

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

المدرسة الوطنية للعلوم الفلاحية – الجزائر-
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH-ALGER

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques

Département : Zoologie Agricole et Forestière

Doctorat en : Biologie et Ecologie en Zoologie Agro-Sylvo-Pastorale

Intitulé de thèse

Contribution à l'étude phytochimique et de l'activité insecticide de
quelques extraits végétaux à l'égard de *Sitophilus oryzae* (L.,1763)
(Coleoptera, Curculionidea)

Présentée par : M^{me} DANE Yasmine

Soutenue le :24/05/2018

Membres du jury :

Président : M^{me} DOUMANDJI MITICHE BAHIA, Professeur à l'ENSA

Directrice de Thèse : M^{me} MOUHOUCHE FAZIA, Professeur à l'ENSA

Examineurs : Mme YAHY GUENAFDI NASSIMA, Professeur à l'USTHB

M^r. RAMON CANELA, Professeur, Université de Lleida –Espagne

Mr HAMMACHE MILOUD, Maitre de conférences A à l'ENSA

Année universitaire: 2017-2018

Remerciements

Ce travail de recherche n'aurait pas été possible sans le soutien et la participation de plusieurs personnes auxquelles je souhaite exprimer toute ma gratitude.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de jury : à Madame **Bahia DOUMANDJI METICHE** qui a fait l'honneur de présider ce jury, à Madame **Nassima YAHYI**, Monsieur **Miloud HAMMACHE** et Monsieur **Ramon CANELA**, qui ont eu la gentillesse d'accepter mon invitation à juger ce travail.

Je remercie **Mme. Fazia MOUHOUCHE**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique, pour avoir assuré la direction et le suivi de cette thèse. Son expérience et son aide scientifique m'ont été essentielles. Sa disponibilité ainsi que l'attention qu'elle a portée à ce travail ont été un atout précieux dans l'avancement de cette étude.

Ma profonde reconnaissance et tous mes vifs remerciements s'adressent à **M. Salahedine DOUMANDJI**, Professeur responsable du Doctorat LMD, département de Zoologie Agricole et Forestière pour sa disponibilité, sa patience et son aide précieuse.

Je remercie **M. Ramon CANELA-GARAYOA**, professeur et chef du laboratoire de Chimie à l'université de Lleida- Espagne, ainsi que toute son équipe qui m'ont accueillie au sein de leur laboratoire et qui ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de cette thèse.

Je souhaite que **Mme. Nesrine DAGHEFALI** du département de botanique de l'ENSA trouve ici le témoignage amical de mon estime et de mes remerciements pour sa disponibilité, son soutien constant et pour ses qualités humaines.

Je présente également mes vifs remerciements à **M. Abderahmane SIAFA** chargé de cours à l'ENSA du département de Zoologie Agricole et Forestière pour ses remarques pertinentes et pour son aide précieuse

Merci à **Soraya CHERCHALI** pour son aide précieuse et l'honneur qu'elle m'a faite d'assister à ma soutenance.

A **ma mère** et à **mon mari**, j'exprime toute ma gratitude et mon amour, pour leur soutien constant et leur profonde affection.

J'associe à mes remerciements ma cousine et ma collègue **Faiza GUERIBIS** avec qui j'ai partagé avec plaisir ces années de recherche.

*'A grain saved is a grain produced
-A seed saved is thousands produced'*

Dédicace

En hommage à mon Père, que ton âme repose en paix

À ma très chère mère et son courage

À mon frère et mes sœurs

À mon très cher époux et mon petit soussou

À tous les membres de ma belle famille

LISTE DES ABREVIATIONS

A :	<i>Artemisia</i>
B :	<i>Bacillus</i>
BMRB	Biological Magnetic Resonance Data Bank
°C :	Degré Celsius
C :	Carbonne
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDLC₃	Deuteriochloroforme
CG/SM :	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Cm :	Centimètre
DAD :	Détecteur à Barrettes de Diodes
DDT :	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DL50 :	Dose létale de cinquante pour cent de la population
DL90 :	Dose létale de quatre-vingt-dix pour cent de la population
E :	Est
EI :	Ionisation par transfert d'Électron
ENSA :	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
ESI :	Électrospray ionisation
Ex :	Exemple
F :	Fusarium
F1 :	Première génération
FAO :	Food and Agriculture Organisation
FC :	Fusarium culmorum
FG :	Fusarium graminearum
Fig :	Figure
g :	Gramme
GC :	Chromatographie en phase Gazeuse
Gr :	Germination
h :	Heure
ha :	Hectare
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Pression
H-RMN :	Résonance magnétique nucléaire du proton
INPN :	Inventaire National du Patrimoine Naturel
ITGC	Institut Technique des Grandes Cultures
J :	<i>Juniperus</i>
j :	Jour
kg :	Kilogramme
<b(kv :<="" b=""></b(kv>	kilovolt
L :	Carl von Linné
LC :	Chromatographie Liquide
LSD :	Least Significant Différence
Mast :	Maxwell Tylden Masters
MC	Croissance mycélienne
M_{EM} :	Masse d'extrait méthanolique
mec :	Méthanol/chloroforme
met :	Méthanol absolu
MeOH :	Méthanol
mew :	Méthanol/eau

mg :	Milligramme
MHz :	Méga Herz
min :	Minute
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
mol/L :	mole/litre
MS :	Spectrométrie de Masse
Mvs :	Matière végétale sèche
N :	Nord
N° :	Numéro
nm :	nanomètre
O :	Oxygène
OH :	Ion hydroxyde
PDA :	Potato Dextrose Agar
pH :	Potentiel d'hydrogène
POP :	Polluants organiques persistants
ppm	Partie par million
rpm :	Rotation par minutes
Rdt :	Rendement
RH :	Humidité relative
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
s :	Seconde
S :	Sitophilus
T :	<i>Tetraclinis</i>
t :	tonne
Tab :	Tableau
Tr :	Temps de rétention
μ :	Micro
μm :	Micromètre
μL :	Microlitre
UDL :	Université de Lleida
UPLC :	Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression
UPLC-PAD-MS :	Chromatographie en phase liquide à Ultra haute performance avec un détecteur ampérométrique pulsé (Pulsed Amperometric Detector) couplée à la spectrométrie de masse
FLR :	Fluorescence
US :	United States
UV :	Ultraviolet
UV-vis :	Détecteur spectroscopiques Ultraviolet/Visible - simple longueur d'onde
v/v :	volume / volume
%	Pourcentage
α:	Alfa
β:	Beta
ó:	Déplacement chimique
λ	Longueur d'onde d'absorption UV

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	01
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	05
I.1 GENERALITES SUR LES DENREES STOCKEES	06
I.1.1 Description	06
I.1.2 Le stockage	06
I.1.2.1 Succession des peuplements d'espèces	07
I.1.2.2 Protection des denrées stockées	07
I.2 MODELE D'ETUDE : <i>Sitophilus oryzae</i>	09
I.2.1 Classification	09
I.2.2 Morphologie	10
I.2.3 Répartition géographique	12
I.2.4 Cycle de développement	12
I.2.5 Dégâts de l'infestation	13
I.3. PRESENTATION DES TROIS ESPECES BOTANIQUES EXPLOITEES	16
I.3.1 L'absinthe <i>Artemisia absinthium</i> L. 1753	16
I.3.1.1 Position taxonomique	16
I.3.1.2 Description et caractéristiques	17
I.3.1.3 Propriété et usages	17
I.3.2 Le genévrier phénicien <i>Juniperus phoenicea</i> L. 1753	19
I.3.2.1 Position taxonomique	19
I.3.2.2. Description et caractéristiques	19
I.3.2.3. Propriété et usages	20
I.3.3 Le cyprès d'Atlas <i>Tetraclinis articulata</i> (Vahl) Masters. 1892	21
I.3.3.1. Position taxonomique	21
I.3.3.2. Description et caractéristiques	21
I.3.3.3. Propriétés et usages	22
I.4 POLYPHENOLES, CHROMATOGRAPHIE, ET SPECTROMETRIE	23
I.4.1 Les polyphénols	23
I.4.1.1 Définition.....	23
I.4.1.2. Classification des polyphénols.....	24
I.4.1.2.1 Polyphénols simples.....	26
I.4.1.2.2 Polyphénols complexes (tanins)	27
I.4.1.3. Importance et Activités biologiques	28
I.4.2 Procèdes d'obtention des polyphénols : techniques d'analyses chimiques	28

I.4.2.1. La chromatographie par U-HPLC-MS	30
I.4.2.1.1. Notion de base	31
I.4.2.1.2. Principes et fonctionnement	32
I.4.2.1.3. Identification des composés	34
I.4.2.2. La spectrométrie RMN	35
I.4.2.2.1 Notion de base	35
I.4.2.2.2 Principe et fonctionnement	36
I.4.2.2.3. Identification d'un composé	37
II. MATERIELS ET METHODES	39
II.1 Etude phytochimique	40
II.1.1 Espèces botaniques exploitées et échantillonnage	40
II.1.2. Solvants utilisés	41
II.1.3. Méthode d'extraction	42
II.1.4 Analyse Chromatographique des polyphénols	43
II.1.4.1 Paramètres de l'UPLC-PDA-FLR	43
II.1.4.2. Paramètre de l'UPLC-MS	44
II.1.4.3. Identification et quantification	45
II.1.5. Analyse par H-RMN	46
II.2 Etude de l'activité biologique des extraits méthanoliques	47
II.2.1 Activité insecticide	47
II.2.1.1 L'Insecte	47
II.2.1.2 Le substrat	48
II.2.1.3 Etude de l'effet insecticide des extraits méthanoliques par contact	48
II.2.1.4 Etude de l'effet insecticide des extraits méthanoliques par traitement des grains	49
II.2.1.4.1. Sexage et formation des couples	50
II.2.1.4.2. Application des traitements	51
II.2.1.4.3. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la descendance de première génération F1	52
II.2.2 Etude de l'effet des extraits méthanoliques sur les grains	52
II.2.2.1. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la perte en poids des grains	52
II.2.2.2. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la germination	53
II.2.3. Evaluation de l'effet fongicide des extraits méthanoliques	54
II.2.3.1. Espèces fongiques	54
II.2.3.2. Procédés d'évaluation de l'activité antifongique	54

II.3. Analyses statistiques	56
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	57
III.1. Etude phytochimique	58
III.1.1. Rendement des extractions méthanoliques	58
III.1.2. Analyse Chromatographique des polyphénols	59
III.1.3. Analyse par H-RMN	66
III.1.3.1 Analyse des spectres d' <i>A. absinthium</i>	67
III.1.3.2 Analyse des spectres de <i>J. phoenicea</i>	72
III.1.3.3 Analyse des spectres de <i>T. articulata</i>	78
III.2. Etude de l'activité biologique des extraits méthanoliques des espèces exploitées	83
III.2.1 Etude de l'activité insecticide	84
III.2.1.1. Evaluation de l'effet insecticide par contact	84
III.2.1.2. Evaluation de l'effet insecticide par traitement des grains	88
III.2.1.3. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la descendance de première génération F1	89
III.2.1.4. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la perte en poids des grains	91
III.2.1.5. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la germination des grains	94
III.2.2 Evaluation de l'activité fongicide des extraits méthanoliques	95
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	99
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	103
ANNEXES	115

LISTE DES FIGURES

FIGURE 01.	Classification de <i>S. oryzae</i> selon l'INPN.....	P. 10
FIGURE 02.	Aspect morphologique de <i>Sitophilus oryzae</i> L.	P. 11
FIGURE 03.	Les quatre états de développement de <i>S. oryzae</i>	P. 11
FIGURE 04.	Identification de <i>S. Oryzae</i> (a) femelle, (b) rostre mâle et femelle.	P. 11
FIGURE 05.	Développement de la nymphe à l'intérieur de la graine.....	P. 13
FIGURE 06.	Schéma simplifié du cycle de développement de <i>S. oryzae</i>	P. 13
FIGURE 07.	Détérioration du blé suite à une infestation par <i>S. oryzae</i>	P. 15
FIGURE 08.	Aspect d' <i>Artemisia absinthium</i> L.....	P. 18
FIGURE 09.	Partie aérienne de <i>Juniperus phoenicea</i> L.....	P. 20
FIGURE 10.	Aspect de <i>Tetraclinis articulata</i>	P. 22
FIGURE 11.	Structure d'un tanin condensé (a) et de tanin hydrolysable (b).....	P. 27
FIGURE 12.	Procédé d'analyse des polyphénols.....	P. 29
FIGURE 13.	UPLC, laboratoire de chimie organique, Université de Lleida-Espagne.....	P. 31
FIGURE 14.	Schéma simplifié du principe de fonctionnement de l'UPLC.....	P. 34
FIGURE 15.	Appareil de RMN dans le laboratoire de chimie organique de l'université de Lleida-Espagne.....	P. 35
FIGURE 16.	Principe de la spectroscopie par RMN.....	P. 38
FIGURE 17.	Laboratoire de chimie organique et analytique de l'UDL.....	P. 40
FIGURE 18.	Schéma du processus d'extraction méthanolique.....	P. 43
FIGURE 19.	Préparation du matériel pour les manipulations UPLC.....	P. 45
FIGURE 20.	Préparations des standards.....	P. 45
FIGURE 21.	Structures chimiques des standards utilisés pour l'identification des polyphénols.....	P. 46
FIGURE 22.	Analyse des extraits méthanoliques par 1H-RMN.....	P. 47
FIGURE 23.	Elevage de <i>S. oryzae</i> au laboratoire de phytopharmacie ENSA.....	P. 48
FIGURE 24.	Réalisation de test insecticide par contact direct.....	P. 49
FIGURE 25.	Séparation des sexes de <i>S. oryzae</i>	P. 50
FIGURE 26.	Réalisation du test insecticide par traitements des grains.....	P. 51

FIGURE 27.	Réalisation de test de germination des grains.....	P. 53
FIGURE 28.	Isolats de <i>Fusarium culmorum</i> et de <i>F. graminearum</i>	P. 54
FIGURE 29.	Réalisation de test d'évaluation de l'activité antifongique.....	P. 56
FIGURE 30.	Rendement de l'extraction méthanolique des trois plantes étudiées	P. 59
FIGURE 31.	Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (solvant utilisé : méthanol absolu).....	P. 60
FIGURE 32.	Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (solvant utilisé : méthanol/eau).....	P. 60
FIGURE 33.	Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (solvant utilisé : méthanol/chloroforme).....	P. 61
FIGURE 34.	Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de <i>Artemisia absinthium</i>	P. 63
FIGURE 35.	Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de <i>Juniperus phoenicea</i>	P. 63
FIGURE 36.	Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de <i>Tetraclinis articulata</i>	P. 65
FIGURE 37.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Amet.....	P. 68
FIGURE 38.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Amew.....	P. 69
FIGURE 39.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Amec.....	P. 70
FIGURE 40.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Jmet.....	P. 74
FIGURE 41.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Jmew.....	P. 75
FIGURE 42.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Jmec.....	P. 76
FIGURE 43.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Tmet.....	P. 79
FIGURE 44.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Tmew.....	P. 80
FIGURE 45.	Spectre 1H-RMN de l'extrait Tmec.....	P. 81
FIGURE 46.	Evolution dans le temps de l'activité insecticide d' <i>A. absinthium</i> sur le pourcentage de mortalité corrigée de <i>S. oryzae</i>	P. 85
FIGURE 47.	Droite de régression de l'effet insecticide par contact d' <i>A.</i> <i>absinthium</i> à l'égard de <i>S. oryzae</i>	P. 86
FIGURE 48.	Evolution dans le temps de l'activité insecticide de <i>J. phoenicea</i> sur le pourcentage de mortalité corrigée de <i>S. oryzae</i>	P. 86
FIGURE 49.	Droite de régression de l'effet insecticide par contact de <i>J.</i> <i>phoenicea</i> à l'égard de <i>S. oryzae</i>	P. 87

FIGURE 50.	Evolution dans le temps de l'activité insecticide de <i>T. articulata</i> sur le pourcentage de mortalité corrigée de <i>S. oryzae</i>	P. 87
FIGURE 51.	Droite de régression de l'effet insecticide par contact de <i>T. articulata</i> à l'égard de <i>S. oryzae</i>	P. 87
FIGURE 52.	Nombre des individus morts après 8j du traitement des grains.....	P. 88
FIGURE 53.	Nombre d'individus émergés (F1) de <i>S. oryzae</i> dans les différents lots de grains.....	P. 90
FIGURE 54.	Durée moyenne du cycle de développement des individus de la F1 du <i>S. oryzae</i> dans les différents lots de grains.....	P. 91
FIGURE 55.	Germination des grains traités par les différents extraits.....	P. 94
FIGURE 56.	Effet des extraits méthanolique sur la souche FC.04.12.....	P. 96
FIGURE 57.	Effet des extraits méthanolique sur la souche FC 06.11.....	P. 96
FIGURE 58.	Effet des extraits méthanolique sur la souche FG.02.12.....	P. 96
FIGURE 59.	Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FC.04.12.....	P. 97
FIGURE 60.	Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FC.06.11.....	P. 97
FIGURE 61.	Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FG.02.12.....	P. 97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01.	Principales classes des composés phénoliques et structure de base	P. 24
Tableau 02.	Espèces botaniques et échantillonnage.....	P. 41
Tableau 03.	Solvants et produits chimiques utilisés.....	P. 41
Tableau 04.	Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par UPLC.....	P. 44
Tableau 05.	Rendement des extractions méthanoliques des différentes espèces	P. 58
Tableau 06.	Polyphénols identifiés par UPLC- PAD-MS pour les trois extraits méthanoliques.....	P. 62
Tableau 07.	Pourcentage des composés phénoliques dans chaque extrait méthanolique.....	P. 65
Tableau 08.	Liste des échantillons RMN, des abréviations, nombres et total d'intensités des signaux observés dans les spectres 1H-RMN.....	P. 67
Tableau 09.	Les principaux composés identifiés par 1H-RMN d' <i>A. absinthium</i>	P. 71
Tableau 10.	Les principaux composés identifiés par 1H-RMN de <i>J. phoenicea</i> ...	P. 77
Tableau 11.	Les principaux composés identifiés par 1H-RMN de <i>T. articulata</i>	P. 82
Tableau 12.	Valeur des DL50 et DL90 du traitement par contact pour chaque extrait.....	P. 84
Tableau 13.	Mortalité moyenne de <i>S. oryzae</i> après 8j de traitement (30mg/cm ²)	P. 85
Tableau 14.	Mortalité de <i>S. oryzae</i> traité avec les différents extraits après (8j) ...	P. 88
Tableau 15.	Mortalité de <i>S. oryzae</i> traité avec les différents extraits après (14j) ..	P. 89
Tableau 16.	Nombre d'émergence de la F1 de <i>S. oryzae</i> dans les différents lots de grain	P. 89
Tableau 17.	Durée moyenne du Cycle de développement de la F1 de <i>S. oryzae</i> dans les différents lots de grain	P. 90
Tableau 18.	Variations de poids en matière sèche des grains après infestation par <i>S. oryzae</i> dans les différents traitements	P. 91
Tableau 19.	Effet des extraits méthanoliques sur la germination des grains	P. 94
Tableau 20.	Effet des extraits méthanoliques sur la croissance mycélienne des souches fongiques	P. 95
Tableau 21.	Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de <i>Juniperus phoenicea</i>	P.116

Tableau 22.	Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d' <i>Artemisia absinthium</i>	P.123
Tableau 23.	Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de <i>Tetraclinis articulata</i>	P.129
Tableau 24.	Evolution de la DL50 par rapport au temps d'exposition des insectes aux extraits méthanoliques	P.134
Tableau 25.	Analyse de la variance des données du test insecticide des extraits par contact.....	P.134
Tableau 26.	Analyse de la variance des données de la mortalité de <i>S. oryzae</i> par traitement des grains après 08jr	P.135
Tableau 27.	Analyse de la variance des données de la mortalité de <i>S. oryzae</i> par traitement des grains après 14jr	P.135
Tableau 28.	Analyse de la variance des données de l'émergence de la F1 du <i>S. oryzae</i>	P.135
Tableau 29.	Analyse de la variance de la durée du cycle de développement de <i>S. oryzae</i>	P.135
Tableau 30.	Analyse de la variance des données liées à la perte en matière sèche des grains dues à l'infestation par <i>S. oryzae</i>	P.136
Tableau 31.	Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FG.02.12	P.136
Tableau 32.	Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FC.06.11	P.136
Tableau 33.	Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FC.04.12	P.136

INTRODUCTION GENERALE

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base du régime alimentaire de l'homme, ainsi qu'un aliment majeur du marché alimentaire international. Le pain, dérivé premier du blé est considéré comme aliment sacré et est le premier produit consommé par les algériens. Selon la FAO, l'Algérie a produit deux millions quatre cent trente-six mille cent quatre-vingt-dix-sept tonnes (2436197 t) de blé en 2014 sur une superficie récoltée d'un million six cent cinquante-et-un mille trois cents onze ha (1651311 ha). Cette production reste très faible et loin de satisfaire les besoins alimentaires de la population algérienne. Les bilans alimentaires affichent qu'un algérien consomme plus de cent quatre-vingt-cinq kg de blé par an (200 kg/an/habitant) (Hamadache, 2017). Ainsi, selon les statistiques du commerce extérieur de l'Algérie, les importations algériennes de céréales (blé, maïs, orge) ont atteint les 13,22 millions de tonnes en 2016 avec un coût d'importation estimé à 2,81 milliard de dollars (Centre National de l'Informatique et des Statistiques, 2016). En plus de la faible production, de nombreuses pertes de produits céréaliers sont encore constatées durant le stockage. Les pertes sont essentiellement dues aux attaques de bactéries, de moisissures, de rongeurs et d'insectes. A l'échelle mondiale, environ 10 à 40% de la perte des grains a été causée par une infestation d'insectes et d'autres bio-agents (Nattudurai et al. 2016). Parmi les insectes ravageurs de grains, on distingue différentes espèces d'acariens, de coléoptères et de lépidoptères, (Haryadi et al., 1994). Ces derniers sont extrêmement destructifs causant ainsi des pertes quantitatives et qualitatives. En outre, certaines conditions physiques, notamment la teneur en eau du grain, l'humidité relative, la température, peuvent entraîner des pertes qualitatives par la dégradation de la qualité des denrées stockées.

Sitophilus oryzae est l'un des ravageurs primaires des céréales, universellement reconnue comme l'un des plus endommageant de différents grains de céréales, notamment le blé. Non seulement en raison de sa propre consommation, mais parce qu'il permet aussi l'installation d'autres ravageurs secondaires tels que *Tribolium castaneum* (Camara, 2009) et plusieurs espèces fongiques comme *Fusarium* sp., en causant des dégâts énormes pouvant aller jusqu'à la perte totale de la production céréalère.

La littérature est remplie de divers dispositifs utilisés pour surveiller, mesurer et lutter contre ces différents agents biotiques, notamment la population d'insectes. Chacun a ses avantages et inconvénients. Néanmoins, l'utilisation des pesticides reste le moyen le plus adapté à nos jours. Pendant très longtemps, la phosphine et le bromure de méthyle ont été utilisés dans le cadre d'une lutte chimique contre les insectes ravageurs des grains entreposés. Le bromure de méthyle a été signalé pour son effet délétère sur la couche d'ozone et la phosphine provoque de graves problèmes de santé pour les êtres humains. La phosphine provoque également une résistance aux pesticides chez les différents organismes nuisibles (Nattudurai et al. 2016). Ces deux insecticides, autorisés pendant des années, sont radiés de la liste des

pesticides homologués. Mais pour autant, ils ne disparaissent pas forcément du fait de leurs utilisations frauduleuses. Les pratiques illégales sont possibles car les mailles des contrôles sont larges, les poursuites rares et les sanctions faibles.

L'Algérie est parmi les premiers utilisateurs mondiaux de pesticides, avec 21999t de matière active de pesticides utilisés en 2014, dont 1230t d'insecticides et 2005t de fongicides et bactéricides (FAO, 2017). Ces substances ne sont pas uniquement utilisées sur les cultures, mais aussi pour la protection des denrées après récolte et le traitement des semences.

Afin de nourrir une population en constante expansion, tout en respectant la santé humaine et l'environnement, il est nécessaire de trouver de nouveaux moyens de protection des cultures, tout en maintenant une agriculture économiquement performante. La recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les chercheurs sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification, à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point des bio pesticides qui ont pour origine des substances naturelles. Ces molécules qui constituent le principe actif des plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes.

Les travaux décrits dans cette thèse apportent une nouvelle contribution sur l'utilisation des métabolites secondaires de trois espèces de plantes à savoir l'absinthe *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), le genévrier phénicien *Juniperus phoenicea* L. et le cyprès de l'Atlas *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae), des plantes largement utilisées en médecine traditionnelle, dans la lutte contre *Sitophilus oryzae* L.

Après une présentation détaillée des différents paramètres de notre étude et l'exposition de la problématique concernant *Sitophilus oryzae*, La contribution majeure de ce travail sera de proposer de nouvelles solutions biologiques, inspirées des résultats récents des études scientifiques dans le domaine de protection des plantes, pour lutter contre le charançon du riz.

Le matériel et la méthodologie de recherche sont traités dans le deuxième chapitre. Nous avons mis en évidence le matériel et l'appareillage utilisé, et les méthodes d'analyses. Nous devons souligner que la méthodologie de recherche appliquée se repose sur des références internationales.

Dans un premier lieu, un screening phytochimique des extraits méthanoliques d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* a été réalisé au laboratoire de chimie organique de l'université de Lleida en Espagne. Ceci s'inscrit dans un cadre d'une valorisation des plantes aromatiques et médicinales de l'Algérie, et afin de connaître leurs principaux constituants et ainsi mieux comprendre les propriétés phytopharmaceutiques de ses extraits. L'analyse chimique a été menée par l'utilisation de deux méthodes basées sur la spectrométrie

de masse (MS) et la spectroscopie, qui constituent les approches les plus réussies pour déterminer l'état métabolique d'un organisme. Il s'agit de L'UPLC (Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance) qui a pour objectif de séparer, quantifier et identifier les constituants des extraits méthanoliques à étudier, et la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) qui offre un certain nombre d'avantages informations sur la résolution atomique, permettant la caractérisation de la structure chimique des métabolites. L'UPLC et RMN offrent différentes forces, qui peuvent être utilisés de manière synergique.

Dans un second lieu, une évaluation des propriétés biologiques de ces extraits, principalement insecticides, a été procédée, d'autant qu'à notre connaissance, ces espèces n'ont pas été testées dans un cadre de lutte contre le charançon du riz. L'effet insecticide portera essentiellement sur quelques paramètres biologiques du ravageur *S. oryzae*, étant donné que ce dernier est responsable des pertes considérables dans les stocks causant une détérioration de la qualité alimentaire et l'installation d'infections cryptogamiques. De plus, l'activité fongicide des extraits méthanoliques a été évaluée sur deux espèces fongiques associées à *S. oryzae* dans les stocks soit *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*.

La dernière partie se réfère aux perspectives qui concernent le développement des méthodes de contrôles et de protection des céréales stockées en Algérie. Les objectifs pour le futur visent le développement en plan économique de secteur agricole de notre pays.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. GENERALITÉS SUR LES DENREES STOCKEES

I.1.1 Description

Les denrées stockées constituent le groupe de produits agricoles les plus échangés sur les marchés internationaux. Le secteur des céréales occupe une place très importante dans l'économie mondiale notamment l'algérienne. Cependant, les céréales sont produites sur une base saisonnière, et dans de nombreux pays, il n'y a qu'une seule récolte par an, ce qui peut augmenter les risques de pertes. Cela signifie que, pour nourrir la population mondiale, la majeure partie de la production mondiale de maïs, de blé, de riz, de sorgho... doit être tenue dans le stockage pour des périodes variant d'un mois à plus d'un an (Proctor, 1994). Le stockage des céréales occupe donc une place essentielle dans les économies des pays développés et en voie de développement.

Devant la place qu'occupe le blé dans le mode de consommation de sa population, l'Algérie appartient au groupe des plus gros importateurs de blé dans le monde où elle est classée à la première place en Afrique et à la troisième place dans le monde après le Brésil et l'Egypte. Selon la FAO (2017), l'Algérie a produit deux millions quatre cent trente-six mille cent quatre-vingt-dix-sept tonnes (2436197 t) de blé en 2014 sur une superficie récoltée d'un million six cent cinquante-et-un mille trois cents onze ha (1651311 ha). Cette production reste très faible et loin de satisfaire les besoins alimentaires de la population algérienne. Les bilans alimentaires affichent qu'un algérien consomme plus de cent quatre-vingt-cinq kg de blé par an (185.42 kg/an/habitant). Ainsi, les importations algériennes de céréales (blé, maïs, orge) ont atteint 1,89 milliard de dollars au 1er semestre de 2015, contre près de 1,77 milliard à la même période de 2014, soit une hausse de 7,3% selon les Douanes. Pour faire face à une demande alimentaire sans cesse croissante, les importations peuvent être aussi massives que nécessaires. Il s'agit donc de les prévoir, les financer et les stocker.

I.1.2 Le stockage

L'un des facteurs clés de la sécurité alimentaire demeure une bonne conservation des récoltes et donc un bon stockage. Ce moyen constitue l'un des facteurs clés pour assurer de façon durable la sécurité alimentaire d'un pays (Maazoun et *al.*, 2017). La plus grande difficulté de stockage réside dans les contraintes liées aux attaques des ravageurs, dont les plus importants sont les insectes. Ces derniers peuvent entraîner d'énormes pertes financières, des risques d'intoxication liés à la consommation des produits avariés ce qui rend la denrée impropre à la consommation, même pour le bétail et cause des risques de pénuries alimentaires (Schiffers et *al.*, 1988).

I.1.2.1 Succession des peuplements

Les ennemis du stockage se classent en trois groupes principaux : les espèces bactériennes et pathogènes, les insectes et les rongeurs (rats et souris) (De Groot, 2004). Parmi tous ces organismes vivants, les insectes forment l'une des communautés les mieux adaptées à l'écosystème des stocks.

La coexistence de différentes espèces d'insectes en même temps dans un stock donné de céréales peut être due à leur rôle dans la succession écologique, et une conséquence directe des différences dans la façon dont chaque insecte infeste le produit céréalier. Les ravageurs primaires sont capables d'exploiter des grains sains en cassant leurs enveloppes dures telles que l'alucite des céréales *Sitotroga cerealella*, le capucin des grains *Rhizopertha dominica* et le charançon du riz *Sitophilus oryzae*. Certaines espèces pondent leurs œufs à l'intérieur de la graine et les larves se développent à l'intérieur aussi. D'autres pondent leurs œufs à la surface de la graine et les larves pénètrent l'enveloppe dure de la graine et se nourrissent dedans. On distingue aussi des ravageurs secondaires, ceux qui exploitent des grains cassés ou des grains déjà endommagés par des ravageurs primaires comme le sylvain du grain *Oryzaephilus surinamensis*. Et enfin, les ravageurs tertiaires qui se nourrissent de grains cassés, de poussières de graines et de la poudre laissée par les groupes précédents (De Groot, 2004 ; Athanassiou et al., 2017).

I.1.2.2 Protection des denrées stockées

Les dommages causés par les insectes dans les grains stockés peuvent être réduits ou contrôlés en utilisant des techniques telles que des pratiques d'hygiène appropriées aux lieux de stockage, l'utilisation des poudres inertes naturelles (Argile poudrée, sable, terre, la terre à diatomées ...), l'application d'insecticides, l'aération pour réduire les températures des grains, la création de conditions atmosphériques modifiées, le stockage dans des sacs de graines traités avec des insecticides... Ces pratiques de gestion intensive peuvent réduire les pertes de grains à moins de 1% pour un an de stockage ou plus longtemps. Si les insectes ne sont pas contrôlés, les pertes peuvent être de 20 à 80% en quelques mois après la récolte (Dowell et Dowell, 2017).

D'après Isman (2006), plusieurs pays en développement ont encore recours au dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et autres polluants organiques persistants (POP). Les organophosphorés, les pyréthroïdes ou encore les fumigations d'aluminium phosphide (Phostoxin®) sont généralement les produits chimiques utilisés actuellement en Algérie. Dans des conditions optimales, leur efficacité à contrôler les insectes nuisibles des stocks est certaine. Toutefois, ils sont neurotoxiques sur les vertébrés (Gibbons et al., 2014) et présentent

beaucoup d'inconvénients et ne donnent plus satisfaction par rapport à la durabilité des agroécosystèmes (perte de diversité biologique, dégradation de la qualité physico-chimique du milieu) et l'apparition de graves déséquilibres dans le milieu telles que la pollution des eaux et la contamination du sol et de l'air (Regnault-Roger et *al.*, 2002 ; Gueye et *al.*, 2011). De plus, le bromure de méthyle a été signalé pour son effet délétère sur la couche d'ozone et la phosphine provoque de graves problèmes de santé pour les êtres humains. La phosphine provoque également une résistance aux pesticides chez les différents organismes nuisibles (Nattudurai et *al.* 2016). Ces deux insecticides, autorisés pendant des années sont frappés d'interdiction. Mais pour autant, ils ne disparaissent pas forcément du fait de leurs utilisations frauduleuses. Les pratiques illégales sont possibles car les mailles des contrôles sont larges, les poursuites rares et les sanctions faibles.

Ainsi, l'utilisation des pesticides de synthèse contre les insectes ravageurs des cultures et des denrées stockées en particulier, repose sur deux critères primordiaux : la connaissance de la bioécologie et de la physiologie de l'insecte ainsi que le choix de l'insecticide. Ce dernier doit répondre à certains critères : être capable d'agir sur le plus grand nombre possible de ravageurs des denrées stockées et ne pas persister dans l'environnement. Nous retiendrons ainsi que les molécules recherchées doivent être efficaces uniquement sur les insectes ciblés et ne pas avoir d'incidence sur les vertébrés non nuisibles. Le moyen le plus logique pour approcher cet objectif est de trouver aux insecticides des cibles qui n'existent que chez les insectes ou chez les acariens (Gadenne et *al.*, 1990). De plus, les questions environnementales sont devenues une préoccupation internationale, majeure et croissante, en particulier à travers la convention sur la conservation de la diversité biologique et le plan d'action mondiale recommandant des pratiques agronomiques durables.

L'utilisation de matériel végétal à partir de plusieurs espèces botaniques pour protéger les grains emmagasinés contre les insectes des céréales stockées est examinée. Des programmes de recherche sur les plantes à effet insecticide ont débouché sur de très nombreuses communications et publications scientifiques à travers le monde (Mouhouche et Fleurat- Lesard 2005 ; Mouhouche et *al.*, 2009 ; Karbache et Mouhouche 2011 ; Akhtar et *al.*, 2013 ; Hasan et *al.*, 2015...). Ces travaux ont largement contribué à une meilleure compréhension des activités insecticides, répulsives et antiappétantes de certaines substances végétales vis-à-vis des insectes. Plusieurs familles de plantes sont utilisées dans ce contexte. Les Fabaceae, les Meliaceae, les Rutaceae, les Asteraceae, les Lamiaceae, les Piperaceae, les Verbeanaceae, les Annonaceae et les Cupressaceae sont parmi les familles les plus expérimentées pour leur effet de contact (Akhtar et *al.*, 2013 ; Hosseyni et *al.*, 2013).

En outre, plusieurs travaux ont montré que les huiles essentielles des plantes sont

biologiquement actives contre les ravageurs des denrées stockées par contact direct ou par inhalation. Le spectre d'action des huiles essentielles est très diversifié ; elles jouent un rôle de régulateur de croissance et possèdent des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Goudoum et *al.*, 2010). Rajendran et Spiranjini (2008) ont montré que les huiles essentielles appartenant principalement aux Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae et leurs composants dont les monoterpénoïdes testées pour leur toxicité fumigène sont efficaces contre plusieurs les ravageurs des denrées stockées, notamment ceux du genre *Sitophilus*.

I.2 MODELE D'ETUDE : *SITOPHILUS ORYZAE*

Le charançon du riz, *Sitophilus oryzae* (L.) est l'une des espèces d'insectes les plus répandus et destructeurs des grains stockés (Maazoun et *al.*, 2017). C'est une espèce à répartition cosmopolite, très commune dans les régions tropicales et subtropicales du monde. L'Inde est considérée comme la terre natale de *S. oryzae* (Zacher 1937 in Nattudurai et *al.* 2016).

Il peut ravager de nombreuses cultures, notamment le blé, le riz, le maïs, les pois cassés et le pois chiche (Damian Flay, 2010). *S. oryzae* provoque des dommages quantitatifs et qualitatifs aux grains stockés en réduisant leur valeur marchande. La larve de ce charançon consommerait 10 mg de grains pendant son développement alors que l'adulte consommerait 0,49 mg par jour. Le charançon du riz infeste caractéristiquement les grains entiers de céréales, mais peut se reproduire dans d'autres produits, telles que les légumineuses notamment les pois cassés et les pâtes. La capacité de *S. oryzae* à infester tous les grains de céréales rend son contrôle une priorité.

I.2.1 Classification

Sitophilus oryzae L. est un arthropode, appartenant à l'Ordre des Coleoptera, de la superfamille des Curculionidae, et la famille des Dryophthorinae (Figure 1). Les Curculionidae constituent la plus grande famille de Coléoptères (environ 50000 espèces), et même la plus grande famille d'insectes (Perrin, 1991 in Charles, 1997). Le genre *Sitophilus* est d'un grand intérêt scientifique car il comprend des espèces largement répandues, fréquemment signalées comme étant invasives des grains stockés. Ce genre a été initialement décrit comme ***Curculio*** Linnaeus, 1758 et ensuite comme ***Calandra*** Clairville & Schellenberg, 1798, et enfin comme ***Sitophilus*** Schoenherr, 1838. Quatorze espèces ont été décrites dans le genre *Sitophilus*, mais seulement trois sont considérées comme des insectes nuisibles d'importance économique. C'est les espèces inféodées aux céréales *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius* et *Sitophilus zeamais* en raison de leur extraordinaire potentiel de destruction des céréales entreposées (Correa et *al.*, 2013).



Figure 01. Classification de *S. oryzae* selon l'Inventaire National du Patrimoine Naturel INPN (2017)

I.2.2 Morphologie

Les adultes de *S. oryzae* sont noirs foncé brunâtre (2-4 mm de long) avec un long rostre et quatre petites taches de couleur brun clair sur les élytres arrière (Figure 2). Le prothorax est recouvert de piqûres rondes ou irrégulières et les élytres ont des rangées de points à l'intérieur des rainures longitudinales. Les larves sont apodes avec un corps blanc de couleur crème et tête noire sous forme de capsule, elles mesurent de 2,5 à 3 mm. Les mâles et les femelles sont semblables en apparence, mais peuvent être identifiés. En effet, les mâles ont des indentations plus larges et irrégulières sur leur rostre qui est plus court (Figure 4b). Les femelles ont un rostre plus long et plus mince avec des indentations peu profondes fonctionnant de manière uniforme vers le bas du rostre (Figure 4b). La nymphe est morphologiquement identique à l'imago. L'œuf est oblong, blanc brillant et mesure en moyenne 0,5*0,3 mm. L'insecte vole rarement, mais peut monter sur des surfaces verticales notamment les bocaux en verre (Balachowsky, 1963 ; Damian Flay, 2010).



Figure 02. Aspect morphologique de *Sitophilus oryzae* L. (J. Rheinheimer, INPN, 2017)



Figure 03. Les quatre états de développement de *S. oryzae*. (a) Œuf, (b) Nymphe, (c) Larve et (d) adulte (Canadian Grain Commission, 2013)

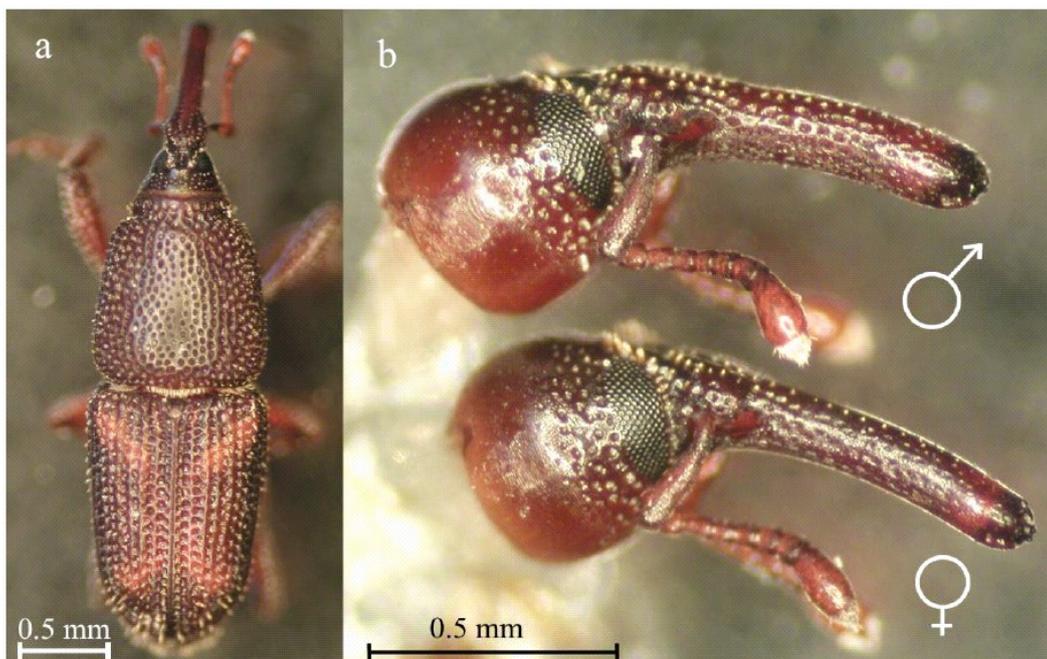


Figure 04. Identification de *S. Oryzae* (a) femelle, (b) rostre mâle et femelle (Damian Flay, 2010)

I.2.3 Répartition géographique

Sitophilus oryzae vit dans les pays chauds. C'est le premier ravageur mondial par sa fréquence dans les échantillons et par ses dégâts occasionnés sur les céréales. L'Inde est considérée comme la terre natale de *S. oryzae* (Zacher 1937 in Nattudurai et al. 2016). Il est très commun dans les régions tropicales et subtropicales du monde. Il se rencontre, d'autre part, en Afrique du Nord, notamment en Algérie et au Maroc, dans les légumineuses telles que le pois chiche et le niébé. Certains auteurs soulignent que les espèces de charançons se rencontrent sur des substrats nutritifs très différents. L'adulte peut se nourrir de farine, de semoule, de graines concassées, mais les femelles ne pondent que dans des grains ou des morceaux de grains suffisamment grands (Kouassi, 1991).

I.2.4 Cycle de Développement

Les femelles commencent à pondre des œufs 4-5 jours après l'émergence. Elles pondent 2-6 œufs par jour, à l'intérieur des grains de blé dans un trou perforé par le rostre. Ce trou est ensuite rebouché par une sécrétion mucilagineuse de l'oviducte qui durcit rapidement à l'air. La ponte persiste toute au long de la vie de l'insecte. Une femelle peut pondre jusqu'à '400 œufs. Le développement de la larve passe par quatre stades larvaires, la larve de dernier stade se transforme en nymphe qui donne un adulte à l'intérieur de la graine (Figure 5), ensuite les adultes quittent le grain. L'incubation dure 10 à 15 J. Les adultes peuvent vivre entre 4 à 5 mois ils peuvent survivre jusqu' à deux ans dépendant des conditions du milieu (Nardon, 1963).

Tout le cycle se déroule à l'intérieur du grain en 4 à 7 semaines à 25-30°C environ, en 15 semaines à 18°C, et le développement s'arrête au-dessous des 15°C. Le nombre de génération est estimé entre 5 à 8 générations par an dépendant des facteurs environnementaux (Balachowsky, 1963). Le grain de céréale apporte à l'insecte à la fois sa nourriture et sa protection. Les conditions favorables pour la croissance des adultes sont entre 25-30°C et à 70-80 % RH. Les adultes).

Selon Paliwal et al. (2004) la détection des états de développement de *S. oryzae* ne s'effectue que par la spectroscopie à infrarouge. Ce sont les orifices de sorties des adultes qui permettent de repérer l'infestation.



Figure 05. Développement de la nymphe à l'intérieur de la graine (US Department of Agriculture, Agricultural Research Services, 2015)

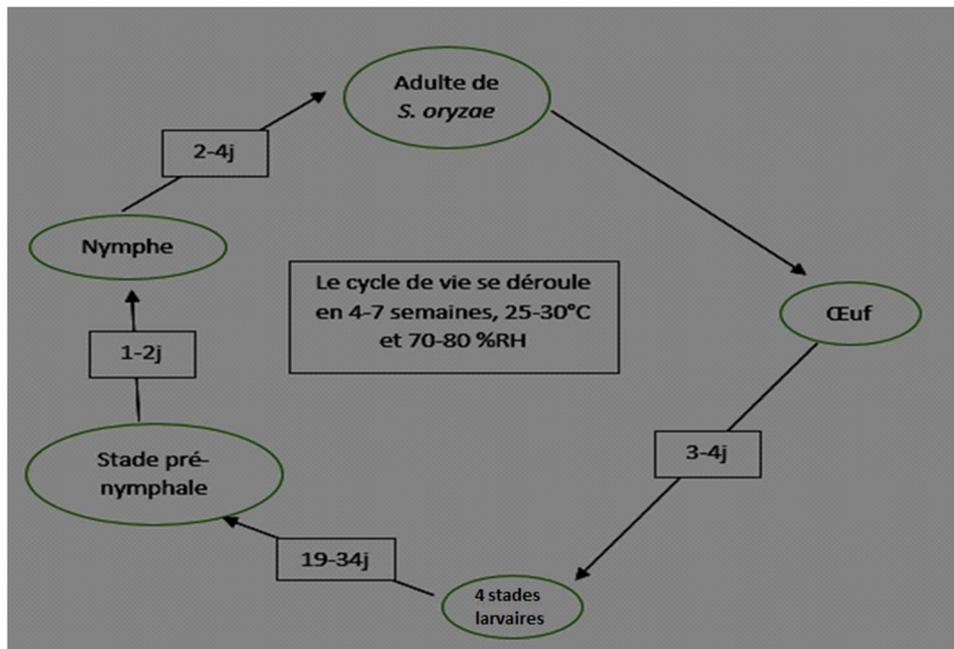


Figure 06. Schéma simplifié du cycle de développement de *S. oryzae* (établi selon la description de Balachowsky, 1963)

I.2.5. Dégâts de l'infestation

Les principaux dégâts d'une infestation par *S. oryzae* est le dommage causé aux grains par les activités d'alimentation des adultes et des larves. Les pertes peuvent aller de 5 à 10% dans

les régions tempérées, et de 20 à 30% dans les zones tropicales (Singh et *al.*, 2017). Les mâles et les femelles se nourrissent en mâchant des trous dans le grain. Les femelles perforent à l'aide de leurs rostre un trou profond avec des côtés élargis dans lequel elles placent un œuf. L'éclosion de l'œuf donne naissance à une larve néonate qui creuse le grain pour s'alimenter et se développer et avant d'émerger comme un adulte pour poursuivre le cycle (Damian Flay, 2010). Le processus d'alimentation réduit la qualité et le poids du grain et produit de grandes quantités de poussières de céréales (Figure 7). En effet, les pertes en matière sèche causées par *S. oryzae* sont très élevées et ont été estimées entre 10-15% pour les grains de blé (Mohammad, 2000 ; Maazoun, 2017). Rajashekar et *al.* (2010) ont signalé environ 20 à 25% de perte de production céréalière alimentaire (environ 250 millions de tonnes) due à une infestation par divers insectes ravageurs des stocks en Inde.

En outre, La poussière de grain attire les ravageurs secondaires comme *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus), *Tribolium castaneum* (Herbst), les sylvains et les acariens qui consomment les poussières de céréales et de grains cassés. L'activité de *S. oryzae* augmente également la température et l'humidité des céréales infestées ainsi que l'augmentation du taux de ravageurs secondaires et rendant les conditions optimales pour les agents pathogènes et toute nouvelle infestation (Hardman 1977; Longstaff 1981).

Selon DE LUCA (1975), certains champignons du champ peuvent se développer dans les denrées stockées en fonction de l'humidité relative de celles-ci. En plus des pertes de rendement, et la réduction du pouvoir germinatif des grains, ces espèces pathogènes produisent des mycotoxines nocives, ce qui peut être plus important que la réduction du rendement dans de nombreux cas. Parmi les espèces de champignons mycotoxigéniques, les espèces de *Fusarium* sont reconnues comme les plus importantes dans les régions tempérées. Elles sont responsables de la production de plus de 35 mycotoxines. Les principales toxines produites par *Fusarium* spp. qui s'attaquent à la culture de blé sont les trichothécènes, la zéaralénone et les fumonisines (Sebastià et *al.*, 2012 in DANE, 2012). Ces derniers menacent la santé humaine et ont un effet mutagène et cancérigène.



Figure 07. Détérioration du blé suite à une infestation par *S. oryzae* (a, b et c), (Original : photos prises lors des essais au laboratoire de phytopharmacie, ENSA (2014) après 6 mois d'infestation du blé tendre).

Le degré des dommages causés par les insectes de stock dépend essentiellement de l'état physico-chimique et la sensibilité variétale des espèces de céréales. En effet, Les pertes infligées par le charançon peuvent être faible pour le blé dur, alors qu'elles peuvent atteindre des niveaux élevés à très élevés pour le blé tendre et le triticales. L'analyse de sensibilité au charançon *Sitophilus oryzae* des espèces et variétés de céréales produites en Algérie pour l'alimentation humaine (blé dur, blé tendre) et animale (triticales) a montré que l'état physico-chimique du grain joue un rôle prépondérant sur le niveau de dommages causés par l'insecte

granivore. Fourar-Belaifa et Fleurat-Lessard (2015) confirment que cet insecte ne pouvait se développer dans les grains de blé dur à une teneur en eau inférieure ou égale à 12%. Au-dessus de cette limite, le développement de l'insecte est possible avec une dynamique moindre sur blé dur que sur blé tendre et triticale, espèces qui se sont avérées plus vulnérables aux attaques du charançon que le blé dur.

I.3. PRESENTATION DES TROIS ESPECES BOTANIQUES EXPLOITEES

L'Algérie par sa position géographique présente une grande diversité de biotope occupée par une importante richesse floristique, très diversifiée en taxons. Cette diversification est le reflet d'une richesse écosystémique (zones humides, les massifs montagneux, les écosystèmes steppiques, sahariens et marins), mais aussi climatiques et géographiques. Ainsi, Les plantes aromatiques et médicinales connaissent de nos jours un intérêt grandissant en termes de leur importance économique, sociale, médicale et écologique. Elles sont actuellement devenues au centre des préoccupations des politiques sectorielles et des orientations stratégiques de l'économie mondiale.

Artemisia absinthium L. (Asteraceae) communément connue sous le nom de l'absinthe, le genévrier de Phénicie *Juniperus phoenicea* L. et le cyprès d'Atlas *Tetraclinis articulata* (Vahl) (Cupressaceae), sont parmi les plantes les plus utilisées dans la pharmacopée traditionnelle en raison de leurs activités biologiques (Riahi et al, 2013 ; Djouahri et al., 2014). Des études antérieures ont été réalisées pour évaluer les activités antioxydantes des huiles essentielles de ces plantes. Cependant, selon notre connaissance, peu d'études ont porté sur l'utilisation des extraits méthanoliques de ces plantes pour protéger les denrées stockées, notamment en Algérie, ce qui nous a poussés à approfondir les recherches sur ces trois espèces botaniques très répandues en Algérie. Et de ce fait, L'intérêt que nous portons à l'étude de ces espèces vise principalement à valoriser les plantes locales particulièrement dans le domaine phytopharmaceutique.

I.3.1 L'absinthe *Artemisia absinthium* L. 1753

Les plantes aromatiques de la famille Asteraceae constituent de loin la famille la plus importante de notre territoire. Plusieurs espèces de cette famille sont utilisées dans notre pays comme antiseptique, anti-inflammatoire, antirhumatismale, antimicrobienne, pour traiter les maladies d'estomac et pour soulager les douleurs ...

I.3.1.1 Position taxonomique

L'absinthe fait partie des angiospermes, de l'ordre des Asterales appartenant à la

famille des Asteraceae et la sous-famille des Asteroideae. Le genre *Artemisia* avec le nom commun en Anglais « Wormwood » est un genre hétérogène, composé de plus de 500 espèces diverses réparties principalement dans les zones tempérées d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Nord (Acheuk et al., 2017) dont 11 sont présentes en Algérie (Derradji Heffaf, 2013), entre autre *Artemisia absinthium* connue aussi sous les noms : Herbe-aux-vers, armoise amère, herbe sainte et alvine, ainsi qu'en arabe algérien « Chedjerat Meriem ». L'Absinthe a été appelée par Lamarck *Absinthium vulgare* et par Richard A. *officinale*. Elle était alors regardée comme un genre distinct, par la suite Linné l'a réunie aux *Artemisia* (Cazin, 1868).

L'absinthe doit son nom à une déesse grecque « Artémis », qui se servait soi-disant de cette plante pour empoisonner ses ennemis.

Le jus d'absinthe est fort amer, mais il guérit du mal de mer

Rien que de toucher à l'absinthe, fait avorter la femme enceinte !?

I.3.1.2 Description et caractéristiques

C'est une plante herbacée et vivace, recouverte de poils soyeux blancs argentés et de nombreuses glandes oléifères. La tige est de couleur vert argent, assez forte, dressée, rameuse, cannelée, atteignant 60 à 70 centimètres et même un mètre de hauteur, ramifiée et très feuillée. Elle se distingue de l'armoise *Artemisia vulgaris* par ses feuilles grises verdâtres dessus, blanchâtres dessous, soyeuses, à la découpe obtuse caractéristique, à l'odeur fortement aromatique, sa saveur est excessivement amère et pénétrante (accentuée quand on les froisse). Les feuilles basilaires mesurent jusqu'à 25 cm de long, et sont longuement pétiolées. Les feuilles caulinaires sont brièvement pétiolées, moins divisées. Les feuilles au sommet peuvent même être simples et sessiles (sans pétiole). La plante possède un rhizome dur. La floraison a lieu de juillet à septembre. Les fleurs sont jaunes, tubulaires, réunies en capitules (Composée) globuleux, penchés, à leur tour réunis en panicules feuillés et ramifiées. Les fruits sont des akènes (Figure 8). La culture d'absinthe demande une terre légère, une exposition chaude et du soleil (Cazin, 1868).

I.3.1.3 Propriété et usages

L'absinthe a été utilisée en médecine depuis les temps des Grecs de l'antiquité, ainsi qu'en Europe occidentale dans la médecine traditionnelle. La plante est réputée vermifuge, antiseptique, insectifuge, anti malarique, apéritive, eupeptique, diurétique, vulnéraire, cholérétique, active contre les leucorrhées et les aménorrhées (Lamarti et al., 1996 ; Khanahmadi et al., 2017). En effet, les huiles essentielles qui se produisent dans les fleurs et les parties aériennes d'*A. absinthium* ont des propriétés antimicrobiennes. En outre les extraits

aqueux d'*A. Absinthium* sont riches en acides cafféoyl et dicafféoylquinique qui sont connus pour inhiber les virus génétiques (Fiamegos et *al.*, 2011). En outre, ces composants sont hépatoprotecteurs (protecteur du foie - tonifie, équilibre, fortifie, désintoxique et protège le foie, également équilibre les enzymes du foie), antihistaminiques, hypocholestérolémiants, antispasmodiques, et potentiellement antimicrobiens. Ils démontrent également une activité antioxydante élevée en raison de leurs groupes o-quinone. Les acides cafféoylquiniques pourraient inhiber les dommages oxydatifs à la fois à cause d'une baisse de lipoprotéines et de l'acide linoléique en piégeant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) liés au cancer et les maladies cardiovasculaires. Ça a été rapporté aussi que l'acide chlorogénique (acide 5-O-caféoylquinique) avait un effet inhibiteur sur la carcinogénèse dans le gros intestin, le foie, et de la langue, et présentait des effets protecteurs sur le stress oxydatif *in vivo* (Ohnishi et *al.*, 1994 in Fiamegos et *al.*, 2011).



Figure 08. Aspect de la partie aérienne d'*Artemisia absinthium* L. (a) Feuilles (original) et (b) Fruit, Fair Dinkum Seeds 2015).

De plus, Le genre *Artemisia* est une source riche de biopesticides. Des études ont montré que les huiles essentielles d'*A. absinthium* repoussent les puces, les moustiques et tuent les mouches domestiques et présentent une propriété acaricide (Chiasson et al., 2001).

1.3.2 Le genévrier phénicien *Juniperus phoenicea* L. 1753

Les cupressacées est une famille de conifères comprenant des espèces d'arbres et d'arbustes qui sont généralement résineux et aromatiques. Entre autres, le genre *Juniperus*, connu pour son utilisation dans différentes cuisines européennes comme épice, aromatisant pour les boissons alcoolisées, dans les cosmétiques et pour ses bienfaits en médecine traditionnelle.

1.3.2.1 Position taxonomique

Juniperus phoenicea (Genévrier de Phénicie, "Araar" en commun) est une gymnosperme appartenant à l'ordre des Pinales et à la famille des cupressacées. D'origine américaine, asiatique, africaine et européenne, Le genre *Juniperus* se compose de 67 espèces et 37 variétés rigides aux aiguilles piquantes et des variétés souples aux feuillages en écailles. (En utilisant la catégorie des variétés plus largement acceptée au lieu de la catégorie des sous-espèces) (Bekhechi et al., 2012). La flore algérienne liste deux sections ; la section **Oxycedrus** avec les deux espèces *J. communis* et *J. oxycedrus*, et la section **Sabina** avec *J. thurifera*, *J. phoenicea* et *J. sabina* (Quezel et Santa, 1963). En Afrique du Nord, il est principalement trouvé en Libye, en Algérie, au Maroc et aux îles Canaries (Bachir Raho et al., 2017).

1.3.2.2. Description et caractéristiques

Le Genévrier de Phénicie est un petit arbre sauvage qui pousse autour du bassin méditerranéen, du Portugal à Israël, ainsi qu'en Afrique du Nord (Algérie et Maroc), les îles Canaries, et l'île de Madère. L'aire de répartition du genévrier rouge (Genévrier de Phénicie) s'intercale entre les formations steppiques de basse altitude et les formations forestières et pré-forestières à chêne vert. Cette position confère au *J. phoenicea* un rôle écologique considérable du fait qu'il se comporte comme un élément de forte résistance à l'érosion éolienne et à la pression anthropique (Bekhechi et al, 2012; Bachir Raho et al., 2017).

C'est un arbre branchu pouvant atteindre huit (8) mètres de hauteur, possédant un tronc court qui peut atteindre deux (2) mètres de circonférence. Il se reconnaît à ses rameaux couverts de feuilles très courtes et très imbriquées sur six (6) rangs ressemblant à des écailles, à apex peu aigu, de couleur assez terne. Cette espèce est monoïque, la floraison a lieu pendant l'hiver et la fructification à la fin de l'été de l'année suivante. A maturité, les fruits sont bruns- rouges et luisants (Figure 9). Elle devient de plus en plus rare sous l'effet de son exploitation abusive, son bois est très recherché comme combustible et fournit un charbon très

apprécié (Le Floc'k, 1983 in Akrou, 2004).

I.3.2.3. Propriété et usages

Le genévrier de Phénicie est une plante médicinale largement utilisée traditionnellement. Le mélange des feuilles et des cônes de *J. phoenicea* est utilisé comme hypoglycémique, tandis que les feuilles toutes seules sont utilisées contre les maladies broncho-pulmonaires, pour soigner le diabète et le rhumatisme et en tant que diurétique. Les fruits séchés et réduits en poudre peuvent guérir les ulcérations de la peau et les abcès (Barrero et al., 2004 ; Le Floc'k, 1983 in Akrou, 2004 ; Bachir Raho et al., 2017).



Figure 09. Partie aérienne de *Juniperus phoenicea* L. (a) feuilles, (b) fruits. (Original)

L'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des feuilles de *J. phoenicea* a été démontrée et confirmée par plusieurs chercheurs. En effet, l'huile essentielle présente un effet inhibiteur contre différentes bactéries, notamment *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* et *Streptococcus mutans*, contre les champignons filamenteux comme *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Macrophomina phaseoli* et *Trichoderma viride*, et des espèces de levures comme *Candida de pseudotropicalis*, *C. albicans*, *C. carlsbergensis*, et *Rhodotorula minuta* (Angioni et al, 2003 ; Mansouri et al., 2011 ; Bachir Raho et al., 2017). De plus, Bekhechi et al. (2012) ont rapporté que les extraits méthanoliques des feuilles de *J. Phoenicea* révèlent une activité antioxydante plus élevée que les huiles essentielles.

Selon plusieurs études, ces propriétés sont liées essentiellement à la présence d'une grande variété de métabolites secondaires particulièrement les composés phénoliques, dont les diterpénoïdes, biflavonoïdes, lignanes, glucosides phényles-propanoïde, glucosides furanone, les dérivés de bis-furanone, ainsi que norterpène et sesquiterpéniques glucosides (Bekhechi et *al.*, 2012).

I.3.3 Le cyprès d'Atlas *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. 1892

Le cyprès de l'Atlas, ou thuya de Berbérie, arbre résineux de la famille des cupressacées, répété pour son activité biologique intéressante et ses bienfaits en médecine traditionnelle, constitue la troisième espèce botanique exploitée dans notre étude.

I.3.3.1. Position taxonomique

Tetraclinis articulata (Vahl) Masters, également connu sous *Thuja articulata* Vahl ou *Callitris quadrivalvis* Vent. est une essence endémique de la Méditerranée sud occidentale, en particulier les pays du Maghreb (d'où son appellation thuya du Maghreb ou thuya de Berbérie), où sa densité décroît d'ouest en est. Ainsi, Azzaoui et *al.* (2011) reportent que l'espèce couvre une superficie de 161000 ha en Algérie, et occupe la troisième place après le pin d'Alep et le chêne vert. Elle est présente dans les collines et basses montagnes, très commune dans le secteur oranais, sous-secteur des sahels littoraux, des plaines littorales et le sous-secteur de l'atlas tellien. De plus, elle est assez commune dans le secteur algérois et le sous-secteur des hauts plateaux et très rare dans la grande Kabylie (Quézel et Santa., 1963).

Elle fait partie de l'ordre des Pinales et appartient à la famille des Cupressacées, sous famille des Callitroidées. C'est la seule espèce représentant ce genre dans l'hémisphère nord (Herzi et *al.*, 2013 ; El Mouridi, 2011).

I.3.3.2. Description et caractéristiques

T. articulata est une espèce de conifère, résineuse à feuilles persistantes. Elle constitue un élément important dans la végétation nord-africaine. C'est une espèce monoïque avec une floraison au printemps, à croissance très lente. C'est un arbre dont la taille ne dépasse pas généralement douze (12) à quinze (15) m de haut, six (6) à huit (8) m de hauteur en moyenne, et trois cent cm de diamètre. Les fleurs en chatons situées à l'extrémité des rameaux. Le fruit est un cône d'allure cubique s'ouvrant par quatre valves sous l'effet de la chaleur libérant ainsi six graines ailées (Figure 10). L'espèce est souvent connue pour sa loupe: un renflement de sa souche se développant au niveau du collet et de la racine. Cette loupe offre un bois de bonnes qualités (dur, homogène et à grain fin) (Quézel et Santa., 1963 ; Camara 2009 ; El Mouridi., 2011 ; Abbas, 2014).

Son aire de répartition se situe dans l'étage bioclimatique semi-aride tempéré et chaud. Elle se développe aussi dans les domaines subhumides et arides supérieurs, indifféremment de la nature du sol : calcaire ou siliceux (Abi-Ayad, 2009 ; El Mouridi., 2011).

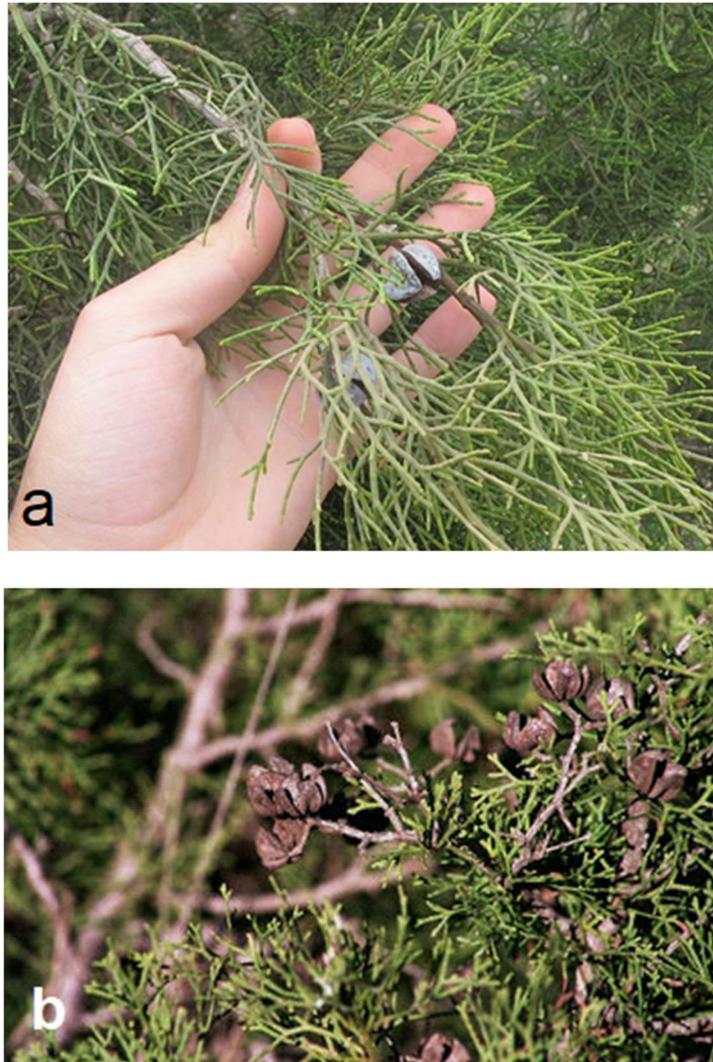


Figure 10. Aspect de la partie aérienne de *Tetraclinis articulata*. (a) Feuilles, (b) Fruit (original)

I.3.3.3. Propriétés et usages

Le bois de Thuya est surtout utilisé dans le secteur artisanal en menuiserie et en ébénisterie ou comme bois de chauffage. En phytothérapie, l'espèce est utilisée contre plusieurs maladies telles que les infections respiratoires et intestinales, les douleurs gastriques, le diabète, l'hypertension, la diarrhée et les rhumatismes. De plus, des études antérieures sur *T. articulata* (Vahl) indiquent son activité antibactérienne et antifongique, cytotoxique, antioxydante et anti-inflammatoire (Benali Toumi et al, 2011 ; Djouahri et al., 2014). En outre, Les huiles essentielles de *T. articulata* sont riches en composés tels que l' α -pinène, le camphre, le borneol

et l'acétate de bornyl utilisés dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique, cosmétiques et la parfumerie.

I.4 POLYPHENOLES, CHROMATOGRAPHIE, ET SPECTROMETRIE

Pendant longtemps, les remèdes naturels et surtout les plantes médicinales furent le principal, voire l'unique recours du médecin, et constituaient la matière première pour la fabrication de remède pharmaceutique. Ainsi, plusieurs études ont montré que l'activité thérapeutique de certaines plantes est liée à la présence de substances chimiques (huiles essentielles, saponines, flavonoïdes, alcaloïdes, glucosinolates, protéines, etc.). Ces métabolites retiennent l'attention aussi bien pour leurs propriétés biologiques et pharmacologiques que pour leur exploitation industrielle. Selon Valnet 1984 in Saihi (2011) Les substances actives des plantes médicinales sont de deux types :

- **Les produits des métabolites primaires** (essentiellement des saccharides), substances indispensables à la vie de la plante, directement impliqués dans la croissance et le développement de la plante, et qui se forment dans toutes les plantes vertes grâce à la photosynthèse.
- **Les produits des métabolites secondaires** : processeurs résultant essentiellement de l'assimilation de l'azote, apparaissent souvent comme inutiles à la plante, mais utiles pour leurs effets thérapeutiques tels que les huiles essentielles et les composés phénoliques ou polyphénols.

I.4.1 LES POLYPHENOLS

Les polyphénols sont le plus grand groupe de produits phytochimiques, avec environ 9000 structures naturelles élucidées à ce jour, ils constituent une famille importante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire du règne végétal (Akowauh et *al.*, 2004), qui correspondent à une très large gamme de structures chimiques et sont un bon témoin de l'extraordinaire capacité de biosynthèse des plantes.

I.4.1.1 Définition

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. 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, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside.

Ce sont des corps dont la molécule contient plusieurs fonctions phénols (Ferguson, 2001), ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractère organoleptique.) et nutritionnelles des végétaux que consomme l'homme

et leur intervention dans la santé et maintenant reconnue dans des domaines variés, anti-cancérigène, antioxydant, la lutte contre le vieillissement des cellules (Cheynier et al., 2006), anti oestrogénique et anti inflammatoire. Certains d'eux sont dits non nutritionnels car ils ne jouent aucun rôle dans la plante (Achat, 2013).

I.4.1.2. Classification des polyphénols

Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, et parmi celles-ci, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés (Bravo, 1998 ; Tsao, 2010). On distingue aussi les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthones, les coumarines et d'autres classes qui existent en nombre considérable (Tableau 1).

Les polyphénols ont été classés par leur source d'origine, leur fonction biologique et leur structure chimique (le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux). En outre, la majorité des polyphénols dans les plantes existent sous forme de glycosides.

Tableau 01. Principales classes des composés phénoliques et structure de base (Bravo, 1998)

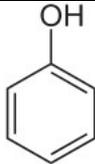
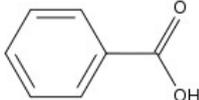
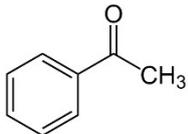
Classe	Squelette	Exemple de Structure de base
Phénols simple	C ₆	
Benzoquinones	C ₆	
Acides phénoliques	C ₆ -C ₁	
Acétophénonnes	C ₆ -C ₂	

Tableau 01. Principales classes des composés phénoliques et structure de base (Bravo, 1998) **(Suite)**

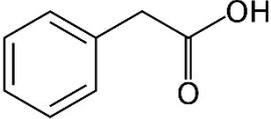
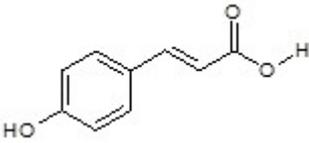
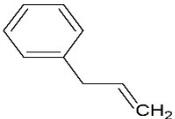
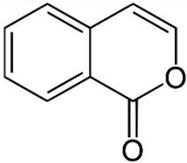
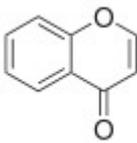
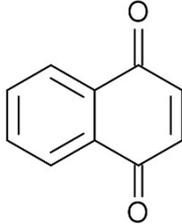
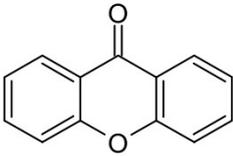
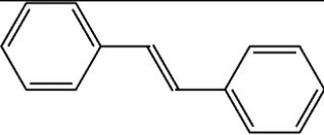
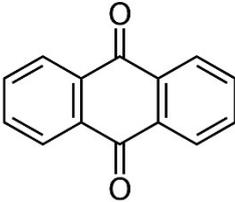
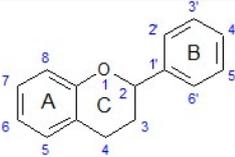
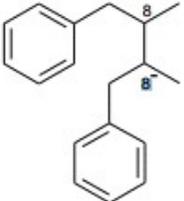
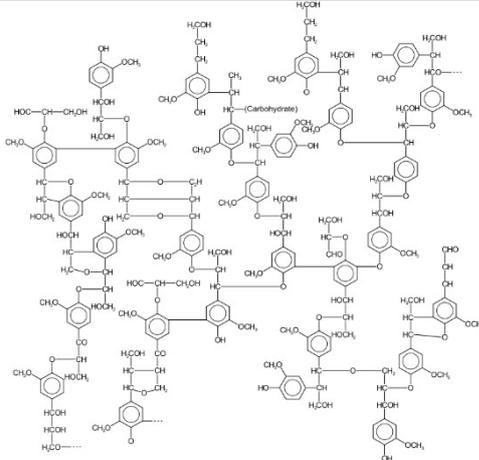
Acides phénylacétiques	C ₆ -C ₂	
Acides hydroxycinnamiques	C ₆ -C ₃	
phenylpropenes	C ₆ -C ₃	
Coumarins, Isocoumarins	C ₆ -C ₃	
Chromones	C ₆ -C ₃	
Naftoquinones	C ₆ -C ₄	
Xanthones	C ₆ -C ₁ -C ₆	
Stilbenes	C ₆ -C ₂ -C ₆	

Tableau 01. Principales classes des composés phénoliques et structure de base (Bravo, 1998) (**Suite**)

Anthraquinones	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$	
Lignanes, Neolignanes	$(C_6-C_3)_2$	
Lignines	$(C_6-C_3)_n$	

Selon la complexité des molécules ou la structure de base, on peut distinguer deux catégories de polyphénols : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Bravo, 1998 ; Tsao, 2010 ; Achat, 2013).

I.4.1.2.1 Polyphénols simples

- **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 (C_6-C_1) et de l'acide hydroxycinnamique (C_6-C_3)

- **Flavonoïdes** : 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. Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau Flavone ou 2-Phényl-Chrome portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.
- **Alcools phénoliques** : Un alcool phénolique est un composé organique possédant au moins un alcool aliphatique et un hydroxyle phénolique. Le tyrosol (4-hydroxyphenylethanol) et l'hydroxytyrosol (3,4 dihydroxyphenylethanol) sont les principales molécules de cette classe.

I.4.1.2.2 Polyphénols complexes (tanins)

Ce sont des composés phénoliques complexes d'origine végétale, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000. En plus des réactions classiques des phénols, ils ont la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et de rendre la peau imputrescible en se fixant sur les protéines. Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés.

- **Tanins hydrolysables** : Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase).
- **Tannins condensés** : Les tannins condensés ou les proanthocyanidines sont des polymères constitués d'unités flavane reliées par des liaisons entre les carbones C₄ et C₈ ou C₄ et C₆.

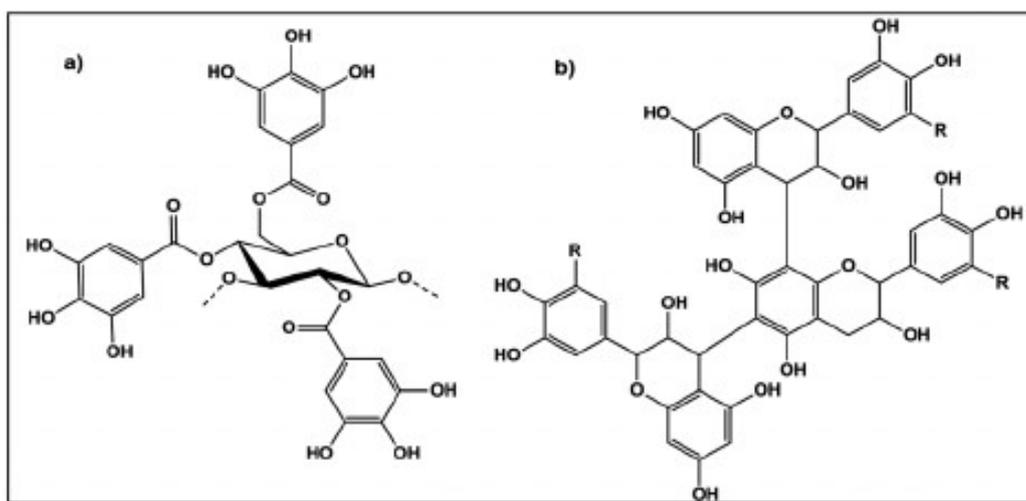


Figure 11. Structure d'un tanin condensé (a) et de tanin hydrolysable (b) (Achat, 2013)

I.4.1.3. Importance et Activités biologiques

Plusieurs études ont montré le rôle important des polyphénols dans la prévention et le traitement des maladies humaines, telles que les maladies cardiovasculaires, le cancer, ainsi que l'ulcère gastrique-duodéal, l'allergie, la fragilité vasculaire, les infections virales et bactériennes, etc. (Bravo, 1998). En effet, Les produits phytochimiques, et en particulier les polyphénols, contribuent directement et indirectement aux activités antioxydantes, antiinflammatoires et antibactériennes d'un organisme biologique (Tsao, 2010).

Ainsi, différents chercheurs (Hashim et Devi, 2003; Derradji-Heffaf, 2013; Nattudurai *et al.*, 2016...) ont confirmé le pouvoir insecticides de certaines plantes et ont reporté que l'action insecticide est directement liée à leurs métabolites secondaires, notamment les polyphénols. En effet, de nombreux composés phénoliques, acides phénols et flavonoïdes provoquent une perturbation de la motricité naturelle de l'insecte.

I.4.2 PROCÉDES D'OBTENTION DES POLYPHENOLS : TECHNIQUES D'ANALYSES CHIMIQUES

Même si les polyphénols partagent une caractéristique phénolique commune comme discuté dans la partie précédente, en raison de la diversité structurale, ces produits phytochimiques varient considérablement dans leurs propriétés physico-chimiques. En effet, la complexité chimique des polyphénols dans les plantes rend les différentes techniques d'extraction, de séparation, d'identification et d'analyse des polyphénols aussi difficiles que jamais, malgré les progrès récents de l'instrumentation.

Avant que les polyphénols ne soient extraits, les échantillons contenant ces composés doivent être collectés, réservés et préparés correctement. On comprend généralement que les échantillons (par exemple, les plantes, les aliments, les liquides biologiques...) collectés doivent représenter l'état réel. Il faut veiller à minimiser la perte de composés d'intérêts biologiques pendant le transport et la conservation des échantillons. Pour éviter la dégradation des polyphénols, les échantillons sont souvent séchés, congelés ou lyophilisés avant l'extraction car la haute teneur en eau ou l'humidité aide les activités enzymatiques (Figure 12). La température très élevée et l'exposition à la lumière et à l'oxygène peuvent affecter la composition polyphénolique dans de nombreux cas ; Par conséquent, le séchage à haute température devrait être évité autant que possible. Le prétraitement des échantillons peut être effectué par filtration et par centrifugation aussi (Tsao, 2010 ; Mahmoudi *et al.*, 2013).

De nombreuses méthodes d'extraction existent pour différents types d'échantillons. Pour la majorité des échantillons originaires de plantes, des extractions de solvants telles que le fractionnement par liquide / liquide et l'extraction solide/liquide sont les plus fréquentes dans le laboratoire.

Les extraits liquides sont parfois répartis avec des solvants tels que l'acétate d'éthyle, l'acétone... en fonction de la solubilité des polyphénols cibles. Le pH du solvant d'extraction est également important. Pour les polyphénols, la plupart des extractions sont effectuées dans des conditions acides, car elles sont généralement plus stables à faible pH, et l'état acide aide les polyphénols à rester neutres, ainsi facilement extraits dans des solvants organiques (Figure 12) (Tsao, 2010 ; Mahmoudi *et al.*, 2013).

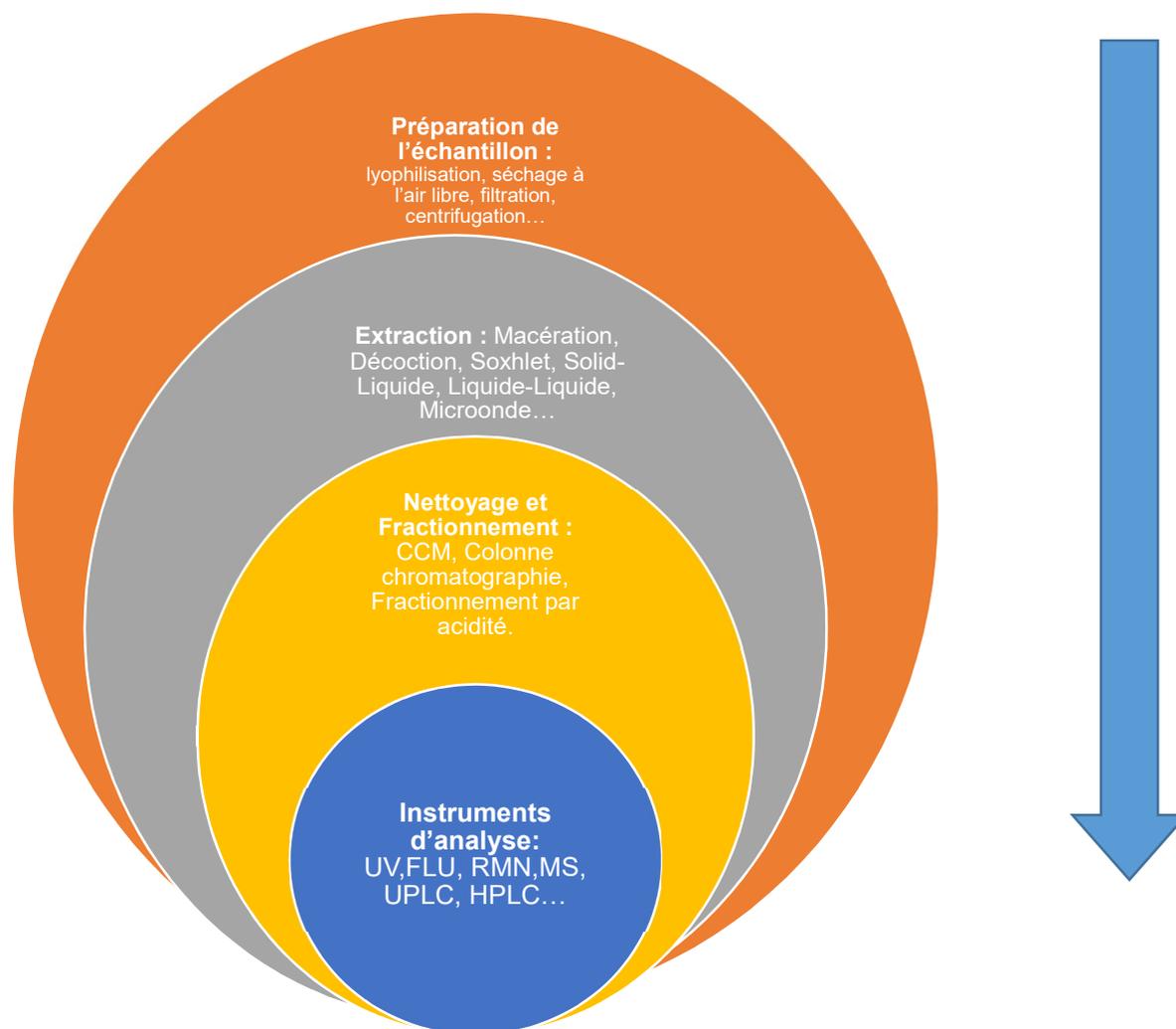


Figure 12. Procédé d'analyse des polyphénols. CCM : Chromatographie sur couche mince ; UV : Ultraviolet ; FLU : Fluorescence ; RMN : Résonance magnétique nucléaire ; MS : Spectrométrie de masse ; UPLC : Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance ; HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

Des méthodes spectrophotométriques ont été développées et sont encore utilisées pour l'estimation du contenu phénolique total. Bien que ces méthodes soient rapides et simples, elles n'ont pas la spécificité pour les composés individuels. En effet, Les interférences à partir de composants non polyphénoliques d'un échantillon peuvent également provoquer de fausses lectures et conduire ainsi à des résultats erronés. Afin de quantifier et d'identifier

précisément les polyphénols individuels, ces composés doivent être séparés en premier. Les méthodes de séparation utilisant diverses techniques chromatographiques ont été examinées et leurs avantages et inconvénients ont été discutés.

La spectrométrie de masse (MS) et la spectroscopie RMN sont de loin les méthodes d'analyses chimiques les plus puissantes. Ceci est dû à l'excellent pouvoir de résolution de ces deux méthodes pour détecter uniquement les espèces moléculaires individuelles. MS et la RMN peuvent être considérées comme des techniques «universelles» que pratiquement chaque métabolite concevable peut être mesuré par ces techniques, ce qui est en contraste avec d'autres méthodes, telles que les méthodes de spectroscopie optique (technologies qui utilisent l'interaction de la lumière avec les tissus pour analyser leur structure et leur composition chimique), qui donnent des informations que sur les sous-ensembles de métabolites optiquement actifs (Bingol et Bruschweiler, 2014).

I.4.2.1. La chromatographie par U-HPLC-MS

Le désir d'obtenir un maximum d'informations, rapidement et d'une manière efficace dans le domaine chromatographique a incité les chercheurs à développer de nouvelles technologies, qui devraient être conviviales et économiques. Une conception d'un système avec une technologie complètement nouvelle, de système de pompe, de détecteur, d'échantillonnage automatique, etc. a été développée, appelée la Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance (UPLC), qui a évolué à partir de Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC).



Figure 13. UPLC, laboratoire de chimie organique, Université de Lleida- Espagne
(Original)

I.4.2.1.1. Notion de base

LC (Chromatographie Liquide) est la technique la plus utilisée pour identifier, quantifier et séparer les composants dans un mélange. Elle utilise une pression élevée pour pousser les solvants à travers une colonne. C'est un moyen idéal pour la séparation et l'identification de différentes substances organiques ou inorganiques (Swartz, 2005 ; Gumustas *et al.*, 2013). La chromatographie liquide haute performance (HPLC) présente de nombreux avantages par rapport aux techniques de chromatographie liquide utilisées précédemment. Elle permet une résolution plus élevée, une meilleure forme de pic, des réponses reproductibles, une vitesse d'analyse plus rapide. Les colonnes HPLC peuvent être utilisées à nouveau sans reconditionnement ou régénération, avec un meilleur contrôle des paramètres affectant l'efficacité de la séparation, une automatisation facile du fonctionnement de l'instrument et d'analyse des données et une adaptabilité aux procédures à grande échelle. La méthode

utilise également de très petites tailles de particules et permet l'application de fortes pressions sur le flux de solvant.

L'HPLC couplée à un détecteur de matrice de diode (DAD) et/ou à des détecteurs spectrométriques de masse (LC-MS) est l'outil d'analyse le plus utilisé pour la quantification des polyphénols (Taos, 2010).

Ainsi, le développement de la Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance (U-HPLC ou UPLC) qui constitue l'un des développements les plus performants de la décennie écoulée, a considérablement amélioré la performance de la séparation. Les polyphénols peuvent être séparés avec une efficacité considérablement accrue et un temps analytique considérablement réduit (à $<1/10$ du temps d'une HPLC conventionnelle). En effet, l'UPLC repose sur l'emploi de phases stationnaires composées de particules de diamètre inférieur ou égale à $2\mu\text{m}$ (contre 3 à $5\mu\text{m}$ en HPLC) (Swartz, 2005; Taos, 2010 ; Gumustas et *al.*, 2013). Au-delà de sa simplicité de mise en œuvre et de son efficacité, elle permet aussi l'utilisation d'un volume réduit d'échantillon (2 à $5\mu\text{L}$ pour l'UPLC et 5 à $100\mu\text{L}$ pour l'HPLC), mais également de solvants organiques.

Cette diminution de la taille des particules permet d'utiliser des débits de pression plus grands que l'HPLC tout en conservant une bonne efficacité. Il est donc possible d'augmenter les débits et donc les vitesses sans sacrifier les performances. En effet, Les colonnes de l'HPLC peuvent atteindre une pression maximale de 600 bar alors que celles de l'UPLC peuvent atteindre plus de 1 200 bar (Gumustas et *al.*, 2013).

Afin de rendre la séparation efficace, le système détecteur devrait avoir un volume de dispersion minimal et un taux d'échantillonnage élevé, ce qui permettra une détection plus précise et une quantification des pics étroits plus fiable. Les détecteurs optiques à base d'absorbance, les détecteurs UV/Visibles, fluorescents et spectroscopiques de masse (MS) sont généralement utilisés avec la LC.

Généralement, les détecteurs MS sont améliorés par l'UPLC. MS/MS est principalement utilisée avec les systèmes UPLC. Selon le type de détecteur, la sensibilité de l'UPLC peut être de 2 à 3 fois plus élevée que celle de l'HPLC. Pour les analyses de MS, la source d'ionisation est plus efficace avec l'UPLC, en raison de l'augmentation des concentrations de pics avec une dispersion chromatographique réduite à des débits plus faibles (Wu et *al.*, 2008 ; Gumustas et *al.*, 2013).

I.4.2.1.2. Principes et fonctionnement

L'UPLC repose sur le même principe que l'HPLC : les composés à analyser sont injectés sous forme liquide et poussés par une phase mobile liquide dans la colonne. Ils vont y être

séparés grâce à l'interaction entre les solutés, la phase mobile et la phase stationnaire. Il en résulte un temps de rétention (le temps que met le soluté à sortir de la colonne, c'est à dire le temps écoulé entre l'injection et le maximum du pic du composé élué) qui permet de caractériser les pics correspondant aux molécules sur un chromatogramme (Wu et *al.*, 2008).

Les molécules une fois séparées, sont ensuite dirigées vers la spectrométrie de masse. La spectrométrie en tandem MS/MS est une technique d'identification et de quantification des ions en phase gazeuse. Les molécules sont dans un premier temps, vaporisées et ionisées en utilisant la technique d'électrospray* (ESI : Eléctrospray Ionisation, une méthode capable de propulser les molécules lourdes et polaires, d'une solution liquide ou d'une matrice solide, vers une phase gazeuse à pression atmosphérique ce qui permet d'accéder à leur masse et parfois à des éléments de leur structure) (Grinbaum et *al.*, 2012 ; Gumustas et *al.*, 2013). Les ions produits sont ensuite triés en fonction de leur rapport m/z (rapport masse/charge) par un premier quadripôle. Seul un ion de rapport m/z défini préalablement (obtention de l'ion parent) peut passer. Celui-ci subit une fragmentation. Les fragments sont triés en fonction de leur rapport m/z par un deuxième quadripôle. Seuls deux ions de rapport m/z défini au préalable sont sélectionnés par le quadripôle, ce sont les ions fils. Chaque molécule se trouve ainsi identifiées par deux couples ions parents/ions fils. Chaque couple est appelé transition et chacun est spécifique de la molécule recherchée. En effet, le fait d'utiliser une double sélection des ions apporte à la méthode une grande spécificité (Grinbaum et *al.*, 2012).

** L'électrospray (électronébullation) est produit par application d'un fort champ électrique à pression atmosphérique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit (couramment entre 1-10 µl/min). Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 3 à 6 KV entre le capillaire et la contre-électrode, séparés de 0,3 à 2 cm. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, située à l'extrémité de capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes hautement chargées (De Hoffmann et *al.*, 1994).*

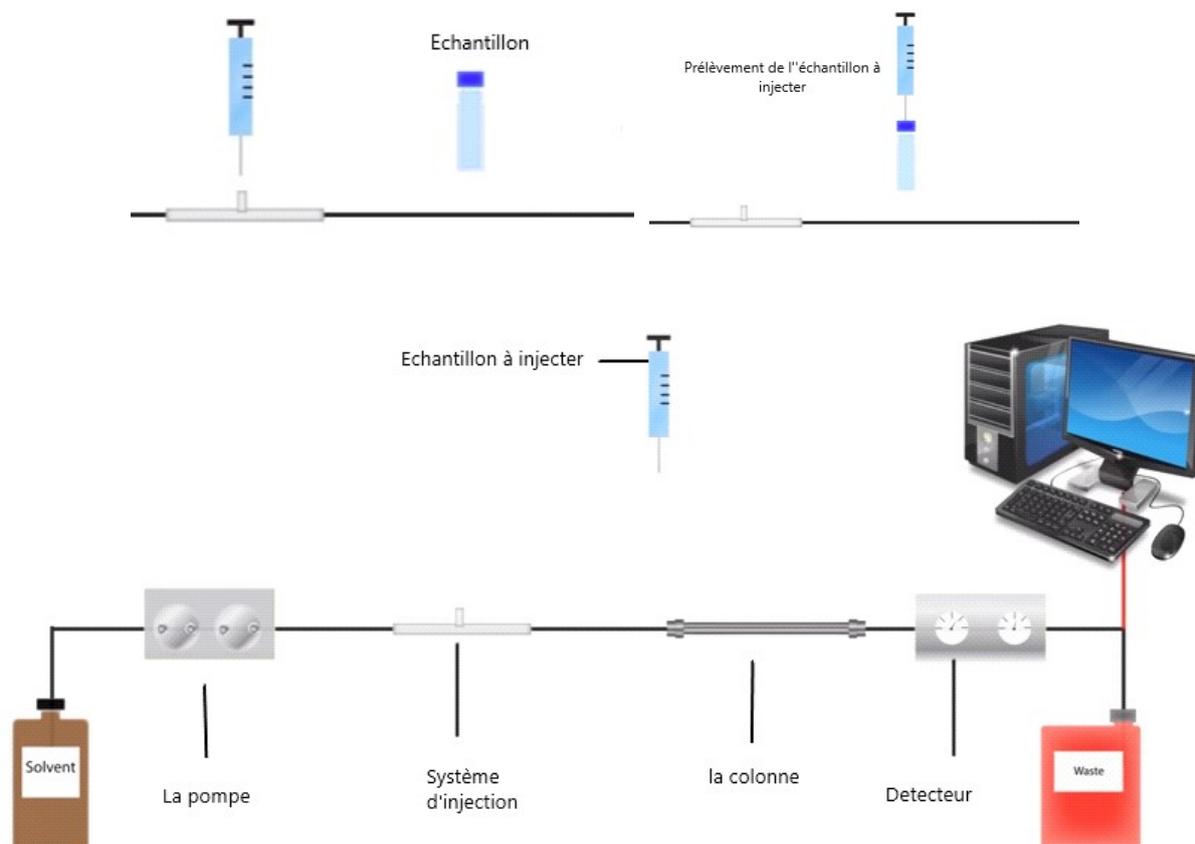


Figure 14. Schéma simplifié du principe de fonctionnement de l'UPLC. Le **solvant** est utilisé pour créer la **phase mobile** qui transporte l'**échantillon** à analyser dans le système de UPLC ; on utilise **la pompe** pour créer la phase mobile, La pompe déplace le solvant en continu de la fiole vers le **bidon de déchets** ; Pour mesurer les échantillons, un **système d'injection** est nécessaire pour injecter les échantillons dans la phase mobile. (L'identification et la quantification se déroule dans la **colonne**). Lorsque l'échantillon atteint les colonnes, il quitte la phase mobile et entre dans la **phase stationnaire**. La phase stationnaire est la substance fixée en place dans la colonne, pour la procédure de chromatographie, c'est là que se produit la **séparation des composés** selon leur rapport masse/charge. Après avoir quitté la phase stationnaire, l'échantillon se déplace à travers un **détecteur**. Le détecteur envoie des signaux à un logiciel sur l'ordinateur qui le convertit en chromatogrammes.

I.4.2.1.3. Identification des composés

Pour obtenir l'identité d'un polyphénol, la méthode la plus courante consiste à comparer le temps de rétention d'un composé particulier avec la norme (les standards). Le DAD peut collecter des données spectrales UV/visible lorsque les composés sont séparés, donc, lorsqu'un pic correspond au temps de rétention et au spectre UV/Vis. d'un standard, il peut être identifié provisoirement (Taos, 2010). La LC-MS peut fournir suffisamment d'informations

pour la confirmation finale de la plupart des polyphénols connus dans les aliments ou organismes vivants (Li et *al.*, 2006, Taos, 2010).

I.4.2.2. La spectrométrie RMN

Au cours de ces dernières années, la spectroscopie par la résonance magnétique nucléaire (RMN) a également attiré une attention considérable en tant qu'outil quantitatif efficace. C'est parmi les approches les plus réussies et les plus utilisées pour déterminer l'état métabolique d'un organisme. L'objectif à atteindre a pour but l'identification, et éventuellement la quantification, des constituants de mélanges naturels sans étape préalable de purification ou avec un fractionnement réduit autant que possible.



Figure 15. Appareil de RMN dans le laboratoire de chimie organique de l'université de Lleida-Espagne (Original)

I.4.2.2.1 Notion de base

La spectroscopie RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains **noyaux** atomiques. Elle est basée sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire. Le mot « nucléaire » signifie que cette méthode utilise les propriétés du noyau (de l'atome d'hydrogène constitué d'un proton pour H^1 RMN : Proton Nuclear Magnetic

Resonance). Cette méthode ne met en jeu aucune réaction de fission de ce noyau et n'est pas associée à l'énergie nucléaire (Günther, 2013). Autrement dit, c'est l'étude de l'absorption de la radiofréquence d'un rayonnement par les noyaux dans un champ magnétique.

Un facteur important dans les études chimiques par RMN est la sensibilité, ce qui limite son application à des concentrations de métabolites de l'ordre du micro molaire. D'autre part, la RMN offre un certain nombre d'avantages uniques. Les informations sur la résolution atomique permettent la caractérisation de la structure chimique d'un métabolite. Elle permet également d'identifier sans ambiguïté les différentes inter-conversions isomères, qui sont présents pour beaucoup de glucides (exemple α - et β -glucose). Etant donné que les pics intégraux de RMN sont directement proportionnels à la concentration moléculaire, la RMN est une méthode très quantitative en ce qui concerne la détermination des concentrations de métabolites et de leurs modifications (Ben Akal-Ben Fatma et *al.*, 2012).

Le phénomène de la résonance magnétique nucléaire (RMN) est actuellement exploité à plusieurs fins, outil clé en chimie, en biologie structurale, La pharmacologie et les sciences des matériaux, l'imagerie médicale utilisant la technique de l'IRM, utilisé également pour la caractérisation de la structure et la dynamique de la matière à l'échelle atomique, La RMN est également utilisée pour l'exploration pétrolière ou l'inspection des œuvres d'art (Günther, 2013 ; Markley et *al.*, 2017).

Il existe différentes spectroscopie RMN selon l'atome étudié : les techniques de RMN 1D (à une dimension) (H^1 et C^{13}) et 2D (à deux dimensions) (COSY, HSQC, TOCSY, HMBC, NOESY et/ou ROESY) ces techniques permettent de réaliser une élucidation structurale fiable d'une molécule (Kougan Nkwokap, 2010 ; Markley et *al.*, 2017).

Pour notre étude, nous avons choisi la H^1 RMN qui est une méthode quantitative rapide, robuste et hautement reproductible et qui constitue la méthode la plus utilisée pour l'analyse des extraits de plantes.

I.4.2.2.2 Principe et fonctionnement

Le but de la spectroscopie RMN est de déterminer les fréquences qui permettent de retourner le moment magnétique de chaque noyau d'hydrogène d'une molécule dans un champ magnétique, pour ensuite déterminer le type d'atome d'hydrogène présent dans la molécule.

La préparation des échantillons RMN est souvent simple et peut impliquer la dissolution de l'échantillon de métabolite lyophilisé dans une solution tamponnée. Néanmoins, les protocoles de préparation des extraits de plantes devraient être choisis avec précaution dépendant des objectifs de l'étude.

Ainsi, en plus des échantillons liquides, des échantillons semi-solides tels que des tissus, peut également être analysés par la spectroscopie RMN. En outre, étant donné que la spectroscopie de RMN est non destructive, le même échantillon utilisé pour la RMN, peut être récupéré pour être analysé pendant une période prolongée et par les différents types d'expériences. Ce qui est très approprié pour le dépistage rapide d'échantillons biologiques (Ben Akal-Ben Fatma *et al.*, 2012 ; Bingol et Bruscheiler, 2014).

La méthode est basée sur des lignes spectrales de différents noyaux atomiques qui sont excités lorsqu'un champ magnétique fort et un émetteur de radiofréquence sont appliqués. La méthode est très sensible aux caractéristiques de la structure moléculaire car même les atomes voisins influencent les signaux provenant des noyaux individuels et ceci est important pour déterminer la structure 3D des molécules (Günther, 2013).

La H^1 RMN permet d'analyser de nombreux composés à faible concentration, avec une très haute précision ; comme l'intégrale du signal est directement proportionnel au nombre de protons associés, la quantification de la molécule à l'étude peut être réalisée facilement en évaluant le rapport intégral avec une molécule de référence. Le manque de nécessité pour l'isolement et la purification du composant cible et la capacité de quantification en utilisant uniquement un signal bien résolu, sont également parmi les avantages clés que le H^1 RMN offre (Bingol et Bruscheiler, 2014 ; Petrakis *et al.*, 2016).

Le schéma ci-dessous (Figure 16) illustre d'une manière simple le principe de fonctionnement de la spectroscopie par RMN. En premier lieu, l'échantillon est dissous dans un solvant, habituellement le $CDCl_3$ (Deuterochloroform), et est placé dans un champ magnétique ; ensuite, un générateur de radiofréquence irradie l'échantillon avec une courte impulsion de rayonnement, causant une résonance. Après excitation des noyaux, c'est le retour à l'état initial, selon un temps de relaxation propre à chacun d'entre eux, qui est étudié. Quand un noyau atomique retourne à son niveau d'énergie initial, le détecteur mesure l'énergie libérée et un spectre est enregistré. Les spectres sont ensuite analysés pour déterminer les structures chimiques des composés.

I.4.2.2.3. Identification d'un composé

L'identification des métabolites se fait typiquement en deux étapes. Dans la première étape, le mélange de métabolites est décomposé dans ses composants individuels, et dans la deuxième étape, chaque métabolite est identifié en consultant une ou plusieurs bases de données de métabolites. En raison du nombre limité de métabolites compilés dans les bases de données de métabolites, un défi majeur est l'identification de signaux « inconnus », qui sont des signaux qui appartiennent à des composés qui ne se trouvent pas dans les banques de données. Une bonne identification à l'aide des bases de données nécessite des correspondances correctes

de plusieurs paramètres RMN typiques d'un métabolite inconnu avec ceux recueillis du composé pur dans des conditions identiques ou presque identiques. Ces paramètres de RMN peuvent être des déplacements chimiques des molécules (ex : déplacements chimiques des hydrogènes pour RMN du H^1), des divisions de pics des spectres etc. (Bingol et Brüschweiler, 2014). En effet, Le déplacement chimique est le paramètre essentiel pour l'identification d'un composé par RMN du H^1 . Il est donc nécessaire d'avoir une excellente reproductibilité des valeurs des déplacements chimiques, dans le spectre du mélange, par rapport aux spectres des composés de référence (Günther, 2013).

Ainsi, il existe plusieurs banques de données métaboliques publiques de l'RMN, facilement accessibles, y compris la base de données sur les métabolismes humains (HMDB), la Banque de données sur la résonance magnétique biologique (BMRB), TOCCATA (Customized Carbon Total Correlation) et COLMAR (Coordination of Standards in Metabolomics), contenant des données expérimentales sur les standards des métabolites purs. Des informations expérimentales peuvent être consultées dans ces banques de données afin d'identifier les métabolites (Ulrich et *al.*, 2008 ; Wishart et *al.*, 2009) mais elles ne couvrent toujours qu'une fraction des composés pertinents (Markley et *al.*, 2017).

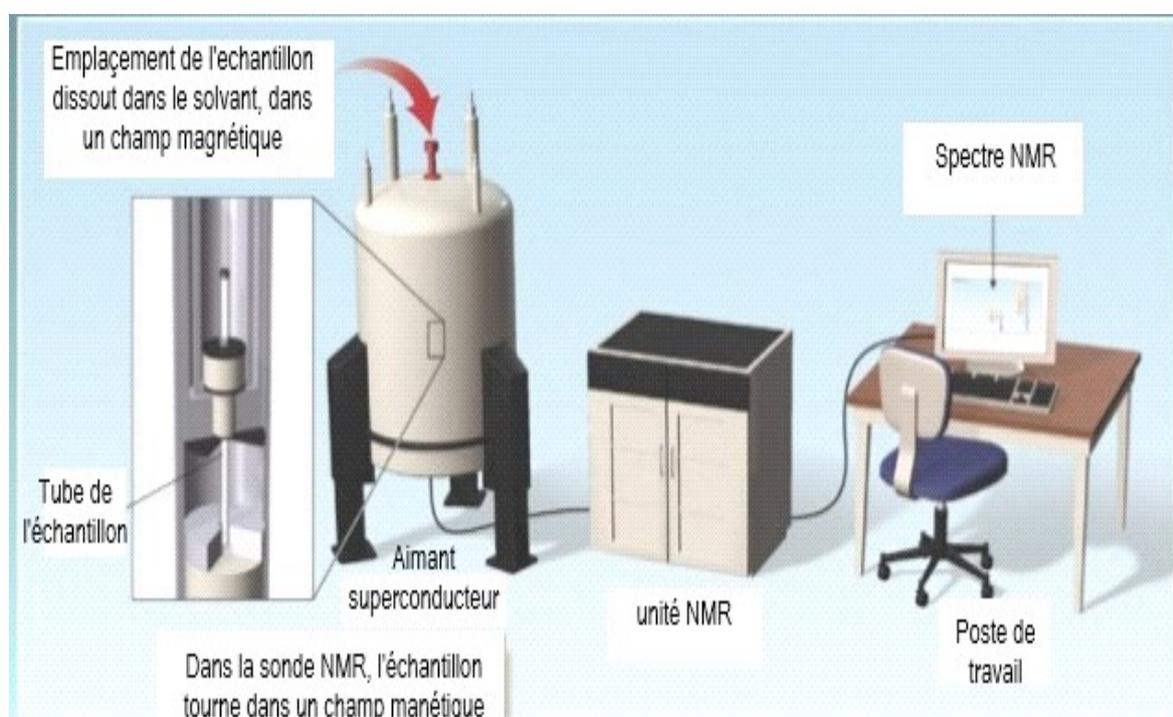


Figure 16. Principe de la spectroscopie par RMN (Sayyad, 2015)

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Etude phytochimique

L'étude phytochimique des espèces botaniques exploitées vise à identifier les groupes de constituants chimiques présentant un intérêt phytopharmaceutique, en l'occurrence les polyphénols.

Deux méthodes basées sur la chromatographie et la spectroscopie ont été retenues pour l'étude du profil chimique des espèces botaniques exploitées. L'ensemble des analyses chimiques a été réalisé au laboratoire de chimie organique et analytique de l'université de Lleida « UDL » en Espagne. Ce laboratoire est actif dans le développement de stratégies analytiques multidimensionnelles basées sur le couplage entre les techniques chromatographiques, la spectrométrie de masse (UPLC, HPLC...) et les techniques de La spectroscopie RMN, ainsi que sur leurs applications dans divers domaines (Figure 17).



Figure 17. Laboratoire de chimie organique et analytique de l'université de Lleida (Original)

II.1.1 Espèces botaniques exploitées et échantillonnage

Trois espèces botaniques ont été utilisées pour les expérimentations décrites par cette thèse, à savoir : *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), le genévrier *Juniperus phoenicea* L. et le cyprès de l'Atlas *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae).

Le choix de ces trois plantes repose principalement sur leur disponibilité sur le territoire national, sur leur usage en médecine traditionnelle locale, et sur leurs propriétés biologiques relatées dans la littérature. Le tableau ci-dessous présente les différentes informations les concernant.

Les échantillons des plantes ont toutefois été récoltés en pleine floraison, en 2013. Le Tableau 2 ci-dessous, présente les informations exactes d'échantillonnage pour chaque espèce exploitée.

Tableau 02. Espèces botaniques et échantillonnage

Nom scientifique	Nom commun	Région d'échantillonnage	Coordonnées géographiques	Date
<i>Artemisia absinthium</i>	L'absinthe	Boumerdes	36°43'53.9"N 3°29'52.0"E	Juin 2013
<i>Juniperus phoenicea</i>	Genévrier de Phénicie	Plage colonel Abbas, Tipaza	36°41'12.3"N 2°47'06.6"E	Mai 2013
<i>Tetraclinis articulata</i>	Thuya de barbarie	Jardin Botanique ENSA, Alger	36°43'15.3"N 3°09'02.4"E	Avril 2013

II.1.2. Solvants utilisés

Les solvants, et les produits chimiques utilisés dans les différentes investigations, ainsi que leur origine et pureté, sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 03. Solvants et produits chimiques utilisés

Produits chimiques	Fournisseur	Pureté
Eau distillée	Grade HPLC	100%
Acétone	J.T.Baker (Deventer, The Netherlands)	100%
Acétone (Analytical Reagent Grade)	Biochem Chemopherma,	99,5%
Chloroforme	Sigma–Aldrich	≥ 99,8%
Méthanol HPLC	CHROMASOLV®,	≥ 99,9%
La gallate	Extrasynthèse (Genay, France)	≥98.0%

Tableau 03. Solvants et produits chimiques utilisés (**Suite**)

La myricétine	Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany)	≥ 99,9%
Le penta-o-galloyl-b-d-glucose	Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany)	≥96%
La luteoline-7-o-glucoside	Extrasynthèse (Genay, France)	≥98%
Diméthylsulfoxyde deutéré	Sigma–Aldrich	100%

II.1.3. Méthode d'extraction

Les échantillons de plantes (parties aériennes) ont été séchés naturellement, à l'air libre au laboratoire à température ambiante (24-25°C) pendant 1 mois. Le matériel végétal séché a été broyé en une poudre homogène en utilisant un mélangeur.

La stabilité de différents extraits du même matériel végétal dépend du solvant d'extraction utilisé pour extraire les composés polyphénoliques, et il est évident que les extraits du même matériel végétal peuvent varier considérablement en fonction de leurs concentrations et donc leurs activités biologiques. Par conséquent, l'extraction a été réalisée en utilisant 3 types de solvants : Méthanol absolu, Méthanol- eau et Méthanol-chloroforme (50:50 v/v).

Les extraits de plantes ont été préparés selon la méthode d'Owen et Johns (1999) et Taylor et al (1996). Une prise d'essai de 12,5g de poudre végétale de chaque plante a été mise à macérer dans 125ml de solvant (méthanol absolu, Méthanol- eau ou Méthanol-chloroforme) sous agitation magnétique (Gallenkamp Environmental Shaker modèle 10X400) à 150 rpm, à une température ambiante (25°C) pendant 48h. Ensuite, les extraits ont été filtrés à l'aide d'un papier filtre 0,20 µm en utilisant un entonnoir. Chaque filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite à 40°C en utilisant un Rotavapor (Buchi® R-215). Par la suite, Chaque extrait a été solubilisé dans de l'acétone et a été conservé à 4°C afin de les utiliser pour de futures analyses (Figure18).

Le rendement en extrait méthanolique est estimé par le rapport des masses de l'extrait méthanolique et de la matière végétale séchée. Il est exprimé en pour cent (%).

$$\text{Rdt}_{EM} = (M_{EM}/M_{VS}) \times 100$$

Rdt_{EM} : Rendement en extrait méthanolique (%) ; M_{EM}: Masse de l'extrait méthanolique (g) ; M_{VS} : Masse de la matière végétale sèche (g).



Figure 18. Schéma du processus d'extraction méthanolique (Original)

II.1.4 Analyse Chromatographique des polyphénols

L'analyse des composés phénoliques a été réalisée en utilisant la technique de l'Ultra Performance Liquid Chromatographies (UPLC) qui désigne la méthode de chromatographie en phase liquide à haute pression. Le protocole adopté est celui décrit par Rivera et Canela (2012).

II.1.4.1 Paramètres de l'UPLC-PDA-FLR

La teneur en polyphénol des extraits a été étudiée par l'analyse UPLC en utilisant un système Waters ACQUITY UPLC™ (Waters, Milford, MA, USA) constitué d'un gestionnaire de solvant binaire (AQUITY UPLC™) et un gestionnaire d'échantillons (ACQUITY UPLC™), couplé à un détecteur de réseau de photodiodes (ACQUITY UPLC™ PDA), un détecteur de fluorescence (ACQUITY UPLC™ FLR) et à un double analyseur avec spectromètre de masse quadripolaire (Waters ACQUITY TQD) (Waters, Royaume-Uni). Les composés ont été séparés par une colonne ACQUITY UPLC™ HSS T3 de 1.8µm (2,1 mm x 150 mm) (Waters, Manchester, Royaume-Uni): en utilisant une phase mobile constituée de deux solvants : solution aqueuse (pour UPLC) contenant solvant A, l'eau H₂O (0,1% v/v HAcO) et le solvant

B, l'acétone ACN 100 % (0,1% v/v HAcO). Le débit était de 0,550 ml/min. Le mode d'élution est comme suit : 0 à 1,89 min, 1% B (isocratique) ; 1,89 à 17,84 min, 30% B, (gradient linéaire) ; 17,84 à 21,39 min, 5% B (gradient linéaire); 21,39 à 21,56 min 1% B (gradient linéaire); et 21,56 à 25 min, 1% B (isocratique) (Tableau 4). Les solvants d'aiguilles faibles et forts étaient H₂O (0,1% v/v HAcO) et le méthanol MeOH respectivement. Le volume d'injection était de 20µl en mode boucle complète, et la colonne a été maintenue à 45°C alors que la température dans le gestionnaire de l'échantillon a été maintenu à 10°C.

Tableau 04. Programmation des taux de solvants utilisés au cours de l'analyse par UPLC

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Mode d'élution
0	99	1	isocratique
1,89	70	30	gradient linéaire
17,84	95	5	gradient linéaire
21,39	99	1	gradient linéaire
21,56- 25	99	1	isocratique

Les analyses sont tri-répliquées et la moyenne seule est reportée. La quantification est effectuée en injectant des standards externes et les concentrations finales sont exprimées en mg/ 100 g.

II.1.4.2. Paramètre de l'UPLC-MS

Les analyses de Spectrométrie de Masse (MS) ont été effectuées par Waters ACQUITY TQD, Spectromètre de masse quadripolaire en tandem (Waters, UK). L'instrument a été commandé à l'aide d'une source électrospray (ESI) en mode d'ions positifs et négatifs. Les paramètres ESI suivants ont été utilisés : la tension capillaire (3,5 et -2,5 Kv) en mode, positive et négative respectivement ; maintien de la source à 150°C; température de de solvation de 500°C; gaz de cône (azote) débit 50L/h; et le gaz de solvation à 800 L/h. Les injections de flux de chaque standard individuellement, ont été utilisées pour optimiser la tension du cône et la surveillance des multiples réactions (Multiple Reaction Monitoring : MRM parameters). Le logiciel Masslynx 4.1 ((Waters, USA) a été utilisé pour l'acquisition des données.



Figure 19. Préparation du matériel pour les manipulations UPLC (Original)

II.1.4.3. Identification et quantification

L'identification des polyphénols a été basée sur l'utilisation des standards de références disponibles et d'autres outils permettant d'identifier un nombre maximal de pics, notamment le comportement chromatographique, le spectre d'absorption UV-Vis et les données bibliographiques publiées concernant les composés phénoliques ont été également utilisés. Les conditions de MS des standards de référence, composées avec le même aglycone ont été appliquées pour identifier des composés pour lesquels les standards n'ont pas été disponibles.

Les standards utilisés pour l'identification sont disponibles commercialement et sont : le gallate, la Myricitine, le penta-O-galloyl-B-D-glucose, et la lutéoline-7-O-glucoside (Figure 20 et 21).



Figure 20. Préparations des standards (Original)

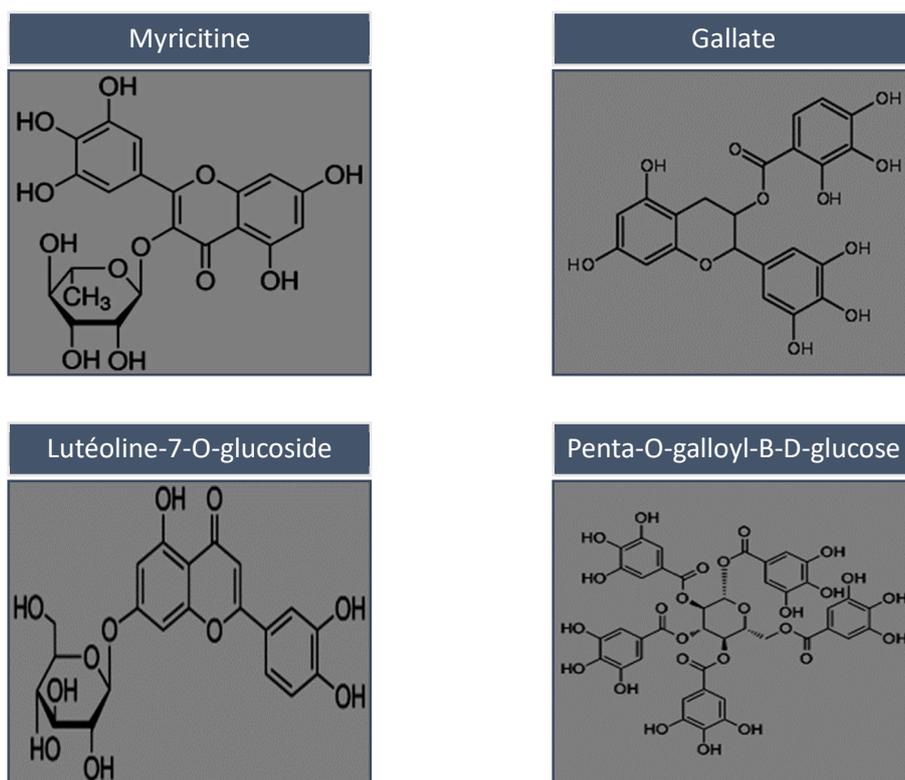


Figure 21. Structures chimiques des standards utilisés pour l'identification des polyphénols (Banque de données BMRD)

La répétition de la procédure pour chaque type d'échantillon a été déterminée par l'analyse d'un échantillon en trois exemplaires; Les résultats sont détaillés en annexe.

II.1.5. Analyse par H-RMN

L'étude de la composition chimique des extraits de végétaux préparés a été effectuée par spectrométrie RMN du proton (^1H -RMN) « Résonance Magnétique Nucléaire du proton ». La technique permet l'obtention de spectres des extraits complexes non purifiés dans des conditions standardisées (Ben Akal-Ben Fatma et *al*, 2012).

La méthode utilisée est adaptée à celle décrite par Oromí-Farrús et *al* (2010). 30 mg de chaque extrait méthanolique évaporé de l'acétone a été dissout dans 0,7ml de diméthylsulfoxyde deutéré (DMSO- d_6). Les échantillons ont été ensuite directement analysés en les introduisant dans des tubes RMN en verre de 5mm de diamètre (Figure 22). Les spectres de ^1H -RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Varian MERCURY plus AS400, fonctionnant à 400 MHz. Les spectres ont été enregistrés à 25°C avec 1000 s de temps de relaxation. Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en ppm par rapport au solvant utilisé. Les signaux de ^1H -RMN ont été répertoriés dans une feuille de calcul indiquant les déplacements chimiques et l'intensité correspondante.



Figure 22. Analyse des extraits méthanoliques par ^1H -RMN (Original)

L'identification des composés est réalisée par comparaison des déplacements chimiques des hydrogènes (spectres des extraits méthanoliques) avec ceux de produits de référence contenus dans des banques de données spectrales conçues à cet effet. La banque de donnée 'Biological Magnetic Resonance Data Bank' « BMRB » a été utilisée dans notre étude : <http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/>. En effet, La BMRB collecte, annote, archive et diffuse (publiquement et dans le monde entier) des données importantes spectrales et quantitatives, dérivées des recherches spectroscopiques RMN des macromolécules biologiques et des métabolites. Ce qui permet d'analyser la structure, la dynamique et la chimie des systèmes biologiques et de soutenir le développement du domaine de la spectroscopie de la RMN biomoléculaire.

II.2 Etude de l'activité biologique des extraits méthanoliques

L'étude de l'activité biologique est principalement basée sur l'évaluation de l'effet insecticide des extraits méthanoliques. L'effet portera essentiellement sur quelques paramètres biologiques du ravageur *S. oryzae*. L'activité fongicide des extraits méthanoliques a été également évaluée sur deux espèces fongiques associées à *S. oryzae* dans les stocks soit *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*.

II.2.1 Activité insecticide

II.2.1.1 L'Insecte

La souche de *S. oryzae* utilisée provient du laboratoire d'entomologie du département de Zoologie Agricole et Forestière de l'ENSA. Plusieurs générations ont été obtenues à partir des techniques d'élevage de masse. L'élevage en masse des individus de *S. oryzae* a été réalisé dans des bocaux en verre de 10.5 cm de hauteur et 11 cm de diamètre sur du blé tendre (variété HD1220) obtenu de l'ITGC d'Oued Smar. Les bocaux étaient maintenus à l'obscurité

dans une étuve réglée à une température de 28 ± 2 °C, et une humidité relative de $70 \pm 5\%$ RH. Après une à deux semaines d'infestation, les adultes sont retirés des grains par tamisage. Les grains infestés sont laissés en incubation dans la chambre conditionnée jusqu'à l'apparition des nouveaux adultes (Figure 23).

Les mêmes conditions de température et d'humidité ont été retenues pour réaliser nos expériences.



Figure 23. Elevage de *S. oryzae* au laboratoire de phytopharmacie ENSA (2013-2016)
(Original)

II.2.1.2 Le substrat

Le matériel végétal utilisé comme substrat au cours des expérimentations, était constitué de grains de blé tendre, variété HD1220 obtenu de l'ITGC d'Oued Smar- Alger. Les grains ne sont pas traités par aucun insecticide ni autres composés chimiques (Figure 23).

II.2.1.3 Etude de l'effet insecticide des extraits méthanoliques par contact

La méthode de l'imprégnation des papiers filtres a été utilisée pour évaluer la toxicité des extraits méthanoliques par contact. A cet effet, nous avons utilisé un essai de papier imprégné, selon la méthode décrite par Stefanazzi et *al.* (2011) avec quelques modifications.

D'après les résultats préliminaires, une gamme de doses (15, 30, et 60 mg/cm²) a été formulée à partir d'une dose initiale et selon une progression géométrique de raison de 2 pour chaque espèce exploitée. Le solvant (Acétone, Analytical Reagent Grade) est utilisé pour les dilutions. Il a l'avantage de solubiliser de manière particulièrement rapide de nombreuses espèces organiques et de s'évaporer très rapidement sans laisser un effet résiduel.

Vingt (20) ml de solutions ont été préparées pour chaque extrait à base des doses préalablement sélectionnées. Des papiers filtres Whatman N°1 de 9 cm de diamètre ont été placés dans des boîtes de Pétri en verre, ensuite chacun a été imbibé par 1ml d'extrait méthanolique (d'*A. absinthium* de *J. phoenicea* ou de *T. articulata*) (Figure 24). Les boites sont

laissées 20 min à l'air libre pour évaporation du solvant. Enfin, 20 individus de *S. oryzae* âgés de 10j ont été placés à l'intérieur de chaque boîte de Pétri. Les boîtes ont été conservées dans des conditions de laboratoire optimales pour le développement de l'insecte (28 ± 2 °C, $70 \pm 5\%$ HR et dans l'obscurité). Le témoin a été traité avec le solvant seulement, et trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement. Les boîtes ont été inspectées régulièrement pendant deux semaines. Les valeurs DL50 et DL90 (Dose létale pour 50% et 90% de la population) ont été calculées par analyse de Probit à l'aide de la table de Finney.



Figure 24. Réalisation de test insecticide par contact direct (Original)

L'efficacité d'un produit biocide est évaluée par la mortalité de l'organisme cible. Cependant, le nombre d'individus dénombrés morts dans une population traitée par un toxique n'est pas le nombre réel d'individus tués par ce toxique. Il existe en fait dans toute population traitée une mortalité naturelle qui vient s'ajouter à la mortalité provoquée par le toxique, pour cela les pourcentages de mortalité doivent être corrigés par la formule d'Abbott (Abbott, 1925) qui est la suivante :

$$MC \% = (M - Mt / 100 - Mt) \times 100$$

MC (%) : Pourcentage de mortalité corrigée ; M (%) : Pourcentage de morts dans la population traitée ; Mt (%) : Pourcentage de morts dans la population témoin

II.2.1.4 Etude de l'effet insecticide des extraits méthanoliques par traitement des grains

Un traitement de grain a été réalisé pour étudier la toxicité des extraits par rapport à la reproduction du ravageur. Pour le faire, nous avons établi le protocole de travail décrits comme suit.

II.2.1.4.1. Sexage et formation des couples

La séparation des sexes ou l'obtention des couples des individus de *S. oryzae* a été faite selon la méthode de séparation à base du maïs. En effet, le maïs concassé a une forte synergie avec la sitophinine (phéromone d'agrégation sécrétée par les males de *S. oryzae* dont la composante principale est le (4S,5R)-5-hydroxy-4-méthyl-3-heptanone) ce qui favorise l'accouplement (Delobel et Tran, 1993).

Pour cela, des individus de *S. oryzae* nouvellement émergés ont été introduits dans une boîte rectangulaire (20cmx10cm) contenant 250g de maïs concassés, ensuite la boîte a été fermée avec une moustiquaire et placée dans une obscurité totale, dans une étuve réglée à ($27\pm 2^\circ\text{C}$ et $70\pm 5\%$ RH). La synergie maïs-phéromone sexuelle attire les femelles de *S. oryzae* et favorise l'accouplement. La boîte est surveillée toutes les 20 min. Suite à ce regroupement, des couples commencent à se former puis sont directement récupérés à l'aide d'une pince et déposés dans des tubes en verre (Figure 25). Les couples obtenus sont ensuite utilisés dans des tests, réalisés sur les grains de blé.



Figure 25. Accouplement des adultes de *S. oryzae* (Original)

II.2.1.4.2. Application des traitements

Deux (2) ml d'extraits méthanoliques ont été appliqués à cinquante grammes de grains de blé tendre (variété HD1220). La dose retenue pour ce test correspond à la dose létale cinquante 'DL50', évaluée pour chaque extrait soient : 15,53 mg/ml pour *A. absinthium*, 22,14 mg/ml pour *J. phoenicea* et 24,05 mg/ml pour *T. articulata*.

Un témoin avec des grains non traités et un témoin avec des grains traités avec le solvant seul (l'acétone) ont été réalisés. Les grains traités ont été laissés sécher 20 min, ensuite nous les avons déposés dans des bocaux en verre (longueur = 7cm, diamètre = 7 cm, volume = 210 ml) à raison de 50g par bocal (Figure 26). Dix couples de *S. oryzae* ont été ensuite introduits dans chaque bocal préparé. Les bocaux ont été doucement secoués pour assurer la distribution de l'insecte dans les grains traités. Chaque bocal en verre a été couvert par un tissu à maille fine et a été stocké dans des conditions de laboratoire (27°C et 75% RH). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque traitement. La mortalité a été évaluée chaque 24h durant 8 jours, et le pourcentage de mortalité a été calculé.

Quinze (15) jours après le traitement des grains, les grains sont tamisés, les individus vivants ont été retirés pour éviter toute confusion dans le démembrement des individus nouvellement émergés (génération F1).

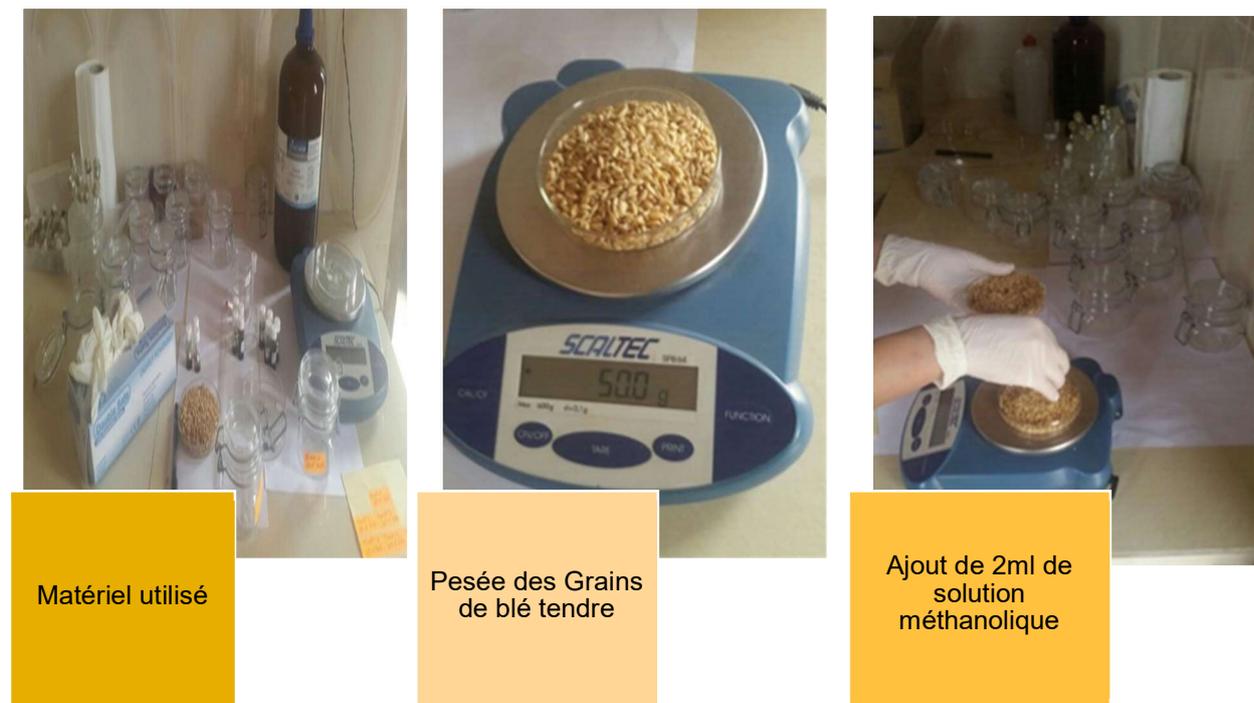


Figure 26. Traitements des grains de blé par les solutions méthanoliques (Original)

II.2.1.4.3. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la descendance de première génération F1

Les grains ont été traités comme décrit auparavant et après 15 jours, les insectes (morts et vivants) ont été retirés (par tamisage) et les grains ont été maintenus dans les mêmes conditions expérimentales jusqu'à l'émergence de la descendance F1. Sur la base du cycle de vie de *S. oryzae*, trois semaines après avoir retiré les individus de *S. oryzae*, nous avons commencé à observer l'émergence des adultes F1 quotidiennement. Le comptage des adultes a été interrompu lorsqu'il n'y a pas eu d'émergence pendant 08 jours consécutifs.

Le pourcentage de réduction de l'émergence des adultes de la descendance F1 ou taux d'inhibition (IR %) était calculé selon la méthode de Taponjoui et *al.* (2002) comme suit :

$$\%IR = (C_n - T_n) \cdot 100 / C_n$$

C_n est le nombre d'insectes qui viennent d'émerger dans le bocal non traité (Témoin) et T_n est le nombre d'insectes dans le bocal traité.

II.2.2 Etude de l'effet des extraits méthanoliques sur les grains

Deux tests ont été réalisés sur les grains de blé. Le premier test était pour évaluer la perte en poids causée par le ravageur et le second était réalisé pour évaluer la faculté germinative des grains après traitement par les extraits méthanoliques.

II.2.2.1. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la perte en poids des grains

A la fin du cycle de développement de la première génération F1 la perte en matière sèche des grains ayant servi de milieu alimentaire (substrat) aux insectes est déterminée.

La perte due à *S. oryzae* est estimée comme étant la différence de masse de matière sèche avant et après l'infestation par l'insecte. La perte en gramme au bout d'un cycle de développement sur 50 g de blé à ($27 \pm 2^\circ\text{C}$ et $70 \pm 5\% \text{ RH}$) est exprimée par la formule suivante :

$$PST = (50 - PS_1) / 50 \cdot 100$$

PS_1 = masse de matière sèche dans le lot après infestation par l'insecte (*Sitophilus oryzae*).

II.2.2.2. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la germination

Les grains de blé ont été traités avec les extraits méthanoliques à la même dose létale cinquante (DL50) correspondante à chaque extrait utilisée pour l'évaluation de l'effet insecticide sur grains de blé, soient : 15,53 mg/ml pour *A. absinthium*, 22,14 mg/ml pour *J. phoenicea* et 24,05 mg/ml pour *T. articulata*. Les grains sont ensuite trempés dans de l'eau distillée pendant environ 10 min, et déposés sur papier filtre (Whatman n°1) dans des boîtes de Pétri et laissées pour germination. Les boîtes sont humidifiées chaque jour avec de l'eau distillée (Figure 27). Au bout du cinquième jour, les grains germés ont été comptés. Le pourcentage de germination a été calculé selon la méthode de Nikpay (2007) comme suit :

$$\%Gr = (Ng / Nt) \times 100$$

Où :

Gr est le pourcentage des grains germés, **Ng** est le nombre de grains germés ; **Nt** est le nombre de grains total

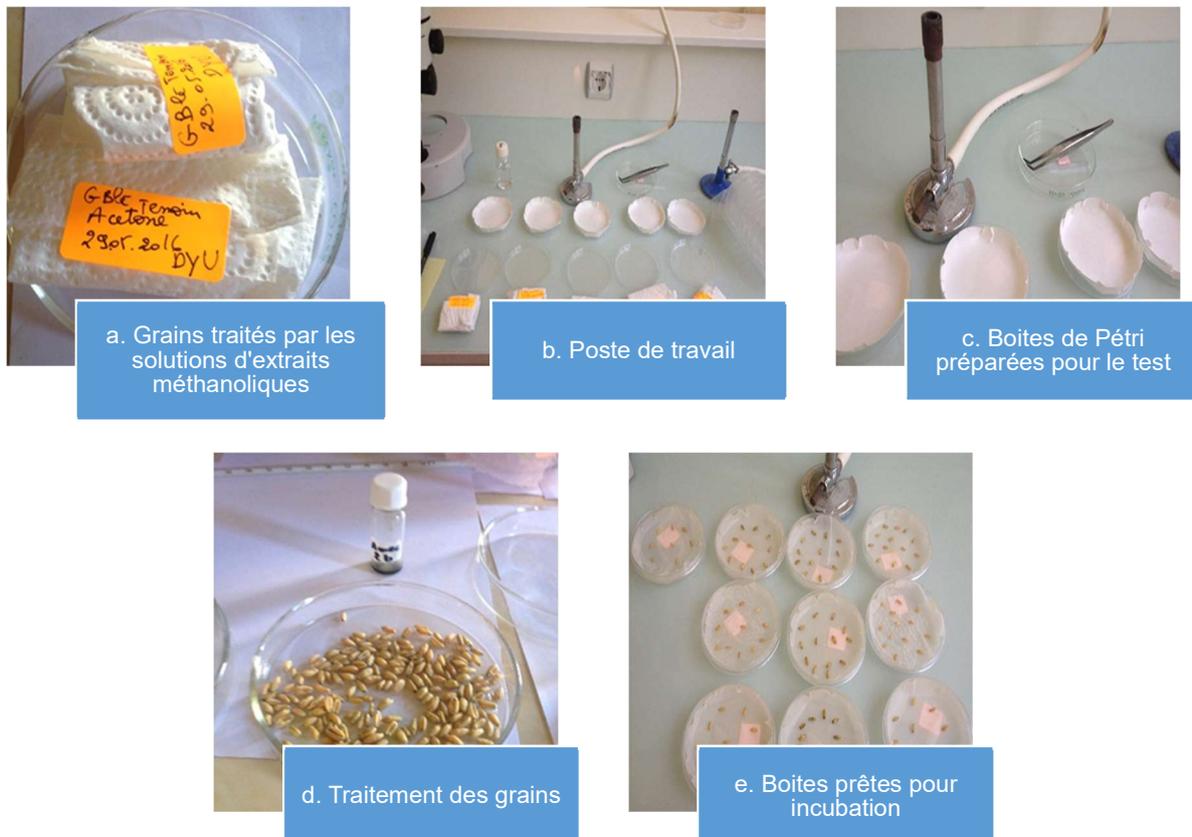


Figure 27. Réalisation de test de germination des grains (Original)

II.2.3. Evaluation de l'effet fongicide des extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques peuvent avoir un effet préventif en détruisant le champignon avant que celui-ci ne s'installe et donc ils peuvent être utilisés comme fongicide de contact ou de surface. Le but de ces tests est d'évaluer l'effet fongicide des extraits méthanoliques sur deux espèces fongiques pathogènes, considérées comme des ravageurs tertiaires des stocks et qui peuvent s'installer après un ravage par *S. oryzae*.

II.2.3.1. Espèces fongiques

Les isolats de *Fusarium culmorum* (FC.06.11 et FC.04.12) et de *F. graminearum* (FG.02.12) ont été sélectionnés pour l'évaluation de l'activité antifongique des extraits méthanoliques de plantes exploitées (Figure 28). Les isolats ont été obtenus auprès du Laboratoire de mycologie (Département de botanique, ENSA, Alger, Algérie). Les souches ont été isolées à partir de blé infectés et identifiés morphologiquement et macroscopiquement en suivant les procédures standards. Une colonie de mycélium de chaque culture de champignons a été purifiée et repiquée sur de l'agar de dextrose de pomme de terre (PDA). Ensuite, les cultures ont été incubées pendant 7 jours à 22 °C sous lumière continue en laboratoire

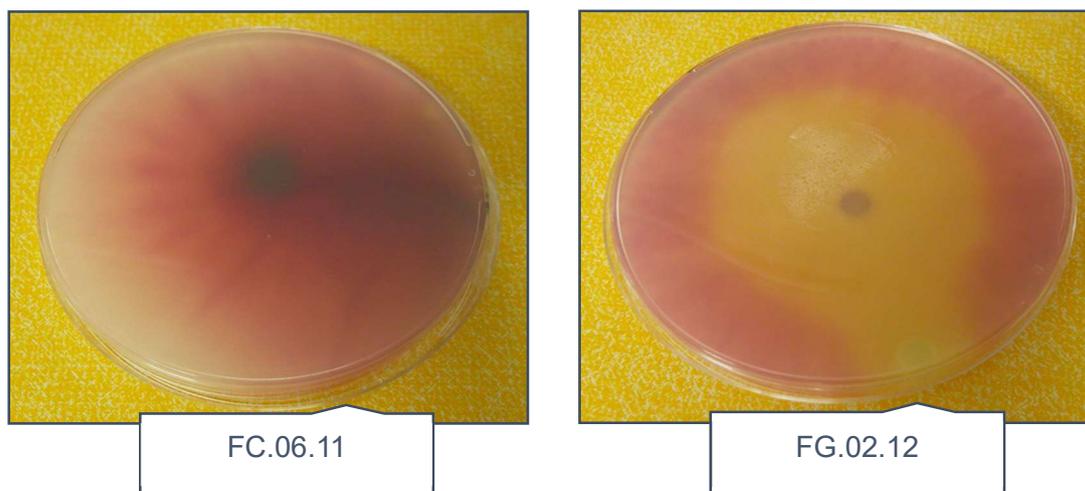


Figure 28. Isolats de *Fusarium culmorum* (FC.06.11) et de *F. graminearum* (FG.02.12)
(Original)

II.2.3.2. Procédés d'évaluation de l'activité antifongique

L'activité des extraits méthanoliques vis-à-vis de la croissance mycélienne de *F. culmorum* et *F. graminearum* a été étudiée au laboratoire de physiologie végétale de l'ENSA selon la méthode décrite par Mishra et Dubey (1994) et rapportée par Adjou et Soumanou (2013) avec quelques modifications. La technique est basée sur l'utilisation d'un milieu de culture PDA

traité par les extraits méthanoliques communément appelée technique d'empoisonnement de milieu de culture.

Le test a été effectué dans des boîtes de Pétri stériles de 90 mm de diamètre, contenant 20 ml de PDA. Deux doses ont été retenues pour le test, soient (30 et 60 mg/ml). Un volume de 2 ml de chaque extrait de plante a été déposé à l'aide d'une micropipette dans le milieu de culture PDA, qui a été maintenue en fusion à une température de 40 à 45°C (Figure 29). Après écoulement et solidification du mélange (milieu de culture et extraits méthanoliques), un explant mycélien de 6 mm de diamètre de chaque agent pathogène, pris à partir des souches âgées de 7 jours a été inoculé dans le milieu des boîtes de Pétri préparées. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque traitement.

Les cultures sont ensuite incubées à 25°C et à l'obscurité pendant 6 jours ce qui correspond à l'optimum les conditions de croissance de *F. culmorum* et *F. graminearum*. Des boîtes témoins ne contenant que l'agent pathogène sont incubées dans les mêmes conditions. La notation des résultats se fait par la mesure de la croissance linéaire et diamétrale du mycélium de chaque agent pathogène après 6 jours d'incubation. L'évaluation de l'inhibition exercée par les extraits méthanoliques se fait par le calcul du pourcentage de réduction de la croissance mycélienne de *F. culmorum* et *F. graminearum* selon la formule suivante :

$$\text{MCI}\% = (\text{dc} - \text{dt} / \text{dc}) \times 100$$

dc et **dt** représentent respectivement les diamètres de la croissance mycélienne en cm pour le témoin (control) et dans les boîtes de Pétri traitées.

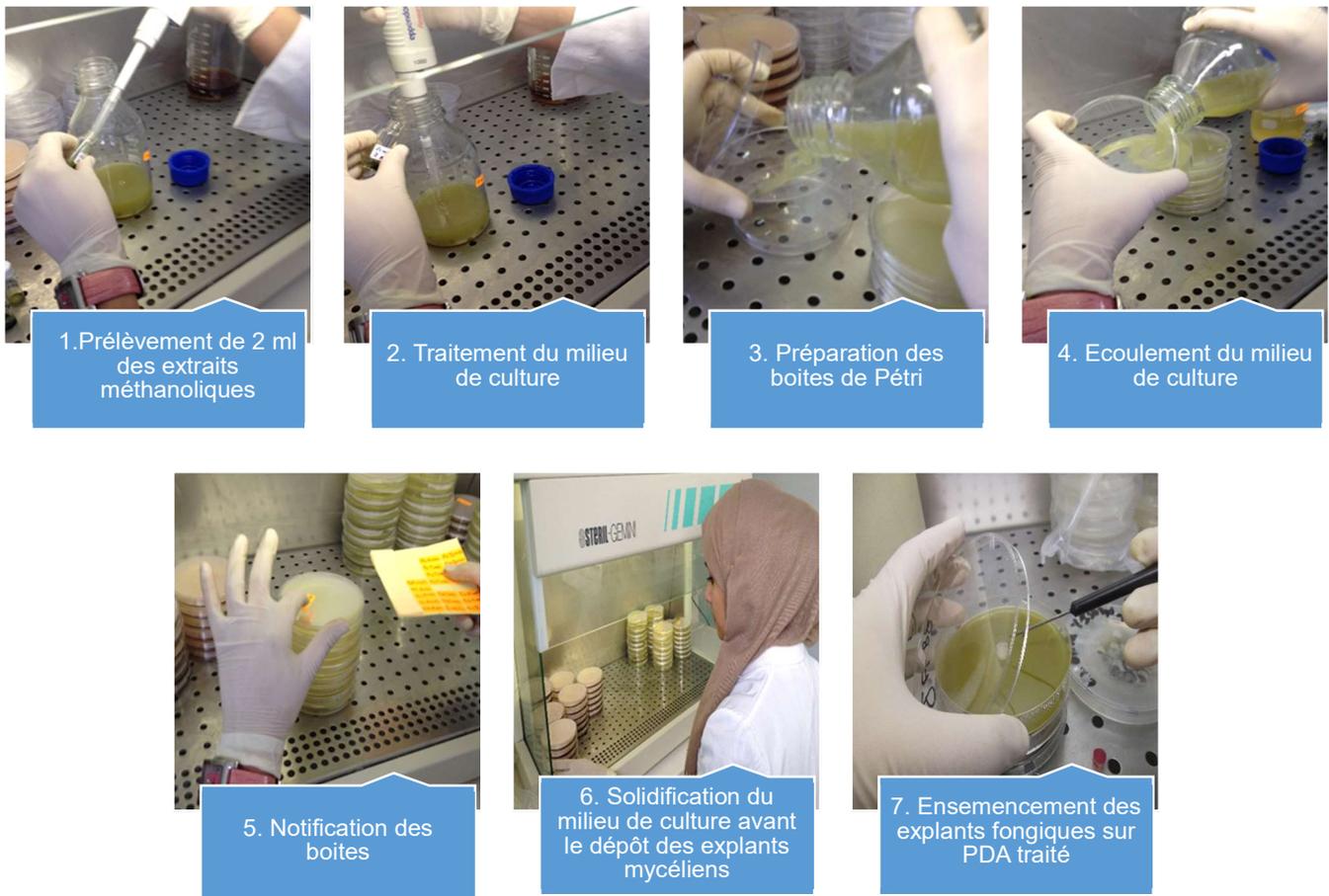


Figure 29. Réalisation de test d'évaluation de l'activité antifongique (Original)

II.3. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée sur XLSTAT, Minitab® version 2016.6 (logiciel statistique © pour Microsoft Excel (versions 2003 à 2016)). Les résultats ont été exprimés par la moyenne et l'écart type, les comparaisons statistiques ont été faites au moyen du test LSD de Fisher, test de Tukey et test de Dunnett. Ces deux derniers tests sont utilisés pour déterminer les différences significatives entre la moyenne du groupe témoin (de contrôle) et les moyennes des autres groupes de traitement. Les résultats des tests statistiques sont considérés comme significatifs lorsque la probabilité de l'hypothèse nulle est inférieure ou égale à 5 %.

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1. Etude phytochimique

L'analyse phytochimique des extraits méthanoliques de *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* constitue une étape d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants bioactifs responsables des propriétés biocides.

III.1.1. Rendement des extractions méthanoliques

Dans cette étude, trois solvants basés sur le méthanol ont été employés pour préparer les extraits de *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata*, à savoir le méthanol absolu (MET), le mélange méthanol/chloroforme (MEC) et le mélange méthanol/eau (MEW). Le tableau 5 montre les rendements en extraits bruts obtenus à partir de parties aériennes de *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata*. Le rendement d'extraction est exprimé en (g) et en (%). Les résultats décrits dans ce tableau révèlent une influence significative du pouvoir d'extraction du solvant sur le rendement. En effet, Le solvant pur (méthanol absolu) s'est montré particulièrement efficace par rapport aux solvants mixtes. Le rendement le plus élevé a été obtenu pour *J. phoenicea* avec 2,62 g d'extrait brut pour 12,5g de matière sèche utilisée.

Tableau 05. Rendement des extractions méthanoliques des différentes espèces

Extraits méthanoliques	Rendement (g/12,5g)	Rendement (%)
<i>A. absinthium</i>		
A _{MET}	1,45	11,59
A _{MEC}	1,27	10,17
A _{MEW}	1,60	12,84
<i>J. phoenicea</i>		
J _{MET}	2,62	20,98
J _{MEC}	2,09	16,76
J _{MEW}	1,27	10,19
<i>T. articulata</i>		
T _{MET}	2,206	17,64
T _{MEC}	1,831	14,64
T _{MEW}	0,70	5,63

Il est à noter que nos résultats révèlent une différence entre les rendements d'extraction pour les trois espèces de plantes testées. Selon Sultana et al. (2009), cette différence pourrait être attribuée à la variabilité des composés extractibles résultant de la variabilité de la composition chimique des plantes. Par ailleurs, plusieurs études soulignent que le pourcentage de rendement d'extraction dépend principalement de la procédure d'extraction, en particulier de la température utilisée pour l'extraction, de la polarité des composés extraits et du rapport de l'extraction solvants/échantillons (Huda-Faujan et al., 2009).

De plus, nos résultats révèlent que le méthanol pur est meilleur solvant que les solvants mixtes (méthanol-eau et méthanol-chloroforme), à l'exception des extraits d'*A. absinthium* où nous avons noté un rendement légèrement plus élevé avec le système d'extraction méthanol-eau (Figure 30).

En effet, le méthanol solubilise correctement des composés phénoliques moyennement polaires et peut entraîner aussi des substances lipophiles résiduelles. L'addition de l'eau au système d'extraction fait améliorer le rendement en composés phénoliques glycosylés et des phénols avec un degré de polymérisation plus élevé. D'autre part, l'augmentation de l'eau dans le système de solvant d'extraction fait extraire en quantité importante les composés non phénoliques comme les glucides et les protéines, susceptibles de polymériser avec les composés phénoliques ce qui conduit à la formation des complexes colloïdaux (Tsao, 2010).

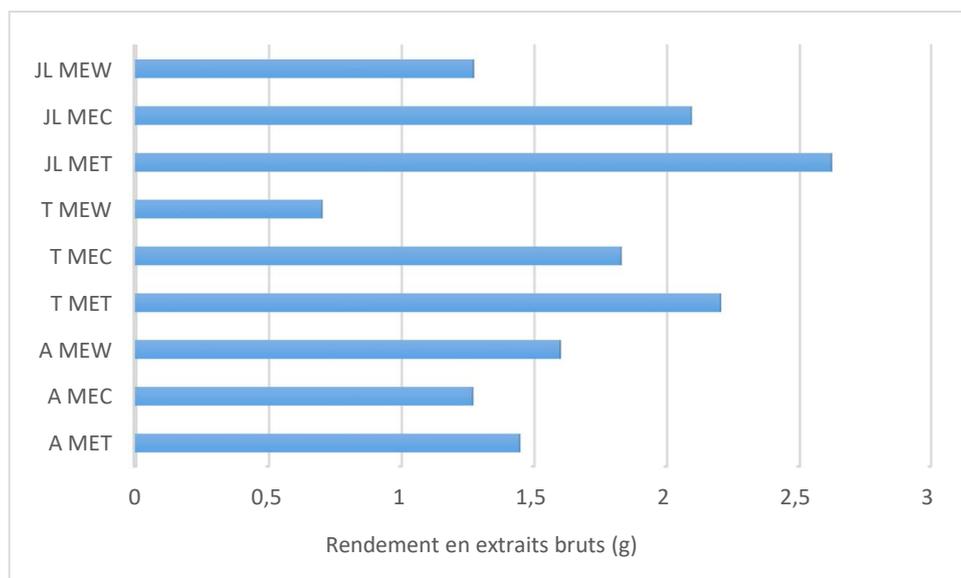


Figure 30. Rendement de l'extraction méthanolique des trois plantes étudiées

Ainsi, l'utilisation du solvant mixte (méthanol/chloroforme) a permis d'avoir un rendement supérieur à celui du mélange (méthanol/eau) pour les deux espèces des cupressacées étudiées (Figure 30). Cela peut être confirmé par la texture des extraits de *J. phoenicea* et *T. articulata* (aspect collant, cire). En effet, le chloroforme est un excellent solvant pour de nombreux composés organiques tels que les résines et les cires.

Suite à tous ces résultats démontrés ci-dessus, nous concluons que l'utilisation des solvants polaires permet d'avoir un rendement meilleur en extraits bruts pour les trois espèces étudiées.

III.1.2. Analyse Chromatographique des polyphénols

La méthode de chromatographie en phase liquide à haute pression couplé à un détecteur de réseau de photodiodes et la spectrométrie de masse (UPLC-PDA-MS) a été développée pour l'analyse de polyphénols présents dans les extraits d'*A. absinthium*, *J. Phoenicea* et *T. articulata*. Les composés phénoliques ont été identifiés par comparaison de leurs temps de retentions UPLC et leur spectres UV avec les standards (la gallate, la myricétine, le penta-O-galloyl-B-D-glucose, et la lutéoline-7-O-glucoside). Les chromatogrammes UPLC-PDA des extraits de plantes exploitées par les différents solvants (méthanol absolu, méthanol/eau et méthanol/chloroforme) sont illustrés dans les figures (Fig. 31, Fig. 32 et Fig. 33).

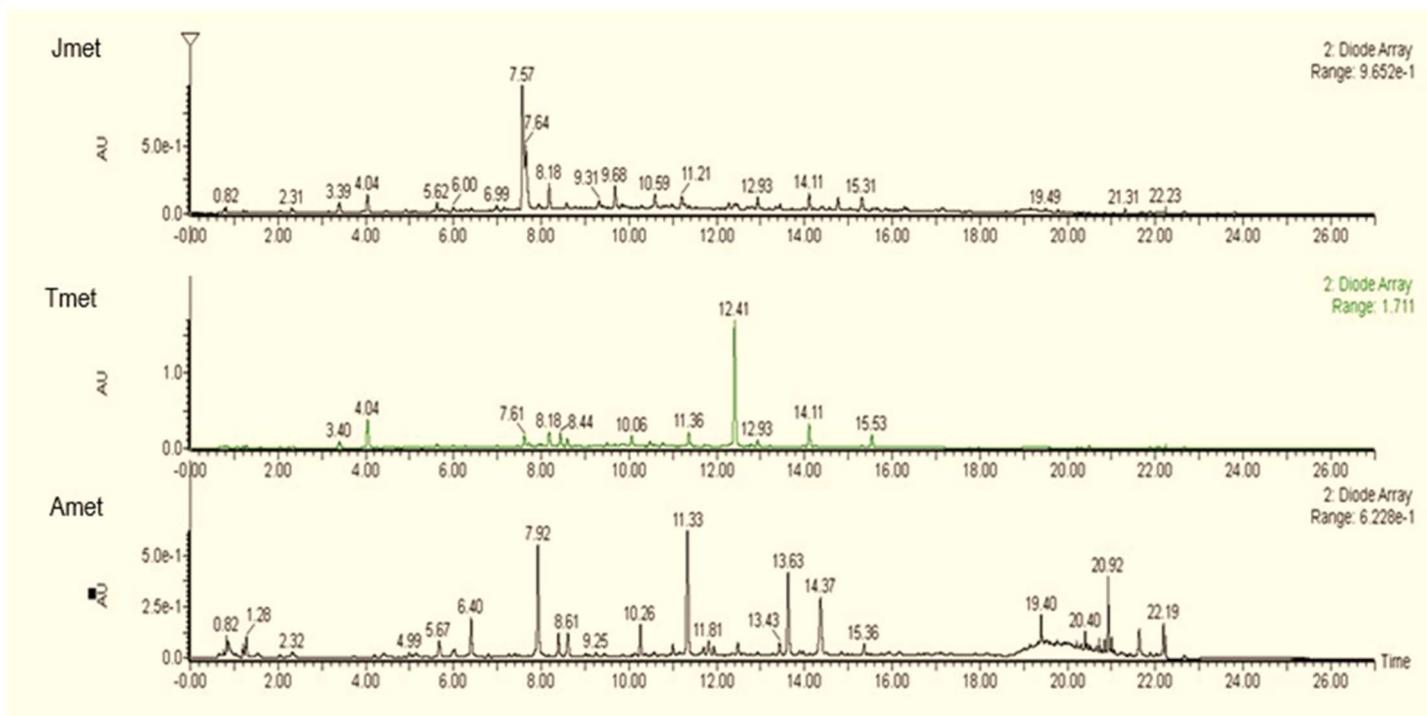


Figure 31. Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (Amet : *Artemisia absinthium* ; Jmet : *Juniperus phoenicea* ; Tmet : *Tetraclinis articulata*) (solvant utilisé : méthanol absolu)

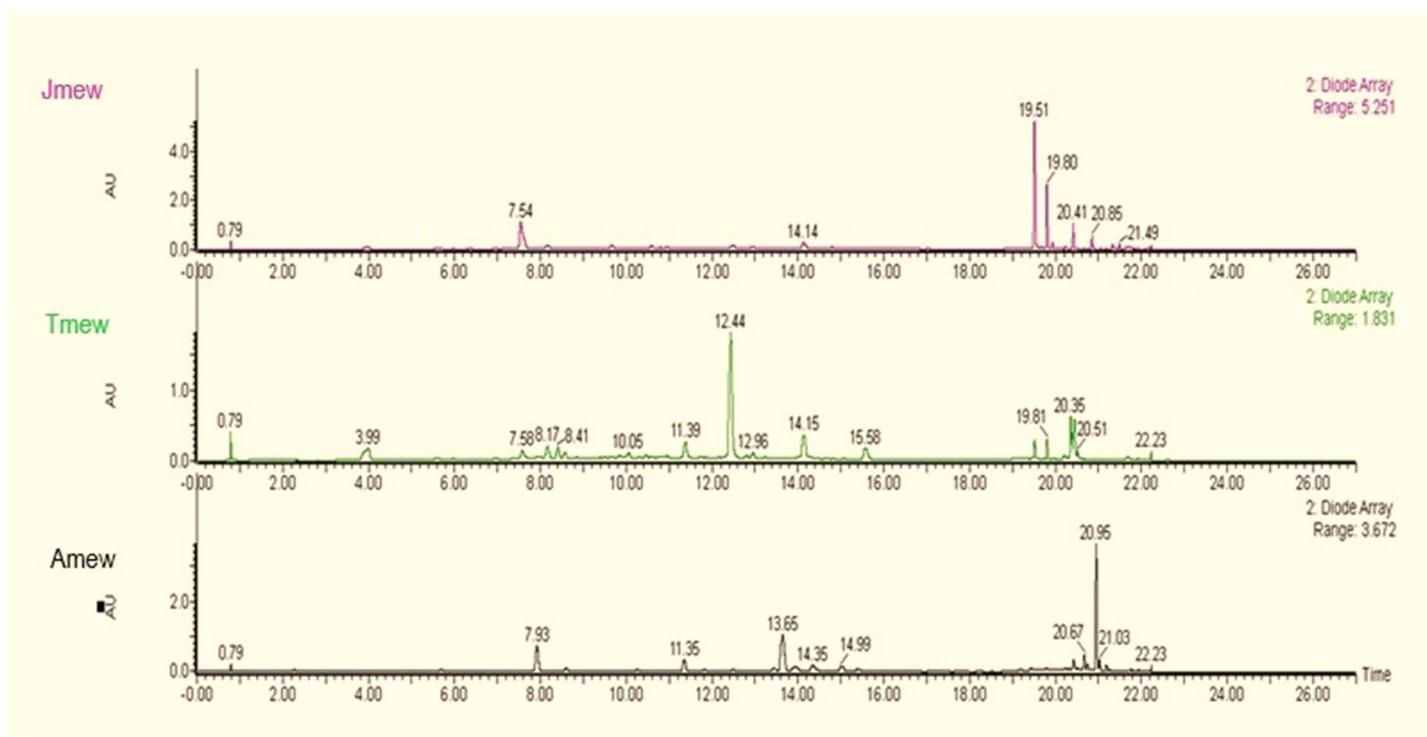


Figure 32. Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (Amew : *Artemisia absinthium* ; Jmew : *Juniperus phoenicea* ; Tmew : *Tetraclinis articulata*) (solvant utilisé : méthanol/eau)

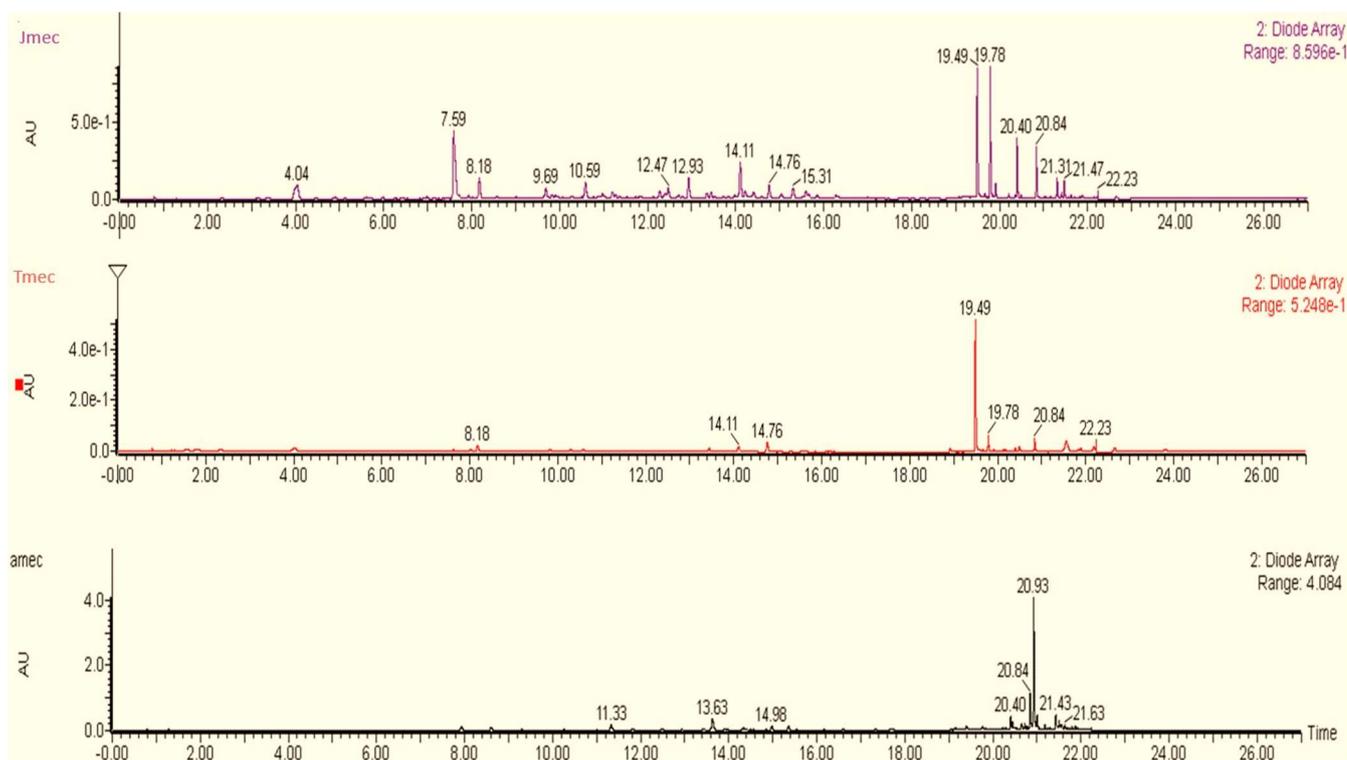


Figure 33. Chromatogrammes UPLC- PAD-MS des trois extraits (Amec : *Artemisia absinthium* ; Jmec : *Juniperus phoenicea* ; Tmec : *Tetraclinis articulata*) (solvant utilisé : méthanol/chloroforme)

Le tableau 6 résume, dans l'ordre du temps de rétention, les polyphénols identifiés pour chaque extrait méthanolique. L'identification a été basée essentiellement sur les spectres obtenus par l'utilisation du méthanol absolu pour l'extraction, car le nombre de pics obtenus a été plus élevé par rapport aux autres pics obtenus pour les autres extraits. L'analyse nous a permis d'identifier sept composés phénoliques pour *A. absinthium*, quatre pour *J. Phoenicea* et sept pour *T. articulata*.

Pour *A. absinthium*, nous avons identifié les acides phénoliques suivants: acide chlorogénique (acide 3caffeoylquinique); Acide néochlorogénique (acide 5-caffeoylquinique); Acide 4-caffeoylquinique (acide crypto-chlorogénique); Et cynarine (acide dicaffeoylquinique). En ce qui concerne les glycosides flavonoïdes, les extraits d'*A. absinthium* contiennent du veronicastroside (Luteolin rutinoside) et de la Glycosyl-arabinosyl-luteolin, tandis que la myricétine-hexose, la myricétine (myricétine-rhamnoside) et la quercitrine (quercétine-3-O-Rhamnoside) ont été identifiés dans l'extrait de *J. Phoenicea* Et *T. articulata*. L'isoquercétine (quercétine-3O-glucoside) n'a été identifiée que dans l'extrait de *T. articulata*. En ce qui concerne les flavonoïdes aglycones, la catéchine a été trouvée dans les extraits de *J. Phoenicea* et *T. articulata*. Les flavanols Kaempferol hexose et Kaempferol-deoxyhexose n'ont été détectés que dans des extraits de *T. articulata*.

Tableau 06. Polyphénols identifiés par UPLC- PAD-MS pour les trois extraits méthanoliques.

Composés	t _R (min)	Fragmen ts M+H (m/z)	Mw	max	Aire(λ (nm))	¹ Equation de Regression	Concentrati on mmol/L	Concentr ation de masse (mg/mL)
<i>Artemisia absinthium</i>								
Acide 3-O- caféoylquinique	6.4	355	354	290 sh, 324	4332 (320)	y = 146546,50 x-276.78	0.031	0.010
acide 5- caféoylquiniqu e	7.9 2	481, 319	480	290 sh, 324	10860 (320)	y = 146546,50 x-276.78	0.075	0.036
Acide 4- caféoylquiniqu e	8.3 9	465, 319	464	290 sh, 324	2205 (320)	y = 146546,50 x-276.78	0.016	0.007
La lutéoline : Luteolin rutinoside	10. 26	595	594	270, 335	2240 (335)	y = 204288,51 x- 108,55	0.011	0.006
Glycosyl- arabinosyl- luteolin	11. 33	565	564	270, 335	11757 (335)	y = 204288,51 x- 108,55	0.058	0.032
Acide ^a Dicafeoylquini que	13. 63	517	516	290 sh, 324	9212 (320)	y = 146546,50 x-276.78	0.064	0.033
Acide ^a Dicafeoylquini que	14. 37	517	516	290 sh, 324	8825 (320)	y = 146546,50 x-276.78	0.062	0.032
<i>Juniperus phoenicea</i>								
Catéchine	8.1 8	291	290	279	6994 (280)	y = 59833, 09x- 103,04	0.118	0.034
Myricetin- hexose	11. 36	481, 319	480	257, 356	322 (350)	y = 202663.56 x-80.6	0.019	0.009
Myricetin- rhamnoside	12. 41	465, 319	464	257, 356	726 (350)	y = 202663.56 x-80.6	0.003	0.001
Quercetin-3-O- rhamnoside	14. 11	449, 303	448	255, 354	2098 (350)	y = 267957, 85x - 283,87	0.008	0.037
<i>Tetraclinis articulata</i>								
Catéchine	8.1 8	291	290	279	7655 (280)	y = 59833, 09x- 103,04	0.129	0.037
Myricetin- hexose	11. 36	481, 319	480	257 356	3921 (350)	y = 202663.56 x-80.6	0.019	0.009
Myricetin- rhamnoside	12. 41	465, 319	464	257, 356	36804 (350)	y = 202663.56 x-80.6	0.181	0.084
Quercetin-3-O- glucoside	12. 78	465, 303	464	255, 354	703 (350)	y = 240672.95 x - 204.93	0.003	0.001
Kaempferol- hexose	13. 98	449, 287	448	264, 348	397(350)	y= 316415,04 x - 133,51	0.001	0.000 4
Quercetin-3-O- rhamnoside	14. 11	449, 303	448	255, 354	36804 (350)	y = 267957, 85x - 283,87	0.138	0.061
Kaempferol- deoxyhexose	15. 53	433, 287	432	264, 348	3163 (350)	y= 316415,04 x - 133,51	0.010	0.004

D'après le tableau 6, Le pic éluant à $t_R = 6,40$ minutes (Figure 34) a montré une absorption UV maximale à 324 nm et un épaulement à 290 nm avec un ion moléculaire à 355 m/z, correspondant à l'acide chlorogénique. La catéchine a été détectée à $t_R = 8,18$ minutes dans les extraits de *J. phoenicea* et *T. d'articulata* (Figure 35 et 36). Le spectre de masse de ce composé a montré une absorption UV maximale à 280 nm et un ion moléculaire à 291 m/z.

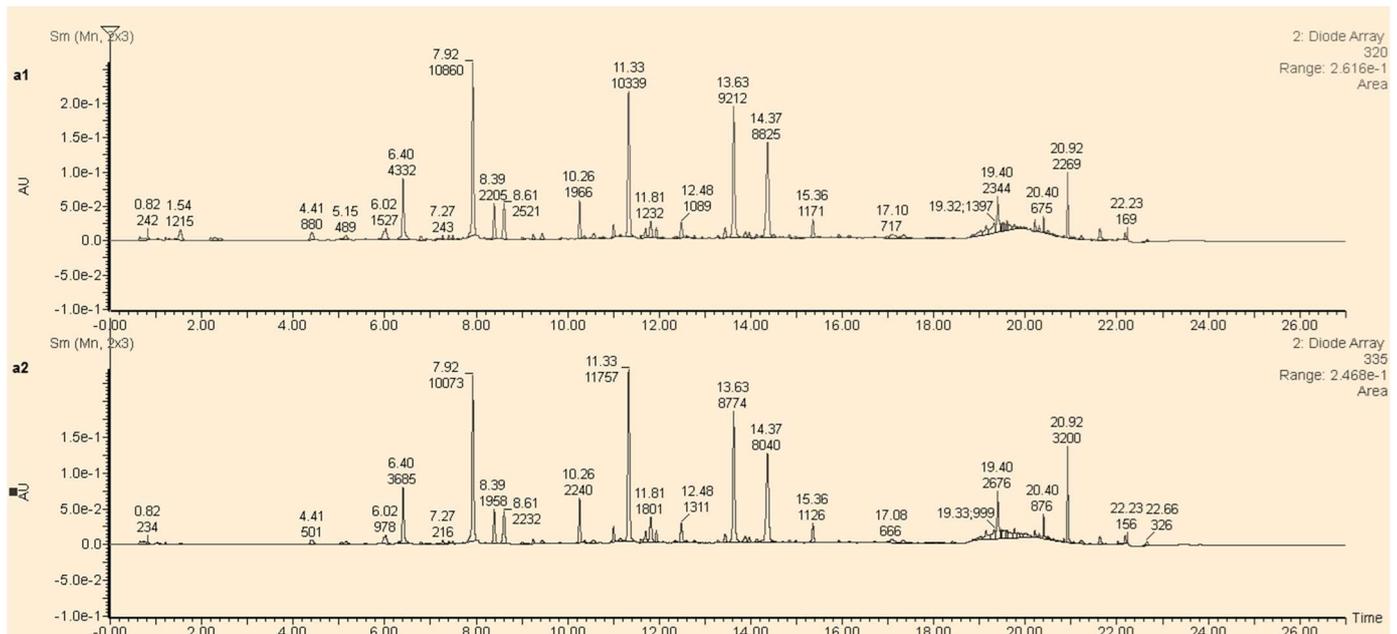


Figure 34. Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de *Artemisia absinthium*: (a1) enregistré à $\lambda = 320$ nm et (a2) à $\lambda = 335$ nm

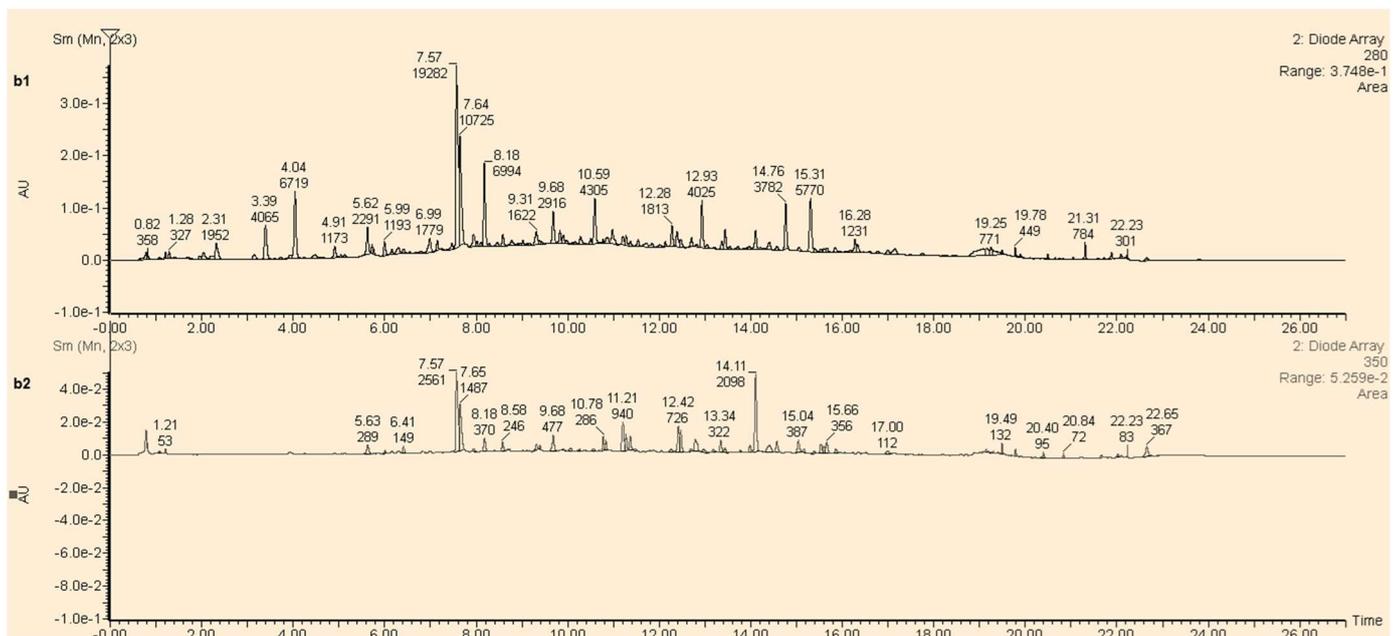


Figure 35. Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de *Juniperus phoenicea*: (b1) enregistré à $\lambda = 280$ nm et (b2) à $\lambda = 350$ nm

Un autre métabolite éluant à tR = 7,92 min a montré des ions fragments à 481 et 319 m/z et une absorption maximale (λ max) à 324 nm et à un épaulement à 290 nm, caractéristiques de l'acide 5-cafeoilquinique. A tR = 8,39 min (Figure 34), nous avons identifié l'acide 4-caffeoylquinique, un composé à ions fragment à 465 et 319 m/z et un spectre UV avec λ max à 320 nm et un épaulement à 290 nm. La structure de Luteolin rutinoside a été suggérée pour le composé avec un ion moléculaire à 595 m/z et un pic éluant à tR = 10,26 min qui a montré une absorbance maximale à 270 et 335 nm. Le pic éluant à tR = 11,33 min a montré des maxima d'absorption UV à 270 et 335 nm, et un ion moléculaire à 565 m/z ce qui nous a emmené vers la Glycosyl-arabinosyl-luteolin. Les composés les plus abondants dans l'extrait de *A. absinthium* sont les acides dicaffeoylquiniques, qui éluèrent à 13,63 et 14,37 minutes, avec une absorbance maximale UV à 324 nm, un épaulement à 290 nm et un ion moléculaire à 517 m/z (Figure 34).

Les résultats d'identification obtenus pour *A. absinthium* sont proches à ceux obtenus par Niranjana et al (2009), notamment en ce qui concerne la présence des acides chlorogéniques et caféiques. En effet, ces chercheurs ont pu identifier un ensemble de huit composés phénoliques pour la première fois à partir des extraits d'*Artemisia pallens* en utilisant la méthode d'HPLC-UV-MS-MS, espèce largement utilisée dans la médecine traditionnelle indienne, et connue pour ses effets thérapeutiques et propriétés biologiques.

En ce qui concerne les spectres UPLC pour les extraits de *J. Phoenicea* et *T. articulata*, un pic d'éluion à tR = 11,36 min a montré une absorbance à 257 et 356 nm, avec des ions à 481 et 319 m/z ce qui nous aide à suggérer la myricétine-hexose. La structure du myricétine-rhamnoside a été attribuée au composé qui a élué à 12,41 minutes, ce qui a montré des ions moléculaires à 365 et 319 m/z. En outre, nous avons supposé que le composé éluant à 14,11 minutes était de la quercétine-3-O-Rhamnoside, avec des ions moléculaires à 449 et 313 m/z, et λ max à 255 et 254 nm (Figure 35 et 36). En outre, sur la base du fragment caractérisé à 465 et 303 m/z avec λ max à 255 et 355 nm, le quercétine-3-O-glucoside a été identifié à tR = 12,78 min pour l'extrait de *T. articulata*. Les données UV et l'analyse MS du pic éluant à 13,98 min avec un ion moléculaire à 449 et 287 m/z et une absorbance maximale à 264 et 348 nm correspondaient à kaempferol-hexose. De plus, à 15,53 min, nous avons supposé que le composé avec un ion moléculaire à 433 et 287 m/z et λ max à 264 et 348 nm était le kaempferol-désoxyhexose (Figure 36).

Ainsi, les résultats illustrés dans le tableau 6 et 7 montrent que les substances bioactives les plus abondantes dans l'extrait d'*A. absinthium* étaient des acides phénoliques, avec 41,66% d'acides dicaffeoylquiniques (0,033 et 0,032 mg/mL), suivis de 23,07% (0,036 mg/mL) d'acide 5-cafeoylquinique. En revanche, les flavonoïdes étaient présents en abondance dans les extraits des espèces de Cupressaceae, enregistrant 0,037 mg/mL (45,67%) de quercétine-3-O-rhamnoside, suivie de 41,97% (0,034 mg/mL) de catéchine pour l'extrait de *J. Phoenicea* ainsi que 42,76% (0,084 mg/mL) de myricétine-rhamnoside et 31,05% (0,061 mg / mL) de quercétine-3-O-rhamnoside pour celui de *T. articulata*.

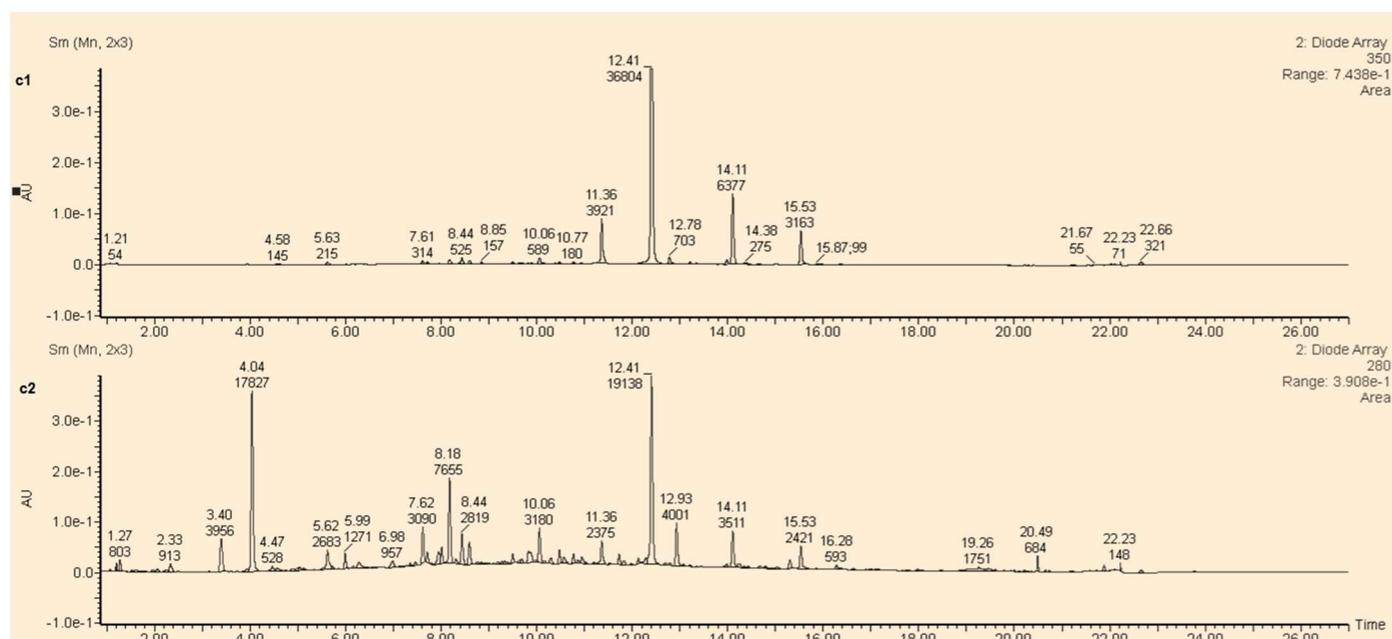


Figure 36. Chromatogramme UPLC- PAD-MS de l'extrait méthanolique de *Tetraclinis articulata* enregistré à (c1) $\lambda=350$ nm et (c2) à $\lambda= 280$ nm

Tableau 07. Pourcentage des composés phénoliques dans chaque extrait méthanolique

Extrait méthanolique	Composés phénoliques	%
<i>Artemisia absinthium</i>	3-caffeoylquinique	6.4
	5-caffeoylquinique	23.07
	4-caffeoylquinique	4.48
	Luteolin rutinoside	3.84
	Glycosyl-arabinosyl-luteolin	20.51
	acide dicaffeoylquinique	21.15
	acide dicaffeoylquinique	20.51
<i>Juniperus phoenicea</i>	Catéchine	41.97
	Myricetin-hexose	11.11
	Myricetin-rhamnoside	1.23
	Quercetin-3-O-rhamnoside	45.67
<i>Tetraclinis articulata</i>	Catéchine	18.83
	Myricetin-hexose	4.58
	Myricetin-rhamnoside	42.76
	Quercetin-3-O-glucoside	0.5
	Kaempferol-hexose	0.20
	Quercetin-3-O-rhamnoside	31.05
	Kaempferol-deoxyhexose	2.03

Globalement, les résultats de notre analyse montrent clairement une différence entre la composition phénolique des extraits d'*A. absinthium* (Asteraceae) et de *J. phoenicea* et *T. articulata*.

En revanche, les composés phénoliques identifiés dans les extraits de *J. Phoenicea* et *T. articulata*, espèces appartenant à la même famille (Cupressaceae), étaient qualitativement similaires, avec plus de composés identifiés dans l'extrait de *T. articulata*. En effet, cette différence de la composition chimique observée entre les trois espèces pourrait s'expliquer par une adaptation aux facteurs biotiques et abiotiques, tels que le microclimat spécifique aux régions de provenance des échantillons, aux facteurs géographiques comme l'altitude et la nature du sol qui orientent la biosynthèse vers la formation préférentielle de produits précis (Mansouri et al., 2011). De plus, plusieurs facteurs peuvent affecter le contenu des principes actifs dans un matériel végétal lors de l'échantillonnage, le traitement et la conservation. Des études antérieures ont rapporté que la présence de composés phénoliques (principalement des flavonoïdes) dans les feuilles est corrélée avec la période d'intensité lumineuse la plus élevée (Tattini et al., 2004) ou avec le stress hydrique (Nacif de Abreu et al., 2005 ; Dos Santos et al., 2014).

Comme noté, les rendements en extraits et leurs compositions variaient en fonction des espèces de plantes, des zones de récolte ou d'échantillonnage, de conservation d'échantillon, des méthodes d'extraction, des solvants utilisés... Pour cela, la comparaison de nos résultats avec ceux obtenus par d'autres chercheurs s'est avérée difficile.

En outre, Les composés phénoliques identifiés présentent un intérêt biologique connu et démontré par plusieurs études antérieures. Notamment, les flavonoïdes qui sont parmi les composés phénoliques qui ont été signalés pour réguler l'oviposition et l'alimentation des insectes. Cette partie sera détaillée un peu plus loin dans ce chapitre.

III.1.3. Analyse par H-RMN

Les profils métaboliques de *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* ont été examinés par la technique de Résonance Magnétique Nucléaire de Proton ^1H RMN, avec une série de procédés d'extraction répétés. Le référentiel BioMagResBank (BMRB: www.bmrb.wisc.edu), répertoire des données expérimentales provenant des études spectroscopiques de résonance magnétique nucléaire (RMN) des molécules biologiques (Ulrich et al., 2008), a été utilisé pour l'identification et l'analyse des spectres ^1H -RMN obtenus. Seuls les composés présents dans les trois extraits (extrait méthanol absolu, méthanol/eau et méthanol/chloroforme) de la même espèce, et dont la valeur de variation est inférieure à 0.01 ont été sélectionnés.

Les échantillons et les abréviations utilisés pour l'analyse RMN et le nombre des signaux observés dans les spectres sont listés dans le tableau 8. Les résultats révèlent que l'effet du type de solvants d'extraction est significatif. Les spectres ^1H RMN représentatifs de chaque extrait sont représentés dans les figures (37-45) ci-dessous. Ces spectres (représentant des extraits de plantes exploitées) montrent que bien que les résonances des espèces soient facilement apparentes, notamment dans les régions dont les fréquences sont entre (2 et 5 ppm), il existe de nombreuses autres régions du spectre où de grandes différences se produisent entre les différents extraits. En particulier, la région entre (6 et 8 ppm) qui a des différences marquées dans les spectres.

Ainsi, Les résultats de notre étude montrent que l'extraction par méthanol absolu ou avec le mélange méthanol /chloroforme permet d'avoir un nombre de pics et des signaux plus élevés par rapport à l'extraction par le mélange méthanol/eau. De plus, l'analyse des spectres nous a permis d'identifier des composés appartenant à différentes familles chimiques, notamment des flavonoïdes et des acides phénoliques, confirmant les résultats d'analyse par UPLC.

Tableau 08. Liste des échantillons RMN, des abréviations et nombres des signaux observés dans les spectres ¹H-RMN

Extrait	Figure N°	Solvant	abréviations	Nombre des signaux
A <i>absinthium</i>	37	Méthanol	Amet	298
	38	Méthanol/eau	Amew	288
	39	Méthanol/chloroforme	Amec	298
J. <i>phoenicea</i>	40	Méthanol	Jmet	384
	41	Méthanol/eau	Jmew	367
	42	Méthanol/chloroforme	Jmec	391
T. articulata	43	Méthanol	Tmet	251
	44	Méthanol/eau	Tmew	149
	45	Méthanol/chloroforme	Tmec	365

III.1.3.1 Analyse des spectres d'*A. absinthium*

En utilisant les données relatives aux spectres obtenus pour *A. absinthium* (Figure 37,38 et 39), nous avons pu identifier les composés illustrés dans le tableau 9. La fréquence en ppm et l'intensité de pic, relatives à chaque composé identifié sont aussi rapportés. L'analyse des pics nous a permis d'identifier des composés de nature différente, notamment des aldohexoses, des acides aminés, des acides phénoliques et des flavonoïdes. Les acides phénoliques tels que l'acide chlorogénique, ferulique, quinique et p-coumarique ont été détectés dans la région (3 – 5 ppm). Ces derniers sont connus pour leurs importantes propriétés biologiques, et ont fait l'objet d'étude de plusieurs travaux de recherche.

L'analyse des spectres montrent que l'extraction par le méthanol absolu ou avec le mélange méthanol chloroforme permet d'avoir un nombre de signaux important. Néanmoins, Les pics les plus élevés sont obtenus avec le mélange méthanol/eau.

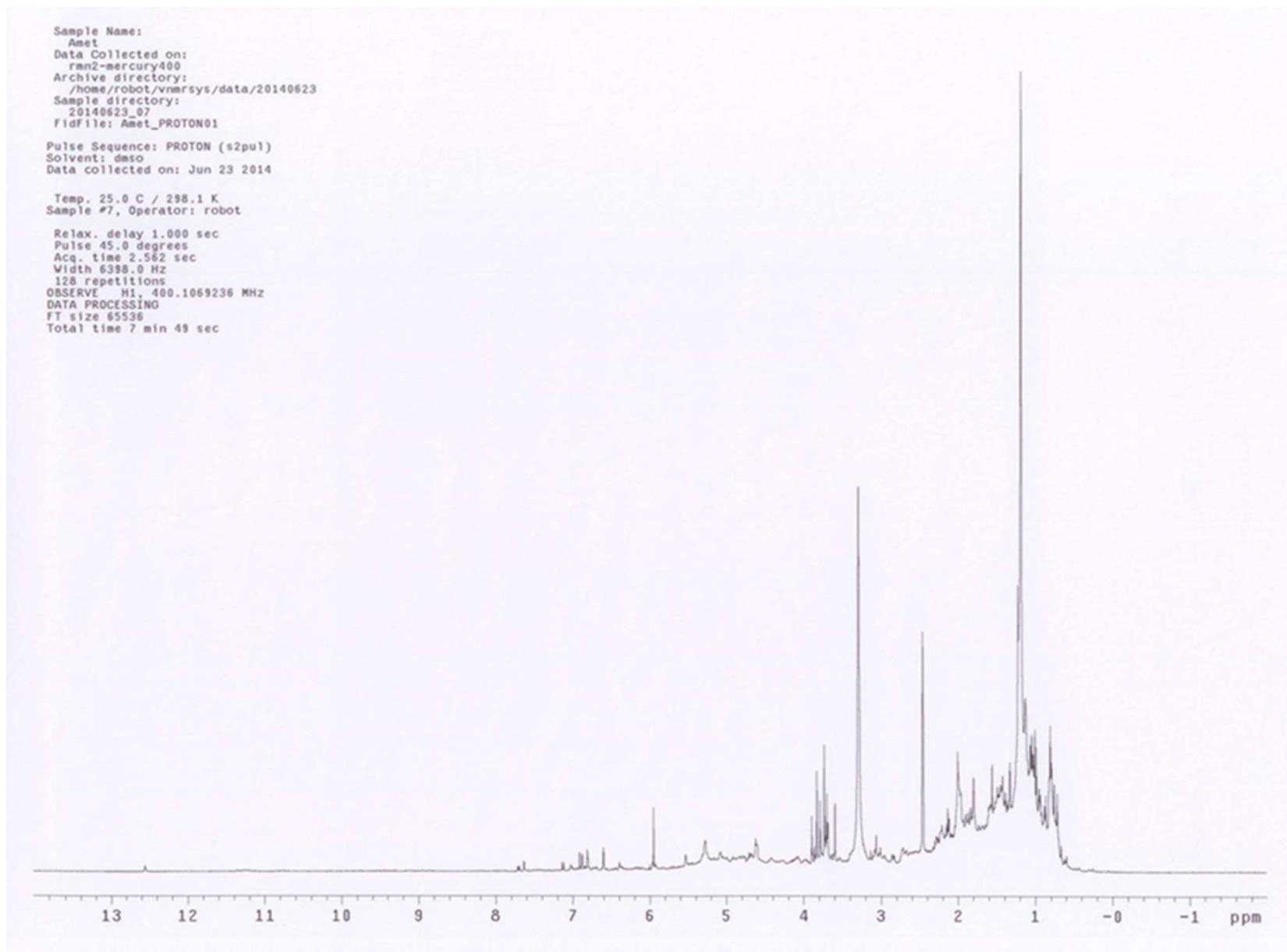


Figure 37. Spectre 1H-RMN de l'extrait Amet (méthanol brut) d'*A. absinthium*

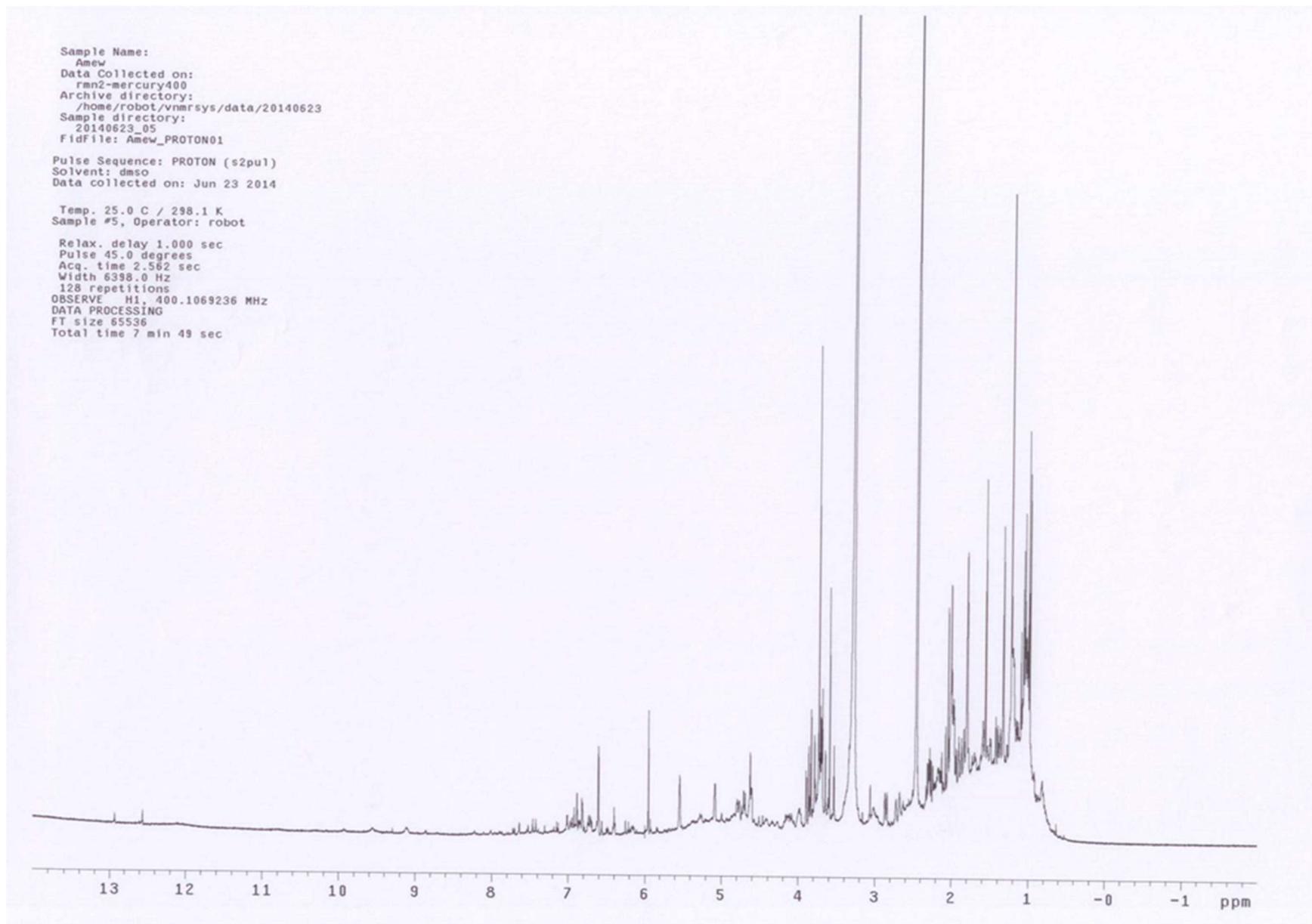


Figure 38. Spectre 1H-RMN de l'extrait Amew (méthanol/eau) d'*A. absinthium*

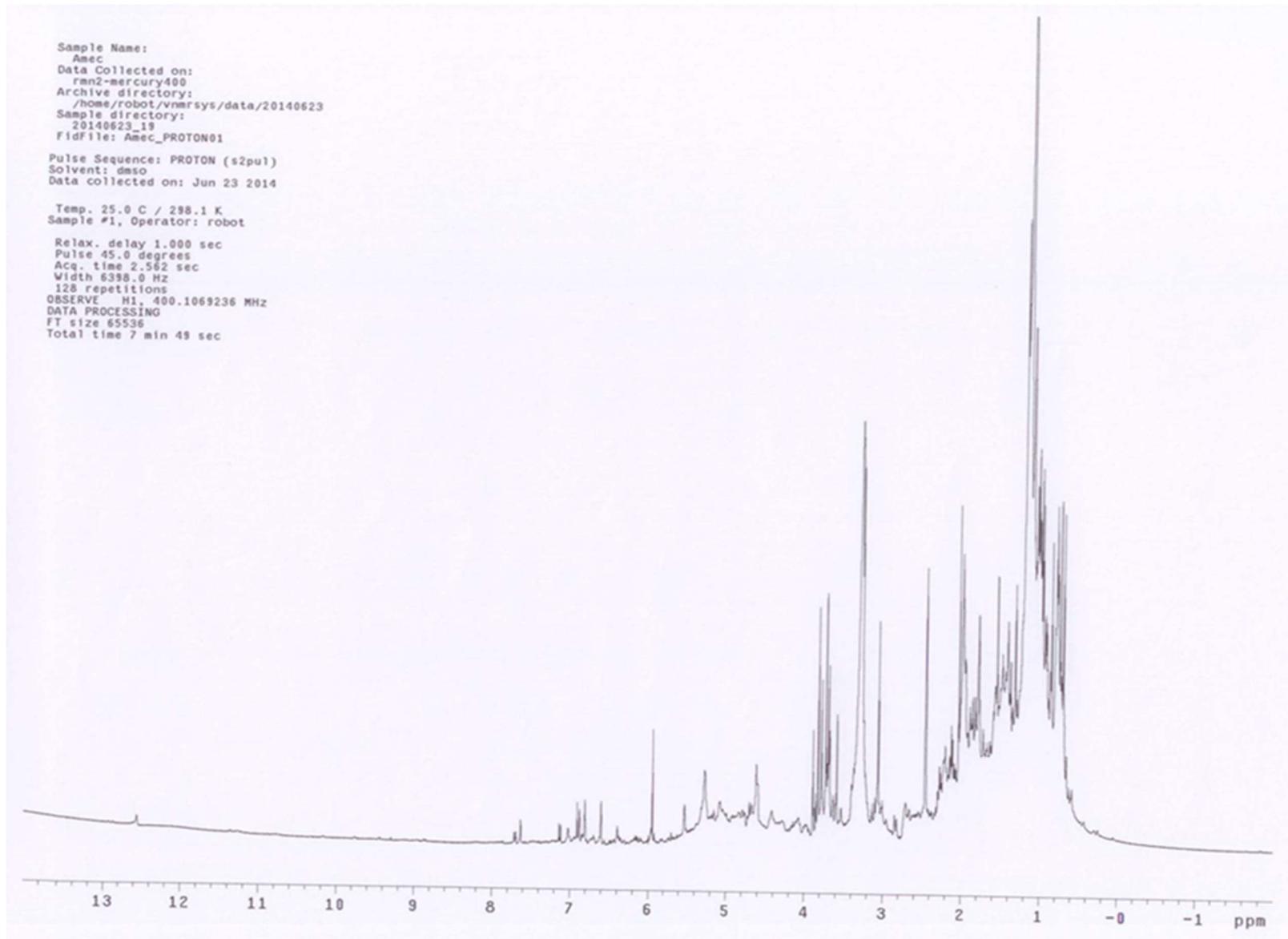


Figure 39. Spectre 1H-RMN de l'extrait A mec (méthanol/chloroforme) d'*A. absinthium*

Les composés présents dans le tableau 9 sont classés par rapport à leurs fréquences. Les résultats d'analyse révèlent la présence des composés organophosphorés tels que la D_glucosamine_6_phosphate, des monosaccharides (N_acetyl_D_glucosamine et D_glucose), des acides aminés (ex : acide aspartique), des polyamines (Spermidine) et des polyphénols principalement dans la région (3-6 ppm).

Les résultats confirment la présence des acides chlorogéniques (5.315 ppm) déjà identifiés par UPLC et des flavonoïdes (Quercétine à 2.6711 ppm ; flavones à 7.425). Le méthyl jasmonate a été détecté à 5.459 ppm, il s'agit d'une dérivée de l'acide jasmonique, une phytohormone qui intervient dans le système de défense de certaines plantes. En effet, des chercheurs ont trouvé que l'acide jasmonique est libéré pendant l'attaque d'un insecte et contrôle la réponse à un endommagement mécanique. Des pathogènes peuvent aussi déclencher la production d'acide jasmonique. Il s'agit donc d'une molécule de défense générale (Miller et *al.*, 2005). En outre, la présence de l'acide nicotinique a été détectée à 7.504 ppm. Ce dernier présente des propriétés insecticides connus mondialement. En effet, les néonicotinoïdes dominent le marché d'insecticide avec 23.1% suivi par les pyréthriinoïdes (15.1%), les organophosphorés (13.3%) et les carbamates (10.6%) (Bodereau, 2012). La présence des deux acides aminés l'ornithine (3.043 ppm) et l'arginine (3.764 ppm) connus pour leurs propriétés médicales (notamment antiparasitaire) a été aussi confirmé.

Tableau 09. Les principaux composés identifiés par ¹H-RMN d'*A. absinthium*

N°	Composés	Fréquence ppm	Intensité	Erreur probable (ppm)
01	α-phellandrène	0.9014	0.86	0.003
02	4, 7,7-trimethyl-8-oxabicyclo [2.2.2] octane (eucalyptol)	1.4905	18.561	0.004
03	4-methyl-1-propan-2-ylbicyclo [3.1.0] hexan-4-ol hydrate (4-Thujanol)	1.6014	0.91	0.005
04	DL-2-camphanone	1.690	58.00	0.001
05	DL_ acide pipercolique	1.73	0.319	0.001
06	Spermine	1.786	4.780	0.002
07	L_ methionine	2.629	4.75	0.002
08	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one ; (quercétine)	2.6711	6.30	0.001
09	Acide L-cysteinesulfinique	2.691	94.968	0.003
10	D_ornithine	3.043	15.00	0.002
11	Spermidine	3.044	58.290	0.001
12	Phenethylamine	3.278	101.830	0.002
13	Acide quinique	3.538	58.822	0.005
14	Acide polygalacturonique	3.758	0.414	0.003
15	Acide Argininosuccinique	3.76	1.86	0.001
16	L_arginine_L_ glutamate	3.763	6.186	0.002
17	L_arginine	3.764	6.80	0.003
18	N_acetyl_D_glucosamine	3.825	3.659	0
19	Selenomethionine	3.830	1.803	0
20	Acide ferulique	3.858	104.265	0.001

Tableau 09. Les principaux composés identifiés par 1H-RMN d'*A. absinthium* (Suite)

21	L_acide aspartique	3.885	3.923	0.001
22	D_Aspartate	3.886	4.049	0.001
23	Acide N_acetylneuraminique	3.978	0.711	0.001
24	Acide malique	4.286	1.01	0.006
25	Acide chorismique	4.885	1.369	0.003
26	D_glucose	5.2259	5.96	0
27	Acide Chlorogénique	5.315	16.006	0.005
28	D_glucosamine_6_phosphate	5.458	1.376	0.004
29	Méthyl jasmonate	5.459	4.061	0.001
30	Acide ethacrynique	6.078	2.353	0.004
31	Acide shikimique	6.431	1.881	0.004
32	Coumarine	6.432	100.906	0.002
33	Acide trans-3-Hydroxycinnamique	7.143	3.235	0
34	Flavone	7.425	4.15	0.004
35	Acide Nicotinique	7.504	0.894	0.003
36	Acide p-coumarique	7.506	102.450	0.001
37	Acide Indole-3-acétique	7.638	1.056	0

Les résultats de notre étude rejoignent ceux obtenus par Lopes-Lutz et *al* (2008) en ce qui concerne la présence de 1,8-Cineole ou 4, 7,7-triméthyl-8-oxabicyclo [2.2.2] octane, le 4-Thujanol, et le DL-2-camphanone dans les extraits de *A. absinthium*. Ces monoterpènes ont été signalés à une fréquence de 1.4905 ppm et 1.6014 ppm respectivement. Ils sont considérés comme étant les composés les plus actifs de l'absinthe, et sont connus pour leurs propriétés biologiques notamment, insecticides et insectifuges (Sfara et *al.*, 2009). Les extraits d'*A. absinthium* contiennent aussi des terpénoïdes, représentés par l' α -phellandrène signalé à (0.9014 ppm).

III.1.3.2 Analyse des spectres de *J. phoenicea*

L'analyse des spectres des extraits de *J. phoenicea* nous a permis d'identifier et de lister les composés rapportés dans le tableau 10. Les résultats révèlent que l'extraction au méthanol permet la récupération de différents composés, notamment en utilisant le mélange de solvants méthanol-eau (Jmew). L'extraction méthanol-eau permet de récupérer plus de composés que lorsque nous utilisons le méthanol absolu (Jmet), principalement dans les régions:

- 7-5 ppm (composés avec des doubles liaisons C=C, ex : Acide gallique et Aldo hexoses sous forme de glucose)
- 4,8-4,6 ppm (aldohexoses sous forme de glucose)
- 4,5-4,2 ppm (acides maliques et saccharose)
- 3,5-3,1 ppm (monosaccharides)
- 3,0-2,0 ppm (acide malique, citrique et pyruvique, asparagine, aspartate, glutamine ...) (Fig.

40 et 41).

En outre, L'extraction avec le solvant chloroforme-méthanol (Jmec) permet de récupérer des composés moins polaires en plus de ceux qui sont présents dans les spectres obtenus dans Jmet et Jmew. Les signaux les plus importants de ces composés sont répartis dans la zone de 1,9 à 0,5 ppm (Figure 42).

L'analyse par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ^1H -RMN nous a permis d'identifier des composés organiques de différentes natures, qui ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche pour leurs effets pharmaceutiques et phytopharmaceutiques. Notant principalement des terpènes (Fenchol à 0.981 ppm, α -phellandrène à 1.662 ppm, Terpinolène à 2.337ppm), des monoterpènes (Neomenthol à 1.269 ppm ; Sabinène à 1.534 ppm, myrtenal à 2.869 ppm et α -pinène à 3.073 ppm), des acides aminés (D_ornithine, Spermidine, Selenomethionine ... à 3.043, 3.149 et 3.83 respectivement), des acides organiques (acide polygalacturonique et acide argininosuccinique à 3.75 et 3.76 ppm), des hexoamines monosaccharides (N_acetyl_D_mannosamine à 4.44 ppm), des vitamines (la β -carotène à 6.151 ppm et acide nicotinique à 7.504 ppm) et des phénylpropanoïdes (le Coniféryle à 6.731 ppm).

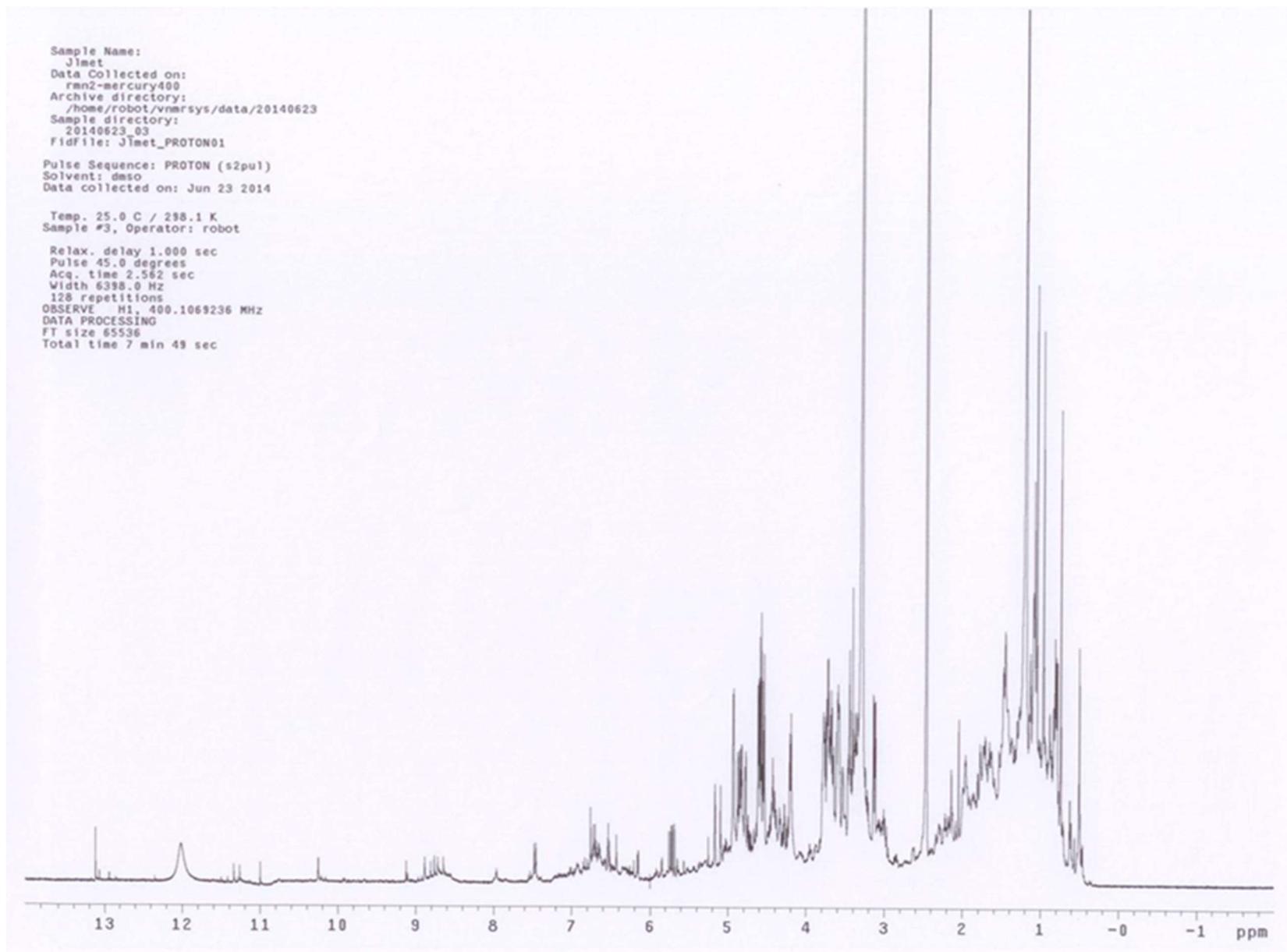


Figure 40. Spectre 1H-RMN de l'extrait J met (méthanol absolu) de *J. phoenicea*

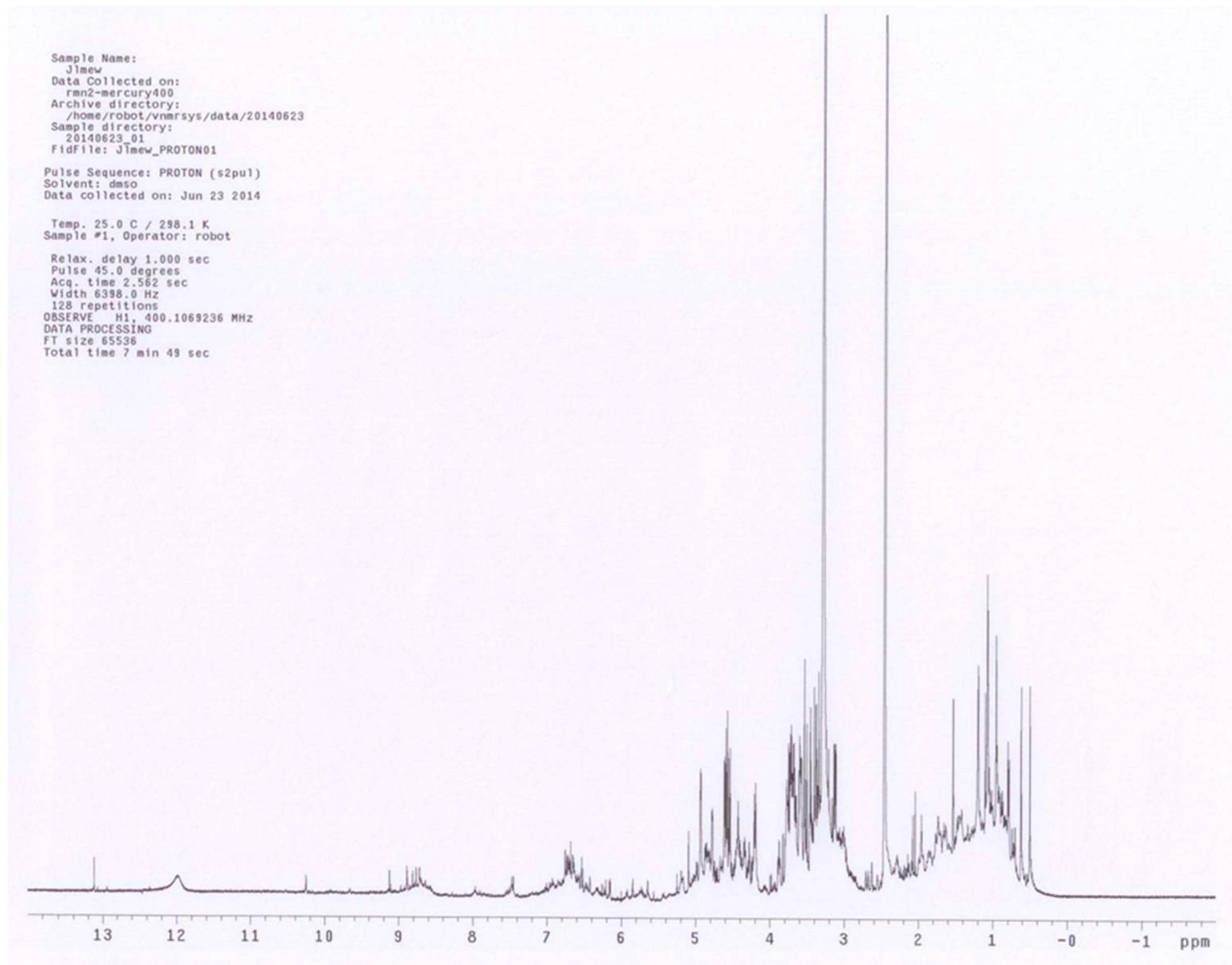


Figure 41. Spectre ^1H -RMN de l'extrait J mew (méthanol/ eau) de *J. phoenicea*

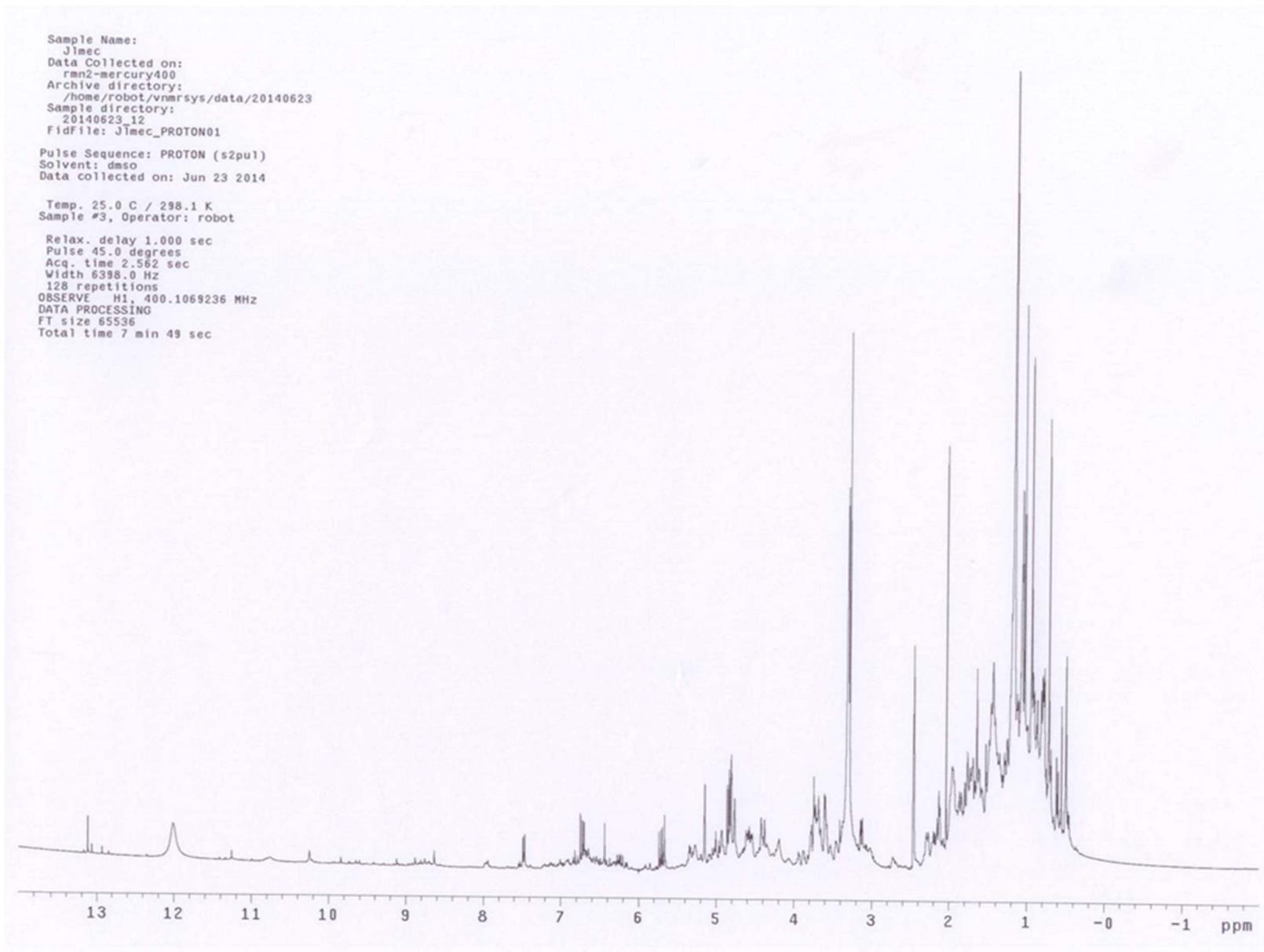


Figure 42. Spectre ^1H -RMN de l'extrait Jmec (méthanol/chloroforme) de *J. phoenicea*

Les résultats révèlent aussi la présence des composés phénoliques notamment des flavonoïdes et confirment l'identification par UPLC. En effet, le signal de la catéchine a été détecté à 6.7552 ppm et la quercétine à 7.0034 ppm. Les lignanes sont aussi présents avec le honokiol qui a été détecté à 6.8848 ppm. Ainsi, la coniférine et l'acide 4-isopropylbenzoïque ont été signalés à 7.013 et 7.952 ppm respectivement.

Les résultats de notre étude révèlent que les extraits méthanoliques de *Juniperus phoenicea* constituent une source de métabolites secondaires, notamment des composés phénoliques, des monoterpènes, des terpènes et des lignanes, dont certains possèdent une activité biologique très prometteuse.

En outre, les résultats de notre étude sont comparables à ceux rapportés par Seca et Silva (2005), qui ont établi un répertoire des principaux composés chimiques présents dans les extraits du genre *Juniperus*, et où on retrouve la plus part des composés que nous avons identifiés. De plus, les résultats de notre étude vont dans le même sens que ceux de Comte et al. (1997) concernant la présence des phénylpropanoïdes (4-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenyl beta-D-glucopyranoside). Ces composés secondaires sont impliqués dans des fonctions diverses telles que la fertilité, la pigmentation, la lignification, la protection contre des agents biotiques ou abiotiques.

Tableau 10. Les principaux composés identifiés par ¹H-RMN de *J. phoenicea*

N°	Composés	Fréquence ppm	Intensité	Erreur probable (ppm)
01	Fenchol	0.981	4.542	0.004
02	(1S 2S 5R)-(+)-Neomenthol	1.269	12.913	0
03	Sabinène	1.5348	0.45	0
04	α-phellandrène (2-méthyl-5-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene)	1.6629	0.63	0.005
05	Terpinolène	2.337	11.584	0.001
06	(1R)-(-)-myrténal	2.869	-	0.006
07	D_ornithine	3.043	15.00	0
08	α-pinène-oxyde	3.073	9.493	0.004
09	Spermidine	3.149	52.746	0.007
10	DL_acide pipecolique	3.571	1.191	0.008
11	Acide glutamique	3.747	1.36	0
12	L_arginine_L_glutamate	3.75, 3.763	6.186	0.004
13	Acide Gluconique	3.756	9.695	0.003
14	Acide Polygalacturonique	3.758; 5.051	0.595	0.004
15	Acide Argininosuccinique	3.76	1.00	0.002
16	Selenométhionine	3.83	47462	0.002
17	D_Aspartate	3.886	4.049	0.007
18	Acide aspartique	3.889	3.923	0.004
19	Acid Malique	4.286	2.76	0.007
20	Acid tartrique	4.324	17.090	0.003
21	UDP glucuronate	4.363	57396	0

Tableau 10. Les principaux composés identifiés par 1H-RMN de *J. phoenicea* (Suite)

22	Acide shikimique	4.385	2.433	0
23	Acide galacturonique	4.396	3.748	0.006
24	N_acetyl_D_mannosamine	4.44	0.923	0.005
25	Methyl_N_acetyl_alpha_D_glucosaminide	4.751	5.158	0.001
26	Acide Rosmarinique	5.19	41.070	0.003
27	N_acetyl_D_glucosamine_6_phosphate	5.192	0.744	0.001
28	β-carotène	6.151	3.852	0.001
29	Coniféryle	6.731	20.380	0.007
30	Catéchine (2-(3,4-dihydroxyphenyl) chroman-3, 5,7-triol)	6.7552	10.31	0.001
31	2-(4-hydroxy-3-prop-2-enylphenyl)-4-prop-2-enylphenol ((Honokiol)	6.8848	1.80	0.004
32	Quercétine (5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl) chromen-4-one)	7.0034	0.99	0.001
33	Coniférine (4-(3-hydroxyprop-1-en-1-yl)-2-methoxyphenyl beta-D-glucopyranoside)	7.013	2.13	0
34	Acide gallique	7.04772	99 926	0.001
35	Acide Nicotinique	7.504	0.894	0.001
36	Acide p-coumarique	7.506	102.450	0.003
37	Acide 4-isopropylbenzoïque	7.952	24.774	0.006

III.1.3.3 Analyse des spectres de *T. articulata*

L'analyse des spectres ¹H-RMN des extraits méthanoliques de *T. articulata* (Figure 43, 44 et 45) a permis de lister 36 composés organiques. Il est à noter que l'extraction par le mélange des solvants méthanol/chloroforme a permis d'obtenir plus de pics que par le méthanol absolu ou le mélange méthanol/eau.

Les résultats sont similaires à ceux obtenus pour les extraits d'*Artemisia absinthium* et de *J. phoenicea* et révèlent la présence de plusieurs types de composés, notamment des acides aminés et leurs dérivées, des hexoses, des monosaccharides, des terpènes, des monoterpènes, des sesquiterpènes et des composés phénoliques. De plus, l'analyse des spectres confirment la présence des myricétine, kaempferol, quercetin et catéchines, composés phénoliques identifiés par UPLC. La fréquence en ppm et l'intensité de signal de chaque composé sont mentionnés dans le tableau 11.

La présence des monoterpènes neomenthol, Thuja-2,4(10)-diène et α-pinène oxyde a été détecté à 0.958, 2.409 et 3.073 ppm respectivement. Les alcools terpéniques fenchol, α-terpinéol et linalol ont été signalés à une fréquence de 1.107, 1.119 et 5.216 ppm respectivement. Alors que le tritèrène canophyllol a été identifié à 3.544 ppm. En outre, le sesquiterpène eremophilène a été identifié à 1.8775 ppm. Ces composés partagent leurs propriétés biologiques avec les phénols particulièrement microbicides à large spectre (bactéricide, viricide, fongicide), et parasiticide (Tholl, 2006).

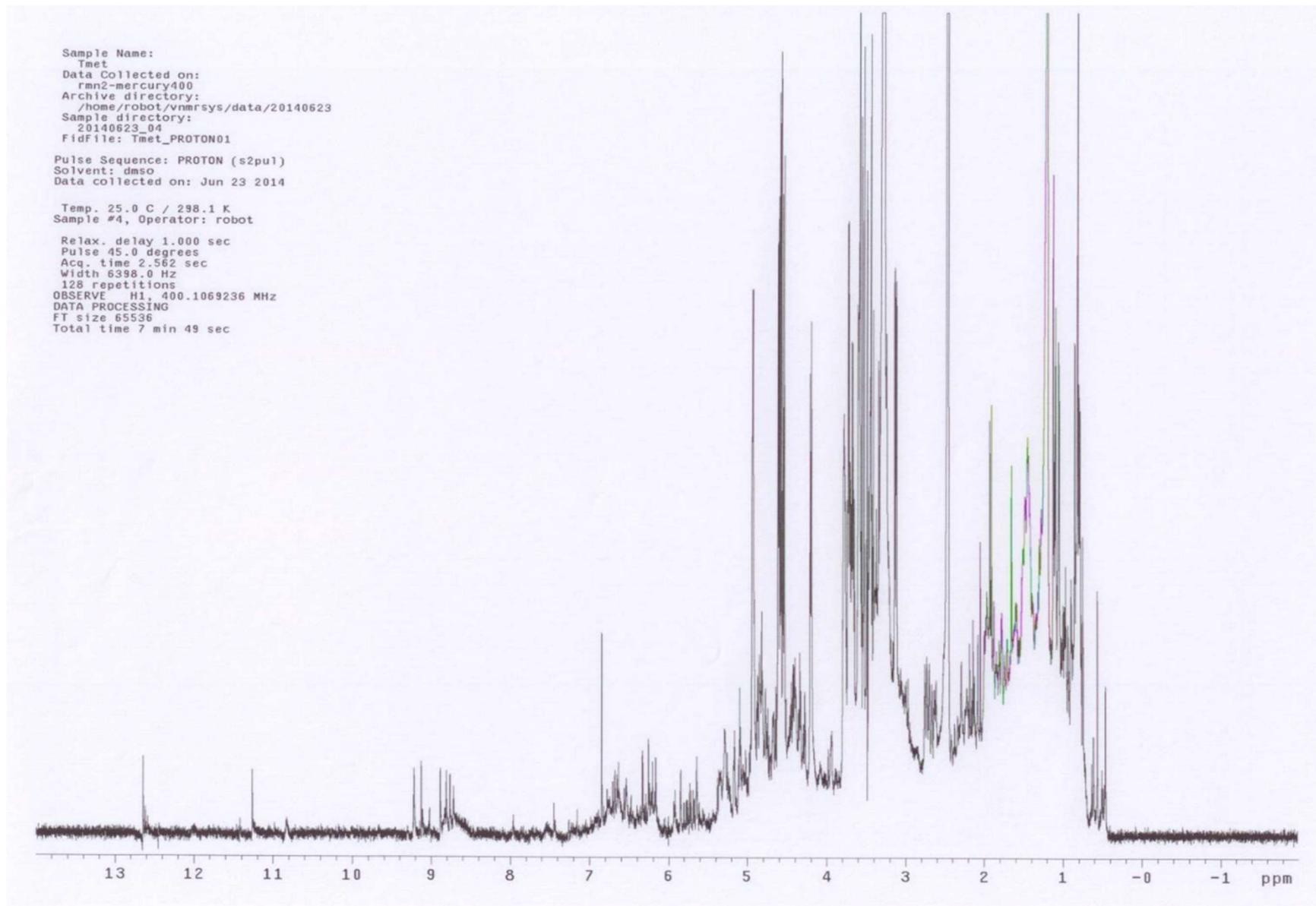


Figure 43. Spectre ^1H -RMN de l'extrait Tmet (méthanol absolu) de *T. articulata*

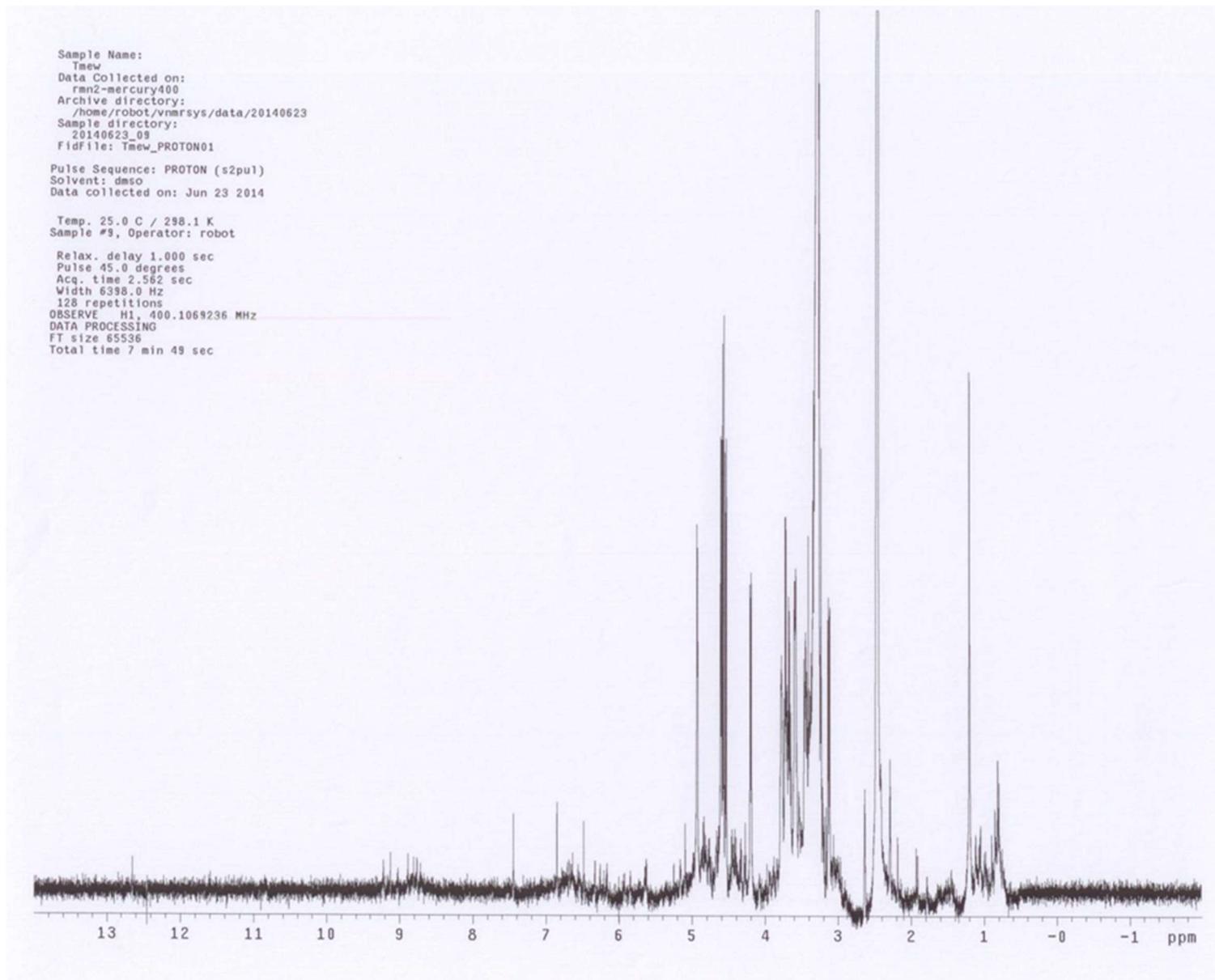


Figure 44. Spectre ^1H -RMN de l'extrait Tmew (méthanol/eau) de *T. articulata*

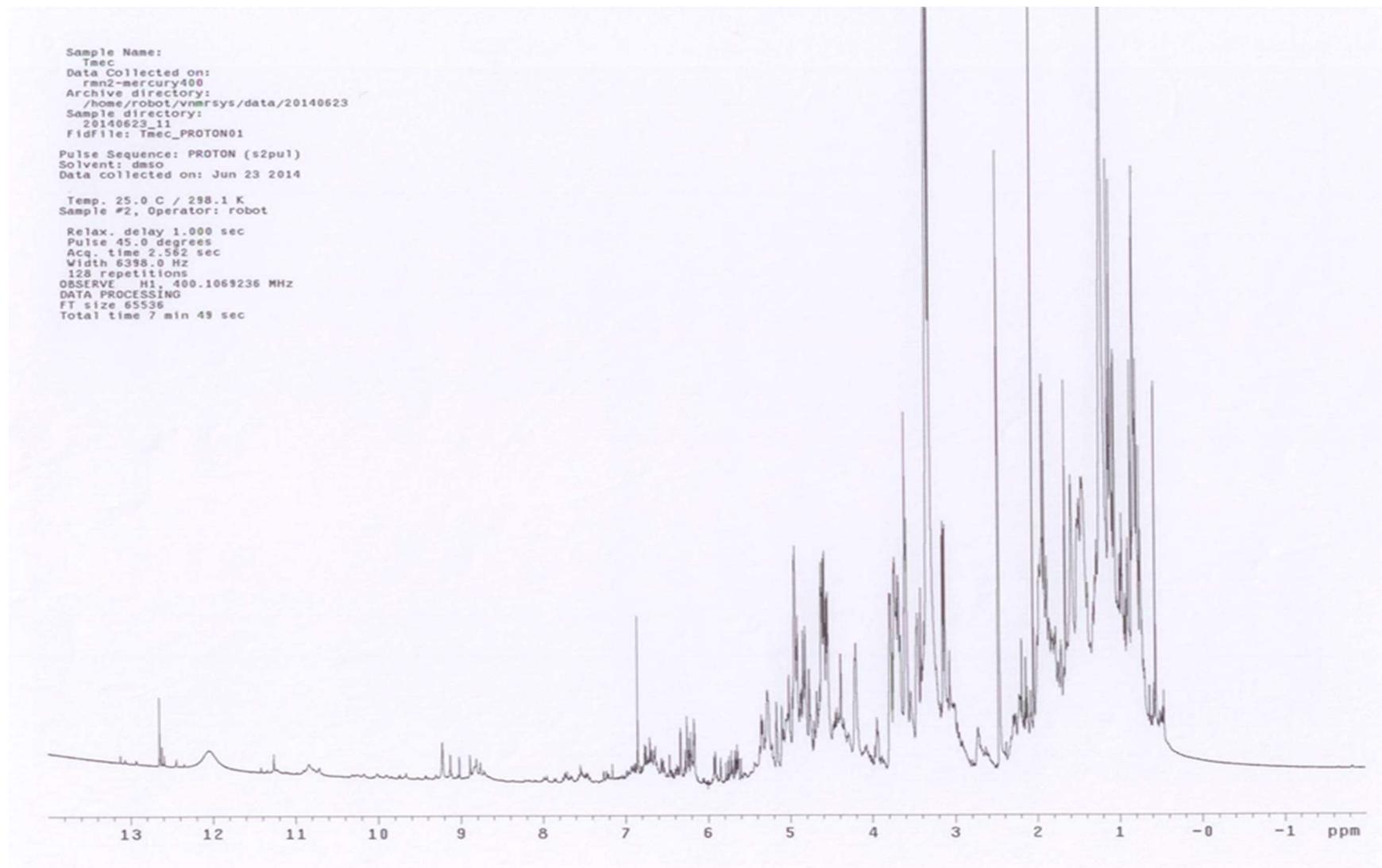


Figure 45. Spectre 1H-RMN de l'extrait Tmec (méthanol/chloroforme) de *T. articulata*

Les résultats de notre étude révèlent aussi la présence des composés phénoliques. En effet, les flavonoïdes sont représentés par le rutoside trihydrate qui constitue un diglycoside de de la quercétine signalé à une fréquence de 3.0634 ppm, par la catéchine à 6.8357 ppm, le kaempferol à 6.9294 ppm, les flavones à 7.55 ppm et la quercétine à 7.5522 ppm. De plus, Nous avons pu identifier le honokiol, un lignane dont la fréquence est de 3.2502 ppm.

Ainsi, les extraits méthanoliques de *T. articulata* contiennent des aldohexoses comme le glucose (5.222 ppm) et leurs dérivés ; des acides carboxyliques comme l'acide propionique (1.043 ppm), l'acide pipécolique (3.571 ppm) et l'acide gluconique (3.752 ppm) ; Ils contiennent aussi des acides aminés comme l'ornithine (3.776ppm) et la selenométhionine (3.83 ppm) ainsi que le méthyl jasmonate (5.254 ppm).

En outre, l'analyse des spectres a permis d'identifier également le R-(+)-2-Pyrrolidone-5-carboxylate à une fréquence de 2.125 ppm. Ce dernier est connu pour ses propriétés insecticides et il a été utilisé dans la formulation des insecticides de contacts et fumigène, notamment contre le moustique *Aedes aegypti* (Watkins et al, 2000).

D'après les résultats obtenus, les extraits de *T. articulata* constituent une source de biopesticide à exploiter. La composition chimique des extraits de Thuya de Berbérie pourrait dépendre de facteurs écologiques et environnementaux et de facteurs génétiques, en accord avec d'autres travaux sur les Cupressacées. Le taux de feuilles, d'écorce et de bois peuvent varier. Barrero et al. (2005) ont montré que les feuilles et le bois de *Tetraclinis articulata* ont un profil différent, avec des concentrations très différentes.

Parmi les composés identifiés, plusieurs sont communs aux trois espèces étudiées. Particulièrement l'ornithine, la quercétine et les acides carboxyliques. En outre, une grande similitude dans la composition chimique du *Juniperus phoenicea* et de *Tetraclinis articulata* a été notée. Cela peut être expliqué par l'appartenance des deux espèces à la même famille botanique. De plus la présence du méthyl jasmonate et des flavones a été enregistrée chez les deux espèces *A. absinthium* et *T. articulata*. De même que le fenchol, l' α -phellandrène, l'acide nicotinique, et la spermidine ont été signalés dans les extraits d'*A. absinthium* et de *J. phoenicea*.

Tableau 11. Les principaux composés identifiés par ¹H-RMN de *T. articulata*

N°	Composés	Fréquence ppm	Intensité	Erreur probable (ppm)
01	(1S, 2S, 5R)-(+)-Neomenthol	0.958	98.577	0.002
02	Acide propionique	1.043	14.406	0.005
03	Fenchol	1.107	5.262	0.002
04	α -terpinéol	1.119	101.087	0.006
05	(+)-Eremophilène (valencène, 4a, 5-diméthyl-3-prop-1-en-2-yl-2, 3, 4, 5, 6,7-hexahydro-1H-naphthalène)	1.8775	0.98	0.004
06	R-(+)-2-Pyrrolidone-5-carboxylate	2.125	1.06	0
07	L_arginine_L_glutamate	2.34	5.324	0
08	Thuja-2,4(10)-diène (Bicyclo [3.1.0] hex-2-ene, 4-méthylène-1-(1-méthylethyl)-)	2.409	3.701	0.003

Tableau 11. Les principaux composés identifiés par 1H-RMN de *T. articulata* (Suite)

09	Myrtenol (Bicyclo [3.1.1] hept-2-ene-2-methanol, 6,6-dimethyl-)	2.412	3.474	0.003
10	Rutoside Trihydrate	3.0634	1.56	0
11	α -pinène oxyde	3.073	9.302	0.009
12	Honokiol (2-(2-hydroxy-5-prop-2-enylphenyl)-4-prop-2-enylphenol)	3.2502	9.77	0.004
13	Canophyllol (8a-(hydroxymethyl)-4, 4, 6a, 6b, 11, 12, 14b-heptamethyl-2, 3, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 12a, 14, 14a-tetradecahydro-1H-picen-3-ol)	3.544	1.76	0.009
14	Acide DL_pipécolique (L-homoproline)	3.571	1.191	0.003
15	UDP glucuronate	3.573	11187	0.001
16	L-ascorbate	3.735	5.432	0.002
17	Acide gluconique	3.752	9.695	0.002
18	Acide polygalacturonique	3.758	0.414	0.004
19	D_ornithine	3.776	0.30	0.002
20	Selenométhionine	3.83	47462	0.007
21	Acide L_aspartique	3.889	6.59	0.003
22	Acide shikimique	3.973	1.250	0.005
23	L Phénylalanine	3.975	1.96	0.003
24	Acide N_acétylneuraminique	3.978	0.711	0
26	Acide malique	4.272	2.59	0.006
27	Acide L_tartarique	4.324	17.090	0.002
28	Linalol (3,7-Diméthyl-octa-1,6-dien-3-ol)	5.2166	1.16	0.001
29	D_glucose	5.222	1.74	0.007
30	Méthyl jasmonate	5.254	5.005	0.003
31	Acide D_galacturonique	5.285	2.515	0.002
32	2-(3,4-dihydroxyphényl) chroman-3, 5,7-triol / (Catéchine)	6.8357	7.76	0.008
33	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	6.841	101.717	0.001
34	3,5, 7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphényl) chromen-4-one / (Kaempferol)	6.9294	3.92	0
35	Flavone	7.55	1.86	0.005
36	Quercétine (5,7-dihydroxy-3-(4-méthoxyphényl) chromen-4-one)	7.5522	0.92	0.008

III.2. Etude de l'activité biologique des extraits méthanoliques des espèces exploitées

L'activité biologique d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* a été mise en évidence en évaluant l'effet insecticide et fongicide de chaque extrait méthanolique. L'activité insecticide a été évaluée sur *S. oryzae* alors que l'activité fongicide a été évaluée sur deux espèces de *Fusarium*, soient *F. culmorum* et *F. graminearum*. Seuls les extraits obtenus par l'extraction avec le méthanol absolu ont été retenus pour effectuer tous les tests biologiques. Cela est dû au fait que les résultats du screening phytochimique sur les trois espèces ont montré que, globalement le méthanol constitue un meilleur solvant pour extraire le maximum de composés bioactifs.

III.2.1 Etude de l'activité insecticide

L'activité insecticide des trois extraits a été évaluée en réalisant un ensemble de tests expérimentaux par contact direct et par traitement des grains de blé.

III.2.1.1. Evaluation de l'activité insecticide par contact

L'évaluation de l'effet insecticide des trois extraits méthanoliques a été réalisée par le calcul des individus morts de *S. oryzae* après exposition aux trois doses de chaque extrait. La mortalité corrigée pour chaque extrait a été aussi calculée. Les figures (46, 48, 50) montrent l'évaluation du taux de mortalité des individus de *S. oryzae* par rapport au temps d'exposition aux trois doses, pour chaque extrait testé. Les courbes de régression des probits en fonction des logs doses de chaque extrait sont présentées dans les figures (47, 49 et 51). Le potentiel toxicologique des extraits méthanoliques de la partie aérienne d'*A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata*, exprimé en DL50 et DL90, est résumé dans le tableau 12. Globalement, les extraits ont montré leurs efficacités contre le ravageur des stocks *S. oryzae*.

L'extrait d'*A. absinthium* était hautement toxique pour *S. oryzae*, entraînant une mortalité de 100% en 24h à une dose de 60 mg/cm². En revanche, à la même dose et au même temps d'exposition, les extraits de *J. phoenicea* et *T. articulata* ont provoqué respectivement un taux de mortalité de 95% et 95,65%. Néanmoins les 100% de mortalité ont été vite atteints (après 48h) avec l'extrait de *J. phoenicea*, alors que l'extrait de *Tetraclinis articulata* a provoqué une mortalité totale des individus après 5j (120h) à la même dose. Aucune mortalité n'a été observée pendant 24 h pour les trois extraits à une dose de 30 mg/cm² ou 15 mg/cm².

En outre, nous avons constaté que la mortalité causée par chaque traitement augmentait avec l'augmentation de la durée d'exposition. L'extrait d'*A. absinthium* a causé une mortalité de 85,16% et 53,66% à une dose de 30 et 15 mg/cm² respectivement après 8 jours d'exposition. L'extrait de *J. phoenicea* a entraîné un taux de mortalité de 61,11% et 37%, tandis que l'extrait de *T. articulata* a provoqué un pourcentage de mortalité de 42,55% et 16,66% respectivement aux mêmes doses et au même temps d'exposition.

Tableau 12. Valeur des DL50 et DL90 pour chaque extrait

Extrait méthanolique	R ²	DL50 (mg/cm ²)	DL90 (mg/cm ²)
<i>A. absinthium</i>	0.95	15.53	28.14
<i>J. phoenicea</i>	0.93	22.14	34.85
<i>T. articulata</i>	0.88	24.05	37.23

Les résultats de notre étude montrent clairement que le pourcentage de mortalité est proportionnel aux doses testées et au temps d'exposition, et ceci quel que soit l'extrait exploité. De plus, l'analyse de la variance pour l'effet insecticide des extraits par contact est hautement

significative $Pr < 0,0001$ (Tableau 13).

Tableau 13. Mortalité moyenne de *S. oryzae* après 8j de traitement (30 mg/cm²)

Extraits	Moy. individus morts
<i>A absinthium</i>	17,333 a
<i>J phoenicea</i>	13,000 b
<i>T articulata</i>	9,667 c
Control Act	2,000 d
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

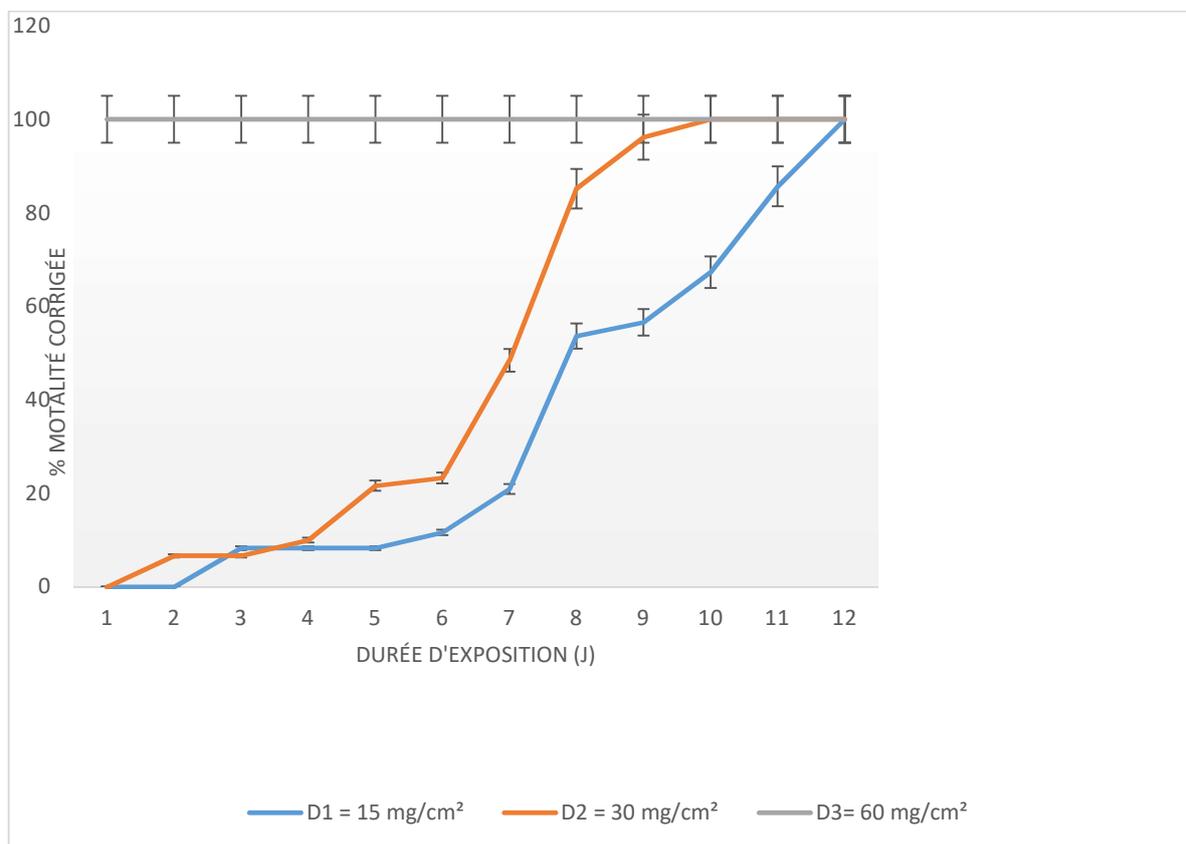


Figure 46. Evolution dans le temps de l'activité insecticide d' *A. absinthium* sur le pourcentage de mortalité corrigée de *S. oryzae*

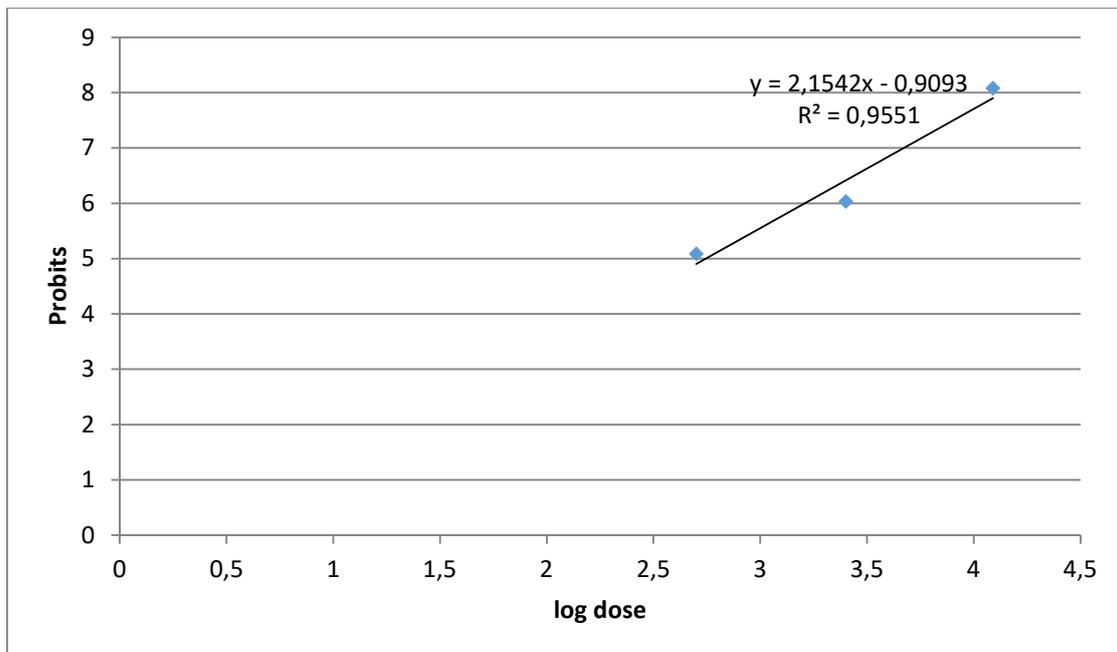


Figure 47. Droite de régression de l'effet insecticide par contact d'*A. absinthium* à l'égard de *S. oryzae*

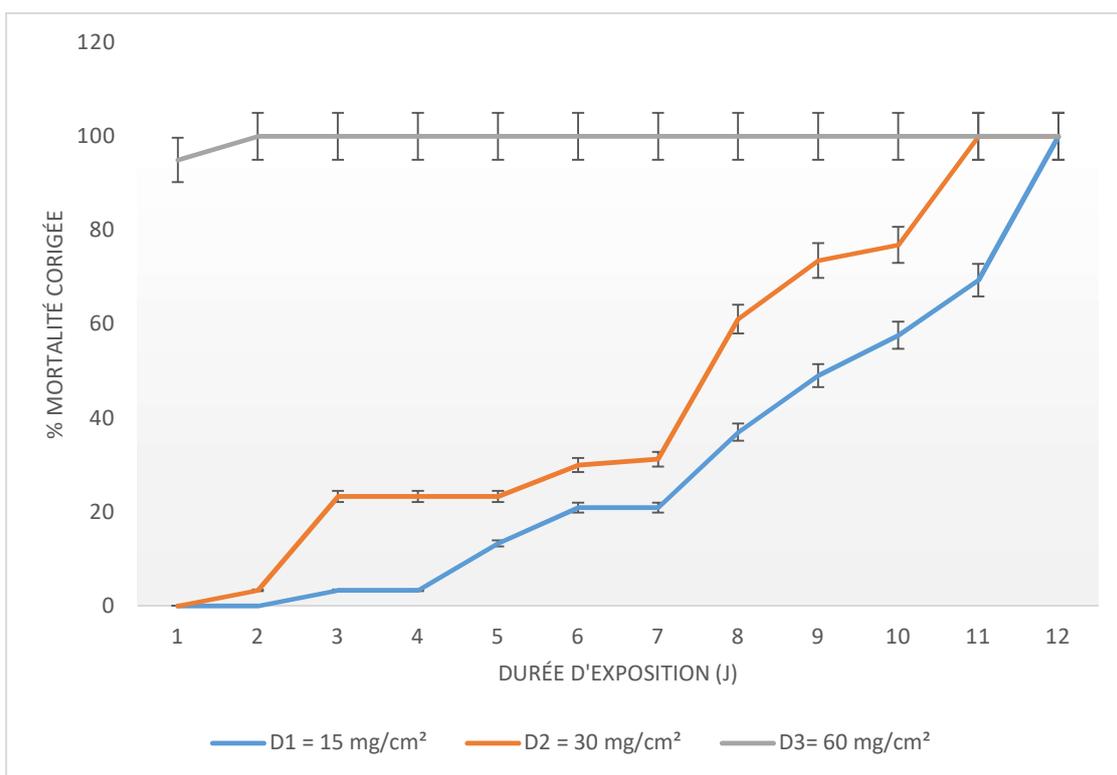


Figure 48. Evolution dans le temps de l'activité insecticide de *J. phoenicea* sur le pourcentage de mortalité corrigée de *S. oryzae*

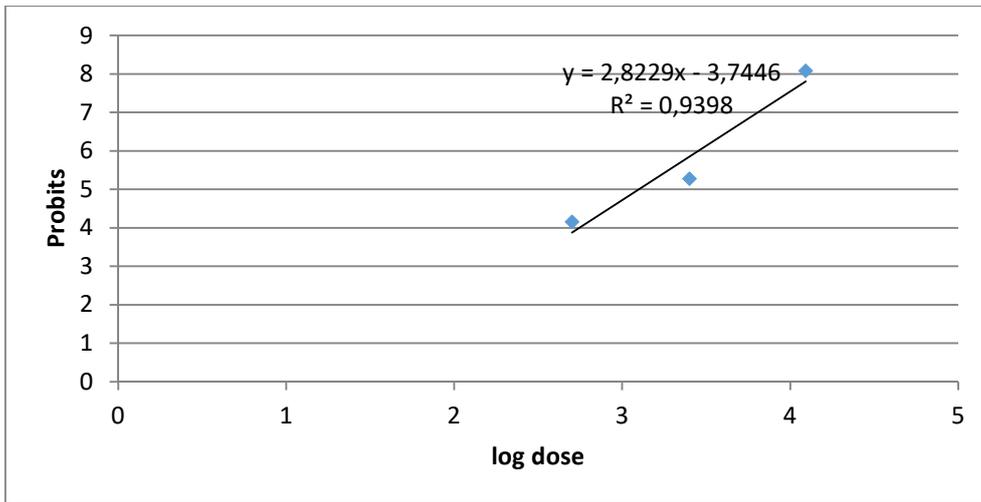


Figure 49. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de *J. phoenicea* à l'égard de *S. oryzae*

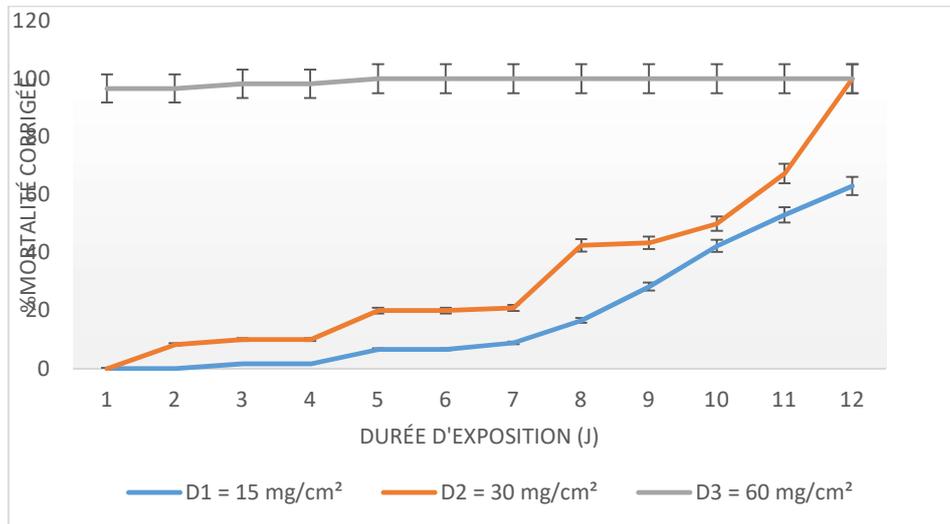


Figure 50. Evolution dans le temps de l'activité insecticide de *T. articulata* sur le pourcentage de mortalité corrigée de *S. oryzae*

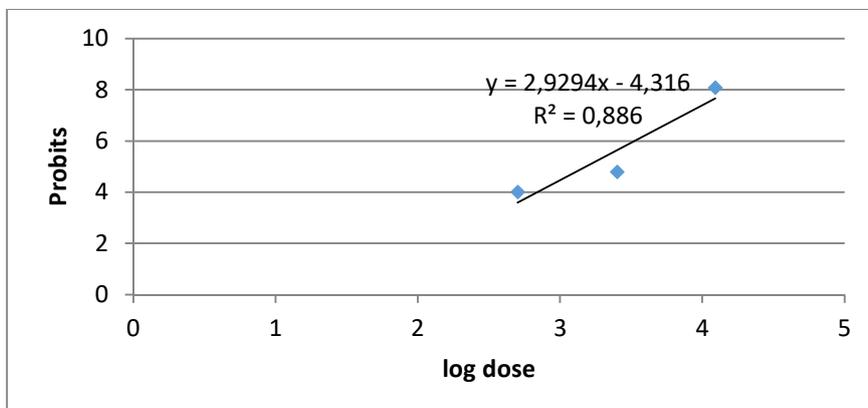


Figure 51. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de *T. articulata* à l'égard de *S. oryzae*

III.2.1.2. Evaluation de l'effet insecticide par traitement des grains

Les trois extraits méthanoliques d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* ont été testés pour leurs effets insecticides afin de dégager ceux qui paraissent plus efficaces pour le contrôle de *Sitophilus oryzae* dans le blé en stock. Selon les résultats obtenus, les extraits exploités se sont révélés efficaces. En effet, les taux de mortalité corrigée obtenus pour chaque extrait sont 71,89%, 70,15% et 56,1% respectivement pour *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* après 8j du traitement (Tableau 14 ; Figure 52). Un taux de mortalité de 1,73% a été enregistré pour le témoin acétone.

Tableau 14. Mortalité de *S. oryzae* traité avec les différents extraits après (8j)

Traitement	Moy. mortalité
<i>A absinthium</i>	14,667 a
<i>J phoenicea</i>	14,333 a
<i>T articulata</i>	11,667 a
Témoin ACT	1,333 b
Témoin	1,000 b
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

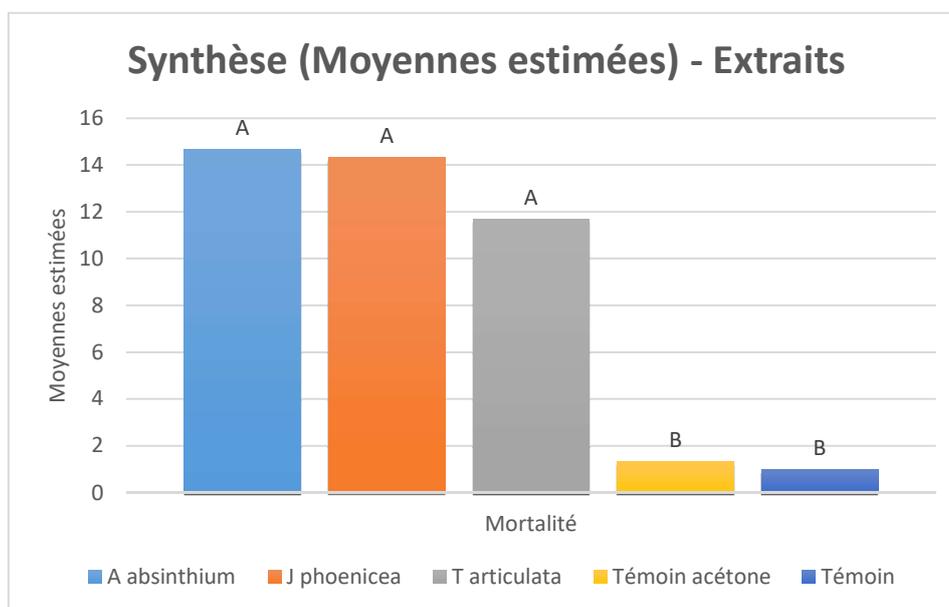


Figure 52. Nombre des individus morts après 8j du traitement des grains

L'analyse de la variance révèle un effet insecticide hautement significatif ($F < 0,0001$) des extraits méthanoliques à l'égard de *S. oryzae*, ce qui nous a permis de distinguer deux groupes homogènes (A et B) entre les grains traités et les grains non traités (Tableau 14, Fig. 52).

Quatorze jours après l'infestation des grains (traités et non traités), le nombre d'individus morts de *S. oryzae* a été compté et tous les individus (morts et vivant) ont été retirés pour faciliter le dénombrement des adultes émergents par la suite et pour ne pas fausser les résultats. Le tableau

15 résume les résultats obtenus après 14j d'essai. Un taux de mortalité corrigée de 77,77% a été enregistré dans les lots de grains traités par les extraits d'*A. absinthium* et de *J. phoenicea* alors que pour les grains traités par l'extrait de *T. articulata* un taux de mortalité de 68,5% a été obtenu.

Tableau 15. Mortalité de *S. oryzae* traité avec les différents extraits après (14j)

Traitement	Moy. Mortalité
<i>A absinthium</i>	16,000 a
<i>J phoenicea</i>	16,000 a
<i>T articulata</i>	14,333 a
Témoin ACT	2,333 b
Témoin	2,000 b
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

Les résultats obtenus par ce test confirment les résultats obtenus par le test d'évaluation de l'effet insecticide des extraits par contact et montrent l'efficacité de nos extraits dans le control de *S. oryzae*.

III.2.1.3. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la descendance de première génération F1

L'effet des extraits méthanoliques sur l'émergence des adultes de *S. oryzae* (F1) a été évalué. L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif des trois extraits ($P < 0,0001$). En effet, les extraits d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* ont réduits le taux d'émergence de 96.89, 97.41 et 95.86% respectivement. Le nombre moyen d'individus émergés dans le lot des grains non traités (témoin) est de 64,33 alors que le nombre d'individus émergés dans les lots traités par l'extrait de *J. phoenicea* est de (1,6). Le tableau 16 et la figure 53 résument les résultats obtenus.

Tableau 16. Nombre d'émergence de la F1 de *S. oryzae* dans les différents lots de grain

Traitement	Nombre d'individus émergés
Témoin	64,333 a
Témoin ACT	59,000 b
<i>T articulata</i>	2,667 c
<i>A absinthium</i>	2,000 c
<i>J phoenicea</i>	1,667 c
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

En outre, nous avons remarqué que les extraits entraînent un prolongement dans la durée du cycle de développement de l'insecte. D'après les résultats, les extraits de *J. phoenicea* et d'*A. absinthium* prolongent le cycle d'une moyenne de 8j comparativement à la durée du cycle du témoin non traité où le cycle de *S. oryzae* a duré 35j à 27±2°C et 70±5% RH. Tout de même, l'extrait de *T. articulata* a prorogé le cycle de développement de l'insecte de 5 jours (Tableau 17 ; Figure 54). Ces résultats sont très prometteurs et reflètent l'efficacité de nos extraits.

Tableau 17. Durée moyenne du Cycle de développement de la F1 de *S. oryzae* dans les différents lots de grain

Traitement	Moy. Cycle de développement (j)
<i>J phoenicea</i>	43,667 a
<i>A absinthium</i>	43,333 a
<i>T articulata</i>	40,000 b
Témoin ACT	35,667 c
Témoin	35,333 c
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

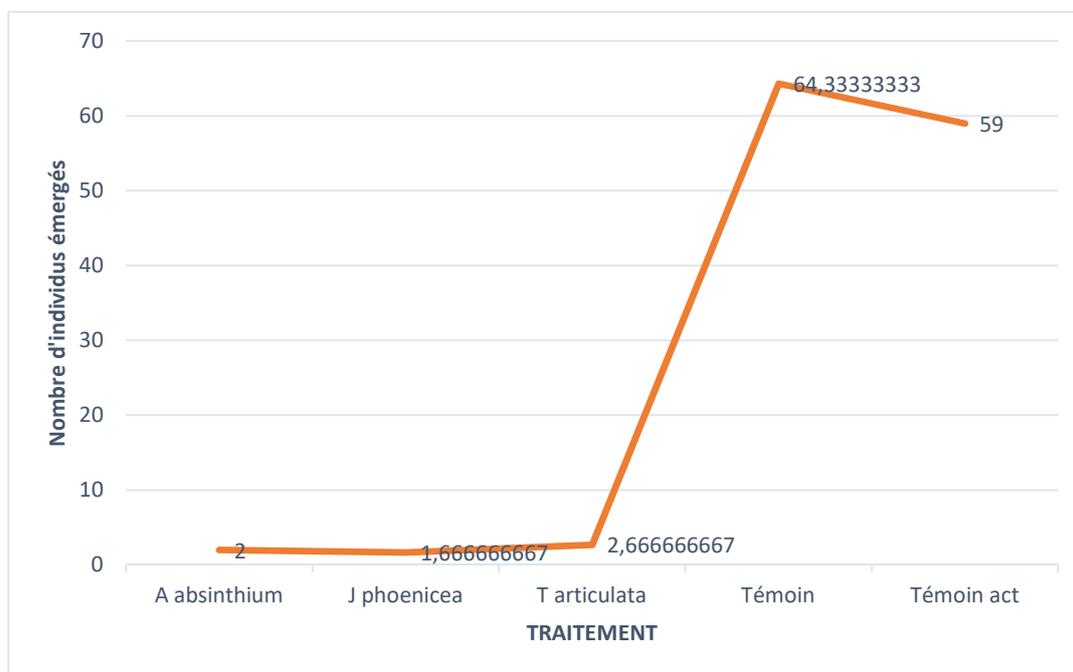


Figure 53. Nombre d'individus émergés (F1) de *S. oryzae* dans les différents lots de grains

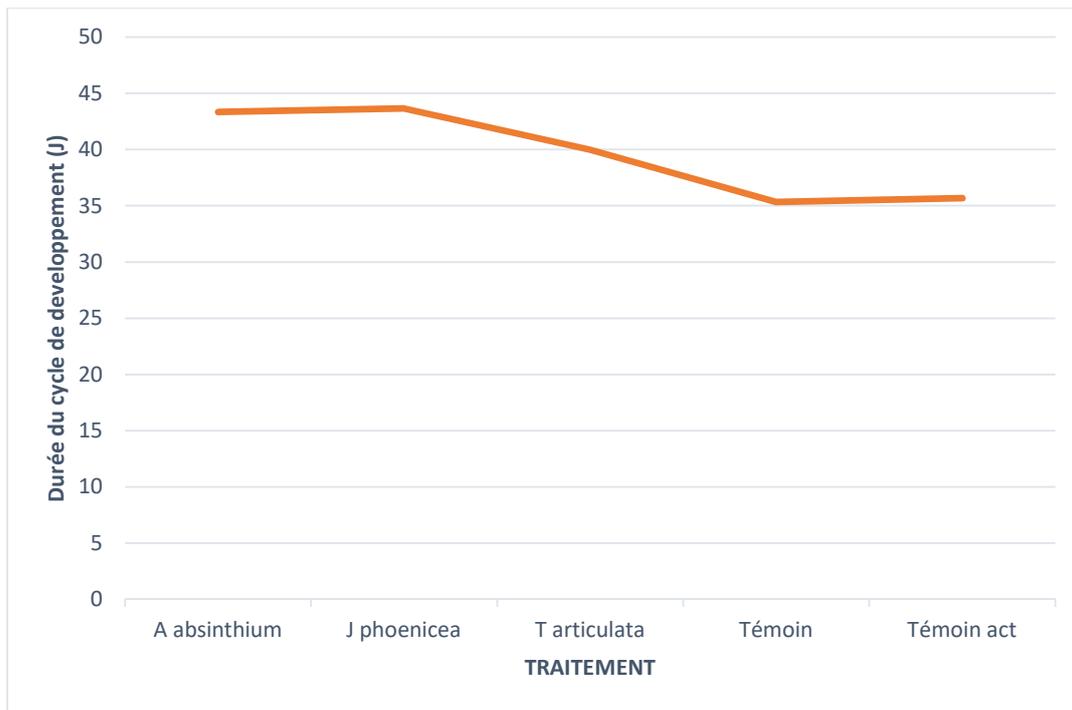


Figure 54. Durée moyenne du cycle de développement des individus de la F1 du *S. oryzae* dans les différents lots de grains

III.2.1.4. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la perte en poids des grains

Les variations de poids observées au niveau des lots de grains de blé non traités et les lots de grains traités avec les différents extraits méthanoliques au bout d'un cycle de développement de *S. oryzae* sont résumées dans le tableau 18. Des pertes importantes sont enregistrées dans les lots témoins (plus de 4g). Les insectes semblent avoir occasionné des pertes hautement significatives dans les lots non traités (8,66 %). Cela signifie qu'au bout de plusieurs générations successives elles seront encore plus importantes. L'analyse de la variance et les comparaisons par le test de Dunnett au seuil de 5% ont permis d'obtenir deux groupes homogènes.

Tableau 18. Variations de poids en matière sèche des grains après infestation par *S. oryzae* dans les différents traitements

Traitement	Poids en matière sèche des grains (g)
<i>A absinthium</i>	49,667 a
<i>J phoenicea</i>	49,667 a
<i>T articulata</i>	49,333 a
Témoin ACT	46,333 b
Témoin	45,667 b
Pr > F	< 0,0001
Significatif	Oui

*Comparaisons issues du test de Dunnett au seuil de 5%

Lors de cette partie de la thèse, nous avons procédé à l'évaluation du potentiel insecticide des extraits méthanoliques d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* à l'égard de *S. oryzae* et nous avons constaté un effet insecticide dont l'ampleur variait selon les espèces exploitées.

En utilisant la méthode du papier imprégné (par contact), il a été possible de démontrer l'effet toxique des trois extraits sur le charançon du riz. De plus, les résultats obtenus par le test de traitement de grains ont confirmé l'activité insecticide des extraits en révélant leurs effets diminutifs sur les adultes de la F1. Cette diminution est due entre autres, à l'effet insecticide par contact des extraits qui ont supprimé plus de 70% de la population d'insectes introduites dans les lots traités. Cette double action des extraits pourrait être due à la présence de divers composés bioactifs dans les extraits méthanoliques bruts. Il est très probable que ces composés chimiques interfèrent principalement avec certains aspects biologiques, écologiques et physiologiques de l'insecte.

De nombreux chercheurs ont mis en évidence l'efficacité des extraits de plantes à l'égard des insectes, notamment ceux qui infestent les denrées stockées. Hasan et al. (2015) ont pu démontrer l'activité larvicide et insecticide des extraits des feuilles et des tiges de *Mallotus repandus* contre *Culex quinquefasciatus* et *S. oryzae*. De même, les poudres et les huiles de *Syzygium aromaticum* et *Anacardium occidentale* causent une mortalité considérable chez les adultes de *S. oryzae* (Ileke et al., 2014). En outre, Franz et al. (2011) ont évalué la toxicité de plusieurs huiles essentielles et ont montré que les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* causait une mortalité atteignant respectivement 70% et 100% des adultes de *S. oryzae* après 24 et 48 h avec une DL50 de 0,027 µL/mL, alors que la mortalité due à *Mentha* sp. et *Zingiber officinale* était de 40% après 24 h et 55% après 48 h. Par ailleurs, Auamcharoen et al. (2012) ont constaté que l'extrait méthanolique brut de *Duabanga grandiflora* présentait une faible toxicité par contact contre *S. oryzae* avec une mortalité maximale de 33% à 32 mg/mL après 7 jours d'exposition et se révélait avoir un effet plutôt répulsif. Ainsi ils rapportent que la toxicité dépend essentiellement de la concentration d'extrait et de la durée d'exposition.

Des résultats similaires à les notre sur l'effet insecticide d'*Artemisia* sp., *Juniperus* sp. et de *T. articulata* ont été signalés. À cet égard, la toxicité de l'huile essentielle d'*A. judaica* a été démontré contre *Callosobruchus maculatus* en utilisant une gamme de tests (fumigation, répulsion, éclosion d'œufs, émergence d'adultes...) (Abd-Elhady, 2012). En outre, la toxicité des huiles essentielles de *A. annua* contre *S. oryzae* (Aggarwal et al., 2001) et de *A. capillaris* et *A. mongolica* contre *S. zeamais* (Liu et al., 2010) a été rapportée. De même pour *J. phoenicea*, dont l'huile essentielle a été considérée en tant qu'agent anti-appétant et insecticide contre *Tribolium confusum* (Bouzouita et al., 2008). De plus, la combinaison de gel de silice avec des huiles essentielles de *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* protège efficacement le blé contre les ravages de *S. oryzae* (Athanassiou et al., 2013). Une activité insecticide a également été observée pour l'extrait aqueux du bois de *T. articulata* qui a diminué la longévité des larves de quatre types de moustiques : *Culex pipiens*, *Aedes caspius*, *Culiseta longiareolata* et *Anopheles maculipennis* (Aouinty et al., 2006).

Les études sur la composition chimique des huiles essentielles ou des extraits de plantes aromatiques en relation avec le screening de leurs activités biologiques (effets toxiques, répulsifs, antinutritifs...) sont abondantes. En effet, des études faites par Goławska et al. (2008) révèlent que la résistance des plantes aux attaques d'insectes peut être liée à la présence de flavonoïdes, et suggèrent que les six aglycones de flavanols identifiées pendant leurs travaux de recherche (quercétine, kaempferol+RCO-, kaempferol, tricine, apigenine+RCO- et apigenine) sont responsables de l'effet répulsifs et dissuasif contre *Acyrtosiphon pisum* (le puceron vert du pois) et modulent son comportement alimentaire. Ceci est expliqué par le fait que les plantes infestées présentaient une concentration relativement élevée de phénols totaux, des o-dihydroxyphénols et des flavonoïdes totaux par rapport au plantes témoins non infestés par l'insecte. Ces composés peuvent exercer un effet synergique sur le comportement, la physiologie et le métabolisme des pucerons et, par conséquent, réduire la population de pucerons dans les plantes résistantes (Szynkarczyk et al., 2001). De même, Green et al. (2003) confirment que les quercitine glycosides et les phénylpropanoïdes présentent des effets dissuasifs contre les larves de *Spodoptera litura*.

L'ensemble de ces composés ont été identifiés par les deux méthodes d'analyses (UPLC et ¹H-RMN) dans notre étude et donc nous pouvons conclure que l'activité insecticide notable de nos extraits est principalement liée à la présence de ces composés. En outre, étant donné que nous avons signalé la présence des acides phénoliques (identifiés par UPLC) uniquement dans les extraits d'*A absinthium*, nous suggérons que ces composés améliorent encore l'activité insecticide de l'extrait de cette plante contre *S. oryzae*.

Par ailleurs, Mierziak et al. (2014) ont établi une revue des connaissances actuelles sur les fonctions des flavonoïdes dans la physiologie des plantes et leurs relations avec l'environnement. Ils rapportent que les flavonoïdes peuvent agir comme étant des agents stimulants ou inhibant pour réguler l'oviposition et l'alimentation chez une population d'insectes. Par exemple, la naringénine, l'hespéretine-7-O-rutinoside et la quercétine-3-O-rutinoside, ainsi que d'autres composés actifs, stimulent l'oviposition des papillons *Papilli* sp. sur les jeunes feuilles de *Citrus* sp. Une activité similaire de luteolin 7-O- (6"- malonyl glucoside) sur *Papilio polyxenes* et de isorhamnétin glucoside sur *Luehdorfia* sur les feuilles de plantes du genre *Asarum* a été constatée. Les flavonoïdes peuvent également inhiber l'oviposition chez les insectes, par exemple, d'une part le quercétine-3-O-rutinoside agit comme un stimulant pour *Danaus plexippus*, et d'une autre part comme dissuasif pour *Pieris rapae*.

Dans la même optique, Regnault-Roger et Hamraoui (1997) rapportent que l'effet des composés phénoliques s'exprime de différentes manières dépendant de l'insecte (motricité, activités ovicide, larvicide, anti nutritionnelle et inhalatrice...). Ils soulignent que tous les composés exercent une action inhibitrice significative, mais d'intensité variable sur la reproduction de l'insecte : l'eugénol, le linalol, le terpinéol, le thymol et le carvacrol sont parmi les composés les plus actifs. Ils ont également mis en évidence que certains polyphénols appartenant aux acides phénols (benzoïques ou

cinnamiques) et aux flavonoïdes (hydrocarbures terpéniques) provoquaient une perturbation physiologique de l'insecte, notamment une inhibition progressive de la motricité ou un effet knock-down (effet de paralysie des muscles et du système nerveux des insectes entraînant leur mort).

III.2.1.5. Evaluation de l'effet des extraits méthanoliques sur la germination des grains

Les résultats de test de germination indiquent que le pourcentage de germination des grains dans tous les lots traités ainsi que les deux témoins (témoin, et témoin acétone) est de 100% après 5 jours du test (Tableau 19). Par conséquent, les extraits méthanoliques exploités n'ont aucun effet sur la germination des grains et peuvent être recommandés comme alternative aux pesticides de synthèse dans l'agriculture.

Tableau 19. Effet des extraits méthanoliques sur la germination des grains

Traitement	% de germination
Témoin	100
Témoin ACT	100
<i>A absinthium</i>	100
<i>J phoenicea</i>	100
<i>T articulata</i>	100



Figure 55. Germination des grains de blé tendre traités par les différents extraits

III.2.2 Evaluation de l'activité fongicide des extraits méthanoliques

L'activité antifongique des extraits d'*A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* à l'égard de *F. culmorum* et *F. graminearum* a été évaluée *in vitro* en mesurant les diamètres de croissance mycélienne et ceci en utilisant la technique d'empoisonnement de milieu de culture. Les extraits ont provoqué une réduction significative de la croissance de ces souches fongiques. L'extrait de *T. articulata* a été le plus efficace contre l'ensemble des souches fongiques, tandis que les extraits d'*A. absinthium* et *J. Phoenicea* présentaient une toxicité faible à modérée. Les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne (MGI%) pour chaque extrait de plante et pour chaque souche de *Fusarium* sont présentés dans le tableau 20. L'analyse statistique des données montre des différences significatives entre les valeurs de croissance mycélienne pour les extraits des trois plantes testées (Figure 56, 57 et 58).

Tableau 20. Effet des extraits méthanoliques sur la croissance mycélienne des souches fongiques

Souche fongique	Extrait méthanolique	Moy. croissance mycélienne (cm)	MGI%
FC.04.12: <i>Fusarium culmorum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	3.8 ± 0.2 c	55.8
	<i>Artemisia absinthium</i>	5.56 ± 0.40 b	35.26
	<i>Juniperus phoenicea</i>	5.86 ± 0.30 b	31.77
	Control	8.6 a	-
Pr > F < 0,0001 Significatif: Oui			
FC.06.11: <i>Fusarium culmorum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	4.8 ± 0.36 c	44.18
	<i>Artemisia absinthium</i>	6.63 ± 0.15 b	22.86
	<i>Juniperus phoenicea</i>	6.83 ± 0.20 b	20.53
	Control	8.6 a	-
Pr > F < 0,0001 Significatif: Oui			
FG.02.12: <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	5.13 ± 0.85 b	40.3
	<i>Artemisia absinthium</i>	7.73 ± 0.50 a	10.07
	<i>Juniperus phoenicea</i>	8.06 ± 0.05 a	6.19
	Control	8.6 a	-
Pr > F < 0,0001 Significatif Oui			

*Comparaisons issues du test de Fisher (LSD) au seuil de 5%

Les pourcentages d'inhibition les plus faibles (6,19%) et (10,07%) ont été observés chez les souches FG.02.12 de *F. graminearum* inoculées dans les milieux traités par les extraits de *J. phoenicea* et *A. absinthium* respectivement. La souche FC.04.12 de *F. culmorum* s'est avérée la plus sensible vis à vis l'extrait de *T. articulata* qui a provoqué le pourcentage d'inhibition le plus élevé soit 55,8% (Figure 59, 60 et 61).

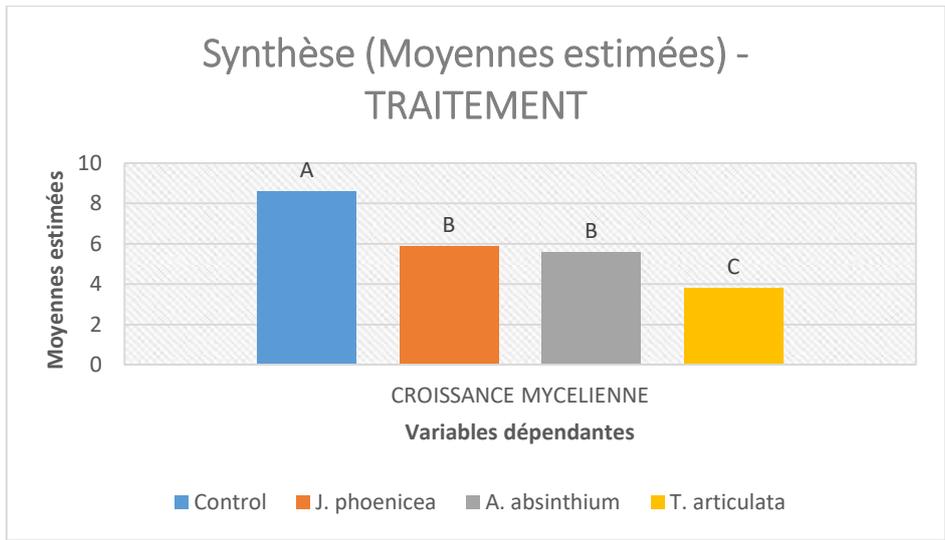


Figure 56. Effet des extraits méthanolique sur la souche FC.04.12

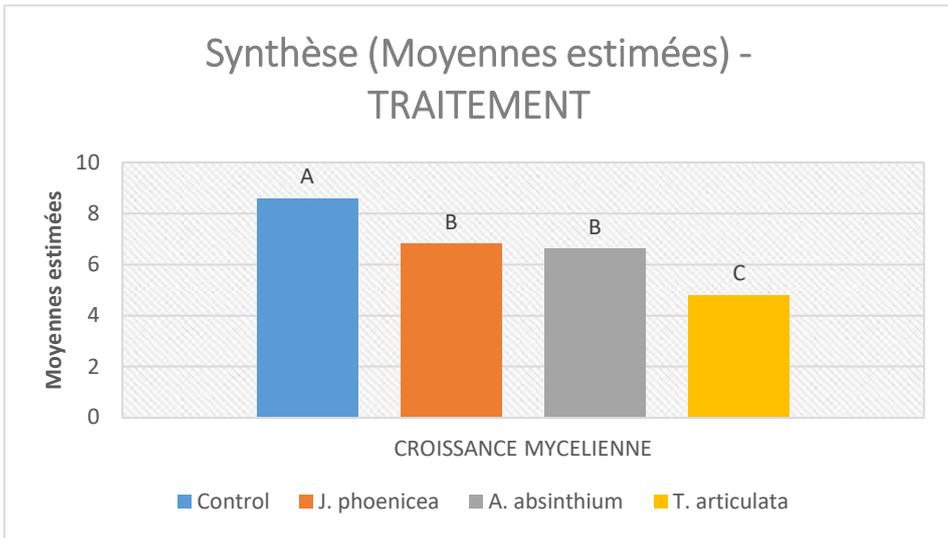


Figure 57. Effet des extraits méthanolique sur la souche FC 06.11

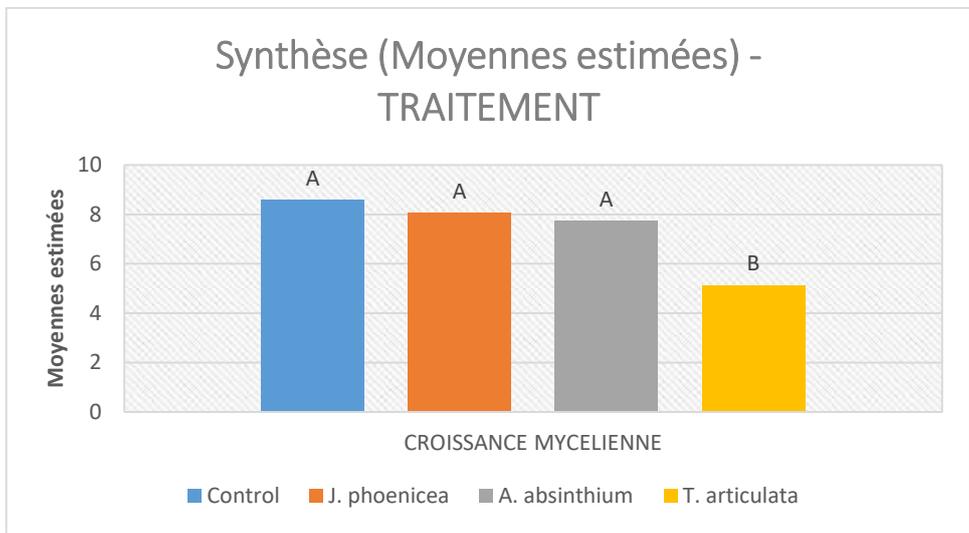


Figure 58. Effet des extraits méthanolique sur la souche FG.02.12

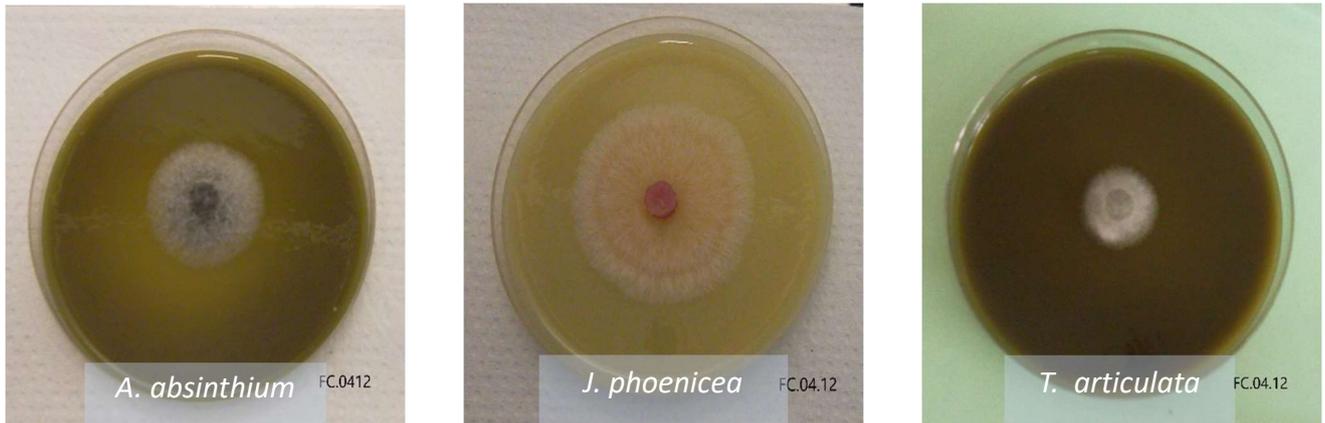


Figure 59. Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FC.04.12

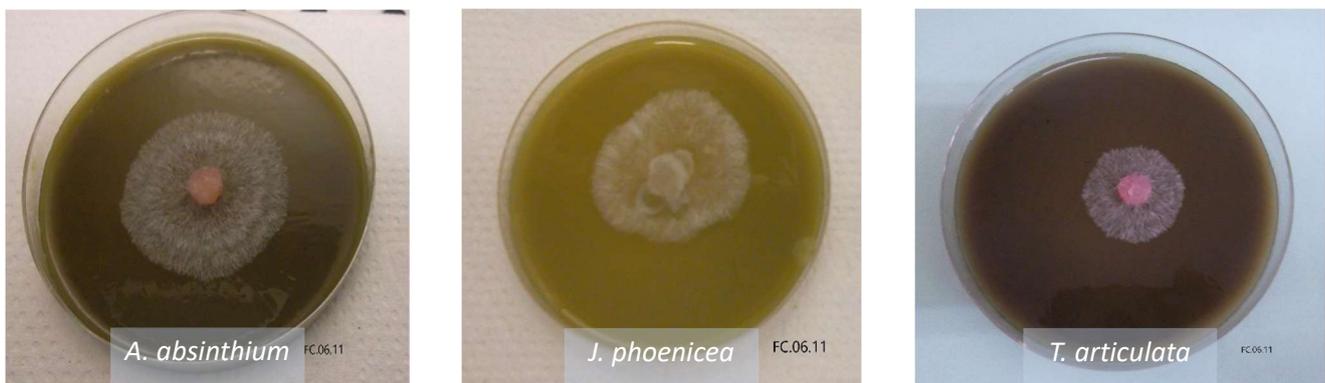


Figure 60. Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FC 06 11



Figure 61. Effet des extraits méthanoliques sur la croissance de la souche FG 02 12

Notre travail de recherche souligne l'effet des extraits de *A. absinthium*, de *J. Phoenicea* et de *T. articulata* sur la croissance mycélienne de *F. culmorum* et *F. graminearum*, des agents pathogènes qui pourraient envahir le stock et une infinie variété de matières végétales sèches. Les résultats obtenus révèlent que l'extrait de *T. articulata* inhibe la croissance mycélienne de *F. culmorum* et *F. graminearum* de 40 à 55%. Tandis que les extraits d'*A. absinthium* et de *J. phoenicea* avaient un effet faible à modéré. Des observations similaires ont été faites par Msaada et al., (2015) qui ont

évalué l'effet de l'huile essentielle d'absinthe (*A. absinthium*) contre *F. graminearum* (23%), *F. culmorum* (23%) et *F. oxysporum* (27%) alors que Kordali et al. (2005) ont rapporté l'efficacité de l'huile essentielle de *A. absinthium* et l'ont décrite comme étant un biofongicide contre 34 espèces de champignons dont *F. solani* et *F. oxysporum* et ont lié l'activité antifongique à la présence de certains composés dont le camphre, le 1,8-cinéole et le chamazulène.

En outre, l'efficacité des huiles essentielles de *J. Phoenicea* ssp. *lycia* contre certaines espèces de champignons (*Gloephyllum trabeum*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana* et *Coriolus versicolor*) a été décrite par Mansouri et al. (2011). L'activité antifongique de *T. articulata* a également été démontrée contre *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger* et *Trametes pini* (Bourkhiss et al., 2010) et enfin contre *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *A. flavus*, and *A. niger* (Abi-Ayad et al., 2009).

Les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des extraits méthanolique sont très différents et variables comparablement aux résultats des recherches antérieures. Cela dépend essentiellement des souches fongiques, de leurs agressivités et de leurs sensibilités vis à vis à certains composés actifs.

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus dans notre étude suggèrent un bon potentiel des extraits d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* en tant qu'agents répulsifs, agents insecticides et agents fongicides dans les systèmes de gestion des organismes nuisibles de stockage.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans un premier temps, un screening phytochimique des extraits méthanoliques des trois plantes exploitées a été réalisé. Une différence quantitative a été constatée dans le rendement d'extraction qui était de l'ordre de 11 à 21% pour les trois espèces. L'analyse chimique a été menée par l'utilisation de deux méthodes basées sur la spectrométrie de masse (MS) et la spectroscopie, qui constituent les approches les plus réussies pour déterminer l'état métabolique d'un organisme. Il s'agit de L'UPLC (Chromatographie Liquide Ultra-haute Performance) et la ^1H -RMN (Proton Nuclear Magnetic Resonance).

L'UPLC-PDA-MS s'est avérée être une technique utile qui peut fournir une sensibilité et une spécificité suffisantes pour la détection d'un grand nombre de substances notamment les composés phénoliques même à de faibles concentrations. Elle offre une optimisation chromatographique ainsi qu'une optimisation des conditions d'ionisation qui nous ont permis de détecter plusieurs composés phénoliques avec une bonne sensibilité. La présence de plusieurs acides phénoliques, de flavonoïdes glycosides et aglycones a été signalée. Les composés les plus abondants dans l'extrait d'*A. absinthium* étaient des acides phénoliques, avec 41,66% d'acides dicaffeoylquiniques (0,033 et 0,032 mg/mL), suivis de 23,07% (0,036 mg/mL) d'acide 5-cafeoylquinique. En revanche, les flavonoïdes étaient présents en abondance dans les extraits des espèces de Cupressaceae, enregistrant 0,037 mg/mL (45,67%) de quercétine-3-O-rhamnoside, suivie de 41,97% (0,034 mg/mL) de catéchine pour l'extrait de *J. phoenicea* ainsi que 42,76% (0,084 mg/mL) de myricétine-rhamnoside et 31,05% (0,061 mg/mL) de quercétine-3-O-rhamnoside pour celui de *T. articulata*. Cette méthode analytique doit être adoptée dans les différents laboratoires de recherche agronomique pour réaliser les différentes analyses phytochimiques et faciliter la recherche de molécules biologiquement actives.

De plus, les profils métaboliques de *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* examinés par la technique de Proton Nuclear Magnetic Resonance ^1H RMN sont très riches en composés actifs. Les spectres ^1H RMN représentatifs de chaque extrait montrent que bien que les résonances des espèces soient facilement apparentes, notamment dans les régions dont les fréquences sont entre (2 et 5 ppm), il existe de nombreuses autres régions du spectre où de grandes différences se produisent entre les différents extraits. En particulier, la région entre (6 et 8 ppm) qui a des différences marquées dans les spectres. Ainsi, les résultats d'analyse révèlent la présence des composés organophosphorés, des acides aminés, des polyamines et des polyphénols principalement dans la région (3-6 ppm). Les résultats confirment aussi la présence des acides phénoliques et des flavonoïdes déjà identifiés par UPLC.

Dans un second temps, nous avons procédé à une évaluation de l'activité biologique des trois extraits. Pour le faire, différents techniques ont été adoptées.

Une méthodologie expérimentale a été appliquée dans le but d'évaluer l'activité insecticide des extraits méthanoliques bruts d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* via différents tests. A l'issue de ce travail, nous avons pu montrer que les trois extraits et particulièrement l'extrait d'*A. absinthium* exhibent une activité insecticide élevée. La mortalité de la population de *S. oryzae* par évaluée via le test de contact direct a été enregistrée après 24 heures d'exposition pour *A. absinthium*. Les DL50 pour les trois extraits ont été calculées : (15,53 mg/cm²) pour *A. absinthium*, suivi de (22,14 mg/cm²) pour *J. phoenicea* et (24,05 mg/cm²) pour *T. articulata*. De plus, le traitement des grains de blé par les trois extraits avant infestation par le coléoptère a permis d'observer des taux de mortalité corrigée élevés pour chaque extrait : 71,89%, 70,15% et 56,1% respectivement pour *A. absinthium*, *J. phoenicea* et *T. articulata* après 8j du traitement de grains. En outre, les résultats révèlent que les trois extraits ont un effet diminutif sur la descendance de première génération du coléoptère. Les extraits d'*absinthe*, de genévrier phénicien et de cyprès de l'Atlas ont réduit le taux d'émergence des adultes de la F1 de *S. oryzae* de 96.89%, 97.41% et 95.86% respectivement. Dans la même optique, l'évaluation de la perte en matière sèches des grains de blé dans des lots traités par les extraits et d'autre sans traitement a été réalisée. Les résultats sont très promoteurs car, encore une fois, l'analyse de la variance et les comparaisons avec les lots de témoins non traités révèlent un effet hautement significatif des trois extraits ($P < 0,0001$).

Ensuite, nous avons vérifié l'effet des trois extraits sur la germination des grains de blé *in vitro* et les résultats étaient négatifs. En effet, les extraits méthanoliques des trois plantes n'influent pas sur la germination.

Le potentiel antifongique des extraits a également été évalué. Les souches fongiques de *Fusarium culmorum* (FC.04.12 et FC.06.11) et *F. graminearum*(FG.02.12) utilisées étaient issues de la collection de laboratoire de mycologie de l'ENSA et ont été isolées à partir du blé infesté. L'évaluation a été réalisée à l'aide de la technique d'empoisonnement de milieu de culture PDA. Les trois extraits ont réduit la croissance de *Fusarium culmorum* et *F. graminearum in vitro*. *T. articulata* s'est révélé le plus efficace avec un pourcentage d'inhibition de 40 à 55%. Les pourcentages d'inhibition les plus faibles (6,19%) et (10,07%) ont été observés chez les souches FG.02.12 de *F. graminearum* inoculées dans les milieux traités par les extraits de *J. phoenicea* et *A. absinthium* respectivement. La souche FC.04.12 de *F. culmorum* s'est avérée la plus sensible vis à vis l'extrait de *T. articulata* qui a provoqué le pourcentage d'inhibition le plus élevé soit 55,8%.

Cette activité biologique (insecticide et fongicide) des trois extraits est sans doute liée à leurs profils métaboliques, notamment leurs richesses en composés phénoliques.

Notre étude a permis d'éclairer certaines propriétés biologiques à intérêt agronomique de l'absinthe, de genévrier phénicien et du cyprès d'Atlas qui ont montré des activités prometteuses insecticides et antifongiques dans la protection des denrées stockées. De façon générale, ces travaux participent également à une meilleure connaissance de la chimio- et de la biodiversité des espèces algérienne, premier pas vers une meilleure préservation de cet environnement.

Ce travail ayant été effectué, il serait intéressant comme projet à venir de comparer les résultats des propriétés insecticides à d'autres sous espèces des trois plantes algériennes étudiées afin de déterminer celles présentant les propriétés les plus bioactives. Il serait également fort intéressant de procéder à un isolement des composés majoritaires présents dans les extraits bruts d'*A. absinthium*, de *J. phoenicea* et de *T. articulata* et d'évaluer leurs activités biologiques indépendamment. Une recherche supplémentaire devrait être menée pour déterminer leurs modes d'action sur le charançon du riz et les espèces fongiques afin de faciliter le développement de formulations de nouveaux biopesticides pour la protection des céréales stockées.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbas Y., 2014.** Microorganismes de la rhizosphère des *Tetraclinis articulata* ; outil pour optimiser la régénération assistée du *Tetraclinis articulata* Vahl. Master. Thèse de doctorat, université., Mohammed V., Rabat. 176 p.
2. **Abbott W. S., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY,18, pp: 265-267.
3. **Abd-Elhady H.K., 2012.** Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of plant protection research* 52, (3), pp: 347-352.
4. **Abi-Ayad F.Z., 2009.** Analyse de l'huile essentielle du Thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse Maj. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, 102 p.
5. **Achat S., 2013.** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interactions avec des ions métalliques. Thèse. Doc. Université Bejaia. 211 p.
6. **Acheuk F., Lakhdari W., Abdellaoui K., Belaid M., Allouane R., Halouane F., 2017.** Phytochemical study and bioinsecticidal effect of the crude ethanolic extract of the Algerian plant *Artemisia judaica* L. (Asteraceae) against the black bean aphid, *Aphis fabae*. *Scop. Agriculture & Forestry*, 63 (1), pp : 95-104, Podgorica.
7. **Adjou E.S. et Soumanou M.M., 2013.** Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. *J. Appl. Biosci*, 70, pp : 5555-5566.
8. **Aggarwal K.K., Veena Prajapati A.K., Kumar S., 2001.** Toxicity of 1,8-cineol towards three species of stored product coleop-terans . *Insect Sci.* 21, (2), pp:155–160.
9. **Akhtar, M., Arshad, M., Raza, A.B.M., Chaudhary, M.I., Iram, N., Akhtar, N., Mahmood, T.,2013.** Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Agric. Appl. Sci.* 5, (1), pp: 69-73.
10. **Akowauh G. A., Zhari I., Norgyati. I., Sadikun A. et Khamsah S. M., 2004.** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*, 7, pp : 559-566.
11. **Akrout A., 2004.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). In: Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. *Cahiers Options Méditerranéennes*, n. 62. Zaragoza: CIHEAM, pp. 289-292.
12. **Angioni A., Barra A., Russo M. T., Coroneo V., Dessí S., et Cabras P., 2003.** Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp: 3073-3078.
13. **Animal Diversity Web, 2017.**
http://animaldiversity.org/accounts/Sitophilus_oryzae/classification/

14. **Aouinty B., Oufara S., Mellouki F., Mahari S., 2006.** Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10, pp : 67-71.
15. **Athanassiou C.G., Kavallieratos N.G., Evergetis E., Katsoula A-M., Haroutounian S.A., 2013.** Insecticidal efficacy of silica gel with *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 106, (4), pp.1902-1910.
16. **Athanassiou C. G., Kavallieratos N. G., Campbell J. F., 2017.** Competition of three species of *Sitophilus* on rice and maize. *Plos One* 12 (3): e0173377.
17. **Auamcharoen W., Chandrapatya A., Kijjoa A., etKainoh Y., 2012.** Toxicity and Repellency Activities of the Crude Methanol Extract of *Duabanga grandiflora* (Lythraceae) Against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pakistan J. Zool.*, vol. 44(1), pp. 227-232.
18. **Azzaoui M. E., Maatoug M. et Berrayah M., 2017.** Phytoecological study of *Tetraclinis articulata* in the woodland of beniaffene, Sdamas Chergui (tiaret, Algeria). *J. Fundam Appl Sci.*, 9(2), pp: 971-987.
19. **Bachir Raho G., Otsmane M. et Sebaa F., 2017.** Antimicrobial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from North Western Algeria. *Journal of Medicinal Botany*, 1, pp: 01-07 DOI: 10.25081/jmb.2017.v1.41
20. **Balachowsky A. S., 1963.** Entomologie appliquée à l'agriculture. 1 (2) Coléoptères. Ed. Masson et Cie, Paris , pp : 1070-1099.
21. **Barrero A. F., Herrador M. M., Arteaga P., Quílez J., 2005.** Chemical composition of the essential oils of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. - *J. Ess. Oil Res.*, 17 (1), pp: 166-168.
22. **Bekhechi C., AtikBekkara F., Consiglio D., Bighelli A., et Tomi F., 2012.** Chemical Variability of the Essential Oil of *Juniperus phoenicea* var. *turbinata* from Algeria. *Chemistry & Biodiversity*, pp: 2742-2753.
23. **Ben Akal-Ben Fatma Y., K. Pianelli, M. Dieuaide-Noubhani, A. Le Menn, C. Deborde, M. Maucourt, M-H. Andrieu, D. Rolin, C. Rothan, A. Moing, S. Bouzidet C. Cabasson, 2012.** 1H-NMR metabolomics: Profiling method for a rapid and efficient screening of transgenic plants. *African Journal of Biotechnology*, 11 (52), pp :11386-11399.
24. **BenaliToumi F., Benyahia M., Hamel L., Mohamedi H., L. Boudaghen, 2011.** Étude comparative de la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire d'Algérie, *Acta Botanica Gallica*, 158 : 1, pp : 93-100, DOI:10.1080/12538078.2011.10516257

- 25. Bingol Kerem et Brüscheiler Rafael, 2014.** Multidimensional Approaches to NMR-Based Metabolomics. *Anal. Chem*, 86, pp: 47–57. [dx.doi.org/10.1021/ac403520j](https://doi.org/10.1021/ac403520j)
- 26. Bourkhiss M., Hnach M., Lakhlifi T., Bourkhiss B., Ouhssine M., Satrani B., 2010.** Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* 79, pp. 4–11.
- 27. Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M.M., 2008.** Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie* 10, pp : 119-125.
- 28. Bravo L., 1998.** Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), pp : 317-333.
- 29. Camara A., 2009.** Lutte contre *S. oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) et *Tribolium castaneum* herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales. Thèse doc. Université du Québec à Montréal, 154p.
- 30. Cazin F.J., 1868.** - Absinthe. *Artemisia absinthium*. L. - In Traité pratique et raisonné des plantes indigènes et acclimatées, Paris : P. Asselin, 4e ed., pp :1-8.
- 31. Canadian Grain Commission, 2013.** Rice weevil : *Sitophilus Oryzae* (L) <https://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepose/pip-irp/rw-cr-eng.htm>. 2013.10.01
- 32. Centre National de l'Informatique et des Statistiques, 2016.** Statistiques du commerce extérieur de l'Algérie. 19p. [/pdf/r_periodique/Rapport%20annee%202016.pdf](#)
- 33. Charles H., 1997.** Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et étude de ses interactions avec l'hôte. Thèse doc. I.N.S.A. Lyon. 134p.
- 34. Cheyner V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J.-M., Sarni-Manchado P., et Fulcrand H., 2006.** Structure and Properties of Wine Pigments and Tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, pp: 298-305.
- 35. Chiasson H., Belanger A., Bostanian N., Vincent C., et Poliquin A., 2001.** Acaricidal Properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) Essential Oils Obtained by Three Methods of Extraction. *Journal of Economic Entomology*, 94 (1), pp:167-171.
- 36. Comte G., Vekcauteren J., Chulia A. J., Allais D. P. et C. Delage, 1997.** Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry*, 45 (8), pp: 1678-1682.
- 37. Correa A.S., De Oliveira L. O., Braga L. S. et Guedes R. N. C., 2013.** Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science*, 20, pp: 763–770. DOI 10.1111/j.1744-7917.2012.01559.x
- 38. Damian Flay C., 2010.** Multiple Mating and Mate Choice in *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: curculionidae). These. Master. Massey University. New Zealand. 63 p.

39. **Dane Y.**, 2012. Etude de la croissance *in vitro* et de l'agressivité de quelques isolats de *Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc. agent de la pourriture racinaire et de la gale de l'épi du blé. Mém. Ing., ENSA El Harrach. 75 p.
40. **De Groot Inge**, 2004. Protection des céréales et des légumineuses stockées. *Agrodok* 18. Ed., Fondation Agromisa, Wageningen. 74p.
41. **Delobel Alex et Tran Maurice**, 1993. Les coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes. Ed. OROSTOM, Paris : 425p.
42. **DE LUCA, Y.** 1975. Ecologie des denrées stockées (Milieu -Peuplement - Agressions). *Bull. ANE AP*, 39 p.
43. **Derradji Heffaf F.**, 2013. Composition chimique et activité insecticide des trois extraits végétaux à l'égard de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera : Curculionidae). Thèse Maj., ENSA-Alger. 92p.
44. **Djouahri A., Saka B., Boudarene L., Benseradj F., Aberrane S., Aitmousa S., Chelghoum C., Lamari L., Sabaou N., Baaliouamer A.**, 2014. *In vitro* synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Industrial Crops and Products* 56, pp: 60–66. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.02.035
45. **Dos Santos F.N., Almeida de Oliveira T., Souza Lima K.C., Alves de Andrade J.I., Xavier da Silva D., Do Vale Amaral L., Moya,H.D., Ronchi-Teles B., Matsuura T., Nunez C.V.**, 2014. *Montrichardialinifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. *Univ. Sci.* 19, (3), pp: 213-224. DOI 10.11144/Javeriana.SC19-3.mlab
46. **Dowell F. E. et Dowell C. N.**,2017. Reducing grain storage losses in developing countries. *Quality Assurance and Safety of Crops&Foods*, 09 (1), pp: 93-100.
47. **Ebeling Walter**, 1971. Sorptive dusts for pest control. *Annual Review of Entomology*, 16: pp:123-158. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.16.010171.001011>
48. **El-Mouridi M.**, 2011. Caractérisation mécanique de la loupe de thuya (*Tetraclinis Articulata* (Vahl) Master en vue de sa valorisation. Thèse en Cotutelle pour obtenir le grade de docteur de l'université Montpellier II, 120 p.
49. **FAO**, 2017. FAOSTAT/ALGERIE. <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/RP>
50. **Ferguson L. R .,** 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475, pp: 89–111.
51. **Fiamegos Y. C., Kastritis P. L., Exarchou V., Han H., Bonvin A. M. J. J., Vervoort J., Lewis K., Hamblin M. R. et Tegos G. P.**, 2011. Antimicrobial and Efflux Pump Inhibitory Activity of Caffeoylquinic Acids from *Artemisia absinthium* against Gram-Positive Pathogenic Bacteria. *Plos One*, 6 (4), e18127, pp : 1-12. doi:10.1371/journal.pone.0018127.t001

- 52. Fourar-Belaifa R. et Fleurat-Lessard F., 2015.** Évaluation expérimentale de la sensibilité aux attaques du charançon du riz de variétés d'espèces céréalières cultivées en Algérie. *Cah. Agric.*, 24 (5), pp: 283- 291.
- 53. Franz A. R., Knaak N. et Fiuza L. M., 2011.** Toxic effects of essential plant oils in adult *Sitophilus oryzae* (Linnaeus) (Coleoptera, Curculionidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 55(1), pp :116–120.
- 54. Gadenne C., Varjas L., Mauchamp B., 1990.** Effects of the non-steroidal ecdysone mimic, RH-5849, on diapause and non-diapause larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* bn. *Journal of Insect Physiology*, 36 (8), pp : 555-559.
- 55. Gibbons D., Morrissey C., Mineau P., 2014.** Examen des effets directs et indirects des néonicotinoïdes et du fipronil sur la faune des vertébrés. *Environ Sci Pollut Res*, 7p. DOI 10.1007/s11356-014-3180-5
- 56. Goławska S., Kapusta I., Łukasik I., Wójcicka A., 2008.** Effect of phenolics on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) population on *Pisum sativum* L. (Fabaceae). *Pesticides* (3-4), pp: 71-77.
- 57. Goudoum A., Ngamo L. S. T., Ngassoum M. B., L. N. Tatsadjieu et Mbofung C. M., 2010.** *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Curculionidae) sensitivity to repetitive applications of lethal doses of imidacloprid and extracts of *Clausena anisate* (Rutaceae) and *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 4(4), pp:1242-1250.
- 58. Green P.W.C., Stevenson P.C., Simmonds M.S.J., Sharma H.C., 2003.** Phenolic compounds on the pod-surface of pigeon pea, *Cajanus cajan*, mediate feeding behavior of *Helicoverpa armigera* larvae. *Journal of Chemical Ecology* 29 (4), pp: 811-821. doi: 10.1023/A:1022971430463
- 59. Grinbaum M., Cottureau P., Philippe T., Champeau N., Fregiere A., Vuchot P., 2012.** Analyses multi résidues de pesticides par UPLC/MS/MS; impact des itinéraires œnologiques. *Qualité et Environnement*, pp : 76-85.
- 60. Guèye M. T., Seck D., Wathelet J.-P., Lognay G., 2011.** Lutte contre les ravageurs des stocks de céréales et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale : synthèse bibliographique. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15 (1), pp : 183-194.
- 61. Gumustas M., Kurbanoglu S., Uslu B. et Ozkan S. A., 2013.** UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*. DOI 10.1007/s10337-013-2477-8
- 62. Günther Harald, 2013.** NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry. John Wiley & Sons, 734 p.
- 63. Hamadache A., 2017.** Amélioration de la production du blé en Afrique du nord: Rapport de Syngenta Agro. AG. Bulletin trimestriel d'information édité par Syngenta Agro. AG- Algérie. Nov. 2017- Année XIV-n° 53, 4p.

- 64. Hardman J.M., 1977.** Environmental changes associated with the growth of populations of *Sitophilus oryzae* (L.) confined in small cells of wheat. *Journal of Stored Products Research*, 13 (2), pp: 45-52. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(77\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0022-474X(77)90057-1)
- 65. Haryadi, Y., et F. Fleurât-Lessard. 1994.** Factors affecting survival and development of *Sitophilus oryzae* (L.) in rice grain pericarp layers. Pp: 525-527 in Highley E., Wright E.J., Banks H.J., et Champ B.R. (eds.), *Stored product protection*. CAB International, Wallingford, England.
- 66. Hasan M.R., Uddin N., Hasan M.M., Hossain M.M., Kamal M.M., Fatema K., Lutfor M., Azumder H.M.R., Bashir K., Rana M.S., 2015.** Larvicidal and insecticidal effects of different extracts of *mallotus repandus* (willd.) Muell.- arg. leaf and stem against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: culicidae) and *Sitophilus oryzae* Linn. (Coleoptera: Curculionidae). *Int j pharm.* 5, (1), pp: 127-133.
- 67. Hashim M.S., K.S. Devi, 2003.** Insecticidal action of the polyphenolic rich fractions from the stem bark of *Streblus asper* on *Dysdercus cingulatus*. *Fitoterapia*, 74, pp: 670–676.
- 68. Herzi N., Camyb S., Bouajilac J., Destrac P., Romdhanea M., Condoret J-S., 2013.** Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: Chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *J. of Supercritical Fluids* 82, pp: 72– 82. doi: 10.1016/j.supflu.2013.06.007
- 69. Huda-Faujan N., Noriham A., Norrakiah A.S., Babji A.S., 2009.** Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology* 8, (3), pp: 484-489.
- 70. De Hoffmann, E., Charette, J., Stroobant, V. (1994).** Spectrométrie de masse. Paris: Masson.
- 71. HosseyniMoghaddam M.S., Soltani J., Babalhavaeji F., Hamzei J., Nazeri S., Mirzaei S., 2013.** Bioactivities of *Endophytic penicillia* from Cupressaceae. *J. Crop Prot.* 2, (4), pp: 421-433.
- 72. Ileke K.D., Ogungbite O.C., Olayinka-Olagunju J.O., 2014.** Powders and extracts of *Syzygium aromaticum* and *Anacardium occidentale* as entomocides against the infestation of *Sitophilus oryzae* (L.) [Coleoptera: Curculionidae] on stored sorghum grains. *African Crop Science Journal* 22, (4), pp : 267-273.
- 73. INPN (Inventaire National du Patrimoine Naturel), 2017.** https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/15551
- 74. Isman B. Murray, 2006.** Botanical Insecticides, Deterrents, and Repellents In Modern Agriculture And An Increasingly Regulated World. *Annual Review of Entomology*, 51, pp:45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>

75. Khanahmadi M., Pakravan P., Hemati Azandaryani A., Negahban M. et Ghamari E., 2017. Fumigant toxicity of *Artemisia haussknechtii* essential oil and its nano-encapsulated form. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5 (2), pp: 1776-1783.
76. Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., Yildirim A., 2005. "Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (24), pp: 9452–9458.
77. Kouassi B., 1991. Influence de quelques facteurs extérieurs sur le cycle de développement et la survie de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidae). Thèse Doc. Univ. Nat. Cote d'Ivoire, 105 p.
78. Kougan Nkwokap G.B., 2010. Isolement et caractérisation des saponosides de trois plantes de la famille des Araliaceae et Dracaenaceae et évaluation de leurs activités cytotoxiques sur cellules tumorales. Thèse Doc., Université De Bourgogne/Université De Yaounde I. 184 p.
79. Lamarti A., Sadki I., Badoc A., Deffieux G., Carde J. P., 1996. Obtention par culture *in vitro* de clones d'absinthe, *Artemisia absinthium* L., dénués de thuyone. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 135, pp: 25-43.
80. Li W., Rettig J., Jiang X., Francisco D. T., Naidong W., 2006. Liquid chromatographic-electrospray tandem mass spectrometric determination of clarithromycin in human plasma. *Biomed Chromatogr.* 20 (11), pp: 1242-1251.
81. Liu Z.L., Chu S.S., Liu Q.R., 2010. Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils of *Artemisia capillaris* and *Artemisia mongolica*. *Molecules* 15, pp: 2600-2608. doi:10.3390/molecules15042600
82. Longstaff B. C., 1981. Biology of the grain pest species of the genus *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae): a critical review. *Protection Ecology*, 3 (2), pp: 83-130.
83. Maazoun A. M., Ben Hlela T., HaouelHamdi S., Belhadj F., Mediouni Ben Jemâa J., Marzouki M. N., 2017. Screening for insecticidal potential and acetyl cholin esterase activity inhibition of *Urginea maritima* bulbs extract for the control of *Sitophilus oryzae* (L.). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, pp: 752–760.
84. Mahmoudi S., Khali M. et Mahmoudi N., 2013. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynarascolymus* L.). « Nature & Technologie ». *B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, n° 09, pp : 35-40.
85. Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L., Aafi A., 2011. Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 3, pp: 415-424.

86. Markley J. L., Bruschweiler R., Edison A. S., Eghbalnia H. R., Powers R., Raftery D. et Wishart D. S., 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, pp: 34-40.
87. Mebarkia A. et Guechi A., 2004. Protection phytosanitaire contre les ravageurs des céréales stockées. Laboratoire de Microbiologie et de phytopathologie, Faculté des Sciences, UFA-Sétif.
88. Mierziak J., Kostyn K., et Kulma A., 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19, pp: 16240-16265; doi:10.3390/molecules191016240
89. Miller B., Madilao L. L., Ralph S., et Bohlmann J., 2005. Insect-Induced Conifer Defense. White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis, de Novo Formed Volatile Emissions, and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce. *Plant Physiology*, 137, pp: 369–382.
90. Mishra A.K. et Dubey N.K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60, (4), pp: 1101-1105.
91. Mohammad M. A., 2000. Effect of the host food on the population density of the confuse flour beetle (Duv). *Arab. Univ. J. Agri. Sci.*, 8 ,pp : 413-423.
92. Mouhouche F., Fleurat-Lessard F., Bouznad Z., 2009. Laboratory assessment of toxic activity of purified peptides extracted from chickpea seeds to two strains of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research*, 45, (4), pp: 261-266. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2009.04.006>
93. Msaada K., Salem N., Bachrouch O., Bouselmi S., Tammar S., Alfaify A., Al Sane K., Ben Ammar W., Azeiz S., Haj Brahim A., Hammami M., Selmi S., Limam F., Marzouk B., 2015. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. *Journal of Chemistry*, Article ID 804658, 12 p. doi: 10.1155/2015/804658
94. Nacif de Abreu I. et Mazzafera P., 2005. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, pp : 241–248. doi:10.1016/j.plaphy.2005.01.020
95. Nardon P., 1963. Les possibilités d'emploi des radiations dans la lutte contre les insectes. *Phytoma*, 144, pp: 7-12.
96. Nattudurai G., Baskar K., Paulraj M. G., Hairul Islam V. I., Ignacimuthu S., Duraipandiyar V., 2016. Toxic effect of *Atalantia monophylla* essential oil on *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae*. *Environ Sci. Pollut. Res.* DOI 10.1007/s11356-016-7857-9

- 97. Nikpay A., 2007.** Insecticidal efficacy of three vegetable oils as post-harvest grain protectants of stored wheat against *Rhyzopertha dominica* (F) (Coleoptera: Bostrychidae). *InsectSci* 14, pp:145–150.
- 98. Niranjana A., Barthwal J., Lehri A., Singh D. P., Govindrajana R., Rawat A. K. S., et Amla D.V., 2009.** Development and Validation of an HPLC–UV–MS–MS Method for Identification and Quantification of Polyphenols in *Artemisia pallens* L., *Acta Chromatographica* 21, 1, pp: 105–116. DOI: 10.1556/AChrom.21.2009.1.9
- 99. Oromí-Farrús M., Villorbina G., Eras J., Gatiús F., Torres M., Canela R., 2010.** Determination of the iodine value of biodiesel using ¹H NMR with 1,4-dioxane as an internal standard. *Fuel*, 89, pp: 3489–3492.
- 100. Owen P.L. et Johns, T., 1999.** Xanthine oxidase inhibitory activity of north eastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology* 64, pp: 149–160.
- 101. Paliwal J., Wang W., Symons S. J. et Karunakaran C., 2004.** Insect species and infestation level determination in stored wheat using near-infrared spectroscopy. *Canadian Biosystems Engineering*. 46, pp: 717-724.
- 102. Petrakis E. A., Cagliani L.R., Tarantilis P. A., Polissiou M. G., Consonni R., 2017.** Sudan dyes in adulterated saffron (*Crocus sativus* L.): identification and quantification by ¹H NMR. *Food Chemistry*, 217, pp:418-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.078>
- 103. Proctor, D.L., 1994.** Grain storage techniques: Evolution and trends in developing countries. *FAO Agricultural Services Bulletin* 109, 272 p. <http://www.fao.org/docrep/T1838E/T1838E00.htm>
- 104. Quézel F. et Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Paris, France: CNRS Edition.
- 105. Rajendran S., Sriranjini V., 2008.** Plant products as fumigants for stored-product insect control. *J. Stored Prod. Res.*, 44, pp: 126-135.
- 106. Rajashekar Y., Gunasekaran N., Shivanandappa T., 2010.** Insecticidal activity of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against stored-product insect pests and its application in grain protection. *J Food Sci Technol*, 47(3), pp: 310–314.
- 107. Regnault-Roger Catherine et Hamraoui Abdelaziz, 1997.** Lutte contre les insectes phytophages par les plantes aromatiques et leurs molécules allelochimiques. *Acta bot. Gallica*, 144 (4), pp : 401-412.
- 108. Regnault Roger C., Philogène B. J. R. et Vincent C., 2002.** Biopesticides d'origine végétale. 1ère ed (pp 337). Tec et Doc Lavoisier, Paris.
- 109. Riahi L., Chogranib H., Elferchichi M., Zaoualib Y., Zoghlamia N., Mlikia A., 2013.** Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves

- and flowers and their effects on antioxidant activities. *Industrial Crops and Products* 46, pp: 290– 296. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.01.036
- 110. Rivera S. et Canela R., 2012.** Influence of sample processing on the analysis of carotenoids in maize. *Molecules*, 17, pp : 11255-11268; doi:10.3390/molecules170911255.
- 111. Saihi R., 2011.** Etude Phytochimique, extraction des produits actifs de la plante *Artemisia campestris* de la région de Djelfa mise en évidence de l'activité biologique. MEM. MAJ. UNIV. ORAN. 76p.
- 112. Sayyad Ali Khan, 2015.** Theory of nuclear magnetic resonance spectroscopy. Scholar Reg. # FA13-R60-002/ATD COMSATS Abbottabad Pakistan
- 113. Schiffers B. C., Verstraeten C. H., Haubruge E., 1988.** Aperçu des problèmes entomologiques dans les denrées emmagasinées en Wallonie et des moyens de lutte proposés. *Parasitica*. 44 (2), pp: 37-43.
- 114. Seca A. M. L. et Silva A. M. S., 2005.** The Chemical Composition of the *Juniperus* Genus (1970-2004). *Recent Progress in Medicinal Plants,16–Phytomedicines*.122p
- 115. Sfara V., Zerba E. N., Alzogaray R. A., 2009.** "Fumigant Insecticidal Activity and Repellent Effect of Five Essential Oils and Seven Monoterpenes on First-Instar Nymphs of *Rhodnius prolixus*". *Journal of Medical Entomology*. 46 (3), pp: 511– 515. PMID 19496421. doi:10.1603/033.046.0315.
- 116. Singh S., Sharma D. K., Bhatia S., Singh A., 2017.** Effect of various plant powders on rice weevil (*Sitophilus oryzae* Linn.) in stored wheat. *Journal of Environmental Biology*, 38, pp: 501-508. DOI: <https://doi.org/10.22438/jeb/38/3/MS-164>
- 117. Stefanazzi N., Stadler T., Ferrero A., 2011.** Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Manag.Sci*. 67, pp: 639–646. doi: 10.1002/ps.2102
- 118. Sultana B., Anwar F., Ashraf M., 2009.** Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* 14, 2167-2180. doi:10.3390/molecules14062167
- 119. Swartz Michael E., 2005.** UPLC TM: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, pp: 1253–1263.
- 120. Szykarczyk S., Leszczyński B., Oleszek W., Staszewski Z.,2001.** Aphids and Other Homopterous Insects, (Cichocka E. et al., Eds.), *Polish Entomological Society*, Siedlce, 8, pp:121-130.
- 121. Tapondjou L. A., Alder A., Bonda H., Fontem D.A., 2002.** Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. *J Stored Prod Res*, 38, pp: 395–402.

- 122. Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D., Agati G., 2004.** Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163, pp: 547-561. doi : 10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x
- 123. Taylor R. S. L., Edel F., Manandhar N. P., Towers G. H. N., 1996.** Antimicrobial activity of southern Nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 45, pp: 67- 70.
- 124. Tholl Dorothea, 2006.** Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, pp: 297–304.
- 125. Tsao R., 2010.** Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2, pp: 1231-1246. doi:10.3390/nu2121231
- 126. Ulrich E. L., Akutsu H., Doreleijers J. F., Harano Y., Ioannidis Y. E., Lin J., Livny M., Mading S., Maziuk D., Miller Z., Nakatani E., Schulte C. F., Tolmie D. E., Wenger R. K., Yao H. Y., Markley J. L., 2008.** BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.*, 36, pp: D402–D408.
- 127. US Department of Agriculture, Agricultural Research Services, 2015.** https://www.gipsa.usda.gov/fgis/publication/ref/Stored%20Grain%20Insects_2015-03-04.pdf
- 128. Watkins S. D., Hills M. J., Birsh A. R., 2000.** Use of menthyl 2-Pyrrolidone-5-carboxylate as an insect repellent. *US*, 6, 451, 844 B1.
- 129. Wishart D. S., Knox C., Guo A. C., Eisner R., Young N., Gautam B., Hau D. D., Psychogios N., Dong E., Bouatra S., Mandal R., Sinelnikov I., Xia J. G., Jia L., Cruz J. A., Lim E., Sobsey C. A., Shrivastava S., Huang P., Liu P., Fang L, Peng J., Fradette R., Cheng D., Tzur D., Clements M., Lewis A., De Souza A., Zuniga A., Dawe M., Xiong Y. P., Clive D., Greiner R., Nazyrova A., Shaykhutdinov R., Li L., Vogel H. J., Forsythe I., 2009.** HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.*, 37, pp: D603–D610.
- 130. Wu T., Wang C., Wang X., Xiao H., Ma Q., Zhang Q., 2008.** Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates. *Chromatographia*, 68, November (No. 9/10), DOI: 10.1365/s10337-008-0788-y0009-5893/08/11

ANNEXES

Tableau 21. Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

Index	Fréquence (ppm)	Intensité
1	13.3599	0.754347
3	13.1721	1.00682
5	13.1189	21.9105
6	13.0681	4.37057
7	12.9388	3.46455
8	12.8519	1.4801
10	12.6201	0.712043
12	12.3498	1.9573
14	12.0145	15.598
16	11.6095	0.731715
18	11.5012	1.47046
20	11.4167	1.87292
22	11.3401	7.1113
23	11.3279	1.37847
25	11.2855	1.68469
26	11.2635	6.53942
27	11.2425	1.26325
30	11.0005	7.96682
32	10.755	1.02231
34	10.2553	9.88534
35	10.2143	2.4069
36	10.1616	1.70818
38	9.93469	1.10771
40	9.91371	1.46893
42	9.8693	0.608377
44	9.73706	0.895129
46	9.65654	1.2498
48	9.46085	0.751204
50	9.29689	0.806725
52	9.14561	1.07253
53	9.12414	8.639
54	9.1051	3.68363
55	9.05874	1.16558
56	8.96603	2.07445
57	8.92113	2.5808
58	8.88599	10.1838
59	8.84939	2.45091
60	8.80938	8.45007
61	8.76156	10.7901
62	8.74594	4.17459
63	8.71764	10.267
64	8.64492	10.3639
65	8.61321	4.4763
66	8.56489	3.67035
67	8.54635	3.20905
69	8.12472	0.646759

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

71	7.96271	5.63142
72	7.84022	1.76875
73	7.55084	3.09289
74	7.52937	4.58593
75	7.47911	15.7569
76	7.45715	16.2058
77	7.39175	2.41897
78	7.18094	3.28082
79	7.16386	3.78461
80	7.1419	3.83876
81	7.13361	3.62118
82	7.09213	3.75833
83	7.07553	3.51588
84	7.04284	4.2337
85	7.02527	4.05049
86	7.01307	6.47966
87	7.00526	6.07126
88	6.98282	4.4528
89	6.96281	5.76644
90	6.92621	8.26246
91	6.90962	7.40497
92	6.88814	5.64419
93	6.85057	8.58563
94	6.8291	10.2733
95	6.79494	9.64406
96	6.75834	31.0831
97	6.73296	13.7297
98	6.72174	24.0452
99	6.70612	18.3788
100	6.69929	24.0899
101	6.6827	17.4619
102	6.66562	12.1554
103	6.65049	16.3792
104	6.63488	14.0972
105	6.6012	8.99763
106	6.5812	10.0681
107	6.53191	24.4616
108	6.51532	17.2026
109	6.49043	8.01104
110	6.48262	7.21928
111	6.47481	6.91851
112	6.45529	7.34672
113	6.42845	19.8378
114	6.35135	6.83855
115	6.30548	6.9916
116	6.28889	6.08006
117	6.27181	5.52834
118	6.25863	6.89458
119	6.23911	4.85324

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

120	6.2274	4.68097
121	6.2069	9.28382
122	6.16103	11.6505
123	6.14932	13.3585
124	6.10442	2.44333
125	6.06246	2.31955
126	6.04343	2.43869
127	6.00097	2.07789
129	5.99951	3.5834
130	5.94631	3.9296
131	5.9346	4.02543
132	5.91752	6.01915
133	5.90288	4.85862
134	5.87653	4.75362
135	5.85018	9.33397
136	5.8453	10.4827
137	5.78381	5.15152
138	5.75356	21.3985
139	5.72672	23.6975
140	5.70964	23.9859
141	5.68329	24.3223
142	5.64815	10.1929
143	5.64278	8.93842
144	5.63351	5.66819
145	5.62424	5.5092
146	5.56421	9.26516
147	5.51249	6.73151
148	5.44417	6.94708
149	5.42904	7.11049
150	5.37682	8.32845
151	5.35779	8.84767
152	5.33095	8.36355
153	5.28801	9.75504
154	5.25092	19.1025
155	5.19724	9.25715
156	5.16601	40.9072
157	5.10892	8.7908
158	5.09525	40.348
159	5.05036	16.2302
160	5.03767	15.6649
161	5.02742	18.5917
162	5.01424	17.3009
163	4.9918	15.1097
164	4.98155	15.5764
165	4.93714	77.845
166	4.92787	80.0996
167	4.87517	54.4203
168	4.86589	32.4062
169	4.85272	55.3521

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

170	4.8493	51.3799
171	4.83173	55.8136
172	4.82637	57.4846
173	4.82246	48.1963
174	4.80734	27.9292
175	4.78342	48.3368
176	4.77318	54.5569
177	4.75122	24.2251
178	4.74438	28.4167
179	4.7273	21.6282
180	4.71803	20.5262
181	4.70437	21.1333
182	4.68582	15.6522
183	4.67265	21.7148
184	4.66582	22.7702
185	4.65606	18.8735
186	4.63507	25.3546
187	4.61507	81.4213
188	4.60384	83.9699
189	4.58871	100.996
190	4.57261	110.716
191	4.55163	83.223
192	4.53552	94.0684
193	4.49258	21.7542
194	4.47794	21.8529
195	4.4672	24.6294
196	4.45549	28.438
197	4.44329	33.7518
198	4.42719	51.9796
199	4.41938	38.6156
200	4.40181	38.0482
201	4.38278	30.8213
202	4.33984	31.3762
203	4.32764	26.9478
204	4.30812	21.0583
205	4.29348	24.7699
206	4.27884	32.9412
207	4.26908	27.9258
208	4.24858	22.8611
209	4.23297	27.8059
210	4.21003	61.9013
211	4.19393	70.1934
212	4.08413	13.591
213	4.05485	13.2983
214	4.03582	11.9766
215	3.98897	10.4487
216	3.96847	13.4424
217	3.95286	16.4746
218	3.93724	14.4099

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

219	3.89186	14.985
220	3.87819	16.5164
221	3.82647	18.7762
222	3.81524	18.6932
223	3.79767	41.7538
224	3.77864	70.5613
225	3.76791	59.7568
226	3.76303	59.9966
227	3.75327	69.0236
228	3.74692	45.8692
229	3.73814	76.0795
230	3.7274	91.9776
231	3.71667	92.6299
232	3.70544	63.6233
233	3.70056	60.791
234	3.68836	69.5714
235	3.67958	79.5562
236	3.66884	72.4475
237	3.65908	53.3762
238	3.64835	56.7308
239	3.63468	30.654
240	3.61224	62.6196
241	3.60101	75.9184
242	3.59418	81.9476
243	3.57954	74.1887
244	3.53562	48.4953
245	3.51269	29.3458
246	3.49414	28.4417
247	3.46925	51.8552
248	3.46145	53.7198
249	3.44632	95.9471
250	3.43363	53.0996
251	3.42533	47.6308
252	3.40923	121.292
253	3.38581	57.6832
254	3.37849	61.9382
255	3.37214	70.6428
256	3.36287	59.5688
257	3.35409	55.4321
258	3.34482	70.4113
260	3.25551	48.6075
261	3.24575	48.1852
262	3.2277	36.4646
263	3.21891	39.0053
264	3.2033	33.846
265	3.1423	77.9427
266	3.13449	76.6738
267	3.1218	74.8932
268	3.11399	75.1093

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

269	3.09447	24.5279
270	3.08374	25.0708
271	3.07544	26.7024
272	3.06227	27.0731
273	3.05251	25.4117
274	3.04421	24.0037
275	3.02859	26.4625
276	3.00761	31.2525
277	2.99346	27.4952
278	2.97004	24.0076
279	2.94661	15.2216
280	2.87488	11.357
281	2.86268	11.5569
282	2.8534	12.3763
283	2.84316	12.8353
284	2.8212	10.56
285	2.77923	8.84834
286	2.73189	10.2301
287	2.71481	10.1323
288	2.69627	10.0319
289	2.63039	15.2031
290	2.61917	15.5392
291	2.6099	13.12
292	2.60453	11.9783
293	2.58842	11.8608
294	2.56695	12.3466
298	2.4269	14.1746
299	2.41567	15.1751
300	2.39225	15.464
301	2.38151	15.2922
302	2.33711	20.9289
303	2.29807	25.4073
304	2.29319	24.7772
305	2.28831	24.3198
306	2.27806	23.4589
307	2.23756	23.839
308	2.22048	29.3981
309	2.2034	24.1151
310	2.18632	28.3838
311	2.16192	28.5345
312	2.14288	47.5032
313	2.12434	30.0041
314	2.07993	25.8833
315	2.08091	26.5791
317	1.99453	40.5153
318	1.95989	53.7986
319	1.91158	36.7174
320	1.87351	37.626
321	1.85594	38.2457

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

322	1.83203	35.313
323	1.81202	42.7778
324	1.80617	46.0469
325	1.7803	54.7434
326	1.77494	58.0581
327	1.72955	57.6439
328	1.71101	61.3709
329	1.69393	50.4144
330	1.67197	51.907
331	1.65782	59.1363
332	1.63439	55.5676
333	1.59535	44.1436
334	1.53582	55.3819
335	1.50703	58.4646
336	1.47677	89.4248
337	1.45676	103.699
338	1.39089	56.2499
339	1.36941	61.0322
340	1.33525	57.9232
341	1.32452	56.0651
342	1.30109	67.783
343	1.29231	62.6074
344	1.27767	71.3188
345	1.26986	73.3558
346	1.19666	565.175
347	1.14835	70.7023
348	1.13274	94.891
349	1.12737	82.0266
350	1.1098	75.8571
351	1.10443	85.6509
352	1.09467	119.61
353	1.08101	165.229
354	1.05124	245.499
355	1.02001	60.2925
356	1.00195	59.3103
357	0.966818	226.815
358	0.949738	61.5042
359	0.939978	59.218
360	0.920458	50.2485
361	0.906794	51.4433
362	0.883371	70.4898
363	0.869219	56.4929
364	0.853115	53.5501
365	0.834571	73.145
366	0.816027	101.035
367	0.801388	93.4496
368	0.786748	91.2537
369	0.770156	39.1221
370	0.741852	194.326

Tableau 21. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Jmet de *Juniperus phoenicea*

371	0.715013	26.44
372	0.706229	24.1892
373	0.657917	10.7556
374	0.62327	35.1754
375	0.607654	25.8703
376	0.59399	12.1903
377	0.563246	20.0187
378	0.528111	13.7362
379	0.506151	97.1678
380	0.492975	29.2924
381	0.472479	15.3195
382	0.460279	16.7829
383	0.368536	2.30396
384	0.343161	2.1093

Tableau 22. Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

Index	Fréquence (ppm)	Intensité
1	12.5577	18.8022
2	11.3474	4.35689
3	11.2967	3.09481
4	11.262	4.18833
5	10.7638	2.8063
6	9.76829	2.8043
7	9.44768	3.53031
8	9.29249	4.54156
9	8.95236	3.49818
10	8.87672	2.73008
11	8.85086	2.8271
12	7.71286	16.1629
13	7.69578	14.9556
14	7.6909	17.7744
15	7.69187	18.8066
16	7.63526	32.2624
17	7.6299	31.4026
18	7.63087	31.6547
19	7.59525	3.98145
20	7.56792	3.64314
21	7.50692	4.76277
22	7.46007	5.48012
23	7.42103	5.79258
24	7.38736	6.02847
25	7.32588	4.02389
26	7.30245	4.54638
27	7.21656	4.01573
28	7.19412	4.48206
29	7.1785	5.42803
30	7.14288	29.7073

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

31	7.12141	29.2875
32	7.02429	21.7665
33	6.99746	12.6266
34	6.94475	11.6278
35	6.91352	60.4873
36	6.89742	10.914
37	6.87936	57.264
38	6.85203	16.9452
39	6.83739	15.3674
40	6.83154	16.7409
41	6.81202	71.168
42	6.80421	45.854
43	6.78371	13.57
44	6.73833	12.6138
45	6.72711	10.9771
46	6.71783	11.4256
47	6.6988	14.3231
48	6.68416	12.554
49	6.62512	11.4526
50	6.6056	63.1756
51	6.60072	77.6118
52	6.5607	9.78533
53	6.49384	7.64944
54	6.48164	8.55265
55	6.46212	8.0596
56	6.45432	8.8723
57	6.44114	11.8933
58	6.43382	9.8676
59	6.40698	13.1503
60	6.39576	31.593
61	6.37965	18.0288
62	6.35428	14.8143
63	6.30889	10.1018
64	6.24838	8.10526
65	6.22203	10.2137
66	6.18446	14.5065
67	6.16347	13.9894
68	6.14346	14.1489
69	6.13126	12.4127
70	6.10198	13.0501
71	6.08247	10.1099
72	6.05563	8.51177
73	6.04928	8.66028
74	6.02244	9.95928
75	6.01854	8.75352
76	6.01415	9.34747
77	6.01073	8.99677
78	6.00975	8.77728
79	6.00878	8.92062
80	6.00439	8.48045

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

81	6.00292	9.92691
82	6.00146	14.8416
83	5.99999	23.7167
84	5.99707	9.96912
85	5.99511	10.2537
86	5.99267	8.73042
87	5.9917	8.80262
88	5.96486	29.2306
89	5.95071	206.733
90	5.92533	26.2716
91	5.87751	10.8256
92	5.83896	13.5372
93	5.81602	13.2285
94	5.77747	9.95997
95	5.72525	14.8554
96	5.69939	17.7271
97	5.66572	14.8268
98	5.63888	15.2889
99	5.62375	16.8901
100	5.59789	18.1219
101	5.53494	55.6661
102	5.50517	27.8824
103	5.49248	24.3363
104	5.47686	25.1125
105	5.46466	27.9964
106	5.45442	26.6065
107	5.43929	28.677
108	5.42074	26.0128
109	5.36804	31.4218
110	5.32022	52.2896
111	5.30411	58.2563
112	5.27288	102.673
113	5.21091	41.5938
114	5.18504	41.3988
115	5.1582	45.2691
116	5.1138	41.2227
117	5.07817	64.3416
118	5.04548	48.4278
119	5.01132	42.764
120	4.99424	45.9092
121	4.96057	35.89
122	4.92982	40.7764
123	4.91469	47.3682
124	4.88834	43.7724
125	4.83954	48.1001
126	4.82344	49.0956
127	4.78782	50.7962
128	4.76244	48.9127
129	4.72974	43.8312
130	4.70486	61.8925

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

131	4.68338	58.9668
132	4.6746	57.1463
133	4.62239	107.801
134	4.61067	87.0391
135	4.60384	88.0853
136	4.44964	35.4761
137	4.41499	44.4796
138	4.35301	32.2438
139	4.3413	32.371
140	4.29152	34.9279
141	4.26127	36.4624
142	4.19441	30.1324
143	4.17343	33.5636
144	4.16123	34.7526
145	4.14317	39.5366
146	4.11975	39.2841
147	4.10462	43.6329
148	4.08218	48.5702
149	4.07486	48.5067
150	4.0529	42.2272
151	3.97726	38.9518
152	3.96066	39.2817
153	3.94358	35.8568
154	3.89625	180.738
155	3.88503	65.1409
156	3.85916	81.5773
157	3.82988	326.502
158	3.78889	230.425
159	3.76059	58.2855
160	3.73472	413.636
161	3.71374	118.336
162	3.70203	253.723
163	3.69227	115.07
164	3.6869	158.895
165	3.63956	56.3614
166	3.63322	52.2163
167	3.61175	57.684
168	3.59516	222.935
169	3.56344	39.536
170	3.53269	46.0343
171	3.47804	38.1907
172	3.44681	36.9729
173	3.40386	59.6544
174	3.37361	68.2801
176	3.2765	538.423
177	3.22672	90.4208
178	3.13644	70.4866
179	3.12229	42.0761
180	3.10228	52.2752
181	3.08618	69.692

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

182	3.07105	76.5482
183	3.06275	120.915
184	3.04519	57.1408
185	3.02518	62.5434
186	3.01005	79.1191
187	2.98028	46.3051
188	2.96028	53.806
189	2.94124	46.4326
190	2.88073	34.5126
191	2.85682	56.4369
192	2.83047	54.2735
193	2.79875	31.6235
194	2.78069	32.803
195	2.71774	78.065
196	2.69383	63.7554
197	2.67187	70.3572
198	2.63625	61.4496
199	2.62698	64.1833
200	2.60746	63.4973
201	2.58745	65.1117
202	2.56939	66.2224
203	2.54694	67.5611
204	2.53767	66.7114
205	2.52742	64.7485
206	2.50254	69.9471
208	2.43227	75.3601
209	2.4147	71.6752
210	2.4025	68.665
211	2.38249	71.9395
212	2.37127	70.3995
213	2.32491	82.3652
214	2.30636	102.306
215	2.28928	111.118
216	2.28196	118.204
217	2.27562	113.286
218	2.25854	111.124
219	2.2317	133.045
220	2.21364	152.964
221	2.19315	123.308
222	2.17607	115.911
223	2.15655	155.407
224	2.138	207.601
225	2.11995	174.018
226	2.10775	116.394
227	2.09653	126.156
228	2.07847	123.069
229	2.06529	118.518
231	2.0082	391.104
232	1.99795	316.634
233	1.98087	268.464

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

234	1.96721	257.7
235	1.93939	169.676
236	1.93256	166.235
237	1.9023	188.295
238	1.86961	193.636
239	1.83789	208.759
240	1.8213	177.924
241	1.79982	304.392
242	1.78372	183.026
243	1.73687	150.899
244	1.72907	151.272
245	1.71003	140.254
246	1.69295	147.502
247	1.6788	151.357
248	1.65879	142.446
249	1.64659	153.325
250	1.63683	151.206
251	1.60609	211.789
252	1.58267	220.534
253	1.56071	351.679
254	1.5368	208.692
255	1.51874	228.198
256	1.4919	276.991
257	1.47482	252.86
258	1.45481	283.152
259	1.42651	310.255
260	1.39918	232.751
261	1.38796	257.126
262	1.36453	231.192
263	1.33135	357.309
264	1.31622	216.149
265	1.30841	217.056
266	1.22789	924.41
267	1.18934	2592
268	1.15274	463.76
269	1.13371	564.118
270	1.10248	367.911
271	1.08198	330.602
272	1.0693	416.348
273	1.05124	447.509
274	1.03026	383.06
275	1.00781	463.483
276	0.990241	406.931
277	0.953642	270.026
278	0.93705	250.605
279	0.92241	194.462
280	0.904354	161.681
281	0.883859	214.05
282	0.871659	248.381
283	0.848723	151.281

Tableau 22. (Suite) Données spectrales de H-RMN de l'extrait méthanolique Amet d'*Artemisia absinthium*

284	0.826763	308.45
285	0.811147	476.599
286	0.794068	358.435
287	0.75942	285.473
288	0.745756	174.711
289	0.719404	254.511
290	0.668653	86.6843
291	0.629613	43.8167
292	0.613998	35.5292
293	0.597894	50.8286
294	0.480775	11.9528
295	0.441248	13.8974
296	0.301681	7.83553
297	0.25825	10.2975
298	0.0596358	4.54122

Tableau 23. Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

Index	Fréquence (ppm)	Intensité
2	12,647	16,6777
3	12,6182	5,77709
4	12,5865	3,53302
6	11,4167	3,23114
7	11,2635	13,8577
8	10,8277	3,36801
9	9,21978	14,2742
10	9,14512	2,68834
11	9,12609	15,8327
12	9,10608	5,28179
13	9,02166	5,63748
14	8,88648	14,3043
15	8,82646	5,69183
16	8,80889	13,7727
17	8,76253	13,0458
18	8,71764	10,4314
19	7,96417	4,2583
20	7,52742	2,82237
21	7,44836	6,83393
22	7,34149	2,68255
23	7,26048	3,18019
24	7,23023	2,64189
25	7,15508	5,42712
26	6,98672	3,83018
27	6,90718	4,63296
28	6,88619	5,39827
29	6,84959	43,9981
30	6,77688	9,92287
31	6,74028	8,4112

Tableau 23. (Suite) Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

32	6,7071	11,6214
33	6,67879	13,9895
34	6,65488	13,1244
35	6,63439	15,8332
36	6,55972	10,1498
37	6,53923	12,3075
38	6,47335	8,65234
39	6,39917	6,39365
40	6,35379	6,32155
41	6,33037	18,3029
42	6,30645	6,66048
43	6,28693	8,88592
44	6,25766	20,835
45	6,24253	11,3065
46	6,21422	9,45319
47	6,20593	15,9336
48	6,17665	9,41555
49	6,16835	16,8462
50	6,16298	16,7151
51	6,06148	3,40734
52	6,04538	3,70173
53	6,00731	2,78
54	5,99951	4,0104
55	5,93363	7,25393
56	5,91899	9,77337
57	5,84481	14,1298
58	5,80236	6,99063
59	5,77454	7,61806
60	5,75648	7,60296
61	5,72965	11,1619
62	5,71159	9,64969
63	5,68475	9,70887
64	5,66865	7,89558
65	5,64181	17,0447
66	5,63644	11,5969
67	5,60862	6,9992
68	5,5647	5,76115
69	5,48516	4,73877
70	5,37731	12,5106
71	5,35926	14,2186
72	5,28703	23,2924
73	5,25141	17,9968
74	5,23189	12,4869
75	5,2153	10,8514
76	5,15967	22,7524
77	5,10745	16,5599
78	5,09428	32,1823
79	5,08452	23,703
80	5,05231	15,4103
81	5,01766	18,5924

Tableau 23. (Suite) Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

82	4,99912	12,6913
83	4,97472	17,9573
84	4,96447	19,5816
85	4,95471	22,9839
86	4,93763	118,709
87	4,92836	118,826
88	4,91372	51,4668
89	4,87712	28,6617
90	4,87858	29,2539
91	4,8698	34,8712
92	4,84637	39,373
93	4,81954	48,6504
94	4,77171	32,1037
95	4,75219	22,576
96	4,74341	27,8194
97	4,72779	21,7101
98	4,69949	17,8459
99	4,66728	27,1473
100	4,64923	25,4476
101	4,63654	32,4007
102	4,61409	129,028
103	4,60287	139,113
104	4,58823	162,098
105	4,57212	171,229
106	4,55211	139,495
107	4,53601	148,186
108	4,51112	29,9273
109	4,46623	26,2499
110	4,455	28,6126
111	4,44378	33,4765
112	4,4267	35,1836
113	4,41938	37,2841
114	4,4023	38,7416
115	4,39108	32,4518
116	4,35252	27,6157
117	4,33935	39,786
118	4,32617	31,51
119	4,29396	24,2894
120	4,27786	31,3097
121	4,26859	26,8919
122	4,20954	100,359
123	4,19393	111,865
124	4,08364	16,1116
125	3,97823	18,8336
126	3,93285	22,7677
127	3,89235	14,6144
128	3,83671	14,1377
129	3,77767	91,7083
130	3,75375	49,0203
131	3,73716	72,9433

Tableau 23. (Suite) Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

132	3,72692	133,054
133	3,71569	133,653
134	3,6991	81,1931
135	3,68739	71,943
136	3,6786	107,581
137	3,66787	107,193
138	3,65811	75,1874
139	3,64737	73,1929
140	3,6015	115,625
141	3,58052	248,335
142	3,57417	95,5027
143	3,56685	66,0289
144	3,5527	156,906
145	3,54587	45,6477
146	3,52293	172,407
147	3,5161	47,7228
148	3,48731	144,815
149	3,48097	26,2327
150	3,47804	38,4328
151	3,47462	34,6721
152	3,46828	74,8612
153	3,45998	75,8028
154	3,43607	175,081
155	3,4268	62,7571
156	3,42387	74,2299
157	3,4185	43,5035
158	3,40972	114,478
159	3,37166	70,9459
160	3,36141	53,8551
161	3,34042	103,406
162	3,32139	95,4451
164	3,24624	102,211
165	3,24038	109,279
166	3,21794	64,053
167	3,20378	54,103
168	3,19012	43,8459
169	3,16231	42,4034
170	3,14132	120,253
171	3,134	123,594
172	3,12131	117,132
173	3,11351	120,647
174	3,06373	36,5336
175	3,01347	32,825
176	2,99151	33,7039
177	2,96857	34,3266
178	2,94515	24,855
179	2,92514	21,5337
180	2,75727	37,4684
181	2,72945	39,0566
182	2,69969	37,5068

Tableau 23. (Suite) Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

183	2,66309	33,0001
184	2,63137	31,8507
185	2,61185	33,8479
188	2,41519	22,0287
189	2,37517	24,4503
190	2,34003	26,2717
191	2,29319	38,0298
192	2,22194	32,2779
193	2,18778	41,8089
194	2,16289	32,2679
195	2,14386	46,979
196	2,12532	34,8195
197	2,08091	43,7957
199	1,99893	44,6119
200	1,98331	47,5179
201	1,96867	53,1202
202	1,93207	90,2635
203	1,91206	93,7285
204	1,88181	51,0743
205	1,8457	40,3114
206	1,81251	42,624
207	1,78274	48,5092
208	1,74175	39,509
209	1,7154	42,8979
210	1,65782	80,5267
211	1,60267	50,8628
212	1,59047	50,6598
213	1,56803	42,7215
214	1,5529	43,343
215	1,48116	73,784
216	1,45042	86,7807
217	1,39576	52,823
218	1,34013	48,63
219	1,31866	53,136
220	1,29963	64,6119
221	1,27425	71,0976
222	1,19862	648,021
223	1,1425	42,7408
224	1,12151	143,98
225	1,11273	67,5698
226	1,10541	87,4866
227	1,09223	115,003
228	1,05368	107,59
229	1,04831	100,095
230	1,02147	43,28
231	0,997073	50,0671
232	0,98097	49,9222
233	0,968282	58,5349
234	0,960474	45,7024
235	0,933146	45,9409

Tableau 23. (Suite) Données spectrales d'H-RMN de l'extrait méthanolique Tmet de *Tetraclinis articulata*

236	0,896547	55,8192
237	0,851651	107,429
238	0,814563	214,307
239	0,798948	98,2855
240	0,784796	92,3933
241	0,770644	48,2313
242	0,751612	65,0895
243	0,745268	45,2125
244	0,636933	15,768
245	0,613998	21,613
246	0,564222	53,314
247	0,529087	5,67653
248	0,507127	14,3823
249	0,493951	10,5569
250	0,473943	11,2513
251	0,460279	32,6846

Tableau 24. Evolution de la DL50 par rapport au temps d'exposition des insectes aux extraits méthanoliques

Jour	<i>A absinthium</i>		<i>J phoenicea</i>		<i>T articulata</i>	
	Coefficient R ²	DL 50 (mg/cm ²)	Coefficient R ²	DL 50 (mg/cm ²)	Coefficient R ²	DL 50 (mg/cm ²)
3	R2= 0,72	29,3	R2= 0,90	28,57	R2= 0,91	34,79
4	R2= 0,76	28,58	R2= 0,90	28,57	R2= 0,91	34,79
5	R2= 0,84	27,22	R2= 0,81	26,1	R2= 0,85	27,83
6	R2= 0,82	26,36	R2= 0,80	24,33	R2= 0,85	27,83
7	R2= 0,89	23,02	R2= 0,81	24,27	R2= 0,83	27,36
8	R2= 0,95	15,53	R2= 0,93	22,14	R2= 0,88	24,05
9	R2= 0,99	13,59	R2= 0,89	17,3	R2= 0,82	22,23
10	R2= 0,75	9,41	R2= 0,87	15,82	R2= 0,79	19,86
11	R2= 0,75	4,37	R2= 0,75	9,06	R2= 0,83	17,11

Tableau 25. Analyse de la variance des données du Test insecticide des extraits par contact

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	377,667	125,889	65,681	< 0,0001
Erreur	8	15,333	1,917		
Total corrigé	11	393,000			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 26. Analyse de la variance des données de la mortalité de *S. oryzae* par traitement des grains après 08jr

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	568,933	142,233	41,029	< 0,0001
Erreur	10	34,667	3,467		
Total corrigé	14	603,600			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 27. Analyse de la variance des données de la mortalité de *S. oryzae* par traitement des grains après 14jr

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	640,400	160,100	120,075	< 0,0001
Erreur	10	13,333	1,333		
Total corrigé	14	653,733			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 28. Analyse de la variance des données de l'émergence de la F1 du *S. oryzae*

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	12812,933	3203,233	1456,015	< 0,0001
Erreur	10	22,000	2,200		
Total corrigé	14	12834,933			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 29. Analyse de la variance de la durée du cycle de développement de *S. oryzae*

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	192,933	48,233	55,654	< 0,0001
Erreur	10	8,667	0,867		
Total corrigé	14	201,600			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 30. Analyse de la variance des données liées à la perte en matière sèche des grains dues à l'infestation par *S. oryzae*.

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	4	46,400	11,600	15,818	0,000
Erreur	10	7,333	0,733		
Total corrigé	14	53,733			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 31. Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FG.02. 12

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	21,397	7,132	29,111	0,000
Erreur	8	1,960	0,245		
Total corrigé	11	23,357			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 32. Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FC.06.11

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	21,723	7,241	147,277	< 0,0001
Erreur	8	0,393	0,049		
Total corrigé	11	22,117			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

Tableau 33. Analyse de la variance des données liées à la croissance mycélienne de la souche FC.04.12

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	3	35,396	11,799	159,082	< 0,0001
Erreur	8	0,593	0,074		
Total corrigé	11	35,989			
<i>Calculé contre le modèle Y=Moyenne(Y)</i>					

ملخص

تركز البحوث بشكل متزايد على تحديد بدائل لاستخدام المواد الكيميائية لإدارة الآفات في الحبوب المخزنة. في هذا السياق، اختبرنا أنشطة مبيدات الحشرات والفطريات من المستخلصات الميثانولية من أرتيميسيا أبسينثيوم أو شجرة مريم، جونيبيروس فينيسا أو العرعار، وأيضا تيتراكلينيس أرتيكولاتا أو تويا عقدية، التي تم جمعها في شمال الجزائر، ضد سيتوفيلوس أوريزاي أو سوسة الرز هي نوع من الحشرات يتبع جنس سوسة الحبوب من الفصيلة السوسية الحقيقية. تصيب هذه السوسة حبوب الأرز وهي أكثر ضررا مما تسببه سوسة الحبوب لقدرتها على الطيران وانتقالها من المخازن إلى الحقول والأجران وإصابتها للحبوب الموجودة به. هذه السوسة عالمية الانتشار، وقد سجل وجودها في معظم المناطق حيث تفضل الجو الحار. كذلك قمنا باختبار المستخلصات الميثانولية ضد الفوزاريوم نوع من الفطريات الخيطية يسبب مرض جرب السنابل لدى القمح والشعير، ويسبب خسائر بمليارات الدولارات كل عام. يؤدي الفطر مادة ديوكسي السامة في حبوب النباتات المصابة، مما يؤدي إلى عدم صلاحيتها للاستهلاك.

تم إجراء التحليل الكيميائي باستخدام طريقتين تعتمدان على قياس الطيف الكتلي والتحليل الطيفي، وهما أكثر الطرق نجاحا لتحديد الحالة الأيضية للكائن الحي. وهما الاستشراب السائلي عالي الأداء (UPLC) كروماتوغرافيا سائلة عالية الضغط بحيث نحصل على فصل نوعي دقيق لمكونات المستخلصات الميثانولية وأيضا تقنية الرنين المغناطيسي النووي يرمز له اختصارا NMR. وكشفت نتائجنا عن احتواء المستخلصات الثلاثة على البوليفينولات أو متعددات الفينول وهي مركبات عضوية تحمي من تأثيرات الأكسدة ومن الحشرات حيث تعمل كمضادات تأكسد للمساعدة في منع تدهور الحبوب والأغذية في المخازن.

تم تقييم نشاط مبيدات الحشرات من خلال اختبارات مختلفة، والتي أظهرت أن جميع المستخلصات الثلاثة كانت فعالة للغاية. وسجلنا أن المستخلص الأكثر ساما ضد سيتوفيلوس أوريزاي أو سوسة الرز كان مستخلص شجرة مريم حيث سجلنا وفيات الآفات بعد 24 ساعة. وكشفت نتائجنا عن إمكانات مستخلصات الميثانول النباتية للسيطرة على الآفات المشتركة في الحبوب المخزنة. وذلك عن طريق تقييم الأنشطة المضادة للفطريات باستخدام تقنية الوسط السام على وسط البطاطا ديكستروس أغار. المستخلصات الثلاثة خفضت نمو فوساريوم كولموروم وفوزاريوم غراميناروم تحت ظروف المختبر أرتيكولاتا كان له أكبر تأثير على النمو وذلك بنسبة 55.8%

RESUME

La recherche se concentre de plus en plus sur l'identification de solutions alternatives à l'utilisation de produits chimiques pour la gestion des organismes nuisibles qui s'attaquent aux denrées stockées. Dans ce contexte, nous avons testé les activités insecticides et antifongiques des extraits méthanoliques d'*Artemisia absinthium* L. (Asteraceae) et de deux espèces de Cupressaceae, en occurrence *Juniperus phoenicea* L. et *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast., collectées dans le nord de l'Algérie, à l'égard de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidea) – un insecte ravageur primaire des grains stockés - et dans le contrôle de *Fusarium* sp., agents pathogènes mycotoxigéniques. Dans un premier temps, nous avons procédé à une analyse chimique en utilisant deux méthodes basées sur la spectrométrie de masse (MS) et la spectroscopie, qui sont deux approches les plus réussies pour déterminer l'état métabolique d'un organisme. Il s'agit de l'UPLC (Chromatographie liquide ultra haute performance) et de la $^1\text{H-NMR}$ (résonance magnétique nucléaire au proton).

Le rendement d'extraction était compris entre 11 et 21%. Les données chromatographiques UPLC ont montré la présence de plusieurs acides phénoliques, des flavonoïdes glycosides et des flavonoïdes aglycones. Les composés les plus abondants dans l'extrait d'*A. absinthium* étaient des acides phénoliques, avec 41,66% d'acides dicaffeoylquiniques (0,033 et 0,032 mg / mL), suivis de 23,07% (0,036 mg / mL) d'acide 5-caféinequinique. En revanche, les flavonoïdes étaient abondamment présents dans les extraits d'espèces de Cupressaceae, enregistrant 0,037 mg / mL (45,67%) de quercétine-3-O-rhamnoside, suivi de 41,97% (0,034 mg / mL) de catéchine pour l'extrait de *J. phoenicea* et 42,76% (0,084 mg / mL) de myricétine-rhamnoside et 31,05% (0,061 mg / mL) de quercétine-3-O-rhamnoside pour celui de *T. articulata*. De plus, les spectres de $^1\text{H-NMR}$ représentatifs de chaque extrait montrent que bien que les résonances de l'espèce soient facilement apparentes, en particulier dans les régions dont les fréquences sont comprises entre 2 et 5 ppm, il existe de nombreuses autres régions du spectre où de grandes différences se produisent entre les différents extraits. En particulier, la région entre (6 et 8 ppm) qui a marqué les différences de spectre. Ainsi, les résultats analytiques révèlent la présence de composés organophosphorés, de monosaccharides, d'acides aminés, de polyamines et de polyphénols principalement dans la région (3-6 ppm).

L'activité insecticide a été évaluée par différents tests. Les résultats révèlent que les trois extraits étaient très efficaces. La mortalité du ravageur a été enregistrée après 24 h pour *A. absinthium*. Les résultats de la DL50 ont révélé que l'extrait le plus actif était celui de *A. absinthium* (15,53 mg/cm²), suivi de *J. Phoenicea* (22,14 mg/cm²) et de *T. articulata* (24,05 mg/cm²). Les activités antifongiques de ces extraits ont été évaluées à l'aide de la technique

d'empoisonnement du milieu de culture PDA. Les trois extraits ont réduit la croissance de *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum in vitro*. *T. articulata* a eu le plus grand effet inhibiteur sur la croissance mycélienne avec un pourcentage de réduction de croissance de (55,8%). Nos résultats révèlent le potentiel des extraits méthanoliques des trois plantes testées dans la gestion des organismes nuisibles aux grains stockés et méritent d'être exploités davantage.

ABSTRACT

Research is increasingly focused on identifying alternatives to the use of chemicals for the management of pests in stored grains. In this context, we tested the insecticidal and antifungal activities of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), and two Cupressaceae species, namely *Juniperus phoenicea* L. and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast., collected in the north of Algeria, against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidea)—a pest of primary infestation of stored grains—and *Fusarium* sp., mycotoxigenic fungi. Chemical analysis was carried out using two methods based on mass spectrometry (MS) and spectroscopy, which are the most successful approaches to determining the metabolic state of an organism. These are UPLC (Ultra High-Performance Liquid Chromatography) and ¹H-NMR (Proton Nuclear Magnetic Resonance).

The extraction yield was in the range of 11–21 %. UPLC chromatographic data showed the presence of several phenolic acids, flavonoid glycosides, and flavonoid aglycones. The most abundant compounds in the extract of *A. absinthium* acids were phenolic acids, with 41.66% dicaffeoylquinic acids (0.033 and 0.032 mg / mL), followed by 23.07% (0.036 mg / mL) of 5-caffeinequinic acid. In contrast, flavonoids were abundantly present in Cupressaceae species, recording 0.037 mg / mL (45.67%) of quercetin-3-O-rhamnoside followed by 41.97% (0.034 mg / mL) of catechin for *J. phoenicea* extract and 42.76% (0.084 mg / mL) of myricetin-rhamnoside and 31.05% (0.061 mg / mL) of quercetin-3-O-rhamnoside for that of *T. articulata*. Furthermore, the ¹H-NMR spectra representative of each extract show that although the resonances of the species are readily apparent, especially in regions whose frequencies are between 2 and 5 ppm, there are many other regions of the spectrum where large differences occur between the various extracts. In particular, the region between (6 and 8 ppm) which has marked differences in spectra. Thus, analytical results reveal the presence of organophosphorus compounds, monosaccharides, amino acids, polyamines and polyphenols mainly in the region (3-6 ppm).

Insecticidal activity was evaluated through different tests, which showed that all three extracts were highly effective. Pest mortality was recorded after 24 h for *A. absinthium*. The LC50 results revealed that the most toxic extract was that of *A. absinthium* (15.53 mg/ cm²), followed by that of *J. phoenicea* (22.14 mg/cm²), and *T. articulata* (24.05 mg/ cm²). The antifungal activities of these extracts were evaluated using the poisonous medium technique on Potato Dextrose Agar medium. All three extracts reduced the growth of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* under *in vitro* conditions. *T. articulata* had the greatest inhibitory effect (55.8%) on mycelial growth of the former. Our results reveal the potential of plant methanolic extracts to control pests common to stored grains.

Copie attachée de la publication

Une partie des travaux réalisée dans cette thèse a donné lieu à la publication d'un article scientifique dans une revue internationale, le Arabian Journal for Science and Engineering : Juin 2016, Volume 41, Issue 6, pp 2147–2158 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s13369-015-1977-2>)

Yasmine Dane¹, Fazia Mouhouche¹, Ramon Canela-Garayoa², Antoni Delpino-Rius², 2015. Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection. Arab J Sci Eng. DOI 10.1007/s13369-015-1977-2

Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast, 1892 (Cupressaceae) and evaluation of their biological activity for stored grain protection

Yasmine Dane¹ · Fazia Mouhouche¹ · Ramon Canela-Garayoa² · Antoni Delpino-Rius²

Received: 28 May 2015 / Accepted: 15 November 2015
© King Fahd University of Petroleum & Minerals 2015

Abstract Research is increasingly focused on identifying alternatives to the use of chemicals for the management of pests in stored grains. In this context, we tested the insecticidal and antifungal activities of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), and two Cupressaceae species, namely *Juniperus phoenicea* L. and *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast., collected in the north of Algeria, against *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera, Curculionidea)—a pest of primary infestation of stored grains—and *Fusarium* sp., mycotoxigenic fungi. The extracts were analyzed by UPLC-PDA-MS. The extraction yield was in the range of 11–21%. UPLC chromatographic data showed the presence of several phenolic acids, flavonoid glycosides, and flavonoid aglycones. Insecticidal activity was evaluated by means of contact toxicity test, which showed that all three extracts were highly effective. Pest mortality was recorded after 24 h for *A. absinthium*. The LC₅₀ results revealed that the most toxic extract was that of *A. absinthium* (15.53 mg/cm²), followed by that of *J. phoenicea* (22.14 mg/cm²), and *T. articulata* (24.05 mg/cm²). The antifungal activities of these extracts were evaluated using the poisonous medium technique on potato dextrose agar medium. All three extracts reduced the growth of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* under in vitro conditions. *T. articulata* had the greatest inhibitory

effect (55.8%) on mycelial growth of the former. Our results reveal the potential of plant methanolic extracts to control pests common to stored grains.

Keywords *Sitophilus oryzae* · *Fusarium* sp · UPLC · Insecticidal · Antifungal

Abbreviations

A.	<i>Artemisia</i>
J.	<i>Juniperus</i>
T.	<i>Tetraclinis</i>
S.	<i>Sitophilus</i>
F.	<i>Fusarium</i>
FC	<i>Fusarium culmorum</i>
FG	<i>Fusarium graminearum</i>
ENSA	Ecole Nationale Supérieure Agronomique
UPLC	Ultra-performance liquid chromatography
UPLC-PDA-MS	Ultra-performance liquid chromatographic photodiode array detector mass spectrometry
m/z	Mass-to-charge ratio
R _t	Retention time
R ²	Coefficient of determination
MGI	Mycelial growth inhibition
Av	Average

✉ Yasmine Dane
y.dane@st.ensa.dz; dpgr@ensa.dz

¹ Laboratoire de phytopharmacie, Département de Zoologie Agricole et Forestière, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Avenue Hassan Badi, El Harrach, Algiers, Algeria

² Department of Chemistry, ETSEA, University of Lleida-Agrotecnio Center, Av. Alcalde Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain

1 Introduction

In most countries, grains are staple food sources [1,2]. Variable qualitative and quantitative damage may occur during the storage of these products. Indeed, the estimated global post-harvest losses caused by insect damage, microbial dete-

rioration, and other factors are in the order of 10–25% [3,4]. Damage caused by insects alone may amount to between 10 and 40% in developing countries, where modern storage technologies are not used [5,6]. The insects most frequently causing damage include Coleoptera belonging to Curculionidae (*Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*), Tenebrionidae (*Tribolium* sp.), Dermestidae (*Trogoderma granarium*), and Bostrichidae (*Rhyzopertha dominica*) [7].

Found worldwide and causing high economic losses, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) is one of the pests of primary infestation of stored grains [2,8,9]. This insect causes significant losses, especially cereals, and facilitates favorable conditions for the growth and appearance of microorganisms and toxigenic fungi [2,10,11]. Females oviposit an average of four eggs per day directly into seeds. This is achieved through a hole—produced by a mucilaginous secretion of the oviduct—punched through the rostrum. Eggs may survive for 4–5 months, and they hatch in about 3 days. The larva develops inside the seed for about 18 days and pupates over 6 days. The new adult will remain in the seed for 3 or 4 days while it hardens and matures. The optimum population growth occurs at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ and $70 \pm 5\%$ relative humidity (RH). This insect can generate a large population in a short time because it is characterized by a short developmental period, which may take only 26–32 days in adequate conditions. *S. oryzae* feeds voraciously so much so that the grain is rendered unfit for human consumption [12,13]. Indeed, larvae consume 10 mg grain/day during development, while adults consume 0.49 mg/day [7,14].

Storage fungi usually accompany or follow insect infestation [3]. They cause significant spoilage of foodstuffs, rendering them unfit for human consumption by decreasing their nutritional value and sometimes by producing mycotoxins [15,16]. The main mycotoxigenic molds in partially dried grain are *Penicillium verrucosum* (ochratoxin) in the damp cool climates of Northern Europe and *Aspergillus flavus* (aflatoxins), *A. ochraceus* (ochratoxin) and some *Fusarium* species (fumonisins, zearalenone (ZEA or ZON), trichothecenes (deoxynivalenol (DON), nivalenol and T-2 toxin)) in temperate and tropical cereals [17,18]. Among the mycotoxins produced by *Fusarium* spp., fumonisins (FUMs), classified as group 2B human carcinogens by the International Agency for Research on Cancer (IARC), are common in maize and derivatives of this crop, while deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) are common contaminants of wheat [16,19,20]. Interactions between spoilage, mycotoxigenic fungi, and insect pests inevitably occur in stored grain ecosystems, thus further influencing contamination by mycotoxins. Insects carry fungus spores, as well as other contaminants. While the insects are feeding on the grain, these spores can cause a rise in the humidity of the product great enough to enable the development of

latent fungi [21]. Also, these spores may be involved in the dominance of mycotoxigenic species by facilitating dispersal and acting as vectors and carriers of the toxin through grain [17,22].

Strategies to eliminate stored pests are based mainly on the use of chemicals. However, these compounds have various limitations, including the development of resistance in pest species and food contamination with residues and/or possible environmental hazards [23]. Therefore, research has increasingly been focused on identifying alternative approaches to manage grain storage pests [24].

In this context, plants are receiving much attention due to their toxic and biological effects on some pests. Several families of plants are used in this context, among these Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiateae, Piperaceae, Verbenaceae, Annonaceae, and Cupressaceae [2,25]. Furthermore, with the improved speed of liquid chromatography (UPLC—ultra-performance liquid chromatography), the analysis of many plant extracts can be achieved in less than 5 min [26]. In this regard, various types of plant preparations, such as powders, solvent extracts, essential oils, bioactive molecules (polyphenols), and whole plants, are being studied. The capacity of these products to protect stored products has been extensively tested in laboratory and field trials [27,28]. Botanical pesticides are generally pest-specific and are relatively harmless to nontarget organisms, including man. They are also biodegradable and do not pose a hazard for the environment. Natural products generally inhibit the development and behavior of insects. In addition, they cause early molting and alter regulatory hormones, thus leading to insect malformations, sterility, or death [29].

In the Mediterranean region and North Africa, *Artemisia absinthium* L. (Asteraceae), commonly known as wormwood, a phoenician juniper *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* (Vahl), which belong to the Cupressaceae family, are traditionally used as alternative medicines due to their biological activities [30–33]. Previous studies have been performed to evaluate the antioxidant activities of the essential oils of these plants. However, to the best of our knowledge, few studies have addressed the use of the methanolic extracts of these plants to protect stored grain.

To pave the way for further research and for the development of effective biopesticides, here we focused on the phytochemical analysis of the polyphenolic compounds present in methanolic extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). In this regard, we determined the antifungal and insecticidal activities of these extracts against some mycotoxigenic fungi (*F. culmorum* and *F. graminearum*) and the coleopteran *S. oryzae*, both pests that cause substantial damage to stored grain.

2 Materials and Methods

2.1 Plant Material

The aerial parts (stem and leaves) of *Artemisia absinthium*, *Juniperus phoenicea*, and *Tetraclinis articulata* were collected during spring (2013) at floral stage of the plant, in the region of Boumerdes, 50 km east of Algiers (Algeria) (36°43'53.9"N 3°29'52.0"E), Tipaza 35 km west of Algiers (36°41'12.3"N 2°47'06.6"E), and the Botanical Garden of ENSA in Algiers (36°43'15.3"N 3°09'02.4"E), respectively. Plant samples were dried naturally on laboratory benches at room temperature (24–25 °C) for 1 month. The dried plant materials were ground to a homogenous powder using a blender.

2.2 Preparation of Plant Methanolic Extracts

The plant materials were milled, and 12.5 g of each powder was shaken separately for 48 h in 125 mL of methanol (CHROMASOLV[®], for HPLC, ≥ 99.9 %) on a Gallenkamp Environmental Shaker (Model 10X400) at 150 rpm at room temperature (25 °C). Extracts were passed through 0.20- μ m PTFE filters using a funnel. Each filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure at 40 °C using a Rotavapor[®] (Buchi[®] R-215). Each extract was resuspended in acetone to make a stock solution [34]. The extracts were kept at 4 °C and subjected to qualitative and quantitative UPLC analysis.

2.3 UPLC-PDA-MS Analysis

The polyphenol content of the extracts was studied by UPLC analysis using a water ACQUITY UPLCTM system (Waters, Milford, MA, USA) consisting of an AQUITY UPLCTM binary solvent manager and ACQUITY UPLCTM sample manager, coupled to a photodiode array detector ACQUITY UPLCTM PDA and to a Waters ACQUITY TQD Tandem Quadrupole Mass Spectrometer (Waters, UK). Compounds were separated with an AQUITY UPLCTM HSS T3 column (1.8 μ m, 2.1 mm \times 150 mm) (Waters, Manchester, UK) using a mobile phase consisting of solvent A, H₂O (0.1 % v/v HAcO), and solvent B, ACN 100 % (0.1 % v/v HAcO). The flow rate was 0.550 mL/min. The linear gradient was as follows: 0–1.89 min, 1 % B, (isocratic); 1.89–17.84 min, 30 % B, (linear gradient); 17.84–21.39 min, 5 % B (linear gradient); 21.39–21.56 min 1 % B (linear gradient); and 21.56–25 min, 1 % B (isocratic). Weak and strong needle solvents were H₂O (0.1 % v/v HAcO) and MeOH, respectively. The injection volume was 20 μ L in mode full loop, and the column was kept at 45 °C while the temperature in the sample manager was maintained at 10 °C. MS was operated using an electro-

spray source (ESI) in positive and negative ion mode. The following ESI parameters were used: capillary voltage of 3.5 and –2.5 kV in positive and negative mode, respectively; maintenance of the source at 150 °C; desolvation temperature of 500 °C; cone gas (nitrogen) flow 50 L/h; and desolvation gas flow 800 L/h.

Polyphenols were identified on the basis of the comparison of retention times and the UV and MS spectra of unknown peaks with those of reference standards. MS conditions of standard compounds with same aglycone were applied to identify compounds for which standards are not available. Data acquisition was performed using Mass Lynx 4.1 software (Waters, USA).

Commercially available standards of epigallocatechin gallate, myricitrin, penta-*O*-galloyl-B-D-glucose, and luteolin-7-*O*-glucoside were used for identification purposes.

2.4 Insects and Rearing Conditions

Two hundred grams of untreated bread wheat (variety Anza, obtained from the ITGC of Oued Smar, Algiers, Algeria, and harvested during 2012/2013) was placed in various cylindrical glass jars (10.5 cm height \times 11 cm diameter). We then introduced 100 adults of *S. oryzae* of mixed sex, obtained from the Entomology Laboratory (Zoology Department, ENSA, Algiers, Algeria), into each jar. All jars were covered with plastic tape (with some holes punched for air circulation) to prevent insects from escaping and were then placed in incubators at 28 \pm 2 °C, 70 \pm 5 % RH in the dark. The insects used for the bioassay were 10-day-old adults. The strain of *S. oryzae* has been raised continuously in the crop protection laboratory since 2013.

2.5 Origin of Pathogenic Fungi

Fungal strains of the genus *Fusarium* (isolate FC.06.11 and FC.04.12 of *F. culmorum* and isolate FG.02.12 of *F. graminearum*) were obtained from the Mycology Laboratory (Botany Department, ENSA, Algiers, Algeria). Strains were isolated from infected wheat and identified morphologically and microscopically following standard procedures. A mycelial colony of each pure fungi culture was subcultured on potato dextrose agar (PDA), and cultures were incubated for 7 days at 22 °C under continuous light in the laboratory.

2.6 Insecticidal Effect of Plant Extracts

The insecticidal effect of the extracts against *S. oryzae* was evaluated by means of contact toxicity. For this purpose, we used an impregnated paper assay, following the method described by Stefanazzi et al. [35] with some modifications. Based on preliminary results, a range of doses (15, 30, and



60 mg/cm²) were formulated and applied to Whatman N°1 filter papers (9 cm diameter). The solvent (acetone, Biochem Chemopharma, Analytical Reagent Grade) was air-dried for 15 min. Each filter paper was then placed inside a glass Petri dish with 20 insects (10 days old). The dishes were kept in optimal laboratory conditions (28 ± 2 °C, 70 ± 5 % RH and in darkness). The control was treated with solvent only, and three repetitions were performed for each treatment. The dishes were inspected regularly for a couple of weeks. *A. absinthium* mortality was recorded after 24 h, and the LC50 and LC90 (lethal concentration) values were calculated by Probit analysis using Finney's table.

2.7 Antifungal Activity of Plant Extracts on the Mycelial Growth of Test Fungi

The antifungal activity of the extracts was tested in the laboratory using the poisonous medium technique on PDA medium, as described by Mishra and Dubey [36] and reported by Adjou and Soumanou [37] with some modifications. The test was performed in sterile Petri dishes (90 mm diameter) containing 20 mL of PDA. A volume of 2 mL of each plant extract with a concentration of 60 mg/mL was deposited in the PDA culture medium, which was maintained molten at a temperature of 40–45 °C, using a micropipette. After flow and solidification of the mixture (culture medium and plant extracts), a mycelial disk of 6 mm in diameter taken from the 7-day-old culture of the test fungal strains was inoculated in the center of the Petri dishes. Plates containing nonpoisoned medium served as controls. These dishes were incubated at 25 °C in the dark, corresponding to the optimum growth conditions of *F. culmorum* and *F. graminearum*. Fungal colony surface area for all treatments was recorded after 7 days of incubation. The mean growth value was obtained and converted into the percentage of mycelial growth inhibition (MGI) in relation to the control treatment using the following formula:

$$\text{MGI \%} = (\text{dc} - \text{dt}/\text{dc}) \times 100$$

where dc and dt represent mycelial growth diameter (cm) in control and treated Petri dishes, respectively.

2.8 Data Analysis

Statistical analysis was conducted on Excel, Minitab® Release 14.1 (statistical software© 1972–2003 MinitabInc. All rights reserved Win 1410 ea. 30). Differences among treatments were detected by analysis of the variances, and *P* values <0.05 were regarded as significant.

3 Results

3.1 Yields of Plant Extracts

Table 1 shows the yields of crude extracts obtained from aerial parts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* using methanol. The extraction yield was in the range of 11–21 %, the highest yield being obtained for *J. phoenicea*.

3.2 UPLC-PDA-MS Analysis

A sensitive, accurate, and specific method coupling UPLC to photodiode array detection (PDA) and electrospray ionization mass spectrometry (MS) was developed for the analysis of polyphenols in extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata*. Phenolic compounds were identified on the basis of their retention time, absorbance spectra, and MS fragmentation and, when possible, by cochromatography with an authentic standard. Figures 1, 2, and 3 show the UPLC chromatograms for the extracts of each plant. Table 2 summarizes, in order of retention time, the seven phenolic compounds identified for *A. absinthium*, four for *J. phoenicea*, and seven for *T. articulata*. For *A. absinthium*, we identified the following phenolic acids: chlorogenic acid (3-caffeoylquinic acid); neochlorogenic acid (5-caffeoylquinic acid); 4-caffeoylquinic acid (crypto-chlorogenic acid); and cynarine (dicaffeoylquinic acid). Regarding flavonoid glycosides, *A. absinthium* extracts contained veronicastroside (luteolin rutinoside) and glucosyl–arabinosyl–luteolin, while myricetin-hexose, myricitrin (myricetin-rhamnoside), and quercitrin (quercetin-3-*O*-rhamnoside) were found in those of *J. phoenicea* and *T. articulata*. Isoquercetin (quercetin-3-*O*-glucoside) was identified only in extracts of *T. articulata*. As regards flavonoid aglycones, catechin was found in extracts of *J. phoenicea* and *T. articulata*. The flavanols kaempferol-hexose and kaempferol-deoxyhexose were detected only in extracts of *T. articulata*.

The peak eluting at $t_R = 6.40$ min showed a maximum UV absorption at 324 nm and a shoulder at 290 nm with a molecular ion at m/z 355, corresponding to chlorogenic acid. Catechin was detected at $t_R = 8.18$ min in *J. phoenicea* and *T. articulata* extracts. The mass spectrum of this compound showed a maximum UV absorption at 280 nm and a molecular ion at m/z 291. A further metabolite eluting at

Table 1 Yields of methanolic extracts from *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata*

Methanolic extracts	Extraction yield %
<i>A. absinthium</i>	11.59
<i>J. phoenicea</i>	20.98
<i>T. articulata</i>	17.64



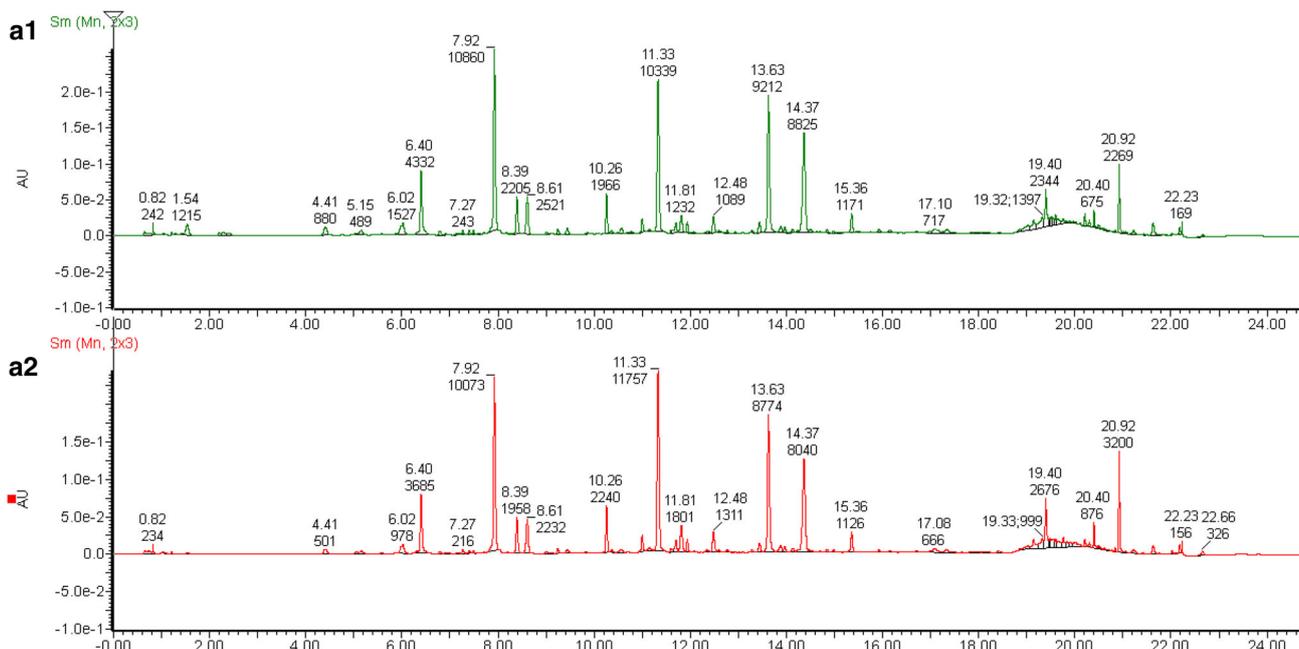


Fig. 1 Typical UPLC-PAD chromatograms of methanolic extract of *Artemisia absinthium*: **a1** recorded at $\lambda = 320$ nm and **a2** at $\lambda = 335$ nm

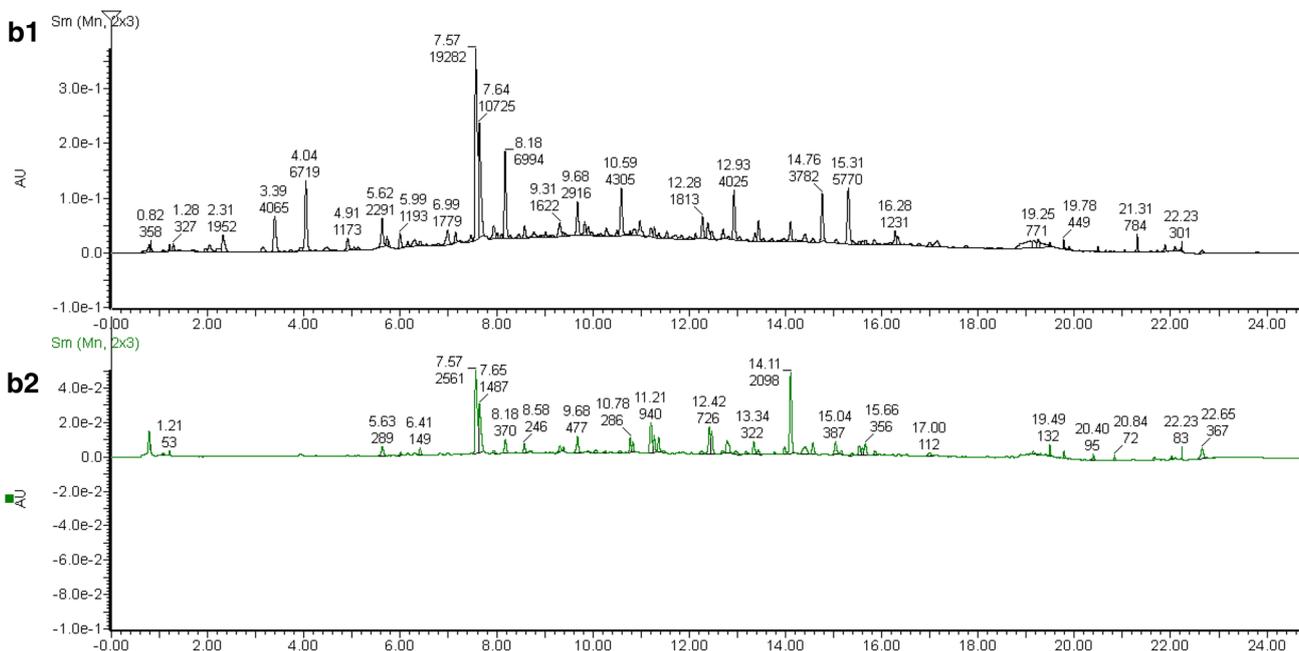


Fig. 2 Typical UPLC-PAD chromatograms of methanolic extract of *Juniperus phoenicea*: **b1** recorded at $\lambda = 280$ nm and **b2** at $\lambda = 350$ nm

$t_R = 7.92$ min showed fragment ions at m/z 481 and 319 and λ max at 324 nm and a shoulder at 290 nm, suggestive of 5-caffeoylquinic acid. At $t_R = 8.39$ min, a compound with fragment ions at m/z 465 and 319 and the UV spectrum with λ max at 320 nm and shoulder at 290 nm was attributed to 4-caffeoylquinic acid. The structure of luteolin rutinoside was suggested for the compound with a molec-

ular ion at m/z 595 and a peak eluting at $t_R = 10.26$ min which showed maximum absorbance at 270 and 335 nm. The peak eluting at $t_R = 11.33$ min showed UV absorption maxima at 270 and 335 nm, and a molecular ion at m/z 565 pointed to glucosyl-arabinosyl-luteolin. The abundant compound in *A. absinthium* was dicaffeoylquinic acids, which eluted at 13.63 and 14.37 min, which showed UV

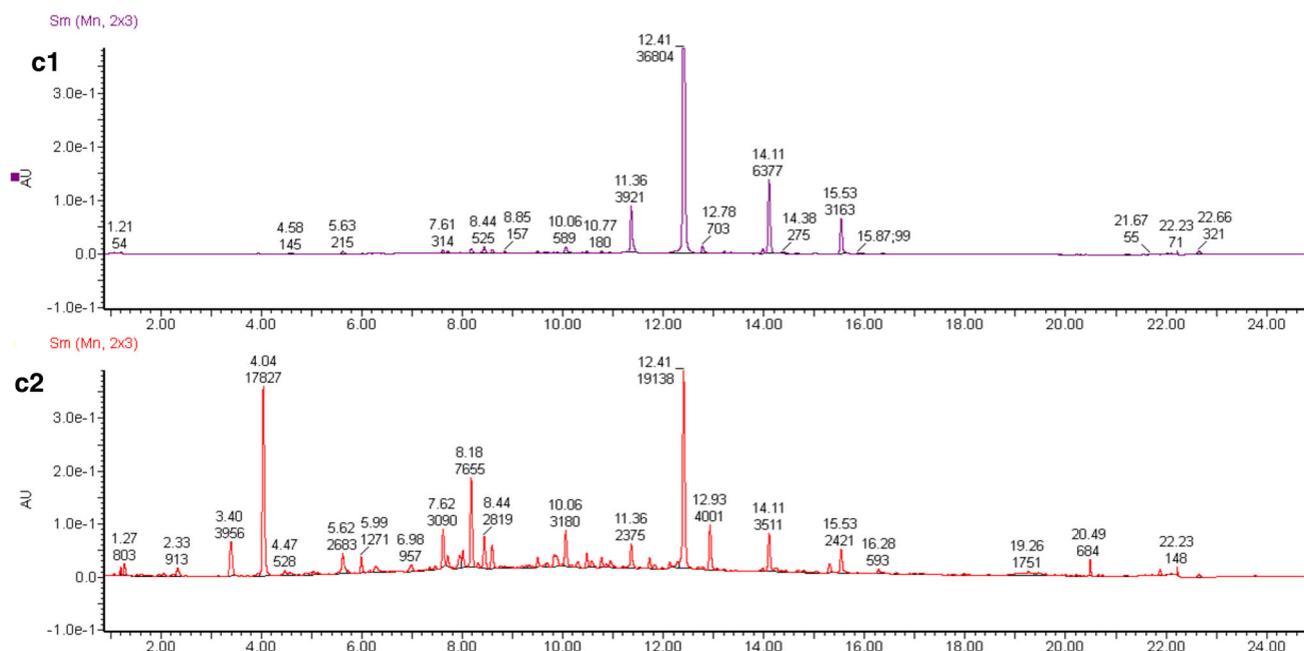


Fig. 3 Typical UPLC-PAD chromatograms of methanolic extract of *Tetraclinis articulata* recorded at **c1** $\lambda = 350$ nm and **c2** at $\lambda = 280$ nm

absorbance at 324 nm, a shoulder at 290 nm, and a molecular ion at m/z 517. Regarding UPLC spectra for *J. phoenicea* and *T. articulata* extracts, a peak eluting at $t_R = 11.36$ min showed absorbance at 257 and 356 nm, with an ions at m/z 481 and 319, which suggested myricetin-hexose. The structure of myricetin-rhamnoside was attributed to the compound that eluted at 12.41 min, which showed molecular ions at m/z 365 and 319. In addition, the compound eluting at 14.11 min was assumed to be quercetin-3-*O*-rhamnoside, with a molecular ion at m/z 449 and 313, and λ max at 255 and 254 nm. On the basis of the characteristic fragment at m/z 465 and 303 and λ max at 255 and 355 nm, quercetin-3-*O*-glucoside was identified at $t_R = 12.78$ min for the *T. articulata* extract. The UV data and the MS analysis of the peak eluting at 13.98 min with a molecular ion at m/z 449 and 287 and maximal absorbance at 264 and 348 nm corresponded to kaempferol-hexose. Furthermore, at 15.53 min, a compound with a molecular ion at m/z 433 and 287 and λ max at 264 and 348 nm was assumed to be kaempferol-deoxyhexose.

The most abundant bioactive compounds in *A. absinthium* extract were phenolic acids, with 41.66% of dicaffeoylquinic acids (0.033 and 0.032 mg/mL), followed by 23.07% (0.036 mg/mL) of 5-caffeoylquinic acid. In contrast, flavonoids were present in abundance for extracts of the Cupressaceae species, registering 0.037 mg/mL (45.67%) of quercetin-3-*O*-rhamnoside, followed by 41.97% (0.034 mg/mL) of catechin for the *J. phoenicea* extract and 43.65% (0.084 mg/mL) of myricetin-rhamnoside and 31.70% (0.061 mg/mL) of quercetin-3-*O*-rhamnoside for that of *T. articulata* (Tables 2, 3).

3.3 Insecticidal Activity

The extract of *A. absinthium* was highly toxic for *S. oryzae*, causing 100% mortality in 24 h at a dose of 60 mg/cm². In contrast, at the same dose and exposure time, the extracts of *J. phoenicea* and *T. articulata* caused a 95 and 95.65% mortality rate, respectively. No mortality was observed in 24 h for any of the extracts at a dose of 30 or 15 mg/cm². Furthermore, we found that the mortality caused by each treatment increased with increasing length of exposure. *A. absinthium* caused 85.16 and 53.66% mortality at a dose of 30 and 15 mg/cm², respectively, after 8 days of exposure. In addition, the *J. phoenicea* extract led to 61.11 and 37% mortality and the *T. articulata* extract 42.55 and 16.66% mortality, respectively, at the same doses and exposure time. Figures 4, 5, and 6 show the comparative mortality of the rice weevil at the three doses tested. The toxicological potential of the extracts, expressed as LC₅₀ and LC₉₀ values, is summarized in Table 4.

3.4 Antifungal Activity

The in vitro antifungal activity of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* extracts against *F. culmorum* and *F. graminearum* was assessed by measuring mycelial growth diameters using the poisonous medium technique on PDA. The extracts caused a significant reduction in the growth of these fungal strains. *T. articulata* extract was the most effective against the fungi, while *A. absinthium* and *J. phoenicea* extracts showed moderate toxicity. Percentages of mycelial growth inhibition

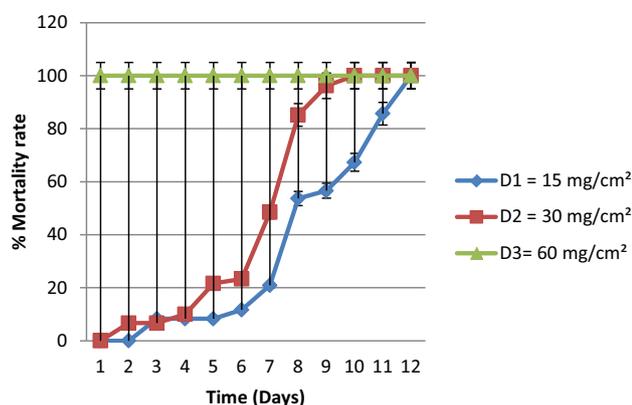
Table 2 Polyphenolic compounds identified from methanolic extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata*

Compounds	t_R (min)	Fragments M+H (m/z)	Mw	Max	Area [λ (nm)]	Regression equation	Concentration mmol/L	Mass concentration (mg/mL)
<i>Artemisia absinthium</i> extract								
3-Caffeoylquinic acid	6.4	355	354	290sh, 324	4332 (320)	$y = 146,546.50x - 276.78$	0.031	0.010
5-Caffeoylquinic acid	7.92	481, 319	480	290sh, 324	10860 (320)	$y = 146,546.50x - 276.78$	0.075	0.036
4-Caffeoylquinic acid	8.39	465, 319	464	290sh, 324	2205 (320)	$y = 146,546.50x - 276.78$	0.016	0.007
Luteolin rutinoside	10.26	595	594	270, 335	2240 (335)	$y = 204,288.51x - 108.55$	0.011	0.006
Glucosyl-arabinosyl-luteolin	11.33	565	564	270, 335	11,757 (335)	$y = 204,288.51x - 108.55$	0.058	0.032
Dicafeoylquinic acid ^a	13.63	517	516	290sh, 324	9212 (320)	$y = 146,546.50x - 276.78$	0.064	0.033
Dicafeoylquinic acid ^a	14.37	517	516	290sh, 324	8825 (320)	$y = 146,546.50x - 276.78$	0.062	0.032
<i>Juniperus phoenicea</i> extract								
Catechin	8.18	291	290	279	6994 (280)	$y = 59,833.09x - 103.04$	0.118	0.034
Myricetin-hexose	11.36	481, 319	480	257, 356	322 (350)	$y = 202,663.56x - 80.6$	0.019	0.009
Myricetin-rhamnoside	12.41	465, 319	464	257, 356	726 (350)	$y = 202,663.56x - 80.6$	0.003	0.001
Quercetin-3-O-rhamnoside	14.11	449, 303	448	255, 354	2098 (350)	$y = 267,957.85x - 283.87$	0.008	0.037
<i>Tetraclinis articulata</i> extract								
Catechin	8.18	291	290	279	7655 (280)	$y = 59,833.09x - 103.04$	0.129	0.037
Myricetin-hexose	11.36	481, 319	480	257 356	3921 (350)	$y = 202,663.56x - 80.6$	0.019	0.009
Myricetin-rhamnoside	12.41	465, 319	464	257, 356	36,804 (350)	$y = 202,663.56x - 80.6$	0.181	0.084
Quercetin-3-O-glucoside	12.78	465, 303	464	255, 354	703 (350)	$y = 240,672.95x - 204.93$	0.003	0.001
Kaempferol-hexose	13.98	449, 287	448	264, 348	397 (350)	$y = 316,415.04x - 133.51$	0.001	0.0004
Quercetin-3-O-rhamnoside	14.11	449, 303	448	255, 354	36,804 (350)	$y = 267,957.85x - 283.87$	0.138	0.061
Kaempferol-deoxyhexose	15.53	433, 287	432	264, 348	3163 (350)	$y = 316,415.04x - 133.51$	0.010	0.004

t_R , retention time; Mw, molecular weight; λ , detection wavelength; $y = ax + b$, where x is the concentration in mmol/L, and y is area under curve at the selected wavelength
^a Isomer configuration do not identified

Table 3 Percentage of phenolic compounds identified

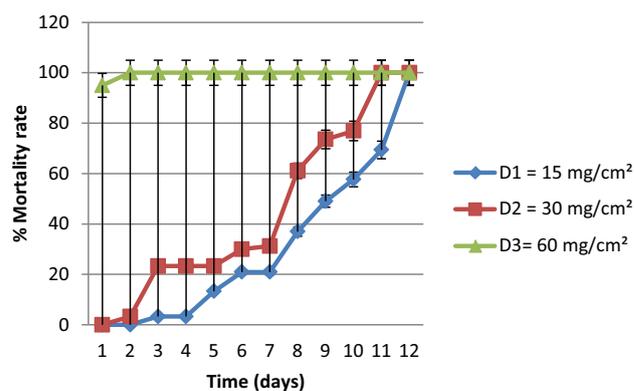
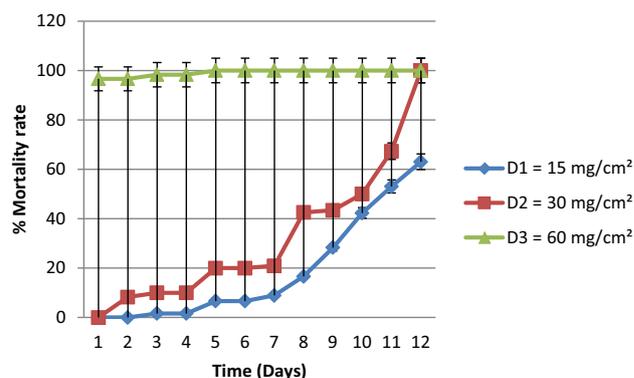
Plant extracts	Phenolic compounds	%
<i>Artemisia absinthium</i>	3-Caffeoylquinic	6.4
	5-Caffeoylquinic	23.07
	4-Caffeoylquinic	4.48
	Luteolin rutinoides	3.84
	Glucosyl-arabinosyl-luteolin	20.51
	Dicaffeoylquinic acid	21.15
	Dicaffeoylquinic acid	20.51
<i>Juniperus phoenicea</i>	Catechin	41.97
	Myricetin-hexose	11.11
	Myricetin-rhamnoside	1.23
	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside	45.67
<i>Tetraclinis articulata</i>	Catechin	18.83
	Myricetin-hexose	4.58
	Myricetin-rhamnoside	42.76
	Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside	0.5
	Kaempferol-hexose	0.20
	Quercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside	31.05
	Kaempferol-deoxyhexose	2.03

**Fig. 4** Effect of *A. absinthium* extract on adult mortality of *S. oryzae*

(MGI %) for each plant extract and for each *Fusarium* strain are shown in Table 5. Statistical analysis of the data shows significant differences between the mycelial growth values for the extracts of the three plants tested.

4 Discussion

With the increasing resistance of storage grain pests to chemicals, alternative natural products derived from plants could have great potential. Numerous plant extracts and phytochemicals show biological properties, which could be highly relevant for pest management. Several studies have attempted to correlate the biological activity of plants with the presence

**Fig. 5** Effect of *J. phoenicea* extract on adult mortality of *S. oryzae***Fig. 6** Effect of *T. articulata* extract on adult mortality of *S. oryzae***Table 4** LC50 and LC90 values of methanolic extracts after 8 days

Methanolic extracts	R^2	LC50 (mg/mL)	LC90 (mg/mL)
<i>A. absinthium</i>	0.95	15.53	28.14
<i>J. phoenicea</i>	0.93	22.14	34.85
<i>T. articulata</i>	0.88	24.05	37.23

of phenolic compounds [38,39]. In this context, here we studied the methanolic extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* by UPLC and tested their insecticidal and antifungal activity against some pests common to stored grain.

Of note, our results reveal a difference between extraction yields for the three plant species tested. This difference could be attributed to the different availability of extractable compounds resulting from the varied chemical composition of the plants [40]. Thus, several studies point out that the percentage of extraction yield is dependent mainly on the extraction procedure, particularly the temperature used for the extraction, the polarity of the extracted compounds, and the ratio of solvent and sample extraction [41,42].

UPLC chromatographic data showed the presence of the following: phenolic acids, chlorogenic acid, caffeic acid,

Table 5 Effect of methanolic extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* on the mycelial growth of three fungal strains

Fungal strain	Methanolic extract	Av. of growth (cm)	MGI%
FC.04.12: <i>Fusarium culmorum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	3.8 ± 0.2 a	55.8
	<i>Artemisia absinthium</i>	5.56 ± 0.40 b	35.26
	<i>Juniperus phoenicea</i>	5.86 ± 0.30 b	31.77
	Control	8.6 c	–
Different letters indicate significant differences ($p < 0.0001$) between treatments according to ANOVA			
FC.06.11: <i>Fusarium culmorum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	4.8 ± 0.36 a	44.18
	<i>Artemisia absinthium</i>	6.63 ± 0.15 b	22.86
	<i>Juniperus phoenicea</i>	6.83 ± 0.20 b	20.53
	Control	8.6 c	–
Different letters indicate significant differences ($p < 0.0001$) between treatments according to ANOVA			
FG.02.12: <i>Fusarium graminearum</i>	<i>Tetraclinis articulata</i>	5.13 ± 0.85 a	40.3
	<i>Artemisia absinthium</i>	7.73 ± 0.50 b	10.07
	<i>Juniperus phoenicea</i>	8.06 ± 0.05 b	6.19
	Control	8.6 b	–
Different letters indicate significant differences ($p < 0.001$) between treatments according to ANOVA			

and cynarine; flavonoid glycosides, myricetin-rhamnoside, quercetin-3-*O*-rhamnoside, quercetin-3-*O*-glucoside, veronicastroside, and glucosyl–arabinosyl–luteolin; flavonoid aglycones, catechin; and flavonols, kaempferol-hexose, and kaempferol-deoxyhexose. The phenolic compounds in *J. phoenicea* and *T. articulata* extracts were qualitatively similar, but the latter were richer. Several factors may affect the content of active principles in plant material during sampling, processing, and storage. Previous studies reported that the presence of phenolic compounds (mainly flavonoids) in leaves is correlated with the period of highest light intensity [43] or with water stress [38,44].

Many researchers have reported on the effectiveness of plant extracts against insects, especially those infesting stored products. Extracts from both the leaves and stems of *Mallotus repandus* have larvicidal and insecticidal activity against *Culex quinquefasciatus* and *S. oryzae* [11]. The powders and oils of *Syzygium aromaticum* and *Anacardium occidentale* cause considerable mortality to *S. oryzae* adults [45]. In addition, the combination of silica gel with essential oils of *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* effectively protects wheat against *S. oryzae* [23].

In the present study, we have shown that the three plant extracts tested, especially *A. absinthium*, showed potent toxicity for *S. oryzae* adults. Similar results on the insecticidal effect of *Artemisia* sp., *Juniperus* sp., and *T. articulata* extracts have been reported. In this regard, the essential oil of *A. judaica* showed effective toxicity against *Callosobruchus maculatus* using a range of tests (fumigation, repellency, surface film, egg hatch, and adult emergence) [46]. Moreover, fumigant toxicity of essential oils of *A. annua* against *S. oryzae* [47] and of *A. capillaris* and *A. mongolica* against *S. zeamais* [48] has been reported. Similarly for *J. phoenicea*,

which its essential oil exhibits relevant antifeedant activity against *Tribolium confusum* [49]. Insecticidal activity was also observed for the aqueous extract of *T. articulata* wood, which decreased the longevity of the larvae of four types of mosquito: *Culex pipiens*, *Aedes caspius*, *Culiseta longiareolata*, and *Anopheles maculipennis* [50]. This activity may be related to the presence of flavonoids, which are being tested for repellent or deterrent effects against insects and have been shown to modulate their feeding behavior [51]. Similarly, the development of cultivars of groundnut that produce concentrations of quercetin glycosides and phenylpropanoids, compounds that are deterrents of *Spodoptera litura* larvae, has been proposed [52]. Furthermore, the capacity of the flavones luteolin and isoflavone genistein to disrupt pea aphid feeding behavior has been demonstrated [53]. Additionally, given that we found phenolic acids only in the extracts of *A. absinthium*, it can be assumed that these compounds further enhance the insecticidal activity of the extract of this plant against *S. oryzae*. Also, our results indicate that the insecticidal effect of the extracts increased as exposure lengthened. The same observation has been made for the insecticidal activity of various medicinal plants against *T. castaneum* [54].

Likewise, the present study underlines the effect of extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* on the mycelial growth of *F. culmorum* and *F. graminearum*. Similar observations have been made for essential oils of wormwood against *F. graminearum*, *F. culmorum*, and *F. oxysporum* [55]. Furthermore, the effectiveness of essential oils of *J. phoenicea* ssp. *lycia* against some fungi species (*Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana*, and *Coriolus versicolor*) has been described [56]. The antifungal activity of *T. articulata* has also been shown



against *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger*, and *Trametes pini* [57] and against *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *A. flavus*, and *A. niger* [58]. As for insecticidal activity, antifungal activity may be attributable to the presence of phenolic compounds. Therefore, on the basis of our results, we propose that further studies address the isolation of phenolic compounds from these plants and their mode of action.

5 Conclusion

Plant extracts are emerging as a potential source to control the pests of stored products. The methanolic extracts of *A. absinthium*, *J. phoenicea*, and *T. articulata* show promising insecticidal and antifungal activities. Further research should be conducted to isolate the biocompounds involved in this activity and to determine their mode of action in order to facilitate the development of formulations of new biopesticides for the control of rice weevil and *Fusarium* sp.

Acknowledgments This study was funded by the Ministry of High Education and Scientific Research, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Ph D program, Algeria. The first author acknowledges the Department of Chemistry, University of Lleida, Spain, for providing doctoral research collaboration. Thanks also go to the head and laboratory technical staff of Botany Department, ENSA Algiers, Algeria, for providing laboratory facilities.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Proctor, D.L.: Grain storage techniques: evolution and trends in developing countries. *FAO Agric. Serv. Bull.* **109**, 272 (1994). <http://www.fao.org/docrep/T1838E/T1838E00.htm>
- Akhtar, M.; Arshad, M.; Raza, A.B.M.; Chaudhary, M.I.; Iram, N.; Akhtar, N.; Mahmood, T.: Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil, *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Agric. Appl. Sci.* **5**(1), 69–73 (2013)
- Dunkel, F.V.: The relationship of insects to the deterioration of stored grain by fungi. *Int. J. Food Microbiol.* **7**, 227–244 (1988)
- Raja, N.; Albert, S.; Ignacimuthu, S.; Dorn, S.: Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *J. Stored Prod. Res.* **37**(2), 127–132 (2001)
- Rani, P.R.; Chelladurai, V.; Jayas, D.S.; White, N.D.G.; Kavitha-Abirami, C.V.: Storage studies on pinto beans under different moisture contents and temperature regimes. *J. Stored Prod. Res.* **52**, 78–85 (2013). doi:10.1016/j.jspr.2012.11.003
- Ileke, K.D.; Ogunbite, O.C.: Entomocidal activity of powders and extracts of four medicinal plants against *Sitophilus oryzae* (L.), *Oryzaephilus mercator* (Faur) and *Ryzopertha dominica* (Fabr.). *Jordan J. Biol. Sci.* **7**(1), 57–62 (2014)
- Kouassi, B.: Influence de quelques facteurs extérieurs sur le cycle de développement et la survie de *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera-Curculionidae). Thèse doc. Univ. National de Cote d'Ivoire. 105 p. (1991)
- Benzi, V.; Stefanazzi, N.; Ferrero, A.A.: Biological activity of essential oils from leaves and fruits of pepper tree (*Schinus molle* L.) to control rice weevil (*Sitophilus oryzae* L.). *Chil. J. Agric. Res.* **69**(2), 154–159 (2009). doi:10.4067/S0718-58392009000200004
- Narayana Swamy, K.C.; Mutthuraju, G.P.; Jagadeesh, E.; Thirumalaraju, V.: Biology of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored maize grains. *Curr. Biotica* **8**(1), 76–81 (2014)
- Batta, Y.A.: Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. *Crop Prot.* **23**, 103–108 (2004). doi:10.1016/j.cropro.2003.07.001
- Hasan, M.R.; Uddin, N.; Hasan, M.M.; Hossain, M.M.; Kamal, M.M.; Fatema, K.; Lutfur Mazumder, H.M.R.; Bashar, K.; Rana, M.S.: Larvicidal and insecticidal effects of different extracts of *Mallotus repandus* (willd.) Muell.-arg. leaf and stem against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: culicidae) and *Sitophilus oryzae* Linn. (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Pharm.* **5**(1), 127–133 (2015)
- Charles, H.: Aspects moléculaires de la bactérie symbiotique principale du charançon des céréales *Sitophilus oryzae* (Coléoptère, Curculionidae) et étude de ses interactions avec l'hôte. Thèse doc. I.N.S.A. Lyon. 134 p. (1997)
- Mishra, R.C.; Pandey, R.K.: Comparative evaluation of different insecticides against damage caused by *Sitophilus oryzae* L. in stored wheat seed. *Int. J. Bio-Resour. Stress Manag.* **5**(3), 404–408 (2014). doi:10.5958/0976-4038.2014.00588.0
- Ndiaye, M.R.; Ndong, A.; Thiaw, C.; Diome, T.; Sembene, M.: Haplotypes of beetles *Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*, storage pests of maize in Senegal and Republic of Guinea. *Int. J. Sci. Adv. Technol.* **4**(6), 17–30 (2014)
- Karbin, S.; Rad, A.B.; Arouiee, H.; Jafarnia, S.: Antifungal activities of the essential oils on post-harvest disease agent *Aspergillus flavus*. *Adv. Environ. Biol.* **3**(3), 219–225 (2009)
- Forrer, H.-R.; Musa, T.; Schwab, F.; Jenny, E.; Bucheli, T.D.; Wettstein, F.E.; Vogelgsang, S.: *Fusarium* head blight control and prevention of mycotoxin contamination in wheat with botanicals and tannic acid. *Toxins* **6**, 830–849 (2014). doi:10.3390/toxins6030830
- Magan, N.; Aldred, D.: Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *Int. J. Food Microbiol.* **119**(1–2) Mycotoxins from the Field to the Table, 131–139 (2007)
- Mișcă, C.; Damiescu, L.; Jianu, C.; David, L.; Mișcă, L.; Mărginean, O.; Rădoi, B.; Rinovet, A.; Bujancă, G.; Velciov, A.; Ivanovici, N.: The incidence of strains of *Fusarium* sp. and of zearalenone in cereals analyzed from the south west of Romania. *Ann. West Univ. Timiș. Ser. Biol.* **19**(2), 137–144 (2014)
- Jaksic, S.; Abramovic, B.; Jajic, I.; Balos, M.Z.; Mihaljev, Z.; Despotovic, V.; Sojic, D.: Co-occurrence of fumonisins and deoxynivalenol in wheat and maize harvested in Serbia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **89**, 615–619 (2012). doi:10.1007/s00128-012-0734-4
- Nayak, S.; Dhua, U.; Samanta, S.; Chhotaray, A.: Molecular detection and genetic characterisation of fumonisin producing fusarium isolates from rice cultivars. *Int. J. Agric. Environ. Biotechnol.* **7**(4), 695–704 (2014). doi:10.5958/2230-732X.2014.01377.1
- Birck, N.M.M.; Lorini, I.; Scussel, V.M.: Interaction between pest infestation and fungus in wheat grain at storage facilities. Microorganisms, mycotoxins, and other biological contaminants PS2-11–6285, pp. 193–197 (2006)
- Magan, N.; Hope, R.; Cairns, V.; Aldred, D.: Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur. J. Plant Pathol.* **109**, 723–730 (2003)
- Athanassiou, C.G.; Kavallieratos, N.G.; Evergetis, E.; Katsoula, A.-M.; Haroutounian, S.A.: Insecticidal efficacy of silica gel with

- Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Econ. Entomol.* **106**(4), 1902–1910 (2013)
24. Demnati, F.; Allache, F.: Effect of *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) on oviposition of *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae). *J. Crop Prot.* **3**(3), 327–334 (2014)
 25. Hosseini Moghaddam, M.S.; Soltani, J.; Babalhavaeji, F.; Hamzei, J.; Nazeri, S.; Mirzaei, S.: Bioactivities of endophytic penicillia from Cupressaceae. *J. Crop Prot.* **2**(4), 421–433 (2013)
 26. Dartora, N.; De Souza, L.M.; Santana-Filho, A.P.; Lacomini, M.; Valduga, A.T.; Gorin, P.A.J.; Sasaki, G.L.: UPLC-PDA-MS evaluation of bioactive compounds from leaves of *Ilex paraguariensis* with different growth conditions, treatments and ageing. *Food Chem.* **129**, 1453–1461 (2011). doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.112
 27. Tura, D.; Roberts, K.: Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. *Rev. J. Chromatogr.* **975**, 71–93 (2002)
 28. Rajashekar, Y.; Shivanandappa, T.: Grain protection potential of decalene II, a new plant-derived natural insecticide. *Adv. Entomol.* **2**, 144–150 (2014). doi:10.4236/ae.2014.23022
 29. Bhatt, P.; Thodsare, N.; Srivastava, R.P.: Toxicity of some bioactive medicinal plant extracts to Asian army worm, *Spodoptera litura*. *J. Appl. Nat. Sci.* **6**(1), 139–143 (2014)
 30. Riahi, L.; Chogranib, H.; Elferchichi, M.; Zaoualib, Y.; Zoghlamia, N.; Mlikia, A.: Variations in Tunisian wormwood essential oil profiles and phenolic contents between leaves and flowers and their effects on antioxidant activities. *Ind. Crops Prod.* **46**, 290–296 (2013). doi:10.1016/j.indcrop.2013.01.036
 31. Tumen, I.; Untar, I.S.; Keles, H.; Akkol, E.K.: A therapeutic approach for wound healing by using essential oils of *Cupressus* and *Juniperus* species growing in Turkey. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* Article ID 728281, 7 p. (2012). doi:10.1155/2012/728281
 32. Herzi, N.; Camyb, S.; Bouajilac, J.; Destrac, P.; Romdhane, M.; Condoret, J.-S.: Supercritical CO₂ extraction of *Tetraclinis articulata*: chemical composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *J. Supercrit. Fluids* **82**, 72–82 (2013). doi:10.1016/j.supflu.2013.06.007
 33. Djouahri, A.; Saka, B.; Boudarene, L.; Benseradj, F.; Aber-rane, S.; Aitmousa, S.; Chelghoum, C.; Lamari, L.; Sabaou, N.; Baaliouamer, A.: In vitro synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Ind. Crops Prod.* **56**, 60–66 (2014). doi:10.1016/j.indcrop.2014.02.035
 34. Ashafa, A.O.T.; Afolayan, A.J.: Assessment of the antimicrobial activity of the root extracts from *Chrysocoma ciliata* L. *Afr. J. Microbiol. Res.* **3**(11), 700–703 (2009)
 35. Stefanazzi, N.; Stadler, T.; Ferrero, A.: Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest. Manag. Sci.* **67**, 639–646 (2011). doi:10.1002/ps.2102
 36. Mishra, A.K.; Dubey, N.K.: Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(4), 1101–1105 (1994)
 37. Adjou, E.S.; Soumanou, M.M.: Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin. *J. Appl. Biosci.* **70**, 5555–5566 (2013)
 38. Dos Santos, F.N.; Almeida Oliveira, T.; Souza Lima, K.C.; Alvesde Andrade, J.I.; Xavierda Silva, D.; DoVale Amaral, L.; Moya, H.D.; Ronchi-Teles, B.; Matsuura, T.; Nunez, C.V.: *Mon-trichardia linifera* (Araceae) biological potential, phytochemical prospection and polyphenol content. *Univ. Sci.* **19**(3), 213–224 (2014). doi:10.11144/Javeriana.SC19-3.mlab
 39. Trimech, I.; Weiss, E.K.; Chedea, V.S.; Marin, D.; Detsi, A.; Ioannou, E.; Roussis, V.; Kefalas, P.: Evaluation of antioxidant and acetylcholinesterase activity and identification of polyphenolics of the invasive weed *Dittrichia viscosa*. *Phytochem. Anal.* (2014). doi:10.1002/pca.2510
 40. Sultana, B.; Anwar, F.; Ashraf, M.: Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules* **14**, 2167–2180 (2009). doi:10.3390/molecules14062167
 41. Huda-Faujan, N.; Norriham, A.; Norrakiah, A.S.; Babji, A.S.: Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *Afr. J. Biotechnol.* **8**(3), 484–489 (2009)
 42. Anwar, F.; Przybylski, R.: Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **11**(3), 293–301 (2012)
 43. Tattini, M.; Galardi, C.; Pinelli, P.; Massai, R.; Remorini, D.; Agati, G.: Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol.* **163**, 547–561 (2004). doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x
 44. Nacifde Abreu, I.; Mazzafera, P.: Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 241–248 (2005). doi:10.1016/j.plaphy.2005.01.020
 45. Ileke, K.D.; Ogungbite, O.C.; Olayinka-Olagunju, J.O.: Powders and extracts of *Syzygium aromaticum* and *Anacardium occidentale* as entomocides against the infestation of *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) on stored sorghum grains. *Afr. Crop Sci. J.* **22**(4), 267–273 (2014)
 46. Abd-Elhady, H.K.: Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J. Plant Prot. Res.* **52**(3), 347–352 (2012)
 47. Aggarwal, K.K.; Veena Prajapati, A.K.; Kumar, S.: Toxicity of 1,8-cineol towards three species of stored product coleopterans. *Insect Sci.* **21**(2), 155–160 (2001)
 48. Liu, Z.L.; Chu, S.S.; Liu, Q.R.: Chemical composition and insecticidal activity against *Sitophilus zeamais* of the essential oils of *Artemisia capillaris* and *Artemisia mongolica*. *Molecules* **15**, 2600–2608 (2010). doi:10.3390/molecules15042600
 49. Bouzouita, N.; Kachouri, F.; Ben Halima, M.; Chaabouni, M.M.: Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *J. Soc. Chim. Tunis.* **10**, 119–125 (2008)
 50. Aouinty, B.; Oufara, S.; Mellouki, F.; Mahari, S.: Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **10**, 67–71 (2006)
 51. Gotawska, S.; Kapusta, I.; Łukasik, I.; Wójcicka, A.: Effect of phenolics on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) population on *Pisum sativum* L. (Fabaceae). *Pesticides* **3–4**, 71–77 (2008)
 52. Green, P.W.C.; Stevenson, P.C.; Simmonds, M.S.J.; Sharma, H.C.: Phenolic compounds on the pod-surface of pigeonpea, *Cajanus cajan*, mediate feeding behavior of *Helicoverpa armigera* larvae. *J. Chem. Ecol.* **29**(4), 811–821 (2003). doi:10.1023/A:1022971430463
 53. Gotawska, S.; Łukasik, I.: Antifeedant activity of luteolin and genistein against the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Pest. Sci.* **85**, 443–450 (2012). doi:10.1007/s10340-012-0452-z



54. Ahmad, M.; Mehjabeen, F.S.; Jahan, N.: Evaluation of insecticidal and antioxidant activity of selected medicinal plants. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2**(3), 153–158 (2013)
55. Msaada, K.; Salem, N.; Bachrouh, O.; Bousselmi, S.; Tamar, S.; Alfaify, A.; Al Sane, K.; Ben Ammar, W.; Azeiz, S.; Haj Brahim, A.; Hammami, M.; Selmi, S.; Limam, F.; Marzouk, B.: Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) essential oils and phenolics. *J. Chem.* Article ID 804658, 12 p. (2015). doi:[10.1155/2015/804658](https://doi.org/10.1155/2015/804658)
56. Mansouri, N.; Satrani, B.; Ghanmi, M.; El Ghadraoui, L.; Aafi, A.: Étude chimique et biologique des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* ssp. *lycia* et *Juniperus phoenicea* ssp. *turbinata* du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **3**, 415–424 (2011)
57. Bourkhiss, M.; Hnach, M.; Lakhli, T.; Bourkhiss, B.; Ouhssine, M.; Satrani, B.: Production et caractérisation de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Bull. Soc. R. Sci. Liège* **79**, 4–11 (2010)
58. Abi-Ayad, F.Z.: Analyse de l'huile essentielle du Thuya de Berbérie (*Tetraclinis articulata*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse Maj. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, 102 p. (2009)

