

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Faculté des Mathématiques et des Sciences de la matière

Département de Chimie

Année : 2020/2021



N° d'enregistrement :

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

Spécialité : Chimie

Option : Analyse physico-chimique et Réactivité des espèces moléculaires

Thème

Contribution à l'étude analytique de métabolites secondaires de quelques plantes sahariennes à caractère insecticide

Présentée et soutenue publiquement par :

BENYAHIA Ibtissam

Le 25/03/2021

Devant le jury composé de :

DENDOUGUI Hocine	Professeur	U.K.M. Ouargla	Président
OULD EL HADJ Mohamed Didi	Professeur	U.K.M. Ouargla	Examineur
YOUSFI Mohamed	Professeur	U.A.T. Laghouat	Examineur
SLOUGUI Nabila	MCA	E.N.P. Constantine	Examineur
HADJ-MAHAMMED Mahfoud	Professeur	U.K.M. Ouargla	Encadreur
BOUZIANE Mebarka	MCA	U.K.M. Ouargla	Co-encadreur
DAHLIZ Abderrahmane	MRA	INRAA Touggourt	Invité

Je dédie ce mémoire à ...

Ma très chère mère. Tu as fait plus qu'une mère peut faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leurs vies et leurs études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de faire depuis ma naissance, durant mon enfance et jusqu'à maintenant.

Mon cher père. Rien au monde ne vaut les efforts que tu as fournis jour et nuit pour mon éducation, ma formation et mon bien être. Ce travail est le fruit des sacrifices que tu as consentis à faire.

Mes beaux-parents Fatima Zohra et Hamou. Avec tous mon respect et ma considération

Ce travail est le témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, vous protéger et vous accorder santé, bonheur et longue vie.

Mon époux HAKIM. Tes sacrifices, ton soutien moral, ta gentillesse sans égal, ton profond attachement m'ont permis de m'épanouir professionnellement. Que dieu réunis nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

Mes très chers frères Yassine, Mahdi, et particulièrement mon petit Younes. Mes beaux-frères Sami, Yassine, Boubaker, Rachid et Hsane.

Ma chère sœur Nardjes, Mes belles sœurs Naziha, Samah, Miada, Sabrina, Kahina et Sara en témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je vous porte.

Mes nièces, mes neveux

Mes chers grands parents, mes tantes et mes oncles.

Mes chères amies du laboratoire BMD : Houria, Fatiha, Lamia, Ahlam, Amina, Nacira et toute l'équipe du laboratoire.

REMERCIEMENTS

A l'achèvement de ce travail je suis honorée et heureuse de remercier vivement tous ceux qui ont d'une façon ou d'une autre participé à la réalisation de cette thèse.

Je tiens à remercier mon Promoteur **Monsieur Hadj Mahammed Mahfoud, Professeur à la Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université K.M. Ouargla (et Directeur du Laboratoire "Biogéochimie des Milieux Désertiques")**, qui m'a encadré tout au long de cette thèse et qui m'a fait partager tout son savoir-faire. Qu'il soit aussi remercié pour sa disponibilité permanente, pour les nombreux encouragements et pour l'ensemble des orientations qu'il m'a accordées. Je lui manifeste toute ma gratitude.

Je remercie mon Co-promoteur **Madame Bouziane Mebarka, Maitre de Conférences 'A' à la Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université K.M. Ouargla**. Cette thèse est le fruit d'une collaboration de plus de cinq années avec elle. C'est à ses côtés que j'ai assimilé ce que rigueur et précision voulaient dire.

Je remercie également le président **DENDOUGUI Hocine Professeur d'UKM OUARGLA**, et les membres du jury **Madame SLOUGUI Nabila Maitre de conférence A à l'ENP Constantine, YOUSFI Mohamed Professeur d'U.A.T.Laghouat et Ould El Hadj Mohamed Didi Professeur au niveau d'UKM OUARGLA**, qui ont bien voulu examiner et juger cette thèse.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du **Laboratoire "Biogéochimie des Milieux Désertiques"** pour leur assistance, leur collaboration et l'ambiance familiale qu'ils m'ont accordé tout au long de ma thèse.

Mes sincères remerciements sont aussi exprimés à l'équipe de **l'Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA-Touggourt)** notamment, à **Madame Lakhdari Wassima Maitre de Recherche A**, à **Monsieur Dahliz Abderahmane Maitre de Recherche A**, ainsi qu'aux **Doctorantes : Melle Wiam Benlamoudi et Melle Randa Mlik** qui m'ont facilités la réalisation d'activité bio-insecticides relatifs à ma thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe du Centre d'Instrumentation en Résonance Magnétique (CIREM) de l'Université libre de Bruxelles composée de **Monsieur le professeur Michel Luhmer, Gaël De Leener, (Doctorant) – Mesdames STEFANOSKA Lidija & D'ORAZIO Rita, Techniciennes Supérieures** ; pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont accordé (de l'Aéroport à l'hébergement), pour les facilités qu'ils ont présenté pour mon intégration au sein de leur équipe et pour l'attention et le suivi fructueux de mes travaux d'analyses, Je ne saurai jamais les remercier pour les orientations et les conseils qu'ils m'ont accordés.

IBTISSAM.BENYAHIA

RESUME

L'étude présente une contribution scientifique à la détermination des produits, de deux plantes spontanées sahariennes (*Euphorbia guyoniana*, *Anvillea radiata*), ainsi que la mise en évidence et l'évaluation de l'activité anti radicalaire et l'activité bio-insecticide *in vitro* de l'extrait butanolique de la partie aérienne d'*Anvillea radiata*.

Notre travail a porté sur l'étude des extraits bruts d'*A.radiata* et *E.guyoniana*. Préliminairement, des tests phytochimiques spécifiques ont révélé la présence des: polyphénols, flavonoïdes, tanins, coumarines, stérols, terpénoïdes et des alcaloïdes (*E.guyoniana*). En effet, la teneur des extraits d'*A.radiata* en polyphénols totaux a été comprise entre 56,75 et 348,93 ($\mu\text{g EE/mg}$ plante sèche) pour les 3 solvants d'extraction (BuOH, AcOEt et CHCl_3). Tandis que, celle d'*E.guyoniana* a été comprise entre 91,45 et 109,30 ($\mu\text{g EE/mg}$ plante sèche) avec les solvants EtOH et DCM. Le fractionnement de la phase butanolique (*A.radiata*) suivi par l'examen des nombreuses sous-fractions par les différentes méthodes chromatographiques et l'utilisation des méthodes d'analyses spectroscopiques de pointe telles que la RMN et l'ESI/MS, nous ont menés à identifier «l'acide 1,5-dicaffeoylquinine».

Concernant l'évaluation de l'activité anti radicalaire, les résultats ont montré un pouvoir appréciable pour cet acide avec un CI_{50} égale à $0.19\mu\text{g/ml}$, mais moins actifs ont été les extraits au BuOH et à l'AcOET dont les CI_{50} sont équivalentes à $26.57\mu\text{g/ml}$ et $41.36\mu\text{g/ml}$, respectivement.

L'estimation de l'activité bio-insecticide *in vitro* d'*A.radiata* contre le puceron *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) des céréales, a révélé que l'extrait au BuOH possède une importante activité insecticide (62%) par rapport à celle de CHCl_3 qui a exposé (26%). Les concentrations létales (CL_{50}) pour l'extrait BuOH sont évaluées après 24h-72h entre 23.07- 5.70 mg/ml, respectivement.

En outre, les analyses des huiles essentielles d'*A.radiata* et *E.guyoniana* par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (GC/MS), ont montré des compositions chimiques très riches pour les deux espèces, avec des pourcentages de présence plus au moins importants.

Mot clés : *Anvillea radiata*, *Euphorbia guyoniana*, activité bio-insecticide, anti-radicalaire, huile essentielle, polyphénols, RMN ; GC/MS.

Abstract

The present study is a scientific contribution to the determination of certain phytochemical compounds, of two spontaneous Saharian plants (*Euphorbia guyoniana*, *Anvillea radiata*), as well as the study of the bio-insecticidal activity *in vitro* of *Anvillea radiata*.

First, the crude extracts of *A. radiata* and *E. guyoniana*, were submitted to a series of preliminary phytochemical tests that revealed the presence of these families of compounds: polyphenols, flavonoids, tannins, coumarins, sterols, terpenoids and alkaloids (only for *E. guyoniana*).

The total polyphenol content in the three extracts of *A. radiata* (BuOH, AcOET and CHCl₃) ranged between 56.75 and 348.93 (µg EE/mg plant dry). While, that of *E. guyoniana* was between 91.45 and 109.30 (µg EE/mg plant dry) with the solvents EtOH and CH₂Cl₂. The purification of the butanolic phase by chromatographic methods followed by NMR and ESI/MS spectroscopic analysis led to the identification of 1,5-dicaffeoylquinic acid.

On another hand, the evaluation of the antiradical activity showed a high potency with an IC₅₀ equal to 0.19 µg/ml. While, the BuOH and AcOET extracts have a lower potency (IC₅₀ = 26.57 µg/ml, IC₅₀ = 41.36 µg/ml, respectively). Moreover, the results of the *in vitro* bio-insecticidal activity of *A. radiata* against the *Rhopalosiphum padi* aphid (*Linnaeus*, 1758) in cereals, revealed an important insecticidal action with BuOH extract estimated at 62%. Whereas, that of CHCl₃ showed (26%). Another test of 3 doses (5 mg/ml, 2.5 mg/ml, 1.25 mg/ml) with the BuOH extract, revealed that time has no influence on mortality, which explains why this extract has a shock effect on aphids, probably caused by its richness in polyphenols. Lethal concentrations (LC₅₀) for the BuOH extract were equal to 23.07 mg/ml, 6.71 mg/ml and 5.70 mg/ml after 24, 48 and 72 hours of treatment, respectively.

GC/MS analysis of the essential oils of *A. radiata* and *E. guyoniana* permitted the identification of a large number of compounds for the two studied plants with different percentages of presence.

Keywords: *Anvillea radiata*, *Euphorbia guyoniana*, bio-insecticide activity, anti-radical, essential oil, polyphenols, NMR; GC/MS

ملخص

هذه الدراسة هي مساهمة علمية في تحديد بعض المركبات الكيميائية من النوعين النباتيين الصحراويين (*Anvillea radiata*، *Euphorbia guyoniana*)، وكذا تقييم للنشاط المبيد للحشرات من مستخلص البوتانول للجزء الهوائي من *Anvillea radiata* على مستوى المخبر

تم إجراء اختبارات فيتوكيميائية أولية للمستخلصات الخام لـ *A. radiata* و *E. guyoniana*، فكتفت عن وجود عائلات المركبات الآتية: البوليفينولات، الفلافونويدات، التانينات، الكومارينات، الستيرويدات، التربينات. وأيضا القلويدات لـ *E. guyoniana* فقط. تراوح إجمالي محتوى البوليفينول لمستخلصات *A. radiata* بين (56.75 و 348.9 µg EE/mg plante sèche) و *E. guyoniana* بين (91.45 و 109.30 µg EE/mg plante sèche) مع المذيبين EtOH و DCM. المذيبات الثلاثة المستخدمة (BuOH و AcOET و CHCl₃)، بينما تراوحت نسبها في *E. guyoniana* بين (91.45 و 109.30 µg EE/mg plante sèche) مع المذيبين EtOH و DCM.

قادتنا تنقية المستخلص البوتانولي لـ *A. radiata* بالطرق الكروماتوغرافية واستعمال طرق التحليل الطيفي (الرنين المغناطيسي النووي ومطيافية الكتلة ESI/MS) للتعرف على المركب: 1,5-dicaffeoylquinic acid.

بالنسبة لتقييم الفعالية المضاد للجذور الحرة، فقد أظهر هذا المركب فعالية عالية، مع تركيز IC₅₀ قدر بـ 0.19 ميكروغرام / مل، في حين أن مستخلصات البيتانول و أسيتات الاثيل أثبتا فعالية أقل (IC₅₀ = 26.57 ميكروغرام / مل، IC₅₀ = 41.36 ميكروغرام / مل) على التوالي.

من جهة أخرى أظهرت نتائج تقييم النشاط المبيد للحشرات الحيوية في المختبر لـ *A. radiata* ضد (*Rhopalosiphum padi aphid Linnaeus*، 1758) في حبوب القمح، أن المستخلص البيتانولي له نشاط مبيد حشري مهم (62%) مقارنة مع مستخلص كلوروفورم الذي أعطى (26%). حيث قدرت التركيزات المميتة (LC₅₀) لمستخلص بيتانول بين 23.07- 5.70 مجم / مل، والتي تم تقييمها بعد 24-72 ساعة على التوالي.

سمح تحليل الزيوت الأساسية لنبات *A. radiata* و نبات *E. guyoniana* بواسطة كروماتوغرافيا الغاز إلى جانب التحليل الطيفي الكتلي (GC / MS) بتشخيص تركيبة كيميائية غنية بالنسبة للنباتين، بنسب حضور أكثر أو أقل أهمية.

الكلمات المفتاحية: *Anvillea radiata*، *Euphorbiaguyoniana*، نشاط مبيدات الحشرات الحيوية، مضاد للجذور، زيت أساسي، بوليفينول، GC / MS، NMR

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>A.radiata</i>	<i>Anvillea radiata</i>
AcOEt	Acétate d'éthyle
AFNOR	Association Française de Normalisation
CC	Chromatographie sur Colonne
CCM	Chromatographie sur couche mince
CI₅₀	Concentration-Inhibitrice de 50% de cellules.
CL₅₀	Concentration létale 50%
COSY	Correlated Spectroscopy
CPG-MS	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<i>D</i>	Doublet
DCM	Dichlorométhane
<i>Dd</i>	Doublet de doublet
<i>Ddd</i>	Doublet de doublet de doublet
DEPT	Distortionless-Enhancement by- Polarization-Transfer
DPPH	(2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl)
<i>E.guyoniana</i>	<i>Euphorbia guyoniana</i>
HE	Huiles-Essentielles
HMBC	Heteronuclear- Multiple Bond Correlation.
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
<i>M</i>	Multiplet
PEG	Polyéthylène glycol
<i>Q</i>	Quadruplet
<i>R.padi</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
ROESY	Rotating Overhouse Effect Spectroscopy
<i>S</i>	Singulet
<i>T</i>	Triplet
TFA	Trifluoroacétique acide

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
Figure 01	Structure du noyau phénol	05
Figure 02	Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques	07
Figure 03	Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques	07
Figure 04	Squelette de base de quelques flavonoïdes	08
Figure 05	Exemples de structures de tanins	10
Figure 06	Exemples de structures des monoterpènes	13
Figure 07	Exemples de structures des sesquiterpène	13
Figure 08	Exemples de structures des composés aromatiques dans les HE	14
Figure 09	Photo de la plante <i>Anvillea radiata</i> coss et dur	18
Figure 10	Distribution géographique d' <i>Anvillea radiata</i> en Algérie	19
Figure 11	Photo original d' <i>Euphorbia guyoniana</i> (région Mesaad, 2017)	25
Figure 12	Cycle de développement des pucerons	30
Figure 13	Présentation des sites d'attaque des insecticides sur l'insecte	33
Figure 14	Représentation graphique des rendements en huiles essentielles.	37
Figure 15	Chromatogramme obtenu pour HE _{Eg} par GC-MS.	40
Figure 16	Représentation graphique de la présence des familles chimiques dans l'huile essentielle d' <i>Euphorbia Guyoniana</i> .	42
Figure 17	Chromatogramme obtenu pour HE _{Ar} par GC-MS	43
Figure 18	Représentation graphique de la présence des familles chimiques dans l'huile essentielle d' <i>Anvillea radiata</i> .	45
Figure 19	Photo du chromatogramme CCM de séparation de la sous fraction A ₁₄ .	51
Figure 20	Droite d'étalonnage de l'acide gallique	59
Figure 21	Chromatogramme CCM des composées après la colonne sephadex LH ₂₀	61
Figure 22	Chromatogramme HPLC du produit purifié N4	61
Figure 23	Spectre RMN ¹ H et COSY (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 la partie [7.60-6.30 ppm].	62

Figure 24	Spectre HSQC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 zoom sur la partie [7.60-5.55 ppm]	63
Figure 25	Spectre HMBC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 zoom sur la partie [7.65-6.25 ppm]	64
Figure 26	Première entité faisant partie de la structure du composé N ₄	64
Figure 27	Deuxième entité faisant partie de la structure du composé N ₄ .	66
Figure 28	Spectre RMN ¹ H (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [5.5-1.9 ppm]	67
Figure 29	Spectre COSY (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [6-1 ppm]	67
Figure 30	Spectre HSQC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [6.30-1.80]ppm..	68
Figure 31	Troisième entité faisant partie de la structure du composé N ₄ .	68
Figure 32	Quatrième entité faisant partie de la structure du composé N ₄	69
Figure 33	Spectre de masse d'ESI/MS en mode positive du composé purifié N4	69
Figure 34	Les caractéristiques structurales anti-radicalaires de l' acide 1-5 dicafeollyquinine	73
Figure 35	Effet de la durée d'application sur la mortalité de <i>R. padi</i> traité avec l'extrait chloroformique d' <i>A.radiata</i> .	80
Figure 36	Effet de la concentration sur la mortalité de <i>R. padi</i> traité avec l'extrait butanolique d' <i>A.radiata</i> .	81
Figure 37	Représentation graphique de l'effet d'interaction concentration (C1, C2, C3) et les durées d'application (24h, 48h, 72h) sur la mortalité de <i>R.padi</i> traité avec l'extrait butanolique d' <i>A.radiata</i>	82
Figure 38	Taux de mortalité de <i>R. padi</i> traité avec les deux extraits butanolique et chloroformique.	83
Figure 39	Evolution du taux de mortalité corrigé du <i>R. padi</i> en fonction des variations des périodes d'exposition (24, 48 et 72h) pour les deux extraits bruts.	84

Figure 40		85
	Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de <i>R.padi</i> sous l'effet de l'extrait BuOH brut d' <i>Anvillea radiata</i> après 24h du traitement.	
Figure 41		86
	Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de <i>Rhopalosiphum padi</i> sous l'effet de l'extrait BuOH brut d' <i>Anvillea radiata</i> après 48h du traitement	
Figure 42		86
	Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de <i>Rhopalosiphum padi</i> sous l'effet de l'extrait BuOH brut d' <i>Anvillea radiata</i> après 72h du traitement	

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
Tableau 01	Structures chimiques de quelques substances de flavonoïdes.	09
Tableau 02	Différentes structure des flavonoïdes isolées de l'espèce <i>Anvillea radiata</i>	20
Tableau 03	Différentes structure de sesquiterpène lactones isolées de l'espèce <i>Anvillea radiata</i>	21
Tableau 04	Différentes structure des acides phénoliques isolées de l'espèce <i>Anvillea radiata</i>	21
Tableau 05	Différentes structure isolées de l'espèce <i>Euphorbia guyoniana</i>	26
Tableau 06	Les insectes ravageurs de blé dur	29
Tableau 07	Propriétés organoleptiques des huiles essentielles préparées	37
Tableau 08	Composition chimique d'huile essentielle d' <i>E. guyoniana</i> par GC/MS	41
Tableau 09	Composition chimique d'huile essentielle d' <i>A. radiata</i> par GC/MS	44
Tableau 10	Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante <i>A.radiata</i> .	50
Tableau 11	Résultats des tests phyto-chimiques préliminaires	57
Tableau 12	Rendement (R%) des extraits	58
Tableau 13	Teneurs en phénols totaux des extraits des parties aériennes d' <i>A.radiata</i> et <i>E.guyoniana</i> .	60
Tableau 14	données spectrales fournies par l'analyse RMN du composé N4	70
Tableau 15	Résultats des CI ₅₀ des étalons	72
Tableau 16	Valeurs de CL ₅₀ appliquées sur <i>R.padi</i> en fonction du temps	85

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION..... 01

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES METABOLITES SECONDAIRES

I.1.	Les polyphénols.....	05
I.1.1.	Classification des polyphénols.....	06
I.1.1.1	Les polyphénols simples.....	06
I.1.1.1.a	Acides phénoliques.....	06
I.1.1.1.b	Flavonoïdes.....	08
I.1.1.2.	Polyphénols complexes.....	09
I.1.1.2.a	Tanins hydrolysables	10
I.1.1.2.b	Tanins condensés	10
I.1.2	Les polyphénols et la lutte contre les phytopathogènes.....	10
I.2.	Les huiles essentielles	11
I.2.1.	Définition.....	11
I.2.2.	Rôle physiologique	11
I.2.3.	Composition chimique.....	12
I.2.3.1.	Les terpènes.....	12
I.2.3.1.a	Les monoterpènes.....	12
I.2.3.1.b	Les sesquiterpènes.....	13
I.2.3.1.c	Les diterpènes.....	13
I.2.3.2.	Les composés aromatiques	14
I.2.3.3.	Les molécules diversement fonctionnalisées.....	14
I.2.4.	Procédés d'extraction des huiles essentielles.....	14
I.2.4.1.	L'hydrodistillation.....	15

I.2.5.	Utilisations des huiles essentielles dans la biologie	15
--------	---	----

CHAPITRE II : ETUDE BOTANIQUE

II.	Description des espèces végétales étudiées.....	17
II.1.	<i>Anvillea radiata</i>	17
II.1.1.	Description botanique.....	17
II.1.2.	Usage thérapeutique.....	18
II.1.3.	Répartition géographique.....	18
II.1.4.	Travaux antérieurs	19
II.2.	<i>Euphorbia guyoniana</i>	20
II.2.1.	Description botanique.....	20
II.2.2.	Usage d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss et Reut.....	21
II.2.3.	Répartition géographique.....	21
II.2.4.	Travaux antérieurs.....	21
II.3.	Généralités sur les insectes.....	23
II.3.1.	Les pucerons.....	23
II.3.1.1	Cycle biologique des pucerons.....	24
II.3.1.2	Dégât des pucerons	25
II.4.	Les bio-pesticides	25
II.4.1	Les bio-pesticides végétaux.....	26
II.5.	Site d'action des insectes	27

CHAPITRE III: ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

III.1.	Préparation du matériel végétal	64
III.2.	Procédé d'extraction	64
III.3.	Rendement en huiles essentielles	65
III.4.	Analyses chromatographiques des huiles essentielles	65
III.4.1.	Analyse par GC/FID.....	65
III.4.2.	Analyse par GC/MS.....	65
III.5.	Résultats et discussion.....	66

III.5.1.	Détermination de rendements des HE _{AR} et HE _{EG}	66
III.5.2.	Caractérisation des huiles essentielles par GC/MS	67
III.5.2.a	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>E.guyoniana</i>	68
III.5.2.b	Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>A. radiata</i>	70

CHAPITRE IV : ETUDE PHYTOCHIMIQUE

IV.1.	Matériel végétal.....	29
IV.2.	Tests phytochimiques préliminaires.....	29
IV.2.1.	Test des alcaloïdes.....	29
IV.2.2.	Test des flavonoïdes.....	30
IV.2.3.	Test des tanins.....	30
IV.2.4.	Test des coumarines.....	30
IV.2.5.	Test des stérols.....	30
IV.2.6.	Test des phénols.....	31
IV.2.7.	Test des terpénoïdes.....	32
IV.3.	Dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin-ciocalteu.....	32
IV.4.	Préparation des extraits de la plante <i>E.guyoniana</i> , au Soxhlet.....	33
IV.5.	Préparation des extraits de la plante <i>Anvillea radiata</i>	33
IV.6.	Chromatographie sur couche mince.....	35
IV.7.	Fractionnement de l'extrait n-Butanolique d' <i>A.radiata</i>	36
IV.8.	Purification de la fraction A14.....	38
IV.9.	Chromatographie liquide à haute performance (HPLC/DAD-UV)	39
IV.10.	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	40
IV.10.1.	Corrélations homonucléaires.....	40
IV.10.2.	Corrélations hétéronucléaires.....	40
IV.11.	Stress antioxydant.....	41
IV.11.1.	Estimation du pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH.....	41

IV.11.1.1.	Principe.....	41
IV.11.1.2.	Préparation des essais.....	42

CHAPITRE V : RESULTATS ET DISCUSION

V.1.	Analyse phyto-chimique.....	44
V.2.	Détermination des rendements.....	45
V.3	Dosage des phénols totaux.....	46
V.4	Caractérisation structural	48
V.4.1	Purification du composé N ₄	48
V.4.2	Elucidation structurale du composé N ₄	49
V.5.	Activité antioxydante.....	59

CHAPITRE VI : TESTS BIO-INSECTICIDE

VI.1.	Elevage d'insectes.....	74
VI.2.	Effet larvicide.....	75
VI.3.	Identification du puceron.....	76
VI.4.	Doses et traitements.....	76
VI.5.	Analyses statistiques.....	76
VI.6.	Résultats et discussion.....	77
VI.6. 1	Teste de l'extrait chloroformique (CHCl ₃)	77
VI.6.1.a.	Comparaison entre le traitement d'extrait CHCl ₃ et le Témoin	77
VI.6.1.b.	L'interaction entre le traitement avec l'extrait chloroformique et sa durée	77
VI.6. 2.	Test d'extrait Butanolique (n-BuOH)	78
VI.6.2.a	Effet de la concentration d'extrait BuOH.....	78
VI.6.2.b	L'interaction entre le traitement avec l'extrait Butanolique et sa durée	79
VI.6.3	Interaction entre les deux extraits (BuOH, CHCl ₃).....	79

VI.6.4. Interaction entre les extraits (BuOH et CHCl₃) et la durée d'application..... **80**

VI.7. La concentration Létale 50 (CL₅₀) d'extrait BuOH **81**

Conclusion générale..... **86**

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Un grand nombre de composés organiques intervient dans la qualité de vie de l'être humain, en particulier dans le domaine alimentaire, où certains participent à la coloration ou à la saveur, d'autres contribuent de façon importante à la capacité de résistance contre divers effets naturels tels que l'attaque des insectes et des micro-organismes. Par ailleurs, les substances naturelles végétales sont recherchées en raison de leurs nombreuses activités biologiques qui promeuvent des effets positifs sur la santé. Ces activités comprennent des activités antivirales, antibactériennes, antifongiques, insecticides, antipaludiques, anti-oxydantes et anticancéreuses, utilisées dans les secteurs industriels pharmaceutiques et de l'agriculture. Nous nous focaliserons dans ce travail sur les pesticides dont les synthétiques classiques sont devenus préoccupants, même si l'on présume qu'ils ont atteint le degré «d'innocuité». L'utilisation répétée et continue de pesticides à base du même ingrédient actif, appartenant à la même famille et au même groupe chimique, favorise considérablement le développement de populations résistantes d'organismes nuisibles entraînant par le fait même, un besoin additionnel en pesticides (**Ahmad et al., 2008**).

Dans ce contexte, de nombreuses initiatives sont déployées depuis quelques années pour développer des méthodes alternatives à l'utilisation de ces pesticides. Ces méthodes qui ont trait à l'emploi de ce que l'on appelle communément les bio-pesticides. Il existe deux types de bio-pesticides sur le marché, en l'occurrence : les pesticides biochimiques qui sont des substances d'origine naturelle et/ou des molécules synthétiques qui leur ressemblent (**Thakor, 2006**) et les pesticides microbiens qui contiennent les microorganismes bénéfiques, tels que les bactéries, les champignons, les levures, les virus ou les protozoaires, comme matière active (**BIA, 2013**), qui sont biodégradables, à activité contre des ravageurs spécifiques, et sans effets secondaires sur l'environnement (**Rahbani, 2015**). Ces derniers, pourraient prendre la relève du «tout chimique», afin de promouvoir la lutte biologique alternative en vue d'une agriculture durable.

Dans les pays en voie de développement, l'utilisation des molécules chimiques de synthèse conventionnelles est encore d'une manière intensive et à grande échelle sans le moindre souci pour l'environnement et la santé humaine. En Algérie, la situation est plus accablante puisque le pesticide de synthèse est de plus en plus utilisé sans aucun contrôle ni suivi et en particulier dans les pôles agricoles émergents du sud ' Adrar, Hassi R'mel, Tindouf, El Oued spécialisés dans la culture des produits maraichers (**Bouziani, 2007**). En outre, avec l'économie de marché actuelle, plusieurs entreprises se sont spécialisées dans l'importation d'insecticides, fongicides et divers produits apparentés. Ainsi, environ 480 produits phytosanitaires sont

homologués en Algérie, dont une quarantaine de variétés sont largement utilisées par les agriculteurs. 30 000 tonnes sont «épandues» chaque année (**Merhi, 2008**)

Ce travail consiste à amorcer des recherches dont l'objectif principal étant de lutter contre les organismes fléaux : agents microbiens pathogènes et ravageurs des cultures maraîchères et céréalières (Blé, tomate, pomme de terre, etc.) par des méthodes biologiques. L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps. En effet, le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes (**Crosby et al. , 1966**). D'après Jacobson (1989), plus de 2000 espèces végétales possédant une activité insecticide sont déjà identifiées. Récemment, la litière de l'aulne, plante riche en polyphénols, s'est révélée être douée de propriétés toxiques importantes vis-à-vis des larves des moustiques *Culex pipiens* (**David et al., 2000**).

Notre objectif, dans ce travail, est de quantifier les composés phénoliques et d'évaluer in vitro quelques activités biologiques des extraits de deux plantes médicinales spontanées du Sahara septentrional. Le choix des plantes est dicté, d'une part, par le caractère endémique de la plupart des plantes investiguées, et d'autre part, par une recherche bibliographique qui a révélé qu'il y a un nombre restreint de rapports scientifiques sur certaines espèces.

Notre travail est structuré comme suit :

- Une étude phytochimique comprenant l'extraction des polyphénols, leur quantification, purification et identification par les méthodes chromatographiques et spectroscopiques ainsi que l'évaluation de leur activité biologique.
- La caractérisation et l'identification des composantes des huiles essentielles de deux plantes choisies, sur la base de travaux antérieurs, par la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de Masse (GC/MS).
- Une étude de l'effet bio-insecticide des extraits bruts foliaires de l'espèce *Anvillea radiata*.

Notre thèse est finalisée par une conclusion résumant l'essentiel de nos résultats et des perspectives à concrétiser ultérieurement pour fructifier d'avantage les résultats de ce travail.

CHAPITRE I :
METABOLITES SECONDAIRES

Synthèse bibliographique

Les métabolites secondaires des végétaux, par opposition aux métabolites primaires (protéines, lipides et glucides), peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes. Ils interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) mais également, ils exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement (**Mansour, 2009**). En fait, ces produits naturels participent, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés : action anti-herbivore (la menthe par exemple), inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et la lumière UV. D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales (**Bruneton J, 2008**).

I.1- Les polyphénols:

Les polyphénols, dénommés aussi composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal et qui appartiennent au métabolisme secondaire de ces végétaux (**Bianco A, 2006; He Z et al, 2008; Mompon B et al, 1996**). On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Leurs fonctions ne sont pas strictement indispensables à la vie du végétal, cependant ces substances jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement (**Richter G, 1993**), contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème.

Le terme « phénol » englobe, approximativement, 10000 composés naturels identifiés (**Martin S et Andriant sitohaina R, 2002 ; Druzynka B et al, 2007**). L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre (**Figure 01**) ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (**Bruneton J, 1999**).

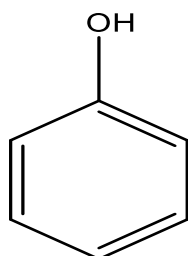


Figure 01 : Structure du noyau phénol

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'élaboration des cycles aromatiques, la voie shikimate (également responsable de la synthèse des acides aminés Phe et Tyr) et la voie polyacétates qui consiste en la condensation de molécules d'acétylcoenzyme A. Ces biosynthèses ont permis la formation d'une grande variété de molécules spécifiques à une espèce végétale, à un organe et/ou à un tissu particulier **(Bruneton, J 2008 ; Guignard J.L, 2000)**.

I.1.1-Classification des polyphénols

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes **(Chifford M.N, 1999 ; D'Archivio M et al, 2007)**.

I.1.1.1-Polyphénols simples

I.1.1.1.a-Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous classes : les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique **(Bruneton J, 2008)**.

- **Dérivés de l'acide hydroxybenzoïque (C6-C1)**

Ces acides sont très communs aussi bien sous forme libre que sous forme combinée à l'état d'esters ou hétérosides **(Bruneton J, 2008 ; Skerget M et al, 2005)**. Cette catégorie est abondante dans les végétaux et les aliments, notamment les épices, les fraises, certains fruits rouges et l'oignon dans lesquels les concentrations peuvent atteindre plusieurs dizaines de milligrammes par kilogramme de fruits frais **(Manach C et al, 2004)**. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque les plus répandus sont illustrés dans **la figure (02)**:

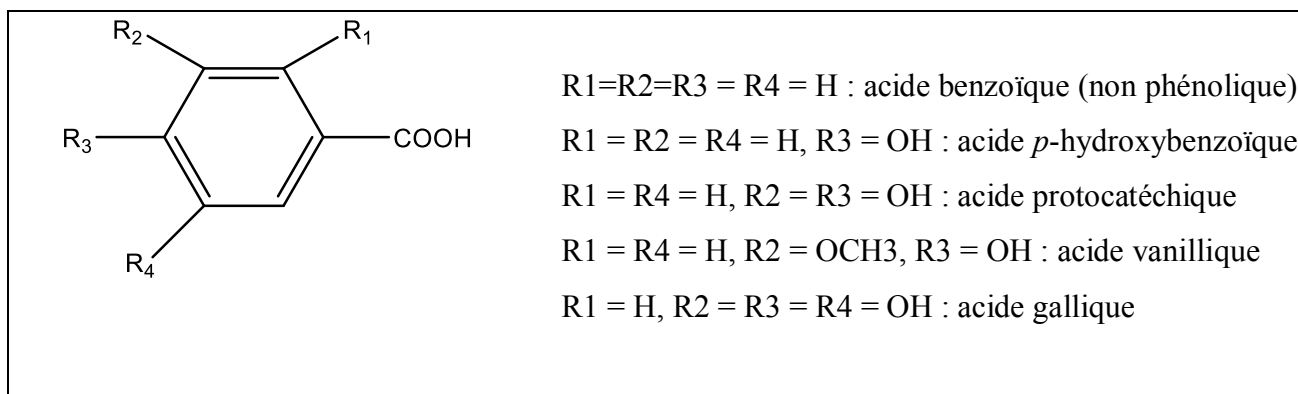


Figure 02 : Structures chimiques des acides hydroxybenzoïques (Bruneton J, 2008)

• **Dérivés de l'acide hydroxycinnamique (C6-C3)**

Ces composés ont une distribution très large. Rarement libres, ils sont souvent estérifiés (Skerget M et al, 2005) et peuvent également être acidifiés ou combinés avec des sucres (O-acylglucosides, O-arylglucosides) ou encore des polyols tels que l'acide quinique (Figure 03) (Bruneton J, 2008).

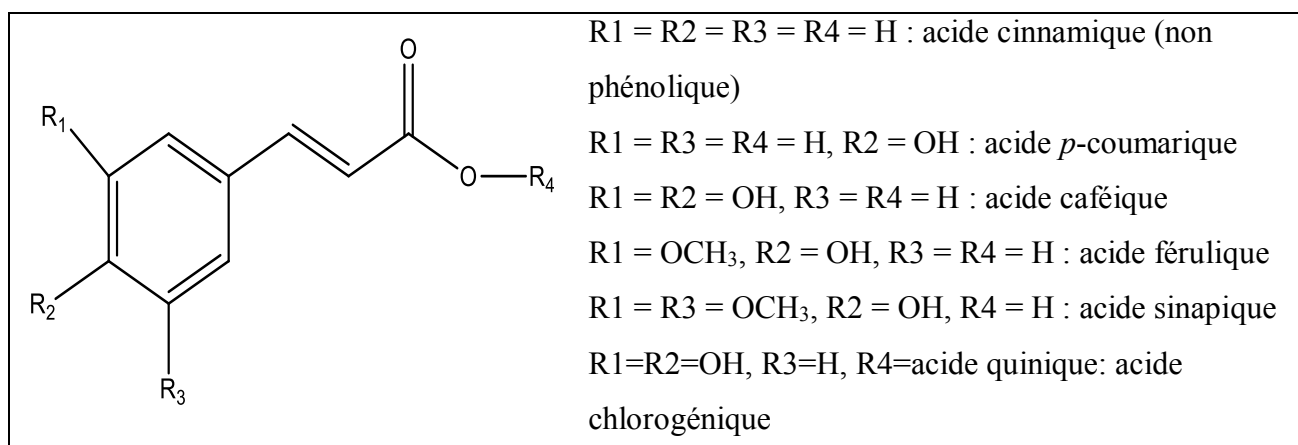


Figure 03 : Structures chimiques des acides hydroxycinnamiques (Han X.H et al, 2007 ; Chira K et al, 2008)

I.1.1.1.b-Flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'une chaîne de 3 atomes de carbone cyclique ou ouverte (chalcones et aurones), formant une structure C6-C3-C6 (**Figure 04**) (**Ghedira K ; 2005**). Ce sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques. Ils interviennent dans la pigmentation des fleurs et dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (**Crozier A, 2003**).

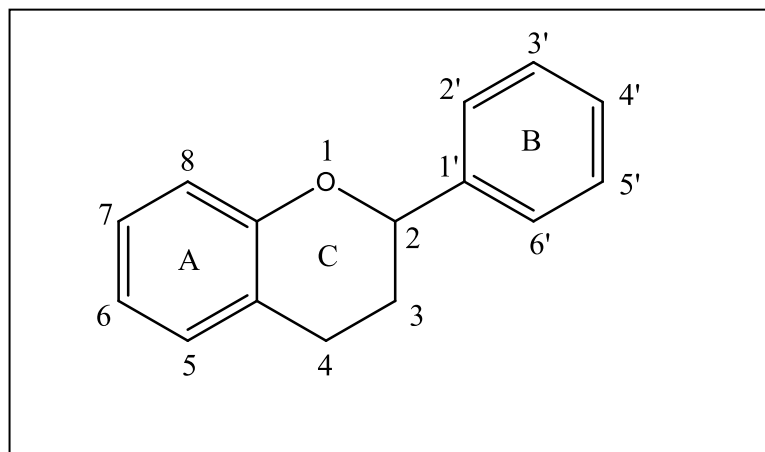
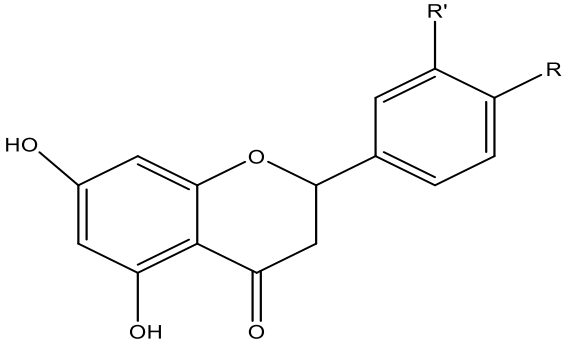
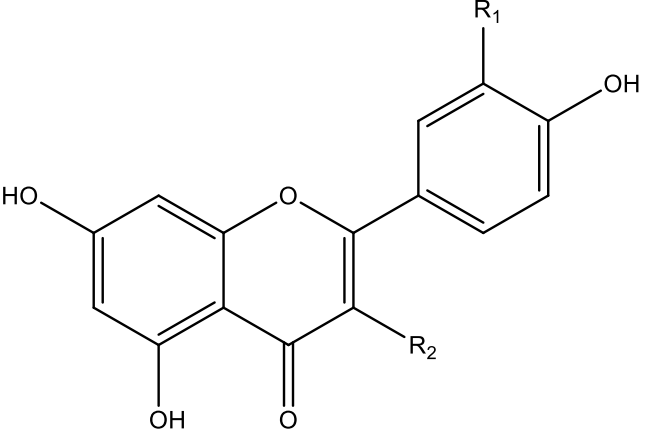
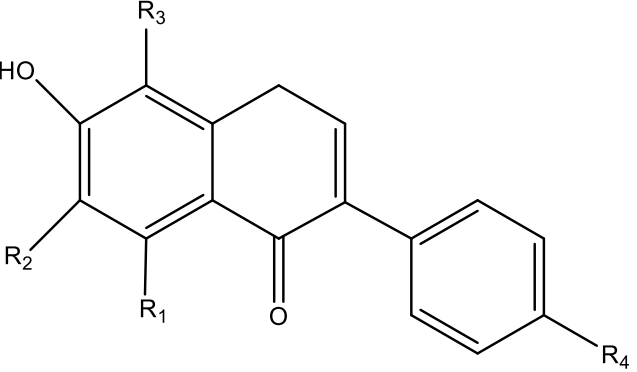
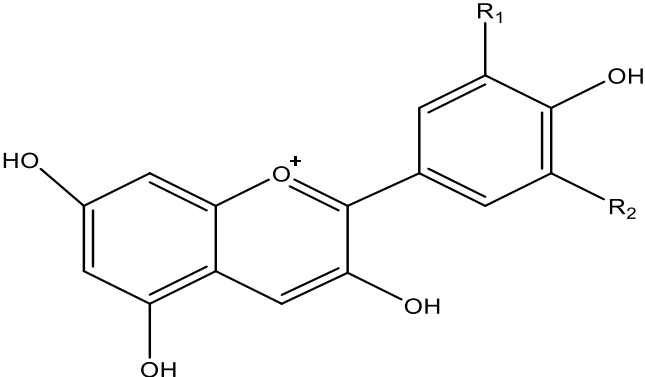


Figure 04 : Squelette de base de quelques flavonoïdes

Il existe plusieurs classes de flavonoïdes, dont les principales sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines. La structure de base de ces différents flavonoïdes peut subir de nombreuses substitutions, les groupements hydroxyles étant généralement en positions 3, 5, 4' et 7. Ces substances existent généralement sous forme de glycosides (**Chira K et al, 2008**).

Tableau 01: Structures chimiques de quelques substances de flavonoïdes.

Classe	Structure de base
<p>Flavanones:</p> <p>R= OH; R'=H: naringenin</p> <p>R=R'=OH: eriodyctiol</p> <p>R=OCH₃ , R'= H: hésperintine</p>	
<p>Flavonols :</p> <p>R₁= H, R₂= OH: Kaempferol.</p> <p>R₁= OH, R₂= OH: Quercetine.</p> <p>R₁= OH, R₂= glucose-rhamnose: Rutine</p>	
<p>Isoflavones :</p> <p>R₁=R₂=R₃= OH, R₄= OH:Diadzein</p> <p>R₁=R₄= OH, R₂=R₃= H: Genistein</p> <p>R₁=R₃=H, R₂= OCH₃, R₄= OH: Glycitein</p>	
<p>Anthocyanine :</p> <p>R₁= R₂= H : Pelargonidin</p> <p>R₁= OH, R₂= H: Cyanidin</p> <p>R₁=R₂=OCH₃ : Malvidine</p>	

I.1.1.2- Polyphénols complexes (tanins)

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Aguilera-carbo A et al, 2008). Historiquement, le terme « tanin » regroupe des composés poly-phénoliques caractérisés par leurs propriétés de combinaison aux protéines (Paris Met Hurabeillen M, 1981), d'où leur capacité à tanner le cuir. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Linden et Lorient D, 1994).

I.1.1.2.a - Tanins hydrolysables : ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique (Fig. 5) (Cowan M.M, 1999; O'Connell J.E et Fox P.F, 2001). Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (Ribéreau-Gayon P, 1968).

I.1.1.2.b- Tannins condensés : les tannins condensés ou les pro-anthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C4 et C8 ou C4 et C6 (Figure 05) (Bruyne T et al, 1999 ;O'Connell J.E et Fox P.F, 2001).

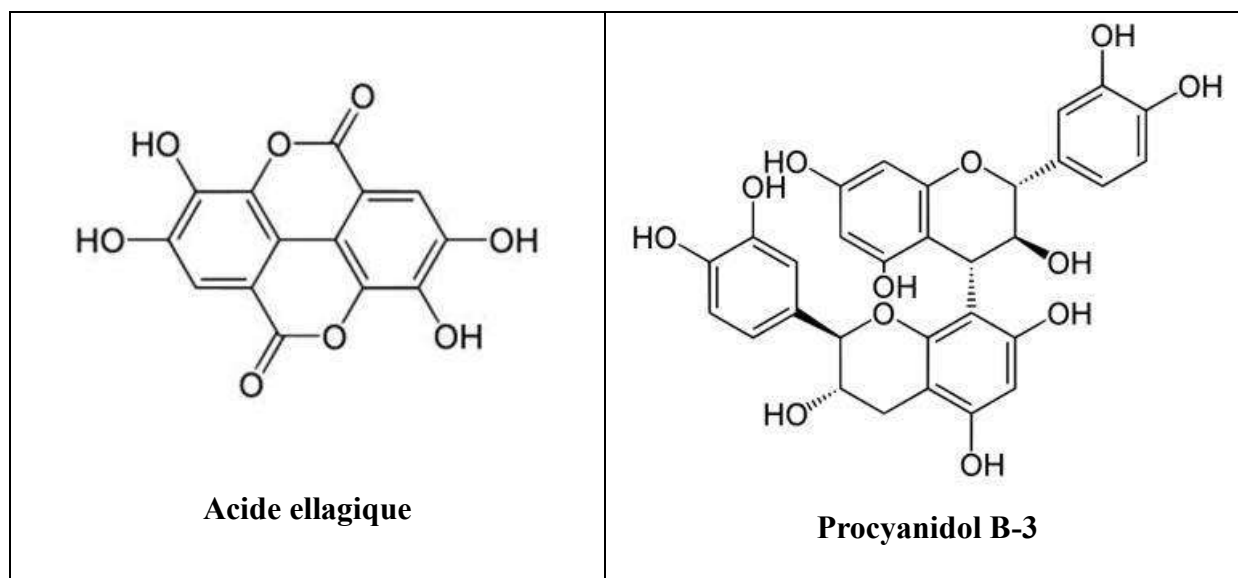


Figure 05 : Exemples de structures de tanins.

I.1.2- Les polyphénols et la lutte contre les phytopathogènes :

Aux cours de ces dernières années, l'utilisation de produits d'origine végétale pour la protection de la santé humaine a pris une grande expansion de même qu'il a été introduit de nouveaux produits. La fortification du système de défense des cultures par des composés phénoliques s'est introduite dans la recherche de substances actives dans le domaine de la lutte biologique, les polyphénols sont des constituants de défenses naturelles des végétaux contre l'attaque des phytopathogènes. Certains acides phénoliques (l'acide chlorogénique, l'acide quinique, l'acide férulique, ect.) sont des inhibiteurs *in vitro* de différents agents phytopathogènes fongiques des cultures (**Lattanzio et al, 2001**). Les composés phénoliques sont largement connus pour leur pouvoir antioxydant, celui-ci réside dans l'élément structural fondamental qui les caractérise (**Bruneton, 2008; Šaponjac et al, 2016**).

En raison de leur pouvoir antimicrobien, les composés phénoliques constitutifs semblent être impliqués dans la résistance de nombreuses plantes aux agents phytopathogènes. Les teneurs phénoliques sont fréquemment corrélées avec le niveau de résistance des plantes à l'infection parasitaire : acide chlorogénique dans l'interaction pomme de terre – *Verticillium alboatrum* (**Patil et al, 1966**), acide caféoylshikimique chez les palmiers dattier et *Fusarium oxysporumf.sp. albedinis* (**Ziouti et al, 1996b**).

I.2. Les huiles essentielles :

I.2.1- Définition :

Définie par la Pharmacopée européenne, une huile essentielle est un « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie.

L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » (**EDQM**)

Selon la monographie de la Pharmacopée européenne, la matière première végétale peut être fraîche, flétrie, sèche, entière, contuse ou pulvérisée, à l'exception des fruits du genre Citrus qui sont toujours traités à l'état frais. Dans le cas du genre Citrus, dont les fruits sont traités par expression à froid, l'AFNOR (Association Française de Normalisation) ne parle pas d'huile essentielle mais d'essence.

I.2.2-Rôle physiologique

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante est inconnu. Il y a beaucoup de spéculation au sujet du rôle des huiles essentielles des plantes. Certainement plusieurs effets apparents utiles ont été décrits : réduction de la compétition des autres espèces de plantes «allélopathie » par inhibition chimique de la germination des graines, et protection contre la flore microbienne infectieuse par les propriétés fongicides et bactéricides, et contre les herbivores par goût et effets défavorables sur le système nerveux **(Oussalah M. et al, 2006)**.

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas pour favoriser la pollinisation. D'autre considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques **(Belaiche P, 1979)**.

I.2.3-Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes à deux groupes caractérisés par les origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes d'une part et le groupe des composés aromatiques dérivés du phényl propane, beaucoup moins fréquents, d'autre part **(Bruneton, 1999)**.

I.2.3.1- Les terpènes

Ils sont très répandus dans la nature notamment dans les plantes comme constituant des huiles essentielles. Ce sont des composés, de formules brutes $(C_5H_8)_n$, ces hydrocarbures sont responsables en partie, de l'odeur dégagée par les plantes. La nomenclature utilisée a pour base une unité terpénique en C_{10} , les différents terpénoïdes sont obtenue par l'addition de nouvelles molécules C_5 .

I.2.3.1.a-Monoterpènes

Ce sont des molécules en C_{10} , ces molécules peuvent être linéaires, monocycliques ou bicycliques, la plupart de ces composés possèdent des centres asymétriques et sont donc optiquement actifs. Dans la nature, on ne retrouve fréquemment qu'un seul des stéréoisomères **(Figure 06)**.

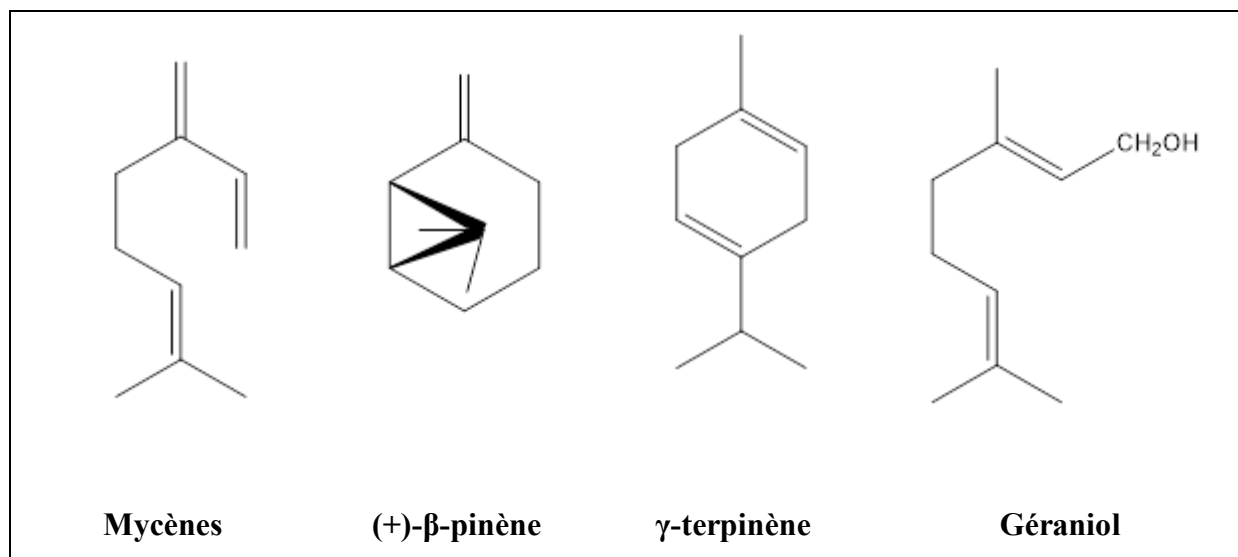


Figure 06 : Exemples de structures des monoterpènes (Bruneton, 1999).

I.2.3.1.b-Sesquiterpènes

Constitués par assemblage de trois unités isoprènes, et donc de 15 atomes de carbones. Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Ces deux derniers types sont les plus fréquents. D'autres structures peuvent être rencontrées comme des peroxydes ou des lactones (Figure 7).

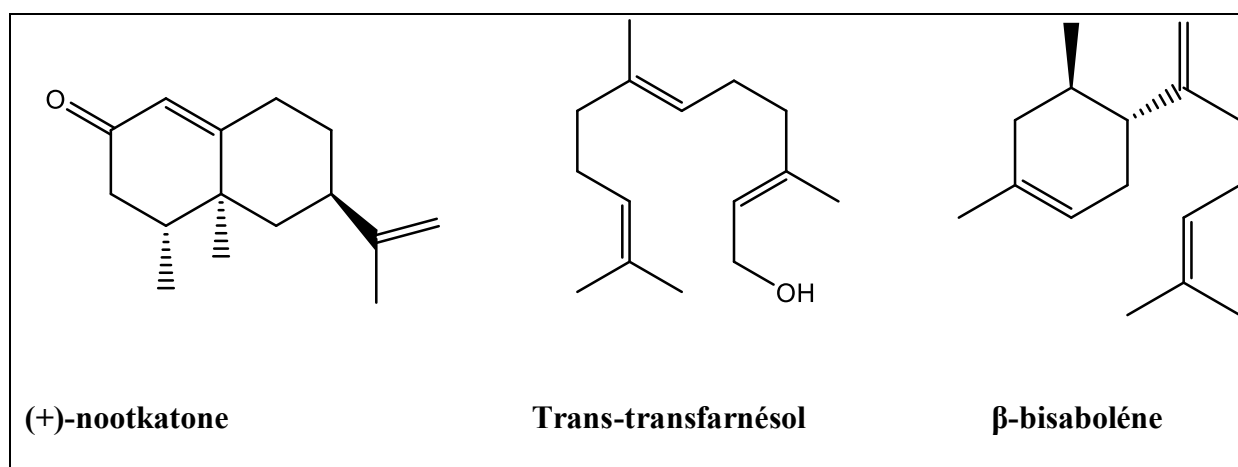


Figure 07 : Exemples de structures des sesquiterpènes (Bruneton, 1999)

I.2.3.1.c- Diterpènes

Les di-terpènes dérivent bio-synthétiquement du Pyrophosphate de géranylgeranyl. Ils peuvent être acycliques, monocycliques, bi-cycliques, tricycliques, tétra-cycliques ou macrocycliques et beaucoup de di-terpènes possèdent un système de cycles supplémentaires dans leur chaîne latérale ou sous forme de substituant d'ester (Marouf et Tremblin, 2009).

I.2.3.2- Les composés aromatiques

Les dérivées du phénylpropane (C6-C3) sont beaucoup moins fréquentes que les précédents. Ce sont très souvent des allyles et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae.

On peut également rencontrer dans les huiles essentielles des composés en C6-C1 comme la vanilline (assez fréquente) ou comme l'anthranilate de méthyle. Les lactones dérivées des acides cinnamiques (c.-à-d. les coumarines) étant, au moins pour les plus simples d'entre elles, entraînaient aussi par la vapeur d'eau, elles seront également présentes dans certaines huiles essentielles (Figure 08).

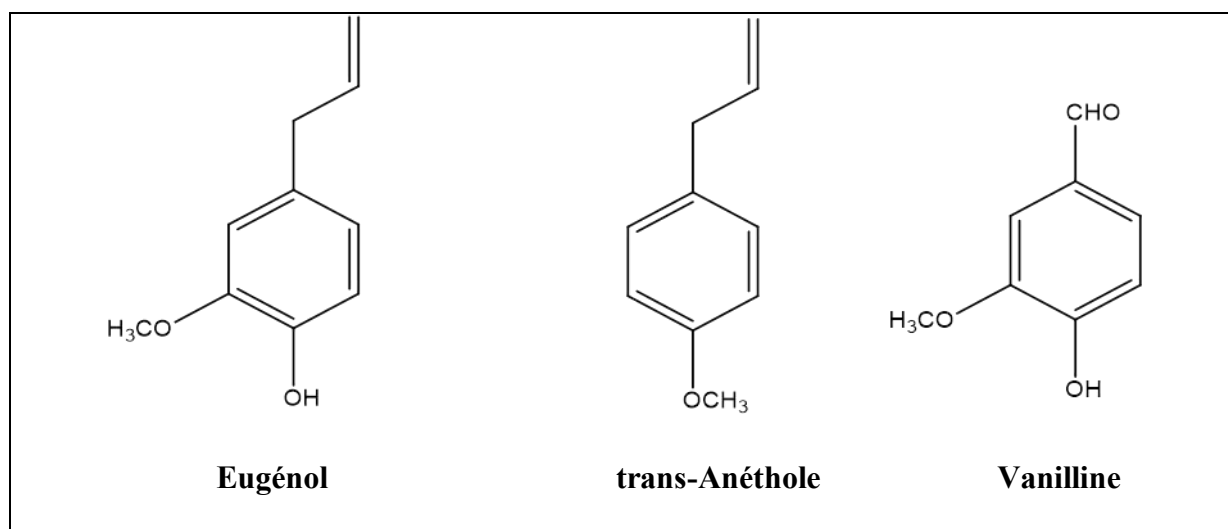


Figure 08 : Exemples de structures des composés aromatiques dans les HE.

I.2.3.3- Les molécules diversement fonctionnalisées

En plus de la diversité terpénique et des phényles-propane, il existe d'autres molécules odorantes qui peuvent intervenir dans la constitution de certaines huiles essentielles, telles que des esters à courtes chaînes, l'alcool cinnamique, le benzaldéhyde les coumarines volatils et les flavonoïdes. **(Bruneton, 1999)**.

I.2.4- Procédés d'extraction des huiles essentielles

A l'intérieure de leurs cellules, les végétaux renferment des essences, c'est-à-dire des sécrétions naturelles que l'on extrait pour obtenir des huiles essentielles **(Moro Buronzo, 2008)**. Elles sont obtenues avec des rendements très faibles ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Plusieurs modes d'extractions sont disponibles, dans ce contexte on emploie la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée pour extraire les composés volatiles des plantes.

I.2.4.1- L'hydro-distillation :

Le principe de l'hydro-distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à l'ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur **(Chemat, 2009)**. Au laboratoire, le système équipé d'une cohobe et utilisé généralement pour l'extraction des huiles essentielles en accord avec la Pharmacopée Européenne est le Clevenger **(Clevenger, 1928)**.

I.2.5- Utilisation des huiles essentielles dans la biologie

Les huiles essentielles sont dotées de nombreuses propriétés médicinales, à savoir, elles sont efficaces contre de nombreux germes et virus ainsi que des mycoses. Chaque huile essentielle à sa spécificité thérapeutique, dans l'aromathérapie et la cosmétique, auxquels s'ajoute récemment le bio-contrôle des bio-agresseurs.

En effet, plusieurs activités biologiques sont attribuées au β -caryophyllène : insecticide **(Omolo et al, 2012)** ; antimicrobienne **(Goren et al., 2011)** et anti-inflammatoire **(havan et al., 2010)**.

CHAPITRE II :
ETUDE BOTANIQUE

II. Description des espèces végétales étudiées :

II.1. l'espèce *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu 1856) :

II.1.1. Description botanique :

La plante utilisée dans ce travail (**Figure 09**) est *Anvillea radiata* Coss. & Durieu 1856. C'est un arbuste très rameaux de 20-50 cm. Les tiges et les rameaux sont ligneux à la base, les feuilles sont en triangle allongé, atténuées à la base en pétiole alors que le limbe est fortement denté. Le capitule est grand, de 4 à 5 cm de diamètre, y compris les longues ligules, entouré de feuilles supérieures rayonnantes qui passent progressivement aux bractées coriaces. Les fleurs sont toutes jaune-orangé. Les paillettes du réceptacle ont tronquées au sommet et prolongées en une soie. Les achaines sont prismatiques, ceux de la périphérie à trois angles, ceux du centre à quatre angles. Cette espèce botanique est classée comme suit (**Ozenda, P., 1977 ; Quezel, P., Santa, S., 1963**) :

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Série	Gamopétales infère ovaires
Ordre	<i>Astrales</i>
Famille	<i>Composées</i>
Genre	<i>Anvillea</i>
Espèce	<i>Anvillea radiata</i> Coss. & Durieu 1856

Figure 09 : photo de la plante *Anvillea radiata* Coss et Dur (<http://atlas-sahara.org/>)



II.1.2. Usage thérapeutique

Selon les pratiques traditionnelles algériennes, la plante est considérée comme plante médicinale, elle est souvent utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter des maladies courantes. A titre d'exemple, l'infusion des feuilles et des tiges d'*A. radiata* est appliquée dans le traitement des phytopathologies broncho-pulmonaires (Mazia et al, 1993) et digestives (Mazia et al, 1993 ; chehma, 2006). Elle a également été rapportée comme plante à activité hypoglycémique (EL Hassani et al, 2004 ; AL-yahya et al, 1990).

II.1.3. Répartition géographique

A. radiata, est une espèce endémique saharienne rencontrée particulièrement, en Algérie et au Maroc, dans le Sud du Sahara septentrional et Sahara central, dans les dépressions sablo-argileuses (Quezel et Santa, 1963). En Algérie, on l'observe en particulier dans les régions d'Ouargla (Oueld El Hadj M., 2003), Djelfa, Bechar (Djellouli, M; 2013) et El Golea (El Hassani, B ; 2004) (Figure 10).

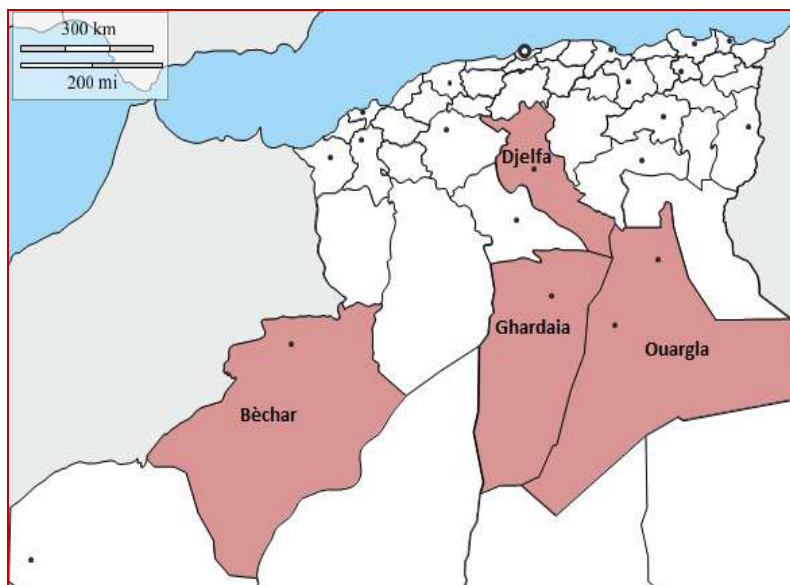


Figure 10: Distribution géographique d'*Anvillea radiata* en Algérie

II.1.4. Travaux antérieurs

A. radiata a fait l'objet de certaines d'études phytochimiques et pharmacologiques internationales (Djellouli, M. M, 2013 ; Mebarki L. H, 2013). Ces auteurs ont mis en évidence la richesse de cette plante en flavonoïdes, saponines, alcaloïdes, tannins, acides gras, terpènes et stéroïdes. (Dendougui H, 2006) a noté la présence de 13 flavonoïdes chez cette espèce botanique, quatre aglycones et neuf flavonols glycosidés. Les exemples sont regroupés dans le tableau (02)

Tableau 02 : différentes structure des flavonoïdes isolées de l'espèce *Anvillea radiata*

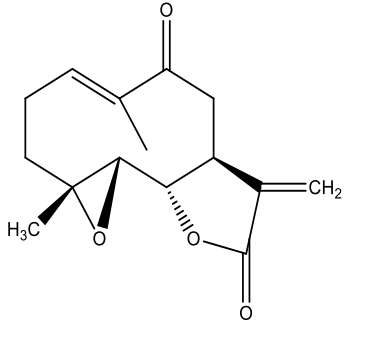
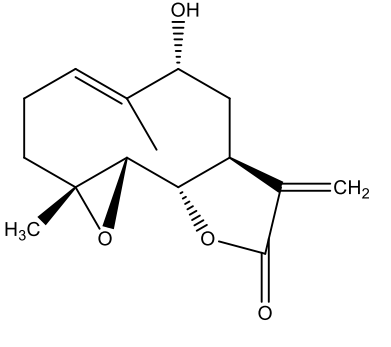
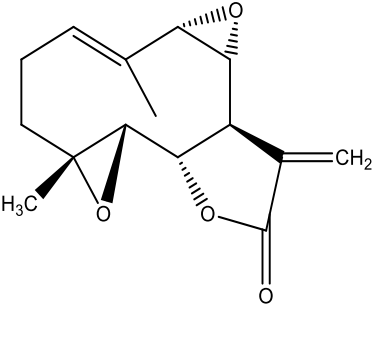
The diagram shows the general structure of a flavonoid. It consists of a central chromone ring system (a benzopyrone core). The A-ring (left) has a hydroxyl group (OH) at position 5, a methoxy group (R₄O) at position 7, and a substituent R₅ at position 8. The C-ring (right) has a carbonyl group (C=O) at position 4 and a substituent R₃ at position 3. The B-ring (bottom right) is attached at position 2 and has substituents R₁ at position 4 and R₂ at position 3.

Composé	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	réf
Nepetin	OH	H	H	H	OCH ₃	Dendougui H, et al 2006
Hispidulin	H	H	H	H	OCH ₃	
Juceosidin	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	
Spinacetin	OCH ₃	H	OH	H	OCH ₃	
Spinacetin-7-glucoside	OCH ₃	H	OH	Glu	OCH ₃	
Spinacetin-3-diglucoside	OCH ₃	H	Glu-Glu	H	OCH ₃	
patuletin 3-diglucoside	OH	H	Glu-Glu	H	OCH ₃	
patuletin 7-glucoside	OH	H	OH	Glu	OCH ₃	
Patuletin -3-Glu 7-diglucoside	OH	H	Glu	Glu-Glu	OCH ₃	
Quercetin -3- glucoside	OH	H	Glu	H	H	
Quercetin 3-Rhamnoglucoside	OH	H	Rha-Glu	H	H	
Isorhamnetin 3-diglucoside	OCH ₃	H	Glu-Glu	H	H	
Kaempferol-6-methoxy-3-glucoside	H	H	Glu	H	OCH ₃	

L'*A. radiata* est une source de sesquiterpène lactones car ont été isolés de celle-ci parthenolide-9-one, 8 α , 9 α -Epoxyparthenolide (El Hassani B, 2004), 9 β -hydroxyparthenolide (Moumou M, et al, 2014) sont regroupé dans le tableau (03)

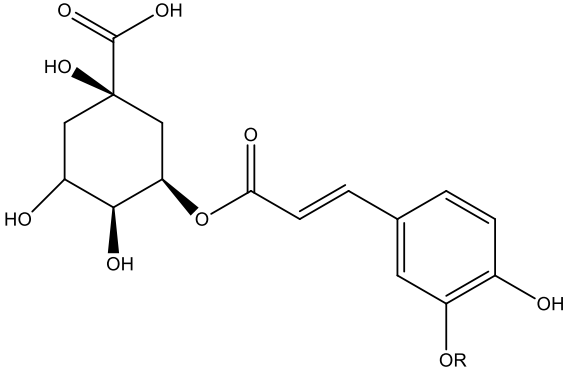
Tableau 03 : différentes structure de sesquiterpène lactones isolées de l'espèce

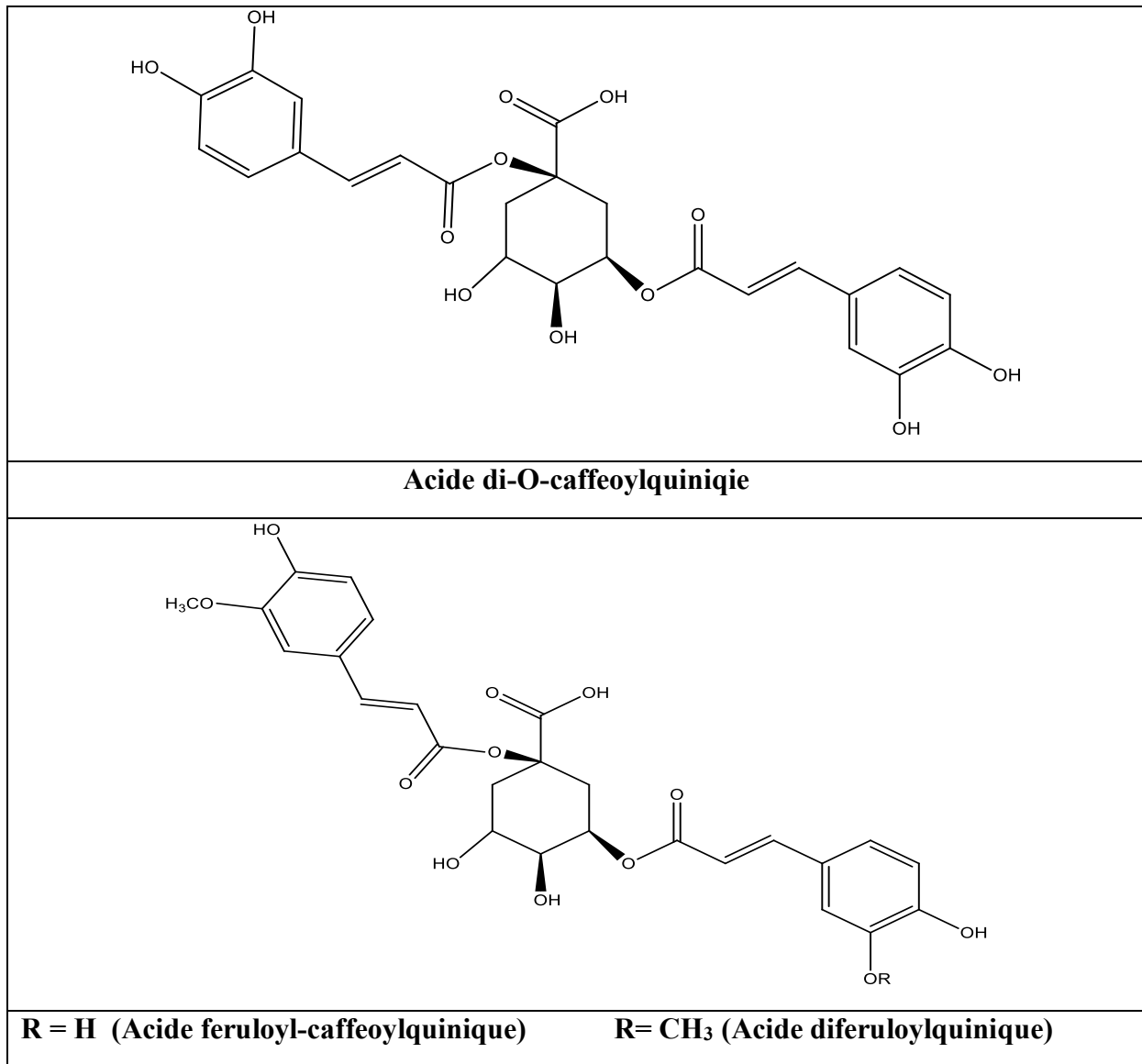
Anvillea radiata

		
parthenolid-9-one	9 α -hydroxyparthenolide	8 α ,9 α -Eoxyparthenolide

Une autre étude phytochimique d'*A. radiata* a permis la caractérisation de 25 composés phénoliques entre autres, sept composés correspondants à des dérivés de l'acide chlorogénique et de l'acide dicaffeoyl-quinique **tableau (04)**; dix-huit flavonoïdes, dont cinq aglycones et treize glycosides extraits de la partie aérienne par la méthode d'extraction accélérée par solvant (ASE) et aient été identifiés avec HPLC-DAD-ESI-MS/MS et analyses HPLC-HRMS (Bourkhis M, 2016).

Tableau 04 : différentes structure des acides phénoliques isolées de l'espèce *Anvillea radiata*

	
R= H (acide 5-O-Caffeoylquinique)	R= CH ₃ (Acide feruloylquinique)



La caractérisation des huiles essentielles de l'*A.radiata* a fait l'objet d'une seule étude (**El Hanbali F, 2007**). L'analyse chimique par GC/MS de ces huiles a révélé une prédominance du 6-oxocyclonérolidol (66.6%) et du 6-hydrocycloclonérolidol (11.4%). L'auteur rapporte également que ces composés possèdent une excellente activité antibactérienne vis-à-vis des microorganismes testés.

Cette plante est citée biologiquement très active, en fait, plusieurs activités sont attribuées à savoir antibactérienne, cytotoxique, anti tumoral, antifongique (**Mebarki, L., H 2013 ; Mohamed M, 2012**) et anticancéreuse (**Mohamed M, 2014**).

Chapitre II : Etude botanique

Les propriétés anti-oxydantes, anti-cholinestérases, anti-tyrosinases, anti- α -glucosidases, cytotoxiques, antifongiques et antibactériens des extraits d'acétate d'éthyle (AcOEt) et de n-butanol (n-BuOH) et de trois composés isolés d'*A.radiata*, deux germacranolides épimères 9 α -hydroxyparthénolide(1), 9 β -hydroxyparthénolide(2) et un acide phénolique ; l'acide 3,5-O-dicaffeoylquinique (3), ont été évaluées (**D.H. Saoud ; 2018**).

II.2. *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut :

II.2.1. Description botanique

Euphorbia guyoniana, connue par son nom vernaculaire lebbina (Chehema, A., 2005), est une plante puissante de 30cm à 1m de haut, d'un vert vif et à souches souterraines longuement traçantes. Les tiges sont dressées non charnues très ramifiées, les feuilles sont étroites, souvent absentes sur les rameaux fleuris. Les graines, noirâtres et munies de cotes longitudinales grises, sont sans caroncules alors que les glandes de la cyathe sont arrondies et sans pointe. Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance d'*E.guyoniana* se fait durant la saison suivante à partir des bourgeons enterrés dans le sol. Cette espèce s'adapte à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire. En effet, les feuilles très petites, parfois absentes, diminuent la quantité d'eau perdue par transpiration (Ozenda, 1991).

D'après les classifications botaniques classiques, *E.guyoniana* est classée comme suit:

Embranchement	Magnoliophyta
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida-dicotylidones
Sous classe	Rosidées
Ordre	Malpighiales
Famille	Euphorbiaceae
Genre	<i>Euphorbia</i>
Espèce	<i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut. 1852



Figure 11 : Photo original d'*Euphorbia guyoniana* (région Mesaad, 2017)

II.2.2. Utilisation d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Le latex est utilisé par les populations locales pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On l'applique localement sur les morsures et piqûres venimeuses. (Bellakhdar, J., 1997)

II.2.3. Répartition géographique

E.guyoniana est une espèce endémique qui se développe souvent dans les dunes ensablées de toute la région pré-désertique et le Sahara septentrional, du sud jusqu'à El Golea et Tadmait (Ozenda, 1958).

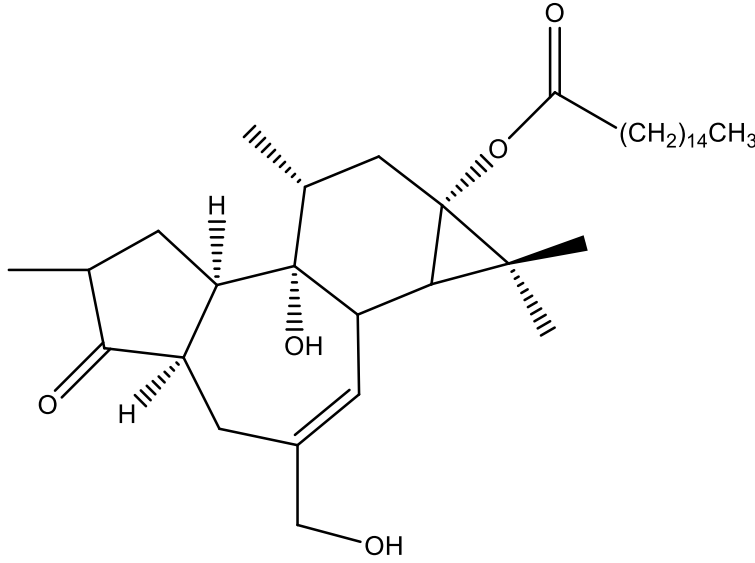
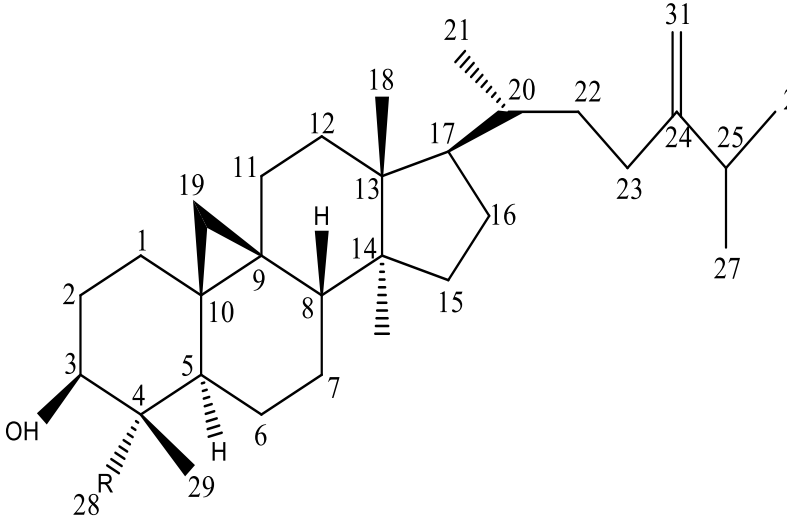
II.2.4. Travaux antérieurs

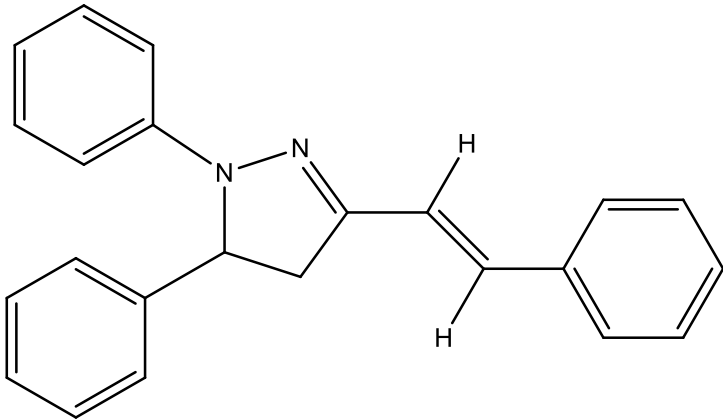
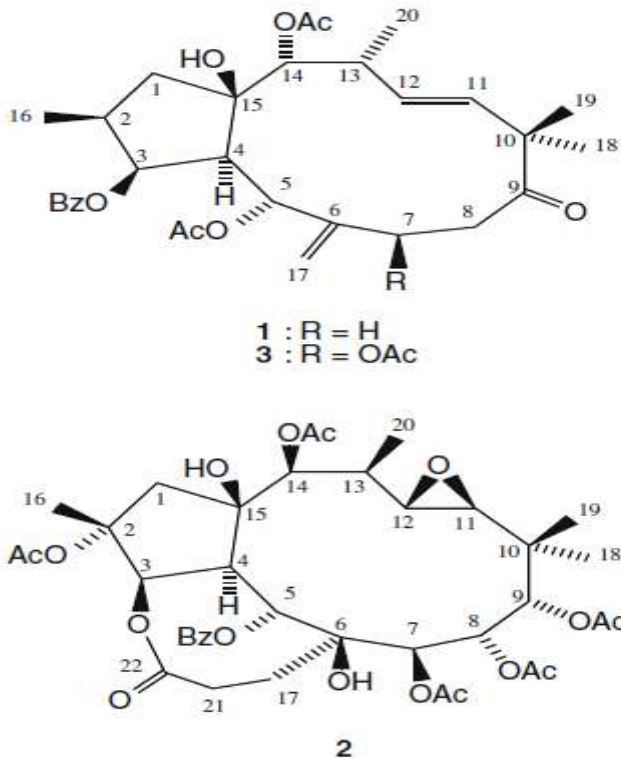
Plusieurs travaux ont été menés sur la partie aérienne d'*E.guyoniana*, ils ont permis l'identification d'un nombre important de composés tels que le 1,5-diphényl-3-styryl-2-pyrazoline 1, les flavonoïdes comme le kaempférol, le kaempférol 3-O-glucoside, le kaempférol 3-rutinoside, la quercétine, le 3-O-glucoside de quercétine, la rutine (Boudiar T ;2010) les diterpènes de polyester, nommés la guyonianine A, B (Ahmed A et al ; 2006), C et D (El-Bassuony, Ashraf A; 2007) qui constituent une classe rare de diterpènes bicycliques. Aussi, des diterpènes de jatrophone, désignés comme guyonianines E, F (I, II) (Hegazy, Mohamed-Elamir F et al; 2010), G (I) et H (II), (Kusz, Norbert ;2016). D'autres auteurs ont pu isoler des flavonoïdes : la quercétine-3-O- β -D-glucuronide, le kaempférol-3-O- β -D-glucuronide et des tannins galliques : 1, 2, 6 tri-O-galloyl- β -D-glucose (Smara, Ouanissa et al, 2014-A) et des coumarines (esculetine) de l'extrait d'acétate d'éthyle (Smara O. et al, 2014-B).

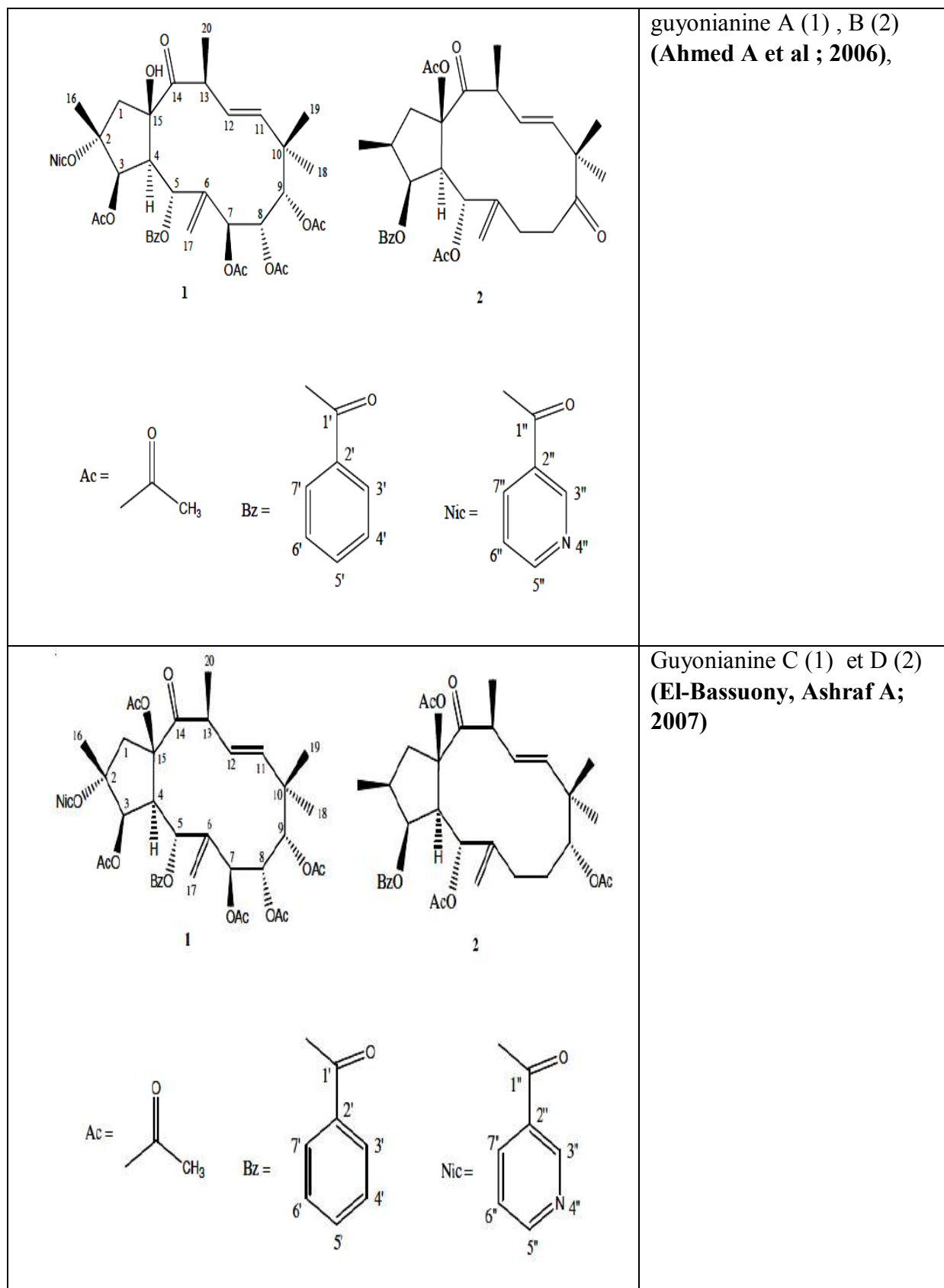
Chapitre II : Etude botanique

Des diterpènes de type abiétatriène 1 et 2, (11,16-époxy-ent-abieta-8,11,15-triene-13,14-dione (1) et 11-hydroxy-entabieta-8,11,13-triene-15-one (2)), untriterpène de type cycloartane, (3-hydroxycycloart-24-one (3)) (**Haba Hamada ;2009**), des di- terpénoïdes de type abiétane: ent-abieta-8,11,13-triène-16-ol (1), ent-abieta-8,11,13-triène-11,16-diol (2) et l'ester méthylique de l'acide 11,12-dihydroxy-7-oxo-ent-abieta-8,11,13-triène-16-oïque (3) en plus des trois tri- terpénoïdes connus: l'euphol (4), le 25-époxycycloartanol (5) et le bêta-sitostérol O-β-D-glucoside (6) (**Haba Hamada, 2013**) ont également été révélés. Les structures des composés identifiés pour *E.guyoniana* sont regroupées dans le **tableau(05)**

Tableau 05 : différentes structure isolées de l'espèce *Euphorbia guyoniana*

Structure	Composé et réf
	<p>4,12-dideoxy (4α) phorbol-13 hexadecanoate (haba,H et al, 2007)</p>
 <p>1: R= CH₂OH ; 2 : R= CH₃</p>	<p>1: 24-methylenecycloartane-3,28-diol 2 : 24-methylenecycloartane-3-ol (haba,H et al, 2007)</p>

	<p>1,5-diphenyl-3-styryl-2-pyrazoline (Boudiar, T., 2010)</p>
 <p>1 : R = H 3 : R = OAc</p>	<p>guyonianins E (1) and F (2) (Hegazy Mohamed-Elamir F, 2010).</p> <p>(3) guyonianine A (Ahmed A et al ; 2006)</p>



II.3. Les Insectes

Nos essais biologiques ont été menés sur les pucerons des céréales. Cependant, le blé est susceptible d'être attaqué par un nombre important de ravageurs dont les plus dangereux sont présentés dans le **tableau06**.

Tableau 06 : Les insectes ravageurs de blé dur. (**Balachowsky et Mesnil, 1936**)
(**Doumandji B. et Doumandji S., 1994**)

Ordre	Nom commun	Nom scientifique	Partie attaqué
Orthoptères	Criquet pèlerin	<i>Schistocereagregaria</i>	Toute la plante
	Criquet migrateur	<i>Locustamigratoria</i>	Feuilles et tiges
Coléoptères	Ver blanc	<i>Zabrustenebrio</i>	Feuilles et tiges
Hémiptères	Punaise	<i>Eurygaster</i> sp.	Epis
Lépidoptères	Noctuelle des céréales	<i>Spodoptera</i> sp.	Epis
	Noctuelle terricole	<i>Agrotis segetum</i>	Tige et feuilles
	Noctuelle	<i>Sesamiananagroides</i>	Epis
Thysanoptères	Thrips	<i>Angullulinatritici</i>	Epis

II.3.1. Les pucerons

Deux Aphididae sont importants pour la culture de blé, il s'agit de *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775) et *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus 1758). La première espèce semble la plus dangereuse à l'épiaison (**Capisano, 1997**). Elle est de forme allongée atteignant 2,5 mm de long pour l'adulte et elle a une couleur variable: jaune, vert, rouge ou noir (**Anonyme, 2004**). Quant au *R.padi*, qui peut pulluler également à la montaison, il est surtout à craindre en automne car

il peut transmettre le virus de la jaunisse nanisant de l'orge (J N.O.). (Capisano, 1997). L'adulte est globuleux avec une couleur vert - sombre et possède le plus souvent une tache rouge à l'arrière du corps (Anonyme, 2004).

II.3.1.1. Cycle biologique des pucerons des céréales

Le cycle évolutif (Figure 12) de la plupart des espèces aphidiennes est hétéroecique qui est caractérisé par l'alternance entre une génération amphi-sexuelle comportant des mâles et des femelles fécondables et une ou plusieurs générations ne comportant que des femelles parthénogénétiques (Remaudilre, 1953). Les sujets fécondés sont toujours ovipares alors que ceux de formes parthénogénétiques sont le plus souvent vivipares (Dedryver, 1982).

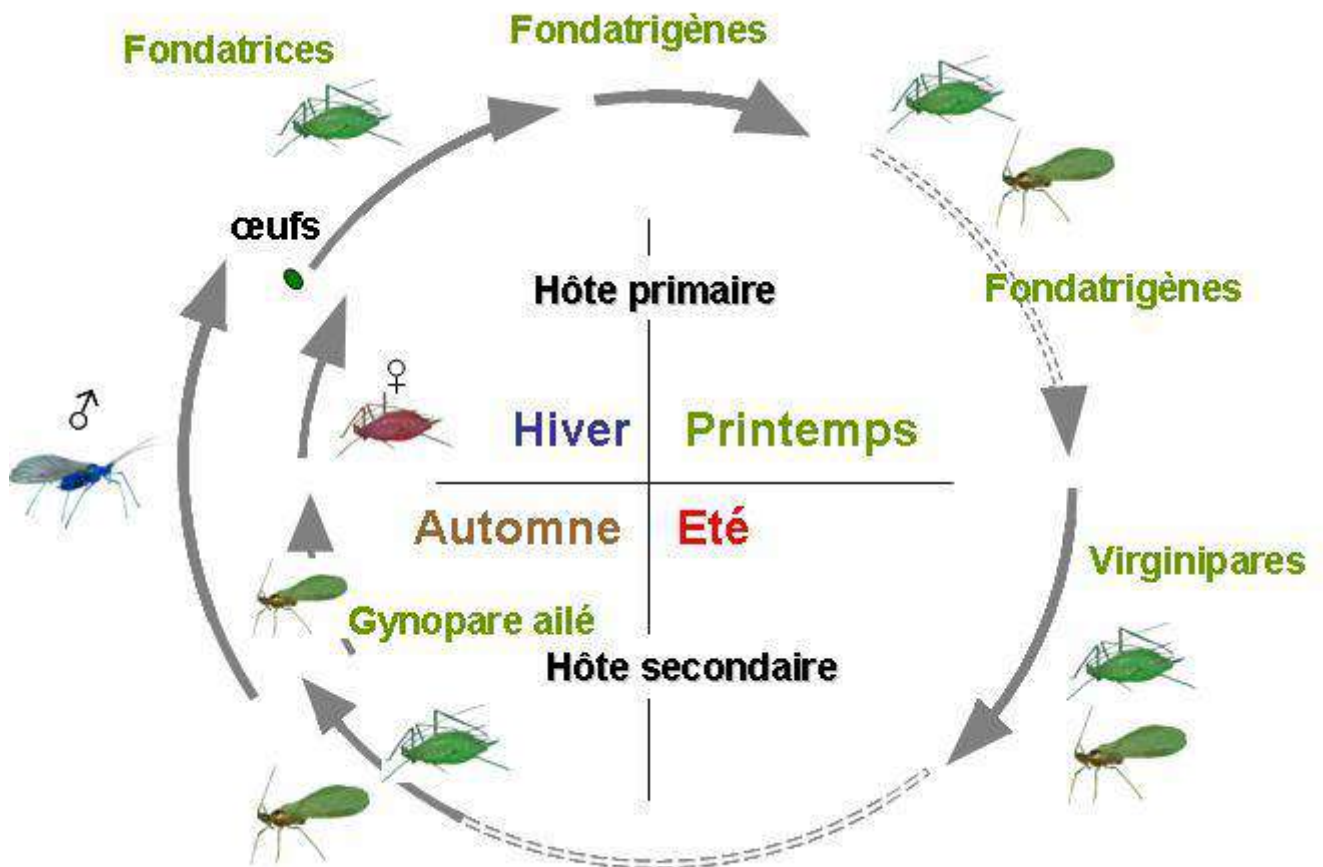


Figure 12: Cycle de développement des pucerons

Dans le cas du cycle de développement complet, il y a apparition d'une génération d'individus sexués et après accouplement, la femelle pond des œufs en automne. Ceux-ci hivernent et éclosent à la fin de l'hiver donnant naissance à des femelles parthénogénétiques appelées fondatrices qui se reproduisent sans l'intervention de mâles. Ces dernières, qui sont

généralement aptères, donnent une ou plusieurs générations de femelles parthénogénétiques appelées fondatrigenes, d'abord aptères mais la portion des ailés croit au fil des générations. Ces fondatrigenes ailées quittent l'hôte initial et colonisent, au cours du printemps, les graminées et en particulier les céréales, sur lesquelles se développent de nombreuses générations parthénogénétiques et vivipares appelées virginogènes. Lorsque la céréale atteint un stade défavorable aux pucerons (stade laiteux-pâteux pour *Setobionavenae*), ceux-ci quittent la culture pour estiver sur le maïs (**Dedryver, 1982**). En automne des femelles parthénogénétiques apparaissent et sont appelées sexupares. Ces dernières engendrent des mâles sexupares et des femelles ovipares. Celles-ci, une fois fécondées, pondent des œufs sur la partie lignifiée de la plante-hôte (**Anonyme, 2004**) (**Figure 12**).

Les pucerons peuvent occasionner jusqu'à 15 Q / ha de pertes de céréales en cas d'attaque importante (**Capisano, 1997**). Pour la lutte contre ces ravageurs, une pyrethrine seule ou associée à un produit ayant une action systémique suffit pour traiter. Parmi les insecticides homologués en Algérie contre ces organismes, il y a le Formothion, la Cyperméthrine et le ténvalérate (**Anonyme, 2002**). Concernant les ennemis naturels des pucerons, il existe de nombreux prédateurs (Coccinelles et les Syrphes...), des parasitoïdes tels que les Aphidiidae et des agents pathogènes tels que les entomophthorales (**Anonyme, 2004**). Dans le groupe des Coccinellidae, *Harmoniaaxyridis* (**Piotte, 1999**) et *Coccinella algerica* semblent les plus efficaces (**Saharaoui, 1998**).

II.3.1.2. Dégât des pucerons :

Les pucerons provoquent à la fois des effets directs et indirects sur la santé des plantes. Les premiers sont notamment causés par le fait que les pucerons se nourrissent exclusivement de la sève des plantes. Ils utilisent leurs pièces buccales appelées stylets afin de percer les tissus des végétaux jusqu'aux vaisseaux phloémiens et en aspirent ainsi la sève élaborée. Ce détournement de nutriments a pour effet d'affaiblir la croissance et la reproduction de la plante. De plus, la salive des pucerons contient des composés pouvant être phytotoxiques et responsables de décoloration, de déformation des feuilles ou encore de nécroses. (**Giordanengo et al., 2007 ; Dedryver et al., 2010 ; Calatayud & Le Ru, 2013**).

II.4. Les bio-pesticides

Ces dernières années, les bio-pesticides remplacent progressivement les pesticides chimiques. Ces derniers sont considérés comme produits hautement toxiques. En 2000, le marché global des bio-pesticides ne représentait que 1,5 % du total des pesticides. Actuellement, ce marché a atteint 3,46 %. La popularité croissante de ces préparations réside dans leur effet létal beaucoup plus sélectif comparé aux composés chimiques synthétiques (**Moser et Obrycki, 2009; Kristoff et al., 2010; Shah et Iqbal 2010; Eriksson et Wiktelius, 2011; Stevens et al., 2011**)

Une problématique de pollution potentielle a été, alors, soulevée et prend de plus en plus d'ampleur particulièrement concernant la santé humaine. Pour cela, des recherches consistent à développer des méthodes alternatives à l'utilisation de ces pesticides. Ces méthodes qui ont trait à l'emploi de ce que l'on appelle communément les bio-pesticides. Ce sont des préparations à base de bactéries, de virus, de protozoaires, de champignons ou de végétaux, qui sont biodégradables, à activité contre des ravageurs spécifiques, et sans effets secondaires sur l'environnement (**Rahbani, 2015**). Ces derniers, pourraient prendre la relève du «tout chimique», afin de promouvoir la lutte biologique alternative en vue d'une agriculture durable.

Les produits considérés comme des bio-pesticides par les agences de réglementation européennes et mondiales sont d'origines diverses. Ils peuvent être classés en trois grandes catégories, selon leur nature : les bio-pesticides microbiens, les bio-pesticides végétales et les bio-pesticides animales (**Chandler et al., 2011 ; Leng et al., 2011**).

Les bio-pesticides végétales, Spécifiquement, les bio-insecticides) constituent l'objectif de recherche principal de cette thèse.

II.4.1. Bio-pesticides végétales

Les plantes produisent des substances actives ayant des propriétés insecticides, aseptiques ou encore régulatrices de la croissance des plantes et des insectes. Le plus souvent, ces substances actives sont des métabolites secondaires qui, à l'origine, protègent les végétaux contre les ravageurs. Plusieurs sont connus pour contrôler ou limiter les attaques d'insectes en agissant sur leur physiologie. Certains sont des molécules ayant une action sur les hormones juvéniles ou de mues des insectes perturbant ainsi leur développement. Les toxines végétales ont également un effet nocif. Plusieurs familles appartiennent à cette catégorie : les

Chapitre II : Etude botanique

terpénoïdes (limonoïdes, cardénolides et pyrèthrine), les alcaloïdes à l'action neurotoxique mais également les composés phénoliques caractérisés par une action anti-appétant et un effet sur la croissance.

II.5. Site d'action des insecticides

Les bio-insecticides régulent les populations des insectes en agissent sur les muscles, sur la respiration, sur le système nerveux, sur la croissance de l'insecte, sur la biosynthèse des lipides, ...

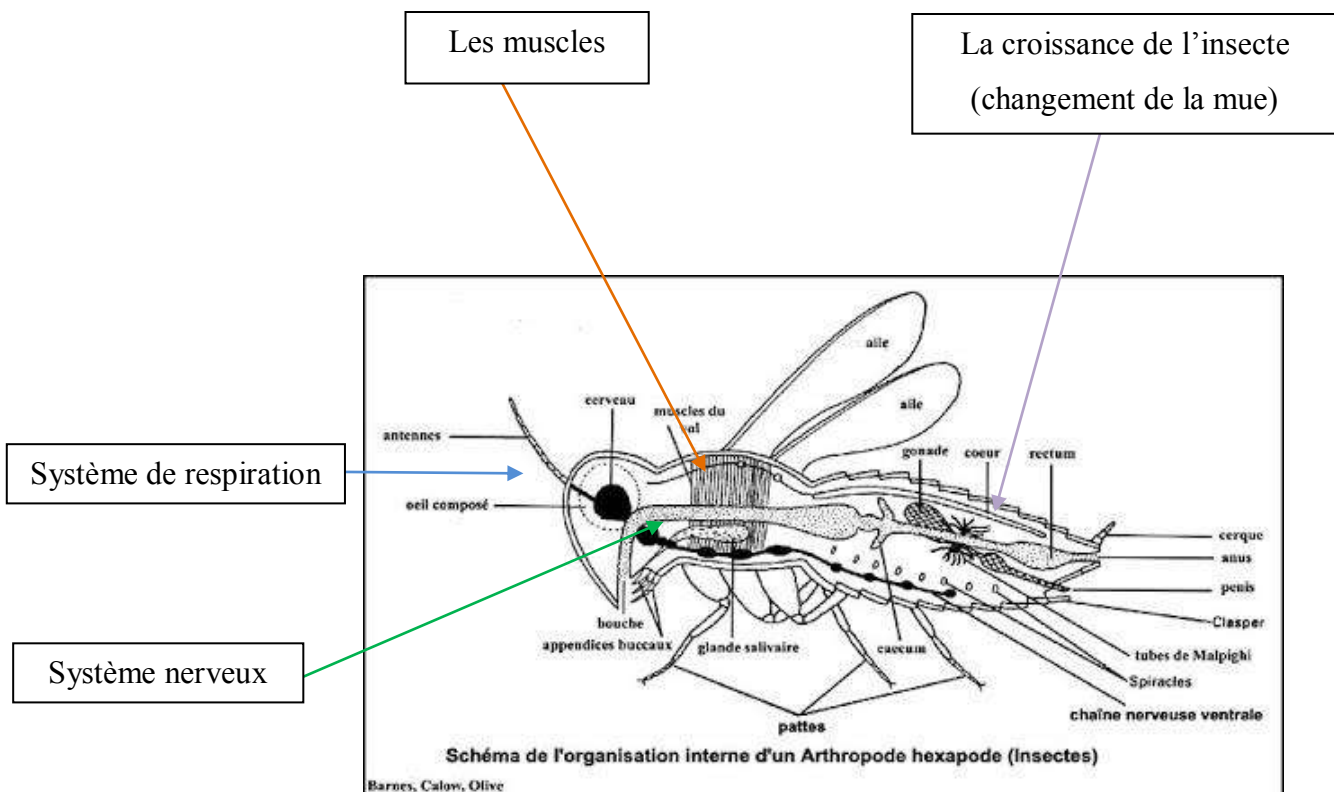


Figure 13 : présentation des sites d'attaque des insecticides sur l'insecte

INRA France; 2017)

CHAPITRE III :
CARACTERISATION
DES HUILES ESSENTIELLES

III.1. Préparation du matériel végétal :

Après avoir été collectées sur terrain, les parties aériennes des deux plantes (*A.radiata* et *E.guyoniana*) ont été ramenées au niveau du laboratoire « Biogéochimie des milieux désertiques » dans la faculté de Mathématique et des sciences de matière, à l'université Kasdi Merbah-Ouargla, où l'étude expérimentale a été faite, les deux plantes ont été séchées à l'ombre. Ensuite ont été concassées manuellement sous forme de petites parties qui ont servi ultérieurement, pour l'extraction des huiles essentielles (HE).

III.2. Procédé d'extraction :

L'extraction a été réalisée par la technique d'hydro-distillation à l'aide d'un appareil de type de Clevenger

Le principe de cette technique consiste à faire bouillir un mélange d'eau distillée et un matériel végétal (dans notre cas les parties aériennes des plantes (300g), la vapeur d'eau produite provoque l'éclatement des cellules végétales ainsi la libération de leur contenu en huiles essentielles, cette vapeur traverse un réfrigérant ou elle se condense puis le distillat (eau+ huiles essentielles) est récupéré. Après le rassemblement de plusieurs extractions, le mélange a été mené à une extraction liquide-liquide au moyen du n-hexane, les extraits hexanoïques réunis ont été par la suite évaporés à l'évaporateur rotatif, sous pression réduite à la température ambiante, les huiles essentielles (HE_{AR} et HE_{EG}) ont été séchées sur $MgSO_4$. Ensuite conservées dans des piluliers bruns hermétiquement fermés à 4°C jusqu'à leur analyse.

III.3. Rendement en huiles essentielles :

On définit le rendement en huile essentielles R_{HE} comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle en gramme (M_{HE}) obtenue après distillation et la masse de matériel végétal en gramme (M_{MV}). Il est exprimé en pourcentage (%) et donné par la formule suivante :

$$R_{HE} (\%) = M_{HE} / M_{MV} \times 100$$

III.4. Analyses chromatographiques des huiles essentielles :

III.4.1. Analyses GC/FID :

Les compositions chimiques des huiles essentielles ont été analysées à l'aide d'un Gaz Chromatographe type Bruker GC-17A équipé d'une colonne capillaire HP-1 (30 m * 0,25 mm, épaisseur du film de 0,33 μm). L'hélium était le gaz vecteur, à un débit de 1,3 ml / min. La température du four a été maintenue à 45 ° C pendant 10 minutes, puis augmentée à 180 ° C à une vitesse de 3 ° C / min et maintenue à 180 ° C pendant 5 minutes, puis à 280 ° C à une vitesse de 5 ° C. / min et maintenue à 280 ° C pendant 5 min. La température de l'injecteur et du détecteur (FID) a été fixée à 280 ° C. Des échantillons dilués (dans du dichlorométhane) de 1 μl ont été injectés en mode split / splitless (100: 1).

III.4.2. Analyses GC/MS :

L'analyse a été réalisée à l'aide d'un GC-MS Bruker. Le détecteur sélectif de masse était équipé d'une colonne capillaire non polaire HP-1 (30 m * 0,25 mm, épaisseur du film 0,33 μm). L'hélium était le gaz vecteur, à un débit de 1,3 ml / min. La température du four a été maintenue à 45 ° C pendant 10 minutes, puis augmentée à 180 ° C à une vitesse de 3 ° C / min et maintenue à 180 ° C pendant 5 minutes, puis à 280 ° C à une vitesse de 5 ° C. / min et maintenue à 280 ° C pendant 5 min. Pour la détection GC-MS, un système d'ionisation électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV a été utilisé. La température de l'injecteur était de 280 ° C. Des échantillons dilués (dans du dichlorométhane) de 1 μl ont été injectés en mode split / splitless (100: 1). L'identification des composants d'huile issus de la colonne capillaire a été réalisée sur la base d'une comparaison de leur indice de rétention (I_r , calculé à partir d'une analyse GC-FID) avec ceux de la littérature et d'une comparaison de leurs modèles de fragmentation en masse avec ceux des bases de données NIST 11, Adams et WILEY8.

III.5. Résultats et discussion :

Tableau 07 : Propriétés organoleptiques des huiles essentielles préparées.

	<i>A.radiata</i>	<i>E.guyoniana</i>
Aspect	Liquide	Liquide
Couleur	Jaune claire	Vert-olive claire
Odeur	Intense, piquante	Agréable

III.5.1. Détermination de rendements des HE_{AR} et HE_{EG}

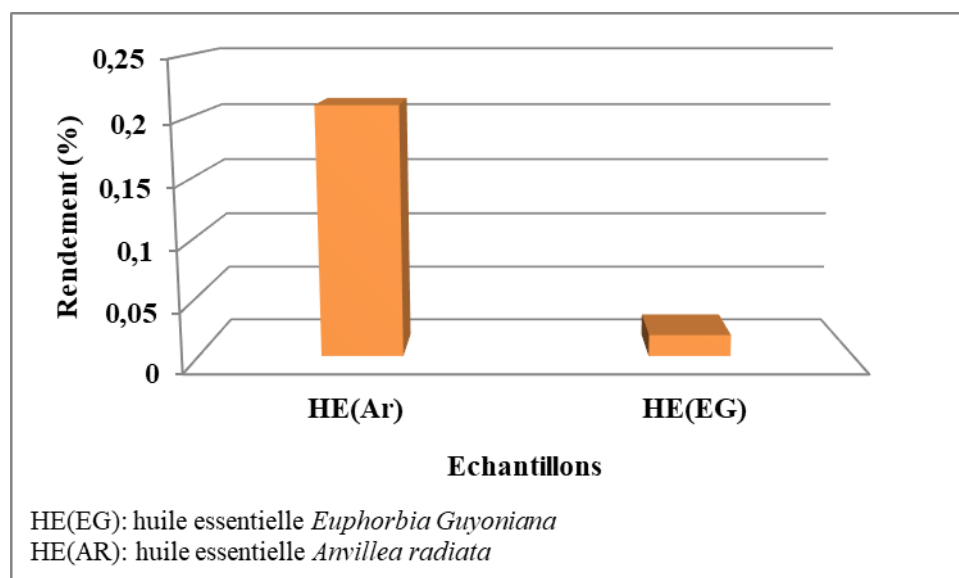


Figure 14 : représentation graphique des rendements en huiles essentielles

Généralement, les *Euphorbiacées* sont connues pour leur richesse en huiles essentielles (**Kouamé, 2012**). D'après notre recherche bibliographique, la seule étude qui a été faite pour l'huile essentielle d'*E. guyoniana* a été réalisée par **Benmeddour en 2016**, sur un matériel de la région de Biskra. L'équipe du travail a noté une faible teneur en huiles essentielles obtenues par hydrodistillation, estimée à 0.007%. A titre comparative, on a enregistré un rendement plus élevé égal à 0.018%. Plusieurs hydrodistillations ont été effectuées, afin d'obtenir une quantité suffisante pour achever notre recherche.

Similairement, nous n'avons trouvé qu'un seul travail réalisée au Maroc sur les huiles essentielles d'*A. radiata*. Le rendement a été signalé égal à 0.5% à partir de la plante fraîche.

En comparaison avec d'autres Asteraceae, le R% des HE d'*A. radiata* obtenu dans notre travail (0.21%) est compris dans l'intervalle (de traces jusqu'à 0.2%) déclaré par **(Raala et al, 2011)**, mais plus faible par rapport à celui du Maroc.

En fait, il est démontré que l'insuffisance ou l'excès d'eau a un effet négatif sur le rendement en huiles essentielles. En outre, il a été noté que les pourcentages de l'huile volatile est passée de 1.4% (pendant la période des jours longs) à 0.7% (pendant la période des jours courts). Ces différences sont probablement, dues à plusieurs facteurs citons entre autres, l'origine géographique, les facteurs écologiques notamment ceux dues au climat tels que la température et l'humidité. L'espèce elle-même, l'organe, le stade de la croissance. La période de cueillette, la conservation du matériel végétal et la méthode d'extraction **(Granger et al., 1973; Rosua et Granados, 1987; Sefidkon et al., 2007)**.

III.5.2. Caractérisation des huiles essentielles par GC/MS :

L'analyse d'échantillons inconnus est rendue encore plus complexe par la présence de nombreux isomères du fait du déficit d'information sur leurs caractéristiques chromatographiques. La tentation d'exploiter la masse importante de données disponibles dans la littérature chromatographique et les laboratoires spécialisés ne serait pas sans risque.

En effet, dans les conditions de programmation de température constantes au CPG, le temps de rétention d'un composé reste également constant. Mais, en pratique, les conditions d'analyse varient beaucoup et, pour cette raison, le temps de rétention seul ne serait fiable. Avec l'introduction du système des indices de Kovats, l'identification des différents composés des huiles essentielles est devenue plus pratique. Le calcul des indices de Kovats se fait en utilisant les temps de rétention corrigés des deux alcanes qui encadrent le composé inconnu **(Maarse et al., 1982)**. Ces indices expriment la rétention d'un produit comparé à son homologue hydrocarbure linéaire, examiné dans les mêmes conditions de température.

Chapitre III: Caractérisations des huiles essentielles

L'expression mathématique générale qui donne une meilleure approximation des indices de Kovats, recommandée par la firme "Chromatographic Society" est la suivante (**Evans et al, 1989**)

$$I_{R_x} = [(T_{R_x} - T_{R_n}) / (T_{R_{(n+1)}} - T_{R_n})] 100 + 100n$$

- I_{R_x} : Indice de rétention du composé inconnue x.
- n : nombre d'atomes de l'alcane dont le temps de rétention R_n est inférieur à x.
- T_{R_x} : Temps de rétention du compose inconnue x.
- T_{R_n} : Temps de rétention de l'alcane inférieur à x.
- $T_{R_{(n+1)}}$: Temps de rétention de l'alcane supérieur à x.

La fiabilité dans la détermination des indices de Kovats est rendue efficace grâce à la performance des colonnes et de l'évolution électronique dans la chromatographie. Néanmoins, leur précision dépend directement de la nature des substances analysées, de la nature de la phase stationnaire et de la température de la colonne (**Tarjan et al., 1989**).

Le développement important de la spectrométrie de masse (SM) dans l'identification des constituants des huiles essentielles est rendu possible grâce au couplage du CPG directement à la spectrométrie de masse. Lors du couplage, la chromatographie (CPG) permet dans un premier niveau de séparer et d'isoler chacun des constituants du mélange qui est injecté séparément dans la chambre d'ionisation de la spectrométrie de masse (deuxième niveau).

L'identification des constituants a été réalisée par la comparaison des indices de rétention (IR) expérimentaux avec ceux de la littérature, sur colonne apolaire, et par l'analyse des spectres de masse des composés constitutifs et leur comparaison avec ceux dans les bases de données électroniques, WILEY et NIST, des bases bibliographiques (**Adams, 2007**).

Chapitre III: Caractérisations des huiles essentielles

Tableau 08 : Composition chimique d'huile essentielle d'*E. guyoniana* par GC/MS

Pic	Composés	IR _{exp}	IR _{Théo}	%
1	Heptane	702	700	1,12
2	2, 3, 4-Trimethylpentane	743	739	1,07
3	trans-1,4-Dimethylcyclohexane	796	780	0,92
4	2-heptanol	852	887	1,46
5	α -tolualdehyde	992	1042	3,07
6	β -myrcene	1058	985	0,40
7	p-Cymenene	1090	1025	0,58
8	n-Decanal	1217	1185	0,17
9	Undec-10-en-1-al	1299	1277	2,73
10	2-Pinen-10-ol, acetate	1316	-	1,01
11	cis-Geranylacetate	1343	1359	0,96
12	α -Terpineolacetate	1346	1334	2,04
13	Damascenone	1348	1469	1,83
14	Citronellol acetate	1358	1354	3,85
15	α -Longicyclene	1374	1371	1,93
16	Gurjunene	1411	1430	1,20
17	cis- β -Copaene	1446	1427	1,15
18	Pentadecane	1460	1491	5,63
19	α -Curcumene	1480	1472	1,53
20	β -Selinene	1485	1480	2,25
21	δ -cadinene	1521	1513	0,27
22	γ-Bisabolene	1531	1525	29,82
23	Nerolidol, (E)	1553	1550	3,19
24	Humulene epoxide II	1592	1597	0,03
25	α -hexadecene	1596	1598	1,81
26	n-hexadecane	1601	1600	9,71
27	Geranyl isovalerate	1604	1587	3,67

Chapitre III: Caractérisations des huiles essentielles

28	β-Eudesmol	1623	1633	11,13
29	cis-Cadin-4-en-7-ol	1635	1626	0,97
30	(Z)-Lanceolacetate	1854	1818	1,30
total identifié		96,80%		

IR_{exp} : indice de rétention (expérimentale) ; **IR_{Théo}** : indice de rétention (Théorique)

L'huile essentielle endémique, possèdent des compositions chimiques originales, caractérisées par d'importantes teneurs en sesquiterpènes, la composition majoritaire est représentée par le γ -Bisabolene (29.82%), β -Eudesmol (11,13%), n-hexadecane (9,71%), pentadecane (5,63%), citronellool acetate (3.85%) et Nerolidol, (E) (3.19%).

La **figure 16** informe sur les familles chimiques présentes dans l'huile essentielle d'E. *Guyoniana*. En effet, plus de 96.80% de cette huile est constitué de 45% des composés divers, 41% sesquiterpènes oxygénés des, 9 % sesquiterpènes et 4% monoterpènes oxygénés, 1% monoterpènes.

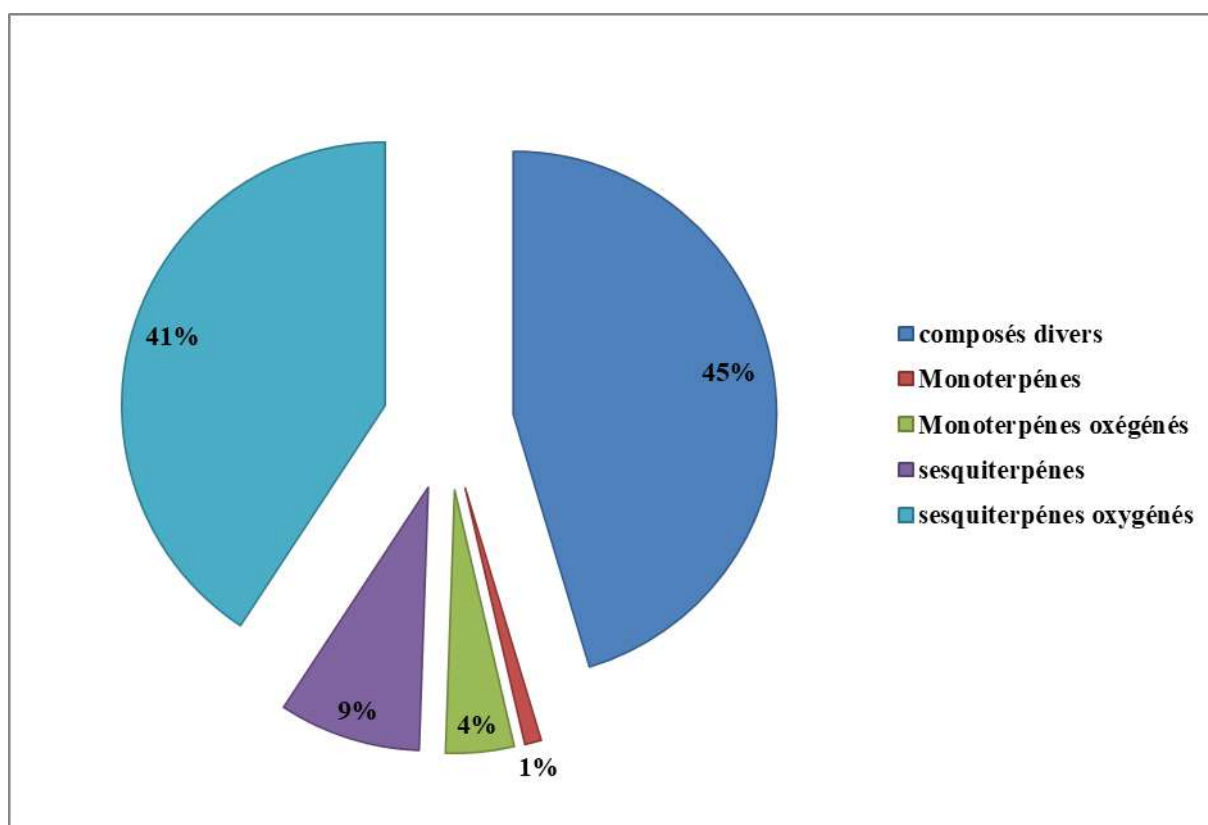


Figure 16 : représentation graphique de la présence des familles chimiques dans l'huile essentielle d' *Euphorbia Guyoniana*.

La comparaison de nos résultats avec ceux rapporté sur l'huile d'*E.guyoniana* originaire de la région de sud d'Algérie (**benmeddour et al., 2016**) révèle qu'il y a des différences qualitative et quantitatives importantes. En fait, **benmeddour et al.** ont analysé l'huile par GC/MS et ils ont identifiés 19 composés, représentant 92.3% de la composition totale. Il a noté que la plante est riche en apocaroténoïdes (15.2%), en monoterpènes (10%), les alcanes de n-pentadécane (35.5%), le heptadécane (11.3%) et le n-tétradécane avec (11.1%). Cependant, dans notre étude 30 composés ont été identifiés par GC/MS représentant 96.30% de la totalité de l'huile, dont les produits majeurs sont cités ci-dessus.

III.5.1.b. Composition chimique de l'huile essentielle d'*A. radiata*

Les résultats de la caractérisation des huiles essentielles de la plante *A. radiata* coss. et Dur. par GC-MS sont représentés par le chromatogramme sur la **figure 17**:

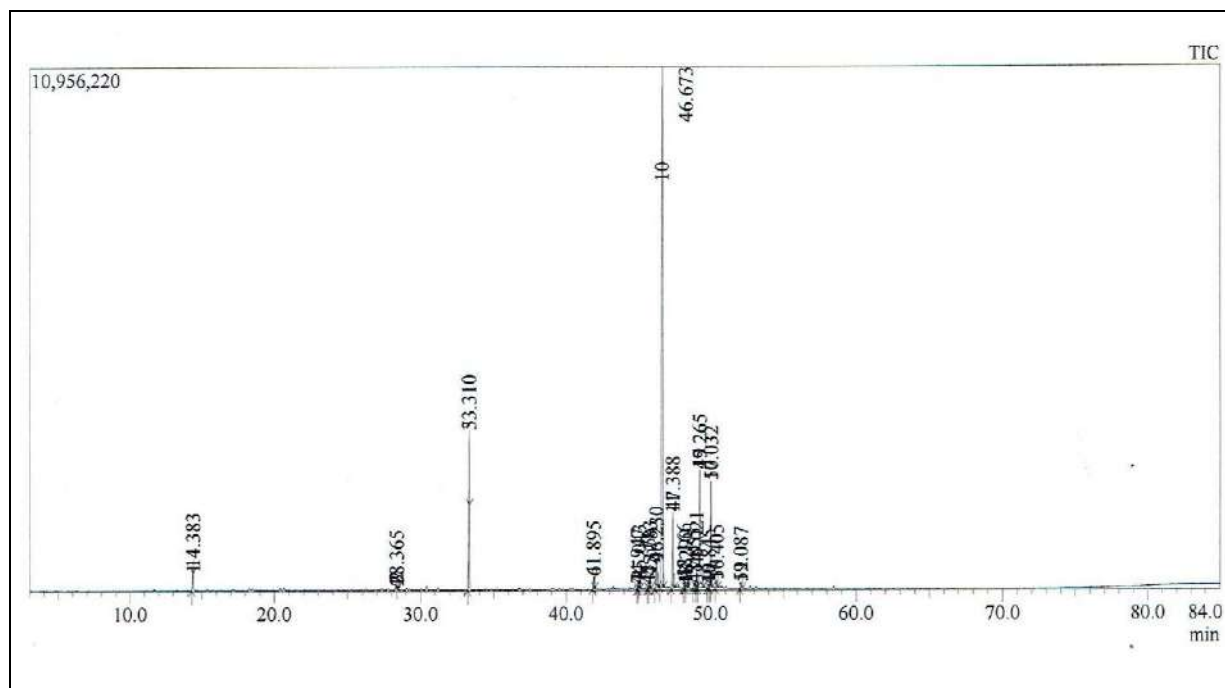


Figure 17: Chromatogramme obtenu pour HE_{Ar} par GC-MS.

Seize composés ont été identifiés dans l'huile essentielle d'*A. radiata*, ce qui représente 98.32% du total d'huile les résultats sont présentés dans le **Tableau 09**.

L'huile essentielle endémique, possède des compositions chimiques originales, caractérisées par d'importantes teneurs en sesquiterpènes oxygénés, les majeurs des composants étant le Nerolidol (*Z*) (62,49%), Humulene-1,2-époxyde (10,28%), Juniper camphor (8,21%), α -Santalol (5,24%) et Chrysanthényle acétate (4,02%).

Tableau 09 : Composition chimique d'huile essentielle d'*A. radiata* par GC/MS

Pic	Composé	IR _{exp}	IR _{Théo}	%
1	α -Pinene	862	976	0,34
2	δ -Verbenol	1114	1125	0,07
3	Chrysanthenylacetate	1217	1248	4,02
4	α -Humulene	1408	1449	0,81
5	α -Selinene	1473	1489	0,33
6	Isobornyl n-butanoate	1489	-	0,64
7	Dehydro-sesquicineole	1523	1460	2,14
8	Nerolidol, (Z)-	1533	1535	62,49
9	α-Santalol	1554	1648	5,24
10	Eucalyptol	1574	1036	0,94
11	Caryophyllene oxide	1597	1570	1,48
12	Humulene-1,2-epoxide	1603	1597	10,28
13	Levomenol	1619	1668	0,34
14	Juniper camphor	1624	1130	8,21
15	trans-Cubebol	1635	1540	0,55
16	α -Bisabolol	1681		0,44
total identifié				98.32%

L'analyse des huiles essentielles de la plante *A. radiata* par la méthode de chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC/FID et GC-MS) a permis l'identification de 88.8% de composés volatiles (El Hanbali, 2007). Cette analyse a montré que Vingt-neuf composants ont été identifiés dans l'huile essentielle est principalement constituée de sesquiterpènes oxygénés, les composants majeure étant le 6-oxocyclonerolidol (66,6%), 6-hydroxycyclonerolidol (11,4%) et acétate de trans chrysanthényle (3,9%).

Chapitre III: Caractérisations des huiles essentielles

La **figure 18** informe sur les familles chimiques présentes dans l'huile essentielle d'*A. radiata*. En effet, plus de 98% de cette huile est constitué de 92% des sesquiterpènes oxygénés, 4.7% des monoterpènes oxygénés, 1.14% sesquiterpènes et 0.34% monoterpènes.

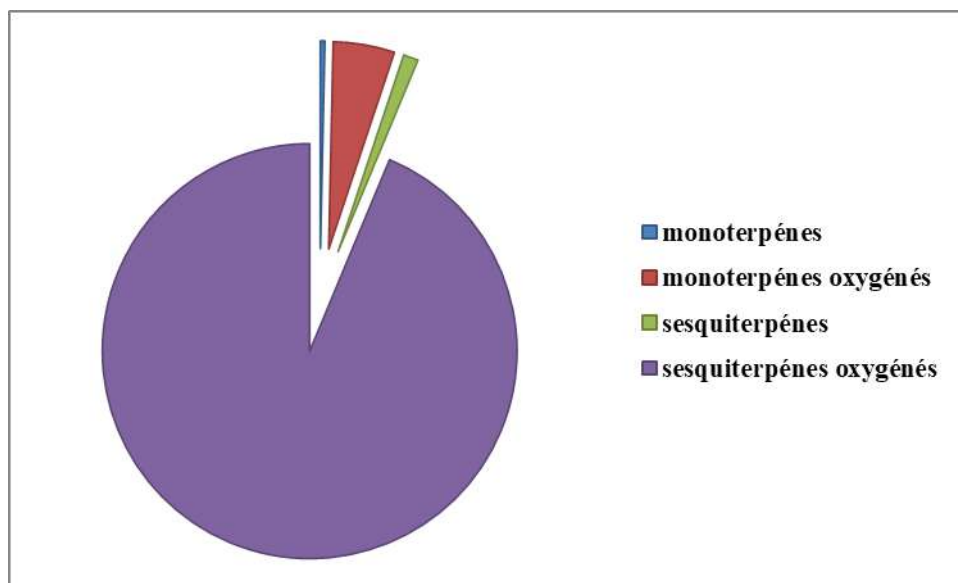


Figure 18 : représentation graphique de la présence des familles chimiques dans l'huile essentielle d'*Anvillea radiata*.

Bachrouch et al (2015) ont enregistré une activité insecticide de l'huile sur plusieurs insectes de conservations de grains. Dans une autre étude menée par **Delimi et al, (2017)** l'huile a affecté la reproduction des insectes et montré une activité répulsive sur les adultes d'*Ephestia kuehniella*. L'huile essentielle d'*Artemisia herba-alba* avait même la capacité de restaurer l'activité des antibiotiques sur certaines bactéries résistantes par blocage du système d'efflux membranaire (**Fadli et al., 2016**)

Les terpénoïdes peuvent agir dans la défense directe envers les bactéries, les champignons, les insectes ou les herbivores comme des toxines, des antibiotiques ou des répulsifs (**Bohlmann & Keeling, 2008**). Ils peuvent également constituer, des obstacles chimiques et physiques à l'alimentation ou à l'oviposition d'insectes (**Keeling & Bohlmann, 2006 ; Heiling et al., 2010**), ou agir comme des analogues des hormones d'insectes.

CHAPITRE IV:
ETUDE DE METABOLITES PHENOLIQUE
DE LA PHASE BUTANOLIQUE
D'ANVILLEA RADIATA

IV.1. Matériel végétal:

A. radiata a été récoltée du sud algérien (34° 10'00'' nord et 3° 30'00''est) de la région de Mesaad située dans la Wilaya de Djelfa en Avril 2016. *E.guyoniana* a été récoltée du Sud-Est Algérien de la région de Hadjira située à 80 Km de la ville de Ouargla au mois de février 2017 et ai identifiée par le Mr EDDOUD Amar. La partie aérienne des deux plantes ont été séchées à l'ombre dans un endroit sec et aéré dans une température ambiante. A l'aide d'un broyeur, ces plantes séchées ont été réduite en poudre de granulométrie homogène, (0,5 mm de diamètre). La poudre a été conservée dans des flacons en verre hermétiquement fermés à l'abri de la lumière et de l'humidité.

IV.2. Tests phytochimiques préliminaires

Une masse de 3g des échantillons ont été mis dans une fiole conique de 100 ml pour chaque solvant : Méthanol, eau, chloroforme et l'éther de pétrole ont été ajoutés séparément. Ces flacons étaient étiquetés et fermés en utilisant des tampons de coton et mis au repos pendant 2 heures pour être filtrés avec du papier filtre Wattman N°01. Les filtrats obtenus sont utilisés pour le criblage des métabolites secondaires pouvant être présents, conformément aux procédures standards : (De.S et al, 2010 ; Kokate C.K et al, 2009 ; Evans W.C, 2002)

IV.2.1. Tests pour les alcaloïdes:

IV.2.1.a. Test de Mayer :

1 ml de chaque extrait a été mélangé à quelques gouttes de réactif de Mayer (solution de potassium iodure mercurique). La formation d'un précipité de couleur crème indique la présence d'alcaloïdes.

IV.2.1.b. Test de Wagner:

On a mélangé 1 ml de chaque extrait avec des volumes égaux de réactif de Wagner (iode dans l'iodure de potassium). La formation d'un précipité brun rougeâtre indique la présence d'alcaloïdes.

IV.2.1.c. Test de Dragendorff:

1 ml de chaque extrait, 2 ml de réactif de Dragendorff ont été ajoutés et mélangés, puis on a ajouté 2 ml d'HCl dilué. La formation d'un précipité de couleur orange indique la présence d'alcaloïdes.

IV.2.2. Tests pour les flavonoïdes :

IV.2.2.a. Test Shinoda :

2 ml des chaque extraits auxquels on ajoute du Magnésium et ainsi que quelques gouttes d'HCl concentrées sur les parois du tube. Apparition d'une couleur rouge indique la présence des flavonoïdes.

IV.2.2.b. Test du FeCl₃:

2 ml d'extrait auxquels on ajoute quelques gouttes de FeCl₃ à 5%. Apparition d'un précipite noirâtre.

IV.2.2.c. Test du réactif basique NaOH :

1 ml de chaque extrait, on ajoute NaOH (1M) l'apparition de la couleur jaune à rouge indique la présence des flavonoïdes.

IV.2.3. Test pour les tanins :

1 ml d'extrait on ajoute 2 ml d'eau distiller ensuite quelques gouttes FeCl₃ à 5% l'apparition de la couleur verte indique la présence des tanins.

IV.2.4. Tests pour les coumarines :

2 ml d'extrait auxquels on ajoute 3 ml d'hydroxyde de sodium à 10% l'apparition de la couleur jaune indique la présence des coumarines.

IV.2.5. Tests pour les stérols :

IV.2.5.a. Test Salkowski :

2 ml d'extrait auxquels on ajoute 5 ml de chloroforme puis 1 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentré on les mélange très bien. La formation d'une couche rouge indique la présence des stérols.

IV.2.6. Tests pour les phénols:

IV.2.6.a. Test pour le phénol :

2 ml d'extrait traité par 1 ml de FeCl₃ à 5%; le développement d'une couleur intense confirme la présence des phénols.

IV.2.6.b. Test pour l'acide ellagique :

Les extraits ont été traités avec quelques gouttes d'acide acétique glacial à 5% (m / v), suivies d'une solution de NaNO₂ à 5% (m / v). La formation d'une couleur marron boueuse indique la présence de phénols.

IV.2.7. Test pour les terpénoïdes:

2 ml de tous les extraits, du HCl à 1% a été ajouté et laissé au repos pendant 5-6 heures. Plus tard, ces extraits ont été traités avec 1 ml de réactif Trim-Hill (une solution de 10 ml d'acide acétique, 1 ml de sulfate de cuivre à 0,2% dans de l'eau et 0,5 ml d'acide chlorhydrique concentré) et chauffés dans un bain-marie bouillant pendant 5 minutes à 10 minutes. La formation de couleur vert bleuâtre indique la présence de terpénoïdes.

IV.3. Analyses quantitatives:

IV.3.1. Dosage des composés phénoliques par la méthode de Folin ciocalteu:

Le dosage des phénols totaux a été déterminé en utilisant le réactif Folin ciocalteu (**Mc Donald et Al, 2001**) avec une méthode spectrométrique (**Singleton, C.P. and J.A., Rossi, 1965**). Un volume de 100 µl d'extraits préparés avec des concentrations de 0,1 mg/ml pour chacun d'entre eux pour l'acide gallique standard avec des concentrations de (100-50-12-5-8-6) µg/ml, a été transféré dans un tube à essai et mélangé avec 1ml de réactif Folin ciocalteu (préalablement dilué 10 fois avec de l'eau distillée). Le mélange a été laissé à température ambiante pendant 5 minutes. Une quantité de 0,8 ml de solution de carbonate de sodium à 7,5 % (p/v) a été ajoutée au mélange qui a été doucement agité. Après un repos dans la température ambiante pendant 30 minutes, l'absorbance a été mesurée à 765 nm en utilisant l'Unicamhelios Gamma spectrophotometric UV-Visible. L'acide gallique a été utilisé comme étalon pour la courbe d'étalonnage. Le contenu phénolique total a été exprimé en équivalents d'acide gallique dans la matière sèche (µg / mg de la plante séché)

IV.4. Préparation des extraits de la plante *E. guyoniana* :

IV.4.1. Procédé d'extraction au Soxhlet :

Dans une cartouche en papier filtres épais placée dans la colonne du Soxhlet, on a introduit une masse de 50g du matériel végétal d'*E.guyoniana* et dans le ballon en dessous on a mis 700 ml de chaque solvant : EtOH, DCM et l'hexane, Après le chauffage pendant une durée de 6h on a obtenu une solution qui contient de l'extrait plus le solvant. L'extrait brut a été récupéré par une simple distillation.

IV.5. Préparation des extraits de la plante *Anvillea radiata* :

Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri de la lumière et l'humidité, les parties aériennes de la plante sont broyées, la poudre obtenue (1900g) a subi une macération dans l'éther de pétrole pendant 24 heures dans un premier temps, après élimination du solvant, le marc a été macéré dans un mélange hydro alcoolique (Ethanol/Eau ; 70 : 30 ; v/v) pendant 48 heures. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35 °C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 48 heures

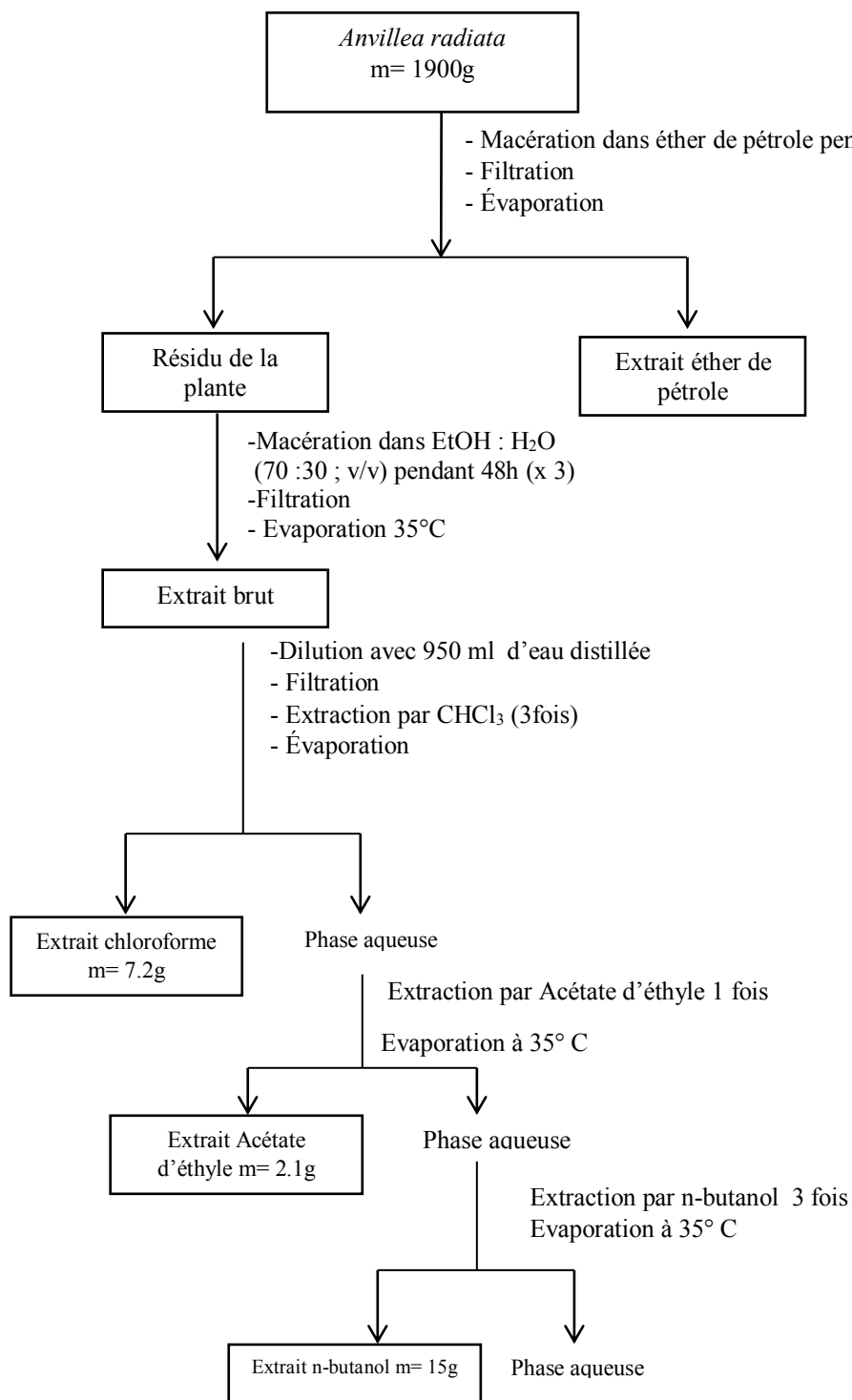
Aux trois extraits hydro alcooliques réunis et concentrés, on a rajouté, sous agitation magnétique, de l'eau distillée à raison de 50 ml pour 100 g de matière sèche. La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cela permet le dépôt de la chlorophylle, les cires, etc....

Après la filtration on a obtenu une solution aqueuse claire. Cette dernière a subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Les trois phases organiques récupérées sont concentrées sous pression réduite à sec et pesées. On a obtenu 7.2 g d'extrait pour la phase chloroformique, 2.1 g d'extrait pour la phase acétate d'éthyle et 15 g de l'extrait *n*-butanolique.

L'organigramme 01 montre les différentes étapes du processus d'extraction.

CHAPITRE IV: ETUDE DE METABOLITES PHENOLIQUE DE LA PHASE BUTANOLIQUE D' *ANVILLEA RADIATA*



L'organigramme 01 : Schéma du protocole d'extraction par macération

IV.6. Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est souvent utilisée pour l'optimisation de la méthode de séparation par colonne, ensuite le contrôle et le suivi des différentes étapes des purifications.

Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Les plaques sont éluées dans des cuves en verre saturées avec la phase mobile (éluant) appropriée.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants, (les proportions sont données en volume) :

- Dichlorométhane / Acétate d'éthyle (9 :1)
- Chloroforme/Méthanol (10 :1) ; (50 :1) ;(25 :1)
- Acétate d'éthyle/Méthanol/ eau (100 :13.5 :7)
- Acétate d'éthyle/acide Acétique /acide formique/eau (100 :11 :11 :26)
- Acétate d'éthyle/ Acide Acétique /eau (8.1.1)

L'observation des CCM s'est effectuée directement (visible) et sous la lumière UV (254 et 356 nm), avant et après la révélation par le réactif de Neu et la Vanilline sulfurique.

IV.6.1. Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes) :

Il est préparé d'une solution A composée de 1 g d'acide amino-2-éthylidiphénylborique et de 100 ml de méthanol et d'une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 ml d'éthanol. Pour la révélation il faut pulvériser un mélange de 10 ml de solution A et 8mL de solution B, puis chauffer la plaque de CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ (**Wagner et Bladt, 2001**). Sous la lumière UV à 365 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de tâches fluorescentes jaunes, vertes ou orange et bleu vif.

IV.6.2. Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur polyvalent) :

Il est préparé d'une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique concentré et de 100 ml l'éthanol à 95%. Pour la révélation il faut pulvériser, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 minutes environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

IV.7. Fractionnement chromatographique de l'extrait Butanoliques de la plante *A. radiata* :

Pour les chromatographies sur colonnes, plusieurs types de phases stationnaires et mobiles peuvent être mises en œuvre dans des colonnes en verre. La longueur et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

L'extrait butanolique, a été grossièrement fractionné sur une colonne chromatographique flash remplie de gel de silice, l'extrait butanolique (12 g) dissout dans un minimum de solvant, est mélangé à 5g de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière, est déposée sur la tête d'une colonne de gel de silice, préparée dans le dichlorométhane et enrichi progressivement en méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couche mince de gel de silice, les plaques analytiques ont été développées avec différents systèmes de phase mobile, et visualisées sous lampe UV, à 254 et 365nm.

Les chromatographies d'exclusion sont réalisées sur gel de Sephadex ® LH20. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

Après rassemblement selon les résultats de suivi analytique, les fractions sont testées ensuite dans des systèmes différents qui sont :

- Acétate d'éthyle/ Acide acétique/ Acide formique/ Eau (100 :11 :11 :26)
- Chloroforme/ Méthanol/ Eau (26 :14 :3) et (50 :15 :1)

La progression de cette colonne est présentée dans le **tableau 10** :

CHAPITRE IV: ETUDE DE METABOLITES PHENOLIQUE DE LA PHASE
BUTANOLIQUE D' *ANVILLEA RADIATA*

Tableau 10 : Fractionnement chromatographique de l'extrait butanolique de la plante
A.radiata

fractions	Regroupement des fractions	Système d'éluion		Nom des fractions regroupées	Masse (mg)
		% CH ₂ Cl ₂	%MeOH		
1-5	1	100	0	A ₁	//
6-9	2	99	1	A ₂	27.9
10-13	3	98	2	A ₃	36.2
14-15	4	98	2	A ₄	32.3
16-18	5	96	4	A ₅	87.5
19	6	96	4	A ₆	87.3
20-22	7	96	4	A ₇	51.4
23-24	8	94	6	A ₈	47.6
25-27	9	92	8	A ₉	155.2
28-31	10	92	8	A ₁₀	98.6
32-34	11	90	10	A ₁₁	89
35-37	12	86	14	A ₁₂	96.28
38-42	13	86	14		
43	14	82	18	A ₁₃	1148.5
44-46	15	72	28	A₁₄	2399.1
47	16	72	28	A ₁₅	4845.4
48-52	17	62	38		
53-55	18	52	48		
56-59	19	42	58		
60-63	20	32	68	A ₁₆	1820
64-67	21	22	78		
68-70	22	12	88	A ₁₇	3225.1
71-74	23	0	100		
75-120	24	0	100		
121-132	25	0	100		

IV.8. Purification de la fraction A₁₄ :

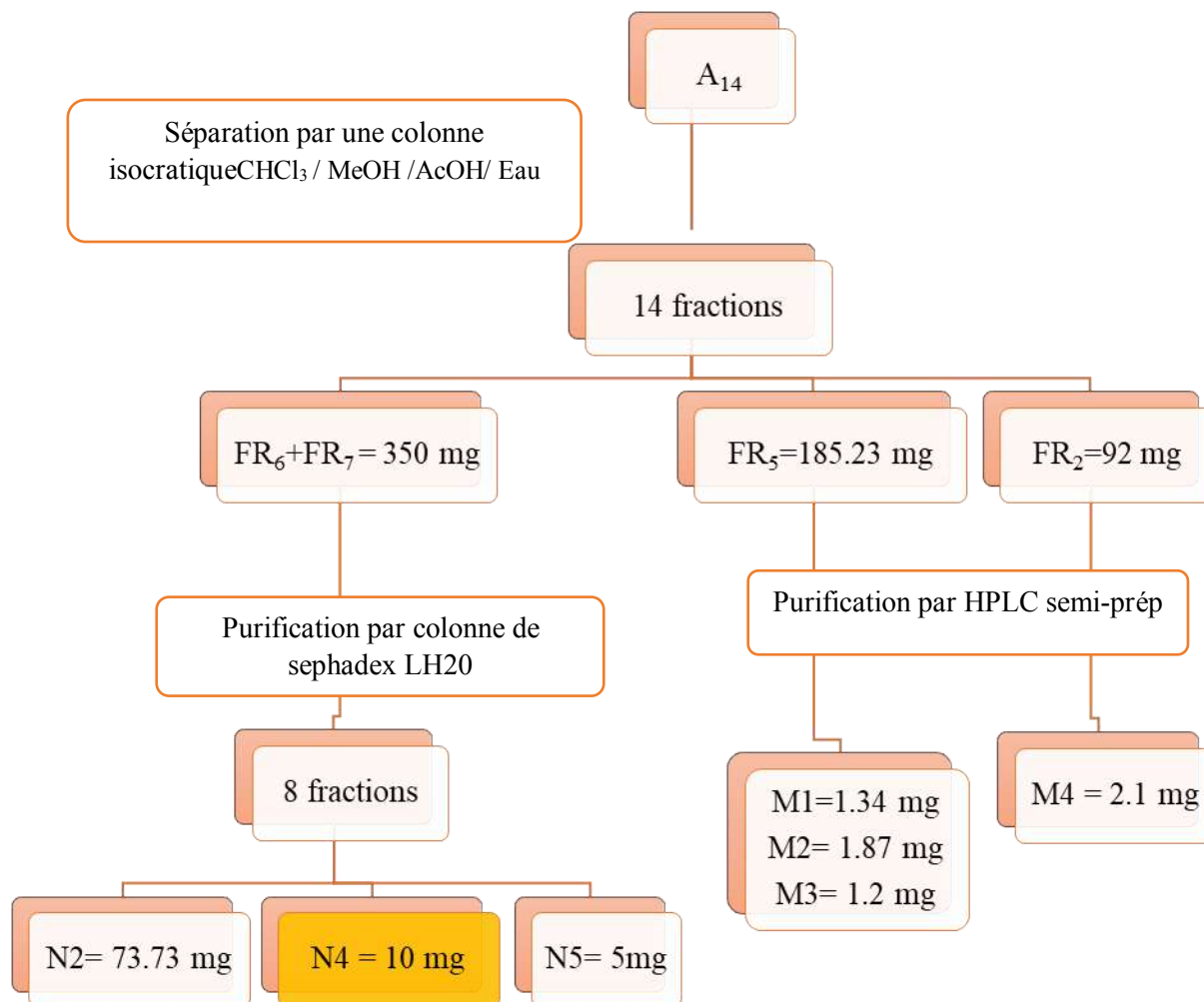
La fraction A₁₄ a subi une séparation sur colonne en mode isocratique avec le système d'élution CHCl₃ / MeOH / AcOH/ Eau (20:13.5:1:0.5) qui a fourni 16 fractions. En se basant sur leur profil CCM, elles ont été rassemblées en ~~ees~~ sous-fractions désignées de FR₁ à FR₁₄. Leur analyse par CCM nous a aidé à rassembler les sous fractions FR₆ et FR₇ et les purifier à l'aide d'une colonne de sephadex LH20, en utilisant le système de solvant méthanol/Dichlorométhane (1/1) pour obtenir 8 sous-fractions de N1 à N8. La **N4 a été révélée produit pur.**



Figure 19 : photo du chromatogramme CCM de séparation de la sous fraction A₁₄.

CHAPITRE IV: ETUDE DE METABOLITES PHENOLIQUE DE LA PHASE BUTANOLIQUE D' *ANVILLEA RADIATA*

L'organigramme 02 résume les étapes de fractionnement de la fraction A₁₄:



L'organigramme 02 : purification de la sous-fraction A₁₄.

IV.9. Chromatographie liquide haute performance (HPLC/DAD-UV) :

Les analyses HPLC/UV(DAD) ont été effectuées à l'aide d'une chaîne HPLC analytique Agilent 1100 séries (ULB, Tip's); column Ascentis® C18 25cm* 2.4 mm, 5µm. Température de 35°C, volume injecté 50 µL et l'appareille HPLC semi-préparatif utilisée a été WATERS (ULB, P2); muni d'une colonne 250*10 mm1/2' VALCO Chromospher 5 C-18. 1000 µl de l'échantillon a été le volume injecté à température ambiante. Toutes les analyses sont effectuées avec un gradient d'acétonitrile, de l'eau et TFA 0.5% en semi-préparatif. Les solvants utilisés sont de qualité HPLC et le débit est fixé à 3 ml/min.

IV.10. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) :

Les spectres de la résonance magnétique nucléaire RMN ont été enregistrés au service CIREM (Instrumentation platform in Nuclear Magnetic Resonance) de l'Université Libre de Bruxelles sur une appareil de type Spectromètre Jeol JNM-ECZ600R / S3, Aimant supraconducteur blindé de 14,1 Tesla (600 MHz) Console à 3 canaux (haut, haut, bas) avec unités à gradient de champ pulsé (PGF) et à température variable (VT) Dispositif de refroidissement par air FTS et système de refroidissement par évaporation à l'azote liquide Plage de température de mesure: -100 ° C à + 150 ° C Carrousel à 30 échantillons pour automatisation Sonde royale NM 5 mm avec z-PFG et ajustement automatique pour les expériences de double résonance 31P-15N / 1H-19F.

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés CD₃OD dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm; les constantes de couplage sont exprimées en Hz. Les programmes des séquences impulsionsnelles standard fournies par Jeol ont permis de réaliser les expériences bidimensionnelles COSY, NOESY, HSQC et HMBC.

IV.11. L'activité anti oxydante :

VI.11.1. Le pouvoir anti radicalaire (DPPH) :

D'après une étude récente (Alan et al ; 2013), 19 méthodes sont utilisées actuellement pour l'estimation in vitro du pouvoir antioxydant d'un échantillon et la méthode au DPPH• représente le test le plus souvent adopté. Il est important de sélectionner et d'employer des méthodes fiables et rapides dans le but d'évaluer cette activité. A cet effet, le test choisi dans ce travail est la réduction du radical DPPH• par les phénols totaux.

IV.11.2. Stress antioxydant :

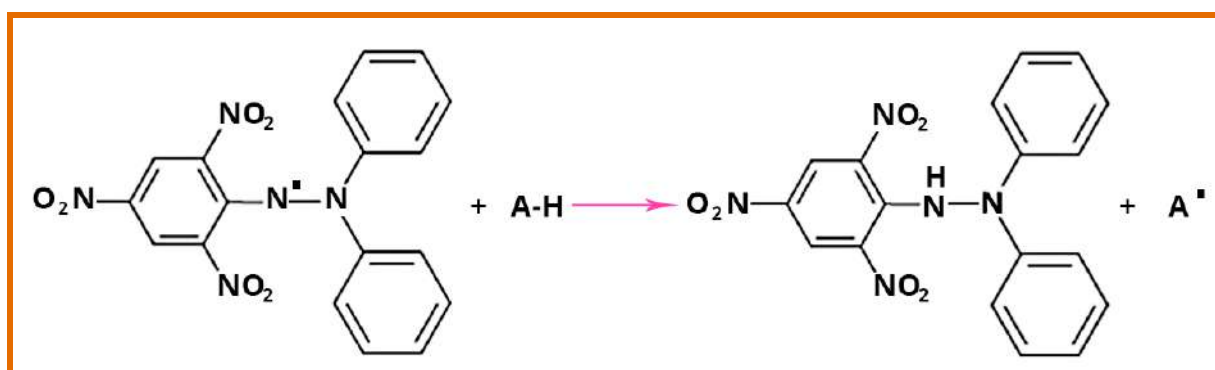
Le terme antioxydant regroupe un très grand nombre de molécules, qui ont la propriété commune de devenir la cible des radicaux libres, protégeant ainsi nos cellules lors d'une attaque radicalaire (Mahrouf et al, 1998).

Il nous paraît donc important de rechercher des substances et des molécules d'origines végétales présentant un pouvoir protecteur vis-à-vis du niveau oxydatif cellulaire.

IV.11.2.a. Estimation du pouvoir anti radicalaire par la méthode du DPPH :

Principe :

Le DPPH est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. (Wu, 2007)



(AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radicale DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune). (Brand-william et al, 1995)

IV.11.2.b. Préparation des essais :

Une solution de DPPH a été préparée par solubilisation de 0.004 g de DPPH dans 100 ml de méthanol, les témoins acide ascorbique et la quercétine d'une gamme de concentration variant de 0.20 à 10 µg/ml de méthanol. Pour les extraits végétaux gamme de concentration variant de 0.2 à 20 µg/ml de méthanol. Chaque essai est réalisé en triple à l'abri de la lumière.

Dans chaque tube on introduit dans l'ordre :

- 500 µl des chaque essai.
- 2500 µl de solution DPPH.

Un contrôle est effectué en introduisant 500 µl de méthanol avec 2500 µl de solution DPPH* incubation de 30 minute à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Lecture des absorbances se fait au spectrophotomètre à 517 nm.

Le pourcentage de l'inhibition du radical est donné par l'expression suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

Où:

A₀: Absorbance de la solution du DPPH•

A : Absorbance de la solution du DPPH après réaction avec l'extrait.

La valeur IC₅₀ est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

CHAPITRE V :
RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre V : Résultats et discussion

V.1. Analyse phyto-chimique :

Les tests phytochimiques préliminaires réalisés selon des protocoles universels sur les extraits d'*A.radiata* ont révélé la présence des flavonoïdes, des tanins, des coumarines, des phénols et des terpénoïdes dans les deux extraits MeOH et aqueux et les stéroïdes dans l'extrait CHCl₃. Egalement, il est à noter que l'extrait à l'éther de pétrole ne renferme aucune de ces familles de composées.

Dans l'*E.guyoniana*, ces tests ont détecté la présence des alcaloïdes dans son extrait MeOH. Les flavonoïdes dans l'extrait aqueux, les tanins ; phénols et coumarines sont présents dans les extraits MeOH et aqueux. Les stéroïdes sont présents dans l'extrait CHCl₃ alors que les terpénoïdes ont marqué leur présence dans les extraits CHCl₃ et aqueux.

Les résultats de ces essais sont rassemblés dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Résultats des tests phyto-chimiques préliminaires

	<i>Anvillea radiata</i>				<i>Euphorbia guyoniana</i>			
	Extraits				Extraits			
	MeOH	CHCl ₃	aqueux	éter de pétrole	MeOH	CHCl ₃	aqueux	éter de pétrole
Alcaloïdes	-	-	-	-	+	-	-	-
Flavonoïdes	+	+	+	-	-	-	+	-
Tanins	+	-	+	-	+	-	+	-
Phénols	+	-	+	-	+	-	+	-
Stéroïdes	-	-	+	-	-	+	-	-
Coumarines	+	-	+	-	+	-	+	-
Terpenoïdes	+	-	+	-	-	+	+	-

(-) absence (+) présence

V.2. Détermination du rendement:

Dans cette étude, les rendements ont été déterminés par rapport à la matière sèche des plantes.

Les résultats sont représentés dans le **tableau 12**

Tableau 12: Rendement (R%) des extraits

Plantes	Extrait	Masse sèche (g)	R %
<i>A.radiata</i>	CHCl ₃	7.2	0.38
	AcOET	2.1	0.11
	n-BuOH	15	0.78
<i>E.guyoniana</i>	Hexane	3.9	7.8
	DCM	12.9	25.8
	EtOH	16.7	33.4

Les résultats obtenus pour la plante *A.radiata* montrent que l'extrait du n-BuOH représente le rendement le plus élevé (0.78 %) par rapport au poids total de la plante sèche, suivi par l'extrait CHCl₃ (0.38 %) puis celui de l'acétate d'éthyle (0.11%).

Les rendements de la plante *E.guyoniana* ont été dans cet ordre, l'extrait éthanolique a exposé le rendement le plus élevé (16.7%), suivi par l'extrait DCM (12.9%) puis l'extrait d'hexane (3.9%).

Généralement, le rendement d'une extraction de produits naturels n'est que relatif et semble être lié à l'origine géographique, aux conditions et à la durée du stockage du matériel végétal récolté et la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon (**Quy Diem Do et al, 2014**)

Selon **Rhazi et al, 2015**, la prolongation du temps d'extraction peut diminuer le rendement de l'extrait et cela peut être dû à la dégradation de certaines substances naturelles comme les polyphénols.

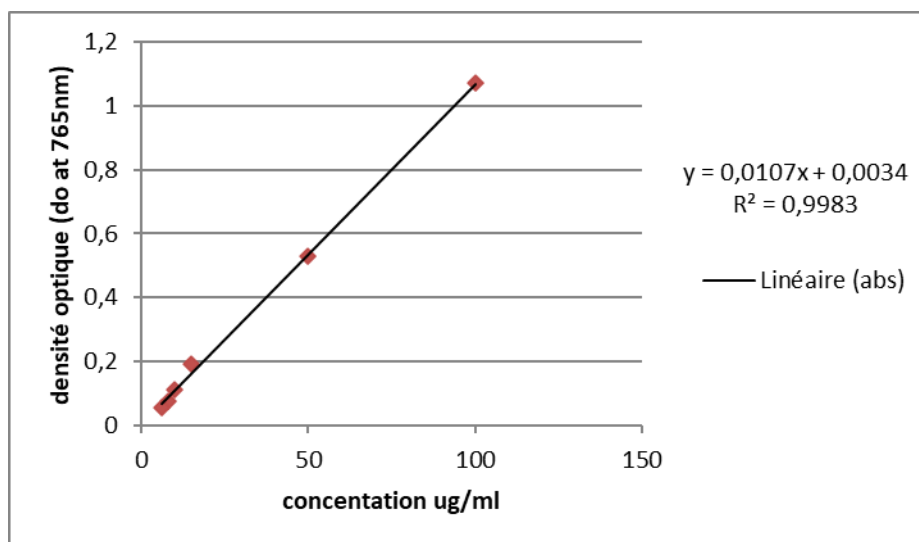
V.3. Résultats de l'analyse quantitative :

V.3.1. Dosage des phénols totaux:

L'étude quantitative des extraits bruts, préparés à partir des parties aériennes d'*A.radiata* et *E.guyoniana*, au moyen des dosages spectro-photométriques avaient été l'objectif de la détermination de la teneur des phénols totaux. La raison principale pour le choix de ces substances induit la majorité des effets pharmacologiques des plantes. La droite d'étalonnage a été tracée pour cet objectif qui est réalisé avec une solution d'étalon à différentes concentrations.

Les quantités des phénols totaux correspondantes ont été rapportées en microgrammes d'équivalents de l'étalon utilisé par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$) et déterminés par l'équation de type : $y = a x + b$.

Le dosage des phénols totaux a été effectué selon la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). L'acide gallique a été utilisé comme étalon (Figure 20).



(moyenne de trois mesures \pm SD).

Figure 20 : Droite d'étalonnage de l'acide gallique

Chapitre V : Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 13**.

Tableau 13: Teneurs en phénols totaux des extraits des parties aériennes d'*A.radiata* et *E.guyoniana*.

Plantes	Extraits	Teneur en phénols totaux (μg EAG/mg)
<i>A.radiata</i>	BuOH	348,93 \pm 7,456
	AcOET	320,39 \pm 4,459
	CHCl ₃	56,75 \pm 0,981
<i>E.guyoniana</i>	EtOH	109,30 \pm 5,710
	DCM	91,45 \pm 1,133

Les valeurs représentent la moyenne de 3 mesures \pm SD.

La lecture des données du tableau ci-dessus montre que les teneurs en phénols totaux enregistrés en μg équivalent d'acide gallique par mg, représentent des proportions allant de 2.98% à 18.3% de poudre d'*A.radiata* et de 18.29% à 21.86% de poudre d'*E.guyoniana*.

En réalité, le solvant d'extraction emporte aussi des substances non-phénoliques comme les sucres, les protéines et les colorants qui peuvent interférer pendant toute évaluation phénolique (**Djeridane et al, 2006**)

Le dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu donne donc une évaluation brute de tous les composés phénoliques d'un extrait. Il n'est pas spécifique aux phénols totaux, mais beaucoup de composés peuvent réagir avec le réactif donnant un taux phénolique apparent élevé (**Tawaha et al, 2007**).

La variabilité des teneurs en phénols totaux chez ces espèces végétales est due probablement, à la composition phénoliques des extraits (**Hayouni et al., 2007**), aux facteurs génotypiques (**El-Waziry, 2007**), les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques) (**Ksouri et al., 2008**), la nature du sol et le type du microclimat (**Atmani et al., 2009**) et aussi des étages bioclimatiques où poussent ces plantes.

V.4. Caractérisation structural :

V.4.1. Purification du composé N₄

Le composé N₄ s'est présenté sous la forme d'une poudre miel soluble dans le méthanol. Ce composé a réagi avec le réactif de Neu en affichant une fluorescence jaune sous UV à 365 nm laissant envisager une structure de type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 258 et 352 nm, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol (**Mabry et al ., 1970**)

Le composé N₄ a été purifié sur une colonne Sephadex LH₂₀, il a été injecté en HPLC pour vérifier sa pureté, les **figures 20 et 21** représente le chromatogramme de N₄ produit purifié.

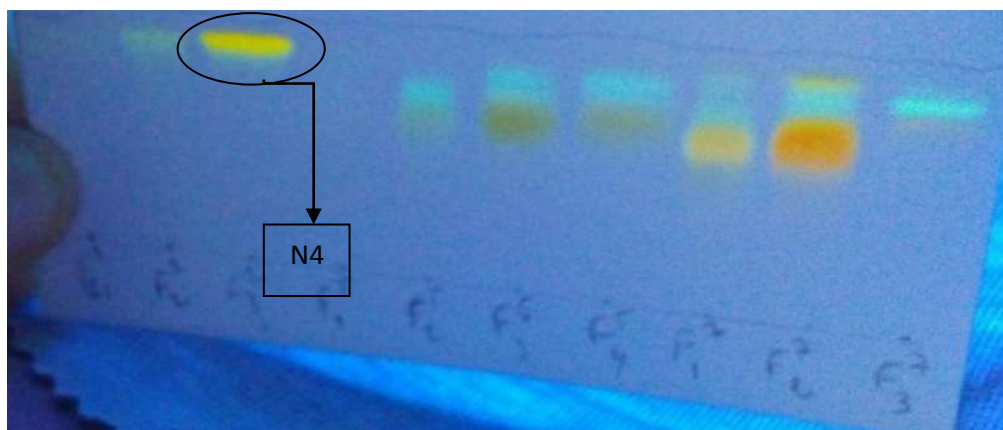
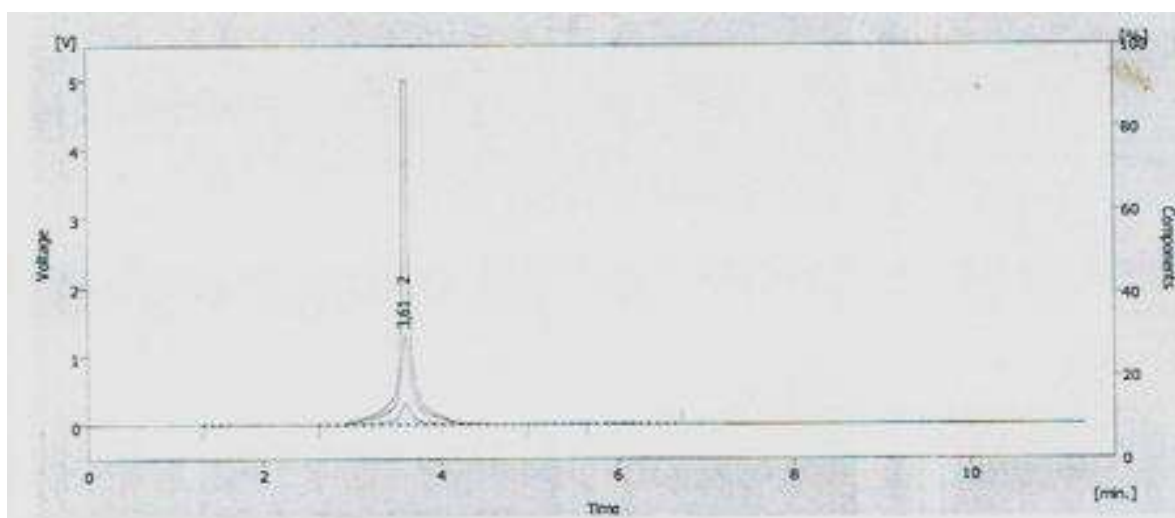


Figure 21 : Chromatogramme CCM des composées après la colonne sephadex LH₂₀



Figures 22 : Chromatogramme HPLC du produit purifié N₄

V.4.2. Elucidation structurale du composé N4 :

Le spectre RMN ^1H , enregistré dans CD_3OD , 600MHz, 25°C, COSY (**figure 23**) et le spectre HSQC (**figure 24**) montrent la présence de deux groupements éthyléniques $-\text{CH}=\text{CH}-$ de configuration *trans*.

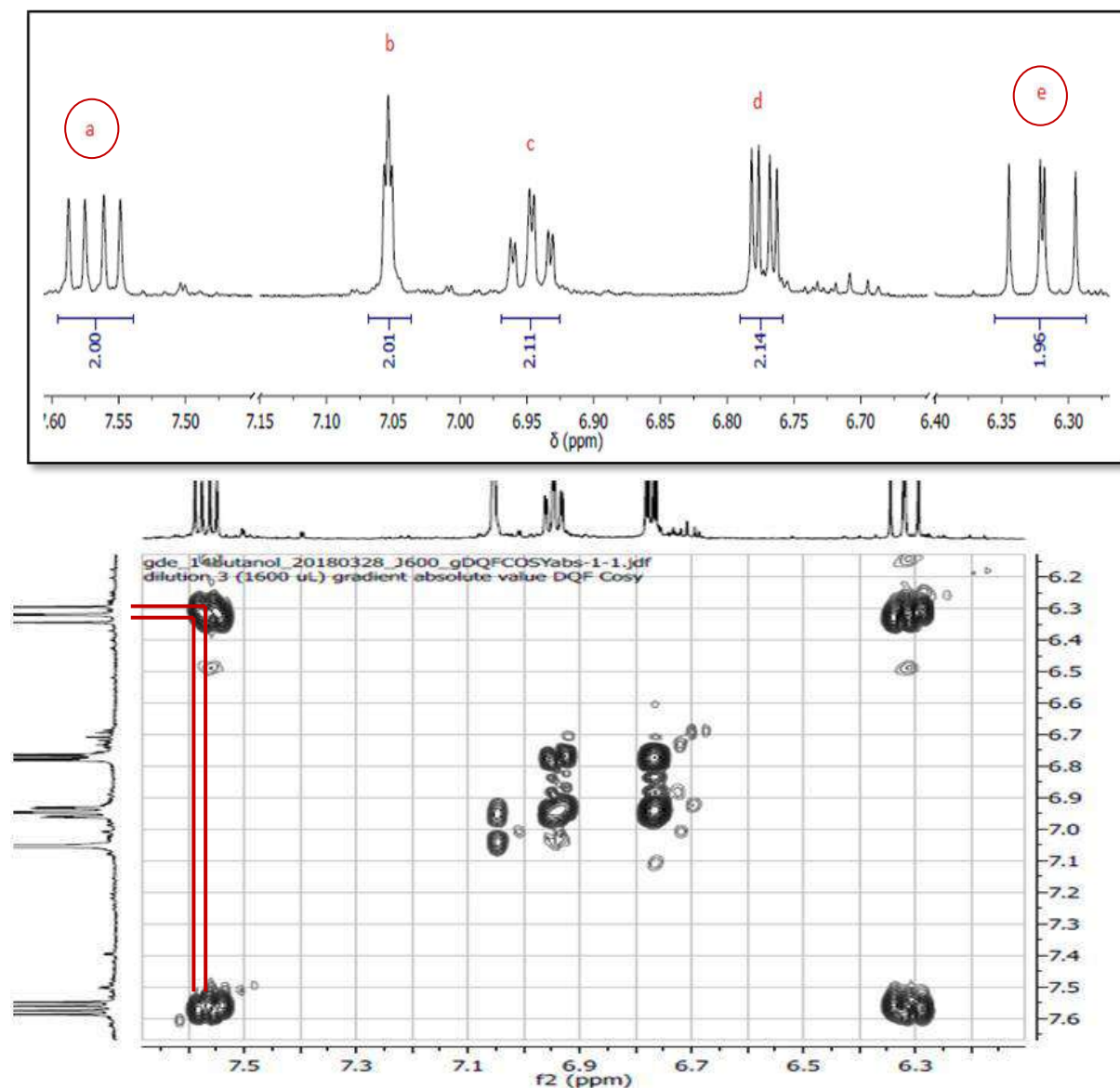


Figure 23 : Spectre RMN ^1H et COSY (600Mhz ; CD_3OD) du composé N4 la partie [7.60-6.30 ppm]

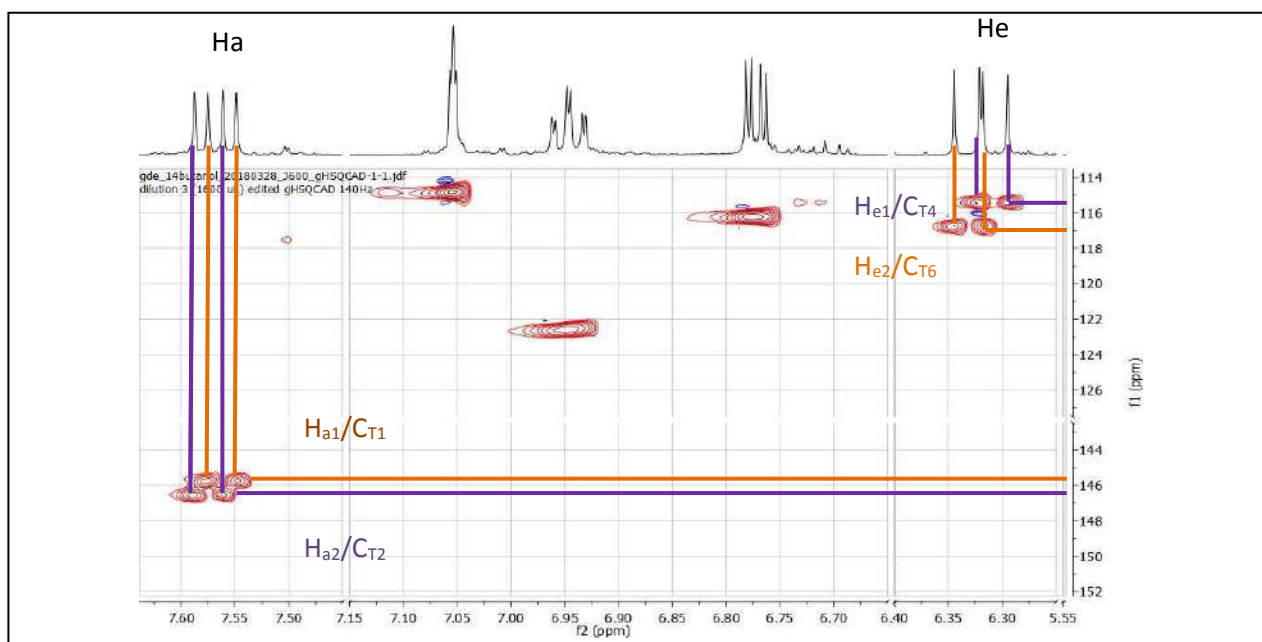


Figure 24 : Spectre HSQC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 zoom sur la partie [7.60-5.55 ppm]

Les deux protons du premier groupement à $\delta_{\text{Ha}1} = 7.57 \text{ ppm}$ ($J = 15.83 \text{ Hz}$) et $\delta_{\text{He}2} = 6.31 \text{ ppm}$ ($J = 15.89 \text{ Hz}$) liés respectivement aux carbones $\delta_{\text{C}} = 146.6 \text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 115.3 \text{ ppm}$, montrent une tâche de corrélation sur le spectre HMBC (**figure 25**) avec le carbonyle de l'estér qui résonne à $\delta_{\text{C}} = 168.8 \text{ ppm}$.

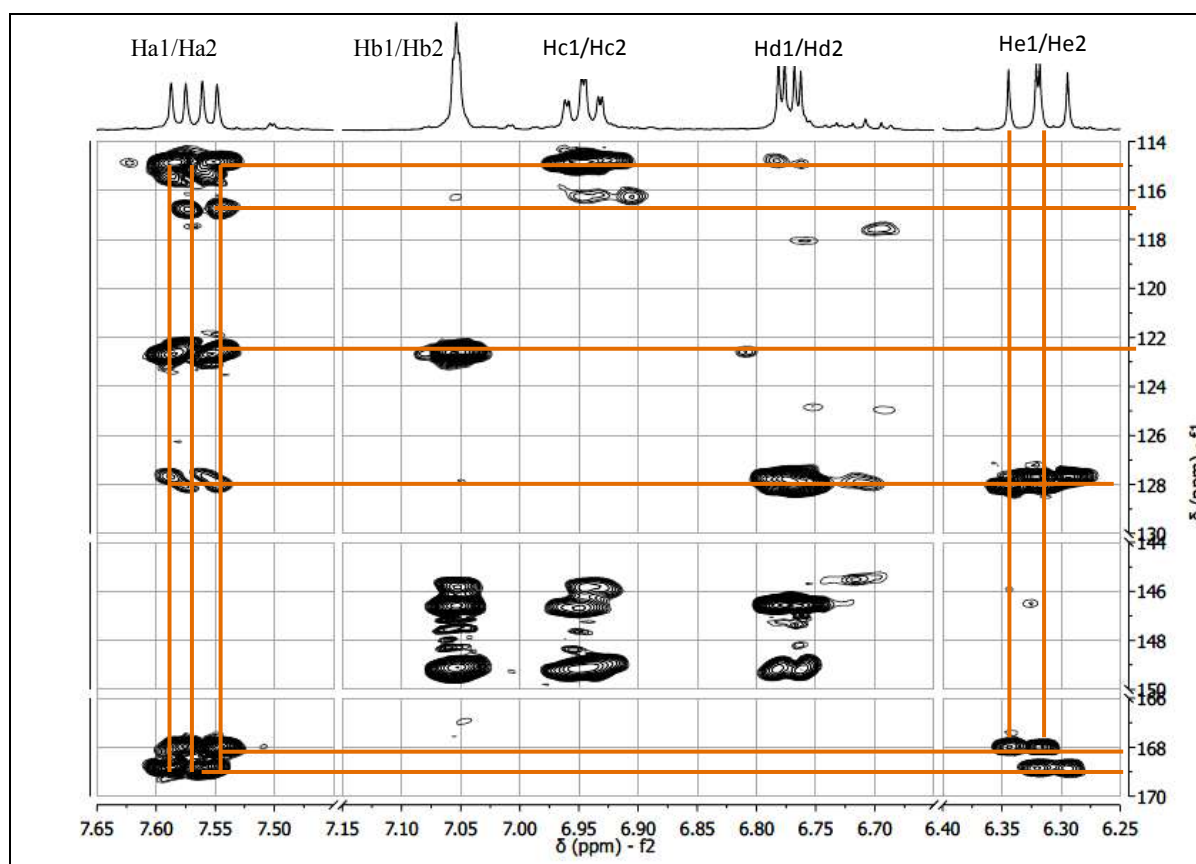


Figure 25 : Spectre HMBC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 zoom sur la partie [7.65-6.25 ppm]

Il en est de même pour les deux protons du second groupement éthyléniques CH=CH à $\delta_{\text{Ha}2}=7.56\text{ppm}$ ($J = 15.97\text{ Hz}$) et $\delta_{\text{He}1} = 6.33\text{ppm}$ ($J = 15.90\text{Hz}$) liés respectivement aux carbones $\delta_{\text{C}} = 145.8\text{ ppm}$ et $\delta_{\text{C}} = 116.7\text{ ppm}$, ces deux protons corrélient avec le carbonyle du groupement ester qui résonne à $\delta_{\text{C}} = 168.0\text{ppm}$. Ces observations indiquent la présence de deux groupements esters conjugués chacun avec une double liaison de configuration *trans* (Figure 26).

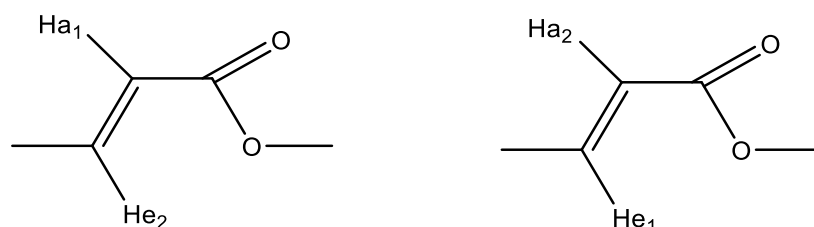


Figure 26 : Première entité faisant partie de la structure du composé N4.

Chapitre V : Résultats et discussion

Un examen du spectre RMN du proton (**figure 23**) montre la présence de deux séries de trois protons aromatiques qui résonnent sous forme de :

- Deux doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{Hb1} = 7.06 \text{ ppm}$ ($J=1.96\text{Hz}$) et $\delta_{Hb2} = 7.05\text{ppm}$ ($J= 2.15 \text{ Hz}$).
- Deux doublets dédoublés à $\delta_{Hc1} = 6.95 \text{ ppm}$ ($J= 8.20$; $J= 2.12\text{Hz}$) et $\delta_{Hc2} = 6.94 \text{ ppm}$ ($J= 8.19$, $J= 2.07\text{Hz}$)
- Deux doublets à $\delta_{Hd1} = 6.78 \text{ ppm}$ ($J= 8.17 \text{ Hz}$) et $\delta_{Hd2} = 6.77\text{ppm}$ ($J=8.17\text{Hz}$).

Ces déplacements chimiques et les valeurs des constantes de couplage orientent vers la présence de deux noyaux aromatiques tri substitués dans les positions: 1,3 et 4 car nous avons pour chaque cycle aromatique un premier proton qui montre uniquement un couplage *méta*, un second qui montre uniquement un couplage *ortho* et un troisième qui montre un couplage un *ortho* et un *méta*.

Par ailleurs, sur les spectres HMBC (**figure 25**), les protons des doubles liaisons éthyléniques à $\delta_{Ha1} = 7.56 \text{ ppm}$ et $\delta_{Ha2} = 7.57 \text{ ppm}$ corrént avec les carbones aromatiques porteur des H à $\delta_{Hb1} = 7.06 \text{ ppm}$ et $\delta_{Hb2} = 7.05 \text{ ppm}$ et également avec les carbones aromatiques porteurs des protons à $\delta_{Cb1} = 114.8 \text{ ppm}$.

Ces observations indiquent que la double liaison éthylénique est reliée, dans les deux cas, au noyau aromatique.

D'après ces constatation on peut déduire si l'on affecte la numérotation 1' et 1'' aux carbones des noyau aromatique liés aux doubles liaisons que les carbones porteurs des protons précédents seront nommé H_{b1} et H_{c1} pour le premier noyau aromatique H_{b2} et H_{c2} pour le deuxième noyau aromatique.

La multiplicité des signaux des protons H_{c1} et H_{c2} oriente vers la substitution des positions C_{m1} et C_{m2} du premier noyau aromatique et également la substitution des positions C_{m2} et C_{n2} du deuxième noyau aromatique.

Chapitre V : Résultats et discussion

Vu la multiplicité (dd) des signaux des protons H_{c1} et H_{c2} , les positions C_{d1} et C_{d2} correspondent aux signaux indiqués plus haut qui sont des doublets à $\delta_{Hd} = 6.77 ; 6.76 \text{ ppm}$ après notre analyse nous pouvons proposer la présence dans cette molécule de deux fois l'entité reportée dans la **figure 27** ; qui correspond à une entité cinnamoyle substituée dans les positions R_1 et R_2

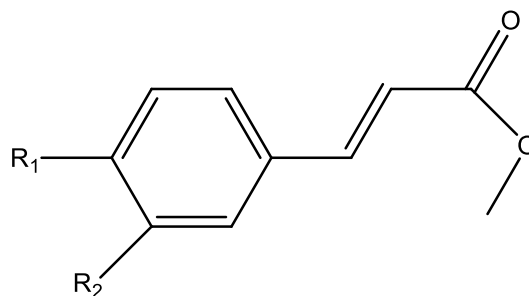


Figure 27 : Deuxième entité faisant partie de la structure du composé N_4 .

L'analyse simultanée des spectres suivants : RMN 1 H (figure 28), cosy (figure 29) et HSQC (figure 30), montre :

- Un groupement CH_2 dont les deux protons magnétiquement non-équivalents résonnent, l'un sous forme d'un doublet multiple à $\delta_H = 2.69 \text{ ppm}$ ($J \approx 15.5 \text{ Hz}$) et le second sous forme d'un doublet dédoublé à $\delta_H = 2.25 \text{ ppm}$ ($J = 15.33 ; 3.48 \text{ Hz}$).
- Les protons de ce même groupement CH_2 ($\delta_c = 38.1 \text{ ppm}$) montre sur le spectre COSY une tache de corrélation le proton d'un premier groupement CH ($\delta_c = 71.7 \text{ ppm}$) qui résonne sous forme d'un (ddd) ($J = 10.99 ; 9.53 ; 4.56 \text{ Hz}$) à $\delta_H = 5.45 \text{ ppm}$.
- Le proton de ce groupement CH, corrèle à son tour avec le proton d'un second groupement CH ($\delta_c = 70.7 \text{ ppm}$) qui résonne sous forme d'un doublet dédoublé ($J = 9.50 ; 3.55 \text{ Hz}$) à $\delta_H = 3.71 \text{ ppm}$. Le proton de ce second CH montre une tache de corrélation avec celui d'un troisième groupement CH hybridé Sp^3 ($\delta_c = 74.4 \text{ ppm}$).

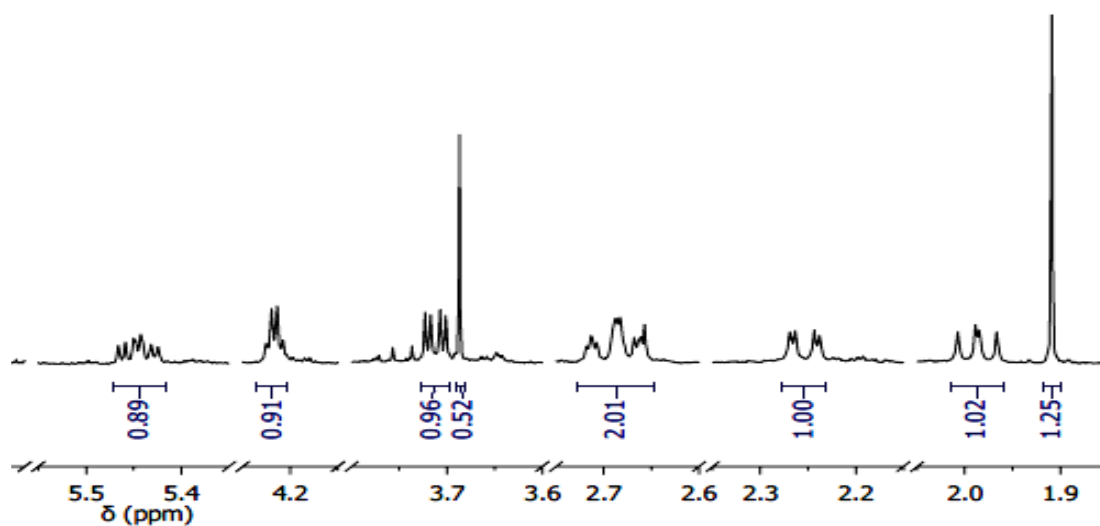


Figure 28: Spectre RMN ^1H (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [5.5-1.9 ppm]

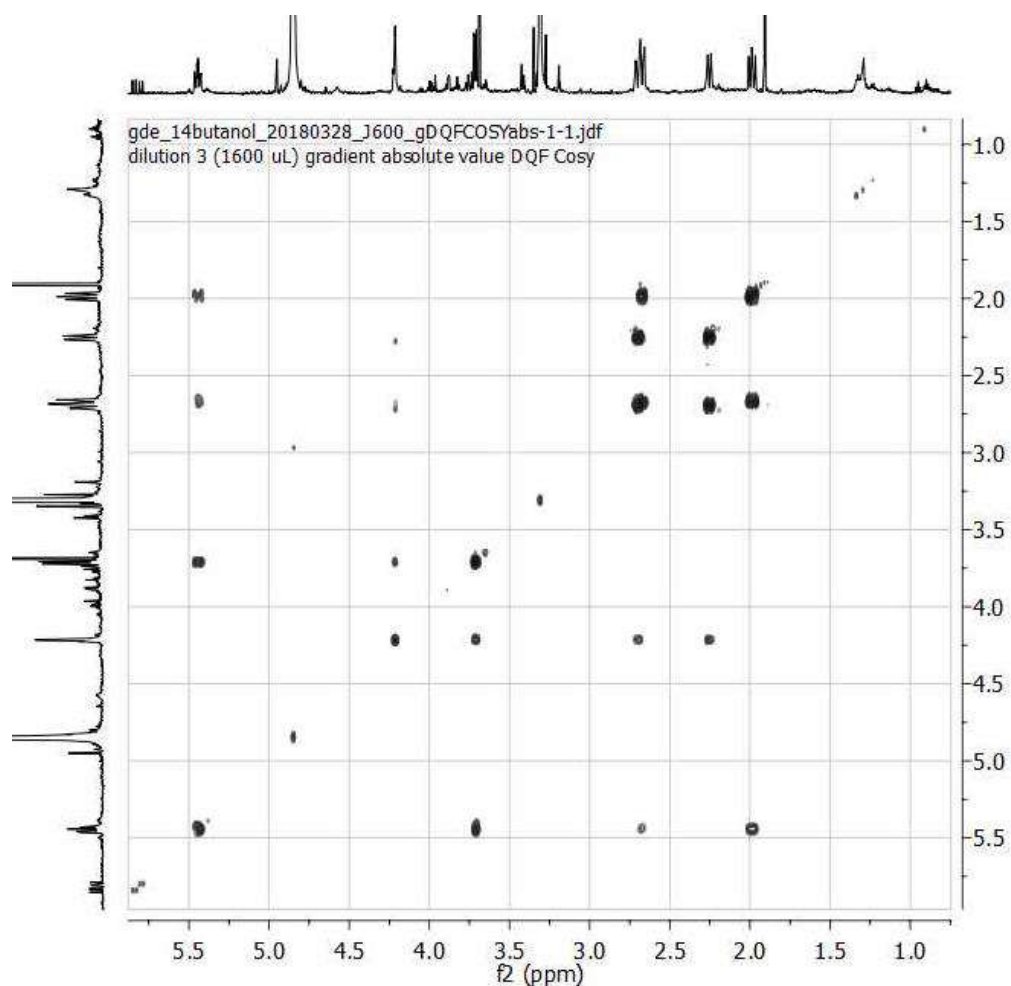


Figure 29 : Spectre COSY (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [6-1 ppm]

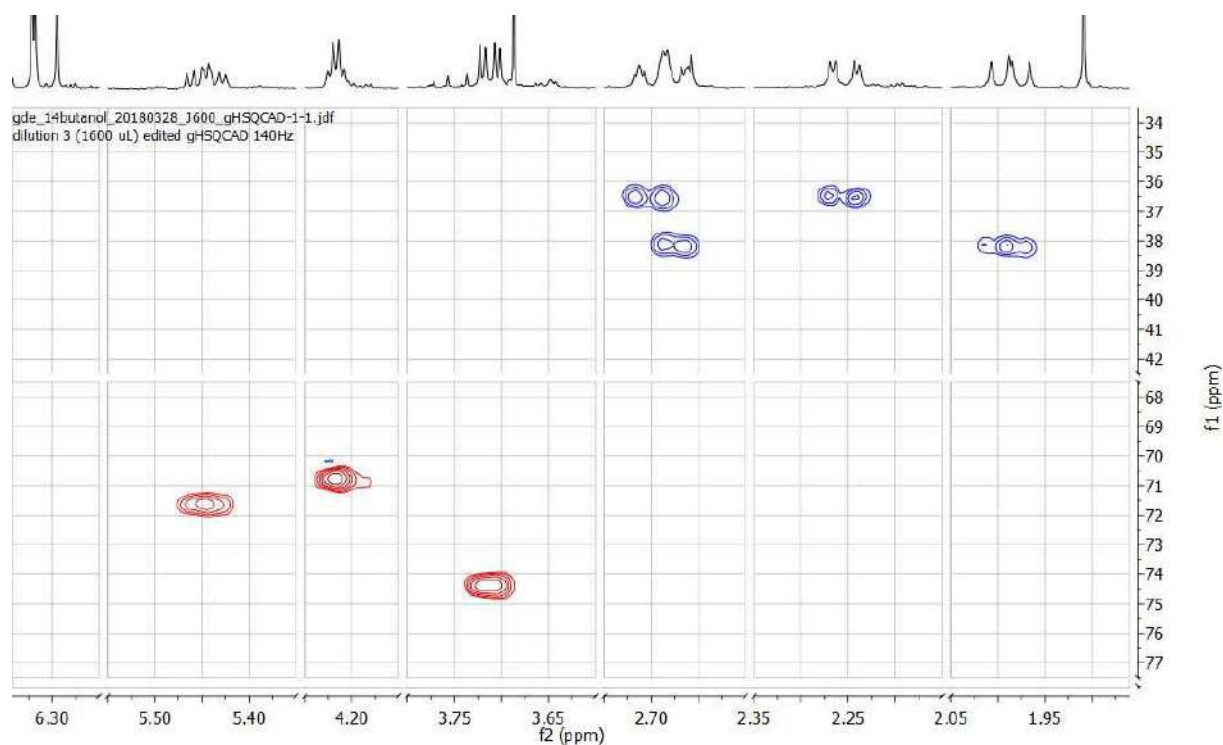


Figure 30 : Spectre HSQC (600Mhz ; CD3OD) du composé N4 de [6.30-1.80]ppm.

- L'ensemble de ces observations additionnées aux valeurs des déplacements chimiques de ces trois groupements CH permettent de proposer l'enchainement reporté dans la **figure 31** suivante :

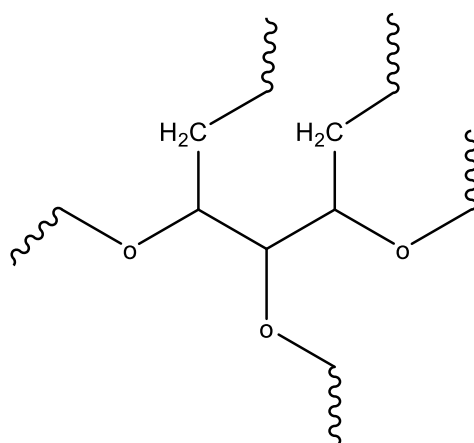


Figure 31 : Troisième entité faisant partie de la structure du composé N4.

Chapitre V : Résultats et discussion

En outre, vu la valeur des déplacements chimiques des deux groupements CH_2 et l'absence de corrélation sur le spectre COSY entre les protons de ces deux groupement avec d'autres protons, nous pouvons alors prévoir un carbone quaternaire oxygéné hybridé Sp^3 comme intermédiaire entre ces deux groupement, ce qui mène à un cycle à six carbones ; dérivé du cyclo hexane oxygéné en C_{R1} ; $\text{C}_{\text{f}}(\text{OR}_3)$; $\text{C}_{\text{g}}(\text{OR}_4)$ et $\text{C}_{\text{h}}(\text{OR}_5)$ **figure 32**.

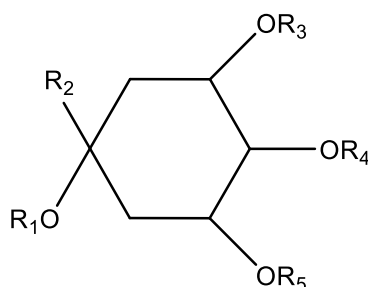


Figure 32 : Quatrième entité faisant partie de la structure du composé N_4 .

D'après rassemblement des informations et comparaison avec la littérature

Dix carbones quaternaires dont : Huit carbones oxygénés avec un hybridé sp^3 et sept hybridés sp^2 parmi lesquels trois groupements carbonyles, l'un à $\delta\text{C} = 174,18$ ppm attribuable à un acide carboxylique qu'est confirmé avec littérature et deux à $\delta\text{C} = 166,35$ ppm et le second à $\delta\text{C} = 165,08$ ppm attribuables à des fonctions esters conjuguées avec des systèmes éthyléniques

Le spectre de masse du composé N_4 (**Figure 33**) ; enregistré en mode électronébulisation, en mode d'ionisation positive, sur un electrospray-ion trap mass spectrometer (ESI-MS) [model LcQ-Deca. (Finnigan, thermoQuest] au niveau du laboratoire PCO (Université Libre de Bruxelles), montre un ion quasi moléculaire $[\text{M}+\text{Na}]^+$ à $m/z=539.40$ Da.

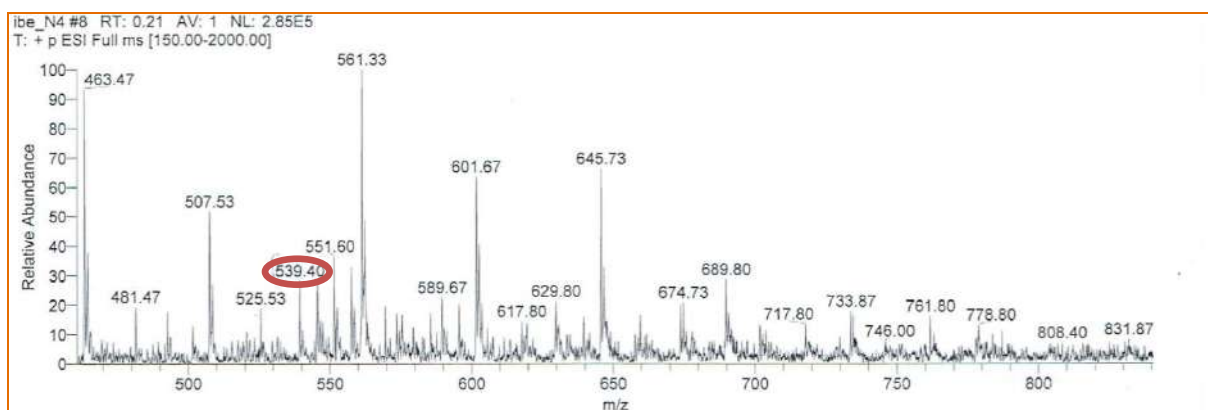


Figure 33: Spectre de masse d'ESI/MS en mode positive du composé purifié N_4

Chapitre V : Résultats et discussion

L'ensemble de ces constatations nous mène à la structure de N4 : **Acide 1-5 dicaffeoylquinine**

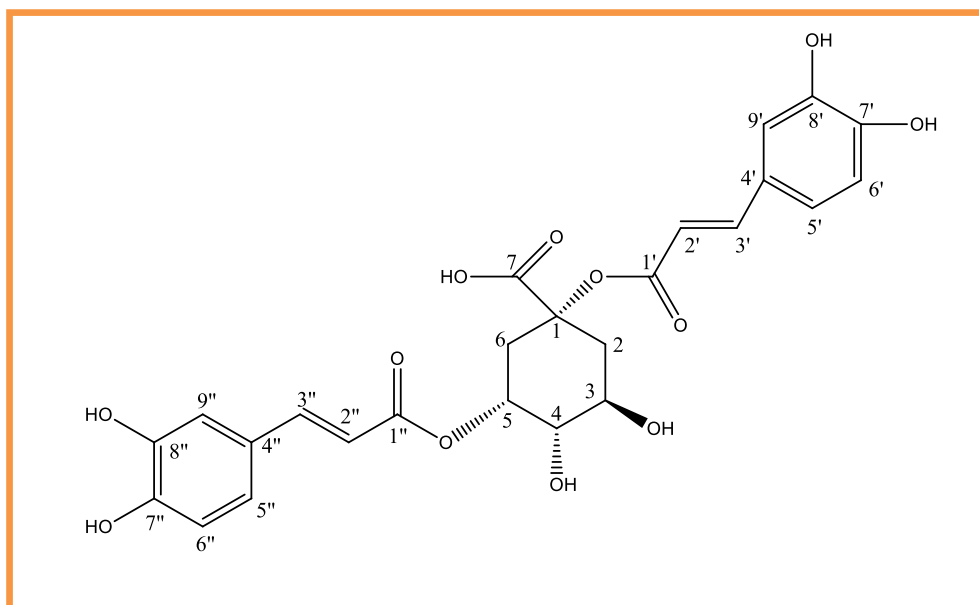


Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN 1H (600MHz) et 13C (75MHz) dans MeOD du composé N4 (δ en ppm et J en Hz)

position	δ (H) ppm	mult.	J (Hz) \pm 0.1	position	δ (ppm) \pm 0.1	Nc	dept
2'	7,57	d	15,83	1'	168,8	1	C
2''	7,56	d	15,97	1''	168,0	1	C
5'	7,05	d	1,96	7',7''	149,1	2	C
5''	7,05	d	2,15	8',8''	145,9	2	C
9'	6,95	dd	8.20, 2.12	3'	146,6	1	CH
9''	6,93	dd	8.19, 2.07	3''	145,8	1	CH
8'	6,77	d	8,17	4'	128,0	1	C
8''	6,76	d	8,17	4''	127,7	1	C
3''	6,33	d	15,90	9',9''	122,6	2	CH
3'	6,30	d	15,89	6'	116,7	1	CH
5	5,44	ddd	10.99 9.53, 4.56	2',2''	116,2	2	CH
4	4,21	q	3.61	6''	115,3	1	CH

Chapitre V : Résultats et discussion

3	3,71	dd	9.50 3.55	5',5''	114,8	2	CH
2	2,69	dm	~ 15.5	1	83,8	1	C
6	2,67	dm	~ 13.5	4	74,4	1	CH
2	2,25	dd	15.33 3.48	5	71,7	1	CH
6	1,98	dd	13.50 11.01	3	70,7	1	CH
				2	38,1	1	CH ₂
				6	36,4	1	CH ₂

V.5. Activité anti oxydante :

Après avoir mis en évidence le pouvoir antioxydant des extraits : butanolique, acétate d'éthyle et le composé purifié N4 d'*A.radiata*. Une évaluation de cette activité a été effectuée. Certainement, se référer à des standards est primordial dans cette étape.

Les résultats expérimentaux de l'activité anti radicalaire (CI_{50}) des étalons utilisés sont regroupés dans le **tableau 15**.

La valeur d' CI_{50} est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, comme elle exprime la quantité de l'antioxydant nécessaire pour diminuer 50% de la concentration du radical. Plus CI_{50} est faible plus l'activité anti-oxydante d'un composé est élevée. (**Villaño et al, 2007**).

Tableau 15: Résultats des CI_{50} des étalons

Témoins	acide ascorbique	Quercétine
CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$	16,681	17.490

Le produit, **Acide 1-5 dicaffeoylquinine** a présenté une très forte activité anti radicalaire dont la valeur de la concentration à 50% d'inhibition (CI_{50}) est de 0.19 $\mu\text{g/ml}$. Cette concentration très faible même de celles de l'acide ascorbique ($CI_{50} = 16.68 \mu\text{g/ml}$) et de la quercétine (17.49 $\mu\text{g/ml}$) illustre glorieusement, le potentiel antioxydant prometteur de ce produit.

Globalement, Les composés phénoliques possèdent une structure chimique idéale pour le piégeage des radicaux libres, parce qu'ils possèdent:

- ✓ Des groupes phénoliques dont les hydroxyles sont susceptibles de donner un atome d'hydrogène ou un électron au radical libre.
- ✓ Un système aromatique stabilisé par la résonance. (**Dai et al, 2010**).
- ✓ Il a été rapporté que les phénols totaux sont des donateurs efficaces d'atome d'hydrogène au radical DPPH en raison de leurs structures chimiques idéales. (**Eroletal, 2010**)

Chapitre V : Résultats et discussion

Certainement cela explique le pouvoir antioxydant puissant de l'acide 1-5 dicafeollyquinine, dont la structure (**figure 35**) renferme plusieurs sites hydroxy, deux cycles aromatiques et deux groupements ester, qui sont tous de bons piègeurs des radicaux libres.

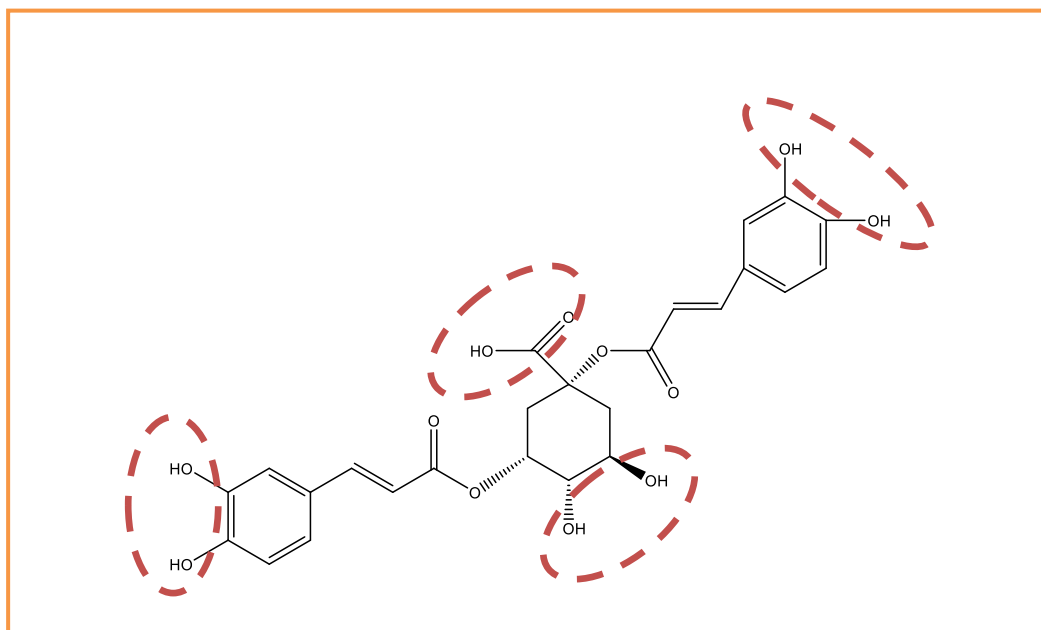


Figure 34: les caractéristiques structurales anti-radicalaires de l'acide 1-5 dicafeollyquinine

Par ailleurs, l'extrait butanolique brut a exposé une activité anti radicalaire relativement forte avec une $CI_{50} = 26.57 \mu\text{g/ml}$. Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle s'est montré moins efficace par rapport aux échantillons précédents, son $CI_{50} = 41.36 \mu\text{g/ml}$, et même en confrontation aux valeurs des témoins.

Souvent, des effets antagonistes entre les composants d'un échantillon le présentent moins actif et/ou complètement, inactif alors que parmi ses constituent des substances très puissantes.

En comparaison avec des CI_{50} d'antioxydants de référence, tels que la rutine ($34.67 \mu\text{g/ml}$), le BHA ($53.96 \mu\text{g/ml}$), on a noté que nos échantillons sont très efficaces en tant que mélanges, contenant sûrement des molécules antioxydantes autant puissantes que ces standards. Elles méritent d'être isolées, caractérisées et utilisées comme une source naturelle d'antioxydants.

D'ordre général, les CI_{50} calculées pour les extraits étudiés reflètent leurs teneurs en composé polyphénoliques et plus particulièrement en substances flavoniques. Aussi, les produits non-phénoliques certainement, présents dans les extraits préparés aux solvants organiques, peuvent être potentiellement antioxydants. Néanmoins, des effets antagonistes entre les

composants d'un échantillon le présentent parfois, moins actif et/ou complètement inactif alors que parmi ses constituent des substances très puissantes. (**Bouziane M., et al, 2015-2016**)

CHAPITRE VI :
ACTIVITE BIO-INSECTICIDE

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

VI.1. Elevage des insectes :

Le choix du modèle biologique a été fait par l'équipe de protection des végétaux de la station expérimentale de l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) de Touggourt. Le puceron *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Homoptera: Aphididae) a été choisi parmi d'autres espèces aphidiennes telles que *Sitobion avenae*, et *schizaphis graminum* à cause des dégâts considérables provoqués par cet homoptère sur la céréaliculture de la région du sud-est algérien.

Des céréales infestées par ce ravageur ont été prélevées durant la période de Mars à Mai 2017 et ramenées au laboratoire de protection des végétaux de la station expérimentale. Les échantillons obtenus ont été maintenus dans les conditions naturelles de celui-ci, sous une température moyenne d'environ 27 °C. Pour séparer les insectes (larves et adultes des pucerons) des végétaux, nous avons utilisé un tamis de 0,5mm de diamètre. Les individus de *R. padi*, récupérés à l'aide d'un pinceau, ont été placés séparément dans des boîtes de Pétri de 08 cm de diamètre. Le couvercle de ces dernières a été perforé pour permettre la respiration des insectes et empêcher la condensation de l'humidité. Le milieu nutritif des homoptères est constitué de talles de céréales fraîches. Ce sont les larves de *R. padi* du 2^{ème} stade (L₂) qui ont été utilisées dans notre étude.

VI.2. Effet larvicide :

Comme c'est déjà mentionné, les essais sur l'activité larvicide d'*A.radiata* ont été réalisés sur les deuxièmes stades larvaires (L₂) du puceron *R.padi*. Dix (10) individus ont été prélevés à l'aide d'un pinceau et introduits dans des boîtes de Pétri de 8 cm. Dix répétitions ont été effectuées pour chacun des extraits testés ainsi que pour le témoin qui n'est constitué que du solvant seulement. Les taux de mortalité dans les populations de *R.padi* ont été calculés après 24h, 48h et 72h de l'application du traitement. La CL₅₀ (La concentration létale) a été obtenue en transformant les concentrations en logarithmes décimaux et les pourcentages de la mortalité corrigée (calculée par la formule **d'Abbot, 1925**) en probits, en se servant de la table de **Finney (1952)**.

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

Les CL_{50} ont été déterminées à partir des droites de régression

$$\text{probits} = f(\log \text{ concentration}).$$

La mortalité observée chez les larves témoins et traitées a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité (\%)} = (\text{Nombre d'individus morts} / \text{nombre total d'individu}) \times 100$$

Les mortalités observées ont été corrigées à l'aide de la formule **d'Abbott (1925)** en tenant compte des mortalités naturelles observées dans les lots témoins.

$$Mc = (M2 - M1) / (1 - M1)$$

Avec :

M1 : pourcentage de mortalité dans le lot témoin.

M2 : pourcentage de mortalité dans le lot traité.

Mc : pourcentage de mortalité corrigée.

VI.3. Identification du puceron :

Les échantillons du puceron *R. padi* ont été déterminés par le Dr DAHLIZ Abderrahmane, entomologiste de la station de l'INRAA de Touggourt, laboratoire d'entomologie.

Selon Lascaux (2010), l'identification des pucerons se réalise par l'examen de certains caractères morphologique en particulier : les antennes, les tubercules frontaux, les tarse, la cauda, la couleur et la forme des cornicules, la pigmentation de l'abdomen et la nervation des ailes.

VI.4. Doses et traitements :

Les deux extraits n-BuOH et $CHCl_3$ d'*A. radiata* ont été testés contre *R. padi*, le choix des doses étaient effectuées à partir des tests préliminaires, réalisé pour la sélection du solvant et des concentrations. Les boîtes de pétri ont été perforées pour l'aération et pour conserver l'humidité de leur atmosphère, on introduit des compresses humides dedans. Des tale des céréales sont rajoutées (un milieu nutritif) à chaque fois la nutrition est nécessaire. Le

traitement a été réalisé par pulvérisation. La mortalité des individus a été contrôlée après 24h sous une loupe binoculaires.

VI.5. Analyses statistiques :

Les résultats obtenus des tests bio-insecticides des extraits végétaux sur les pucerons des céréales sont évalués statistiquement à l'aide du logiciel R (v.3.5.2). L'analyse commence par un test de normalité (test de Schapiro) puis se termine par une ANOVA au niveau de $p = 0,05$. En outre, un test post-hoc (test de la Tuquie) est effectué avec le logiciel Agricola 1.3.1.

VI.6. Résultats et discussion :

VI.6. 1. Teste de l'extrait chloroformique (CHCl₃) :

VI.6. 1.a. comparaison entre le traitement d'extrait CHCl₃ et le Témoin :

Les résultats des tests d'extrait CHCl₃ avec une concentration de 5 mg/ml, nous a donné des pourcentages de traitements évalués à 23,1 ($\pm 1,77$) %, 24 ($\pm 1,59$) % et 26 ($\pm 2,26$) % qui sont très proches au cours des durées de 24h, 48h et 72h respectivement. Le test student réalisé pour la comparaison entre les résultats du traitement et le témoin, a révélé $t(29) = 7.28$, $p = 5.069.10^{-8}$ des résultats significatifs (**Annexe**).

VI.6. 1.b. L'interaction entre le traitement avec l'extrait chloroformique et sa durée:

D'après le diagramme (**figure 35**), on constate que l'extrait CHCl₃ détermine le même groupe (a), au cours des durées d'exposition au traitement 24h, 48h et 72h, ce qui nous permet de conclure que la variation des durées du traitement n'a aucune influence sur la mortalité des insectes.

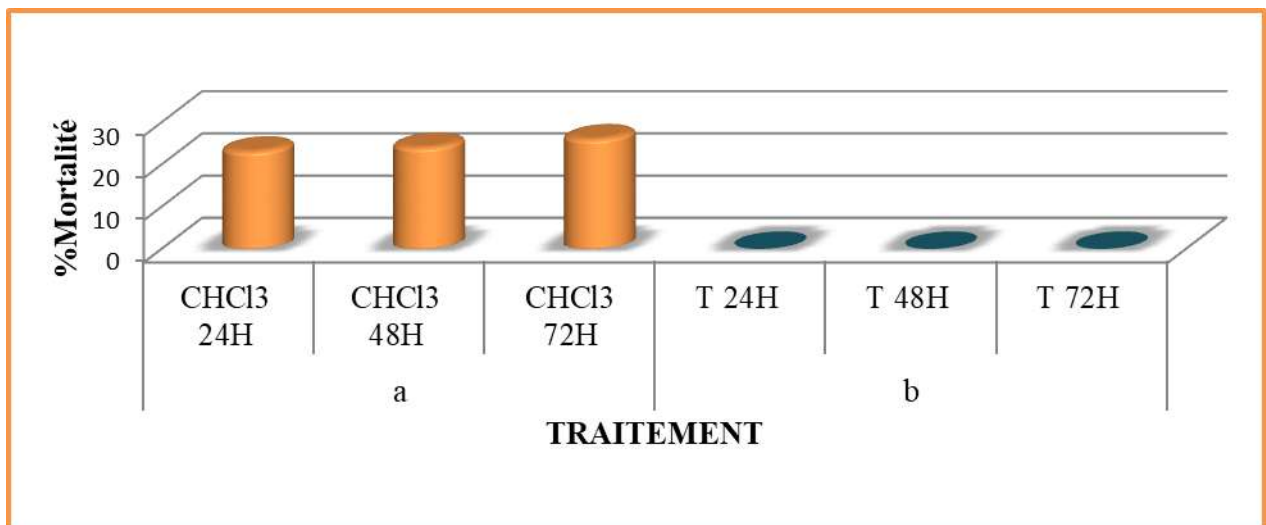


Figure 35 : Effet de la durée d'application sur la mortalité de *R. padi* traité avec l'extrait chloroformique d'*A. radiata*

VI.6. 2. Test d'extrait Butanolique (n-BuOH) :

VI.6.2.a. Effet de la concentration d'extrait BuOH :

Afin de vérifier l'effet de la concentration sur l'activité bio-insecticide sur les pucerons *R. padi*, l'extrait BuOH a été utilisé avec une variation de concentration, selon cet ordre 5 mg/ml, 2.5 mg/ml et enfin 1.25 mg/ml, durant ces périodes 24h, 48h et 72h de traitement.

L'histogramme (**figure 36**) expose une différence notable (27.43%) entre la première concentration 5 mg/ml et celle de 2.5mg/ml. En outre, on n'a remarqué que deux groupes de concentrations à savoir, a (5 mg/ml) et b renfermant le trois autres (2.5mg/ml, 1.25 mg/ml avec le témoin), on peut dire que ce teste montré que la concentration 5 mg/ml et plus fiable.

Les analyses statistiques confirment ces résultats par un ANOVA, $F(3)28.29$, $p=8.44*10^{-14}$ (***) très hautement significative.

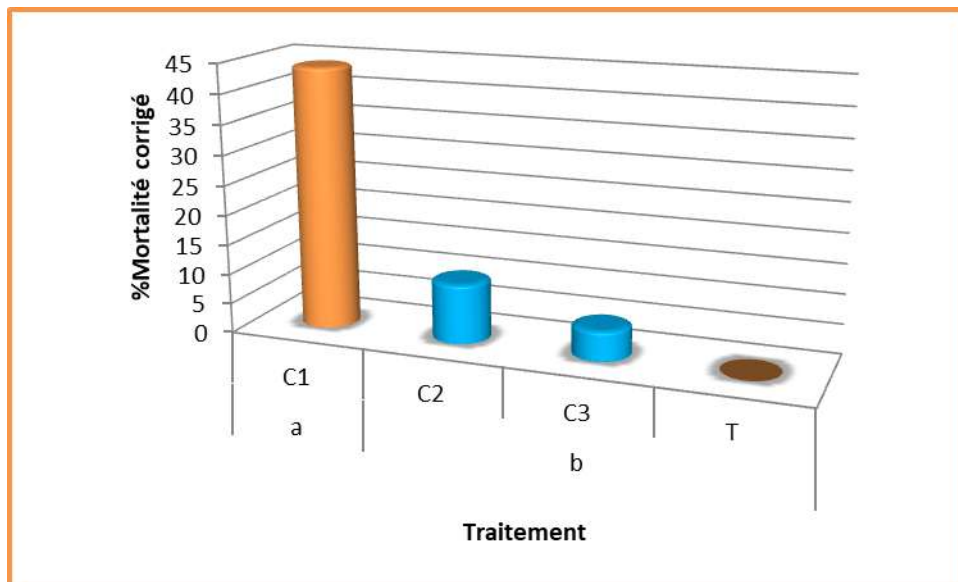


Figure 36 : Effet de la concentration sur la mortalité de *R. padi* traité avec l'extrait butanolique d'*A. radiata*.

VI.6.2.b. L'interaction entre le traitement avec l'extrait Butanolique et sa durée :

L'étude de l'activité bio-insecticide de l'extrait brut butanolique contre les larves de *R. padi* a montré les taux de mortalité corrigés suivant, 9,4 ($\pm 1,49$)%, 50,5 ($\pm 2,59$)% et 62,7 ($\pm 3,09$)% obtenus respectivement après 24h, 48h et 72h de l'application du traitement (**Figure 37**).

Ce diagramme montre aussi la présence de seulement deux groupes de concentrations, celui de (C1 de 72h et 48h) qui représente le groupe (a) et le deuxième qui regroupe le C1 de 24h avec le reste des concentrations et le témoin représente le groupe (b).

Cela explique qu'à partir d'une certaine concentration les polyphénols jouent le rôle d'un attracteur pour les insectes ensuite l'effet Knok-down. (**Regnault-Roger C., et al, 2004**)

Ces résultats sont confirmés par l'analyse statistique $F(11)10,66$, $p= 4.92 \cdot 10^{-13}$ (***), très hautement significative.

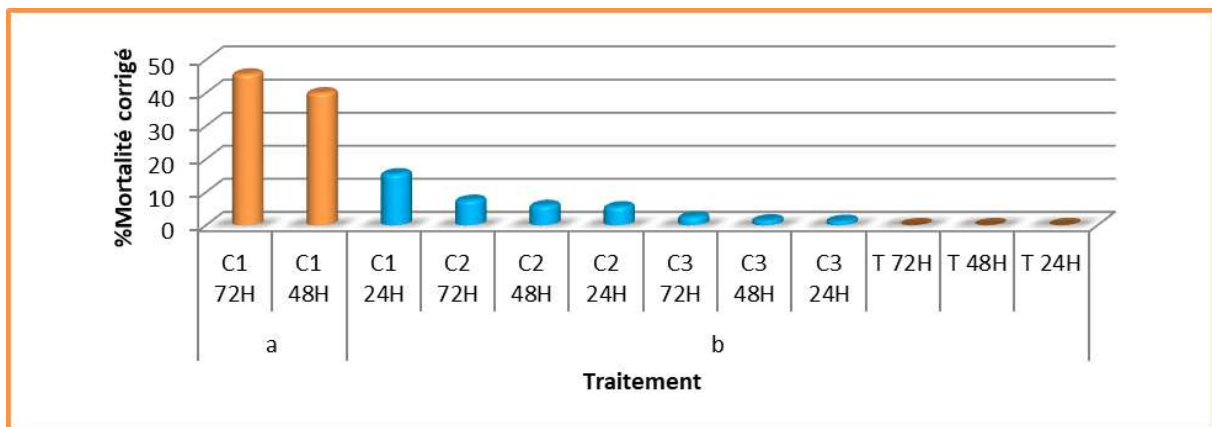


Figure 37 : Représentation graphique de l'effet d'interaction concentration (C1, C2, C3) et les durées d'application (24h, 48h, 72h) sur la mortalité de *R.padi* traité avec l'extrait butanolique d'*A.radiata*

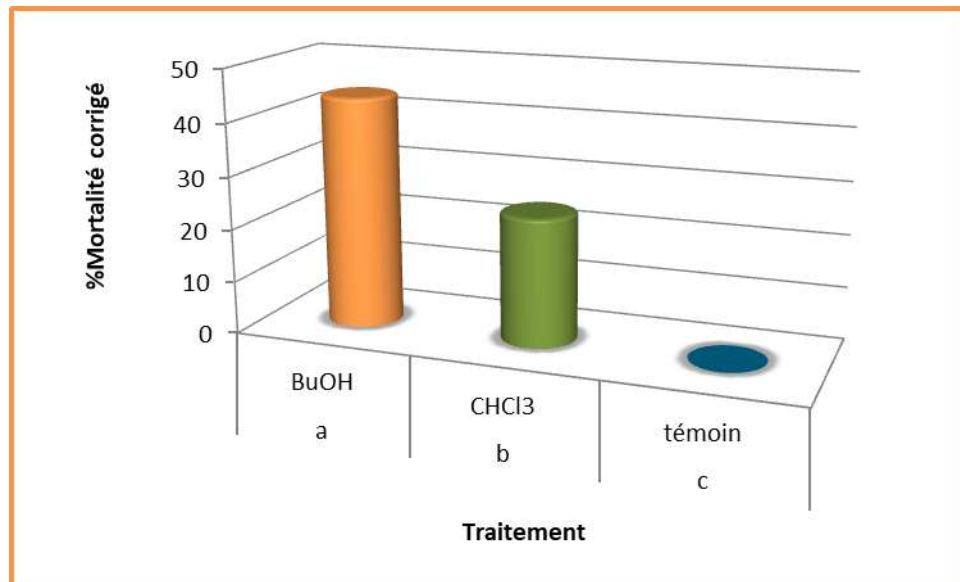
VI.6.3. Interaction entre les deux extraits (BuOH, CHCl₃) :

Dans ce test une étude comparative a été réalisée pour les deux extraits CHCl₃ et BuOH avec le témoin, on remarque que chaque extrait possède son propre groupe, l'extrait BuOH représente le groupe (a) qui précède la mortalité la plus élevée ensuite l'extrait chloroformique qui constitue le groupe (b) et le témoin indiqué par le groupe (C), le

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

diagramme sur **figure 38** montre la différence entre les groupes et que chaque extrait manifeste son effet différent sur les pucerons des céréales.

Ces résultats sont suivis d'une analyse statistique qui a fourni une très haute signification : $F(2)31.39, p= 5.46 \cdot 10^{-11}***$.



Les traitements avec la même lettre ne sont pas significativement différents.

Figure 38 : Taux de mortalité de *R. padi* traité avec les deux extraits butanolique et chloroformique.

VI.6.4. Interaction entre les extraits (BuOH et CHCl₃) et la durée d'application :

Les résultats de ce test permettent de conclure l'efficacité de l'extrait BuOH en tant que bio-insecticide, biodégradable, et son effet augmente au cours du temps, d'après le diagramme sur la **figure 39** montre qu'après 24h l'extrait BuOH a causé 9.4% de mortalité, alors qu'après 72h le taux de mortalité a augmenté jusqu'à 62.7%.

Il convient également de noter qu'à la fin de l'expérimentation, les individus de *R. padi* survivants présentaient différentes anomalies et handicaps sous l'effet des deux extraits d'*A. radiata* et une absence totale de mue chez les larves.

L'effet significatif de l'extrait butanolique d'*A. radiata*, enregistré dans cette étude, est probablement dû à sa richesse en composés phénoliques (**Regnault-Roger C., et al, 2004**) comparativement à celui du chloroforme qui exige une concentration plus élevés par rapport à celle de l'extrait BuOH.

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

Ces tests sont affermis par l'analyse statistique, $F(8)21.28$, $p= 2*10^{-16}$ *** très hautement significative.

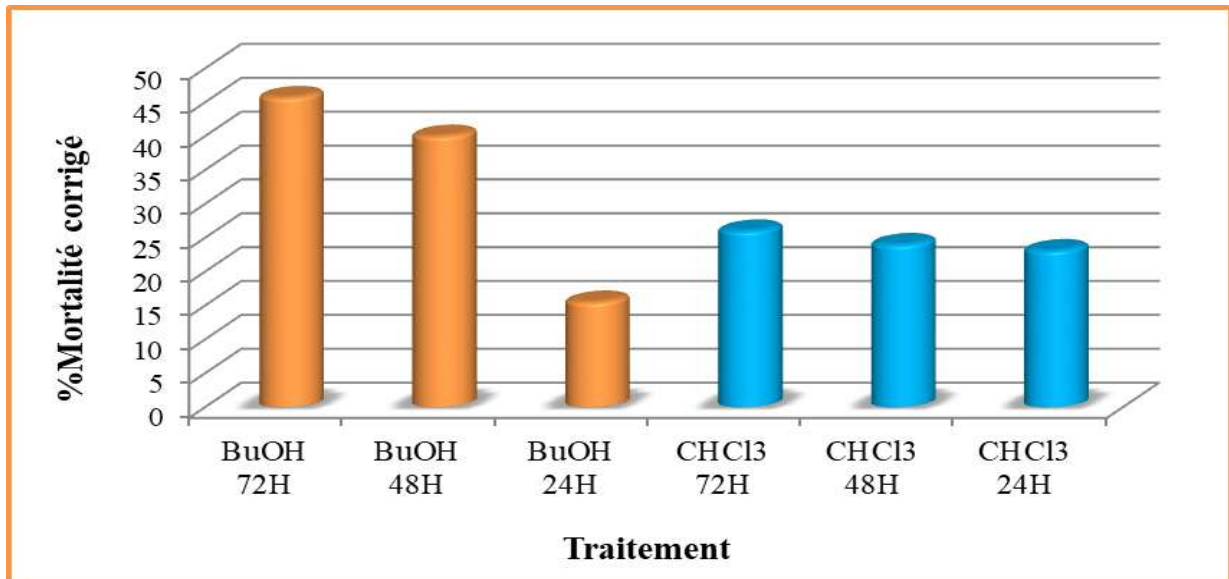


Figure 39: Evolution du taux de mortalité corrigé du *R. padi* en fonction des variations des périodes d'exposition (24, 48 et 72h) pour les deux extraits bruts.

En fait, cette constatation est confirmée par plusieurs autres auteurs (El Hassany, B., et al, 2004 ; Dendougui, H.; et al, 2006 ; Hamada, D. and S., Ladjel, 2015) qui notent que l'activité bio-insecticide de celui-ci pourrait être liée à sa teneur élevée en polyphénols, flavonoïdes, acides phénoliques et germacranolides.

L'effet biocide de cette *Asteraceae* a été noté par plusieurs auteurs dans le monde. (Bammou, H et al, 2015) a montré que l'effet antibiotique et antioxydant de l'extrait aqueux de cette plante a pu réduire d'environ 15% la propagation des bactéries multi-résistantes telles que *Staphylococcus aureus* Gram (+) et *Escherichia coli*. (Beddou.F, et al , 2014) a annoncé qu'*A.radiata* présente des activités anti-oxydante et antibactérienne dues aux mêmes composés que ceux enregistrés dans notre étude. Le même auteur et ses collaborateurs ont rapporté que les plus grandes quantités de ces molécules existent dans les fleurs.

VI.7. La concentration Létale (CL₅₀) d'extrait BuOH :

Concernant la concentration létale (CL₅₀) de l'extrait butanolique d'*A.radiata*, l'équation de régression a été établit pour calculer celle-ci après 24h, 48h et 72h du traitement, le **tableau 12** résume les données. L'utilisation de ce test, montrant la mortalité de 50% des individus de *R. padi*, a permis d'enregistrer ces valeurs de concentrations 23,07 mg/ml, 6,71 mg/ml et 5,07mg/ml après 24h, 48h et 72h respectivement.

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

L'examen de ces données révèle leur diminution durant le temps, montre l'efficacité réelle et élevée de l'extrait butanolique brut. Cela est certainement dû à la composition chimique des espèces botaniques utilisées mais également au solvant employé dans l'extraction qui ont permis d'extraire diverses molécules de différentes classes phyto-chimiques.

Tableau 16: Valeurs de la CL_{50} appliquées sur *R.padi* en fonction du temps

Périodes (h)	CL_{50} valeur (mg/ml)
24	23.07
48	6.71
72	5.7

Sur la lumière de l'équation de régression, on constate qu'il y a une proportionnalité entre la concentration et la mortalité. Ainsi on a noté une augmentation de 3.703% de la mortalité, en passant d'une concentration à une autre pour le traitement de 72h.

Les figures (40,41, 42) représentent les droites de régression

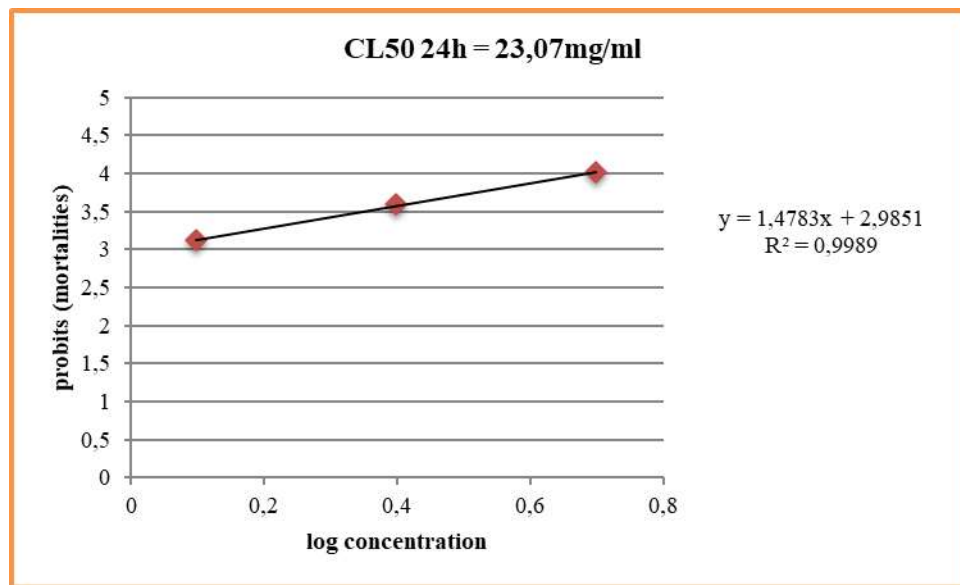


Figure 40 : Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de *R.padi* sous l'effet de l'extrait BuOH brut d'*Anvillea radiata* après 24h du traitement.

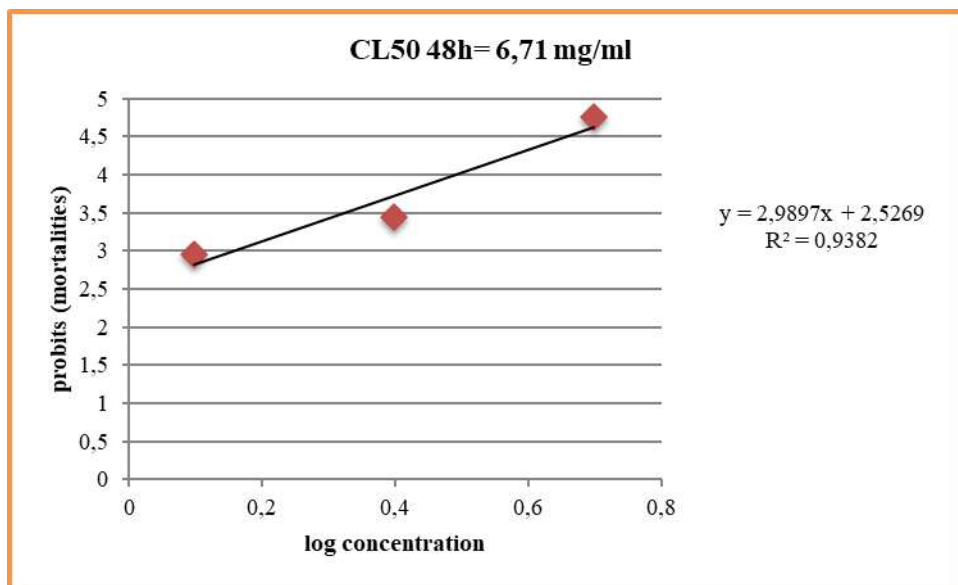


Figure 41 : Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de *Rhopalosiphum padi* sous l'effet de l'extrait BuOH brut d'*Anvillea radiata* après 48h du traitement

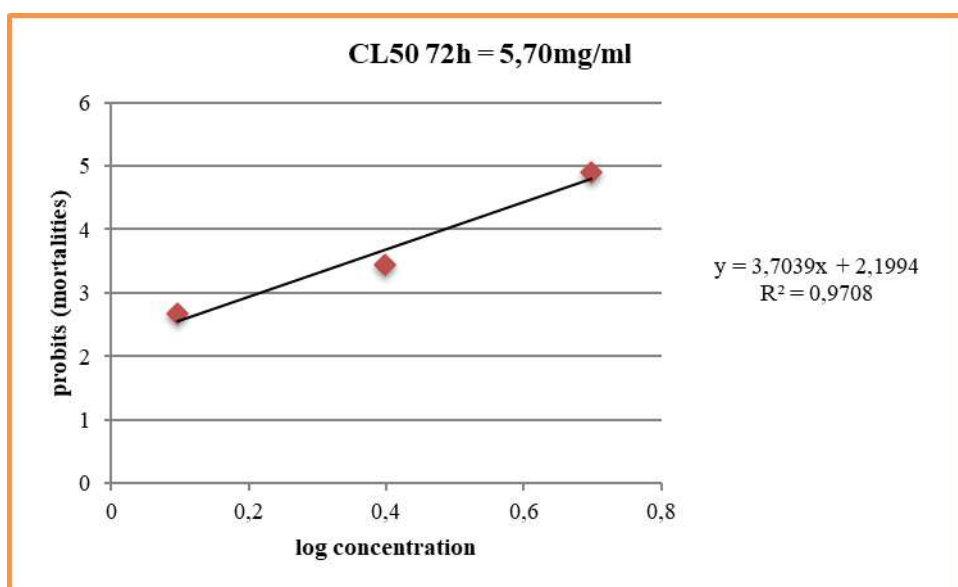


Figure 42: Droite de régression et doses nécessaires pour la mortalité de 50 % d'individus de *Rhopalosiphum padi* sous l'effet de l'extrait BuOH brut d'*Anvillea radiata* après 72h du traitement

Chapitre VI : Activité bio-insecticide

Les polyphénols attirent les insectes et les immobilisent à proximité d'autre insecticide à action rapide. L'effet attractif des polyphénols permet de masquer l'effet répulsif des substances insecticides.

En fait, l'utilisation d'extraits des plantes comme insecticide est connue depuis longtemps. A titre d'exemple, le pyrèthre, la nicotine, la roténone ont déjà été utilisés depuis longtemps comme agents de la lutte contre les insectes (**Crosby, 1966**).

Pareillement, les polyphénols ainsi que les alcaloïdes sont des métabolites toxiques utilisés comme insecticide dans la lutte contre les insectes (**Raymond et al., 2011**).

Les résultats trouvés par **Baba-Aissa et Badaoui, (2016)** montrent que les bio-tests réalisés avec l'extrait polyphénolique des feuilles de faux fenouil et la coriandre ont donné 100 % de mortalité chez les larves de *Galleria mellonella* dans un délai de 3 à 4 jours. L'activité larvicide des extraits de plantes médicinales aromatiques a aussi été confirmée dans les travaux de **Jang et al. (2002)**.

Conclusion

Conclusion

Dans ce travail, nous avons abordé deux aspects scientifiques sur la caractérisation de quelques métabolites secondaire. Le premier à caractère fondamental illustré par la partie analytique des différents extraits de plantes choisies sur la base de travaux antérieurs (*Euphorbia guyoniana* et *Anvillea radiata*). Le deuxième aspect s'est articulé autour de l'une des applications biochimiques, à savoir le caractère bio-insecticide de la plante *Anvillea radiata*.

Le criblage phytochimique des extraits bruts des deux plantes investies, a permis de mettre en évidence, la présence des 6 groupes de composés, appartenant à des familles potentiellement actives, les polyphénols, les terpénoïdes, les coumarines, les flavonoïdes, les tanins et les stérols ainsi que les alcaloïdes (pour *Euphorbia guyoniana*), traduisant ainsi la richesse de ces plantes en principes actifs.

Les teneurs en polyphénols enregistrées en équivalent d'acide gallique (en $\mu\text{g}/\text{mg}$ d'extrait), s'avèrent intéressantes, elles sont comprises entre 56.75 et 348.93 dans le cas des extraits de la plante *Anvillea radiata* (au BuOH, AcOET et CHCl_3) et pour ceux de la plante *Euphorbia guyoniana*, entre 91.45 et 109.30 (EtOH et CH_2Cl_2). Elle justifie ainsi leurs utilisations dans diverses indications médicales.

L'extrait butanolique d'*Anvillea radiata*, soumis à un fractionnement et des purification nous a permis d'identifier l'acide 1,5-dicaffeoylquinine par les techniques spectroscopiques (ESI/MS et RMN).

Les propriétés antioxydantes des deux extraits, butanolique et acétate d'éthyle ainsi que le produit purifié de la plante d'*Anvillea radiata*, ont été évaluée en utilisant le test au DPPH•. Le produit purifié (Acide 1,5-Dicaffeoylquinine a montré une activité plus importante ($\text{IC}_{50} = 0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$) que les deux extraits (BuOH : $\text{CI}_{50} = 26.57$ et AcOEt : $\text{CI}_{50} = 41.36 \mu\text{g}/\text{ml}$), ce qui reflète l'importance de ce composé dans l'activité de la plante en question.

La caractérisation d'une huile essentielle est une opération indispensable lorsque l'on souhaite la contrôler, la commercialiser, ou mettre en évidence son éventuelle spécificité. Nous avons ainsi, caractérisé les huiles essentielles des parties aériennes d'*Euphorbia guyoniana* par l'identification de 30 constituants de (97.98% de la composition chimique), principalement constituée de sesquiterpènes. Les composantes majoritaires sont : γ -bisabolène (29.82%), β -eudesmol (11,13%), n-hexadécane (9,71%),

Conclusion

pentadécane (5,63%), acétate de citronellol (3.85%) et nerolidol (E) (3.19%). On peut en déduire le chemotype de cette HE qui est γ -bisabolène.

Par ailleurs, l'analyse de l'huile essentielle d'*Anvillea radiata* nous a conduit à l'identification de 16 constituants représentant environ 98.32% de sa composition chimique. Les groupes prédominants sont les sesquiterpènes oxygénés 92 % et 4.7% des monoterpènes oxygénés.

La partie application de notre travail est consacrée à l'étude de l'effet bio-insecticide de l'une des plantes sur les agents pathogènes des cultures céréalières et maraichères, afin de mettre en évidence d'éventuelles biomolécules naturelles actives. Ces dernières pourront constituer une alternative aux produits phytosanitaires de synthèse (les pesticides) pour la gestion des productions agricoles et le développement durable. Les résultats des différents tests *in vitro* et *in situ* des extraits nous ont permis de rassembler un certain nombre de données. Les tests de mortalité effectués au laboratoire, nous ont permis de constater que l'activité bio-insecticide des extraits d'*Anvillea radiata* contre les larves *R.padi* avec une concentration de 5 mg/ml, a montré que le taux de mortalités les plus élevés étaient obtenus par l'extrait butanolique avec 62.7% \pm 3.09 après 72h d'application du traitement. En outre, les concentrations létales CL_{50} enregistrées sont : 23,07, 6,71 et 5,07mg/ml après 24h, 48h et 72h, respectivement. Ces résultats préliminaires sont très encourageants et méritent d'être suivis par d'autres essais, en utilisant les autres extraits et les huiles essentielles qui peuvent présenter un effet insecticide. Il faudrait élargir aussi les traitements sur d'autres variétés de pucerons et l'utilisation *in vivo*.

Nous terminons ce travail par émettre les remarques suivantes : Les bio-pesticides font l'objet d'un intérêt croissant de la part des exploitants, notamment dans le cadre de stratégies de lutte intégrée. La mise sur le marché des bio-pesticides est facilitée dans certaines régions comme les USA, alors que dans d'autres comme l'Europe de l'Ouest, les processus d'homologation sont longs et coûteux. Le développement futur des biopesticides est dépendant de nombreux facteurs, comme les politiques gouvernementales tant en matière de soutien à la recherche que de réglementation, les stratégies des grands industriels du secteur phytosanitaire et l'évolution des choix des consommateurs. Les processus d'homologation en Algérie ne sont pas réglementés, la prise en charge de cet aspect afin de permettre aux chercheurs de finaliser ce type de travail, est plus que recommandée.

Références

Références

Abbott W S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Econ. Entomol*, 18, 265-267.

Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th Edition.

Aguilera Carbo A. Augur C. Prado-Barragan L. A. Favela-Torres E. Aguilar C.N., 2008. Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 189-199.

Ahmad, M., Sayyed, A.H. et Saleem, M.A., 2008. Evidence for field evolved resistance to newer insecticides in *Spodoptera litura* (*Lepidoptera noctuidae*) from Pakistan. *Crop Prot.*, 27(10): 1367-1372.

Ahmed M. El-Waziry., 2007 - Nutritive Value Assessment of Ensiling or Mixing Acacia and Atriplex Using In Vitro Gas Production Technique. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6), 605-614.

Ahmed, Ahmed A. Gherraf, Nouredine; El-Bassuony, Ashraf A.; Rhouati, Salah; Gad, Mahmoud H.; Ohta, Shinji; Hirata, Toshifumi., 2006 - Guyonianin A and B, 2 polyester diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana. *From Natural Product Communications*, 1(4), 273-279.

Ain Raala. Helen Kaur. Anne Orav. Elmar Arak. Tiiu Kailas. and Mati Müürisepp., 2011- Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60(1), 55–63.

Al-yahya MA. Al-Meshal IA. Mossa JS. Al-Badr AA. Tariq M., 1990 - Saudi Plants: A Phytochemical and Biological Approach. *King Abdul Aziz City for Science and Technology (KACST)*.

Anonyme, 2002- EPPO Standards Good plant protection practice. Bull. OEPP/EPPO, 32 : PP367–369.

Anonyme, 2004- Inventaire myrmécologique de la réserve naturelle volontaire trésor. Rapport de mission 10 au 25 janvier 2004, PP13-15.

Références

Ari Tolonen , Topi Joutsamo, Sampo Mattila, Terttu Kämäräinen, Jorma Jalonen, 2002- Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. *Phytochem Anal*, 13(6):316-28.

Atmani D. Chaher N. Berboucha M. Ayouni K. Lounis H. Boudaoud H. Debache N. Atmani D., 2009 - Capacité antioxydante et teneur en phénol de certaines plantes médicinales algériennes. *Chimie alimentaire*, 12(2), 303-309.

Baba Aissa F., 1991 - Les plantes médicinales en Algérie. Ed. Bouchéne and Diwan, p.p. 5-10.

Balachowsky, A.S., Mesnil, L., 1936. Les insectes nuisibles aux plantes cultivées. Leurs moeurs. Leur destruction. Traité d'entomologie agricole concernant la France, la Corse, l'Afrique du Nord et les régions limitrophes. 1535-1539. .

Balasundram N. Sundram K. et Samman S., 2006 - Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.

Bammou, M., Sellam, K., El Rhaffari, L., Bouhlali, E., Daoudi, A., Ibijbijen, J. et Nassiri, L. (2015). Bioactivity of *Anvillea radiata* Coss. & Dur. collected from the southeast of Morocco. *European Scientific Journal* 11: 21.

Bachrouch, O., Ferjani, N., Haouel, S., & Jemâa, J. M. B. (2015). Major compounds and insecticidal activities of two Tunisian *Artemisia* essential oils toward two major coleopteran pests. *Industrial Crops and Products*, 65, 127–133.

Beddou F. Bekhechi C. Chabane Sari D. and Atik Bekkara F., 2014 - Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds from *Anvillea radiata* Coss et Dur. *International journal of pharmaceutical research and bioscience*, 3 (1), 172-187.

Belaiche P., 1979 - Traité de phytothérapie et d'aromathérapie, Tome I, L'aromathérapie, Ed. Maloine. Paris.

Bellakhdar J., 1997 - La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press

Benmeddour T. (2016). Etude de l'activité biologique de quelques espèces végétales dans la région des Aurès et au nord du Sahara algérien. Thèse de doctorat en science. Département de biologie et écologie végétale, faculté des sciences de la nature et de la vie, UFA de Sétif.

Bianco A. Chiacchio M.A. Grassi G. Iannazzo D. Piperno A et Romeo R., 2006 - Phenolics compounds of *Olea europaea* : Isolation of new tyrosol and hydroxytyrosol derivatives. *Food Chemistry*, 95, 562-565.

Références

- Boudiar T. Lakhal H. Khalfallah A. Kabouche A. Kabouche Z. Brouard I. Bermejo J. et Bruneau C., 2010** - A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*. *From Natural product communications*, 5(1), 35-7.
- Boukhris M.A. Destandau E. El Hakmaoui A. El Rhaffari L. et Elfakir H., 2016** - A dereplication strategy for the identification of new phenolic compounds from *Anvillea radiata* (Coss. & Durieu). *Claire From Comptes Rendus Chimie*, 19(9), 1124-1132.
- Bouziane M., Hadj mahammed M., AUDRAN G., 2015**- Extraction et analyse de la composition chimique de plantes sahariennes d'intérêt médicinal . Université Kasdi Merbah Ouargl
- Bouziane Mebarka, Hadj-Mahammed M., Dehak K., Oussameur N., Ksikis C., Benzaoui F., Houari A., 2016** - Antioxidant and antibacterial properties of *Brocchia cinerea* (Vis.) and *Matricaria pubescens* (Desf.) ethyl acetate extracts and their fractions. *Der Pharma Chemica* 8 (17), 232-239
- Bouziani, M., 2007**. L'usage immodéré des pesticides. De graves conséquences sanitaires. Le guide de médecine et de la santé. Santémaghreb. [consulté le, 11/12/2017]. <http://www.santetropicale.com/santemag/algerie/poivue51.htm>.
- Brand-Williams W. Cuvelier M.E. and Berset C., 1995** - Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss technol*, 28, 25-30.
- Bruneton J., 1999** - Phytochimie Plantes médicinales Pharmacognosie. 3^{ème} édition. Paris, France, 125-165p.
- Bruneton J., 2008** - Acides phénols In: Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales. *Ed Tec& Doc*. Lavoisier, Paris, 198-260p.
- Bruyne T. Pieters L. Deelstra H. et Vlietink A., 1999** - Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematic and Ecology*. 27: 445-459.
- Calatayud P. A. et Le Ru B., 2013** - Les pièces buccales et l'alimentation des insectes. *In Interactions insectes-plantes*, 107 p.
- Capisano, 1997**- Orges de brasserie, les préférées des malteurs - *Cultivar*, no 392- PP27-28.
- Chavan M.J., Wakte P.S., Shinde D.B. (2010)**. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* 17:149-151

Références

- Chehma A., 2005** -Etude floristique et nutritive des parcours camelins du sahara septentrional algerien cas des regions d'Ouargla et Ghardaia.. Thèse de doctorat. Univ-Badji Mokhtar Annaba. 178 p.
- Chira K. Such J. Saucier C. Teissèdre L., 2008** - Les polyphénols du raisin. Ed Springer, (6)75-82.
- Clifford M.N., 1999** - Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea. Washington, DC, CRC Press, Boca Raton Florida, 41 (5), 393-397.
- Cowan M.M. , 1999** - Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 564-582.
- Crosby DG. ; 1966.** Natural pest control agents. In Gould, R.F. *Natural Pest Control Agents*. Adv. Chem. Ser. American Chem. Society: Washington
- Crozier A., 2003** - Classification and biosynthesis of secondary plant products: an overview. In *Plants Diet and Health*, Ed. Goldberg, 27- 48p.
- D'Archivio M. Filesi C. Di Benedetto R. Gargiulo R. Giovannini C. et Masella R., 2007** - Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali de l'Istituto Superiore di Sanità*. 43(4), 348-361.
- David JP. Rey D. Pautou MP. Meyran JC. 2000** - Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. *J. Invertebr. Patho.* 75; 9-18.
- Dai J. et Mumper R. J., 2010** - Plant Phenolics Extraction Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*, 15 (10), 7313-52.
- De S. Dey Y.N. and Ghosh A.K., 2010** - Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorpha phalluspaeoniifolius* (araceae). *Internatinal Journal Pharm & Biomedical Research*, 1(5), 150-157.
- Dedryver C. A. Le Ralec A. & Fabre F., 2010** - The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus Biologies*, 333(6–7), 539–553.

Références

- Dedryver L., 1982-** Biologie des pucerons des céréales dans l'Ouest de la France. IV. Etude de l'hivernation de populations anholocycliques de *Rhopalosiphum padi* L., *Metopolophium dirhodum* Wlk. et *Sitobion avenae* F. sur repousses de céréales, dans trois stations de Bretagne et du Bassin Parisien. *Acta oïReceolao Oecol. Applic.* 3 (4), 321p.
- Delimit A., Taibi F., Bouchelaghem S., Boumendjel M., Hennouni siakhène N., Chefrour A., 2017.** Chemical composition and insecticidal activity of essential oils of *Artemisia herba alba* (Asteraceae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera:pyralidae). *International journal of biosciences*, (10)2,130-137.
- Dendougui H. Jay M. Benayache F. Benayache S., 2006 -** Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur.(Asteraceae). *Biochem Systematics and Ecol*, 34, 718-720.
- Djellouli M. Moussaoui M. Benmehdi H. Ziane L. et Belabbes A., 2013 -** Ethnopharmacological study and Phytochemical Screening of Three Plants (Asterasea Family) From the Region of South West Algeria. *Asian J Nat & Appl Sci*, 2, 159-165.
- Djeridane A. yousfi M. Nadjemi B. Boutassouna D. Stoker P. Vidal N., 2006 -** Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containinig phenolic compounds. *Food chemistry*, 97(4), 654-660.
- Doumandji B., Doumandji S., Benzara A. et Guecioueur L., 1994-** Comparaison écologique entre plusieurs peuplements d'orthoptères de région de Lakhdaria, (Algerie). I.N.A. El-Harrach, Alger, PP1075-1081.
- Druzyńska B. Stepniewska A. et Wolosiak R., 2007 -** The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 6, 27-36.
- EDQM., 2017 -** Huiles essentielles Aetherolea. Pharmacopée Européenne, 9^{ème} éd.
- El-bassuony. ashraf a ., (2007)-** Antibacterial Activity of New Polyester Diterpenes from *Euphorbia guyoniana* . *Asian Journal of Chemistry* Vol. 19, No. 6 4553-4562.
- El Hanbali F. El Hakmaoui A. Mellouki F. El Rhaffari L. and Akssira M., 2007 -** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oil of *Anvillea radiata* Coss.& Dur. *Natural Product Communications* 2(5), 595-597.

Références

El Hassani B. El Hanbali F. Akssira M. Mellouki F. Haidour A. Barrero A.F., 2004 - Germacranolides from *Anvillea radiata*. *Fitoterapia*, 75, 573.

El Zakhem M., 2003 - Effets antifongiques des huiles essentielles extraites de l'*Origanum syriacum* L et de *Salvia banotica* Boiss et Gaill contre les *Candida albicans holmii* et *famata*. Mémoire de Diplôme d'Études Approfondies (DEA) en Agroalimentaire et Assurance-Qualité. Institut National Agronomique Paris-Grignon (INA-PG).

El-waziry, A.M. , 2007- Nutritive Value Assessment of Ensiling or Mixing Acacia and Atriplex Using In Vitro Gas Production Technique. *Res. J. Agri. Biolog. Sci.*, v.3, p.605-614.

Erol N. T. Sari F. et Velioglu Y. S., 2010 – Polyphenols alkaloids and antioxidant activity of different grades turkish black tea. *GIDA* 35 (3), 161-168.

Eriksson, H. et Wikteliuss, S., 2011. Impact of chlorpyrifos used for desert locust control on non target organisms in the vicinity of mangrove, an ecologically sensitive area. *Int J Pest Manag.*, 57(1):23-34.

Evans W.C. and G.E. Trease ., 2002 - *Carbohydrates in Trease and Evans pharmacognosy* (China, W.B. Saunders).

Fadli M., pages.J-M, Mezrioui. N.E., Abbad A., Hassani L., (2016). *Artemisia herba-alba* asso and *cymbopogon citratus* (DC)strapf essential oils and their capability to restore antibiotics efficacy. *Ind.crops prod*, 89.399-404

Finney D. J.. 1952 -Cambridge University Press, New York., 22.5 × 14 cm. xiv + 318 pp. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific Ed.)*, 41(11), 627. Probit Analysis. 2nd ed

François-Prévoist Bi Koffi KOUAME, 2012- Valorisation de quatre plantes médicinales ivoiriennes : étude phytochimique, THÈSE DE DOCTORAT.

Ghedira K., 2005 - Les flavonoïdes structures propriétés biologiques rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 04, 162-169.

Giordanengo P. Febvay G. & Yvan R., 2007 - Comment les pucerons manipulent les plantes. *Biofuture* 279 (7), 35–38.

Goren A.C., Piozzi F., Akcicek E., Kilic T., Carikci S., Mozioglu E., Setzer W.N. (2011). Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochemistry Letters* 4:448-453

Références

- Granger R. et Passet J., 1973** - *Thymus vulgaris* spontane de France: Courses chimiques et chimiotaxonomie. *Phytochimie* 12(7), 1683-1691.
- Guignard J.L., 2000** - Les composés aromatiques In : Biochimie végétal. Ed Dunod. 161-217 p.
- Haba H. Benkhaled M. Marcourt L. et Long C., 2013** - Minor ent abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *From Natural product communications*, 8(11), 1519-22.
- Haba, H., Lavaud, C., Harkat, H., Alabdul Magid, A., Marcourt, L., & Benkhaled, M. (2007).** *Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana. Phytochemistry*, 68(9), 1255–1260.
- Han X.H. Hong S.S. Hwang J.S. Lee M.K. Hwang B.Y. et Ro J.S., 2007** - Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Archives Pharmacol Research*, 30; 07-13.
- Hayouni EA. Abedrabba M. Bouix M. Hamdi M., 2007** - Les effets des solvants et de la méthode d'extraction sur le contenu phénolique et les activités biologiques *in vitro* des extraits de fruits tunisiens de *Quercus coccifera* L et *Juniperus phoenicea* L. *Food Chem*, 105, 1126-1134.
- He Z. Xia W. et Chen J., 2008** - Isolation and structure elucidation of phénolics compounds in Chinese olive (*Cnarium album* L.) fruit. *European Food Research and Technology*, 226, 1191-1196.
- Heiling, S., Schuman, M. C. et al. (2010).** Jasmonate and ppsystemin regulate key malonylation steps in the biosynthesis of 17-hydroxygeranyl linalool diterpene glycosides, an abundant and effective direct defense against herbivores in *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell*. 22, 273-292.
- Hegazy M.El. Mohamed F. Abou El-Hamd H. Aoki Nobuwa. Ikeuchi Toshitaka. Ohta Emi. Ohta Shinji., 2010** - Bioactive jatrophone diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *From Phytochemistry*, 71(2-3), 249-53.
- Jang YS. Baek BR. Yang YC. Kim MK. Lee HS., 2002-** Larvicidal activity of leguminous seeds and grains against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. *J. Am. Mosq. Control. Assoc* ; 18 ; 3 ; 210-213.
- Keeling, C. I. and Bohlmann, J. (2006).** Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New Phytol*. 170, 657-675.
- Khandelwal K.R., 1995** - *Practical Pharmacognosy: Techniques and experiments*, India, Nirali Prakashan

Références

- Kokate C.K. Purohit A.P. and Gokhale S.B., 2009** - Pharmacognosy. Nirali Prakashan, 616-617.
- Kouamé-Bi K.F.P., 2012-** Valorisation de quatre plantes médicinales Ivoiriennes : étude phytochimique. Thèse de doctorat, chimie organique, Université de Nantes et de l'Université de Cocody-Abidjan. 180 p.
- Kristoff, G., Guerrero, N.R.V. et Cochon, A.C., 2010.** Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus* by the carbamate pesticide carbaryl. *Aquat. Toxicol.*, 96: 115-123.
- Ksouri R. Megdiche W. Falleh H. Trabelsi N. Boulaaba M. Smaoui A. Abdelly C., 2008.** Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendu de Biologie*, 331, 865–873
- Lattanzio V. Di Venere D. Linsalata V. Bertolini P. Ippolito A. et Salerno M., 2001** - Low Temperature Metabolism of Apple Phenolics and Quiescence of *Phlyctaena vagabunda*. *Jornal Agric Food Chem*, 49(12), 5817- 5821.
- Linden et Lorient D., 1994** - Pigments et arômes In Biochimie agro-industrielle valorisation alimentaire de la production agricole. Ed Masson, MALOINE S.A. Paris, 338-340 p.
- Mabry TJ. Markham KR. et Thomass MB., 1970** - L'identification systématique des flavonoïdes. *Springer, Heidelberg*, 41–61
- Mahrour A. Lacroix M. Nketsa-Tabiri J. Calderon N. Gagnon M., 1998** - Antimicrobial properties of natural substances in irradiated fresh poultry. *Radiat Phy Chem*, 52, 81–84
- Manach C. Scalbert A. Morand C. Remesy C. et Jimenez L., 2004** - Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Mansour, M. (2009)** Employers' Attitudes and Concerns about the Employment of Disabled People. *International Review of Business Research Papers*, 5, 209-218.
- Maarse, H. and Belz, R., 1982.** Isolation, Separation, and Identification of Volatile Compounds in Aroma Research, *Reidel, Dordrecht*.
- Marouf A. et Tremblin G., 2009** – Abrégé de biochimie appliquée. *EDP.Sciences* 483p.
- Martin S. et Andriantsitohaina R., 2002** - Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endo thelium. *Annales de Cardiologie et d'Angiologie*, 51, 304-315.

Références

- Maiza,k.,Brac de la perrière, R.A Hammiche,V. , (1993)** - pharmacopée traditionnelle saharienne :sahara septentrional In : Schroder , E Balansard .Médicaments et aliments : Lapproche ethnopharmacologique . Actes du 2éme colloque Européen d' Ethnopharmacologie et de la 11émé conférence internationale d'Ethnomédecine .,p.169-171.
- McDonald S. Prenzler P. Antolovich M. Robards K., 2001** - Contenu phénolique et activité antioxydante des extraits d'olive. *Chimie alimentaire*, 73(1), 73-84.
- Mebarki L. Kaid H.M. Benlarbi L. Rahmani A. and Sarhani A., 2013** - Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of *Anvillea radiata*. *World App Sc J*, 26, 165-171.
- Merhi, M., 2008.** Etude de l'impact de l'exposition à es mélanges de pesticides à faibles dose : caractérisation des effets sur la lignée cellulaire humaines et sur le système hématopoïtique murin. Doctorat de l'Université de Toulouse. France. 249p.
- Mompon B. Lemaire B. Mengal P. et Surbel D., 1996** - Extraction des polyphénols : du laboratoire à la production industrielle. IN « Polyphénols 96, Ed INRA. 31-35p.
- Mortensen A. Kulling SE. Schwartz H., 2009** – Analytical and compositional aspects of isoflavones in food and their biological effects. *Mol Nutr Food Res*, 53, 266-309.
- Moumou M. El Bouakher A. Allouchi H. El Hakmaoui A. Benharref A. Véronique M. Gérald Guillaumet. Akssira M., 2014** - Synthesis and biological evaluation of 9 α - and 9 β -hydroxy amino parthenolides as novel anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 24, 14014–4018.
- Moumou M. El Hakmaoui A. Benharref A. Akssira M., 2012** - Access to new sesquiterpenoids by catalytic acid rearrangement of 9 α -hydroxyl parthenolide. *Tetrahedron Letters*, 53, 3000–3003
- Moser, S.E. et Obrycki., 2009.** Non-target effects of neonicotinoid seed treatments : mortality of cocci-nellid larvae related to zoophytophagy. *Biol. Control.*, 51: 487-492
- O'Connell J.E. Fox P.F., 2001** - Signification and applications of phénolic compounds in the production and quality of milk dairy products. *International Dairy Journal*, 11(3), 103-120.
- Omolo M.O., Okinyo D., Ndiege I.O., Lwande W.L., Hassanali A. (2004).** Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry* 65:2797-2802
- Oueld El Hadj M.D. Hadj-Mahammed M. et Zabeiro H., 2003** - Places des Plantes Spontanées Dans la Médecine Traditionnelle de la Région d'Ouargla. *Courrier du Savoir*, 03, 47-51.

Références

Oussalah M., Caillet S., Saucier L. & Lacroix M. (2006). Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69 (5), 1046-1055.

Ozenda P., 1977 - Flore du Sahara septentrional et central. 2nd Edn. Paris, 434 p.

Paris M. Hurabeillen M., 1981 - Abrégé de Matière médicale, pharmacognosie. Ed Masson, 210-215.

Piotte, 1999- Insecticide resistance in the currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri* (Hemiptera : Aphididae) in the UK. *Bull. Entomol. Res.*, PP89, 21-23.

Quan V Vuong. Hirun S. Paul D. Roach. Michael C. Bowyer. Phoebe A. Phillips and Christopher J. Scarlett., 2013 - Effect of extraction condition on total phenolic compound and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts. *journal of herbal medicine*. 3, 104–111.

Quezel P. et Santa S., 1963 - Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S. Paris, 949 p.

Raal, A., Kaur, H., Orav, A., Arak, E., Kailas, T., & Müürisepp, M. (2011). *Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 60(1), 55.

Rahbani, J., 2015. Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides à base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolée du sol libanais. Doctorat de l'université de Toulouse. France. 234p.

Raymond, C. M., Brown, G., & Robinson, G. M. (2011). *The influence of place attachment, and moral and normative concerns on the conservation of native vegetation: A test of two behavioural models. Journal of Environmental Psychology*, 31(4), 323–335.

Regnault-Roger C. Ribodeau M. Hamraoui A. Bareau I. Blanchard P. Gil M.I. and Tomas Barberan F., 2004 - Disturbance of *Acanthoscelides obtectus* behavior by polyphenolic compounds identified in insecticidal (*Labiatae* botanicals). *Journal of stored product research*, 40, 395-408.

Remaudière G., 1953 – Nutrition et variation du cycle des Aphidoidea. *Revue de pathologie végétale et d'entomologie –Agricole de France*, 32(3) :190-207.

Références

- RHAZI N. Oumam M. Hannache H. Sesbou A. Charrier B. Pizzi A. et Charrier El Bouhtoury F., 2015** - Comparison of the impact of different extraction methods on polyphenols yields and tannins extracted from Moroccan *Acacia mollissima* barks. *Industrial Crops and Products*, 70, 245–252.
- Ribéreau-Gayon P., 1968** - Les composés phénoliques des végétaux. Edition Dunod Paris, 173-201p.
- Rosua JL. Garcia-Granados A., 1987** - L'analyse des huiles essentielles espèces du genre *Rosmarinus L* et leur caractéristique taxinomique intéressée. *Plant Med Phytothér* 21 (2), 138–143.
- Saharaoui L. et Gourreau J.M., 1998-** Les coccinelles d'Algérie : Inventaire préliminaire et régime alimentaire (*Coleoptera: Coccinellidae*). *Bull. Soc. Entomo. France*, 3 (103) : PP213-224.
- Shah, M.D. et Iqbal, M., 2010.** Diazinon-induced oxidative stress and renal dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol.* 48(12): 3345-53.
- Smara, Ouanissa; Julia, Audrey; Moral-Salmi, Cecile; Vigor, Claire; Vercauteren, Joseph; Legseir, Belgacem; (2014A)** - Flavonoids from *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. *Journal of Life Sciences (New York, NY, United States)*, 8(6), 544-551.
- Smara, Ouanissa; Vigor, Claire; Julia, Audrey; Moral-salmi, Cecile; Vercauteren, Joseph; Legseir, Belgacem(2014B)** - The Coumarin from *Euphorbia guyoniana* Boissier and Reuter. *PhytoChem & BioSub Journal* 8(1), 8-11.
- Saoud D.H., Jelassi A., Hlila M.B., Goudjil M.B., Ladjel S., H.Ben Jannet., 2018** - Biological activities of extracts and metabolites isolated from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae). *South African Journal of Botany*, 121 (2019) 386–393.
- Sarni-Manchado P. et Cheynier V., 2006** - Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Tec et Doc Lavoisier, 02-11 p.
- Sefidkon F. Sadeghzadeh L. Teymouri M. Asgari F. SHAHLA A., 2007** - Antimicrobial effects of the essential oils of two *satureja* species (s. *Khuzistanica jamzad* and s. *Bachtiarica bunge*) in two harvesting time. *Iranian journal of medicinal and aromatic plants*, vol 23 , n 2 (36), 174-182.
- Singleton V.L. Orthofer R. Lamuela-Raventós R.M., 1999** - [14] Analyse des phénols totaux et autres substrats d'oxydation et antioxydants au moyen du réactif folin-ciocalteu. *Méthodes en enzymologie*, 299 , 152-178.

Références

- Skerget M. Kotnik P. Hadolin B. Hras A.R. Simonic M. et Knez Z., 2005** - Phenols, proanthocyanidines, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89,191-198.
- Stevens, M.M., Burdett, A.S., Mudford, E.M., Helliwell, S. et Doran, G., 2011.** The acute toxicity of fipronil to two non-target invertebrates associated with mosquito breeding sites in Australia. *Acta Trop.*, 117(2):125-130.
- Tawaha K. Alali F.Q. Gharaibeh M. Mohammad M. El-Elimat T., 2007** - Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food chemistry*, 104(4), 1372-1378.
- Thakore, Y., 2006.** The biopesticide market for global agriculture use. *Ind. Biotechnol.*, 2: 194-208.
- Vesna Tumbas Šaponjac. Jasna Canadanović-Brunet. Gordana Četković. Mirjana Jakišić. Sonja Djilas. Jelena Vulić and Sladana Stajčić., 2016** - Encapsulation of Beetroot Pomace Extract RSM Optimization Storage and Gastrointestinal Stability. *from Molecules*, 21, 584.
- Villaño D. Fernández-Pachón M. S. Moyá M. L. Troncoso A. M. et GarcíaParrilla M. C., 2007.** Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, 230–235.
- Wagner H. et Blatt S., 2001** - Plant Drugs Analysis a Thin Layer Chromatography. 2^{ème} éd, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York.
- WU H., 2007** - Isolation and characterization of natural products from ginger and *Allium Ursinum*. Thèse de doctorat: Université de New Jersey, p.28.
- Kováts E. (1958)**, *Helv. Chim. Acta*, 41, 1915
- Evans M.B. et. Haken J.K, (1989).** *Chromatogr.*, 472, 93
- Tarjan G., Nyiredy S., Győr M., Lombosi E.R., Lombosi T.S., Budahegyi M.V., Meszaros S.T. et Takács, J.M. (1982)** *J.Chromatogr.*, 472, 1

Certains aspects de ces travaux de recherche ont été partiellement publiés ou présentés lors de congrès internationaux sous forme de communications orales ou de posters.

Article scientifique :

BENYAHIA Ibtissam, HADJ-MAHAMMED Mahfoud, BOUZIANE Mebarka, DEHLIZ Abderrahmène, LAKHDARI Wassima. Bio-insecticidal effect of polyphenol extracts of *Anvillea radiata* against cereal aphid *Rhopalosiphum padi*. QJAS Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences ISSN: 2618-1479 Vol. 10, No.1 ,(2020), PP 264-270.

Communication oral:

BENYAHIA ibtissam, international Eurasian conference on biotechnology and biochemistry (biotechbiochem 2020) 16-18 December 2020, Ankara, turkey.

Communication poster:

BENYAHIA Ibtissam, hadj-Mahammed Mahfoud, Bouziane Mebarka, Third international symposium Medicinal plants and Materials (MPM-2020), February 25-27,2020, Tebessa (Algeria),

BENYAHIA ibtissam, Hadj-Mahmmed Mahfoud, Bouziane Mebarka, Lakhdari Wassima et Dahliz abderahman, Premier symposium maghrébin sur la protection intégrée des plantes (SYMPIP-2017), 30 octobre-01 novombtre 2017, Sousse (Tunisie).

ANNEXE

ANNEXE

Annexe 01 :



Manipulation d'élevage d'insectes au niveau du laboratoire Zoologie
INRAA-Touggourt.

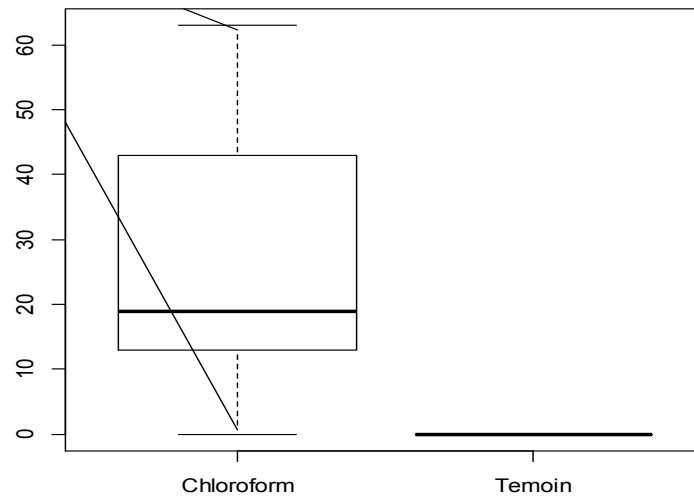


RMN au niveau d'Université Libre de Bruxelles

ANNEXE

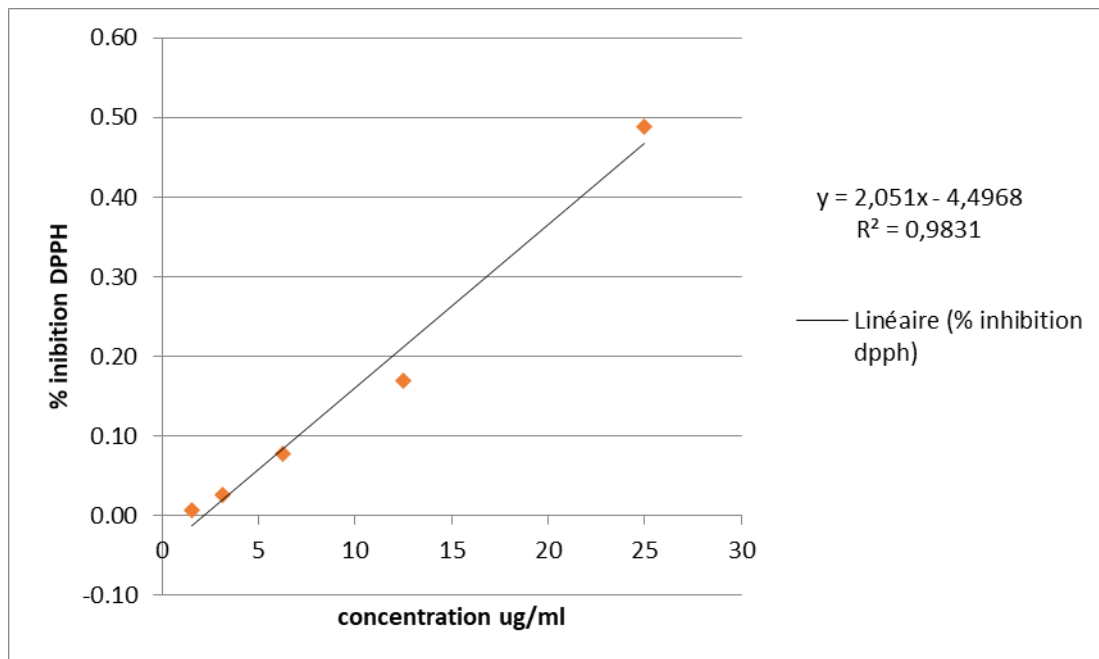
Teste de l'extrait chloroformique (CHCl₃) :

data: Mortalite by Traitement t = 7.2836, df = 29, p-value = 5.069e-08



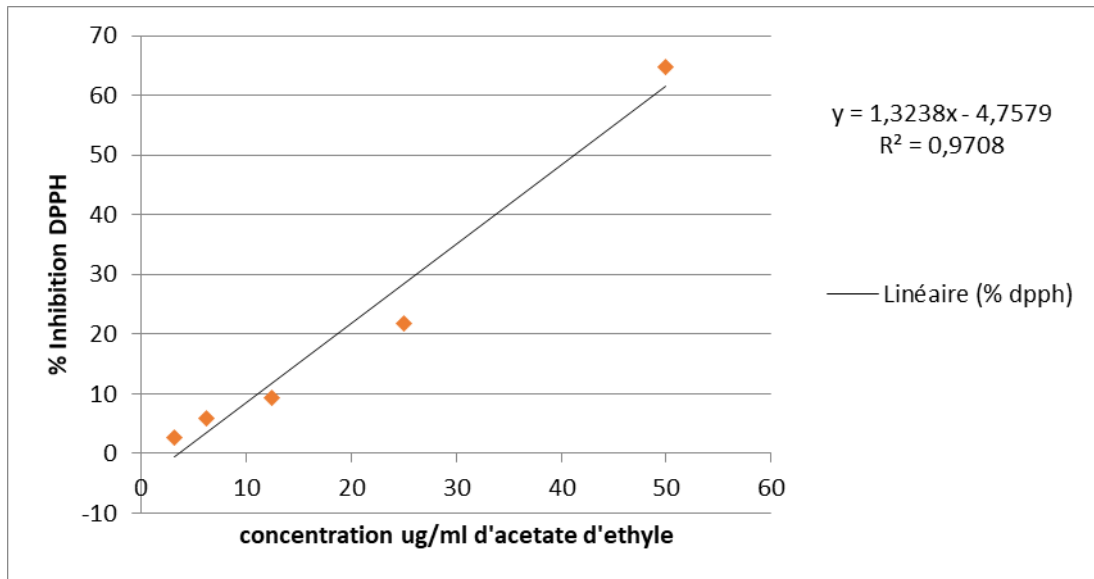
L'interaction entre le traitement avec l'extrait chloroformique et sa durée :

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
trait	5	8950	1790.0	9.972	8.51e-07 ***
Residuals	54	9693	179.5		

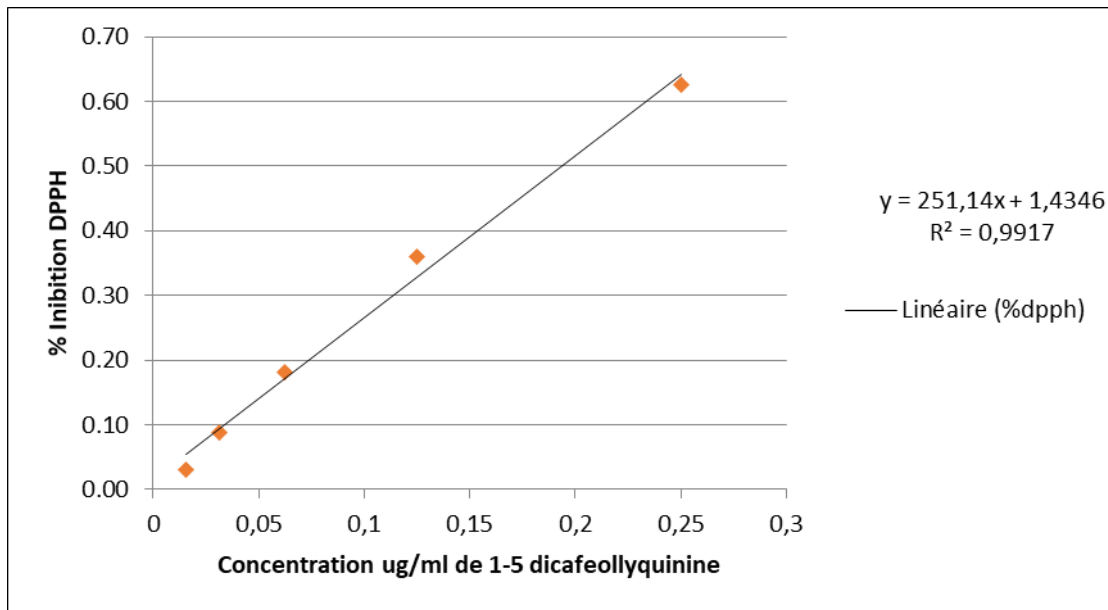


Pourcentage d'inhibition des différentes concentrations du l'extrait butanolique.

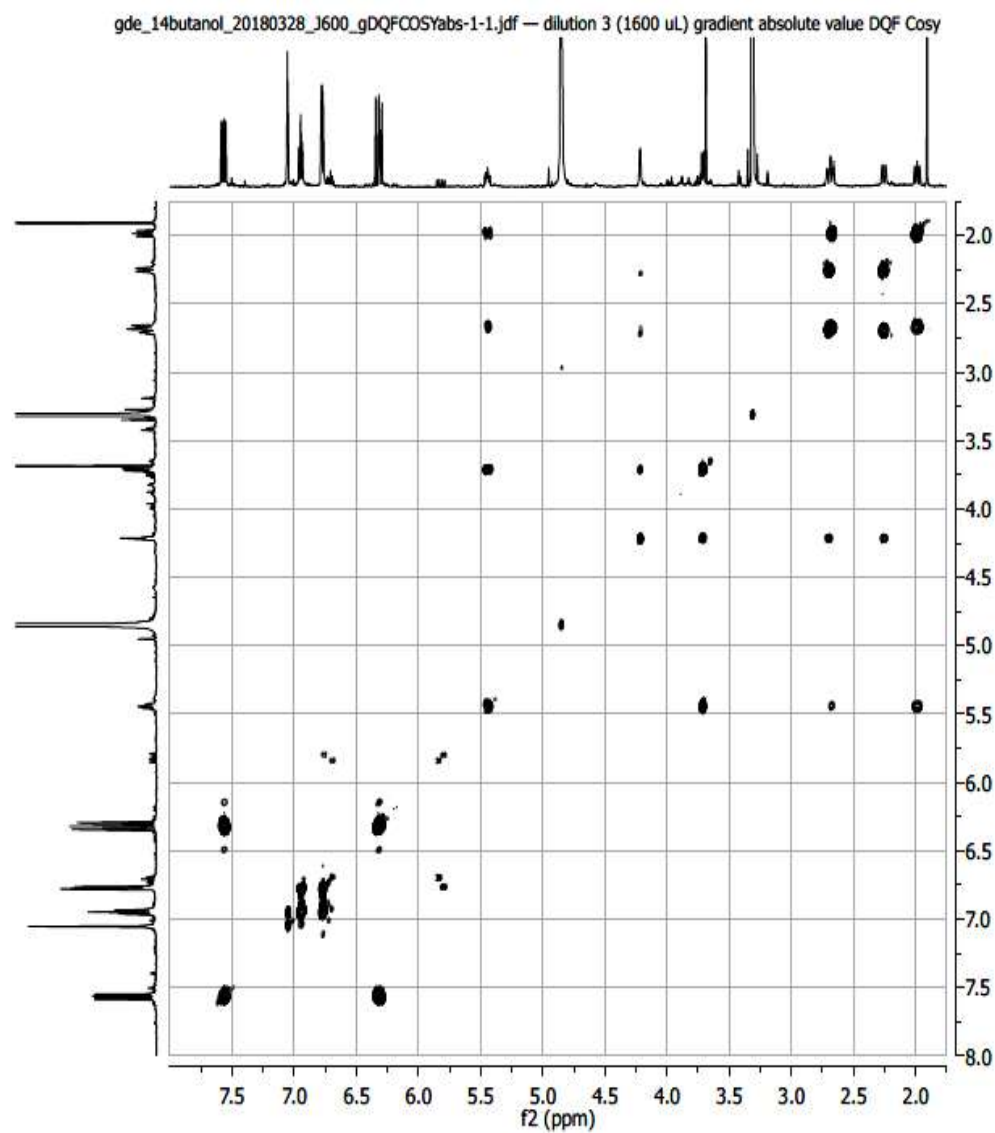
ANNEXE



Pourcentage d'inhibition des différentes concentrations de l'extrait acetate d'éthyle.



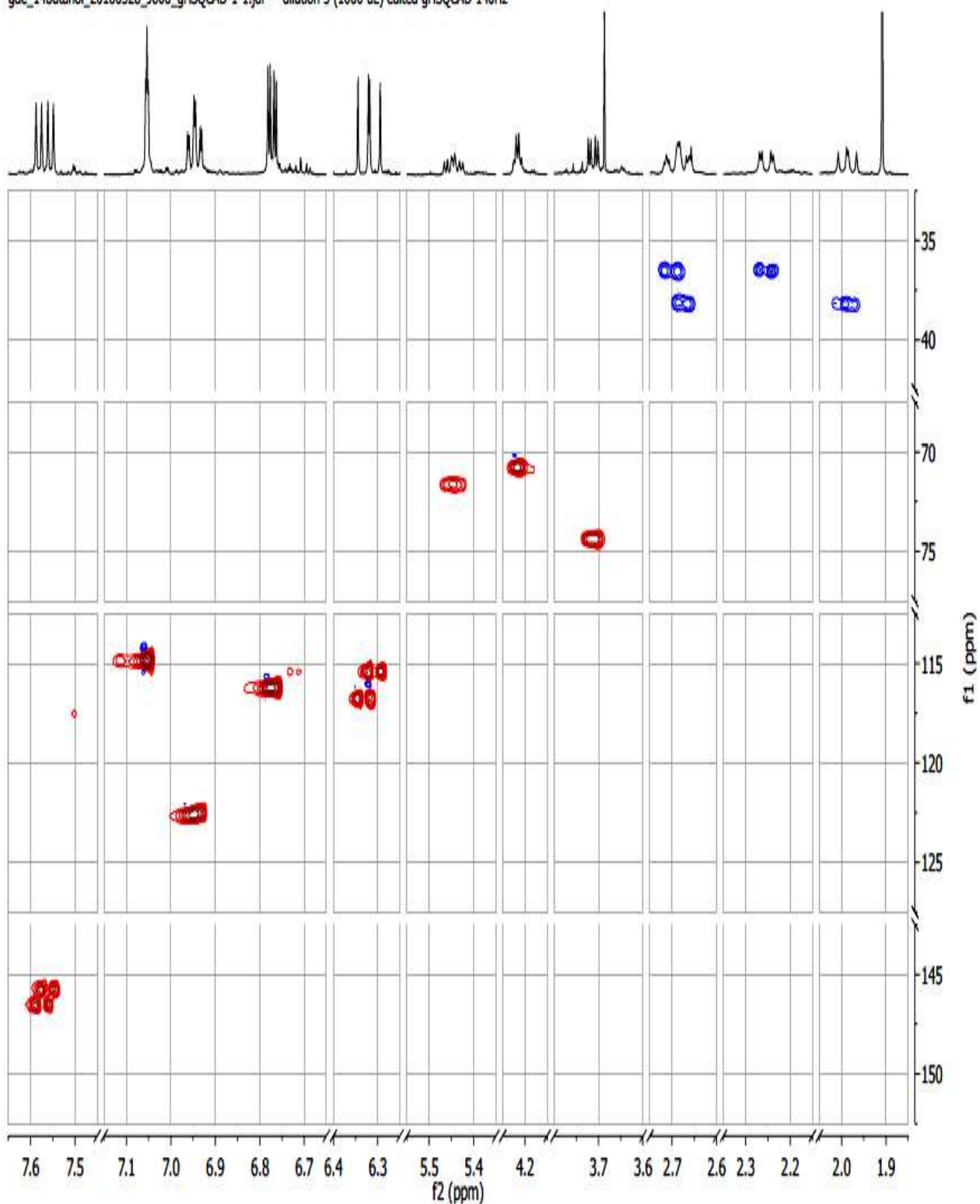
Pourcentage d'inhibition des différentes concentrations du produit pure « **Acide 1-5 dicaffeoylquinine** ».



Spectre globale de dfCOSY de « Acide 1-5 dicaffeoylquinine ».

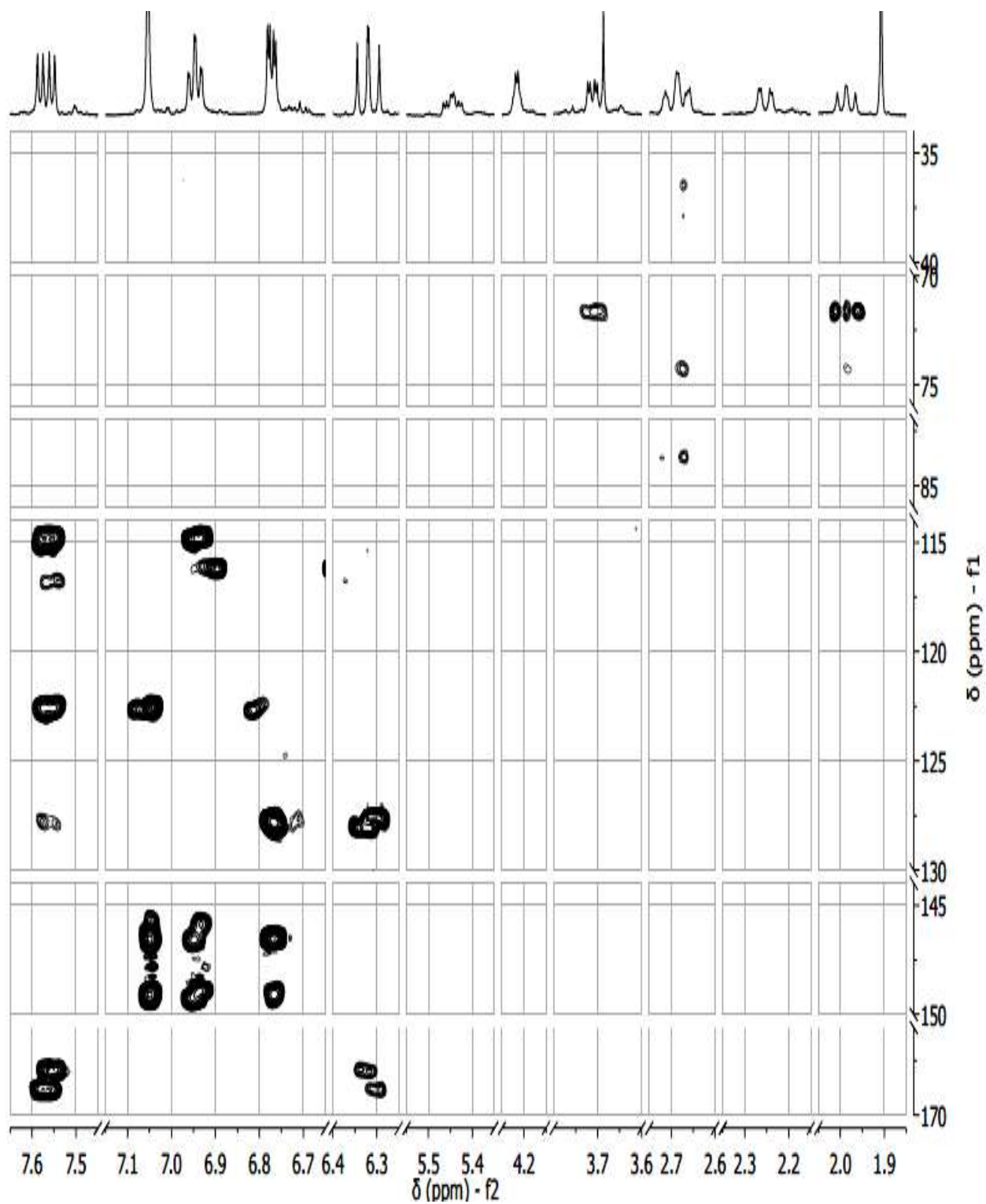
ANNEXE

gde_14butanol_20180328_1600_gHSQCAD-1-1.jdf — dilution 3 (1600 uL) edited gHSQCAD 140Hz



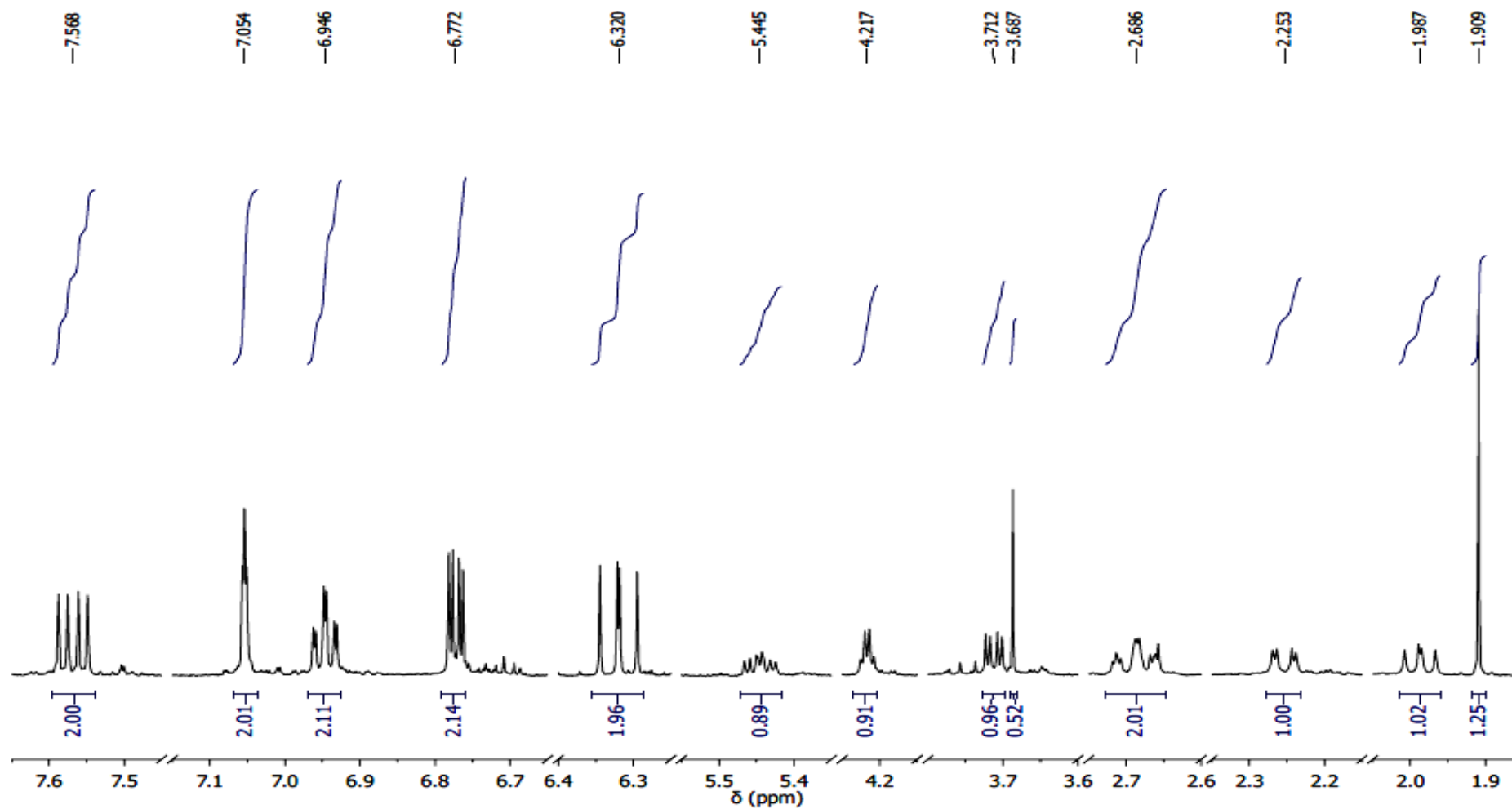
Spectre globale d'HSQC de « Acide 1-5 dicaffeoylquinine ».

ANNEXE



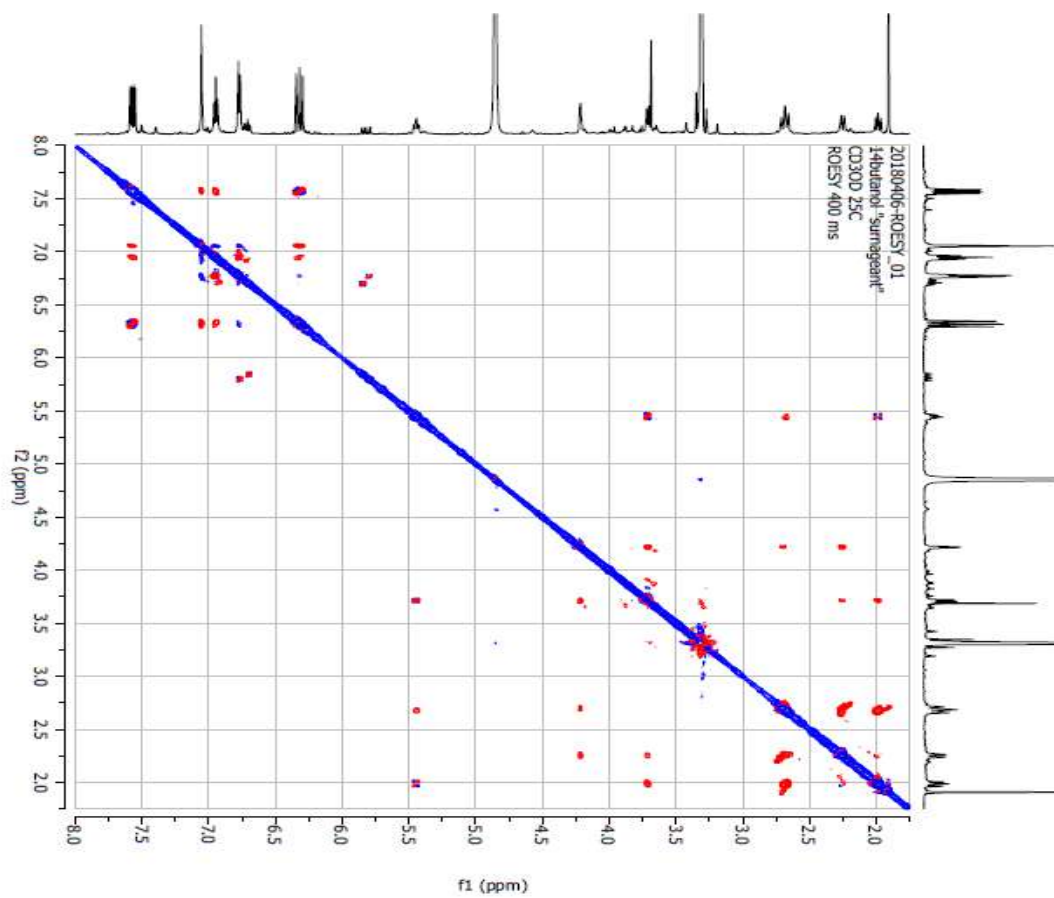
Spectre globale d'HMBC de « **Acide 1-5 dicaffeoylquinine** ».

ANNEXE



Spctre globale du proton RMN H^1 de « **Acide 1-5 dicaffeoylquinine** ».

Spectre RMN globale de ROESY de « Acide 1-5 dicaffeoylquinine ».



BIO-INSECTICIDAL EFFECT OF POLYPHENOL EXTRACTS OF ANVILLEA RADIATA AGAINST CEREAL APHID RHOPALOSIPHUM PADI

BENYAHIA Ibtissam¹, HADJ-MAHAMMED Mahfoud¹, BOUZIANE Mebarka¹,
DEHLIZ Abderrahmène², LAKHDARI Wassima^{2,3}

⁽¹⁾ Laboratory of Biogeochemistry of Desert environments. University of Kasdi-Merbah, Ouargla 30000, Algeria.

⁽²⁾ National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Touggourt Station, Touggourt 30100, Algeria.

⁽³⁾ Biology department, Faculty of Life and Nature Sciences, Valcore Laboratory, University of Boumerdes, Boumerdes, Algeria.

Email: benyibtissam@gmail.com

Received : 22/1/2020

Final Revision : 11/2/2020

Abstract: To reduce the abusive apply of artificial organic pesticides with discernment, biodegradable bio-pesticides origin from plants were used as an alternative phytosanitary method against crop pests. This experimentation allowed testing in vitro the bio-insecticidal activity of *Anvillea radiata* Coss and Dur (Asteraceae), endemic plant from the southeastern Algeria, against the cereal aphid *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758). Three concentrations were tested (D1= 5mg/ml, D2= 2.5mg/ml and D3= 1.25mg/ml) with the butanolic and chloroformic extracts. The results showed a mortality rate of *R. padi* varying significantly by treatment and concentration according to the tested substances. The quantitative analysis of the two extracts shows that the crude butanolic extract is rich in polyphenols (348.935±7.456 µg EAG/mg MS) compared to the crude chloroformic extract (56.754±0.982 µg EAG/mg MS). Samely to the insecticidal effect tested, the concentration of 5 mg/ml presented an important insecticidal activity with the butanolic extract (62%) higher than the chloroformic extract (26%). Also, the lethal doses (LC50) of the crude butanolic extract were estimated by 23.07 mg/ml, 6.71 mg/ml and 5.70 mg/ml respectively after 24, 48 and 72hours of the treatment.

Keyword: Bio-insecticide, Cereal Aphid, *Anvillea radiata*, chemical compound, lethal dose.

I. INTRODUCTION

In Algeria, the harvested area of cereals was estimated by 3 421 833 ha in 2017 [1]. This crop remains insufficient and does not cover constantly increasing needs [2]. The cultivation of cereals in Algeria is most often faced with various difficulties which limit production. However, several pests confront this vegetable such as diseases and insect pests [3]. In the latter group, cereal aphids are in the first place. These Homoptera cause direct and indirect significant damage. They hurt the plant and take the sap to feed themselves. At the same time, they inoculate the plant with phytopathogenic agents such as barley dwarf yellowing virus. This disease can cause significant damage because the symptoms are not noticeable until very late time when no cure is possible. Despite the dangers it presents to humans and their environment, chemical intervention is the only way to control these arthropods. Nevertheless, in recent decades, other methods of control have emerged including natural products that are increasingly required as alternatives for various insecticides, fungicides, herbicides or even medical applications [4].

The possibility of using secondary metabolites of plants against harmful insects was the subject of many works. Noting the most recent studies in Algeria such as [5-14].

In this context the objective of our study is to evaluate the bio-insecticidal activity of the crude butanolic and chloroformic extracts of *Anvillea radiata*, a spontaneous plant from the south-eastern Algeria, against the larvae of the cereal aphid *Rhopalosiphum padi*. As well as to determine the lethal dose (LC50) of the crud extract tested in a specific time against this aphid.

II. MATERIAL AND METHODS

A. Description and origin of *Anvillea radiata*

Anvillea radiata Coss and Dur, vernacular name "Nogde", is particularly growing in North Africa (Algeria and Morocco) that is belonging to the family of Asteraceae [15]. This plant is a very branching shrub 20-50 cm, woody base

stem and branches, elongated triangle leaves, attenuated at the base in to a petiole, and lamina strongly dentate surrendered large , 4 to 5 cm in diameter including long ligules, surrounded by radiating upper leaves gradually passing the bracts, these tough, yellow-orange flowers all; glitter truncated at the top of the receptacle and a long silka chenes prismatic those from the periphery to three angle from the center of those surrendered four corner devices flowers ligules long, up to 25 mm [16].

Samples were collected in April 2016 from the region of Masaad in the southeastern Algeria. This plant was identified by Mr. EDDOUD Amar, Professor at the faculty of natural and life sciences in the University of Ouargla (Algeria). It was deposited in the herbarium of the Laboratory of Biogeochemistry and Desert environments (BMD), at the University of Ouargla with a reference number (0613/2016).

B. Screening of secondary metabolites

A quantity of three grams of *A. radiata* was placed separately in conical vials with 100 ml of the following solvents: methanol, water, chloroform, petroleum ether then stayed for 2 hours and filtered using filter paper. The filtrates were used for screening the secondary metabolites according to standard procedures followed by [17-20].

Detection of **Alkaloids** was made respectively by the reagent tests of Mayer (HgCl_2 , KI and H_2O), Dragendorff [$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, KI and H_2O] and Wagner (KI, I₂ and H_2O) on the extracts. The presence of alkaloids was notified by the appearance of a red-orange precipitate, for Mayer and Dragendorff reagents, and brown, red or black for Wagner's reagent. Concerning the phenols, they were detected by the FeCl_3 test carried out on the extracts and confirmed their presence by the formation of intense color.

The detection of **tannins** was made by Alkaline Reagent test; 2ml of extracts that were treated with a solution of sodium hydroxide. The appearance of yellow to red color indicates the presence of tannins.

Flavonoids were characterized from the reagents Zinc-HCl reduction test. It consists to add a pinch of Zinc dust and a few drops of HCl to all the extracts. Formation of deep red color indicates the presence of Flavonoids. In lead-acetate test, 2ml of all the extracts were added to few drops of basic lead acetate solution. The formation of reddish-brown precipitate indicates the presence of flavonoids. Also in Shinoda's test, 1-2ml of all the extracts was added to a small piece of magnesium paper with few drops of HCl. The appearance of red color indicates the presence of flavonoids.

Identification of **Coumarins** was made by adding 2ml of all the extracts, in separate tubes, and covered with a piece of paper soaked in NaOH and heated. The production of a yellow fluorescence under UV light indicates the presence of coumarins.

Concerning **sterols** test performed by Salkowski's, 2ml of all the extracts were added to 5ml of chloroform. A volume of 1ml of H_2SO_4 was added carefully along the walls of the tube containing the mixture (chloroform + H_2SO_4). The formation of reddish color in the lower layer indicates the presence of steroids.

About **terpenoids** Screening Test, 2ml of all extracts were added to 1% of HCl and stayed for 5 to 6 hours. Then, these extracts were treated with 1ml of Trim-Hill reagent, containing 10ml of acetic acid, 1ml of 0.2% copper sulfate in water and 0.5ml of concentrated hydrochloric acid, and heated in a boiling water bath for 5 to 10 minutes. Formation of a bluish green color indicates the presence of terpenoids.

C. Extracts preparation

The aerial part of *A. radiata* was dried in shade, in a dry and ventilated place at room temperature in the laboratory. Then they were grounded to a fine powder of homogeneous particle size of 0.5mm diameter. The obtained powder was stored in glass vials, hermetically preserved, protected from light and moisture.

A quantity of 1900 g of *A. radiata* powder was macerated in petroleum ether for 24 hours, then the extract was recovered by filtration and the residue was macerated 3 times (48 h x 3) in a hydro-ethanolic mixture. After concentrating the combined extracts, consecutive liquid-liquid extractions were performed on the aqueous phase with chloroform (CHCl_3) and then with ethyl acetate (AcOEt) and finally with butanol (BuOH) [21]. Obtained extracts were tested on the *R. padi* aphid with three doses D1= 5mg/ml, D2= 2.5mg/ml and D3= 1.25mg/ml.

D. Determination of total phenolic compounds

Total phenolic content was determined by using Folin-ciocalteu reagent with a spectrometric method [22]. A volume of 100 μl of prepared extracts with concentrations of 0.1mg/ml for each and same for standard gallic acid with concentrations of (100-50-12-5-8-6) $\mu\text{g/ml}$, were transferred into a test tube and mixed with 1ml of Folin-ciocalteu reagent (previously diluted 10-fold with deionized water). Mixture could stay at room temperature for 5min. A quantity of 0.8ml of 7.5% (w/v) Sodium Carbonate solution was added to mixture that was gently stirred. After staying at room

temperature for 30min, the absorbance was measured at 765nm using Unicam helios Gamma spectrophotometric UV-Visible. Gallic acid was used as a standard for the calibration curve. Total phenolic content was expressed as gallic acid equivalents dry matter (μg per mg).

E. Breeding of *Rhopalosiphum padi*

The biological material was chosen by the team of plant protection laboratory from the National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA) of Touggourt. The cereal aphid *R. padi* Linnaeus, 1758 (Homoptera: Aphididae) was selected between two other aphid species, *Sitobion avenae* and *Schizaphis graminum*, because of the considerable damage caused by this aphid to cereal growing in the southeastern regions of Algeria.

Aphid of cereals was collected during March to May 2017 and breeding in the plant protection laboratory at the experimental station of INRAA. The obtained samples were maintained under natural laboratory conditions, at an average temperature of approximately 27°C in petri dishes. A strainer of 0.5mm of diameter was used to separate aphids (larvae and adults) from plants.

F. In vitro larvicidal bio-assay

Ten (10) individuals of second stage (L2) of *R. padi* were recovered with a brush and placed separately in Petri dishes (10 repetitions) that their covers were perforated to allow insects breathing and prevent moisture condensation. Fresh cereal leaves were considered as nutrient medium. The extract of *A. radiata*, previously prepared, was applied by spraying individuals of *R. padi* with a concentration of 5mg/ml.

Mortality rates of *R. padi* populations were calculated after 24h, 48h and 72h of treatment application. The lethal concentration ($\text{LC}_{50\%}$) was obtained by transforming doses into decimal logarithms. Moreover, percentages of corrected mortality were transformed into probits by $y = a + bx$ by determine the dose corresponding a probit of 50% of the mortality. Control and treated observed mortality were calculated by using the following formula of [23]:

$$\text{Mortality rate (\%)} = \frac{\text{Number of dead individuals}}{\text{total number of individuals}} \times 100$$

The observed mortalities values were corrected by using the formula of [24] considering natural mortality observed in the control groups.

$$M_c = \frac{(M_2 - M_1)}{(1 - M_1)}$$

Where:

M1: percentage of mortality in the control group;

M2: percentage of mortality in the treated group;

M_c: corrected mortality percentage.

I. Statistical analyses

Results are evaluated statistically using R software (v.3.5.2). Analysis is started with normality test (Schapiro's test) then completed with ANOVA at level of $p = 0.05$. Furthermore, a Post-hoc test (Turkey's test) is conducted with an Agricola 1.3.1 package.

II. RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary phytochemical screenings of methanol, chloroform, petroleum ether and aqueous extracts from the aerial parts of *A. radiata* were carried out to study main bioactive components that could constitute the main factor behind the plant bio-insecticidal activity. These results were announced in the table below.

The obtained results showed the presence of flavonoids, tannins, coumarins, phenols and terpenoids in the methanolic and aqueous extracts of *A. radiata* (Table 1). It is also noted that the petroleum ether extract does not contain any of these families of compounds. These results were similar to those obtained by [25], [15] who noted that *A. radiata*, collected from the region of Bechar in the southeastern Algeria, has an important presence of alkaloids, saponins, terpenes, tannins, steroids and cardenolids. Based on results of total phenol assays, we note that butanolic extract contains a significant amount of total phenols in the order of $348,935 \pm 7.456 \mu\text{g EAG/mg MS}$, while chloroformic extract presents a lower value of $56,754 \pm 0.982 \mu\text{g EAG/mg MS}$.

TABLE (1): QUALITATIVE PHYTOCHEMICAL SCREENING RESULTS OF *ANVILLEA RADIATA* EXTRACTS

	Methanol	Water	Chloroform	Petroleum ether
Alkaloids	-	-	-	-
Flavonoids	+	+	+	-
Tannins	+	+	-	-
Coumarins	+	+	-	-
Sterols	-	-	+	-
Phenols	+	+	-	-
Terpenoids	+	+	-	-

+: Presence; -: Absence.

Several studies confirmed the biological activity of plant's compounds. For this, [26] noted that polyphenols cause disturbance of insect's natural motor skills and their toxicity is positively correlated with the attractiveness of these compounds. Not only insects, but also phytopathogenic fungi, the activity of polyphenols against these micro-organisms allow plants creating barriers and do better resistance against them. Concerning coumarins, [27] as well [28] announced that these compounds have many biochemical and pharmacological activities that depend on structure and nature of the substituent. Also, it should be noted that terpenoids have an anti-inflammatory, antimalarial, antiviral and antibacterial properties [29]. Flavonoids are biosynthesized by many plants to control bacterial infections through interaction with the cell wall of bacteria and proteins [30]. The results of the bio-insecticidal activity of the crude extracts of *A. radiata* against the 2nd larval stage of the cereal aphid *R. padi* are presented in Fig. 1.

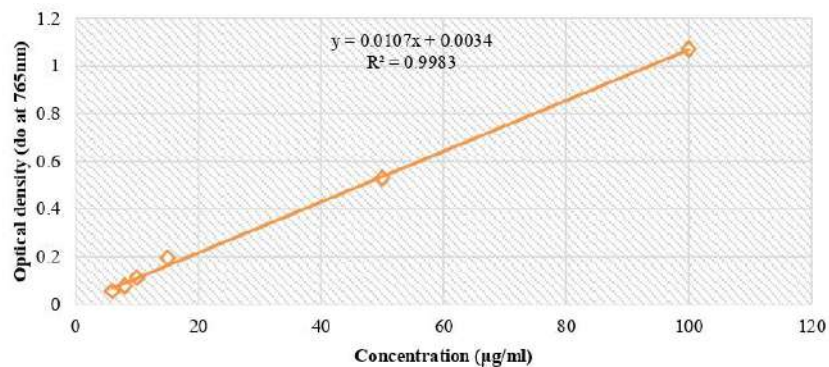


Fig. 1: CALIBRATION LINE FOR TOTAL PHENOLS PERFORMED BY GALLIC ACID

The bio-insecticidal activity of *A. radiata* crude extracts against *R. padi* larva showed that the highest mortality rates were obtained by the butanolic crud extract with $9.4 \pm 1.49\%$, $50.5 \pm 2.59\%$ and $62.7 \pm 3.09\%$ were respectively obtained after 24h, 48h and 72h of treatment application (Fig. 2). Unlike the chloroformic crud extract, lower mortality rates were recorded with values of $23.1 \pm 1.77\%$, $24 \pm 1.59\%$ and $26 \pm 2.26\%$ recorded respectively with the same periods. On the other hand, the mortality in control dishes was taken as a correction control. Statistical analyses confirmed the result of these compounds with a significant effect ($p=0.0107$) which proved that the mortalities caused by both of extracts have no relationship with time. This explains why these extracts have a striking effect on individuals. Also, it should be noted that at the end of the experimentation, the survived individuals showed different abnormalities and handicaps under the effect of *A. radiata* extracts. According to the results obtained in the present study, the significant effect of the butanicol extract of *A. radiata* was richer with chemical compounds comparing to the chloroformic one. Our results were confirmed by several studies on the compounds of this botanical species noting that its bio-insecticidal activity may be due to its high content of polyphenols, flavonoids, phenolic acids and germacranolides [31], [32], [4].

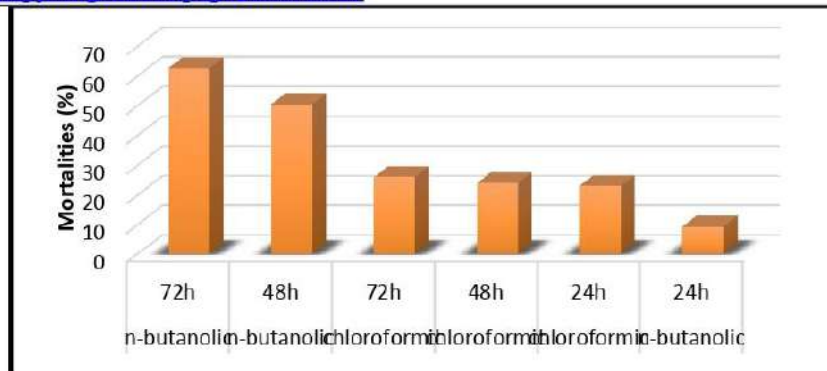


Fig. 2: EVOLUTION OF CORRECTED MORTALITY RATE OF *RHOPALOSIPHUM PADI* DEPENDING ON TIME VARIATIONS (24, 48 AND 72H) FOR THE CRUDE EXTRACTS OF BUTANOL AND CHLOROFORM

On the other hand, after 24h the chloroformic extract showed mortality rates of $15.5 \pm 2.14\%$, $5.5 \pm 1.14\%$ and $1.3 \pm 0.41\%$ with the three examined doses (D1= 5mg/ml, D2= 2.5mg/ml and D3= 1.25mg/ml). While after 48h, the mortality rates increased only in the first dose with $40 \pm 2.82\%$ until the end of the experimentation, after 72h, with $45.7 \pm 3.06\%$ (Fig. 3).

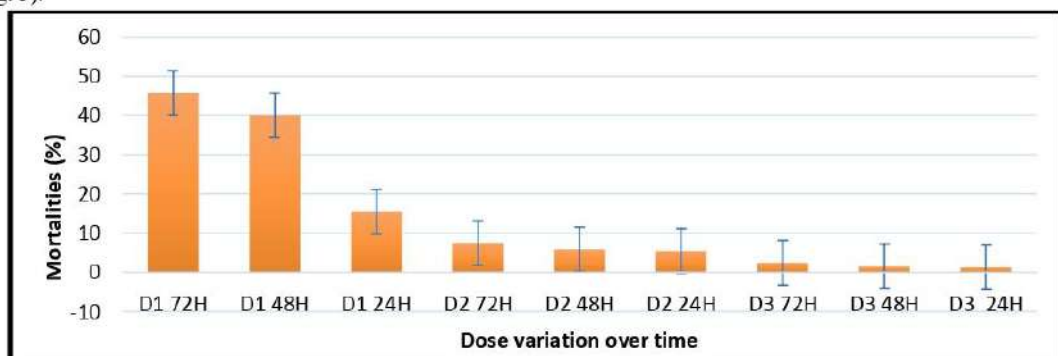


Fig. 3: EVOLUTION OF CORRECTED MORTALITY RATE OF *RHOPALOSIPHUM PADI* DEPENDING ON DOSES D1, D2 AND D3 FOR 24, 48 AND 72H

Concerning the lethal dose (LC_{50}) examined with butanolic extract of *A. radiata*, the regression equation was performed to calculate this dose for each time. This test showing the mortality of 50% of aphid's individuals recorded values of 23.07 mg/ml, 6.71 mg/ml and 5.07mg/ml after 24h, 48h and 72h, respectively (Table 2). Examination of these data revealed that the obtained values of LC_{50} decrease over time that explains the real and high efficiency of crude butanolic extract. This is certainly due to the chemical composition of the used botanical species as well as to the used solvent in the extraction which were able to extract various substances from different phytochemical classes.

TABLE (2) : VALUES OF DL_{50} APPLIED ON *R. PADI* ACCORDING TO THE TIME

Time (h)	LD_{50} values (mg/ml)
24	23.07
48	6.71
72	5.7

In fact, this *Asteracea* biocidal effect is presented by several authors around the world. Noting, [33] who argued the antibiotics and antioxidant effect of the aqueous extract of this plant by reducing about 15% of the spread of multi-resistant bacteria such as *Staphylococcus aureus* Gram (+) and *Escherichia coli*. In addition, [34] also demonstrated that *A. radiata* presents antioxidant and antibacterial activity due to same compounds recorded in our experiment. Same author reported that the highest quantities of those molecules do exist on flowers and vary according to the used solvent. According to the study conducted by [35] on the same species of aphid, they noted that the application of linalool and cinnamaldehyde on *R. padi* was very toxic. Not only aphids, but also, this plant is characterized by another compounds

against micro-organism where [36] demonstrated the antifungal activity of *A. radiata* against several fungi such as *Aspergillus* spp., *Penicillium expansum*, *Fusarium oxysporum* and *Alternaria* sp. Furthermore, [15] recorded a significant effect of the extract of this plant on the phytopathogenic agent of date palm *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*.

III. CONCLUSION

The bio-insecticidal effect of an endemic plant from the southeastern Algeria against the cereal aphid *R. padi* was conducted in the present study. The screening of this botanical species allowed identifying its chemical compounds that are flavonoids, tannins, coumarins, phenols and terpenoids. The toxicity of this plant extract was higher with the butanolic extract that was richer than the chloroformic one. It should be recommended more deep analysis and experimentations in the field to multiply this botanical species and synthesize identical active substances that are exist in it. The present study showed significant data on this kind of biological treatment against the cereal aphid. According to the obtained results, *A. radiata* revealed the presence of substances that could constitute a good method to control *R. padi* and might be introduced as an eco-friendly way to control this in sustainable organic agriculture.

Acknowledgements

We are grateful to the advice and support of Mr. EDDOUD Amar, professor from the Department of Natural and Life Sciences SNV, Kasdi-Merbah University for the valorization of our work through statistical analysis.

REFERENCES

- [1] FAO STAT, 2019. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC/visualize>.
- [2] Kellil, H., 2010. "Contribution à l'étude du complexe entomologique des cereals dans la region des hautes plaines de l'est algérien". Magist. Thesis, University of Batna, Algeria.
- [3] Mokabli, 2002. "Biologie des nématodes à kystes (Heterodera) des cereals en Algérie: Virulence de quelques populations à l'égard de diverses varietes et lignées de cereals". Doctorate thesis, ENSA, Algeria.
- [4] Hamada, D. and S., Ladjel, 2015. "Chemical composition, in-vitro anti-microbial and antioxidant activities of the methanolic extract of *Anvillea radiata* asteraceae. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 6(2), 1367-1373.
- [5] Oued El-Hadj, M. D., A., Tankari Dan-Badjo, F., Halouane and S., Doumandji, 2006. « Toxicité comparée des extraits de trois plantes acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* Forskål, 1775 (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae) ». Sécheresse, 17 (3), 407-414.
- [6] Zouiten, H., K. Abbassi, Z. Atay-Kadiri, M. Mzari, M. El Mahi and E. M. Essassi, 2006. "Insecticidal activity of *Solanum sodomaeum* (solonaceae) extracts on *Schistocerca gregaria* (forskål) larvae". Journal Orthop. Res., 5 (2), 171-173.
- [7] Idrissi, L. M. and J. Hermas, 2008. « Effet de l'alimentation en *Peganum harmala* L. (zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pelerin *Schistocerca gregaria* forsk. (orthoptera, acrididae). Zool. Baetica, 19, 71-84.
- [8] Kemassi, A., Z., Boual, A., Ould El Hadj-Khelil, M., Dadi Bouhoun, and M.D., Ould El Hadj, 2010. "Activité biologique de l'extrait d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae) sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Othoptera : Acarididae) ». Annales des Sci. Technol., 2(1) : 61-70.
- [9] Bouziane, N., 2012. « Toxicité compare des extraits d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. (Euphorbiaceae) et de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) récoltés au Sahara Septentrional est algérien sur les larves et les adultes de *Schistocerca gregaria* Forskål (1775) ». M.Sc., University of Ouargla, Algeria.
- [10] Smara, O., 2014. « Etude ethnobotanique et chimique d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut ». Doctorate thesis, University of Annaba, Algeria.
- [11] Kemassi, A., K., Boukhari, R., Chérif, K., Ghada, N., Bendaken, Z., Boual, N., Bouras, A., Ould El Hadj-Khelil, M., Dadi Bouhoun, and M.D., Ould El Hadj, 2015. "Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss.&Reut.) (Euphorbiaceae)". El Wahat pour les recherches et les Etudes, 08 (1), 44-61.
- [12] Lakhdari, W., A., Dehliz, F., Acheuk, A., Soud, H., Hammi, R., Mlik, and B., Doumandji-Mitiche, 2015. "Acaricidal activity of aqueous extracts against the mite of date palm *Oligonychus afrastaticus* Meg (Acar: Tetranychidae)". J. Med. Plants Stud., 3(6), 113-117.
- [13] Dehliz, A., W., Lakhdari, F., Acheuk, R., Aoudjit, W., Benlamoudi, R., Mlik, H., Hammi, S., Chergui, K., Guermi, and S., Matallah, 2017. "*Euphorbia guyoniana* aqueous extract efficiency against tomato leaf miner in southern East Algeria". Organic Agriculture, 8(4), 349-354.

- [14] Dehliz, A., W., Lakhdari, R., Mlik, H., Hammi, O., Guezoul, F., Acheuk, W., Benlamoudi, S., Chergui, K., Guermit, S., Matallah, M., Berrekbia and S., Gueriani, 2019. "Potential of *Zygodophyllum album* L. to control *Tuta absoluta* in Southeastern Algeria". *Organic agriculture*, 19, 1-6.
- [15] Mebarki, L., H.M. Kaid, L. Benlarbi, A. Rahmani and A. Sarhani, 2013. "Phytochemical analysis and antifungal activity of *Anvillea radiata*". *World App. Sci. J.*, 26, 165-171.
- [16] Ozenda, P., 2004. « *Flore et Végétation du Sahara* », 3rd éd, Paris.
- [17] Khandelwal, K.R., 1995. "Practical Pharmacognosy: Techniques and experiments" (India, Nirali Prakashan).
- [18] Evans, W.C. and G.E., Trease, 2002. "Carbohydrates in Trease and Evans pharmacognosy" (China, W.B. Saunders).
- [19] Kokate, C.K., A.P., Purohit and S.B. Gokhale, 2009. "Pharmacognosy". NiraliPrakashan, 616-617.
- [20] De, S., Y.N., Dey, and A.K., Ghosh, 2010. "Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphaphallus paeonifolius* (araceae)". *Int. Journal Pharm & Biomedical Research*, 1(5), 150-157.
- [21] Kumar, V., J., Reisch, D. B., Wickremaratne, R. A., Hussain, K. S., Adesina, and S. Balasubramaniam, 1987. "Phytochemistry". *Plant Science Laboratories*, 26, 511-514.
- [22] Singleton, C.P. and J.A., Rossi, 1965. "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents". *Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- [23] Abbott W.S., 1925. "A method of computing the effectiveness of an insecticide". *Econ. Entomol*, 18, 265-267.
- [24] Schneider-Orelli, O., 1947. *Entomologisches Praktikum: Einführung in die land- und forstwirtschaftliche Insektenkunde*. Sauerländer Aarau, Germany.
- [25] Djellouli, M., A., Moussaoui, H., Benmehdi, L., Ziane, A., Belabbes, M., Badraoui, N., Slimani and N., Hamidi, 2013. "Ethnopharmacological study and phytochemical screening of three plants (asteraceae family) from the region of south west Algeria". *Asian journal of natural & applied sciences*, 2 (2), 59-65.
- [26] Regnault-Roger, C., M., Ribodeau, A., Hamraoui, I., Bateau, P., Blanchard, M.I., Gil and F., Tomas Barberan, 2004. "Disturbance of *Acanthoscelides obtectus* behavior by polyphenolic compounds identified in insecticidal (*Labiatae botanicals*)". *Journal of stored product research*, 40, 395-408.
- [27] Min Mao, P.C., J. F., Mouscadet, H., Leh, C., Auclair and L., YihHsui, 2002. "Chemical Modification of Coumarin Dimer and HIV-1 Integrase: Inhibitory Activity". *Chemical and pharmaceutical*, 50, 1634-1637.
- [28] Fylaktakidou, K., D. J., CHadjipavlou-Litina, K. E., Litinas and D. N., Nicolaide, 2004. "Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/ antioxidant activities". *PubMed*, 10(30), 3813-3833.
- [29] Indumathi, C., G., Durgadevi, S., Nithyavani, and P. K., Gayathri, 2014. "Estimation of terpenoid content and its antimicrobial property in *Enicostemma littorale*". *International Journal of ChemTech Research*, 6 (9), 4264-4267.
- [30] Bansode, D.S., and M.D., Chavan, 2014. "Phytochemical screening and antibacterial activity of curry (*Murraya Koenigi*) leaf extracts against enteric pathogens". *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (9), 1075-1079.
- [31] El Hassany, B., F.; El Hanbali, M., Akssira, F., Mellouki, A., Haidour, and A., Barrero, 2004. "Germacranolides from *Anvillea radiata*". *Fitoterapia*, 75 (6), 573-576.
- [32] Dendougui, H.; M., Jay, F., Benayache and S., Benayache, 2006. "Flavonoids from *Anvillea radiata* Coss. & Dur. (Asteraceae)". *Biochemical Systematics and Ecology*, 34 (9), 718-720.
- [33] Bammou, M., A., Daoudi, I., Slimani, M., Najem, E.H., Bouiamrine, J., Ibjibijen and L., Nassiri, 2015. "Valorisation du lentisque « *Pistacia lentiscus* L. » : étude ethnobotanique, screening phytochimique et pouvoir antibactérien ». *Journal of Applied Biosciences*, 86, 7966- 7975.
- [34] Beddou, F., C., Bekhechi, D., Chabane Sari and F., Atik Bekkara, 2014. "Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds from *Anvillea radiata* Coss et Dur". *International journal of pharmaceutical research and bioscience*, 3 (1), 172-187.
- [35] Hamraoui, A. and C., Regnault-Roger, 1997. "Comparaison des activités insecticides des monoterpènes sur deux espèces d'insectes ravageurs des cultures : *Ceratitis capitata* et *Rhopalosiphum padi* ». *Acta botanica gallica*, 144 (4), 413-417.
- [36] Moghtet, S., N., Menad, B., Meddah and A., Moussaoui, 2018. "Effect of *Salsola vermiculata* on fungi of french soft wheat and test of grain storage by the coating method". *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 10 (1), 1112-9867.