3)
    ld90 = np.round(9**(1./popt[1])*popt[0], 3)
    ld95 = np.round(19**(1./popt[1])*popt[0], 3)
    return[popt, r2, ld50, ld90,ld95, z, z1]

[params, r2, ld50, ld90, ld95, z, z1] = fit(x1.Treatment, x1.Mortality)

plt.plot(x1.Treatment, x1.Mortality, 'o', ms=4,label= 'Replicats')
plt.plot(z, z1, '-k', lw=2, label='$R^2=$'+str(r2)+'\n LD50='
+str(ld50)+'\n LD90='+str(ld90)+'\n LD95='+str(ld95))
plt.legend()
plt.show()
```

Annexe 2 Code python permettant d'appliquer l'équation de Hill aux données et ainsi obtenir les courbes de mortalité ainsi que les LD50, 90 et 95. Code réalisé par Stamatios Nicolis (ULB).

	Concentration (%)	Acétone (%)	Huile (%)
C. cassia	0,01	76,3	23,7
		3,3	96,7
		76,0	24,0
	0,025	100,0	0,0
		100,0	0,0
		96,7	3,3
		41,7	58,3
		20,3	79,7
		32,0	68,0
	0,05	100,0	0,0
		100,0	0,0
		50,0	50,0
		96,7	3,3
		100,0	0,0
		96,7	3,3
		17,7	82,3
		48,7	51,3
	0,1	96,7	3,3
		100,0	0,0
		100,0	0,0
		100,0	0,0
		90,0	10,0
		56,3	43,7
	0,5	100,0	0,0

	Concentration (%)	Acétone (%)	Huile (%)
C. zeylanicum	0,5	28,7	71,3
		56,7	43,3
		76,7	23,3
	1	100,0	0,0
		100,0	0,0
		74,0	26,0
		47,3	52,7
	4	73,3	26,7
		96,7	3,3
		93,7	6,3
	6	100,0	0,0
		100,0	0,0
		80,0	20,0

Annexe 3 Résultats principaux des screening préliminaires de répulsion pour les huiles C. cassia et C. zeylanicum. Les concentrations d'huile sont exprimées en pourcentage et sont sur fond bleu. Le temps passé sur le papier filtre traité à l'acétone ou à l'huile est exprimé en pourcentage de temps. Les valeurs de pourcentage supérieures à 60% sont mises en évidence sur fond rouge.

Confidentiel

Jour	Température (°C)	Humidité relative (%)
1	22,701	34,662
2	22,265	37,581
3	22,167	33,410
4	22,776	51,617
5	22,937	53,038
6	23,291	57,909
7	23,310	56,418
8	22,343	44,882
9	22,171	39,716
10	22,152	53,614
11	21,576	49,742
Moyenne	22,517	46,599
Ecart-type	0,535	8,934
Médiane	22,343	49,742

Annexe 4 Tableau reprenant la température et l'humidité relative relevées par le HOBO lors des expériences de répulsion.

Confidentiel

```
# ------------------------------------------------------------------------
# chargement des modules
# ------------------------------------------------------------------------
from collections import Counter
from numba import jit
import math
import time
import string
import numpy as np
import pandas as pd
import cv2 as cv
import matplotlib.pyplot as plt
# ------------------------------------------------------------------------
# fonctions utiles
# ------------------------------------------------------------------------
alphabet = list(string.ascii_lowercase)
alphabet1 = list(string.ascii_uppercase)

plt.rcParams['svg.fonttype'] = 'none'
plt.rcParams['lines.linewidth'] = '0.5'
plt.rcParams['axes.linewidth'] = '0.5'
plt.rcParams.update({'font.size': 8})

def cm2inch(value):
    return value/2.54

def subplot(w1, ar, row, col, numbins, nx, ny, colo):
    fig4, ax4 = plt.subplots(ncols=col, nrows=row,figsize=(cm2inch(w1),
            cm2inch(ar)), dpi=100, sharex=nx, sharey=ny)
    plt.subplots_adjust(wspace=0.06, hspace=0.06)
    ii = -1
    for i in range(0, row,1):
        for j in range(0,col,1):
            ii = ii+1
            ax4[i,j].margins(0.1, 0.1)
            ax4[i,j].locator_params(nbins=numbins+1)
            if colo !=0:
                ax4[i,j].text(0.05, 0.96, alphabet[ii], transform =
                    ax4[i,j].transAxes,va='top', color=colo, fontsize=8)
    return [fig4, ax4]

def check_point(x1, x2, p1):
    if np.isnan(p1[0]) == False and np.isnan(p1[1]) == False:
        if np.cross(x1-p1, x2-p1) < 0 == True:
            x = -1
        else:
            x = +1
    else:
        x =np.nan
    distx = np.sqrt((x1[0] - p1[0])**2 + (-x1[1] + p1[1])**2)
    return [x, distx]
# ------------------------------------------------------------------------
# calcul de l'angle entre l'insecte, le centre de la boite et la marque droite
# ------------------------------------------------------------------------
def angle_between(a,b,c):
    ang = math.degrees(math.atan2(c[1]-b[1], c[0]-b[0]) -
            math.atan2(a[1]-b[1], a[0]-b[0]))
    return ang + 360 if ang < 0 else ang
```

```
# ------------------------------------------------------------------------------
# figures
# ------------------------------------------------------------------------------
def make_fig(video, cc):
    xmn = cc
    dfa = pd.read_excel(video+'.xlsx', sheet_name='sheet1')
    dfb = pd.read_excel(video+'.xlsx', sheet_name='sheet2')
    xaa = [1.*dfb['mark_1_x'].item(), 1.*dfb['mark_2_x'].item()]
    s   = dfb['slope'].item()
    si  = dfb['intercept'].item()
    yaa = np.asarray(s)*xaa + si
    fig, ax = subplot(16, 10,2,2, 4, False, False,'k')
    ax[0,0].plot(dfa['frames']/25., dfa['distance from center'], label =
        'distance from center')
    ax[0,0].plot(dfa['frames']/25., dfa['distance from mark'],
        label = 'distance from mark')
    ax[0,0].legend(fontsize=6, ncol=2, loc=(-0.1, 1.04))
    ax[0,0].set_xlabel('time ($s$)')
    ax[0,0].set_ylabel('Distance (px)')
    circle1 = plt.Circle((dfb['coord_center_x'], -dfb['coord_center_y']),
        dfb['radius'], color='#F5BDC8', fill='#F5BDC8', alpha=0.3)
    ax[0,1].add_artist(circle1)
    ax[0,1].plot(xaa,yaa , 'o-k', lw=0.5)
    ax[0,1].plot(dfb['coord_center_x'], -dfb['coord_center_y'], 'o',
        color='#F5BDC8', alpha=0.6, ms=3)
    ax[0,1].plot(dfa['coo_x'], -dfa['coo_y'], 'o', ms = 1, alpha=0.03)
    ax[0,1].set_xlim(0, 1920)
    ax[0,1].set_ylim(-1080, 0)
    ax[0,1].axis('off')
    ax[1,0].bar([-.5,.5], xmn, width=0.4, color='k')
    ax[1,0].set_xlim(-1.1, 1.1)
    ax[1,0].set_xticks([-0.5, 0.5])
    ax[1,0].set_xticklabels(['zone 1', 'zone 2'])
    ax[1,0].set_ylabel('frame count')
    ax[1,0].set_xlabel('')
    ax[1,1].hist(dfa['angle'], bins=np.linspace(0, 360, 37), edgecolor='w',
        facecolor='k')
    ax[1,1].set_xlabel('angle')
    ax[1,1].set_ylabel('frame count')
    ax[1,1].set_xticks(range(0, 370, 60))
    ax[0,1].set_title(video, fontsize=8)
    fig.savefig('figs_'+video+'.pdf')
    return [ax]
# ------------------------------------------------------------------------------
```

```
# ------------------------------------------------------------------------
# Script principal
# ------------------------------------------------------------------------
def process_video(video):
    start = time.time()
    print('\ncalculating background ...')
    mean                        = mean_i(video)
    u1, u2, pente, intcpt       = draw_line(mean, video)
    xx1, yy1, rr1               = findcontour(mean)
    print('finished calculating background ...')
    cap                         = cv.VideoCapture(video+'.mp4')
    length                      = int(cap.get(cv.CAP_PROP_FRAME_COUNT))
    print('\nnumber of frames =', length)
    fourcc                      = cv.VideoWriter_fourcc(*'mp4v')
    params                      = cv.SimpleBlobDetector_Params()
    params.minThreshold         = 8
    params.maxThreshold         = 200
    params.filterByArea         = True
    params.minArea              = 80
    params.maxArea              = 5000
    params.filterByCircularity  = False
    params.minCircularity       = 0.05
    params.filterByConvexity    = True
    params.minConvexity         = 0.1
    params.filterByInertia      = True
    params.minInertiaRatio      = 0.03
    params.maxInertiaRatio      = 0.7
    detector                    = cv.SimpleBlobDetector_create(params)
    ii                          = -1
    A1                          = [] ; A2 = []; A3 = [] ; A4 = [] ; A5 = []; A6 = []
    A7                          = [] ; A8 = []; A9 = []; A10 = []; A11 = []

    paramZone                   = rr1/2
    paramfps                    = 25
    tpsframe                    = 1/paramfps
    tpszone1 = 0; tpszone2 = 0; tpszone3 = 0; tpszone4 = 0; OrdAxe = 0
    AxeY= (u1[1]+u2[1])/2
    Maxe = -(u2[1]-u1[1])/(u2[0]-u1[0])
    Paxe = -u1[1]+Maxe*u1[0]
    Maxe = -pente.item()
    Paxe = -intcpt.item()
    out                         = cv.VideoWriter('out_'+video+'.mp4',fourcc,
        25.0, (1920,1080))
    print('\nprocessing ...\n')
    while(cap.isOpened()):
        ii          = ii +1
        ret, frame = cap.read()
        if ret == True:
            sframe              = cv.absdiff(frame,mean)
            gray                = cv.cvtColor( sframe, cv.COLOR_BGR2GRAY )
            (thresh, im_bw)     = cv.threshold(gray, 20, 255,
                cv.THRESH_BINARY)
            im                  = cv.bitwise_not(im_bw)
            keypoints           = detector.detect(im)
            im                  = cv.bitwise_not(im)
            cv.DrawMatchesFlags_DRAW_RICH_KEYPOINTS
            im_with_keypoints   = cv.drawKeypoints(im, keypoints,
                np.array([]), (56,209,253),
                cv.DRAW_MATCHES_FLAGS_DRAW_RICH_KEYPOINTS)
```

```
            cv.circle(frame, (xx1, yy1), rr1, (255,0,0), 2)
            cv.circle(frame, (xx1, yy1), 10, (255,0,0), -1)
            cv.line(frame, (int(u1[0]), int(u2[0])), (int(u1[1]),int(u2[1])),
                    (255,0,0), 1)

            ik = -1
            for keypoints in keypoints:
                ik = ik+ 1
                A1.append(ii)
                A2.append(keypoints.pt[0])
                A3.append(keypoints.pt[1])
                A4.append(keypoints.size)
                A5.append(ik)
                if ii!=0:
                    OrdAxe = Maxe * keypoints.pt[0]+Paxe
                    if keypoints.pt[1]-OrdAxe < -paramZone:
                        tpszone4 += tpsframe
                    elif keypoints.pt[1]-OrdAxe < 0 :
                        tpszone3 += tpsframe
                    elif keypoints.pt[1]-OrdAxe < paramZone:
                        tpszone2 += tpsframe
                    else:
                        tpszone1 += tpsframe
                A6.append(tpszone1)
                A7.append(tpszone2)
                A8.append(tpszone3)
                A9.append(tpszone4)
                A10.append(tpszone1+tpszone2+tpszone3+tpszone4)
                A11.append(OrdAxe)
                cv.circle(frame, (int(keypoints.pt[0]),
                    int(keypoints.pt[1])), 5, (255,0,0), -1)
                cv.line(frame, (xx1, yy1), (int(keypoints.pt[0]),
                    int(keypoints.pt[1])), (255,0,0), 1)
            out.write(frame)
            if np.mod(ii, 500) == 0 :
                print('frame number', ii)
            if ii >= 7500:
                break
        else:
            break
B = np.empty((len(A1), 15))
for i in range(len(A1)):
    B[i,0]     = A1[i]
    B[i,1]     = A2[i]
    B[i,2]     = A3[i]
    B[i,3]     = A4[i]
    B[i,4]     = A5[i]
    [xp, dist] = check_point(u1, u2, (A2[i], A3[i]))
    B[i,5]     = xp
    B[i,6]     = dist
    B[i,7]     = np.sqrt((A2[i] - xx1)**2 + (-A3[i] + yy1)**2)
    B[i,8]     = angle_between((int(u1[0]), int(u2[0])),
              (xx1,yy1),(A2[i],A3[i]))
    B[i,9]     = A6[i]
    B[i,10]    = A7[i]
    B[i,11]    = A8[i]
    B[i,12]    = A9[i]
    B[i,13]    = A10[i]
    B[i,14]    = A11[i]
```

```
    xo      = len(np.where(B[:,5]==1)[0])
    xmo     = len(np.where(B[:,5]==-1)[0])
    xmn     = [xo, xmo]
    writer = pd.ExcelWriter(video+'.xlsx', engine='xlsxwriter')
    values = [xx1, yy1, rr1, int(u1[0]), int(u1[1]), int(u2[0]), int(u2[1]),
              pente.item(), intcpt.item()]
    cols1  = ['frames', 'coo_x', 'coo_y', 'size', 'blobs','location',
              'distance from mark', 'distance from center', 'angle','tpsZ1',
              'tpsZ2','tpsZ3','tpsZ4','TotalTps','OrdAxe']
    cols2  = ['coord_center_x','coord_center_y', 'radius',
              'mark_1_x','mark_2_x', 'mark_1_y', 'mark_2_y', 'slope',
              'intercept']
    df      = pd.DataFrame(B, columns=cols1)
    df2     = pd.DataFrame([values], columns= cols2)
    df.to_excel(writer,sheet_name='sheet1')
    df2.to_excel(writer,sheet_name='sheet2')
    writer.save()
    print('finished !\nmaking figures ...')
    ax = make_fig(video, xmn)
    print('\ndone !')
    end = time.time()
    print('\nexecuted in '+str(end-start)+' seconds')
    return df
df1 = process_video('exemple')
```

Annexe 5 Code python utilisé pour l'analyse comportementale de répulsion, réalisé par Stamatios Nicolis (ULB).

Confidentiel

Pics	Temps de rétention	Constituants	%
1	7,3	alpha-PINENE	0,08
2	7,4	alpha-THUYENE	0,01
3	8,7	CAMPHENE	0,05
4	9,1	HEXANAL	0,01
5	10,1	beta-PINENE	0,03
6	14,1	LIMONENE	0,04
7	14,5	1,8-CINEOLE	0,02
8	17,2	STYRENE	0,17
9	18,0	p-CYMENE	0,06
10	18,7	TERPINOLENE	0,01
11	21,9	6-METHYL-5-HEPTENE-2-ONE	0,01
12	25,5	NONANAL	0,02
13	26,2	COMPOSÉ BENZYLIQUE	0,02
14	29,8	SESQUITERPENE	0,01
15	30,2	SESQUITERPENE	0,02
16	30,3	delta-ELEMENE	0,01
17	31,0	CYCLOSATIVENE + ISOLEDENE	0,12
18	31,2	YLANGENE	0,06
19	31,8	alpha-COPAENE	0,80
20	32,9	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,04
21	33,3	CAMPHRE	0,04
22	33,6	BENZALDEHYDE	1,14
23	33,8	beta-BOURBONENE	0,02
24	36,8	LINALOL	0,04
25	37,6	SESQUITERPENE	0,05
26	37,9	alpha-trans-BERGAMOTENE	0,04
27	38,2	beta-CARYOPHYLLENE	0,12
28	38,5	TERPINENE-4-OL	0,04
29	38,8	AROMADENDRENE	0,03
30	40,6	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,14
31	41,1	ACETOPHENONE	0,08
32	41,3	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=132	0,14
33	41,8	ALLO-AROMADENDRENE	0,12
34	42,6	alpha-HUMULENE + ESTRAGOLE	0,04
35	43,0	ALDEHYDE SALICYLIQUE	0,69
36	43,8	gamma-MUUROLENE	0,14
37	44,2	BORNEOL	0,30
38	44,4	alpha-TERPINEOL + LEDENE	0,08
39	46,0	alpha-MUUROLENE	0,08
40	46,2	beta-BISABOLENE	0,13
41	47,7	2-METHYL BENZOFURANE	0,40
42	47,9	delta-CADINENE + gamma-CADINENE	0,29
43	48,3	SALICYLATE DE METHYLE	0,09
44	49,0	BENZENEPROPANAL	0,78
45	49,2	alpha-CURCUMENE	0,09
46	49,5	Trans-alpha-BISABOLENE	0,05
47	50,2	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,04
48	50,8	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,03
49	51,1	ACETATE DE 2-PHENYLETHYLE	0,03
50	51,8	Trans-ANETHOL	0,02
51	52,1	CALAMENENE	0,03
52	52,9	ACIDE HEXANOIQUE	0,03
53	53,5	COMPOSÉ PHÉNOLIQUE	0,12
54	54,4	ALCOOL BENZYLIQUE	0,27
55	55,4	Z-CINNAMALDEHYDE	0,34
56	56,3	ALCOOL PHENYLETHYLIQUE	0,98
57	58,5	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,05
58	59,1	2-METHOXY BENZALDEHYDE	0,42
59	60,2	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,05
60	63,5	**E-CINNAMALDEHYDE**	**79,49**
61	63,8	COMPOSÉ AROMATIQUE Mw=206	2,46
62	65,4	2-METHOXYPHENYLACETONE	0,24
63	67,4	SPATHULENOL	0,10
64	68,8	ACETATE DE CINNAMYLE	0,46
65	69,5	EUGENOL	0,04
66	69,8	TRIMETHYL PENTADECANONE	0,02
67	70,5	T-CADINOL	0,02
68	71,3	SANDARACOPIMARADIENE ISOMERE	0,03
69	72,1	alpha-BISABOLOL	0,05
70	72,3	SESQUITERPENOL	0,03
71	72,6	alpha-CADINOL	0,02
72	74,4	2-METHOXY-CINNAMALDEHYDE	0,04
73	75,1	ALCOOL CINNAMIQUE	0,13
74	75,7	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,02
75	78,4	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,07
76	82,2	**Trans-o-METHOXY-CINNAMALDEHYDE**	**5,26**
77	82,6	**COUMARINE Mw=146**	**2,10**
78	90,3	BENZOATE DE BENZYLE	0,07
79	93,8	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,04
80	99,5	COMPOSÉ AROMATIQUE	0,14
		TOTAL	**99,99**

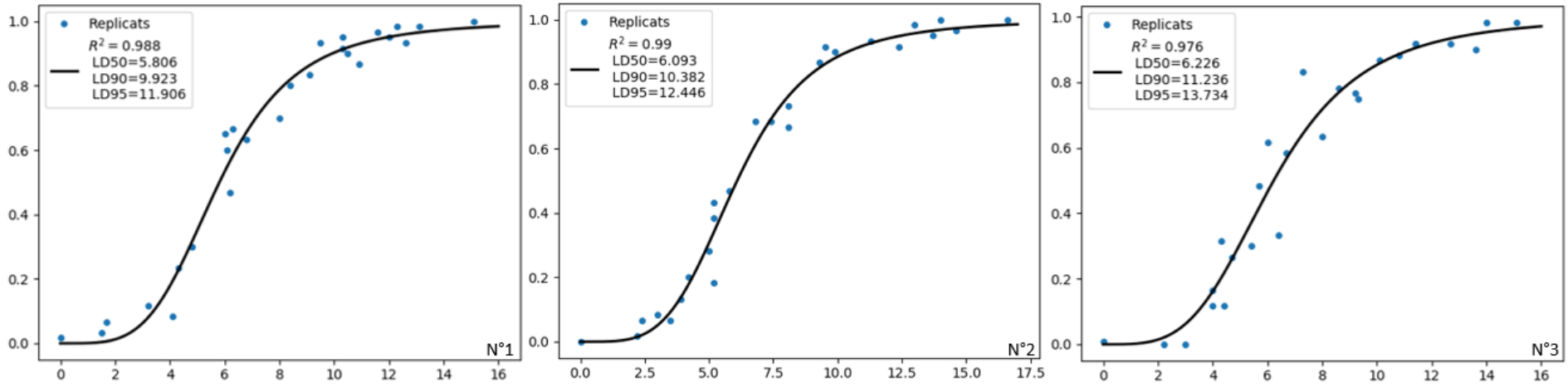
Date de l'analyse – date of the analysis : Avril 2019,

Annexe 6 Résultats de l'analyse GC-MS de Cinnamomum cassia (lot CCB114) par Pranarom. La GC-MS a été réalisée avec une colonne Innowax 60-0.5-0.25, de l'Hélium comme gaz vecteur et un programme de température tel que 6mn à 50°C-2°C/mn → 250°C-20mn à 250°C

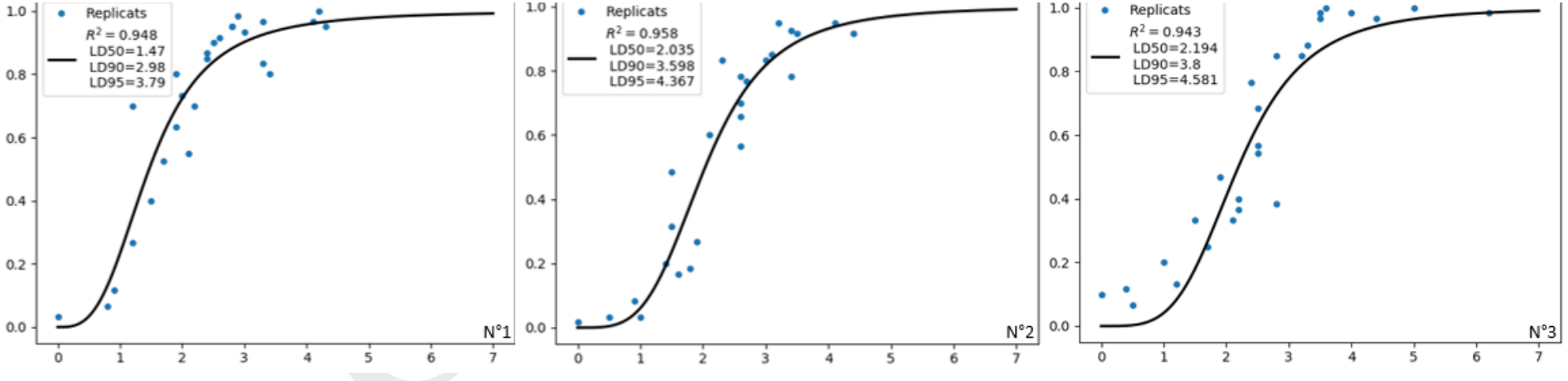
Pics	Temps de rétention	Constituants	%
1	6,7	alpha-PINENE	1,06
2	6,8	alpha-THUYENE	0,14
3	7,5	alpha-FENCHENE	0,02
4	7,7	CAMPHENE	0,34
5	8,9	beta-PINENE	0,33
6	9,3	SABINENE	0,02
7	10,2	delta3-CARENE	0,08
8	10,6	beta-MYRCENE	0,14
9	10,8	alpha-PHELLANDRENE	1,33
10	11,3	alpha-TERPINENE	0,12
11	12,1	LIMONENE	0,34
12	12,4	1,8-CINEOLE	0,13
13	12,5	beta-PHELLANDRENE	0,44
14	13,5	Cis-beta-OCIMENE	0,02
15	14,1	gamma-TERPINENE	0,04
16	14,3	Trans-beta-OCIMENE	0,06
17	14,6	STYRENE	0,03
18	15,2	m-CYMENE	0,02
19	15,3	p-CYMENE	0,72
20	15,6	ISOTERPINOLENE	0,03
21	15,9	TERPINOLENE	0,12
22	24,3	Cis-OXYDE DE LINALOL	0,03
23	25,5	alpha-CUBEBENE	0,02
24	26,0	Trans-OXYDE DE LINALOL	0,02
25	27,6	alpha-COPAENE	0,57
26	29,3	BENZALDEHYDE	0,20
27	30,7	LINALOL	2,27
28	31,5	Trans-p-MENTH-2-EN-1-OL	0,01
29	33,4	beta-ELEMENE	0,02
30	33,8	**beta-CARYOPHYLLENE**	**3,56**
31	33,9	TERPINENE-4-OL	0,06
32	34,4	AROMADENDRENE	0,05
33	36,6	ALLO-AROMADENDRENE	0,01
34	38,0	alpha-HUMULENE	0,58
35	38,4	gamma-MUUROLENE	0,02
36	39,1	BORNEOL	0,02
37	39,5	alpha-TERPINEOL	0,30
38	39,7	LEDENE	0,04
39	40,3	GERMACRENE D	0,02
40	40,8	ACETATE DE BENZYLE	0,02
41	41,1	beta-SELINENE	0,02
42	41,2	alpha-SELINENE	0,02
43	41,4	alpha-MUUROLENE	0,04
44	41,8	BICYCLOGERMACRENE	0,12
45	43,1	delta-CADINENE	0,13
46	43,2	gamma-CADINENE	0,03
47	45,8	Trans-SABINOL	0,03
48	46,3	ESTER PHENYLMETHYLIQUE	0,02
49	48,0	CALAMENENE	0,01
50	48,1	p-CYMENE-8-OL	0,03
51	49,6	SAFROLE	0,99
52	52,3	ALCOOL BENZYLIQUE	0,03
53	53,3	ACETATE DE BENZENE PROPANOL	0,08
54	54,8	OXYDE D'ISOCARYOPHYLLENE	0,02
55	55,4	OXYDE DE CARYOPHYLLENE	0,42
56	57,0	METHYLEUGENOL	0,03
57	58,3	E-CINNAMALDEHYDE	1,23
58	58,5	3-PHENYLPROPANOL	0,09
59	59,6	GLOBULOL	0,01
60	60,1	SESQUITERPENOL	0,02
61	62,6	SPATHULENOL	0,05
62	64,0	ACETATE DE CINNAMYLE	1,45
63	64,9	**EUGENOL**	**76,43**
64	67,0	CARVACROL	0,03
65	69,0	ACETATE D'EUGENYLE	1,79
66	70,2	ALCOOL CINNAMIQUE	0,10
67	70,8	CARYOPHYLLA-3,7-DIEN-6-OL	0,02
68	72,6	SESQUITERPENOL	0,02
69	72,8	CHAVICOL	0,09
70	74,4	EPOXYDE SESQUITERPENIQUE	0,03
71	81,6	METHOXY EUGENOL	0,02
72	85,5	**BENZOATE DE BENZYLE**	**3,18**
73	88,9	BENZOATE DE 2-PHENYLETHYLE	0,02
74	96,3	COMPOSE AROMATIQUE	0,04
		TOTAL	**99,99**

Date de l'analyse – date of the analysis : Mars 2019,

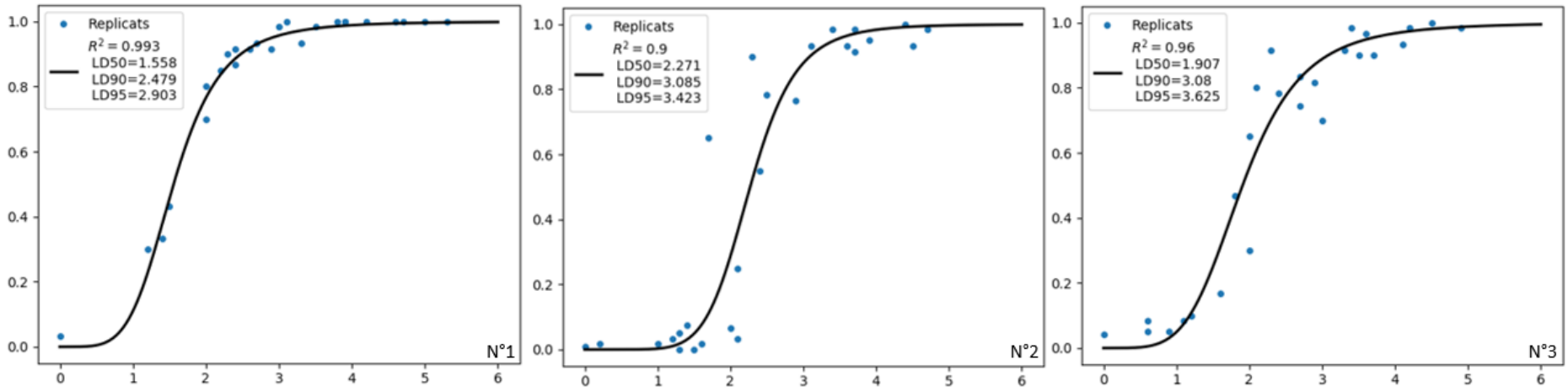
Annexe 7 Résultats de l'analyse GC-MS de Cinnamomum zeylanicum (lot BCVL107) par Pranarom. La GC-MS a été réalisée avec une colonne Innowax 60-0.5-0.25, de l'Hélium comme gaz vecteur et un programme de température tel que 6mn à 50°C-2°C/mn → 250°C-20mn à 250°C



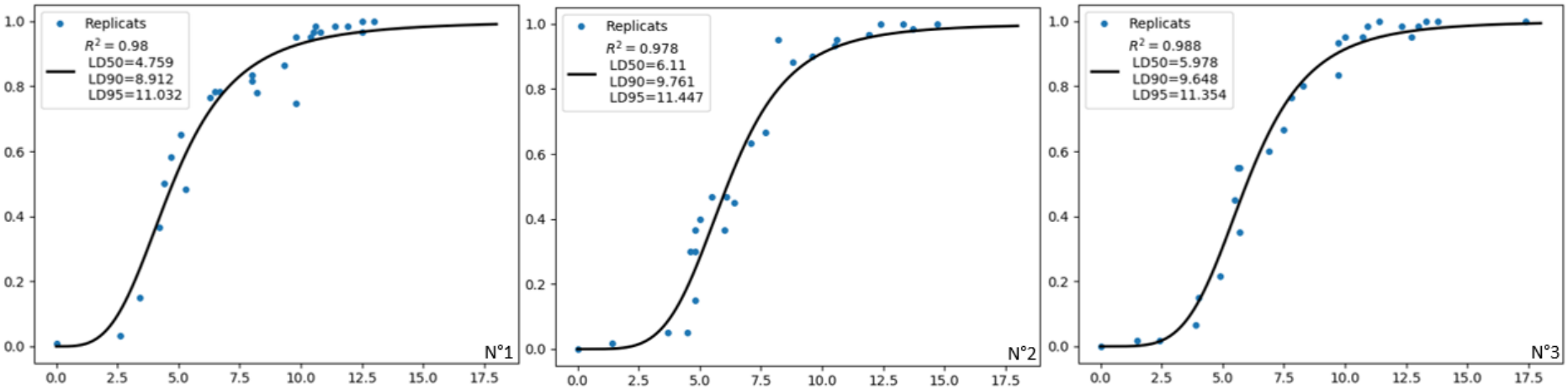
Annexe 8 Courbes de mortalité pour C. zeylanicum en condition scellée, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.



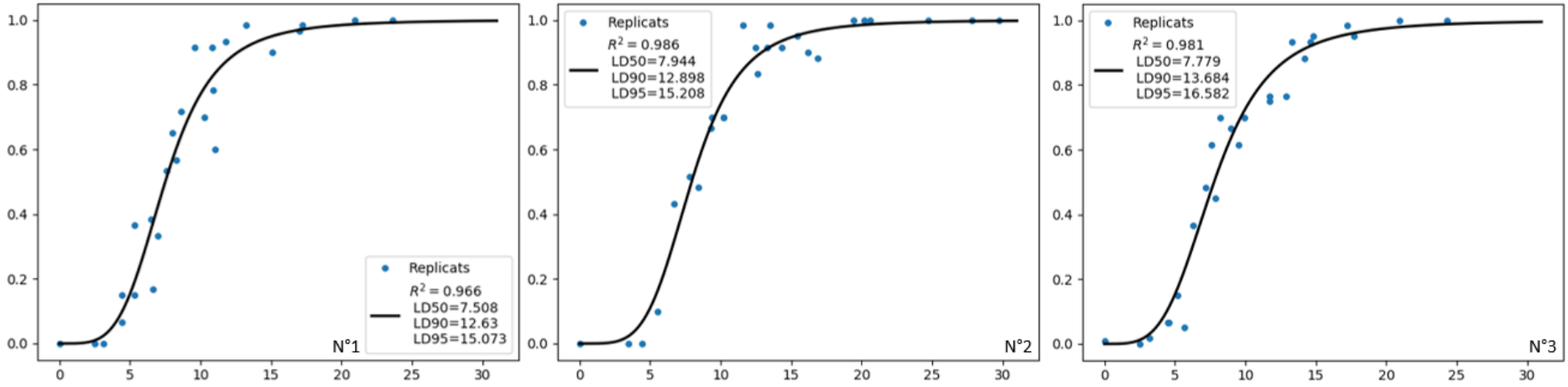
Annexe 9 Courbes de mortalité pour C. cassia en condition scellée, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.



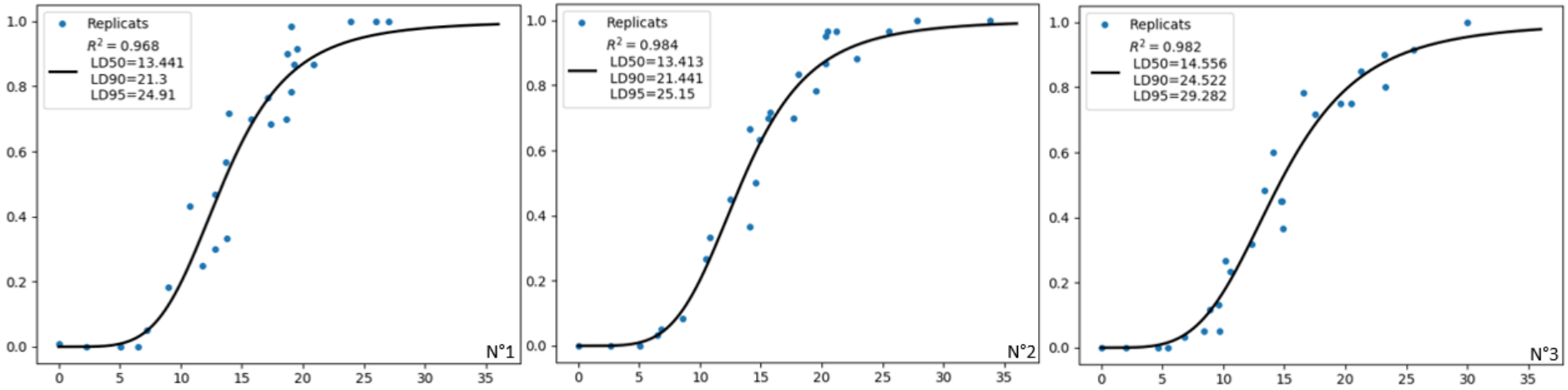
Annexe 10 Courbes de mortalité pour la molécule principale de C. cassia (le trans-cinnamaldehyde) en condition scellée, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.



Annexe 11 Courbes de mortalité pour la molécule principale de C. zeylanicum (l'eugénol) en condition scellée, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.



Annexe 13 Courbes de mortalité pour C. cassia en condition ouverte, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.



Annexe 12 Courbes de mortalité pour C. zeylanicum en condition ouverte, obtenue via une fonction de Hill (première méthode). L'axe des X représente la dose par boîte (mg) et l'axe des Y, la proportion de mortalité.

Bibliographie

Abbott, W.S. 1925. The Value of the Dry Substitutes for Liquid Lime. J. Econ. Entomol. 18: 265–267.

Abouseadaa, H.H., Osman, G.H., Ramadan, A.M., Hassanein, S.E., Abdelsattar, M.T., Morsy, Y.B., et al. 2015. Development of *trans*genic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing avidin gene conferring resistance to stored product insects. BMC Plant Biol. 15: 1–8. BMC Plant Biology.

Arrêté royal du 22 février 2005 relatif au premier programme de réduction des pesticides à usage agricole et des biocides, Moniteur Belge, 11 Mars, p. 10174.

Barrier-Guillot, B., Dauguet, S., Ducom, P., Leblanc, M.P., Crépon, K., Frérot, E., et al. 2014. Economie et innovation en protection raisonnée des céréales contre l'infestation par les insectes au stockage. Innov. Agron. 34: 67–82.

Barry, L. 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: *Curculionidae*): a critical review. Prot. Ecol. 2: 83–130.

Bassolé, I.H.N. & Juliani, H.R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. Molecules 17: 3989–4006.

Biosic SA. (2018), Talisma UL. https://www.biosix.eu/denrees-stockees/grains-stockes/talisma-ul/ [Web], page consultée le 19 décembre 2019.

Bond, E.J. 1984. Chimicals used as fumigants: phospine. In: Manual of fumigation for insect control (Food and agriculture organization of the United Nations, ed). London, Ontario.

Caliboso, F.M., H., N. & K., K. 1994. A preliminary evaluation of carbon dioxide under high pressure for rapid fumigation. In: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection (E. Highley, E. J. Wright, H. J. Banks, & B. R. Champ, eds), pp. 45–47. Canberra.

Darwish, Y.A., Omar, Y.M., Hassan, R.E. & Mahmoud, M.A. 2013. Repellent effects of certain plant essential oil, plant extracts and inorganic salts to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). Arch. Phytopathol. Plant Prot. 46: 1949–1957.

De Souza, V. nubia, Ferreira de Oliveira, C.R.L., Cysneiros matos, C.H. & Florentino de Almeida, D.K. 2016. Fumigation toxicity of essential oils against *Rhyzopertha dominica* (F.) in stored maize grain. Rev. Caatinga 29: 435–440.

Confidentiel

Eastham, L.E.S. & Mccully, S.B. 1943. The oviposition responses of *Calandra granaria*. J. Exp. Biol. 20: 35–42.

Eastham, L.E.S. & Segrove, F. 1947. The influence of temperature and humidity on instar length in *Calandra granaria* Linn. J. Exp. Biol. 24: 79–94.

Ebadollahi, A. & Mahboubi, M. 2011. Insecticidal activity of the essential oil isolated from Azilia eryngioides (PAU) hedge et lamond against two beetle pests. Chil. J. Agric. Res. 71: 406–411.

European commission Health & consumer protection directorate general (2002), Review report for the active substance deltamethrin Finalised in the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health at its meeting on 18 October 2002 in view of the inclusion of deltamethrin in Annex I of Directive 91/414/EEC 1., pp. 1-78.

European Food Safety (2009), Authority, Scientific Opinion of the Panel on Food Contact Materials, Flavourings and Processing Aids (CEF) on a request from European Commission on Flavouring Group Evaluation 214: alpha, beta-Unsaturated aldehydes and precursors from chemical subgroup 3.1 of FGE.19: Cinnamyl derivatives. The EFSA Journal, 880, 1-27

FAO, De Lucia M & Assennato D. 1992. L'après-récolte des grains - organisation et techniques. Bulletin des services agricoles de la FAO. 93. [Web] http://www.fao.org/3/t0522f/T0522F05.htm, consulté le 21 mai 2019.

Ferry, N., Edwards, M.G., Gatehouse, J.A. & Gatehouse, A.M.R. 2004. Plant-insect interactions: Molecular approaches to insect resistance. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 155–161.

Fleurat-lessard, F. 2018. Gestion intégrée de la protection des stocks de céréales contre les insectes sans traitement insecticide rémanent. Phytoma 716: 33–40.

Fleurat-Lessard, F. 2016. Stored-Grain Pest Management. Encycl. Food Grains 126–139. Elsevier.

Godart, M.-F., Cawoy, V., Andre, M., Bruggeman, D., Coppens, A., Courtois, X., et al. 2018. Logique de localisation des sites de stockage de céréales en Wallonie (M. Andre & S. Zangl, eds).

Golob, P. 1997. Current Status and Future Perspectives for Inert Dusts for Control of Stored Product Insects. J. Stored Prod. Res. 33: 69–79.

Confidentiel

Haddi, K., Oliveira, E. & Faroni, R.A.L. 2017. Cinnamon Oil. In: Green Pesticides Handbook Essential Oils for Pest Control, (N. Leo M.L & H. S. Rathore, eds), pp. 118–150. CRC Press Taylor & Francis Group, Viçosa.

Hamza, A.F., El-Orabi, M.N., Gharieb, O.H., El-Saeady, A.-H.A. & Hussein, A.-R.E. 2016. Response of *Sitophilus granarius* L. to fumigant toxicity of some plant volatile oils. J. Radiat. Res. Appl. Sci. 9: 8–14. Elsevier Ltd.

Hance, T. & Demeter, S. 2019. OILPROTECT Utilisation d'huiles essentielles pour la protection des denrées stockées : deuxième rapport scientifique et technique. Projet WALInnov n°1610128. Louvain-la-Neuve.

Hance, T. & Demeter, S. 2018. OILPROTECT Utilisation d'huiles essentielles pour la protection des denrées stockées : premier rapport scientifique et technique. Projet WALInnov n°1610128. Louvain-la-Neuve.

Haque, M.A., Nakakita, H., Ikenaga, H. & Sota, N. 2000. Development-inhibiting activity of some tropical plants against Sitophilus zeamais Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). J. Stored Prod. Res. 36: 281–287.

Howe, R.W. 1965. A summary of estimates of optimal and minimal conditions for population increase of some stored products insects. J. Stored Prod. Res. 1: 177–184.

Hussein, H.S., Salem, M.Z.M. & Soliman, A.M. 2017. Repellent, attractive, and insecticidal effects of essential oils from Schinus terebinthifolius fruits and *Corymbia citriodora* leaves on two whitefly species, *Bemisia tabaci*, and *Trialeurodes ricini*. Sci. Hortic. (Amsterdam). 216: 111–119. Elsevier B.V.

IGEAT, CREAT & Lepur. 2017. Recherche 2 : Localisation des zones pouvant accueillir des activités agro-économiques de proximité - Rapport intermédiaire.

Isman, M.B. 2016a. Pesticides based on plant essential oils: Phytochemical and practical considerations. ACS Symp. Ser. 1218: 13–26.

Isman, M.B. 2016b. Pesticides Based on Plant Essential Oils: Phytochemical and Practical Considerations. In: Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization (V. D. Jeliazkov & C. L. Cantrell, eds), pp. 13–26.

Isman, M.B. & Grieneisen, M.L. 2014. Botanical insecticide research: Many publications, limited useful data. Trends Plant Sci. 19: 140–145. Elsevier Ltd.

Confidentiel

Jenner, P.M., Hagan, E.C., Taylor, J.M., Cook, E.L. & Fitzhugh, O.G. 1964. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. Food Cosmet. Toxicol. 2: 327–343.

Jia, P., Xue, Y.J., Duan, X.J. & Shao, S.H. 2011. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and sarA expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lett. Appl. Microbiol. 53: 409–416.

Kim, S. Il, Roh, J.Y., Kim, D.H., Lee, H.S. & Ahn, Y.J. 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. J. Stored Prod. Res. 39: 293–303

Kordali, S., Aslan, I., Çalmaşur, O. & Cakir, A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three Artemisia species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: *Curculionidae*). Ind. Crops Prod. 23: 162–170.

Korunić, Z. 2013. Diatomaceous Earths – Natural Insecticides. Pestic. i fitomedicina 28: 77–95.

Le Goff, G.J., Hance, T., Detrain, C., Deneubourg, J.L., Clotuche, G. & Mailleux, A.C. 2012a. Impact of starvation on the silk attractiveness in a weaving mite, *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*). J. Ethol. 30: 125–132.

Le Goff, G.J., Hance, T., Detrain, C., Deneubourg, J.L. & Mailleux, A.C. 2012b. The locomotor activities on sites covered by silk produced by related and unrelated spider mites in *Tetranychus urticae* (Acari: *Tetranychidae*). Comptes Rendus - Biol. 335: 226–231.

Ministère de l'agriculture, de l'alimentation et des affaires rurales. 2019. L'aération des grains, fiche technique. [Web] http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/87-053.htm, consulté le 15 décembre 2019.

Muséum national d'Histoire naturelle. 2019, Inventaire National du Patrimoine Naturel, *Sitophilus granarius* (Linnaeus, 1758). [Web] https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/15546/tab /taxo, consulté le 22 avril 2019.

National Center for Biotechnology Information. 2019a PubChem Database. 3-Carene, [Web] , https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/26049, consulté le 22 mai 2019.

Confidentiel

National Center for Biotechnology Information. 2019b PubChem Database. Phosphine [Web] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/phosphine#section=NIOSH-Toxicity-Data, consulté le 22 mai 2019.

Ngamo, L.S., & Hance, T. 2007. Diversité des ravageurs des denrées et méthodes alternatives de lutte en milieu tropical. Tropicultura, 25(9), 215–220.

Ducom, P.J.F.. 2006. The Return of the Fumigants. In: 9th International Working Conference on Stored Product Protection, pp. 510–516. São Paulo.

Parlement Européen. 2008. Règlement (CE)N°1334/2008 du Parlement Européen et du Conseil du 16 décembre 2008 relatif aux arômes et à certains ingrédients alimentaires possédant des propriétés aromatisantes qui sont destinés à être utilisés dans et sur les denrées alimentaires et mo. J. Off. Union Eur. 34–50.

Pavela, R. 2014. Acute, synergistic and antagonistic effects of some aromatic compounds on the *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep., Noctuidae) larvae. Ind. Crops Prod. 60: 247–258. Elsevier B.V.

Pavela, R. 2015. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. Parasitol. Res. 114: 3835–3853.

Plata-Rueda, A., Campos, J.M., da Silva Rolim, G., Martínez, L.C., Dos Santos, M.H., Fernandes, F.L., et al. 2018. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 156: 263–270. Elsevier Inc.

Polatoğlu, K. & Karakoç, Ö.C. 2016. Biologically Active Essential Oils against Stored Product Pests. In: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, pp. 39–59. Elsevier.

Polatoğlu, K., Karakoç, Ö.C., Demirci, B., Gören, N. & Can Başer, K.H. 2015. *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera) Toxicity and Biological Activities of the Essential Oils of *Tanacetum macrophyllum* (Waldst. & Kit.) Schultz Bip. J. Oleo Sci. 64: 881–893.

Prazic-Golic, M., Andric, G. & Kljajic, P. 2011. Effects of 50°C temperature on *Sitophilus granarius* (L.), *Sitophilus oryzae* (L.) and *Sitophilus zeamais* (Motsch.). Pestic. phytomedicine 26: 221–227.

Confidentiel

Rajashekar, Y., Bakthavatsalam, N. & Shivanandappa, T. 2012. Botanicals as Grain Protectants. Psyche A J. Entomol. 2012: 1–13.

Rajendran, S. & Sriranjini, V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. J. Stored Prod. Res. 44: 126–135.

Rao, P., Singh, P., Yadav, S.K., Gujar, N.L. & Bhattacharya, R. 2013. Acute toxicity of some synthetic cyanogens in rats: Time-dependent cyanide generation and cytochrome oxidase inhibition in soft tissues after sub-lethal oral intoxication. Food Chem. Toxicol. 59: 595–609. Elsevier Ltd.

Re, L., Barocci, S., Sonnino, S., Mencarelli, A., Vivani, C., Paolucci, G., et al. 2000. Linalool modifies the nicotinic receptor-ion channel kinetics at the mouse neuromuscular junction. Pharmacol. Res. 42: 177–181.

Regnault-Roger, C., Vincent, C. & Arnason, J.T. 2012. Essential Oils in Insect Control: Low-Risk Products in a High-Stakes World. Annu. Rev. Entomol. 57: 405–424.

Regnault-Roger, C. 1997. The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integr. Pest Manag. Rev. 2: 25–34.

Rozman, V., Kalinovic, I. & Korunic, Z. 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. J. Stored Prod. Res. 43: 349–355.

Rozman, V., Kalinovic, I. & Liska, A. 2006. Insecticidal activity of some aromatic plants from Croatia against granary weevil (Sitophilus granarius L.) on stored wheat. Cereal Res. Commun. 34: 705–708.

St-Pierre, N., V. Bélanger et A. Brégard. 2014. Ventilation et conservation des grains à la ferme. Réseau Innovagrains et Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec (CRAAQ). 58 p.

Schafer, K.S. 1999. Methyl Bromide Phase-Out Strategies: a global compilation of laws and regulations. Paris.

Schmidt, G.H., Risha, E.M. & El-Nahal, A.K.M. 1991. Reduction of progeny of some stored-product Coleoptera by vapours of *Acorus calamus* oil. J. Stored Prod. Res. 27: 121–127.

Confidentiel

Shaaya, E. & Rafaeli, A. 2007. Essential Oils as Biorational Insecticides–Potency and Mode of Action. In: Insecticides Design Using Advanced Technologies, pp. 249–261. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Shivanandappa, T. & Rajashekar, Y. 2014. Mode of Action of Plant-Derived Natural Insecticides. In: Advances in Plant Biopesticides (D. Singh, ed), pp. 323–345. Springer India, New Delhi.

Surtees, G. 1963. Labobatory studies on dispersion behaviour of adult beetles in grain. I.—The grain weevil, *Sitophilus Granarius* (L.) (Coleoptera, *Curculionidae*). Bull. Entomol. Res. 54: 147–159.

Tripathi, A.K., Upadhyay, S., Bhuiyan, M. & Bhattacharya, P.R. 2009. A review of essential oils as biopesticide in insect-pest management. J. Pharmacol. Phyther. 1: 52–63.

U.S. Coast Guard. 1999. Chemical Hazard Response Information System (CHRIS) - Hazardous Chemical Data. Commandant Instruction 16465.12C. Washington, D.C.: U.S. Government Printing Office.

Winks, R.G. & Russell, G.F. 1994. Effectiveness of SIROFLO® in vertical storages. In: Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection (E. Highley, E. J. Wright, H. J. Banks, & B. R. Champ, eds), pp. 1245–1249. Canberra.

World Health Organization. 2016. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes: Second edition. World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser. 22.

Yang, F.L., Liang, G.W., Xu, Y.J., Lu, Y.Y. & Zeng, L. 2010. Diatomaceous earth enhances the toxicity of garlic, *Allium sativum*, essential oil against stored-product pests. J. Stored Prod. Res. 46: 118–123. Elsevier Ltd.

Ziaee, M., Moharramipour, S. & Francikowski, J. 2014a. The synergistic effects of *Carum copticum* essential oil on diatomaceous earth against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. J. Asia. Pac. Entomol. 17: 817–822. Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society.

Ziaee, M., Moharramipour, S. & Mohsenifar, A. 2014b. Toxicity of *Carum copticum* essential oil-loaded nanogel against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. J. Appl. Entomol. 138: 763–771.

Confidentiel