

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة- الحراش- الجزائر
ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE – EL HARRACH- ALGER

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences Agronomiques
Département: Zoologie Agricole et Forestière

Sujet

Extraction et purification de métabolites purs de
Dittrichia (Inula) viscosa (L.) Greuter et Evaluation
de leur activité biologique à l'égard de quelques
bio-agresseurs des cultures

Présentée par: M^{me} GUERIBIS Faiza

Soutenu le: 21/12/ 2020

Devant le jury :

<i>Président :</i>	M. BENZEHRA A.	Professeur (E.N.S.A.- El-Harrach)
<i>Promoteur:</i>	M ^{me} KHALFI O.	Maître de conférences-B (E.N.S.A.- El-Harrach)
<i>Co-promoteur:</i>	M ^{me} ZERMANE N.	Professeur (Université Alger 1)
<i>Examineurs:</i>	M. BICHE M.	Professeur (E.N.S.A.-El-Harrach)
	M ^{me} ACHEUK F.	Professeur (Université de Boumerdes)
	M. DJAZOULI Z.	Professeur (Université de Blida)

Année universitaire: 2020/2021

Remerciements

Tous d'abord, je tiens à remercier le bon Dieu, de m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à remercier infiniment **M. Antonio Evidente**, professeur et responsable du laboratoire de chimie organique du département de chimie de Université Degli Studi Di Napoli Federico II en Italie de m'avoir accueilli comme stagiaire au sein de son laboratoire. Je le remercie pour ses précieux conseils, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée tout au long de mon stage. Je tiens à remercier particulièrement son équipe, pour l'attention et l'aide qu'elle m'a apportée pendant mon stage.

Mes remerciements s'adressent également à ma directrice de thèse **Mme Khalfi Ouassila** pour son encadrement, sa disponibilité et sa gentillesse.

Je voudrais en particulier, exprimer toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse **Mme Zermane Nadjia** de la Faculté des Sciences de l'Université d'Alger 1, je la remercie d'avoir dirigé de bout en bout ce travail avec toute la dextérité et la claire voyance requise. Sa disponibilité, sa sollicitude, sa magnanimité, sa rigueur scientifique, ses immenses qualités humaines ainsi que ses soutiens multiples et multiformes qui ont permis de mener cette thèse à bon port et dans de meilleures conditions.

Mes remerciements vont également à **M. Benzehra Abdelmadjid** pour avoir accepté de présider ce jury ainsi qu'à **M. Biche Mohammed**, à **M. Djazouli Zahr Eldinede** l'Université de Blida et à **Mme Acheuk Fatma** de l'université de Boumerdes qui m'ont fait un grand honneur en acceptant d'évaluer et de juger ce travail.

Je remercie également **M. Siafa Abderrahmene** pour sa présence et son soutien. Je lui rends hommage d'avoir guidé mes premières marches dans l'univers passionnant et complexe de la recherche. En tant que guide scientifique, je lui saurais gré de continuer à m'abreuver dans son riche et inépuisable savoir de phytopharmacie.

Mes remerciements s'adressent également aux Prof. **Houda Boureghda** (Ensa, Algérie) et Dr **Christophe Le May** de l'Agro Campus Ouest (France) pour avoir fourni des isolats fongiques testés dans ce travail.

Dédicace

Je dédie cette thèse à Maman et Papa, ceci est la fin de vos légitimes inquiétudes et appréhensions. Trouvez en cette œuvre, le couronnement de tous vos sacrifices.

À mes sœurs et mes beaux-frères.

À mon cher frère et ma belle-soeur

À mon mari et ma belle famille

À mon petit ange, mon bonheur, ma fille Asma

*À toute ma famille en particulier ma chère cousine
Yasmine*

Je vous aime tous

Liste des tableaux

Tableau 1: Quelques exemples de lutte biologique par augmentation	6
Tableau 2: Détails des colonnes à pression normale utilisées pour le fractionnement.	41
Tableau 3: Les souches fongiques utilisées et leurs origines.	53
Tableau 4: Résultats RMN H ¹ pour les Inuloxines A-C et l'acide α -costique.....	71
Tableau 5: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la croissance mycélienne des souches fongiques phytopathogènes testées.	75
Tableau 6: Effets des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur le contenu en chlorophylle des feuilles de quelques adventices.....	77
Tableau 7: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris</i>	78
Tableau 8: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur l'émergence des plantules de <i>Cuscuta campestris</i>	79
Tableau 9: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines de <i>Orobanche crenata</i>	80
Tableau 10: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la longueur de tube germinatif des graines germées d' <i>Orobanche crenata</i>	80
Tableau 11: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la fécondité de <i>Callosobrochus maculatus</i>	84
Tableau 12: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la fertilité de <i>Callosobrochus maculatus</i>	85
Tableau 13: Effet des métabolites de <i>Dittrichia viscosa</i> sur le sex ratio de la F1 de <i>Callosobrochus maculatus</i>	86

Liste des figures

Figure 1: Evolution du marché des produits phytosanitaires dans différentes régions du monde.	13
Figure 2: Répartition du marché phytosanitaire dans différentes régions du monde.	13
Figure 3: Les différents stades de développement de <i>Callosobruchus maculatus</i>	23
Figure 4: Détails schématisés montrant les différences de la face dorsale entre le mâle et la femelle de <i>Callosobruchus maculatus</i>	24
Figure 5: Détail de la morphologie de la femelle de <i>Callosobruchus maculatus</i>	25
Figure 6: Le caryotype de <i>Callosobruchus maculatus</i>	25
Figure 7: Cycle biologique de <i>Callosobruchus maculatus</i>	27
Figure 8: Répartition géographique du genre <i>Dittrichia</i>	31
Figure 9: <i>Dittrichia viscosa</i> , aspect de la plante.	33
Figure 11: Protocole d'extraction avec le dichlorométhane.	38
Figure 12: Imprégnation sur silice de l'extrait de <i>Dittrichia viscosa</i>	43
Figure 13: Chromatographie sur colonne de l'extrait organique de <i>Dittrichia viscosa</i>	44
Figure 14: Chromatographie sur une couche mince.	46
Figure 15: Rf et les différents types de révélation.	47
Figure 16: Récupération des métabolites à partir des plaques CCM.	50
Figure 18: Différentes parties de l'appareil de RMN.	51
Figure 19: Préparation d'un échantillon RMN.	52
Figure 20: Aspect cultural des souches fongiques testées.....	54
Figure 21: Elevage de masse de <i>Callosobruchus maculatus</i> au laboratoire.	55
Figure 22 : Etapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs extraits de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes.	57
Figure 23: Mesure du contenu en chlorophylle des feuilles de quelques plantes adventices traitées par les métabolites purs extraits de <i>Dittrichia viscosa</i>	59
Figure 24: Étapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines de <i>Cuscuta campestris in-vitro</i>	61
Figure 25: Etapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines d' <i>Orobanche crenata in-vitro</i>	64
Figure 26: Dispositif de l'évaluation de l'effet des métabolites purs extraits de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la fécondité de <i>Callosobruchus maculatus</i>	67
Figure 27: Spectre RMN H ¹ des 4 métabolites enregistré à 400 MHz dans le CDCl ₃	72
Figure 28 : Structure chimique des Inuloxines A-C et de l'acide α -costique.	73
Figure 29: Schéma récapitulatif de l'extraction et de la purification des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i>	74
Figure 30: Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la mortalité des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i>	82
Figure 31: Régression mortalité / dose par effet de contact des 4 métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i>	83

Liste des annexes

Annexe 1: Les flavonoïdes d' <i>Inula viscosa</i> L.	I
Annexe 2: Les acides sesquitérpéniques d' <i>Inula viscosa</i> L..	III
Annexe 3: Les tritèrènes esters d' <i>Inula viscosa</i> L.	IV
Annexe 4: Les espèces adventices utilisées	V
Annexe 5: Aspect des plantes parasites utilisées	VI
Annexe 6: Composition du milieu PDA	VII
Annexe 7: Détermination de la DL50	VII

Liste des abréviations

ACC	Agriculture et Agroalimentaire Canada
OILB	Organisation Internationale de Lutte Biologique
OTA	Office of Technology Assessment
UIPP	Union des Industries de la Protection des Plantes
TCAC	Taux de Croissance Composé Annuel
INRA ;	Institut Nationale de la Recherche Agronomique
AFPP	Association Française de Protection des plantes
CEB ;	la Commission des Essais Biologiques
NCBI	National Center for Biotechnology Information
APG ;	Angiosperm Phylogeny Group,
FAO ;	Food and Agricultur Organistion
mg / ml, ;	grammes en millilitres
µg/mg;	Microgramme/ Milligramme
g	gramme
ml	millilitre
µl	microlitre
T/an ;	tonne/an
t/m	Tour/minute
T ;	tesla
MHz ;	Mégahertz
°C ;	Celsius
NUV;	Near UltraViolet
UV	Ultra violet
Nm	Nanomettre
CH₂Cl₂	Dichloromethane
H₂O-CH₃OH ;	Eau- Méthanol
CDCl₃ ;	Chloroforme deutéré
H₂SO₄	l'acide sulfurique
I₂	Iode
C₃H₈O	Isopropanol
EP	Ethyre Petroleum
Acet	Acétone
EDS	Eau Distillée Stérile
CCM;	Chromtographie sur Couche Mince
Rf;	Rapport Frontale
HR	Humidité Relative
TLC ;	Thin layer chromatography
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
PDA	Potato Dextrose Agar
DL50 ;	Dose Létale pour 50% de la population

Sommaire

Liste des tableaux.....	4
Liste des figures.....	5
Liste des annexes.....	6
Liste des abréviations.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	11

PARTIE I: DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I: La lutte biologique.....	4
1. Définition de la lutte biologique.....	4
2. Objectifs.....	5
3. Les différents types de lutte biologique.....	5
3.1. La lutte biologique classique :.....	5
3.2. La lutte biologique par augmentation de populations d'auxiliaires endémiques.....	5
3.3. La lutte par protection (conservation) :.....	6
4. Les organismes utilisés en lutte biologique.....	7
4.1. Définition de l'agent de lutte biologique.....	7
4.2. Les organismes utilisés en lutte biologique.....	7
5. Utilisation des plantes et de leurs extraits en lutte biologique.....	7
6. Avantages et inconvénients de la lutte biologique.....	10
7. Le marché phytosanitaire et les biopesticides.....	11
7.1. Le marché phytosanitaire mondial.....	11
7.2. Le marché des biopesticides.....	14
Chapitre II : Les bioagresseurs des cultures.....	15
1. Plantes adventices des cultures.....	15
2. Les agents phytopathogènes.....	15
3. Etude de cas: <i>Callosobruchus maculatus</i> (F).....	17
3.1. Systématique et synonymie.....	17
3.2. Description morphologique et développement.....	19
3.3. Génétique.....	22
1.1. Ecologie et cycle biologique.....	26
1.2. Dégât et importance économique.....	28
Chapitre III: Présentation de l'espèce végétale étudiée: <i>Dittrichia (Inula) viscosa</i> (L) Greuter	29
1. Généralités sur <i>Dittrichia viscosa</i> (L) Greuter.....	29
2. Synonymie :.....	30

3. Noms Vernaculaires	30
4. Répartition géorgaphique	31
5. Caractéristiques morphologiques	32
6. Usages traditionnels, propriétés biologiques et pharmacologiques.....	34

PARTIE II: MATERIEL ET METHODES

Chapitre I: Extraction et purification des metabolites 36

1. Matériel végétalutilisé.....	36
2. Extraction et purification des métabolites de <i>Dittrichia viscosa</i>	36
2.1. Obtention de l'extrait organique	36
2.2. Purification des métabolites de <i>Dittrichia viscosa</i>	39
2.2.1. Principe des méthodes chromatographiques de séparation et de purification	39
2.2.2. Les séparations chromatographiques de l'extrait organique de <i>D. viscosa</i> :.....	41
3. Identification des métabolites par Résonance Magnétique Nucléaire(RMN)	47

Chapitre II: Tests biologiques..... 53

1. Présentation des bioagresseurs des cultures testés	53
1.1. Matériel fongique	53
1.2. Adventices et phanérogames parasites testées	54
1.3 <i>Callosobruchus maculatus</i> : origine et élevage au laboratoire	55
2. Tests biologiques réalisés.....	56
2.1. Évaluation de l'activité antagoniste des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes.....	56
2.2. Évaluation de l'effet des métabolites sur le taux de dégradation de la chlorophylle de quelques plantes adventices	58
2.3.Évaluationde l'activité antagoniste des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> à l'égard de <i>Cuscuta campestris</i>	60
2.4. L'évaluation de l'activité antagoniste des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> à l'égard de <i>Orobanche crenata</i>	62
2.5.Évaluation de l'effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur les paramètres biologique de <i>Callosobruchus maculatus</i>	65
3. Analyses statistiques	68

PARTIE III: RESULTAT ET DISCUSSION

Chapitre I: Résultats de l'extraction à partir de *dittrichia viscosa* 69

1. Profil chimique des métabolites obtenus	69
--	----

Chapitre II: Résultats des tests biologiques..... 75

1. Effets des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la croissance mycélienne des souches fongiques phytopathogènes testées	75
2. Effets des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur le contenu en chlorophylle des feuilles de quelques adventices.....	76
3. Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines et l'émergence des plantules de <i>Cuscuta campestris</i>	78
4. Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la germination des graines et l'élongation du tube germinatif des graines germées de <i>Orobancha crenata</i> Forsk.	79
5. Effet insecticide des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur les paramètres biologiques de <i>Callosobrochus maculatus</i>	81
6. Effet des métabolites purs de <i>Dittrichia viscosa</i> sur la fécondité et la fertilité de <i>Callosobrochus maculatus</i>	84
DISCUSSION GENERALE	87
CONCLUSION GENERALE	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	97
ANNEXES	A
COPIE ATTACHÉE DE LA PUBLICATION	VIII

INTRODUCTION GENERALE

L'insécurité alimentaire demeure un fléau dans le monde et touche près de 800 millions de personnes dont la majorité se trouve dans les pays en développement. Dans les pays de l'Afrique subsaharienne, l'agriculture connaît une stagnation et l'aide alimentaire est toujours d'actualité, avec un taux de croissance démographique en plein essor de 2,9 à 3,9 %, alors que celle de la production agricole plafonne à 2 % par an (**FAO, 1995**). Dans certaines régions, l'écart se creuse entre la production agricole et les besoins alimentaires des populations.

D'autre part, la conservation des récoltes demeure l'un des facteurs clés de la sécurité alimentaire d'un pays. En effet, la production agricole est généralement saisonnière alors que les besoins des consommateurs s'étendent sur toute l'année. De ce fait, la mise en place d'une politique phytosanitaire adéquate s'impose pour épargner les populations des risques de pénurie alimentaire pendant l'intersaison agricole (**Zuoxin et al., 2006**). Dans cette perspective et pour faire face à la demande alimentaire croissante de ces populations, il est nécessaire de ralentir la croissance démographique et d'accroître la production agricole en augmentant les rendements ou les superficies cultivables et en réduisant les pertes avant et après récoltes (**Delobel & Trans 1993**).

Pour atteindre ce but, l'utilisation de produits chimiques de synthèse dans la protection des plantes demeure une nécessité afin d'améliorer les rendements et la qualité des produits agricoles. Bien qu'efficaces, ces produits présentent souvent des inconvénients vis-à-vis de l'environnement et de la santé humaine telle que l'accumulation significative de matières actives dans les écosystèmes aquatiques et terrestres traités (**Barbouche et al., 2001**) ainsi que l'augmentation des cas de résistance aux insecticides chimiques et les effets néfastes sur les espèces non cibles (**Kim et al., 2005**). En plus, tous les ans, un million de personnes sont victimes d'empoisonnement par les produits chimiques de synthèse avec plus de 20 000 décès dont la grande majorité se trouve dans les pays en voie de développement (**FAO, 2015**).

Les inconvénients liés à l'emploi des pesticides de synthèse convergent en faveur de la mise au point et de la vulgarisation d'alternatives efficaces à la lutte chimique. Pour ces raisons, plusieurs chercheurs ont été motivés pour trouver des solutions durables pour une bonne gestion des ressources naturelles. Il s'agit de mettre au point des techniques de production et des méthodes de contrôle des ravageurs respectueuses de l'environnement, telles que la lutte biologique par les produits d'origine végétale. Cette méthode de lutte consiste à contrôler les interactions entre les agents pathogènes et les facteurs biotiques ou abiotiques de l'environnement par l'utilisation de plantes (**Dharmagadda et al., 2005**;

George & Vincent, 2005; Dua et al., 2006) ou de leurs métabolites (les huiles essentiels et les extraits organique...etc) sélectifs et non polluants (**Grafton-Cadwell et al., 2005**), et dégradables et non toxiques pour les organismes non cibles (**Kostyukovsky et al., 2000**). Il s'agit des pesticides d'origine végétale ou biopesticides. Ces derniers ont prouvé leur efficacité au laboratoire contre de nombreux ravageurs de denrées stockées (**Raja et al., 2001; Murdock et al., 2003; Kellouche & Soltani, 2004**).

Les plantes à effet pesticide ont fait l'objet d'études par de nombreux auteurs (**Morallo & Tantengco, 1986 ; Preethi et al., 2010 ; Ayodele et al., 2011 ; Toufique et al., 2014 ; Chehmi et al., 2015**). Déjà, les effets insecticides de quelques plantes ont été prouvés dans certains pays. C'est le cas du piment rouge, du poivre noir, du tabac, de *Titonia* spp. et de *Lantana camara* (**Nkouka, 1995**). On peut citer également le pyrèthre, la roténone, le neem (**Isman, 2000**) et certaines huiles essentielles extraites de plantes aromatiques dont certaines sont traditionnellement utilisées par les paysans pour protéger leurs stocks.

C'est dans cette optique et compte tenu des nombreux problèmes liés à la propagation des bioagresseur des cultures et à leur contrôle, que nous avons testé dans la présente étude les effets antagonistes de quelques métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa* à l'égard de quelques bioagresseurs de cultures.

L'objectif principal de cette recherche est l'extraction de nouveaux métabolites produits par *D. viscosa* et l'évaluation de leur activité pesticide. Pour ce faire, les objectifs spécifiques suivants ont été fixés:

1. Optimisation d'une méthode d'extraction rapide et exhaustive de la partie aérienne de *D. viscosa* ;
2. Extraction et purification des principaux métabolites en utilisant des techniques chromatographiques classiques, à savoir la colonne et la chromatographie sur couche mince (CC, CCM);
3. Détermination de la structure des métabolites bioactifs par outils spectroscopiques (UV, RMN) ;
4. Evaluation de l'activité herbicide, antifongique et insecticide des métabolites purifiés.

Le travail réalisé comporte trois grandes parties. La première partie concerne les données bibliographiques sur la protection des plantes et les bioagresseurs des cultures. La deuxième partie est consacrée à la partie expérimentale ; elle porte sur la méthodologie adoptée pour

l'ensemble des tests menés, et la troisième et dernière partie présente les résultats obtenus et leur discussion. Enfin, une conclusion générale résume les principaux résultats et présente les perspectives de recherches.

PARTIE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I

LA LUTTE BIOLOGIQUE**1. Définition de la lutte biologique**

La définition de lutte biologique varie selon les auteurs. Elle est ainsi définie :

Au sens large, elle comprend toutes les méthodes qui réduisent la nuisance des ravageurs à l'exclusion des pesticides chimiques, et des moyens de lutte qui diminuent directement les populations de ravageurs présents (**Pierrard, 1981**).

Selon **AAC (2009)**: il s'agit de l'utilisation d'organismes vivants pour contrôler ou combattre un ravageur.

La lutte biologique est, selon la définition de l'Organisation Internationale de Lutte Biologique (OILB), «l'utilisation d'organismes vivants pour prévenir ou réduire les dégâts causés par des ravageurs ».

Elle nécessite la présence de parasites, de parasitoïdes et de prédateurs naturels dans les cultures en favorisant l'aménagement ou la proximité d'un environnement qui leur est propice (forêts, prairies, haies fleuries...) (**Etilé, 2012**). Cette méthode de lutte peut être très efficace, mais elle peut se révéler difficile à maîtriser par les petits agriculteurs (**Guèye, 2011, in Laëtitia, 2017**).

Pour plusieurs phytopathologistes, la lutte biologique consiste en l'utilisation de microorganismes bénéfiques afin de réduire les maladies des plantes (**Saliou, 2018**). La définition la plus couramment rencontrée est l'« utilisation d'organismes vivants ou de leurs produits pour empêcher ou réduire les pertes ou dommages causés par des organismes nuisibles aux productions végétales ». Cette définition est intéressante et assez complète puisqu'elle réunit l'utilisation des organismes vivants et leurs produits (**Harman et al., 2010 ; Suty, 2010**).

La lutte biologique est le fait d'exploiter un organisme vivant afin de contrôler un autre organisme vivant. Les organismes exploités sont également appelés ennemis naturels ou agents de lutte biologique. La lutte biologique peut être réalisée à l'aide de macro-organismes ou à l'aide de biopesticides. Les macro-organismes, également appelés auxiliaires, sont des organismes prédateurs ou parasitoïdes qui s'attaquent et éliminent les ravageurs d'une culture (**Verscheure, 2017**).

2. Objectifs

Le but de la lutte biologique est de réduire et de contrôler les populations de ravageurs en deçà d'un seuil d'intervention pour lequel les dommages sont économiquement et esthétiquement acceptables (**Lambert, 2010**) en remplaçant, en totalité ou en partie, les pesticides chimiques utilisés en agriculture et en foresterie par des micro-organismes, des macro-organismes ou encore par des toxines produites par des micro-organismes (**Boivin, 2001; Druart, 2017**).

3. Les différents types de lutte biologique

Selon plusieurs auteurs (**Theiry & Xuereb, 2004; Thiec, 2007; Lambert, 2010; Bouzerida et al., 2016**), la lutte biologique peut être divisée en trois catégories bien distinctes :

3.1. La lutte biologique classique :

Consiste à introduire des espèces non naturellement présentes dans l'agrosystème, on parle alors de lutte par inoculation. C'est une méthode qui vise l'implantation d'un antagoniste exotique dans un milieu où sévit un ravageur exotique. En l'absence du ou des ennemis qui contrôlent ses populations dans son aire de répartition d'origine, le ravageur n'a presque aucun obstacle à sa prolifération autre que la culture ou le milieu dont il dépend. C'est ainsi que plusieurs cas de lutte biologique ont été réalisés par l'introduction d'un ennemi naturel dans la nouvelle région, dans le but qu'il s'implante et se développe, pour contrôler le ravageur à long terme. Ce mode de lutte demande néanmoins, beaucoup de recherche avant sa mise en place, surtout afin de s'assurer que l'espèce introduite s'acclimate et s'attaque spécifiquement au ravageur exotique et non aux organismes indigènes. Un exemple de lutte biologique classique serait l'introduction de la coccinelle asiatique, *Harmonia axyridis* Pallas, contre les pucerons (hémiptères de la super-famille Aphidoidea),

3.2. La lutte biologique par augmentation de populations d'auxiliaires endémiques

Le but est de contrôler un ravageur indigène en augmentant l'occurrence de son ou ses ennemis naturels, naturellement présents mais en quantité insuffisante, ou d'introduire à répétition un ennemi qui ne survivrait pas, par exemple, aux conditions hivernales.

L'objectif est ici de réduire le nombre de la population du ravageur sans que l'établissement et la reproduction de l'auxiliaire ne soient visés pour le long terme. On introduit des quantités très importantes de l'organisme auxiliaire dans l'environnement lors des périodes endémiques du ravageur. Cette technique connaît d'autant plus de succès ces dernières années que les chercheurs ont réussi à maîtriser les méthodes de production de masse de certains types d'organismes auxiliaires, par exemple la fermentation liquide ou solide pour les bactéries et les champignons, cultures de cellules pour les virus, milieux nutritifs semi-artificiels pour les insectes et les nématodes (**Tableau1**).

Cette lutte présente trois avantages particuliers :

- Assurer la parfaite coïncidence chronologique entre le stade sensible de la cible et le stade actif de l'auxiliaire ;
- Permettre une distribution optimale de l'organisme auxiliaire en fonction de celle de la population cible ;
- Optimiser les doses d'application.

Tableau1: Quelques exemples de lutte biologique par augmentation

Auxiliaire	Cible	Références
<i>Trichogramma brassicae</i>	Pyrale du maïs	Frandon & Kabiri, (1998); Derron & Goy, (2006)
<i>Metaphycus barletti</i> ou <i>M. lounsburyi</i>	Cochenille de l'olivier	(Orphanides, 1993)
<i>Coccinella algerica</i>	Pucerons	Ben Halima et al., (2010) :Rahmouni et al., (2017)

3.3. La lutte par protection (conservation) :

Elle vise à augmenter l'occurrence des ennemis naturels (auxiliaires) en aménageant les paysages ou en modifiant l'environnement. C'est la méthode de lutte la plus utilisée car elle nécessite beaucoup d'efforts et les auxiliaires sont déjà adaptés à l'environnement visé.

Parexemple, certaines espèces d'insectes prédateurs comme les coccinelles du genre *Hyppodamia*, se nourrissent de pollen quand les proies deviennent plus rares. Malheureusement, elles ne peuvent pas se reproduire sous cette diète, ce qui peut faire chuter les populations. Cette situation peut être évitée en pulvérisant sur les cultures une solution de sucre et d'hydrolysats de levures, ce qui remplace temporairement les pucerons .

4. Les organismes utilisés en lutte biologique

4.1. Définition de l'agent de lutte biologique

L'agent de lutte biologique est toute entité taxonomique capable de réguler la dynamique des populations d'un bio-agresseur, et dans le cas d'un insecte d'avoir une action à différents stades de son développement (œufs, larves, nymphes, adultes). Il représente un organisme différent de sa cible, il exerce son action en tant que parasite (ou parasitoïde) prédateur, compétiteur ou agent pathogène (micro-organismes) de la cible de la lutte, et aboutissant à sa mort à plus ou moins brève échéance, en s'en nourrissant ou tout au moins en limitant son développement (**Thiec, 2007 ; Bouzerida et al., 2016**).

4.2. Les organismes utilisés en lutte biologique

Plusieurs groupes d'organismes peuvent être utilisés en lutte biologique. Les principaux sont les micro-organismes, les nématodes, les insectes et les arachnides ou des substances naturelles issues particulièrement de micro-organismes, de plantes ou mêmes de minéraux (**Etilé, 2012 ; Bouzerida et al., 2016 ; Druart, 2017 ; Verscheure, 2017**).

5. Utilisation des plantes et de leurs extraits en lutte biologique

Le concept d'utilisation des plantes en agriculture n'est pas nouveau. Les propriétés insecticides de *Pyrethrum roseum* (Astéracées) ont été utilisées depuis plus de 2000 ans par les chinois pour protéger leurs cultures contre les insectes (**Leng et al., 2011**). Auparavant, l'activité insecticide de lanicotine extraite des feuilles de tabac, *Nicotina tabacum*, fut découverte par Quintinie depuis 1690 (**Camara, 1997, Deravel et al., 2013**).

Avant la seconde guerre mondiale, les chercheurs en agriculture se sont beaucoup intéressés aux produits naturels provenant des plantes. Depuis quelques décennies, l'homme s'est intéressé à leurs activités biologiques, en particulier à leurs composés secondaires considérés comme étant des substances pouvant être utilisées contre les pathogènes et les

ravageurs. Cet intérêt est appuyé par le fait que la plupart des produits naturels provenant des plantes possèdent une sélectivité remarquable envers leur cible, une activité spécifique, et sont généralement biodégradables (Gauthier, 2016). Les agriculteurs avaient d'ailleurs coutume de mettre dans les sacs des grains de plantes odorantes comme la menthe, l'ail, le laurier, etc... pour protéger leurs stocks contre les insectes. Ces végétaux possèdent une action insecticide ou répulsive via des composés volatiles qu'ils émettent (Ait Aider, 2017). L'utilisation des produits organiques de synthèse met fin à la période glorieuse des insecticides d'origine végétale vers les années 1950. Aujourd'hui, des milliers de plantes sont utilisées dans le tiers monde pour la protection des récoltes (De luca, 1979 in Camara, 1997).

La valorisation des plantes à effet insecticide prend de plus en plus de l'ampleur au niveau des programmes de recherches dans le monde entier particulièrement en Afrique. Ces plantes sont exploitées sous plusieurs formes, soit sous forme de poudres végétales, d'huiles essentielles, d'huiles végétales ou d'extraits végétaux (Bouzerida et al., 2016).

Les poudres des plantes

De nombreuses plantes aromatiques et médicinales ont été testées sous forme de poudre et elles ont montré une action anti appétante ou répulsive vis-à-vis de plusieurs insectes ravageurs des denrées stockées (Ait Aider, 2017). Ces poudres peuvent provenir de différents organes (feuilles, écorces, graines, fruits, etc...) de plantes séchées (Gwinner et al., 1996; Suleiman & Yusuf, 2011). Ainsi, *Tanacetum (Chrysanthemum) cinerariifolium*, plus communément appelé pyrèthre, est une plante herbacée vivace cultivée pour ses fleurs dont une poudre insecticide est extraite. Ses principes actifs, appelés pyréthrine, attaquent le système nerveux de tous les insectes. Cependant, ces molécules naturelles sont rapidement dégradées par la lumière (Deravel et al., 2013).

Les extraits aqueux

L'utilisation des extraits aqueux est une méthode de conservation couramment pratiquée par les fermiers africains qui réalisent un trempage des feuilles de plantes dans l'eau pour obtenir une solution à effet insecticide (Gakuru & Fouabi, 1996). Les principaux extraits aqueux d'origine végétale utilisés contre les ravageurs des grains stockés sont: les extraits de pyrèthre (*Asteraceae*), de neem (*Melicaeae*), de poivron (*Solanaceae*) et les racines d'*Annona* (*Annonaceae*) (Gwinner et al., 1996). L'activité larvicide des extraits de plantes aromatiques a aussi été confirmée par les travaux de plusieurs auteurs (Tandon & Sirohi, 2010; Govindaraj & Kumari, 2013). Au Maroc, l'utilisation des plantes contre les

invasions demoustiques est une pratique très courante (Aouinty *et al.*, 2006). Mis à part les travaux d'Alouani *et al.*, (2009), Habbachi *et al.* (2013) et Tchaker *et al.*, (2016), en Algérie, les études menées sur l'activité insecticide des extraits végétaux vis-à-vis des larves de moustiques semblent inexistantes.

Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont connues depuis fort longtemps pour leurs vertus médicinales (antiseptique et antifongique). Peu à peu, elles ont constitué un remarquable outil de défense contre les insectes nuisibles en général et ceux des denrées stockées en particulier (Keita *et al.*, 2001). La toxicité de nombreuses huiles essentielles et de leurs constituants a été évaluée sur de nombreux ravageurs des graines. Ainsi, les huiles essentielles de *Laurus nobilis* (Lauraceae), d'*Origanum glandulosum* (Lamiaceae), de *Clausena anisata* (Rutaceae), de *Salvia verbenaca* (Lamiaceae), d'*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae) ont montré une activité insecticide à l'égard de *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, *Bruchus rufimanus*, *Callosobruchus chinensis* et de *C. maculatus* (Ndomo *et al.*, 2008; Kellouche *et al.*, 2010; Mediouni-Ben Jemâa *et al.*, 2012; Righi *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'étude du pouvoir insecticide des huiles essentielles foliaires des plantes permet de mettre en évidence le pouvoir biocide des huiles essentielles de ces plantes sur les insectes nuisibles.

Les huiles végétales

Les huiles végétales sont utilisées très tôt dans la lutte contre les insectes sous forme d'émulsion. Ce sont à la fois des insecticides de contact qui agissent par leurs propriétés physiques et chimiques et des adjuvants pour leurs molécules liposolubles et synergistes dans certains cas (Regnault-Roger *et al.*, 2005). Les huiles végétales sont parmi les extraits de plantes les plus utilisés, elles permettent le contrôle des bruches du niébé. Selon De Luca (1979), l'action des huiles végétales se traduit soit par une destruction des larves dans les œufs après pénétration à travers les pores de chorion, soit par une augmentation de la mortalité imaginale suite à la création d'un film asphyxiant sur la cuticule avec obstruction des orifices respiratoires (Camara, 1997).

Diverses études sur *Boscia senegalensis* et *Azadirachta indica* ont révélé l'intérêt de ces plantes dans la lutte contre les ravageurs des denrées stockées. En effet, diverses études phytochimiques réalisées sur le neem (*A. indica*) montrent qu'il produit plus de 30 composés bioactifs dont le plus puissant est l'azadirachtine. Ce dernier perturbe la morphogénèse et le développement embryonnaire des insectes (Srivastava & Raizada, 2007; Correia *et al.*, 2013). De plus, il a un effet anti-appétant

entraînant par conséquent la mortalité de l'insecte. **Huang et al., (2004)** indiquent que l'application de l'Azadirachtine provoque une réduction de l'alimentation chez *Spodoptera litura* (Lépidoptère) et la mort des larves et des pupes. Il est aussi mortel chez de nombreux Coléoptères (**Shah et al., 2008; Martinez-Villar et al., 2005**). **Mehaoua et al. (2013)** ont prouvé que l'Azadirachtine est toxique sur les larves de *Apomyelois ceratoniae*, la pirale des dattes, pendant peu de temps d'exposition (24h) et qu'il cause une diminution de la fertilité des femelles.

6. Avantages et inconvénients de la lutte biologique

Avantages

D'après **Borowiec et al., (2011)**, les avantages de la lutte biologique sont multiples. Elle constitue, si elle est couronnée de succès, une alternative plus respectueuse de l'environnement et de la santé humaine que la lutte chimique. Par ailleurs, et même si cet aspect reste souvent peu ou mal chiffré, elle s'avère économiquement très bénéfique :

- d'abord, c'est une méthode de gestion durable des ravageurs, aucun phénomène de «résistance» de ravageur à un insecte auxiliaire n'ayant été documenté à ce jour;
- ensuite, elle ne nécessite pas (ou peu) d'interventions, ni de coûts particuliers une fois les phases initiales de recherche et développement et d'introduction de l'auxiliaire terminées.
- il s'agit enfin d'une méthode qui peut être déployée sur de vastes territoires, même peu accessibles, dans la mesure où la dispersion de l'auxiliaire se fait naturellement.

Inconvénients

Selon plusieurs sources (**OTA, 1995 ; Bouzerida et al., 2016**), la lutte biologique n'est pas parfaite et pourrait présenter des inconvénients non négligeables, tels que :

- La non spécificité de l'agent de lutte biologique. Il est essentiel de s'assurer qu'un organisme, introduit dans un milieu à des fins de lutte biologique classique ne s'attaque qu'au ravageur ciblé. Si l'auxiliaire n'est pas spécifique, il risque de s'attaquer à des espèces indigènes, de menacer la biodiversité et, ainsi, de troubler l'équilibre écologique.

- La contamination possible des auxiliaires introduits par des pathogènes ou par leurs propres ennemis naturels. L'opération de «purification» des auxiliaires est essentielle à l'introduction sécuritaire des auxiliaires. La présence de contaminants pourrait réduire l'efficacité de l'auxiliaire ou nuire aux organismes indigènes et à la biodiversité.
- La recolonisation de la niche libérée du ravageur ciblé: ainsi, il est possible qu'en diminuant l'abondance du ravageur ciblé, la niche ainsi libérée soit recolonisée par un nouveau ravageur. A titre d'exemple, il est possible que l'espace laissé par une mauvaise herbe contrôlée par la lutte biologique soit repris par une autre mauvaise herbe. Il est donc important de considérer ce risque avant l'introduction et de s'assurer que le ravageur n'est pas remplacé par un autre.
- L'éventuelle irréversibilité: ainsi, la lutte biologique a comme désavantage environnemental d'être difficilement réversible. Une fois qu'un organisme est bien implanté, qu'il se reproduit et se disperse, peu de choses sont possibles à faire afin de le stopper en cas d'effets indésirables.

7. Le marche phytosanitaire et les biopesticides

La protection des cultures contre les bioagresseurs a entraîné l'utilisation abusive de pesticides chimiques. L'usage de ces produits, engendre des impacts néfastes pour la santé humaine et animale. Face à cette problématique, les biopesticides se présentent comme le meilleur moyen alternatif de lutte. Ces biopesticides demeurent moins coûteux, efficaces et sans risque pour l'environnement et la santé humaine (Yeza, 2005; Gauthier, 2016; Rahmouni et al., 2017 ; Trizelia et al., 2017). Les biopesticides les plus utilisés sont des organismes vivants et qui sont pathogènes pour les bioagresseurs cibles. On trouve par exemple *Trichoderma* comme biofongicide, *Phytophthora* comme bioherbicide et *Bacillus thuringiensis* comme bioinsecticide (Gupta & Dikshit, 2010).

7.1. Le marché phytosanitaire mondial

Selon l'Union des Industries de la Protection des Plantes (UIPP), le marché des produits phytosanitaires dans le monde se chiffre à plus de 40 milliards de dollars, avec une croissance supérieure à 40% sur la période 2007-2012, alors qu'il était estimé à 30 425 millions de dollars en 2006 (Thiec, 2007).

Le marché des produits phytosanitaires est dominé par les géants mondiaux de l'industrie chimique, ce qui laisse peu de place aux nouveaux entrants. Selon les données, 80% du marché mondial des produits phytosanitaires est concentré entre les 6 géants du secteur. L'Europe demeure le premier marché phytosanitaire: 10,6 milliards de dollars en 2010 et 12,2 milliards en 2011. Elle se distingue par l'importance des fongicides (près de 37 % des ventes) et la faible consommation des insecticides (13,9 %). L'Amérique du Nord se place en 2^{ème} position avec 8 milliards de dollars dont 6,5 milliards concerne les seuls États-Unis. En 3^{ème} position se trouve l'Amérique du sud où le marché total des produits phytosanitaires est de 6 milliards de dollars. Concernant l'Asie, le premier pays consommateur de produits phytosanitaires en valeur est le Japon. La Chine arrive en deuxième position mais les chiffres sont sans doute sous évalués, puis l'Asie-Océanie. L'Afrique est loin derrière avec 1,3 milliard de dollars de ventes des produits phytosanitaires (**Gloria, 2012**) (**Figures 1 et 2**).

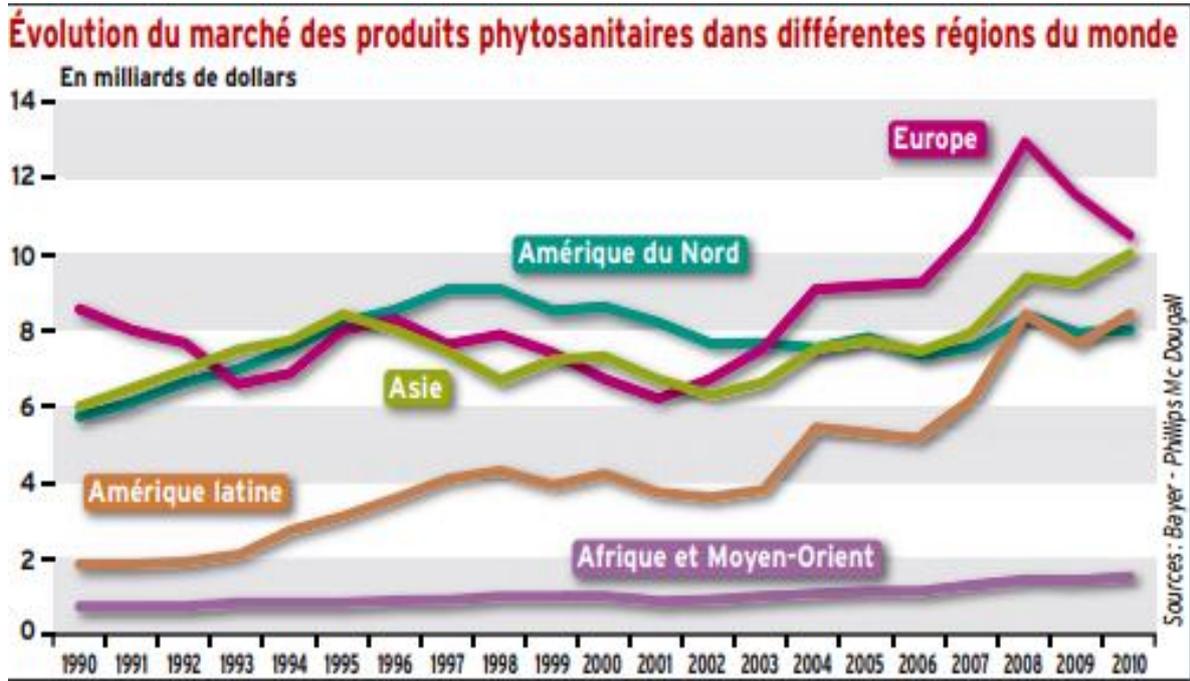


Figure 1: Evolution du marché des produits phytosanitaires dans différentes régions du monde (Gloria, 2012).

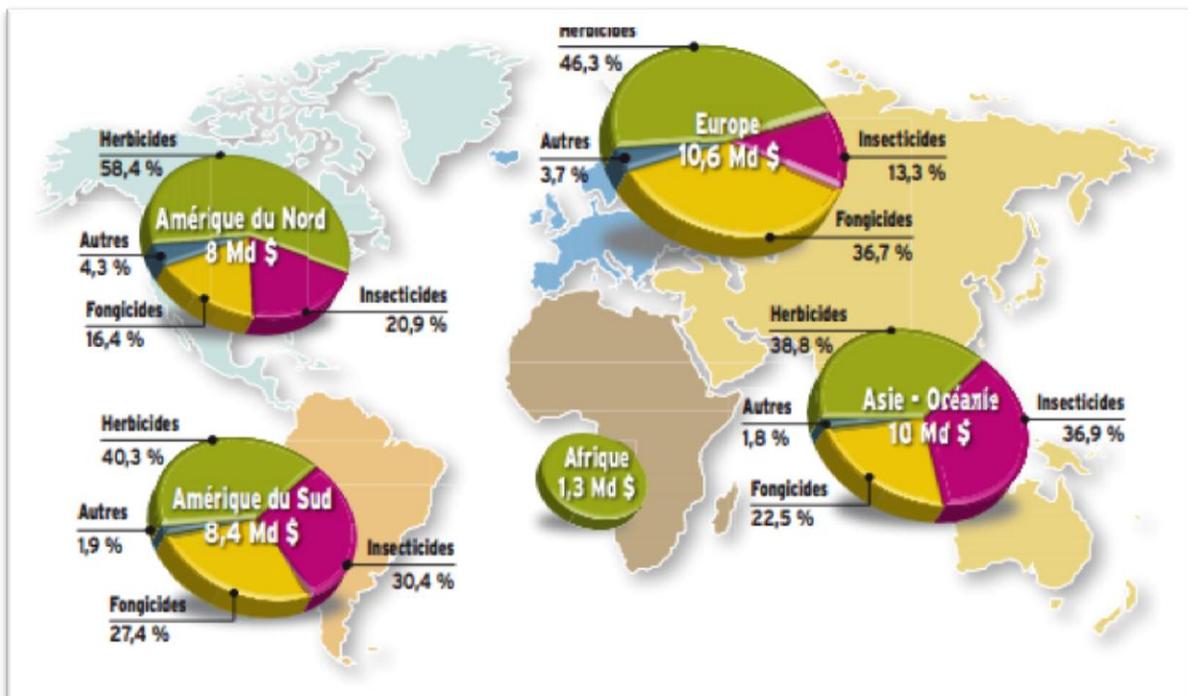


Figure 2: Répartition du marché phytosanitaire dans différentes régions du monde (Gloria, 2012).

7.2. Le marché des biopesticides

Le marché des biopesticides a atteint 1,6 milliards de dollars en 2009 et est passé à 3,3 milliards de dollars en 2014 avec un taux de croissance composé annuel (TCAC) de 15,6 %. Les pesticides synthétiques, par contre, représentent la plus grande part du marché, avec 41 milliards de dollars en 2009 et une valeur de 48 milliards de dollars en 2014 avec un taux de croissance annuel composé (TCAC) de 3 % (**Andry, 2005**). La plus grande utilisation de biopesticides se fait actuellement aux États-Unis, qui représentent plus de 44 % du total. L'Union Européenne et l'Asie viennent ensuite avec environ 20 % chacune, puis l'Amérique latine avec environ 10 % et environ 6 % pour l'Asie (**Deravel et al., 2013**).

En général, les différentes estimations indiquent que le marché des biopesticides est promis à un avenir prometteur bien que la part de marché qu'ils représentent actuellement est encore faible. Ainsi, le marché des biopesticides enregistre un taux de croissance de 10 à 15% contre 2% pour les pesticides de synthèse. De surcroît, une projection optimiste estime qu'en 2040, le marché des biopesticides atteindra 20% du marché mondial des produits de protection des plantes (**Regnault-Roger, 2005**).

Cette projection est renforcée par le fait que le coût et le temps pour commercialiser un biopesticide est de 2 à 10 millions de dollars et de 2 à 4 ans contre environ 100 millions de dollars et 7 à 10 ans pour un nouveau produit chimique. Progressivement, les traitements biologiques avancent et leur coût diminue car c'est aussi un facteur déterminant dans le choix du traitement pour l'agriculteur qui préférera un moindre coût à l'hectare (**INRA, 2010**).

Chapitre II :

LES BIOAGRESSEURS DES CULTURES

Le terme bioagresseur regroupe tous les organismes pouvant engendrer des dommages sur les cultures. Il peut s'agir d'agents pathogènes responsables de maladies, de ravageurs ou de plantes adventices. Mieux apprendre à les connaître nous permettra de mieux cibler les méthodes de luttés. Ci-dessous quelques définitions des différents bioagresseurs de cultures sont données :

1. Plantes adventices des cultures

Les adventices des cultures posent de sérieux problèmes à l'agriculture dans plusieurs pays à travers le monde (**Laraba, 2005**). Une adventice est, en botanique, toute plante qui, pour des raisons diverses, est introduite spontanément dans une nouvelle région et installée dans un peuplement végétal auquel elle est initialement étrangère (**Ambrosi et al., 2007, Brunel & Tison, 2005**).

2. Les agents phytopathogènes

Les maladies des plantes causées par ce qu'on appelle les agents pathogènes remettent en question les efforts des agriculteurs pour maximiser la production agricole à cause de leurs capacités à développer rapidement une résistance aux pesticides (**Suffert, 2003**). Ces maladies peuvent être dues aux agents non parasitaires (physiologiques) ou parasitaires (pathogènes) parmi lesquels on trouve :

Les champignons

Ce sont des organismes filiformes microscopiques ou macroscopiques, dépourvus de chlorophylle et des tissus conducteurs, mais pourvus de structures de reproduction (en général des spores). Les champignons peuvent être saprophytes (se nourrissent de matière organique morte) ou parasites (tirent leurs substances nutritives des plantes vivantes) causant 100000 maladies chez les plantes (**Small et al., 2011; Asselin, 2012; Everts et al., 2012**). Comme d'autres pays, les maladies dues aux champignons sont rencontrées en Algérie. A titre d'exemple, on trouve: les fusarioses qui affectent diverses cultures telles que les lentilles (**Belabid et al., 2004**), les pois chiches (**Bouregghda & Bouzned, 2009**) et le palmier

dattier (Sabaou et al., 1983), l'helminthosporiose (Merzougui & Aichour, 2013), les taches chocolat et la verticilliose (Bellahcene et al., 2005).

Les bactéries

Ce sont des cellules simples sans chlorophylle qui se reproduisent habituellement par division cellulaire et provoquent un ensemble de troubles spécifiques chez un hôte infecté. (Small et al., 2011 ; Asselin, 2012).

Selon Horquet (2007) et Aouar, (2012), les bactéries peuvent être :

- des bactéries pathogènes opportunistes: habituellement inoffensives qui deviennent pathogènes en présence de la plante compromise.
- des bactéries pathogènes strictes: qui sont toujours pathogènes. tels que *Erwinia* spp., *Agrobacterium tumefaciens* et *Streptomyces scabies*. Cette dernière affecte plusieurs cultures maraîchères (carottes, radis, betterave, etc), c'est aussi l'agent responsable de la gale commune de la pomme de terre

Les virus

Les virus représentent la forme la plus simple des organismes parasites. Ce sont des particules cristallines composées d'acide nucléique (ARN ou ADN) entouré par des protéines. Ils sont des parasites obligatoires incapables de poursuivre leur cycle à l'extérieur de leur hôte. Les petites particules virales peuvent être trouvées dans toutes les parties de la plante et ils ne peuvent pas être vues sans microscope électronique (Small et al., 2011). Ils sont le plus souvent transmis d'une plante à l'autre par un organisme tiers dénommé vecteur. *Tobacco mosaic virus* représente l'espèce la plus importante des virus qui attaquent les plantes (Scholthof et al., 2011).

Les nématodes

Les nématodes sont des vers ronds non segmentés, microscopiques qui vivent dans des matériaux du sol, l'eau et des plantes. La plupart des nématodes parasites des plantes causent des gales et des lésions aux racines, les font pourrir et peuvent retarder sérieusement leur croissance (Small et al., 2011 ; Asselin, 2012).

Les protozoaires

Ce sont des formes primitives d'animaux microscopiques. Quelques espèces ont été associées à certaines maladies des plantes (**Asselin, 2012**).

Les insectes

Les insectes ravageurs constituent l'un des facteurs de réduction les plus importants de la production agricole (**Abraz, 2015**). Les dommages qu'ils provoquent pendant les phases de cultures et durant le stockage, peuvent se révéler particulièrement importants, entraînant parfois même, en absence de traitement, la destruction du plant (**De Iara & Maure, 2017**).

3. Etude de cas: *Callosobruchus maculatus* (F).

Les cultures de légumineuses sont connues pour leur valeur nutritive et occupent de ce fait une place importante dans l'alimentation notamment dans les pays en voie de développement où la tendance est de répondre à certaines carences en protéines animales (**Ekeh et al., 2013**). Ces cultures font l'objet d'attaques par plusieurs insectes, aussi bien au champ que dans les stocks. Parmi ces ravageurs, les coléoptères et les lépidoptères sont le plus souvent rencontrés (**Johnson et al., 2006**) dont les bruches (Coleoptera:Chrysomelidae) qui sont les plus importants insectes ravageurs des légumineuses à grains (**Adebayo & Oka, 2017 ; Jafer & Annon, 2018**).

Ces insectes infestent les graines au champ et continuent de se multiplier pendant l'entreposage (**Chougourou & Alavo, 2011**). Les pertes occasionnées aux denrées entreposées par ces bruches sont très importantes. Cette présente étude s'intéresse à l'une des espèces qui causent le plus de dégâts aux stocks de légumineuses, à savoir *Callosobruchus maculatus* F., la bruche la plus répandue dans les régions chaudes et qui peut causer des dégâts pouvant atteindre 100% en Afrique tropicale (**Sharma et al., 2007 ; Khashaveh et al., 2011**).

3.1. Systématique et synonymie

Position systématique

Callosobruchus maculatus est une espèce cosmopolite d'origine inconnue et son affinité est subtropicale et tropicale (**El-Sabrouh & Bressac, 2012 ; Hadjel-Chebheb, 2014**). Cette espèce fut décrite pour la première fois par Fabricius en 1775 (**Aiboud, 2012**).

Actuellement, la classification phylogénétique a tendance à classer les bruches dans la famille des Chrysomelidae (**Kergoat et al., 2007**). La position systématique de *C. maculatus* est la suivante:

- **Règne:** Animalia
- **Phylum:** Arthropoda
- **Sousphylum:** Hexapoda
- **Classe:** Insecta
- **Ordre:** Coleoptera
- **Famille:** Chrysomelidae
- **Sousfamille:** Bruchinae
- **Genre:** *Callosobruchus*
- **Espèce:** *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775)

Synonymie

Selon **Delobel & Trans (1993)**, *C. maculatus* est connu sous de nombreux nomenclatures scientifiques et vernaculaires.

Noms vernaculaires :

- **Français:** *Bruche à quatre taches, Bruche du niébé, Bruche maculée*
- **Anglais:** *cowpea weevil, cowpea bruchid, southern cowpea weevil*
- **Arabe:** *سوسة البقوليات*

Nom scientifique :

Les synonymes suivants ont été donnés à cette bruche :

Noms scientifiques	Source
<i>Bruchus maculatus</i> Fabricius (1775)	Ouedraogo, (1978) ; Delobel et Trans (1993)
<i>Bruchus quadrimaculatus</i> Fabricius (1792)	Vazirani (1976) ; Delobel et Trans (1993) ;
<i>Bruchus ornatus</i> Boh.(1829)	Vazirani (1976)
<i>Bruchus vicinus</i> Gyllen (1833)	Vazirani (1976)
<i>Bruchus vicinus</i> Gyllen (1833)	Vazirani (1976)
<i>Mylabris quadrimaculatus</i> Fabricius (1887)	Ouedraogo (1978)
<i>Laria quadrimaculatus</i> Bedel (1901)	Ouedraogo (1978)
<i>Pachymerus quadrimaculatus</i> Schisky (1905)	Ouedraogo (1978)
<i>Callosobruchus maculatus</i> Fabricius, Bridwell (1929).	Vazirani (1976) ; Delobel et Tran (1993)

3.2. Description morphologique et développement

Le développement de *C. maculatus*, comme celui de la plupart des *Chrysomelidae*, passe par les stades suivants (**Ouédraogo, 1978**):

L'œuf: Mesurant 0,4 à 0,7 mm de long sur 0,3 à 0,4 mm de large (**Balachowsky 1962 ; Ouedraogo, 1991**). L'œuf est de forme ovoïde de couleur blanchâtre. Il est fermement attaché au testa de la graine par une substance émise par la femelle au moment de l'expulsion de l'œuf appelée spumaline (**Ilboudo, 2009**). Il est asymétrique et présente deux extrémités, une extrémité arrondie correspondant au pôle postérieur où on note la présence d'une protubérance appelée «tube respiratoire» qui jouerait un rôle dans le séchanges entre le milieu extérieur et l'intérieur de l'œuf (**Seck, 2009**). L'incubation de l'œuf dure 3 à 5 jours et aboutit à la formation de la larve néonate. Un œuf mal déposé ou faiblement adhérent au substrat avorte (**Ilboudo, 2009**). (**Figure 13, a**)

- **La larve:** La larve de cet insecte passe par 4 stades avant de se nymphosée. A l'exception de stade 1 qui se déroule à la surface de la graine, sous le chorion de

l'œuf, tous les autres stades passent à l'intérieure de la graine (**Kellouche, 2005**). L'éclosion se manifeste environ 6 jours après la ponte à une température de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ et une humidité relative de $70\pm 5\%$. La larve néonate dite primaire est de type chrysomélien apparaissant toujours à l'endroit de dépôt de l'œuf. Elle possède trois fines paires de pattes non fonctionnelles et une plaque prothoracique (**Ilboudo, 2009**). Elle reste sous le chorion de l'œuf pendant 24 à 48 h puis elle pénètre directement dans la graine en forant une galerie dans l'épaisseur du cotylédon (**Figure 13,b**). Après une première mue, elle perd ses pattes et sa dépouille larvaire et devient une larve secondaire de type rynchophorien à corps blanchâtre (**Abraz, 2015**) (**Figure 13,c**). Elle continue à creuser la galerie et l'élargit en une première logette où intervient la mue (**Ilboudo, 2009**). Elle subit ensuite les deux autres mues devenant ainsi larve de 3^{ème} et 4^{ème} stade (**Figure 13, d,e**). Ainsi, elle achève ses 4 mues en une vingtaine de jours (**Seck, 2009**). La larve de 4^{ème} stade présente un corps en arc de cercle, porte des pattes vestigiales et ne possède qu'un ocelle de chaque côté de la tête (**Delobel & Trans, 1993**). Cette larve n'est différente des larves L2 et L3 que par la taille. Elle continue à grossir en creusant une troisième logette à laquelle elle donne une taille et une forme définitives. Cette logette est arquée et tapissée d'acide urique. Elle n'est séparée de l'extérieur que par une fine membrane tégumentaire de la graine. C'est le lieu de la nymphose (**Ilboudo, 2009**).

- **La nymphe:** Au départ, la nymphe est blanchâtre et porte encore sur sa face ventrale l'exuvie de la larve de 4^{ème} stade. La nymphose a lieu dans la graine à l'intérieur d'une logette, aménagée par la larve 4 (**Abraz, 2015**) (**Figure 13, f**). Ses organes se sclérifient au fur et à mesure dans l'ordre suivant: les yeux d'abord, les pièces buccales et les antennes, les pattes, les élytres puis le corps tout entier pour aboutir à l'imago. Ce dernier reste à l'intérieur de cette logette pendant 24 ou 48 heures avant d'émerger (**Ouedraogo, 1978**).
- **L'adulte:** *C. maculatus* est un petit coléoptère de 2, 8 à 3, 5 mm de long (**Ilboudo, 2009**). Le corps est de forme oblongue et de couleur générale noire et rousse (tous les intermédiaires entre le noir et le roux existent), recouvert, chez les exemplaires frais, de soies dorées et blanches (**Ouédraogo, 1991**). Cette bruche se distingue de la bruche chinoise (*Callosobruchus chinensis*) par ses élytres plus longs que larges et son allure

plus allongée (**Camara, 1997**). Les élytres sont ornés de quatre taches noires, arrondies, placées latéralement, les deux plus grandes vers le milieu, les deux autres sur l'apex (**Abraz, 2015**). Le pygidium est allongé et entièrement noir ou roux à zones noires ; chez la femelle, il existe une ligne médiane de soies blanches (**Aïboud, 2012**). Les pattes sont d'un roux clair et plus ou moins marquées de noir. Les antennes sont crénelées à partir du 5^{ème} article et les derniers articles sont parfois assombris (**Hadjel-Chebheb, 2014**) (**figure 13, g**).

- **Dimorphisme:** La distinction entre les deux sexes se fait par l'observation de l'aspect général, le plus caractéristique est la coloration des élytres (ailes antérieures) et de la forme du pygidium (extrémité postérieure de l'abdomen) (**Figure 4**). Ce dernier est élargi et de couleur sombre sur les deux faces pour les femelles et petit et manqué de rayures chez les mâles. Les femelles sont de taille plus grande et de couleur plus foncée, contrairement aux mâles qui sont de couleur brun clair (**Beck & Blumer, 2007**). Les antennes sont noires avec les 4 premiers articles roux. Chez les mâles, elles sont plus élargies à partir du 7^{ème} article mais certaines femelles ont les antennes entièrement rouges. L'espèce est ailée, bien qu'il existe des formes brachyptères ou aptères (**Aïboud, 2012**).
- **Le polymorphisme imaginal:** Il existe chez *Callosobruchus maculatus* un polymorphisme imaginal induit pendant le développement embryonnaire et/ou post embryonnaire. Il dépend des conditions de température et de teneur en eau des graines dans lesquelles a lieu le développement (**Ouédraogo et al., 1991**). Deux formes d'adultes ont été décrites et caractérisées par **Utida (1954 ; 1972)**. Ces deux formes diffèrent par des caractères morphologiques, physiologiques et comportementaux (**Camara, 1997**) :
 - ✓ **-La forme non voilière (polyvoltine):** ses adultes sont incapables de voler, leurs muscles alaires ne sont pas fonctionnels (ne se déplacent que par la marche). Ils représentent le morphe adapté aux systèmes de stockage. La coloration du corps est généralement brun rougeâtre et les antennes des adultes de la forme non voilière sont plus longues que celles des adultes voiliers (**Abraz, 2015**).
 - ✓ **La forme voilière (monovoltine):** les adultes sont d'excellents voiliers et constituent cependant la forme de dissémination la plus courante de

l'infestation du niébé dans les champs. Le corps à une coloration générale brun noir à gris noir (**Ilboudo, 2009**). Son apparition au cours du développement post-embryonnaire dépend surtout des facteurs abiotiques tels que la teneur en eau de la graine et la température (**Ouedraogo et al., 1991**). D'après **Delobel & Trans (1993)**, les femelles pondent dans les champs sur les gousses en voie de maturation ou sèches. La forme voilière apparait au cours du stockage; elle est surtout constituée d'adultes diapausants qui survivent dans la nature. Ces adultes coloniseront les cultures et deviendront reproducteurs lors de la phase de floraison et de fructification de la plante-hôte.

3.3. .Génétique

Callosobruchus maculatus a un caryotype de dix paires de chromosomes ($2N = 20$) (**Yadav, 1971**). Le chromosome 10 est le chromosome sexuel. Les mâles de bruche sont hétérosexuels. Le caractère mendélien a été décrit pour les coléoptères des haricots, la couleur du corps est autosomique et a des allèles à dominance incomplète (**Eady, 1991**). D'autre part, la variation héréditaire de la taille corporelle est bien décrite (**Fox et al., 2004**), de même que les traits de vie et de comportement tels que la longévité et la durée de la copulation (**Brown et al., 2009**). Certains gènes ont été isolés et caractérisés, par exemple, par des gènes ayant une régulation de transcription pertinente pour l'environnement (**Chi et al., 2011**). La base de données nucléotidiques dans le NCBI GenBank a plus de 80 entrées pour *C. maculatus*. Lorsqu'une séquence génomique complète devient disponible, on peut y accéder en entrant "*Callosobruchus*" dans le moteur de recherche « **NCBI Entrez** ».

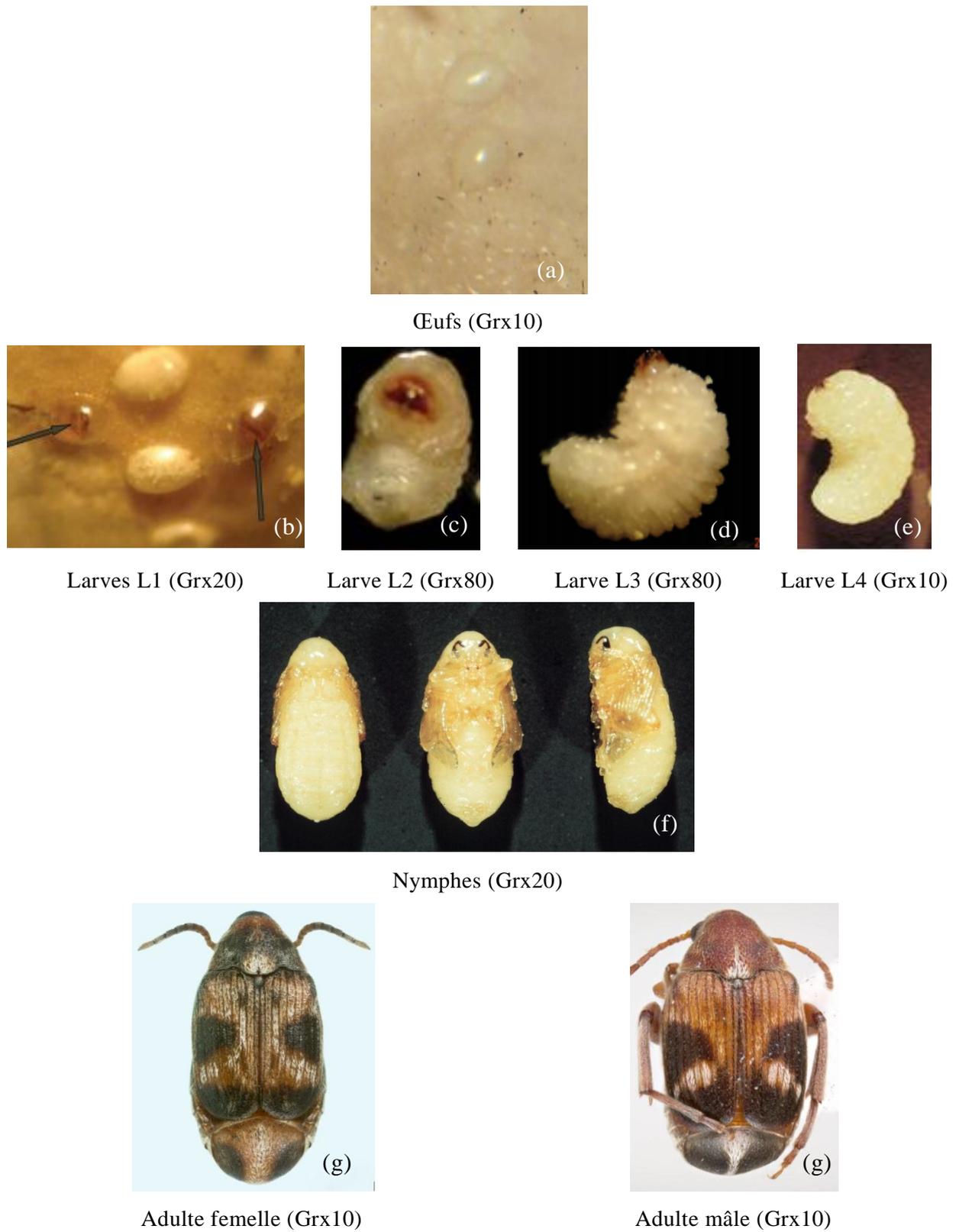


Figure 3: Les différents stades de développement de *Callosobruchus maculatus* (Ait Aider, 2017)



Figure 4: Détails schématisés montrant les différences de la face dorsale entre le mâle et la femelle de *Callosobruchus maculatus* (Brown & Downhover, 1988).

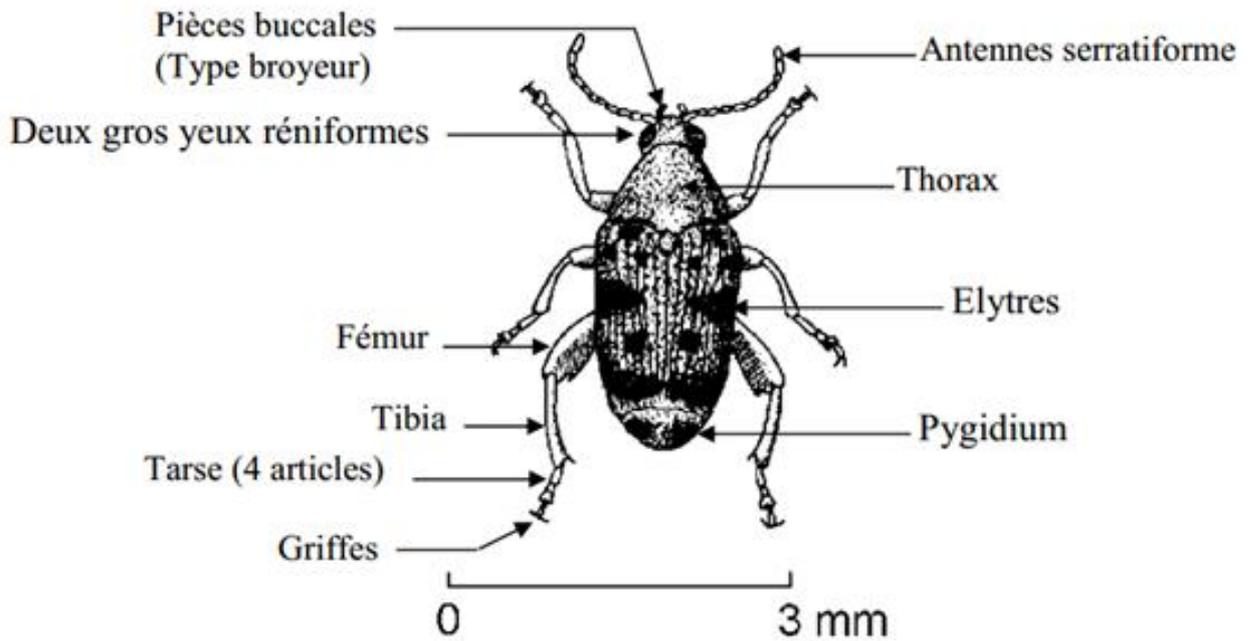


Figure 5: Détail de la morphologie de la femelle de *Callosobruchus maculatus* (Aïboud, 2012).

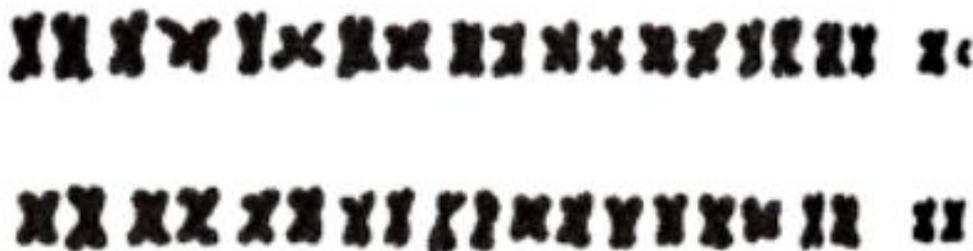


Figure 6: Le caryotype de *Callosobruchus maculatus*.

La **Figure 5** montre le détail de la morphologie d'une femelle et la **Figure 6** représente les dix paires de chromosomes d'un mâle. Les paires de chromosomes du côté droit sont les chromosomes sexuels (Yadav, 1971).

1.1. Ecologie et cycle biologique

La plante hôte la plus fréquente de *C. maculatus* est le niébé, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. En Afrique, l'insecte a été collecté des graines de *Vigna radiata*, de *Vigna subterranea*, de *Vigna angularis*, de *Murotyloma geocarpum*, de *Cajanus Cajun* et même d'une césalpiniaçée (*Cassia occidentalis*) au Sénégal (**Delobel & Tran, 1993**).

Dans les entrepôts surtout mal appropriés, les insectes trouvent toutes les conditions favorables pour se développer à partir des formes résistantes contenues dans les graines (**Camara, 1997 ; Beck & Blumer, 2007 ; Ilboudo, 2009**). Les femelles sont réceptives dès l'émergence. Après l'accouplement (**Figure 7, a**), elles pondent sur les gousses, de préférence mûres ou directement sur les graines dans les cultures ou dans les stocks (**Figure 7, b**). On compte 30 à 100 œufs par ponte, cette dernière se prolonge de 15 jours à 01 mois (**Aiboud, 2012**). Selon **Kellouche (2005)**, la durée du cycle du développement (de l'œuf à l'adulte) est en moyenne de 28 ± 3 jours dans les graines de pois-chiche et même au-dessous de 20 jours en conditions de haute température et de faible humidité relative (**Sanon & Ouédraogo, 1998**). L'incubation des œufs dure environ 1 semaine, le développement larvaire 15 jours et la nymphose 6 jours (**Aiboud, 2012**). L'éclosion se manifeste de 3 à 4 jours après la ponte dans les conditions les plus favorables, mais à basses températures, l'incubation peut se prolonger pendant plusieurs semaines (**Ilboudo, 2009**). Les larves néonates pénètrent dans les graines immatures qui poursuivent leur développement et mûrissent. Au terme de leur développement, les larves détruisent l'enveloppe interne des graines pour y faire leur loge de nymphose et consomment les réserves contenues dans les cotylédons (**Arumugam et al., 2016**). La suite du développement passe par 3 autres stades larvaires (**Figure 7, c**) et par un stade nymphal (**Figure 7, d**) duquel sortira la bruche adulte (**Camara, 1997**). Les adultes sont matures 24-36 heures après l'émergence et peuvent vivre en moyenne entre 12 et 14 jours à 25-30° C, selon le même auteur (**Figure 7, e**). Ils sont tellement bien adaptés aux conditions de stockage, qu'ils ne nécessitent ni eau ni nourriture pour se reproduire (**Moumouni et al., 2013**). A la fin de la saison sèche, lorsque les graines sont fortement dégradées et que les variations climatiques annoncent le début de la saison des pluies, les individus de la forme voilière émergent dans les stocks (**Ouédraogo, 1991**).

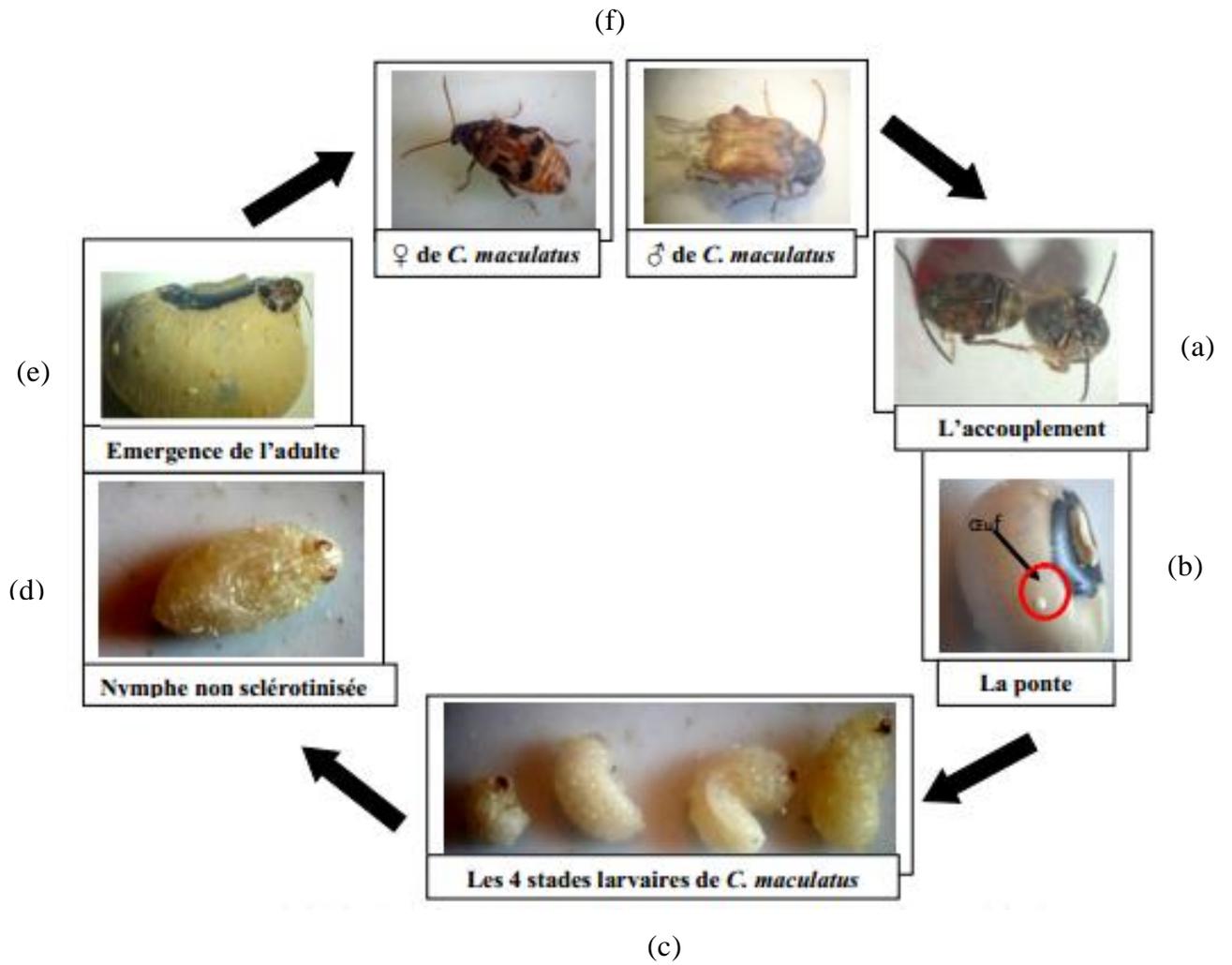


Figure 7: Cycle biologique de *Callosobruchus maculatus* (Abraz, 2015).

1.2. Dégât et importance économique

Callosobruchus maculatus est le principal ravageur économiquement important des graines de légumineuses (Ekeh et al., 2013). Il peut causer des pertes allant jusqu'à 30 % au bout de deux mois, voire 100% en quelques mois (Ayodele et al., 2011).

Adultes et larves sont responsables des dégâts commis sur les graines qui deviennent impropres à la consommation et difficilement commercialisables en raison de divers détritiques qui s'y accumulent et notamment la présence d'azote sous forme d'acide urique toxique à l'intérieur des graines du niébé (Ndoutoume-Ndong & Rojas-Rousse, 2007). Les signes d'infestation sont les trous de sortie des insectes ayant un diamètre de 2, 5 mm (Kellouche, 2005). La bruche du niébé cause non seulement une réduction directe du poids sec, mais également une diminution de la viabilité des semences et leurs potentiels germinatifs. Les graines percées sont souvent décolorées et dégagent une odeur déplaisante.

Callosobruchus maculatus est responsable de la destruction de 50% des graines de niébé au Brésil et entraîne une perte de 50% de la valeur marchande. Au Nigeria, les pertes avoisinent 2900 T/an (Caswell, 1960). Dans ce même pays qui est le plus grand producteur mondial (900.000 T/an), Singh et Yadv(1999) évaluent les pertes à plus de 30 millions de dollars. Au Niger, cet insecte entraîne la perte de 30% de la production nationale (Alzouma, 1995). Au Sénégal, 90% des graines peuvent être endommagées après 6 mois de stockage (Seck, 1992).

Assurément, c'est cette particularité biologique de causer des dégâts aux champs et dans les stocks, qui rend ce ravageur très redoutable. L'ampleur des dégâts varie selon le niveau de l'infestation initial, la durée et les techniques de stockage. L'infestation des graines affecte leur valeur nutritive et leur qualité organoleptique et peut finalement rendre le stock inconsommable (Djossou, 2006). De plus, cet insecte est de nos jours, signalé comme étant polyphage attaquant plusieurs autres légumineuses. Il est également cosmopolite notamment dans la plupart des régions tropicales et subtropicales, constituant ainsi une menace mondiale au secteur agricole de l'Afrique et de l'Asie qui produisent de grandes quantités de légumineuses (Zekaya et al., 2014). L'intérêt économique de cet insecte justifie donc son choix pour notre étude.

Chapitre III

PRESENTATION DE L'ESPECE VEGETALE ETUDIEE:***DITTRICHIA (INULA) VISCOSA (L) GREUTER***

L'utilisation des plantes médicinales par l'homme est une pratique antique. De nos jours, la majorité des habitants du globe terrestre utilisent de très nombreuses plantes, compte tenu de leurs propriétés aromatiques, comme source d'assaisonnement ou comme remède en médecine traditionnelle (Merghoub et al., 2011). Parmi ces plantes figure *Dittrichia (Inula) viscosa*.

1. Généralités sur *Dittrichia viscosa (L) Greuter*

Le genre *Dittrichia* appartient à la famille des Astéracées (ou des composées) qui est l'une des plus répandues dans le règne végétal. Le mot «Aster» du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. Cette famille compte environ 25000 espèces réparties en 1300 genres (Lee, 2004), ce qui représente environ 8 à 10% de toutes les plantes à fleurs. *Dittrichia* spp. Regroupent environ 90 espèces. Ce sont des plantes herbacées vivaces, à feuilles alternes, à capitules jaunes, contenant à la fois des fleurs tubuleuses et des fleurs ligulées. Les bractées sont en plusieurs séries. Les fleurs périphériques sont pistillées, à ligules tridentées, à anthères sagittées à la base. Les achènes sont munis de côtes, à aigrette simple. Ce genre est distribué principalement dans le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France...), Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc...) (Paquet, 2014 ; Al-Masri et al., 2015).

Dittrichia viscosa est une plante pérenne dont l'ancien nom du genre (*Inula*) auquel appartenait l'espèce viendrait du grec: Inéoqui signifie-je purge (Allusion à une propriété thérapeutique de la plante) et *viscosa* veut dire visqueuse, d'où vient le nom «Aunée visqueuse» (Merghoub et al. 2011; Deghdek & Zaitar, 2014). La position systématique de cette plante est comme suit :

- **Règne:** Végétal
- **Embranchement:** Spermaphytes
- **Sous-embranchement:** Angiospermes
- **Classe:** Dicotyledones
- **Sous-classe:** Gamopetales
- **Ordre:** Campunulales
- **Famille:** *Asteraceae* ou *composeae*
- **Genre :** *Dittrichia*
- **Espèce:** *Dittrichia viscosa* (L) Greuter

(Source: APG III, 2019)

2. Synonymie :

D'après **Brullo & De Marco (2000)** et **Dobignard & Chatelain (2011)**, cette plante est connue également sous les noms suivant;

- *Erigeron viscosum* L.
- *Senecio littoralis* Scop.
- *Solidago viscosa* L.
- *Paniopsis viscosum* Raf.
- *Pulicaria viscosa* L.
- *Cupularia viscosa* L.

3. Noms Vernaculaires

Selon **Boumaza (2011)**, l'inule visqueuse est connue sous les appellations suivantes :

- Noms arabes: El Tibek. El Tayoun. El Rassen El Dabik, Trehla et chez nous elle s'appelle Megremen, Safsak, Mersit, Hfina. En Tamazirt c'est Afjded, Niret. Tlirine. Elle n'était pas connue chez les anciens herboristes.
- Noms français: Inule visqueuse, Aunée visqueuse
- Noms anglais : *Rock Flea* - *Bane* .
- En Espagne, on la trouve sous plusieurs noms populaires comme: Jolivarda, Joliverda, Xolivarda, Olivarda.

4. Répartition géographique

Le genre *Dittrichia* est largement répandue dans tout le bassin méditerranéen, en Europe (Espagne, France...), en Asie (Chine, Turquie, Japon, Korea...) et en Afrique (Egypte, Algérie, Maroc...) (Benhammou, 2006 ; Benguerba, 2008) où il affectionne les sols salés, les prairies humides et les bords de cours d'eau (Sbahi, 2017). *Dittrichia viscosa* se rencontre dans les lieux peu propices à la végétation: bords de chemins, décombres, terrains abandonnés, jachères, garrigues. Elle affectionne les lieux fraîchement perturbés par les travaux ou le passage du feu, et pousse autant sur les sols argileux que sableux et apprécie les sols secs et calcaires formant d'abondantes touffes vertes à capitules jaunes, elle est considérée comme assez envahissante (Cicarelli et al., 2007 ; Deghdek & Zitar, 2014).

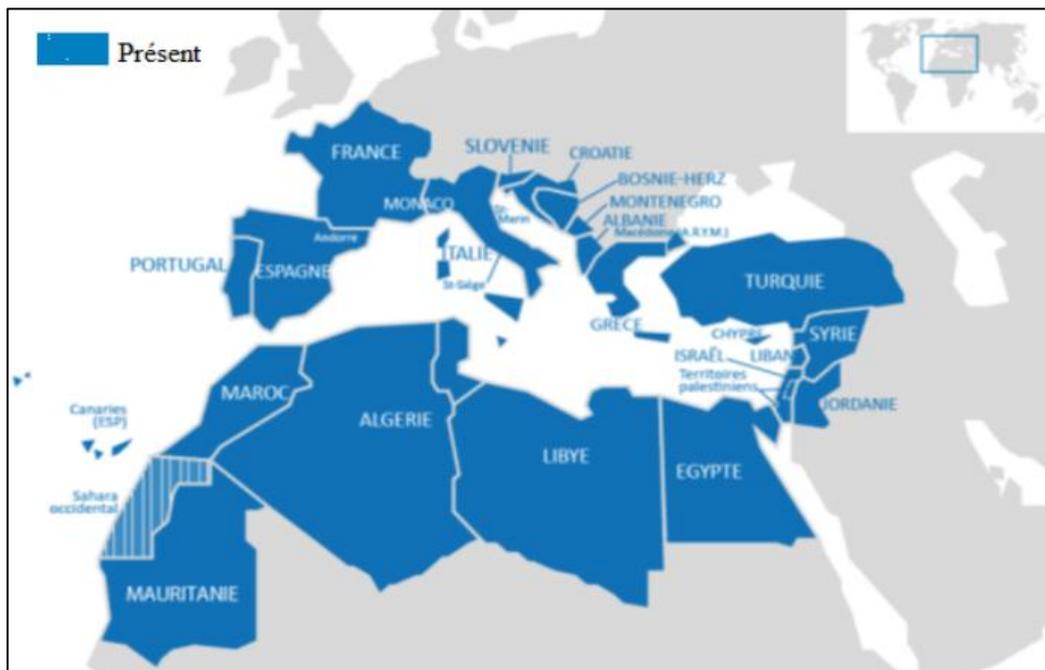


Figure 8: Répartition géographique du genre *Dittrichia* (Benyahia, 2014).

5. Caractéristiques morphologiques

Selon **Quezel & Santa (1963)**, l'inule visqueuse est une plante annuelle herbacée, mais la plupart des auteurs rapportent que l'inule est une plante herbacée pérenne ou vivace puisque les branches ligneuses bourgeonnent à chaque printemps et sont dans la partie inférieure (**Sbahi, 2017**). Elle est hémicryptophyte à chaméphyte visqueuse et glanduleuse, à odeur forte, entomogame (par les insectes) et anémochore (par le vent). Les tiges sont frutescentes à la base, dressées en éventail, assez ramifiées et pourvues d'un feuillage dense. Avec l'âge, elles deviennent ligneuses et foncées à la base (**Benhammou, 2012 ; Lecomte, 2015**). Les feuilles sessiles sont insérées directement sur la tige avec une forme ondulée, alterne, allongée à lancéolée. La base du limbe des feuilles semble entourer partiellement la tige. Leur marge est lisse ou dentée avec un sommet aigu (**Ait Youcef, 2006, Bouhadjera, 2017**). La plante est couverte de poils glanduleux qui libèrent une résine odoriférante et collante (**Reeb, 2010**).

Chez *D. viscosa*, dont les pieds peuvent atteindre 150 cm de hauteur et un mètre de largeur, la floraison commence à partir du mois de Septembre (**Warlop, 2006**). Les inflorescences consistent en des capitules floraux assez gros, multiflores, radiés et formant de longues grappes pyramidales à forte odeur et présentent de nombreux capitules à fleurs fertiles jaunes au sommet de la tige. Les fleurs périphériques sont liguliformes, celles du centre sont tubulaires (**Deghdek & zaitar, 2014**). Les fruits sont des akènes (fruits secs) velus, un peu ovoïdes, et sont surmontés par une petite aigrette jaunâtre de soies denticulées (**Sbahi, 2017**) (**Figure9**).

Selon **Bouhadjera (2017)**, la formule florale des fleurs de *D. viscosa* est la suivante :

$$10S+10P+ (5 \times 4) E+2C$$

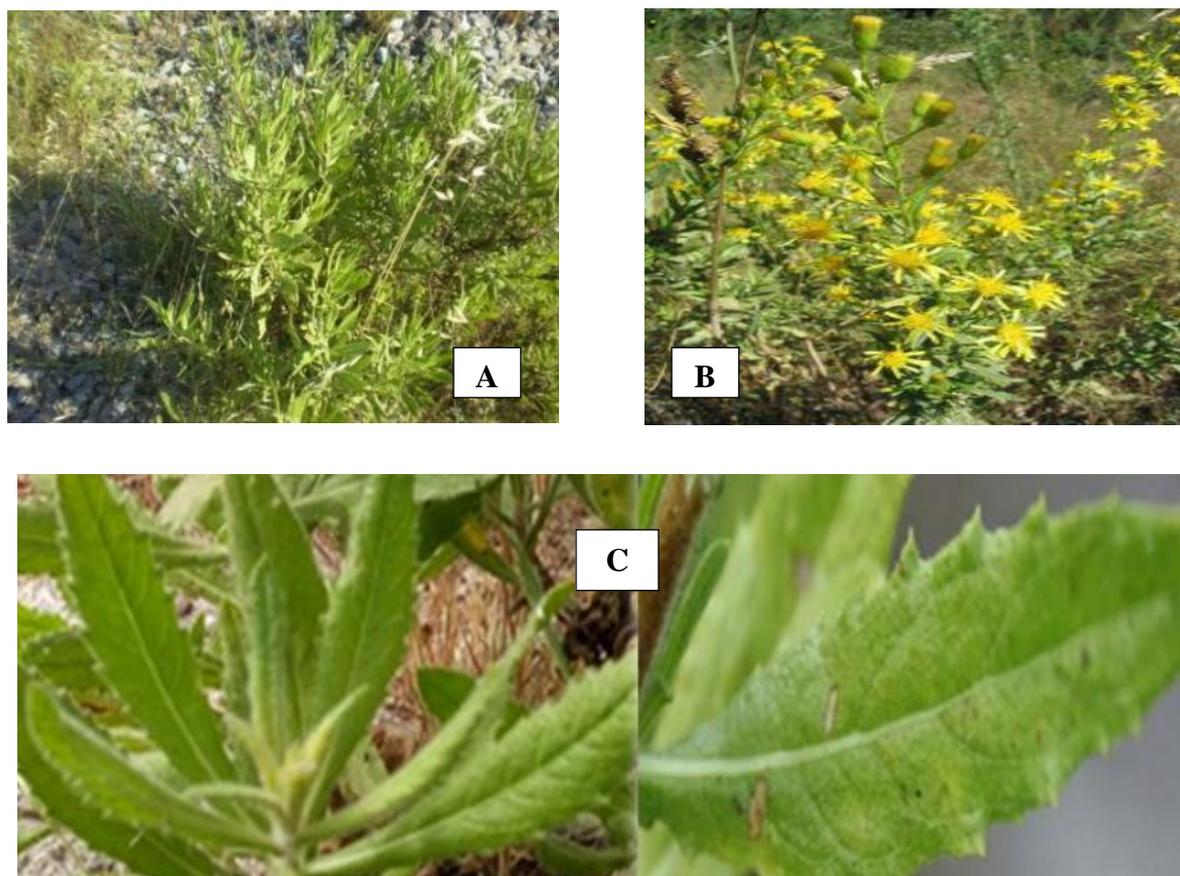


Figure 9: *Dittrichia viscosa*, aspect de la plante.

A/ Aspect général de la plante (photo prise pendant la collecte de la plante) ; B/ Aspect des inflorescences ; C/ Détail de l'aspect des feuilles.

Composition chimique

Beaucoup de contributions concernant la composition chimique de *D.viscosa* ont été rapportées. Une étude menée par **Benayache et al., (1991)** sur les parties aériennes de cette plante a montré sa richesse en flavonoïdes, en terpènes et en lactones sesquiterpéniques. Alors que les racines contiennent de nombreux composés: l'Inuline, l'Helénine ou Camphre d'Aunée (**Fournier, 1947**), de la paraffine et 3 sesquiterpènes essentiels: l'Alantole, l'Alantolactone et l'Acide Allantique (**Annexes 1, 2, 3**). En plus de ces substances on peut trouver également des substances mineures comportant des résines et des pectines constituant une matière noirâtre: la phytomélane (**Oksöz, 1976 ; Benchohra et al., 2011**).

6. Usages traditionnels, propriétés biologiques et pharmacologiques

Utilisation de *Dittichia viscosa* dans la pharmacopée

Les effets thérapeutiques de cette plante sont très diversifiés et connus depuis longtemps dans les médications traditionnelles. De nombreuses études ont démontré une gamme élargie des activités biologiques de cette plante, à savoir l'effet anti-inflammatoire (**Zeggwagh et al., 2006 ; Hernandez et al., 2007**), antiviral (**Sassi et al., 2008**), antitumoral, antiseptique, antibactérien, cicatrisant, et antifongique. Elle est également couramment utilisée pour sa large durabilité de conservation alimentaire. Elle peut donc être exploitée dans l'industrie agroalimentaire afin d'accroître la durée de vie de certains produits (**Lakhdar, 2015 ; Side Larbi et al., 2016**).

Effet antifongique

Les études menées sur les différents extraits de *D. viscosa* ont montré la présence d'une activité biologique variable sur différentes souches fongiques dans des systèmes agricoles à petite échelle dans lesquels les fongicides de synthèse ne sont pas économiquement faisables (**Tegegne & Pretorius, 2007**). Dans ce contexte, plusieurs études ont été menées dans le but d'identifier les substances antifongiques produites par les plantes (**Sas-Piotrowska & Piotrowski, 2010**). À titre d'exemple, **Benhammou, (2006)** a testé *in vitro* l'effet des huiles essentielles extraites à partir de cette plante sur un ensemble de moisissures phytopatogènes. Les résultats obtenus ont révélé un pouvoir antifongique dont les pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne étaient les plus élevés chez *Fusarium* spp. et pouvaient atteindre 100% pour *Microsporum canis* et *Microsporum gypseum*.

Effet antibactérien

Après une étude floristique, biogéographique et ethnobotanique de *D. viscosa*, **Bssaibis et al., (2007)** ont abordé le volet phytochimique et l'activité biologique de cette plante. Les études menées sur les différents extraits de la plante ont montré la présence d'une activité biologique variable sur différentes souches bactériennes. Ces mêmes auteurs ont trouvé une activité antibactérienne optimale avec l'extrait des fleurs au méthanol qui présentaient une activité inhibitrice sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* jusqu'à la dilution 1/100.

Effet cytotoxiques et génotoxiques

L'effet cytotoxique et génotoxique des extraits de feuilles de *D. viscosa* sur les cellules du méristème des racines d'*Allium cepa* ont été examinés par **Aşkin Çelik & Aslantürk, (2010)**. Cette étude a montré que l'effet inhibiteur de la croissance des racines en fonction de la concentration des extraits a été statistiquement significative en comparaison avec les groupes témoins, et que cet effet a été observé sur les cellules membranaires dans les groupes traités avec 5 mg / ml et 10 mg / ml d'extraits, ce qui explique le phénomène de cytotoxicité chez l'*Allium cepa*.

Effet insecticide

L'*Inule visqueuse* est réputée comme étant un "insecticide végétal" qui combat la mouche de l'olivier. Des observations faites en Grèce ont montré que dans une oliveraie "rénovée", l'arrachage de l'*Inule* a été suivi d'une attaque de la mouche de l'olivier, ce qui indique bien la relation *Inule-Olivier* connue par les anciens, en langue corse, 'Pecita' (**Bssaibis et al., 2009**).

Effet herbicide

Selon **Omezzine et al., 2011**, *D. viscosa* est largement utilisée comme un herbicide naturel grâce à son pouvoir allélopathique et sa capacité à réduire la germination et l'émergence de plusieurs mauvaises herbes (*Raphanus sativus*, *Peganum harmala* and *Silybum marianum*).

Effet nématocide

Les extraits de *D. viscosa* ont un potentiel en tant que nématocide naturel. Les travaux de **Oka et al., (2006)** ont montré que les extraits obtenus des feuilles sèches de cette plante avec un mélange d'acétone et n-hexane ou n-hexane seul, suivi par l'évaporation des solvants ont montré une efficacité dans le contrôle de *Meloidogyne javanica* dans les conditions du laboratoire, en chambre de culture, en microparcelles et lors d'expériences sur le terrain. Les extraits pouvaient tuer ce nématode dans le sable à une concentration de 0,01% ou plus et réduisaient l'indice de grippage des plantules de concombre ainsi que l'indice de grippage et le nombre des œufs du nématode sur les plants de tomates dans les expériences en chambre de culture.

PARTIE II

MATERIEL ET METHODES

Chapitre I

EXTRACTION ET PURIFICATION DES METABOLITES

Dans cette partie, nous donnons des informations sur la collecte et la préparation de la plante utilisée pour l'extraction, à savoir *Dittrichia viscosa*. Nous décrivons également les méthodes d'extraction et de chromatographie permettant l'obtention des métabolites et les extraits organiques que nous avons testés.

1. Matériel végétal utilisé

Des échantillons de *D. viscosa* ont été collectés dans différentes régions du Nord de l'Algérie (dans l'Algérois, à Boumerdès et à Khemis El Khechna) durant la période s'étalant d'octobre à décembre 2013.

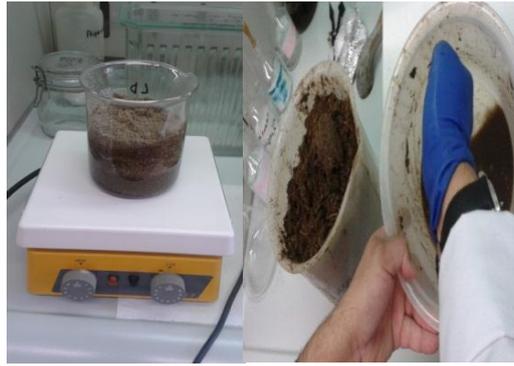
Les échantillons consistaient en la partie aérienne (tiges feuillées) de la plante. Dès leur récolte, les échantillons ont été placés dans des sacs en papier puis transportés au laboratoire où ils ont été déposés sur du papier journal à température ambiante jusqu'à leur séchage total. Le matériel végétal a été par la suite broyé à l'aide d'un broyeur ordinaire, pour obtenir une poudre fine, puis conservé dans des sachets sous vide jusqu'à utilisation.

2. Extraction et purification des métabolites de *Dittrichia viscosa***2.1. Obtention de l'extrait organique**

Pour obtenir l'extrait organique, 400 g de la poudre végétale ont été mélangés avec un litre du mélange eau-méthanol [$\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{OH}$ (1: 1, v/v)]. La suspension a été maintenue sous agitation à température ambiante pendant 24 heures et puis macéré manuellement pour récupérer la phase aqueuse du mélange (**Figure 11, a**).

La phase aqueuse obtenue a été filtrée sous vide pour éliminer les restes de débris de la plante (**Figure 11,b**), puis extraite trois fois avec le dichlorométhane CH_2Cl_2 (3x400 ml), c'est l'étape de l'extraction proprement dite. Elle consiste à déposer le surnageant dans une ampoule à décanter, sur lequel on rajoute un volume (400 ml) de dichlorométhane. On observe alors la formation de deux phases dans l'ampoule à décanter. Le dichlorométhane étant plus dense que l'eau, il constitue la phase inférieure. Pour que l'extraction soit efficace, il faut agiter l'ampoule à décanter, en pensant à dégazer régulièrement, puis on laisse reposer le mélange pour bien

séparer la phase organique de la phase aqueuse. Par la suite, la phase organique, contenant le dichlorométhane et les métabolites, a été récupérée dans un erlenmeyer propre (**Figure11, c**). Les phases organiques dichlorométhanes ont été combinées, mélangées avec une petite quantité de sulfate de sodium (Na_2SO_4), pour l'élimination de l'excès d'humidité, filtrées et évaporées sous pression réduite, produisant un résidu huileux de couleur rouge-brun (**Figure11, d**).



a)- Agitation et macération manuelle de la poudre végétale -



b)- Filtration de la phase aqueuse à travers une pompe à vide et du coton stérile -



c)- Extraction par dichlorométhane -



d)- Evaporation du dichlorométhane et obtention de l'extrait organique -

Figure 11: Protocole d'extraction avec le dichlorométhane.

2.2. Purification des métabolites de *Dittrichia viscosa*

2.2.1. Principe des méthodes chromatographiques de séparation et de purification

Les méthodes chromatographiques telles que décrites par **Hainque (2008)**, sont des méthodes permettant de séparer les éléments d'un extrait végétal en solution plus ou moins complexe. Le mélange à chromatographie entraîné par une phase mobile circule au contact d'une phase stationnaire liquide ou solide. Des interactions physiques ou chimiques s'établissent entre la phase stationnaire, qui possède une très grande surface de contact, et les molécules à séparer. Des échanges rapides et réversibles se produisent dont la force dépend de la nature chimique des molécules à séparer. Celles-ci sont plus ou moins retenues selon l'importance de leur interaction avec la phase stationnaire. Les molécules sont alors entraînées chimiquement, ce qui permet leur séparation. Cette séparation peut être effectuée dans un but analytique quantitatif ou qualitatif ou dans un but préparatif

A. Chromatographies sur colonne :

Elle permet la séparation et l'isolement des constituants d'un mélange. Selon **Helmut (1969)**, elle présente, néanmoins quelques inconvénients parmi lesquelles on peut citer:

- De grandes quantités de solvants sont nécessaires à l'élution.
- La détection des composés exige une attention constante ...etc.

Principe de la technique :

Le principe de cette chromatographie est basé sur les phénomènes d'adsorption, d'une part les substances les plus polaires sont fortement retenues par l'adsorbant dans la colonne et d'autre part, les solvants polaires entraînent facilement les composés polaires. Les proportions des molécules adsorbées dépendent de leur nature et du pouvoir de dissolution de l'éluant.

Lorsque l'échantillon est déposé au sommet de la colonne, il est aussitôt adsorbé en une zone cylindrique. L'écoulement continu de l'éluant dans la colonne provoque alternativement la désorption et l'adsorption des molécules de l'échantillon. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant (**PCA, 2004**).

B. Chromatographie préparative sur couches minces

La chromatographie sur couche mince est une technique couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparatrice) (**Lagnika, 2005**). Elle est basée principalement sur les phénomènes d'adsorption, elle s'apparente étroitement à la chromatographie sur colonne au niveau des phases impliquées et du mécanisme mis en œuvre pour la séparation.

Principe de la technique

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption: la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire solide fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil (**Almela et al., 2006**).

Lorsque la plaque sur laquelle nous avons déposé l'échantillon, est plongée dans la cuve à CCM, le solvant monte par capillarité le long de la phase stationnaire et permet ainsi la migration de chaque composé de l'échantillon, chacun avec sa propre vitesse (**Andriamialihariso, 2011**). Cette dernière dépend d'une part des forces électrostatiques retenant le composé sur la phase stationnaire, et d'autre part de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption.

En chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires, ceci est valable lorsque l'éluant est à caractère peu polaire ou apolaire (**Andriamialihariso, 2011**). Le constant de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire /phase mobile donné est appelée facteur de rétention R_f (rapport entre la distance parcourue par la tache et la distance parcourue par le front du solvant de puis la ligne de dépôt). La comparaison des R_f entre les taches d'extrait avec des témoins connus permet l'identification de la nature des composés (**Hainque, 2008**).

2.2.2. Les séparations chromatographiques de l'extrait organique de *D. viscosa* :

A. Le choix de la colonne :

Le choix de la colonne et du type de silice dépend du poids de l'extrait (**Tableau 2**). Dans notre cas, on a utilisé une colonne à pression normale (type n°2) et la silice 60 (0.063-0.200 mm).

Tableau 2.Détails des colonnes à pression normale utilisées pour le fractionnement.

Type	Poids de l'extrait	Masse de la silice	Diamètre de la colonne	Hauteur de la silice obtenue
1.	15-500 mg	15g	30 mm	45 mm
2.	500 mg-3 g	30 g	40 mm	50 mm
3.	2-15g	100 g	70 mm	55 mm

B. Choix de l'éluant

Pour choisir le bon éluant nous avons fait des essais sur CCM avec différents éluants pour avoir une bonne séparation entre les produits, tout en recherchant un $R_f \sim 0,3$ pour le produit le moins polaire. L'extrait obtenu a été soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice et après plusieurs essais de systèmes de solvants nous avons opté pour le système suivant :Chloroforme/ Isopropanol (95:5), suivi d'un autre mélange Chloroforme/ Isopropanol (7:3), puis d'une élution finale avec du méthanol.

C. Préparation de la colonne

La réalisation d'une colonne impose le respect de certaines règles pour assurer une séparation efficace. Avant de commencer la manipulation, un morceau de coton a été placé au fond de la colonne puis recouvert de solvant, afin d'éliminer l'air emprisonné dans le coton. Par la suite, une suspension de silice dans l'éluant Chloroforme/ Isopropanol (95 :5) a été préparée. Le gel ainsi formé a été introduit dans la colonne avec un entonnoir. Une fois la silice déposée ; on rince les parois de la colonne avec l'éluant et on le laisse s'écouler, on s'assure régulièrement de ne pas assécher la phase stationnaire, en vérifiant qu'il reste toujours d'éluant au niveau de la silice (**Evidente, 2013**).

D. Chromatographie sur colonne de l'extrait de *Dittrichia viscosa*

Dans notre cas, la quantité de l'extrait de *D. viscosa* obtenue est très grande. Pour cette raison on n'a pas pu l'utiliser en entier car il aurait fallu utiliser beaucoup de solvant. Pour cela on a fait une imprégnation sur silice. Il s'agit de mélanger l'extrait dilué dans le chloroforme avec une quantité de silice jusqu'à l'obtention d'une mousse. Puis, le solvant a été évaporé sous pression réduite à une vitesse de 15 t/m et une température de 38°C jusqu'à la formation d'une poudre de silice d'une couleur brune (**Figure 12**).

Le solide obtenu a été déposé à l'aide d'un entonnoir sur le haut de la colonne remplie d'un gel de silice et contenant un volume de solvant. Par la suite, une petite quantité de l'éluant a été rajoutée à l'aide d'une pipette Pasteur, dont les premiers millilitres doivent toujours être ajoutés avec précaution afin de ne pas perturber la surface de silice (**Figure 13, a**). Ensuite, l'éluant a été rajouté plus rapidement en le versant directement dans la colonne. Le robinet a été laissé ouvert et l'extrait est entraîné par la phase mobile (**Figure 13, b**). Des fractions de 25 ml ont été recueillies et le suivi de ces fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support Aluminium (**Figure 13, c**).

Les résidus de la seconde et de la cinquième fraction ont montré la présence des métabolites majeurs. Ces derniers ont été ensuite purifiés (par colonne et CCM).



- Dilution de l'extrait et addition de la silice -



-Obtention de la mousse et évaporation du solvant -



- Obtention de la poudre de silice contenant l'extrait organique -

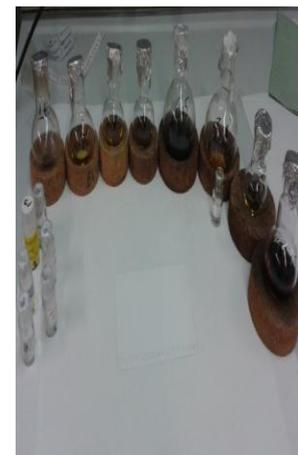
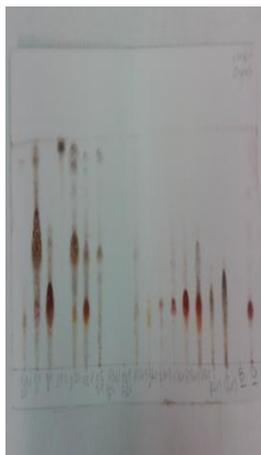
Figure 12: Imprégnation sur silice de l'extrait de *Dittrichia viscosa*.



a)- Dépôt de la poudre de silice imprégnée de l'extrait organique de *D. viscosa* -



b)- Addition du solvant et collection des fractions -



c)- TLC des fractions et évaporation du solvant -

Figure 13: Chromatographie sur colonne de l'extrait organique de *Dittrichia viscosa*

E. Chromatographie sur une couche mince

Cette méthode consiste à placer l'éluant choisi dans la cuve sur une hauteur de 2 cm et fermer hermétiquement. Par ailleurs, une ligne a été tracée au crayon sur la plaque TLC à 2 cm du bord horizontal et parallèlement à lui sans arracher le matériel (la silice) et sans le toucher avec les doigts. Par la suite, l'échantillon à analyser a été déposé sur le trait à l'aide d'un capillaire de manière à ce qu'il soit à 1,5 cm du bord latéral gauche et droit (**Figure 14, a**). Le dépôt doit se faire rapidement et sans appuyer, de façon à ce que la ligne formée n'excède pas 2 mm de diamètre et sans arracher la silice avec le capillaire. La ligne formée a été séchée et la plaque de TLC a été placée dans la cuve à chromatographie contenant l'éluant (Chloroforme/ Isopropanol). Ce dernier ne doit pas atteindre le trait de crayon et la cuve ne doit plus être manipulée (**Figure 14, b**). Après 45 min de développement, la plaque TLC a été retirée avec des pinces et séchée avec un sèche-cheveux (air froid) et visualisée sous UV dans une chambre noire (**Figure 14, c**).

F. Révélation des composés séparés

Lorsque les composants de l'échantillon analysé sont colorés, leur séparation est facilement observable sur la plaque ; dans le cas contraire, on doit rendre les bandes visibles par un procédé de révélation. Pour la CCM trois révélateurs peuvent être utilisés: l'Ultra Violet (UV), le Diode (I_2) et l'Acide sulfurique (H_2SO_4) (**Figure 15**).

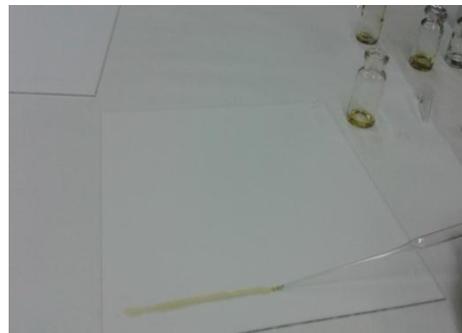
G. Calcul du Rapport Frontal, Rf

Le Rf (rapport frontal) est défini comme étant le rapport entre la distance parcourue par la substance et la distance parcourue par le front du solvant. Le Rf est une caractéristique d'un composé dans des conditions chromatographiques données: éluant, température, phase stationnaire (**Jurd, 1962**). En effet, les valeurs des Rf effectués sur des systèmes chromatographiques peuvent apporter beaucoup d'indications (**Benguerba, 2008**). On détermine pour chaque constituant le rapport frontal qui est compris entre 0 et 1.

$$R_f = D_x / D_y$$

Dx: distance parcourue par le composé (mesurée au centre de la tache).

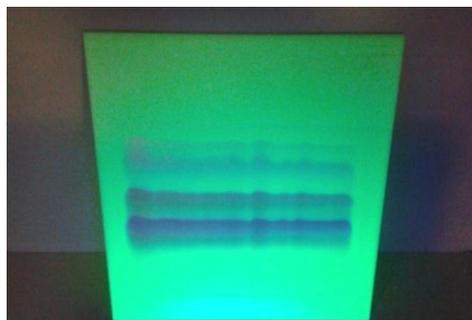
Dy: distance parcourue par le front du solvant.



a)- Préparation de la plaque de silice et dépôt d'une fraction-



b)- Migration des métabolites sur la plaque de silice.



c)- Visualisation des bandes chromatographique sous UV -

Figure 14: Chromatographie sur une couche mince.

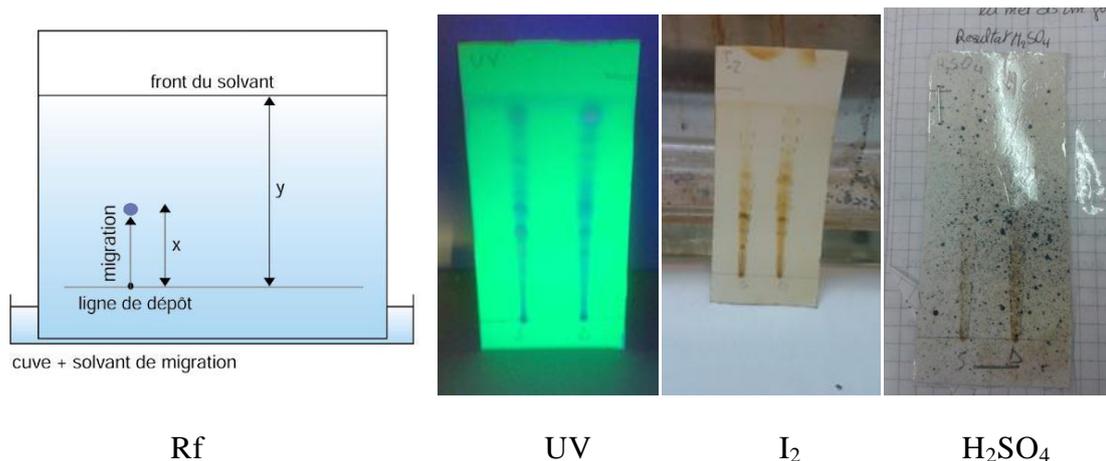


Figure 15: Rf et les différents types de révélation.

H. Récupération des métabolites à partir des plaques CCM

Une fois la migration effectuée jusqu'en haut de la plaque et après séchage, les bandes d'intérêt ont été d'abord délimitées, puis récupérées par grattage de la silice avec une spatule en prenant soin de placer sous la plaque une feuille d'aluminium qui servira à récolter la silice grattée (**Figure 16, a**). Par la suite, le complexe formé (métabolite/silice) est dissout dans le même solvant de migration puis filtré et évaporé sous pression réduite, le filtrat obtenu est ainsi à l'état pur ou à purifier encore par CCM ou par colonne (**Figure 16, b**).

3. Identification des métabolites par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'objectif de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est de déterminer la nature des atomes présents, leur nombre et leur enchaînement, et ainsi de connaître la structure totale d'une molécule organique.

Appareil de RMN et réalisation d'un échantillon

Les appareils de RMN permettent d'imposer un champ magnétique très intense. Les premiers appareils généraient un champ d'environ 1 T (tesla). On peut actuellement atteindre des champs de 23,5 T. Par comparaison, cela représente 500 000 fois le champ magnétique terrestre qui s'élève à $4,7 \times 10^{-5}$ T (**Figures 17 et 18**).

Principe de fonctionnement de l'appareil

La RMN tire des informations de l'interaction qui naît entre les noyaux des atomes de certains éléments présents dans l'échantillon et le champ magnétique intense et constant,

produit par un aimant auquel on le soumet (signaux de résonance). On utilise couramment les appareils de 400 MHz pour l'analyse chimique. Une excitation électromagnétique, autour de la fréquence est générée au sein de l'appareil. Son étendue en fréquence est suffisamment large pour pouvoir exciter l'ensemble des noyaux de la matière chimique que l'on veut étudier. Après excitation, les noyaux reviennent à leur état initial suivant un temps de relaxation qui leur est propre. L'énergie libérée lors de ce retour génère un petit courant, dans un circuit secondaire. C'est le signal que l'on détecte (**Navarrete Fuentes, 2011**).

Préparation de l'échantillon

- **Tubes RMN:** Les tubes RMN doivent satisfaire à certains critères de qualités nécessaires à la réalisation d'une bonne analyse. Avant d'être utilisés, les tubes doivent être propres et secs sans cassure ni fêlure (en proton la sensibilité est telle que toute impureté sera détectée ce qui pourra nuire à l'analyse et /ou à l'interprétation des données). La longueur minimale de ces tubes doit être de 170mm et de 5mm de diamètre pour éviter toute casse sur le passeur.
- **Nettoyage des tubes:** Après analyse, les tubes doivent être lavés le plus rapidement possible avec le solvant utilisé pour solubiliser le produit étudié. Après plusieurs rinçages, le tube est séché sous vide.
- **Remplissage des tubes:** La résolution dépend de l'homogénéité du champ magnétique, mais aussi du réglage fin de ce paramètre qui est réalisé de manière automatique sur chaque échantillon. Dans les conditions standards d'analyse pré-programmées sur l'appareil, l'homogénéité du champ a été calibrée à l'aide de tubes de références ayant une hauteur de remplissage constante de 4 cm soit 600µl de solvant. Afin d'être dans les conditions optimales de la mesure, il est nécessaire de respecter cette hauteur de solvant dans le tube.
- **Concentration des échantillons:** La sensibilité d'une expérience de RMN dépend des noyaux étudiés et de la concentration du produit. Dans les conditions standards pré-programmées sur l'appareil, une concentration de 0,6 M est nécessaire (dans 600µl de liquide). Soit pour exemple:
 - ✓ RMN1H ~ 5 mg
 - ✓ RMN13C en journée ~ 30 mg
 - ✓ RMN13C nuit ~ 10 mg

- **Choix du solvant:** L'échantillon à étudier (quelques milligrammes) est dissout dans un solvant qui ne contient aucun atome absorbant dans la zone de RMN du proton, c'est le Chloroforme deutéré CDCl_3 , où D est le symbole chimique du Deutérium.
- **Etiquetage des tubes:** Il est nécessaire d'étiqueter les tubes en inscrivant sur le haut du tube ou le bouchon au feutre noir indélébile, la référence du produit.
- **Passeur BACS, turbines:** Il faut prendre soin du passeur d'échantillon et des turbines en les manipulant avec les mains propres, sans gants (contient du talc). Une fois introduit dans une turbine, le tube est calibré en le mettant dans le calibre fixé au mur et en le poussant jusqu'au fond sans forcer. Les étapes de préparation d'un échantillon RMN sont présentées dans la **Figure 19**.



a)- Récupération de la silice -



b)- Rinçage de la silice et récupération des métabolites -

Figure 16: Récupération des métabolites à partir des plaques CCM.



1. Traitement de l'information. Visualisation du spectre.
2. Armoire informatique.
3. Aimant dans lequel est placé le tube contenant l'échantillon à analyser.

Figure 17: Chambre à RMN

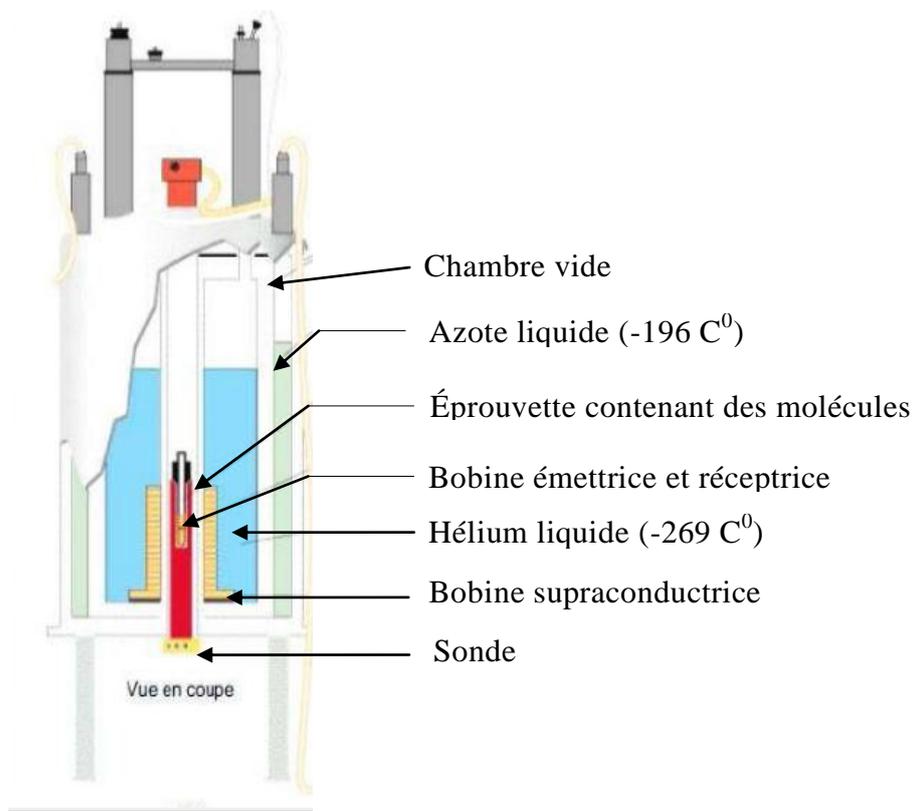
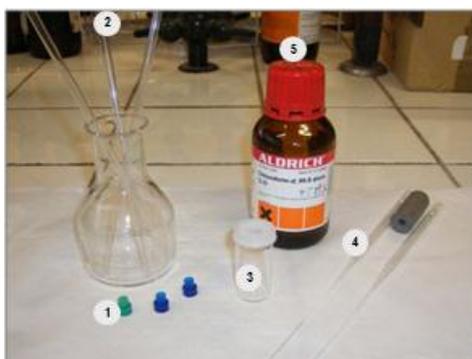


Figure 18: Différentes parties de l'appareil de RMN (Navarrete Fuentes, 2011).



- Le matériels nécessaire à la confection d'un échantillon:

1. Bouchons pour tubes RMN
2. Tubes RMN
3. Pilulier dans lequel est dilué le produit à analyser
4. Pipette Pasteur et poire de prélèvement
5. Solvant deutérié (CDCl_3)



- La mise en solution de l'échantillon contenu dans un pilulier. Dans notre cas, c'est un spectre proton H^1 , 1mg environ de composé à étudier est dissout dans 1 ml de solvant deutérié.



- L'ensemble est ensuite transvasé, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans le tube à RMN.



- Le tube avec son bouchon et son étiquette est prêt à être déposé dans l'aimant de l'appareil.

Figure 19: Préparation d'un échantillon RMN (Arnaud *et al.*, 2015).

Chapitre II

TESTS BIOLOGIQUES**1. Présentation des bioagresseurs des cultures testés****1.1. Matériel fongique**

Pour l'évaluation de l'effet de 4 métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa* sur la croissance mycélienne de champignons phytopathogènes, 9 souches fongiques ont été utilisées (5 souches de différentes espèces du genre *Fusarium*, une souche de *Botrytis cinerea*, une souche d'*Alternaria* sp., une souche de *Phoma medicaginis pinodella* et une souche de *Didymella pinodes*). Les détails sur les souches fongiques testées sont consignés dans le **Tableau 3** et leur aspect cultural est donné dans la **figure 20**

Tableau 3: Les souches fongiques utilisées et leurs origines.

Espèce fongique	Origine	Hôte	Date d'isolement
<i>Fusarium culmorum</i> Saccardo	Constantine	Collet du blé dur	2012
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	ITGC de Oued Semar	Collet du blé tendre	2012
<i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>ciceri</i> (Padwick) Matuo & Sato	Oued Semar	Pois chiche	2003
<i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>ciceri</i>	Guelma	Pois chiche	2003
<i>Botrytis cinerea</i> Persoon	ITGC	Feuillage de Pois chiche	2009
<i>Fusarium solani</i> (Martius) Appel & Wollen Weberemend. Snyder & Hansen	ENSA	Epi de Blé tendre variété Latino	2007
<i>Alternaria</i> sp.	ITGC	Pois chiche	2012
<i>Phoma medicaginis</i> var. <i>pinodella</i> (L.K. Jones)	France	Petit pois	2013
<i>Didymella pinodes</i> (Berk. & A. Bloxam) Petr., (1924)	France	Petit pois	2013

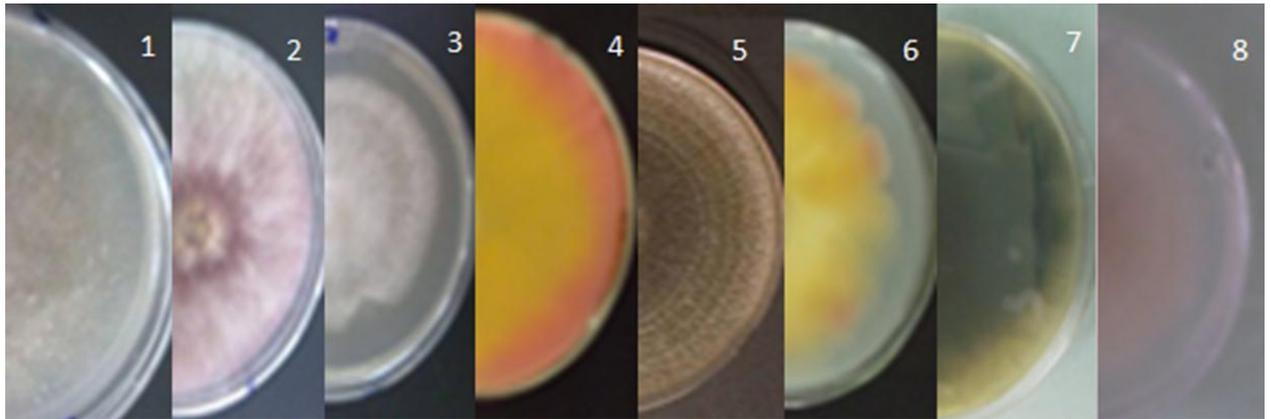


Figure 20: Aspect cultural des souches fongiques testées.

- 1- *Botrytis cinerea* / 2. *Fusarium culmorum* / 3. *Fusarium solani* / 4. *Fusarium graminearum* /
5. *Didymella pinodes* /6. *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceri* / 7. *Alternaria* sp. /8. *Phoma medicaginis* var. *pinodella*

1.2. Adventices et phanérogames parasites testées

Pour l'évaluation de l'effet herbicide des métabolites purs extraits de *D. viscosa*, quatre espèces adventices ont été utilisées. Il s'agit de : *Convolvulus arvensis*, *Anagallis arvensis*, *Chenopodium album* et *Oxalis pes-caprae*. Ces adventices sont parmi les espèces les plus répandues dans les cultures. Les parties aériennes de ces plantes ont été récoltées du jardin botanique de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, ENSA, en 2015 (**Annexe 4**). En plus de ces adventices autotrophes, deux mauvaises herbes parasites, à savoir la cuscute champêtre (*Cuscuta campestris* Yuncker) et l'orobanche spécieuse (*Orobanche crenata* Forsk.) ont été également testées. (**Annexe 5**).

Les graines de cuscute ont été extraites manuellement des capsules desséchées de la plante parasite récoltée sur différentes mauvaises herbes à la station de la direction générale de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) en juin 2012. Les graines ont été nettoyées des débris de leurs capsules, puis réfrigérées à 4°C pendant au moins une semaine avant leur utilisation

Pour ce qui est de l'orobanche, les graines de ce parasite proviennent de plants d'orobanches desséchés récoltés en juin 2009 au jardin botanique de l'ENSA. Les graines ont été conservées dans de petites boîtes en plastique dans les conditions du laboratoire jusqu'à leur utilisation.

1.3 *Callosobruchus maculatus*: origine et élevage au laboratoire

Callosobruchus maculatus provient de graines de pois chiche infestées. L'élevage de cette bruche est régulièrement entretenu au département de Zoologie Agricole et Forestière (ENSA) –Alger pour son utilisation dans les différents travaux de recherche. Sa multiplication, pour cette étude, a nécessité l'utilisation de bocaux en verre contenant environ 250g à 300g de pois chiche, une étuve réglée à 30°C et 75% d'humidité relative, ainsi qu'un stock de graines saines de pois chiche.

L'opération consiste à infester chacune des boîtes avec quelques individus (adultes mâles et femelles). Dans les conditions contrôlées, cela suffit pour qu'il y ait accouplement, pontes et développement larvaire. Au bout de 20 à 25 jours, l'émergence de nouveaux adultes commence. Par la suite, le contenu des boîtes a été tamisé pour récupérer les adultes qui serviront pour de nouvelles infestations plus importantes. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à ce que les émergences deviennent conséquentes et peu échelonnées si bien que les infestations qui suivent donneront des descendants suffisamment nombreux et homogènes. A l'approche des émergences, les adultes âgés de 0 à 2h sont prélevés au fur et à mesure pour la conduite des différents tests au laboratoire (**Figure 21**).



Figure 21: Elevage de masse de *Callosobruchus maculatus* au laboratoire.

2. Tests biologiques réalisés

2.1. Évaluation de l'activité antagoniste des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes

Dans des boîtes de pétri ($\varnothing = 9$ cm) contenant le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (**Annexe 6**), 5 petits disques de papier filtre ($\varnothing = 5$ mm) ont été déposés à équidistance du centre des boîtes. Ces disques ont reçu 10 μ l de méthanol contenant 0, 2 mg de chacun des métabolites appliqués séparément. Les disques témoins ne reçoivent qu'une solution équivalente de méthanol (**Figure 22, a**). Des explants fongiques ($\varnothing = 5$ mm) prélevés des cultures âgées de 7 jours de chaque champignon, ont été placés au centre des boîtes. Quatre répétitions par traitement ont été réalisées (**Figure 22, b**).

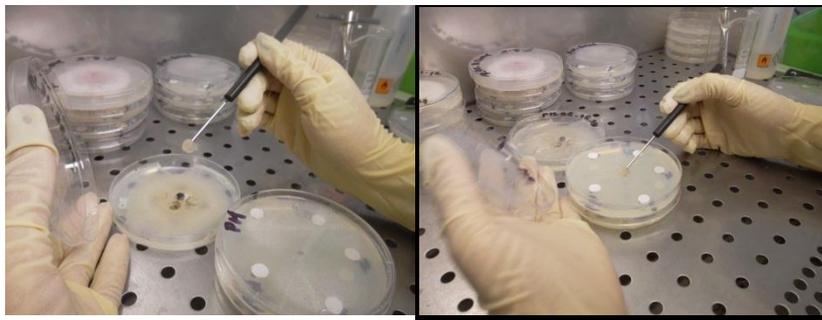
Parallèlement, un explant fongique de chaque champignon a été cultivé sur milieu PDA pour évaluer la durée de la croissance mycélienne maximale (occupation de toute la boîte de Pétri). Les boîtes de Pétri ont été ensuite incubées à 25°C à l'obscurité (**Figure 22, c**). Lorsque le maximum de croissance mycelienne est atteint chez le témoin, le diamètre de la colonie fongique des différents traitements a été mesuré. Le taux d'inhibition (TI) de la croissance mycélienne est calculé par la formule proposée par **Whipps (1997 in Joseph et al., 2009)**, comme suit :

$$I (\%) = (1 - D_n / D_o) \times 100$$

- I (%): Inhibition moyenne de la croissance mycélienne,
- D_n: Diamètre moyen de la croissance mycélienne correspondant aux traitements avec les différents métabolites
- D_o: Diamètre moyen du témoin



a)- Dépôt des disques imprégnés de métabolites ou de méthanol dans les boîtes de Pétri sur le milieu PDA –



b)- Dépôt des explants fongiques au centre des boîtes de Pétri –



c)- Incubation des boîtes (25 °C pendant 7 jours) -

Figure 22 : Etapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa* sur la croissance mycélienne de quelques champignons phytopathogènes.

2.2. Évaluation de l'effet des métabolites sur le taux de dégradation de la chlorophylle de quelques plantes adventices

L'objectif de ce test est de calculer le taux de la chlorophylle dégradée après le traitement par les métabolites purs de *D. viscosa*. Il consiste à mettre 0,1 g de matériel végétal (feuilles), coupé en petits disques de 5 mm, dans des tubes Eppendorf® dans lesquels on ajoute 1ml d'EDS contenant 10µl de chaque métabolite, appliqué séparément. Les tubes du témoin ont reçu la même quantité d'EDS ou du Méthanol. Trois répétitions par traitement ont été réalisées (**Figure 23, a**).

Après 6 jours d'incubation sous lumière NUV (**Vurro et al., 1998**), le matériel végétal de chaque traitement a été macéré avec 2 ml d'acétone à 80%, puis les extraits récupérés ont été ajustés jusqu'à un volume final de 10ml, puis filtré à travers un papier filtre stérile (**Figure 23, b**). Par la suite, les extraits ont été transférés dans des cuvettes et les lectures ont été faites à 647 et 663nm (**Tait & Hik, 2003**) dans un spectrophotomètre (JENWAY, Modèle 7300) (**Figure 23, c**). Les lectures ont été prises immédiatement après la préparation de l'extrait (**Pompelli et al., 2013**).

Les concentrations de la chlorophylle a, b et totale ont été calculés en utilisant la formule de **Wellburn's (1994)**. Les valeurs calculées sont exprimées en µg/mg de matière végétale fraîche (MVF).

$$\text{Chl a} = 12,21 \text{ DO}_{663} - 2,81 \text{ DO}_{647}$$

$$\text{Chl b} = 20,13 \text{ DO}_{647} - 5,03 \text{ DO}_{663}$$

$$\text{Chl T} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

Le taux de réduction de la teneur en chlorophylle (*Tx Red*) par rapport au témoin non traité a été obtenu à partir de la formule suivante: (**Amari et al., 2008**)

$$Tx Red = \frac{Ch \text{ témoin} - Ch \text{ traité}}{Ch \text{ témoin}} \times 100$$

Ch, représente la teneur de chlorophylles des extraits de feuilles traitées ou non (témoin).



a)- Préparation du matériel végétal -



b)- Macération et filtration du matériel végétal -



c)- Lecture des résultats à 647 et 663nm dans un spectrophotomètre -

Figure 23: Mesure du contenu en chlorophylle des feuilles de quelques plantes adventices traitées par les métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa*.

2.3.Évaluation de l'activité antagoniste des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* à l'égard de *Cuscuta campestris*

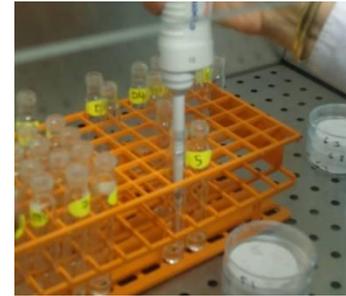
L'efficacité des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* a été évaluée à l'égard de *C. campestris*. Les essais ont porté sur le taux de germination des graines du parasite ainsi que sur le taux d'émergence de ses plantules. Avant de procéder au test de germination, il fallait lever la dormance tégumentaire des graines pour qu'elles puissent germer.

Levée de la dormance tégumentaire

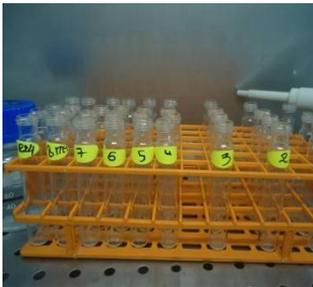
Les graines de cuscute ont été trempées dans l'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré avec agitation pendant 15 min à l'aide d'un agitateur magnétique, puis filtrées à travers une grille métallique. Par la suite, les graines traitées ont été rincées abondamment à l'Eau Distillée Stérile (EDS) pour éliminer les débris des téguments, puis mises à sécher dans du papier filtre stérile.

Test de germination

Le méthanol étant toxique pour les plantes, sa teneur ne doit pas dépasser 2% pour la cuscute et 0,5% pour l'orobanche (**Figure 24, a**). Ainsi, pour les tests sur la cuscute, 40 μ l de chacun des extraits dilués dans le méthanol ont été rajoutés à 1,96 ml d'EDS puis placés dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 5$ cm) contenant du papier filtre stérile (Whatman, GF/A). Cette concentration est considérée comme la concentration initiale (Ci). Chez le témoin, la même quantité d'EDS ou de concentration correspondante de méthanol a été rajoutée (**Figure 24, b**). Les graines de cuscute ont été par la suite éparpillées sur le papier filtre, et les boîtes ont été incubées à 22°C à l'obscurité pendant 5 jours (**Figure 24, c et d**). Trois répétitions par traitement ont été réalisées. Après incubation, le nombre de graines germées a été déterminé et le pourcentage de germination a été calculé. Une dilution de 10^{-1} (codée C1) a été également testée pour chaque extrait selon le même protocole.



a)- Préparation des extraits (chaque extrait a été dilué dans une quantité du méthanol égal à 1/20 de son poids).



b)- Préparation des concentrations (Ci, C1) pour chacun des métabolites et du témoin méthanolique. Les solutions ont été versées à raison de 2 ml par boîte de pétri contenant du papier filtre stérile.



c)- Dépôt des graines de cuscute dans les boîtes de Pétri



d)- Incubation des graines pendant 5 jours à 22°C.

Figure 24: Étapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines de *Cuscuta campestris in-vitro*.

Test sur l'émergence des plantules de la cuscute

Le test sur l'émergence des plantules de cuscute *in-vitro*, a été conduit dans des boîtes de Pétri contenant 34g d'un mélange sol/sable (2:1, v/v) autoclavé à 120°C pendant 15 min et humidifié avec 10 ml d'EDS. Dans chacune des boîtes, 3 ml d'EDS contenant les métabolites (appliqués individuellement), à raison de 0, 4 mg/ml, ont été rajoutés. Par la suite, 16 graines de cuscute ont été placées dans chacune des boîtes, à une profondeur de 5 mm et ces dernières ont été placées dans les conditions du laboratoire. Pour les besoins d'humidification du sol, des apports supplémentaires d'EDS ont été faits durant l'expérimentation. La lecture des émergences a été réalisée quotidiennement durant une semaine jusqu'à l'arrêt total de l'émergence. À la fin de l'expérimentation, le pourcentage des plantules émergées par rapport au nombre total des graines enfouies a été calculé.

2.4. L'évaluation de l'activité antagoniste des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* à l'égard de *Orobanche crenata*

L'évaluation de l'effet des métabolites purs extraits de *D. viscosa* a porté également sur la germination des graines d'*O. crenata* et a nécessité la réalisation de deux étapes importantes, il s'agit de la désinfection des graines du parasite et leur pré-conditionnement.

Désinfection

Les graines d'orobanches doivent subir une désinfection avant leur utilisation dans tout test de germination. Cette étape est réalisée comme suit:

a)- Trempage des graines dans l'éthanol à 70% pendant 30s à 1 min avec agitation sur agitateur magnétique ; b)- Rinçage avec de l'EDS ; c) Trempage des graines dans d'hypochlorite de sodium à 2% avec agitation pendant 20 min ; d)- Rinçage avec l'EDS et enfin, le séchage des graines dans du papier filtre stérile.

Pré-conditionnement des graines

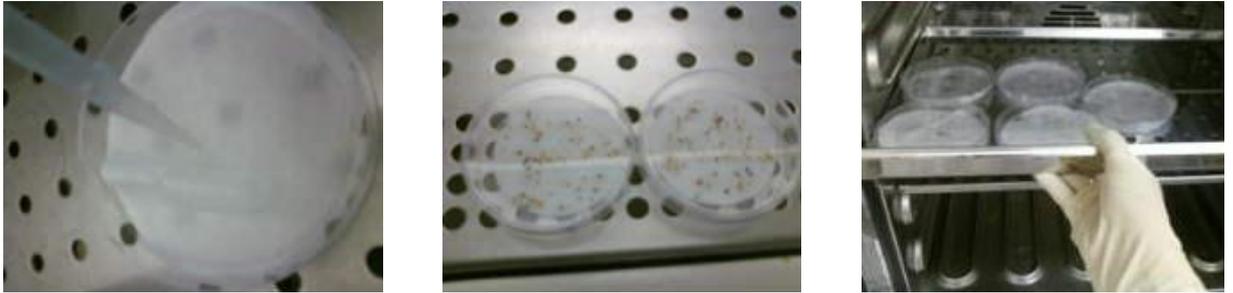
Les graines d'orobanche désinfectées et séchées ont été transférées dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 9\text{cm}$) sur du papier filtre stérile humidifié avec l'EDS. Les boîtes ont été placées par la suite dans un incubateur à 22°C pendant 10 jours. Un apport d'EDS supplémentaire a été réalisé en cas de nécessité pour éviter le dessèchement du papier filtre lors de la phase de pré-conditionnement.

Test de germination

A l'aide d'un scalpel stérile, de petits carreaux ont été découpés dans le papier filtre portant les graines d'orobanche pré-conditionnées puis placés dans de nouvelles boîtes de Pétri ($\varnothing = 5$ cm, 4 carreaux par boîte) sur de papier filtre stérile (Whatman, GF/A). Parallèlement, une concentration initiale (C_i) à 0, 5% a été préparée en ajoutant $5\mu\text{l}$ de chaque métabolite dilué dans le méthanol, dans $995\mu\text{l}$ d'une solution de GR24 préparée comme suit: 1 mg de la poudre du GR24 a été dissoute dans 1ml d'acétone complété à 100 ml par de l'EDS. Le GR24 est considéré comme étant un stimulant synthétique de germination. La dilution 10^{-1} (concentration C_1) a été préparée pour chacun des métabolites testés.

Par la suite, 1ml de chacune des concentrations C_i et C_1 a été ajouté par boîte de Pétri, séparément. Chez les témoins, la même quantité de GR24 ou de concentration correspondante de méthanol a été rajoutée. Trois répétitions par traitement ont été réalisées.

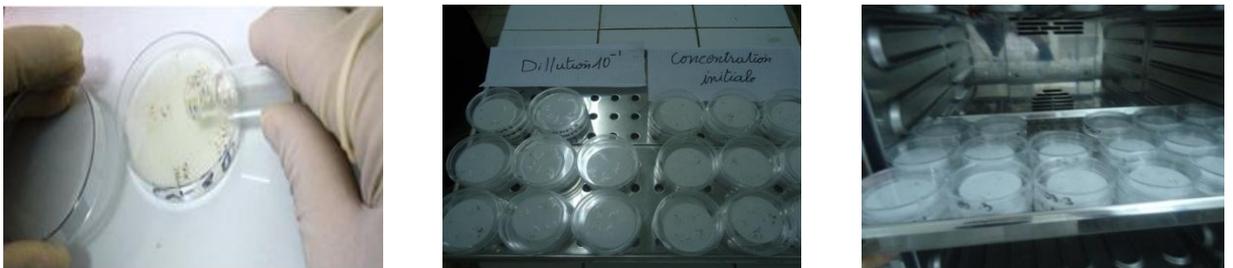
Le nombre de graines d'orobanche germées a été déterminé et le pourcentage de germination a été calculé après 10 jours d'incubation à 22°C , à l'obscurité. A l'aide d'un micromètre, la longueur des tubes germinatifs des graines germées a été mesurée (**Figure 25**).



- Pré-conditionnement des graines d'*Orobanche crenata* -



- Préparation des différentes concentrations (C_i , C_1) et le méthanol, séparément -



- Application des différentes concentrations et incubation des boîtes à 22°C/10j -

Figure 25: Etapes de l'évaluation de l'effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines d'*Orobanche crenata in-vitro*.

2.5.Évaluation de l'effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur les paramètres biologique de *Callosobruchus maculatus*

Évaluation de l'effet des métabolites sur la mortalité des adultes

L'essai est mené dans des boites de Pétri de 9cm de diamètre dans lesquelles les papiers filtres (**Whatman® GF/A**) ont été imprégnés avec 1 ml de solution d'acétone dans laquelle ont été diluées séparément les volumes suivants des métabolites purs de *D. viscosa*: 5µl, 2, 5µl et 1, 25µl. Les boites témoins ont reçu uniquement de la solution d'acétone (1ml par boite).

Après 10 min environ de séchage du solvant à l'air libre, des individus adultes de *C.maculatus* (âgés de 0 à 2 h) ont été déposés (20 individus par boite). Les bruches exposées pendant 24 heures aux métabolites ont été par la suite transférées dans de nouvelles boites contenant 50g de pois chiches non traités, puis incubées (28°C, 75% HR) dans une étuve à l'obscurité.

La mortalité des insectes a été évaluée à 1, 3, 5 et 7 jours après l'exposition aux métabolites après correction par la formule de **Abbott (1925)** :

$$MC(\%) = \frac{M - Mt}{100 - Mt} \times 100$$

MC (%): Pourcentage de mortalité corrigée

M (%): Pourcentage de morts dans la population traitée

Les valeurs de la DL50 ont été calculées par analyse du Probit. Sept jours ont été considérés pour éviter la mortalité naturelle, sachant que les adultes de *C. maculatus* (mâles et femelles) ont tous deux une durée de vie moyenne de 7 jours dans des conditions de laboratoire (**Shah et al., 2016**) (**Annexe 7**). Les bruches ont été considérées comme mortes lorsqu'elles ne présentaient aucune réaction après avoir été doucement incitées avec une épingle. L'expérience a été menée avec cinq répétitions.

Évaluation de l'effet des métabolites sur la fécondité

Des graines de pois chiche ont été déposées dans des boites en verre (14 cm de diamètre, 100 g par boîte), puis traitées avec les métabolites, appliqués séparément, dissous dans de

l'acétone pour atteindre les doses correspondant à leurs valeurs de DL50, déterminées précédemment lors du test sur la mortalité. Six millilitres ont été appliqués par boîte et la même quantité d'acétone sans métabolites a été utilisée pour le témoin.

Après les avoir bien mélangées avec les solutions de métabolites, les graines ont été exposées à l'air libre pendant 10 min pour assurer l'évaporation du solvant. Par la suite, 25 femelles âgées de 0-2 h ont été introduites dans chaque boîte. Les boîtes sont été ensuite incubées dans une étuve contrôlée (28 ± 1 °C et 70 ± 5 % d'humidité relative) dans l'obscurité. Après 24h de contact avec les graines traitées, les femelles ont été transposées dans de nouvelles boîtes en présence de 100g de graines de pois chiche non traitées et 25 mâles vierges non traités. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque traitement, témoin y compris (**Figure 26**).

Le comptage des œufs (éclos et non éclos) a été effectué, sous une loupe binoculaire, le 15ème jour pour que toutes les femelles puissent pondre le maximum d'œufs. Un deuxième essai a été réalisé dans les mêmes conditions sauf que ce sont plutôt les mâles qui ont été traités avec les métabolites. Les croisements suivants ont été réalisés:

- Femelles traitées avec mâles non traités (FTxMNT)
- Femelles non traitées avec mâles traités (FNTxMT)
- Femelles non traitées avec mâles non traités. (FNTxMNT), qui correspond au témoin.

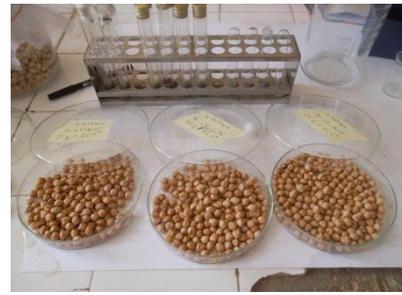
Évaluation de l'effet des métabolites sur la fertilité

A partir de pontes réalisées lors du test précédent sur la fécondité, un nombre de graines de pois chiche a été sélectionné de façon à ne garder que 20 œufs par boîte. Les boîtes chez le témoin contiennent le même nombre d'œufs, mais issus de couples non traités. En cas de surplus, le nombre excédent d'œufs est éliminé. Le comptage des œufs éclos a été réalisé 3 jours après et le taux d'émergence des bruches de la 1ère génération a été calculé selon la formule suivante:

$$\text{Taux d'émergence} = (\text{Nombre d'adultes émergés} / \text{nombre total d'œufs}) * 100$$



- Préparation des doses de métabolites -



-Préparation des graines de pois chiche -



- Réalisation du test et incubation des boîtes -

Figure 26: Dispositif de l'évaluation de l'effet des métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa* sur la fécondité de *Callosobruchus maculatus*.

Évaluation de l'effet des métabolites sur le sex-ratio

De l'essai sur la fertilité, le développement est poursuivi jusqu'aux émergences pour faire le sexage des individus, et évaluer l'effet des métabolites sur le sex-ratio dans les lots traités comparativement aux témoins non traités. Le sex-ratio a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Sex ratio} = \text{Nombre de mâles émergés} / \text{Nombre de femelles émergées}$$

3. Analyses statistiques

Toutes les expérimentations ont été menées selon un dispositif complètement randomisé avec 3 à 5 répétitions. Les données sur la mortalité des adultes ont été corrigées avec la formule de **Abbott (1925)**. Les DL50 ont été déterminées en utilisant une méthode de régression-probit. Les analyses de données ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica (V.8.5, 2014). Les données ont été soumises à ANOVA à un facteur et la comparaison des moyennes (à $p \leq 0,05$) a été déterminée par le test de Duncan, en cas de différence significative.

PARTIE III

RESULTAT ET DISCUSSION

Chapitre I

RESULTATS DE L'EXTRACTION A PARTIR DE DITTRICHIA VISCOSA

Les métabolites extraits de la partie aérienne de *D. viscosa* ont été identifiés comme étant des sesquiterpènes bi et tri-cycliques. Il s'agit de: l'acide α -costique (Rf 0, 35), purifié de la fraction A la moins polaire sous forme d'huile jaune homogène, l'inuloxine A (Rf 0, 52), issu de la fraction B isolée sous forme d'une huile jaune, l'inuloxine B (Rf 0, 52) et l'inuloxine C (Rf 0, 31), tous deux révélés par le résidu de la fraction la plus polaire purifié à nouveau par CCM préparative. Leurs structures ont été confirmées par RMN (**Figures 27**) et comparées à des métabolites de référence de **Andolfi et al. (2013)**. (**Figure 28**).

1. Profil chimique des métabolites obtenus**Inuloxine A :**

Inuloxine A, obtenu sous la forme d'une huile jaune a pour formule moléculaire $C_{15}H_{20}O_3$. Son profil chimique est le suivant: $[\alpha]_D^{25} +8, 5$ (c 1, 9); IR ν_{max} 1755, 1706, 1659, 1119 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 284 (2, 14). Le spectre RN du H^1 est rapporté dans le **Tableau 4**: HRESIMS (+) m/z 519 $[2M+Na]^+$, 287 $[M+K]^+$, 271.1321 [Calculé pour $C_{15}H_{20}NaO_3$, 271, 1310, $M+Na]^+$, 249 $[M+H]^+$, 231 $[M+H-H_2O]^+$.

Inuloxine B :

Inuloxine B, obtenu sous la forme d'une huile jaune a pour formule moléculaire $C_{15}H_{22}O_3$. Son profil chimique est le suivant : $[\alpha]_D^{25} +49, 9$ (c 0, 2); IR ν_{max} 1764, 1711, 1190 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 270 (2, 40). Le spectre RMN du H^1 est rapporté dans le **Tableau 4**: HR ESIMS (+) m/z 289 $[M+K]^+$, 273, 1357 [calculé pour $C_{15}H_{22}NaO_3$, 273, 1467 $M+Na]^+$.

Inuloxine C :

Inuloxine C obtenu sous la forme d'une huile jaune qui présente la même formule moléculaire que celle d'Inuloxine A ($C_{15}H_{20}O_3$). Cet Inuloxine diffère de l'inuloxine A par les différents groupes fonctionnels présents dans le macrocycle en 10 termes. Son profil chimique est le suivant: $[\alpha]_D^{25} +13, 1$ (c 0, 3); IR ν_{max} 3428, 1758, 1662, 1635, 1152 cm^{-1} ; UV λ_{max} nm (log ϵ) 262 (1, 07). Le spectre NMR du H^1 est rapporté dans le **Tableau 4**: HR

ESIMS (+)m/z 519 [2M+Na]⁺, 287 [M+K]⁺, 271.1319 [calculé pour C₁₅H₂₀NaO₃, 271.1310 M+Na]⁺, 253 [M+Na-H₂O]⁺, 249 [M+H]⁺.

L'acide α -costique:

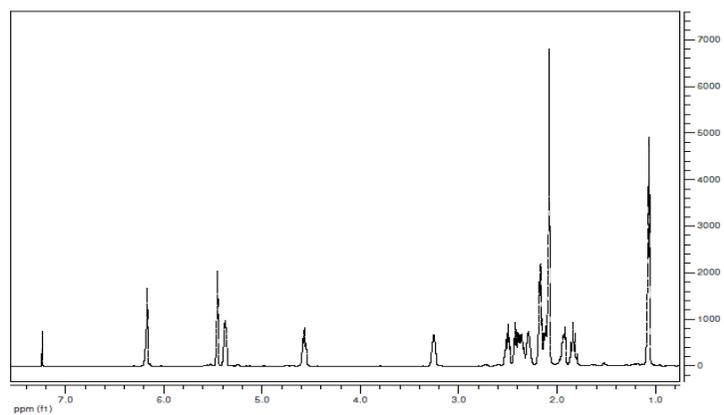
Le principal métabolite de *D. viscosa* a été isolé à partir de la deuxième et de la troisième fraction de la première colonne de purification de l'extrait organique correspondant. Ce métabolite a été identifié comme étant l'acide- α -costique par comparaison avec les données spectroscopique (RMN H¹ et UV) rapportées dans la littérature.

L'acide α -costique obtenu sous la forme d'un solide a pour formule moléculaire C₁₅H₂₂O₂. Son profil chimique est le suivant: $[\alpha]_{D}^{25} +15$ (c 0, 5); IR ν_{\max} 3403, 2906, 1687, 1618, 1278 cm⁻¹; UV λ_{\max} nm (log ϵ) 225 (3, 38) (**Shtacher et Kashman, 1970**); $[\alpha]_{D}^{25} +10$ (c 0, 8 CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) 2, 900, 2, 830(v.s), 1, 960(v.s), 1, 615(>C=C<COOH)(s), 1, 435(s), 1, 365 (m), 968 (v.s) cm⁻¹ (**Chen et al., 2001**); $[\alpha]_{D}^{25} +8$ (c 0, 24 CHCl₃); IR ν_{\max} 2916, 2848, 1696, 1621, 1436, 1278 cm⁻¹. Le spectre NMR du H¹ est rapporté dans le **Tableau 4**; ESIMS (+) m/z 235 [M+H]⁺, 189 [M-COOH]⁺.

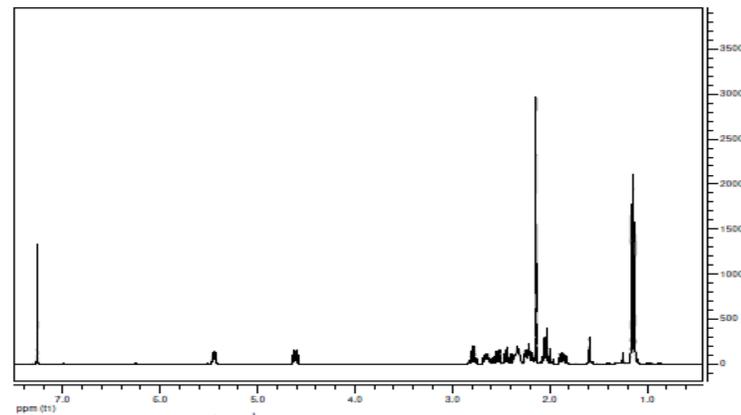
Le résumé des colonnes et des CCM réalisées pour la purification des différents métabolites est présenté dans la **figure 29**.

Tableau 4: Résultats RMN H¹ pour les Inuloxines A-C et l'acide α -costique

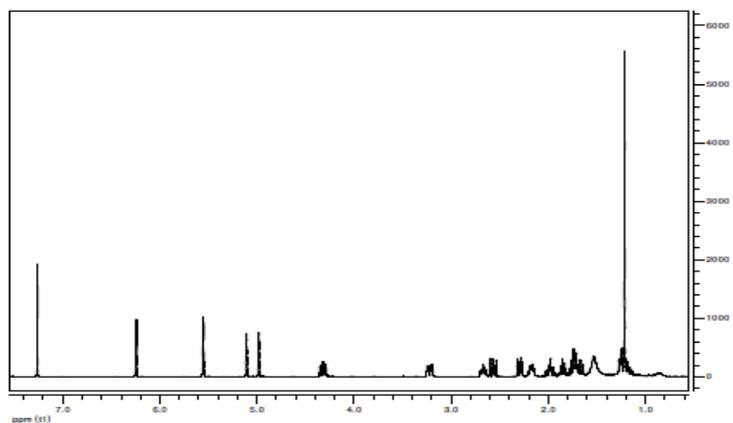
Position	Inuloxine A δ H (Jin Hz)	Inuloxine B δ H (Jin Hz)	Inuloxine C δ H (Jin Hz)	L'acide α -costique δ H(Jin HZ)
1	(2H) 2.20m	2.34m 2.22m		1.36 (2H) m
2	2.52m 2.44m	2.55ddd (15.6 ; 9.3 ;4.3) 2.44ddd (15.6 ;8.8 ;6.6)	2.21m 1.70ddd (8.0 ; 8.0 ; 3.9)	2.09 m 1.96 m
3			1.69m	5.32 br s
4			1.75m 1.99m	
5	5.39dd (9 ;5.2)	5.45dd (10.1 :2.0)		2.02 m
6	2.40m 2.13dd (10.0 :5.2)	2.22m 1.87ddd (15.6 ; 10.1 :3.8)	1.27m 2.32ddd (13.2 :3.6 :3.2)	1.27 q (13.1) 1.46 dt(13.1, 3.7)
7	3.27m	2.65m	2.69m	2.42 brt(13.1, 12.6, 3.7)
8	4.60ddd (11.2 :8.5 :2.5)	4.61ddd (11.0 :7.5 :6.1)	4.33ddd (10.7 :9.0 :6.1)	1.68 br d (13.0) 1.56 ddd(13.0, 12.6, 3.7)
9	1.95ddd (13.7 :5.4 :2.5) 1.83dt (13.7 :11.2)	(2H) 2.05m	3.24ddd (15.6 :6.1 :3.2) 2.58dd (15.6 :10.7)	1.86 br d (12.6) 1.28 td(12.6, 2.7)
10	2.31m	2.34m		
11		2.79 quin (7.5)		
12				
13	6.18d (3.0) 5.47d (3.0)	1.16d (7.5)	6.27d (3.5)	6.32 s 5.68 s
14	2.10s	2.14s	1.24s	0.84 s
15	1.08d (6.9)	1.13d (7.2)	5.00bs 5.13bs	1.62s



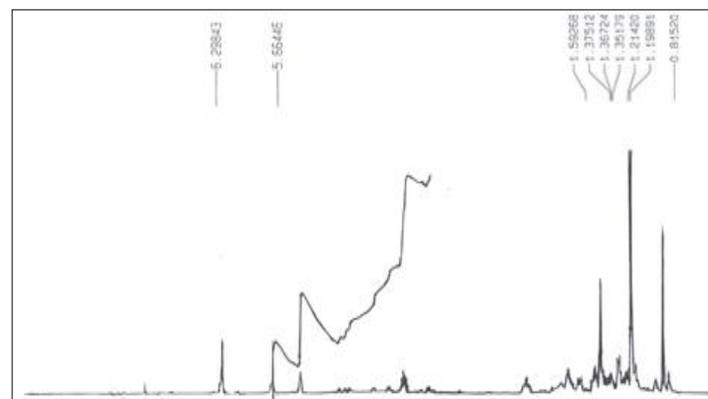
Inuloxine A



Inuloxine B

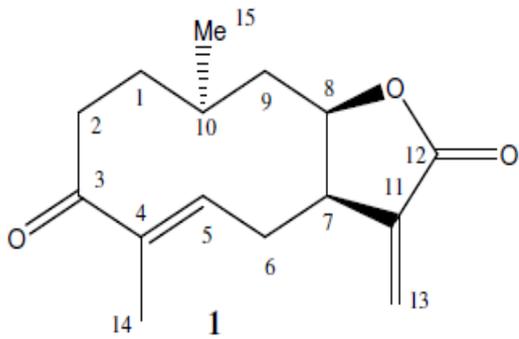


Inuloxine C

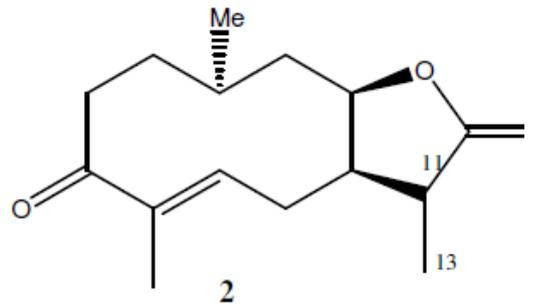


L'acide α -costique-

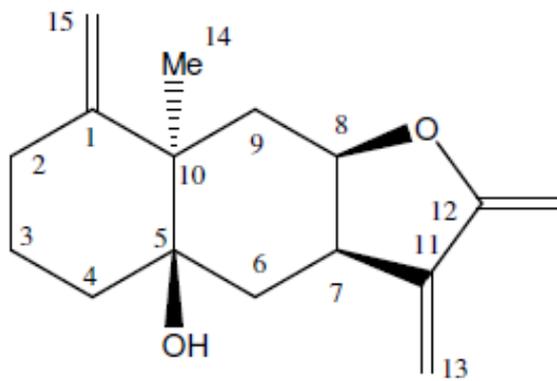
Figure 27: Spectre RMN H^1 des 4 métabolites enregistré à 400 MHz dans le $CDCl_3$.



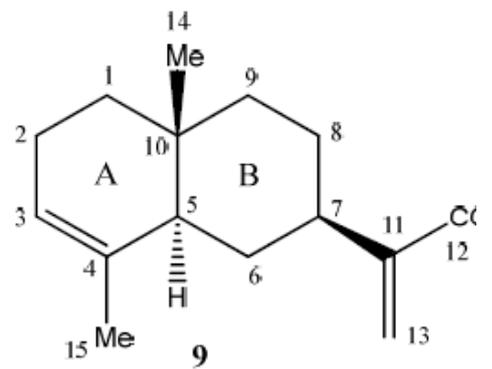
Structure de l'Inuloxine A



Structure de l'Inuloxine B



Structure de l'Inuloxine C



Structure de l'acide α -costique

Figure 28 : Structure chimique des Inuloxines A-C et de l'acide α -costique (Andolfi *et al.*, 2013).

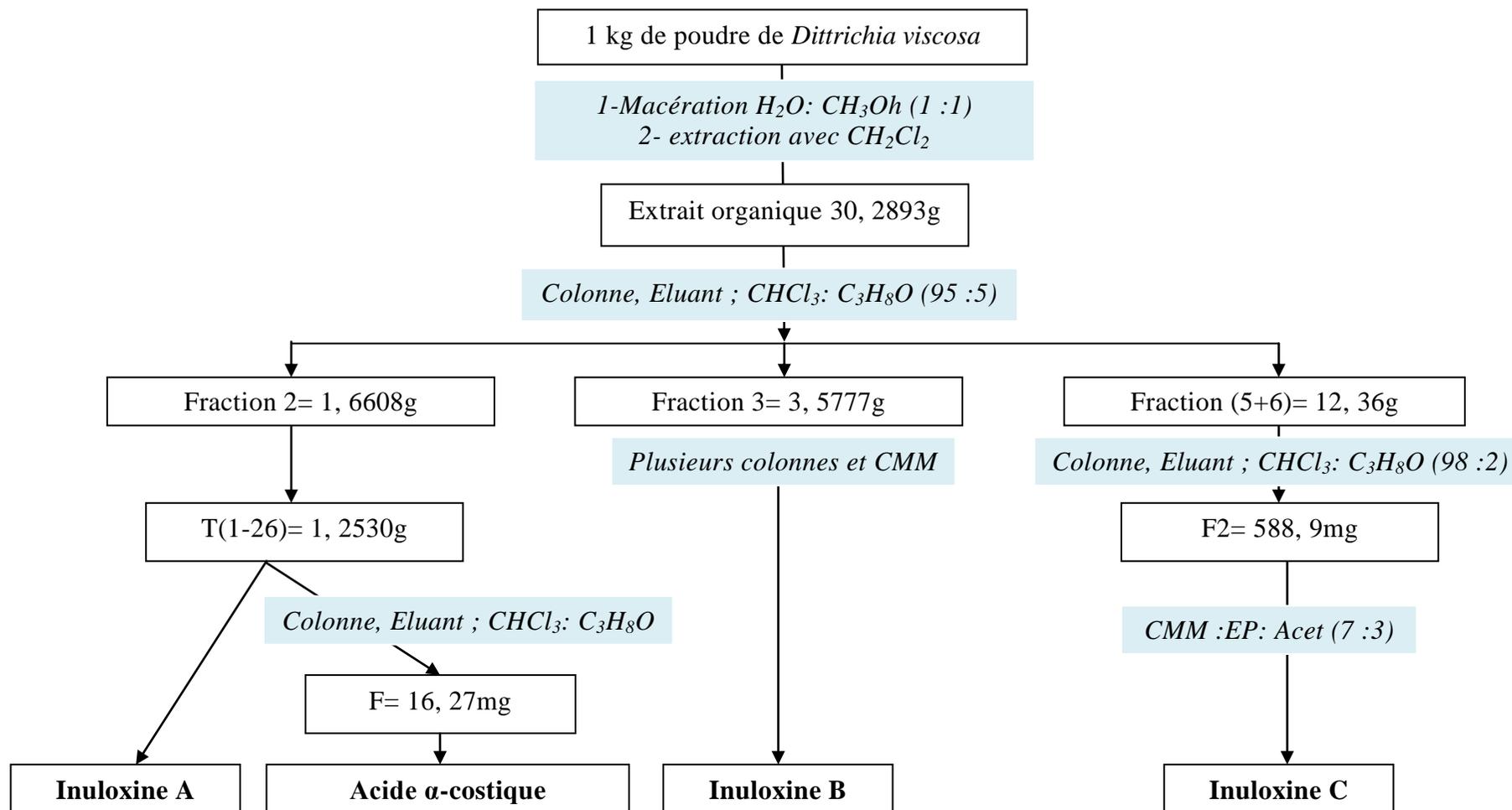


Figure 29: Schéma récapitulatif de l'extraction et de la purification des métabolites purs de *Dittrichia viscosa*.

Chapitre II

RESULTATS DES TESTS BIOLOGIQUES**1. Effets des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la croissance mycélienne des souches fongiques phytopathogènes testées**

L'ensemble des métabolites testés, n'ont révélé aucune activité sur la croissance mycélienne des souches fongique testées. En effet, tous les champignons se sont développés normalement et de façon semblable à leurs témoins (**Tableau 5**). Cependant, l'acide α -costique a affecté la croissance mycélienne de la souche de *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceri* en provenance de Guelma avec 50 % de réduction. Néanmoins, l'effet n'a pas pu être reproduit lors de la répétition de l'essai.

Tableau 5: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la croissance mycélienne des souches fongiques phytopathogènes testées.

Traitements	Croissance mycélienne des souches fongiques (cm)								
	<i>F.c.</i>	<i>F.g.</i>	<i>F.s.</i>	<i>Alt.</i>	<i>Foxy.G.</i>	<i>Foxy.O.</i>	<i>B.c.</i>	<i>Ph.m.</i>	<i>D.p.</i>
Inuloxine A	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b
Inuloxine B	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b
Inuloxine C	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b
Acide α -costique	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	4,5 a	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b
Témoin (Eau)	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b	9,0 b
Témoin (Méthanol)	9,0 b	9,0 b	9,0 b	8,0 a	9,0 b	9,0 b	8,2 b	9,0 b	9,0 b

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%. *F.c.*: *Fusarium culmorum* / *F.g.*: *Fusarium graminearum* / *F.s.*: *Fusarium solani* / *Alt.*: *Alternaria* sp. / *Foxy.G.*: *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceri* (Guelma) / *Foxy.O.*: *Fusarium oxysporum* fsp. *ciceri* (Oued Smar) / *B.c.*: *Botrytis cineria* / *Ph.m.*: *Phoma medicaginis pinodella* / *D.p.*: *Didymella pinodes*.

2. Effets des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur le contenu en chlorophylle des feuilles de quelques adventices.

La dégradation de la chlorophylle diffère selon les métabolites, les espèces d'adventices et les types de chlorophylle. *Chenopodium album* n'a montré aucune sensibilité à l'égard des 3 métabolites testés (Inuloxine A, Inuloxine C et l'acide α -costique) par rapport au témoin EDS. Par contre, les chlorophylles b et totale ont été affectées par tous les métabolites testés au niveau des feuilles d'*Anagallis arvensis*. Chla semble, cependant être plus résistante. Chez *Oxalis pes-caprae*, les taux de Chlb et TChl ont été considérablement réduits par rapport au témoin EDS. Chlb a été affecté par l'acide α -costique avec une réduction de 99%. De manière inattendue, le contenu de Chla des feuilles de *Convolvulus arvensis* traitées par les 3 métabolites était significativement plus élevé que ceux du témoin EDS. La Chl b n'a montré aucune différence avec ce dernier (**Tableau 6**). De manière générale, le traitement des feuilles avec l'acide α -costique a entraîné la réduction la plus élevée des taux de chlorophylle.

Tableau 6: Effets des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur le contenu en chlorophylle des feuilles de quelques adventices.

Espèce d'adventice		Chl A	Différence (%)§	ChlB	Différence (%)§	ChlT	Différence (%)§
<i>Chenopodium ablum</i>	Inulox. A	0, 78 a	/	0, 57 a	/	1, 36 a	/
	Inulox. C	0, 75 a	/	0, 557a	/	1, 30 a	/
	Acide α -costique	0, 58 ab	/	0, 59 a	/	1, 18 a	/
	Témoin (MET)	0, 45 b	-41, 7	0, 12 b	- 83, 7	0, 57 b	-62, 2
	Témoin (EDS)	0, 77 a		0, 74 a		1, 51 a	
<i>Convolvulus arvensis</i>	Inulox. A	1, 45 a	+88, 3	0, 74 a	/	2, 20 ab	/
	Inulox. C	1, 59a	+106, 4	0, 81 a	/	2, 40 b	+64.3
	Acide α -costique	1, 50 a	+95, 8	0, 62 a	/	2, 13 ab	/
	Témoin (MET)	1, 04 ab	/	0, 89 a	/	1, 93 ab	/
	Témoin (EDS)	0, 77 b	/	0, 68 a	/	1, 46 a	/
<i>Anagalis arvensis</i>	Inulox. A	0, 78 a	/	0, 28 a	-56, 9	1, 07 a	-58, 5
	Inulox. C	2, 40 b	+64, 3	0, 36 ab	-44, 6	1, 14 a	-55, 8
	Acide α -costique	2, 13 ab	/	0, 26 a	-60	0, 94 a	-63, 5
	Témoin (MET)	1, 93ab	/	0, 43b	-33, 8	1, 49 b	-42, 2
	Témoin (EDS)	1, 46 a	/	0, 65 c	/	2, 58 c	/
<i>Oxalis pes-caprae</i>	Inulox. A	1, 04 a	/	0, 2 a	-80, 8	1, 21 a	-53, 1
	Inulox. C	1, 21 a	/	0, 33 a	68, 2	1, 54 a	-40, 3
	Acide α -costique	0, 46 a	/	0, 01 a	-99	0, 47 a	-81, 8
	Témoin (MET)	0, 81 a	/	0, 29 a	-72, 1	1, 11 a	-57
	Témoin (EDS)	1, 81 a	/	1, 04 b	/	2, 58 b	/

Inulox.: Inuloxine / *Chl a*: chlorophylle a / *Chl b*: chlorophylle b / *TChl*: Chlorophylle totale/ *Témoin MET*: Témoin méthanolique / *Témoin EDS*: Témoin avec l'Eau Distillée Stérile. /§ Les taux de réduction ou d'augmentation (Différence) sont calculés par rapport aux témoins EDS correspondants.

3. Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines et l'émergence des plantules de *Cuscuta campestris*

Effet sur la germination des graines

Les résultats obtenus montrent que tous les métabolites ont agi sur la germination des graines comparativement aux témoins (**Tableau 7**).

L'Inuloxine C a réduit la germination d'une façon très appréciable avec un taux de réduction de l'ordre de 98,7% par rapport au témoin méthanolique. Les métabolites les plus performants étant l'Inuloxine A et l'Acide α -costique avec 100% d'inhibition de la germination des graines du parasite. L'Inuloxine B s'est révélé le moins efficace avec une réduction de la germination de l'ordre de 38% par comparaison au témoin EDS. Avec la dilution 10^{-1} aucun métabolite n'a eu un effet statistiquement différent des deux témoins.

Tableau 7: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines de *Cuscuta campestris*

Métabolites	Germination des graines de Cuscuta (%)	
	Concentration Initiale	Dilution 10-1
Inuloxine A	00,00a	51,67 a
Inuloxine C	00,79a	44,41 a
Inuloxine B	34,16c	45,73 a
Acide α -Costique	00,00 a	44,46a
Témoin (EDS)	54,88 b	54,88 a
Témoin(Méthanol)	62,52 b	47,61 a

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

Effet sur l'émergence des plantules

L'effet des quatre métabolites testés sur l'émergence des plantules de cuscute n'était pas statistiquement différent des deux témoins non traités (**Tableau 8**).

Tableau 8: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur l'émergence des plantules de *Cuscuta campestris*.

Traitements	Emergence des plantules de <i>Cuscuta campestris</i>	
	Emergence des plantules (%)	
Inuloxine A	08, 5	a
Inuloxine B	22, 5	a
Inuloxine C	20, 9	a
Acide α - Costique	13, 7	a
Témoin Eau	24, 0	a
Témoin (Méthanol)	290	a

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

4. Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines et l'élongation du tube germinatif des graines germées de *Orobanche crenata* Forsk.

Effet sur la germination des graines

Il ressort des résultats obtenus que les Inuloxines A et C ont complètement inhibé la germination des graines de l'orobanche (100% inhibition, $P < 0.001$). Par contre, l'acide α -costique a induit une inhibition de la germination de l'ordre de 23, 6% 30, 67% comparaison aux témoins GR24 et le témoin méthanolique, respectivement (**Tableau 9**). Le taux de germination obtenu suite à l'application de l'Inuloxine B n'était pas statistiquement différent des deux témoins. Avec les dilutions 10^{-1} , les 4 métabolites testés n'ont eu aucun effet sur la germination des graines du parasite puisqu'ils n'étaient pas statistiquement différents des deux témoins

Tableau 9: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la germination des graines de *Orobanche crenata*

Métabolites	Germination des graines de l' <i>Orobanche</i> (%)	
	Concentration Initiale	Dilution 10 ⁻¹
Inuloxine A	00, 00c	39, 72 a
Inuloxine C	00, 00c	23, 08 d
Inuloxine B	40, 34 b	58, 16 b
Acide α - Costique	23, 87 a	61, 02 b
Témoin (GR24)	31, 24 ab	31, 24 abd
Témoin (Méthanol)	34, 43 ab	45, 05 a

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

Effet sur la longueur du tube germinatif des graines germées

L'élongation du tube germinatif des graines germées de l'orobanche a également été affectée par les Inuloxines A, B et C, qui ont réduit significativement la longueur des tubes germinatifs par rapport au témoin méthanolique (100 % d'inhibition). (**Tableau 10**). Avec la concentration 10⁻¹, l'Inuloxine C était le seul à inhiber l'élongation du tube germinatif avec un taux de réduction de 76, 8%, 83, 2% par rapport aux témoins GR24 et méthanolique, respectivement.

Tableau 10: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la longueur de tube germinatif des graines germées d'*Orobanche crenata*.

Métabolites	Longueur du tube germinatif (μ m)	
	Concentration initiale	Dilution 10 ⁻¹
Inuloxine A	00, 00 a	35, 60 d
Inuloxine C	00, 00 a	18, 53 c
Inuloxine B	00, 00 a	70, 53 ab
Acide α - costique	76, 86 b	65, 40 a
Témoin GR24	80, 06 b	80, 06 b
Témoin (Méthanol)	82, 47 b	110, 26 e

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

5. Effet insecticide des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur les paramètres biologiques de *Callosobruchus maculatus*

Effet des métabolites sur la mortalité des adultes

Les essais de toxicité par contact à l'égard de *Callosobruchus maculatus*, montrent que tous les métabolites testés ont exercé une activité insecticide très marquée surtout à la dose de 5 µl/ml ou les taux des mortalités corrigées ont atteint les 100% seulement 24 h après l'exposition aux métabolites.

A la dose de 2,5 µl/ml, les mortalités sont restées assez élevées oscillant entre 77,55% pour l'Inuloxine C et 90,81% pour l'Inuloxine A, dépassant ainsi les doses létales. Par contre, l'Inuloxine B n'a engendré que 38,77% de mortalité seulement. Les mortalités enregistrées avec la dose la plus faible (1,25 µl/ml) n'ont dépassé guère les 40%, cependant les taux restent très différents de ceux du témoin (**Figure 30**).

Les valeurs des DL50 ont été calculées par transformation des pourcentages de mortalité en unités probits et les valeurs obtenues ont été corrélées avec le logarithme des doses (**Annexe 07**). A l'aide de la droite de régression, on a déterminé la dose létale correspondante pour 50% de la population d'insectes (**Figure 31**).

D'après les DL50 obtenues, nous constatons que les Inuloxines A et C et l'acide α -costique occasionnent une toxicité assez proche avec une DL50 égale à 1,52 µl/ml pour Inuloxine A, 1,58 µl/ml pour Inuloxine C et 1,47 µl/ml pour l'acide α -costique. Enfin, l'Inuloxine B a manifesté la plus faible toxicité avec une DL50 égale à 1,76 µl/ml.

■ Inuloxine A
 ■ Inuloxine B
 ■ Inuloxine C
 ■ Acide α costique
 ■ Témoin

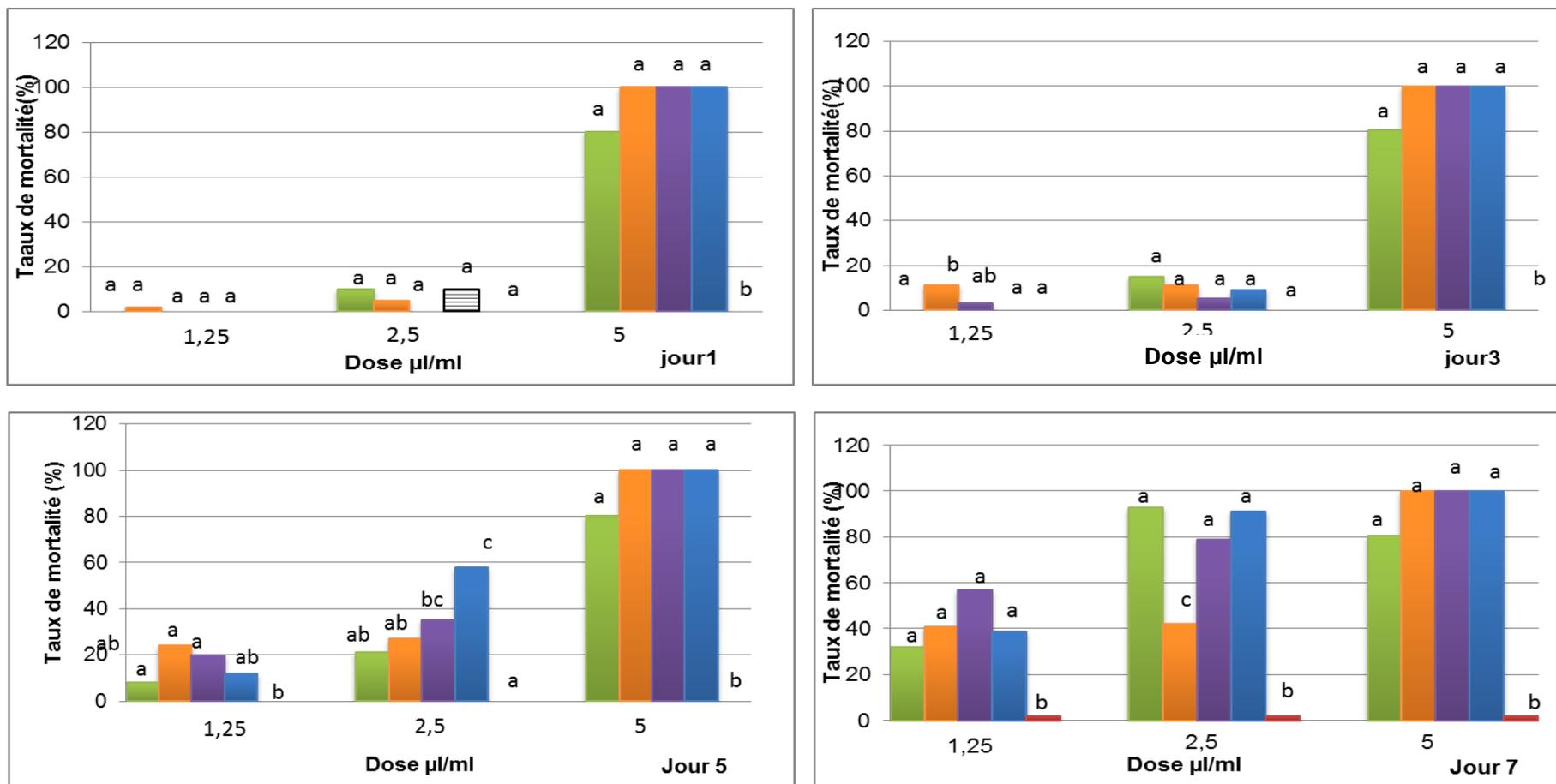


Figure 30: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la mortalité des adultes de *Callosobruchus maculatus*

A ; Inuloxine A/ B ; Inuloxine B/ C : Inuloxine C / D : Acide α -costique

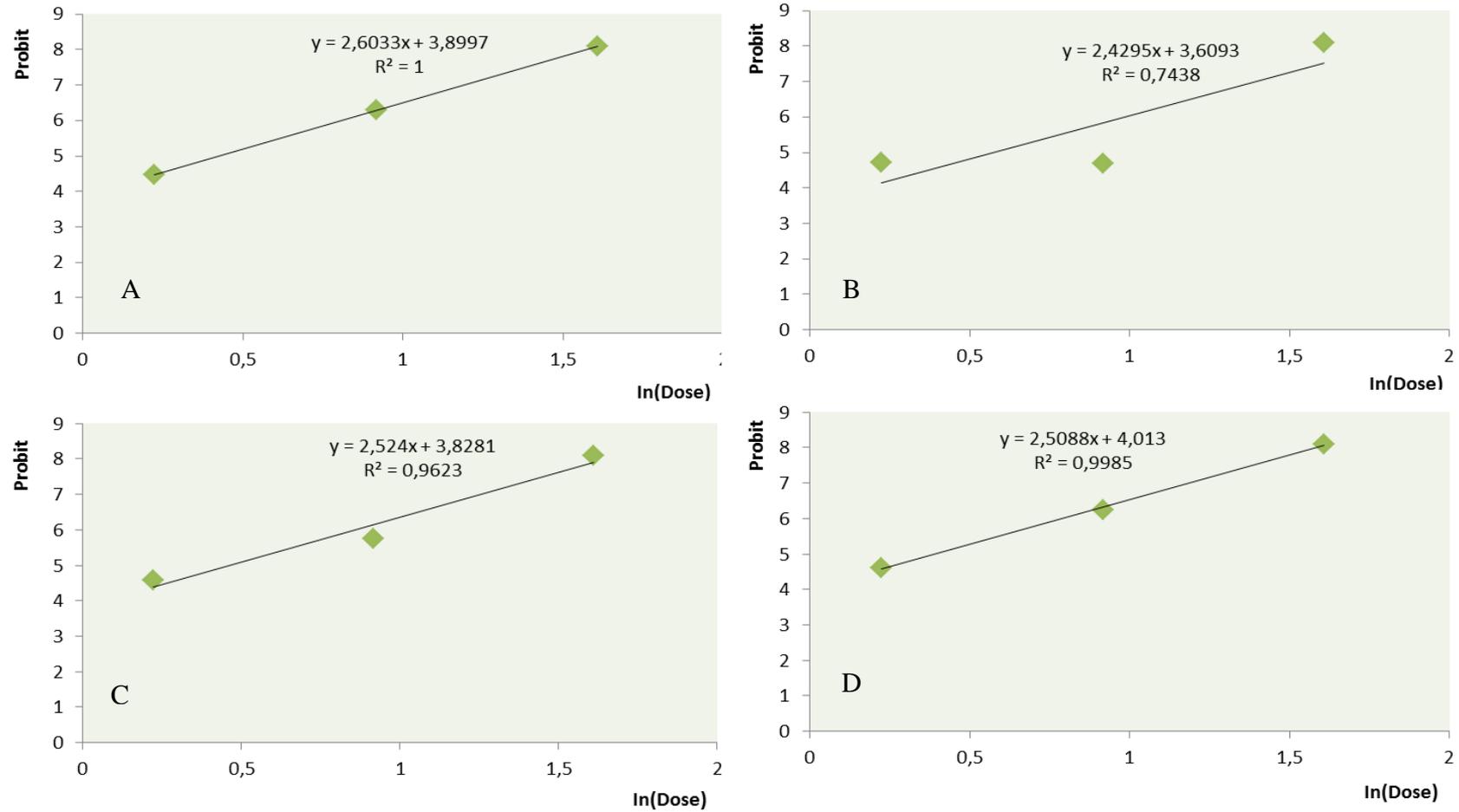


Figure 31: Régression mortalité / dose par effet de contact des 4 métabolites purs de *Dittrichia viscosa*

6. Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la fécondité et la fertilité de *Callosobrochus maculatus*.

▪ Effet sur la fécondité

Les résultats présentés dans le **Tableau 11** indiquent que la performance de la ponte varie en fonction du sexe du partenaire sexuel traité. Lorsque des femelles traitées se sont accouplées avec des mâles non traités (FT x MNT), à part l'inuloxine C, les 2 autres métabolites n'ont eu aucun effet sur le nombre d'œufs pondus. En effet, les moyennes de l'Inuloxine A, et de l'acide α -costique, bien que proches, ne diffèrent pas statistiquement de celle du témoin. Alors que l'inuloxine C a provoqué une ponte moyenne presque double par rapport à celle du témoin (augmentation de 97 %, $P < 0,001$).

À l'inverse, lorsque des femelles non traitées se sont accouplées avec des mâles traités (FNT x MT), les 3 composés (Inuloxines A et C et l'acide α -costique) ont réduit de manière significative le nombre d'œufs pondus par rapport au témoin non traité ($P < 0,001$) avec une inhibition de la ponte presque égale allant de 23% à 27%.

Tableau 11: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la fécondité de *Callosobrochus maculatus*.

Type d'accouplement	FT x MNT		FNT x MT	
	Nombre des œufs pondus	Différencea %	Nombre des œufs pondus	Différencea %
Inuloxine A	676, 5 a	nsb	755, 0 a	-27
Inuloxine C	2200, 2 b	+97	784, 5 a	-24
Acide α costique	754, 0 a	nsb	800, 0 a	-23
Témoin (Acétone)	1114, 5 a	-	1033, 8 b	-

Les Inuloxines A et C ont été testés à 1.58 $\mu\text{l/ml}$ et 1.74 $\mu\text{l/ml}$, respectivement. L'Acide α -costique a été testé à 1.52 $\mu\text{l/ml}$.

FT ; Femelles traitées/ MT ; Mâles traités/ MNT ; Mâles non traités/ FNT ; Femelles non traitées, a : par comparaison au témoin non-traité ; b ns:non significatif

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

▪ **Effet des métabolites sur la fertilité**

Les résultats présentés dans le **Tableau 12** montrent que la fertilité a été significativement affectée, quel que soit le sexe du partenaire sexuel traité. Lorsque les femelles traitées se sont accouplées avec des mâles non traités (FT x MNT), les résultats obtenus ne présentaient pas de différence entre eux mais étaient statistiquement différents du témoin. Les 3 métabolites testés (Inuloxine A, C et l'acide α -costique) ont entraîné un nombre de descendants de la 1^{ère} génération (F1) significativement plus faible ($P < 0,001$) par rapport au témoin non traité. On note également que l'effet des métabolites sur la fertilité était le plus élevé avec l'acide α -costique et le plus faible avec l'inuloxine C.

D'autre part, lorsque les femelles non traitées se sont accouplées avec des mâles traités (FNT x MT), un nombre d'adultes F1 émergés significativement plus faible a été obtenu suite au traitement avec l'inuloxine C et l'acide α -costique ($P < 0,001$) avec des taux de réduction de 70 % et 65 %, respectivement. Par contre, l'inuloxine A n'a pas eu d'effet significatif comparativement au témoin non traité.

Tableau12: Effet des métabolites purs de *Dittrichia viscosa* sur la fertilité de *Callosobrochus maculatus*.

Type d'accouplement	FTx MNT		FNT x MT	
	Nombre d'adultes émergés(F1).	Taux de réduction de la descendance % ^a	Nombre d'adultes émergés(F1).	Taux de réduction de la descendance % ^a
Inuloxine A	12 a	41 a	13 ab	35 ab
Inuloxine C	13 a	36 a	06 a	73 a
Acide α -costique	10 a	49 a	07 a	68 a
Témoin (Acétone)	18 b	11 b	14b	29 b

Les Inuloxines A et C ont été testés à 1, 58 μ l/ml et 1, 74 μ l/ml, respectivement. Acide α costique a été testé à 1, 52 μ l/ml.

FT: Femelles traitées/ MT: Mâles traités/ MNT: Mâles non traités/ FNT: Femelles non traitées./ ^a : Les moyennes ont été calculé à partir de 20 œufs pondus

Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

Sex ratio

Les résultats présentés dans le **Tableau 13** montrent que le sex ratio de la population de descendants F1 varie en fonction du sexe du partenaire d'accouplement traité. Le sex-ratio n'a pas été affecté lorsque les femelles traitées avec tous les métabolites se sont accouplées avec des mâles non traités. À l'inverse, un rapport de sexe plus faible a été constaté lorsque des femelles non traitées s'accouplaient avec des mâles traités avec l'acide α -costique et Inuloxine C, bien qu'une différence significative ($p < 0,001$) n'ait été détectée que pour le dernier métabolite.

Tableau 13: Effet des métabolites de *Dittrichia viscosa* sur le sex ratio de la F1 de *Callosobruchus maculatus*

Type d'accouplement	FTx MNT		FNT x MT	
	% Femelles	Sex ratio	% Femelles	Sex ratio
Inuloxine A	57 a	0,798 a	63 ab	0,585 ab
Inuloxine C	67 a	0,513 a	85 b	0,208 a
Acide α -costique	66 a	0,565 a	75 ab	0,333 ab
Témoin (Acétone)	64 a	0,626 a	58 a	0,745 b

FT: Femelles traitées/ MT ; Mâles traités/ MNT ; Mâles non traités/ FNT ; Femelles non traitées. Les moyennes de chaque colonne suivies de lettres différentes sont significativement différentes selon le test de Duncan au seuil de 5%.

DISCUSSION GENERALE

Les substances d'origine végétale ont toujours constitué une source majeure pour l'élaboration de nouvelles substances aux propriétés thérapeutiques. Dans notre étude, *Dittrichia viscosa* avec son large spectre allélopathique, sa grande diversité biologique, chimique ainsi que son caractère ubiquitaire, nous a incités à évaluer l'activité antagoniste de quatre de ses métabolites à l'égard de quelques bio-agresseurs des cultures.

Effet sur les champignons phytopathogènes

Les métabolites testés n'ont manifesté aucune activité inhibitrice vis-à-vis des souches fongiques utilisées. Beaucoup d'auteurs ont mis l'accent sur les facteurs susceptibles de conditionner l'activité fongicide d'un extrait ou d'un composé issu de plantes. Il ya lieu de citer, la concentration du composé, la nature du solvant, la structure chimique, la sensibilité propre de chaque champignon ainsi que certaines réactions possibles d'antagonisme ou de synergie lors du contact du métabolite avec la souche fongique.

Dans notre étude, l'une des raisons probables de l'absence d'activité des métabolites est le fait que les tests ont été menés avec une dose unique (10µ/ml). Il se peut que cette dose soit insuffisante pour induire un effet, et de surcroit sur une gamme de souches fongiques de sensibilité différente.

A ce sujet, plusieurs auteurs mettent l'accent sur les limites de concentrations requises à partir desquelles l'activité antifongique devient efficace. En effet, **El Ajjouri et al. (2013)** ont observé une sensibilité différente de 4 souches de champignons, à savoir *Gloeophyllum trabeum*, *Poria placenta*, *Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor* vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus ciliatus* et *T. algeriensis*. Globalement toutes les souches fongiques lignivores testées ont montré une grande sensibilité à l'huile essentielle de *T. ciliatus* et une sensibilité inférieure à l'essence de *T. algeriensis*. Dans le même sens, **Maoz et al. (1999)** ont rapporté que la tayunine, un composé sesquiterpène isolé de *Inula viscosa*, provoque une inhibition de la croissance mycélienne de *Microsporium canis* et *Trichophyton rubrum* lorsqu'il est testé à 10 et 50 µg / ml, respectivement.

Pour **Cafarchia et al. (2001)**, c'est à la concentration de 1 mg / ml de tomentosine, un autre sesquiterpène, isolé à partir de fleurs de *I. viscosa*, qu'ils ont pu obtenir une inhibition intéressante contre *Microsporium canis*, *M. gypseum* et *Trichophyton mentagrophytes*.

Aussi, nombreux sont les chercheurs qui ont expérimenté plusieurs solvants pour exprimer l'activité antifongique. Cette dernière est en effet influencée par la nature du solvant et les résultats justifient ce facteur déterminant par des différences très significatives.

Viji et al., (2013) ont trouvé que l'inhibition obtenue avec l'extrait d'acétone des feuilles de *Calotropis gigantea* testé contre des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* était plus importante que celle avec l'extrait aqueux.

De même, l'utilisation des extraits organiques de *Inula viscosa* contre deux espèces de *Trichoderma* et trois de *Fusarium* provoqué des inhibitions plus ou moins importantes en fonction de la nature du solvant. Les pourcentages d'inhibition se situaient entre 17-61%, 77-100% et 55-100% en présence de l'hexane, du chloroforme et du méthanol, respectivement (**Omezzine, 2011**).

Ces résultats ainsi que ceux issus des travaux utilisant soit les huiles essentielles soit les extraits indiquent que *I. viscosa* est une source importante de composés bioactifs utiles pour le développement de produits contre certaines souches fongiques.

Effet sur les adventices

Nos résultats concordent avec ceux de beaucoup d'auteurs qui ont pu mettre en évidence des perturbations des teneurs des chlorophylles sous d'autres stress, hydriques, pathogènes, fertilisants .. etc.

En effet, **Ben Tekaya et al. (2007)** ont rapporté que la chlorophylle b agit plus significativement comme pro-oxydant que la chlorophylle a. De leur côté, **Cheikh M'hamed et al. (2008)** ont montré que la chlorophylle b est moins sensible au stress salin de l'orge que la chlorophylle a.

Cependant, certains auteurs tels que **Guettouche (1990)** affirment que la teneur en chlorophylle n'est pas un bon indicateur de résistance mais c'est plutôt le rapport Ch a / Chb en ce sens que: plus ce paramètre est élevé, plus la plante est tolérante. Il est clairement exposé dans la littérature que la photosynthèse et les échanges gazeux des feuilles sont affectés par plusieurs stress dont, la salinité, le stress hydrique, le stress métallique, la compaction du sol, une nutrition inadéquate...etc (**Tripathi, 1999**). **Hikosaka et al. (2006)** ajoutent que la quantité de la chlorophylle peut être influencée par beaucoup de facteurs tels que l'âge des feuilles, la position des feuilles, et les facteurs environnementaux tels que la

lumière, la température et la disponibilité en eau. Au cours d'un stress hydrique, une diminution de la teneur en chlorophylle a été remarquée chez le blé dur (**Bousba et al., 2009**). L'évaluation de la perte en chlorophylles après infiltration de la juglone, a confirmé l'influence de *Mycosphaerella fijiensis*, agent causal de la cercosporiose noire sur l'activité photosynthétique de différentes variétés de bananiers. (**Amari et al., 2008**). L'explication de cette perte de chlorophylle est selon **Tahri et al., (1998) et Hassani et al., (2014)**, due à l'altération de l'activité de la glutamate synthétase, qui est une enzyme impliquée dans la biosynthèse du glutamate qui est un précurseur de pigments chlorophylliens.

Effet sur les plantes parasites

Les composés d'origine naturelle, comme les phycotoxines produites par des champignons ou les métabolites purs des plantes, peuvent être utilisés dans les stratégies de gestion des mauvaises herbes parasites en interférant avec leurs premiers stades de croissance. Ces métabolites peuvent inhiber la germination des graines ou affectent l'élongation du tube germinatif, empêchant ainsi l'attachement à la plante hôte (allélopathie positive), ou, au contraire, de stimuler la germination des graines en l'absence de l'hôte (allélopathie négative), ce qui contribue à une réduction du stock des graines du parasite dans le sol (**Vurro et al., 2009 ; Evidente et al., 2013**).

Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus montrent une activité antagoniste efficiente sur la germination des graines de la cuscute. La réduction du taux de germination des graines sous l'action des métabolites de *D. viscosa* était de l'ordre de 90% pour l'Inuloxine C et l'acide α -costique. En revanche, celle induite par l'Inuloxine A était de 100%. Cela est en accord avec les travaux de **Dor & Hershenhorn (2004)** qui ont rapporté que cette plante contient des composés naturels herbicides très actifs. Ces composés actifs ont été purifiés et leur structure chimique a été déterminée. Il s'agit d'un sesquiterpène lactone tayunin (C₁₅H₂₀O₃).

Paradoxalement à la germination, les métabolites n'ont manifesté aucun effet significatif sur l'émergence des plantules de la cuscute. Sur ce volet, beaucoup de travaux font état de la difficulté pour faire valoir les réponses des composés allélochimiques en utilisant le sol comme substrat. En effet, selon **Cheng (1995) et Inderjit, 2001**, une fois dans le sol, ces composés peuvent subir des interférences en matière de rétention, de transport ou de transformation, influençant quelque peu leur phytotoxicité. Selon **Werker & Fahn**

(1981) et **Levizou et al., (2002)**, les composés allélopathiques de cette plante ne sont pas inactivés dans le sol et, de surcroît ses feuilles portent abondamment des glandes sécrétrices assurant une continuité d'approvisionnement du sol en composés allélopathiques jusqu'à la concentration nécessaire pour inhiber l'émergence des plantules de cuscute. On pourrait donc supposer que la dose des métabolites à proximité des graines n'était pas suffisante pour induire un effet inhibiteur sur l'émergence des plantules.

Les tests sur l'orobanche font ressortir que les Inuloxines A et C sont les plus actifs en inhibant complètement la germination des graines de ce parasite (100%) ; alors que, l'acideacostique a exhibé un effet inverse puisqu'il a causé une stimulation de la germination de l'ordre de 29%. Ces mêmes métabolites testés par **Cimmino et al., (2014)** sur une autre espèce d'Orobanche (*Orobanche cumana*) ont montré une activité stimulatrice de la germination des graines. De même, **Evidente et al., (2007)** ont identifié le trigoxazonane, composé purifié du fenugrec (*Trigonella foenum-graecum*) comme étant un inhibiteur de la germination des graines d'*Orobanche crenata*.

Concernant l'effet de ces métabolites sur le développement du tube germinatif des graines germées de l'orobanche, les Inuloxines A et C ont confirmé leur activité inhibitrice (100% d'inhibition). **Cimmino et al., (2015)** ont trouvé que le métabolite pur de seigle Ryecyanatine a inhibé la germination et le développement de *Orobanche crenata*, en induisant la promotion d'une couche de papilles à la pointe de la radicule ce qui empêche l'attachement du parasite à la plante hôte.

L'inhibition de la germination des graines associée à celle de l'émergence des plantules pourrait se révéler être une piste très intéressante pour contrôler les plantes parasites, à l'image des Inuloxines A et C vis-à-vis de l'orobanche.

Effet sur *Callosobruchus maculatus*

Dans notre étude, l'efficacité des métabolites purs extraits de *D. viscosa* comme agent de lutte biologique contre *C. maculatus* a été évaluée en tenant compte de la mortalité des adultes, de la ponte et de l'émergence de la descendance F1. La mortalité des adultes est un paramètre clé pour évaluer l'efficacité d'un produit utilisé pour la protection de denrées stockées. La mortalité empêche les adultes de s'accoupler et de pondre des œufs et limite ainsi l'accroissement de la population de *C. maculatus* dans les stocks de graines.

Nos résultats ont montré que les métabolites testés (Inuloxines A, B et C et acide α -costique) ont agi rapidement, provoquant une mortalité complète (100 %) des adultes un jour seulement après l'exposition à la concentration la plus élevée (5 μ l/ml). Lors des tests de toxicité par contact menés par **Rotundo et al., (2019)**, l'extrait n-hexane des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *D. viscosas* est révélé très bioactif vis-à-vis du charançon du grenier, *Sitophilus granarius* (L.). L'analyse par GC-MS des fractions actives a fortement suggéré l'acide costique et, en particulier les isomères α - et γ -, comme le composé responsable de la toxicité par contact de cet extrait contre les adultes du charançon du grenier.

Par contre, d'autres espèces du genre *Inula* (*Dittrichia*) ont montré une efficacité moindre contre plusieurs parasites des denrées stockées, même lorsqu'elles ont été testées à des concentrations plus élevées. Ainsi, un extrait des racines d'*Inula helenium* L. testé à l'égard de *Sitophilus oryzae* L. a provoqué une mortalité des adultes de 0, 0% et 37% après 3 et 4 jours respectivement d'exposition de l'insecte à une concentration d'extrait de 50mg/100 μ l de méthanol (**Kima et al., 2003**). Dans la même étude, les taux de mortalité sur *Callosobruchus chinensis* L. étaient de 27% et 30% après 1 et 2 jours respectivement après le traitement, ce qui pourrait suggérer que *C. chinensis* était plus sensible. L'extrait des parties aériennes de *Inula racemosa* Hook. a permis d'obtenir un taux de mortalité de 66, 59% de *C. chinensis* infestant les graines de pois chiches stockées dans l'Uttar Pradesh en Inde après une journée d'exposition à l'extrait testé appliqué à une dose allant jusqu'à 2 % (**Chandel et Singh 2017**). En outre, le Neem, *Azadirachta indica* A. Juss., connu pour sa grande toxicité pour *C. maculatus*, a nécessité des concentrations plus élevées et plus de temps pour atteindre une mortalité de 100% des adultes. A titre d'exemple, des extraits de feuilles de neem appliqués à une concentration de 3, 8 g/l ont permis d'obtenir une mortalité complète des adultes de *C. maculatus* le 3^{ème} jour après le traitement (**Paranagama et al., 2003**). De même, la mortalité des chrysomélides a atteint 65-100 % 3-5 jours après l'enrobage des graines de niébé avec l'huile de Neem (**Ivbijaro, 1990**).

Nos résultats ont également montré que la ponte et l'émergence de la progéniture F1 étaient significativement réduites (jusqu'à 27 % et 73 %, respectivement) après traitement avec des métabolites purs de *D. viscosa*, ce qui est cohérent avec plusieurs études précédentes qui ont signalé des réductions significatives du nombre d'œufs pondus et de la progéniture F1 produite après traitement de *C. maculatus* avec des extraits ou des huiles

essentielles de différentes plantes (**Raja et al., 2001 ; Boeke et al., 2004 ; Rahman & Talukder, 2006 ; Demnati & Allache, 2014**).

De toute évidence, sous l'effet des métabolites purs testés, la plupart des œufs pondus n'ont pas achevé leur cycle de vie, ce qui a entraîné une réduction de la production de la descendance F1. **Raja et al., (2001)** ont lié la réduction de l'émergence des adultes à la faible capacité d'éclosion des œufs et ont supposé que les vapeurs d'huiles des plantes testées se sont diffusées probablement dans les œufs et ont affecté le processus physiologique et biochimique associé au développement embryonnaire.

Les composés utilisés dans la présente étude sont des lactones sesquiterpènes bi- et tricycliques, appelées Inuloxines A-C et l'acide α -costique (**Andolfi et al., 2013**) isolés des parties aériennes du membre des *Asteraceae*, *Dittrichia (=Inula) viscosa*. Les lactones sesquiterpéniques constituent l'une des classes de métabolites secondaires les plus répandues et les plus importantes sur le plan biologique, et sont les plus répandues dans les *Asteraceae* (**Chadwick et al., 2013**). Il a été démontré que les sesquiterpènes exercent un large éventail d'effets sur les insectes nuisibles des denrées stockées, notamment une toxicité de contact, une altération de la croissance, des activités répulsives et dissuasives, ainsi qu'une inhibition de la reproduction par des effets ovicides et larvicides (**Tripathi et al., 2000; Garcia et al., 2003; Nawrot & Harmatha 2012; Aliyu et al., 2014; Russo et al., 2015; Wei et al., 2018**)

Le résultat le plus frappant de la présente étude est la différence entre les réponses des mâles et des femelles de *C. maculatus*, les mâles présentant une plus grande sensibilité au traitement avec les métabolites purs testés (Inuloxine A, Inuloxine C et acide α -costique). Ce constat a été confirmé lorsque la ponte n'a été significativement réduite que lorsque des femelles non traitées se sont accouplées avec des mâles traités (FNT x MT), mais pas dans le cas contraire. De plus, une émergence de la progéniture F1 significativement plus faible a pu être obtenue à partir d'œufs pondus par des femelles non traitées qui se sont accouplées avec des mâles traités avec 2 des 3 métabolites purs testés (l'Inuloxine C et l'acide α -costique). En outre, le sex-ratio n'a été affecté que lorsque des femelles non traitées se sont accouplées avec des mâles traités.

Toutes ces données suggèrent que les composés testés peuvent avoir induit la stérilité des mâles, entraînant une réduction de la fécondité et de la fertilité des femelles non traitées qui se sont accouplées avec les mâles traités. Plusieurs extraits de plantes et huiles essentielles ont été signalés comme des chimiostérilisants contre les insectes (**Saxena et al.,**

1977; Singh 2017) en réduisant la ponte des insectes, l'éclosion des œufs, le développement postembryonnaire et la production de la descendance. En plus de la toxicité directe, la chimiostérilisation par des produits naturels peut être une méthode de contrôle intéressante en produisant en masse des mâles stériles pour les relâcher. Une autre explication pourrait être un effet indirect des mâles traités sur les ovaires des femelles. On peut donc supposer que les sesquiterpènes présents sur la genitalia des mâles traités ont pu être introduits dans la cavité corporelle de la femelle lors de l'accouplement et ainsi provoquer des effets ovicides plus importants que lorsque les femelles étaient traitées seules. Des recherches supplémentaires sont, néanmoins, nécessaires pour mieux comprendre ce phénomène et son utilisation à des fins de lutte.

En conclusion, nos résultats sur l'activité biologique des métabolites purs issus de *Inula viscosa* contre la bruche du pois chiche viennent s'ajouter à ceux des autres chercheurs pour promouvoir, rationaliser et optimiser les investigations dans ce domaine ; avec éventuellement des perspectives de formulations d'un bio pesticide.

CONCLUSION GENERALE

Le présent travail est consacré à l'étude de l'activité biologique de quelques métabolites purs extraits de *Dittrichia viscosa* à l'égard de quelques bioagresseurs des plantes cultivées.

A travers les différents tests réalisés, nous avons pu évaluer l'activité biologique de ces métabolites sur deux types de plantes parasites (*Cuscuta campestris* et *Orobanche crenata*). Les Inuloxines A et C ont causé une inhibition totale de la germination des graines de ces deux plantes parasites avec une incidence très significative sur le développement du tube germinatif de l'Orobanche.

Dans nos conditions expérimentales, aucun effet n'a été décelé sur les souches fongiques phytopathogènes utilisées bien que, comme rapporté dans la littérature, certains extraits aqueux et huiles essentielles de la même plante ont montré une activité fongicide sur plusieurs autres espèces de champignons.

Concernant l'effet sur la chlorophylle, de manière générale les chlorophylles b et totales ont montré une sensibilité vis-à-vis des métabolites testés chez toutes les espèces adventices étudiées à l'exception de *Chenopodium album* qui n'a manifesté aucune sensibilité envers les métabolites testés. L'acide α -costique a entraîné la réduction la plus élevée des taux de chlorophylle.

Concernant l'insecte des denrées stockées *Callosobruchus maculatus*, les quatre métabolites testés ont manifesté une activité insecticide très élevée avec des DL50 inférieures à 1,8 μ l/ml. L'Inuloxine A et l'acide α -costique se sont révélés les plus toxiques.

Les résultats de la présente étude suggèrent clairement que l'on peut s'attendre à une protection efficace des graines de pois chiches stockées grâce à l'action combinée d'une réduction de la ponte, d'une mortalité élevée des adultes et de faibles taux d'émergence. Ils ont également démontré que les métabolites extraits de *D. viscosa* exercent une activité toxique significative sur *C. maculatus* dans des conditions contrôlées. Par conséquent, l'utilisation de ces métabolites ou de la plante entière de *D. viscosa*, pourrait aider à protéger les graines de pois chiches ou d'autres légumineuses stockées.

Par ailleurs, et malgré l'abondante littérature concernant l'utilisation de l'huile essentielle ou des extraits de *D. viscosa* comme agents protecteurs de stockage, aucun des travaux que nous avons pu examiner n'a pris en compte les effets que cette plante pourrait avoir sur la qualité des denrées stockées. Par conséquent, des tests de laboratoire standardisés doivent être

entrepris pour quantifier ces effets, étant donné, par exemple, que la forte odeur de la matière végétale de *D. viscosa* est susceptible de donner une odeur aux denrées alimentaires stockées et traitées.

D'autres aspects pouvant faire l'objet d'études ultérieures peuvent inclure l'optimisation des conditions d'extraction et de conservation, l'optimisation des méthodes d'application (par le développement de formulations appropriées) pour les essais en plein champ, les mécanismes d'action ainsi que la toxicité envers les cultures, les invertébrés et l'Homme.

Enfin, il est évident que ce type de contribution, doit s'inscrire dans un vaste programme qui vise la valorisation des ces métabolites à une échelle plus grande afin d'aboutir à la formulation de biopesticides.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbott, WS.1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*: 18: 265-267.
2. **Abraz F. 2015.** Etude de l'activité biologique des extraits de quelques plantes aromatiques à regard d'un insecte ravageur des grains stockés, *Callosobruchus maculatus* (coleoptera: bruchidae). Thèse de magister. Faculté des sciences biologique et des sciences agronomiques de l'université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 69p.
3. **Adebayo R.A., Oke T.F. 2017.** Effects of honey and glucose solutions feeding and larval competition on the development of *Callosobruchus maculatus* (f.) [Coleoptera: chrysomelidae]. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 5(2): 1270-1273.
4. **Agriculture Et Agroalimentaire Canada (AAC). 2009.** lutte biologique: se servir de la nature pour lutter contre les organismes nuisibles des cultures. in agriculture et agroalimentaire canada. publications du gouvernement du Canada.
5. **Aïboud K. 2012.** Etude de l'efficacité de quelques huiles essentielles à l'égard de la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (coléoptera: bruchidae) et impacte des traitements sur la germination de *Vigna unguiculata* (l.) walp. Thèse de magister. Université Mouloude Mammeri, Tizi ouzou.83p.
6. **Ait Aider F. 2017.** Activité biologique des principaux constituants de l'huile d'olive de Kabylie sur *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Thèse de doctorat. Universite Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou.123p.
7. **Ait Youcef, 2006.** Les plantes medicinales de Kabylie. Edition Ibis Press. Paris. 349p.
8. **Aliyu A.B., Adeyemi M.M.H., Abdulkadir I., Dambatta M.B., Amupitan J.O., Oyewale A.O. 2014.** Antifeedant activity of *Vernonia ocephala* against stored product pest *Tribolium casteneum* (Herbst). *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*;49:243 – 248.
9. **Al-Masri M.I., Sharawi S.M., Barakat R.M. 2015.** Effect of *Clammy inula* (*Inula viscose*) plant extract in combination with a low dose of the fungicide iprodione on *Botrytis cinerea* in vitro and in vivo. *American Journal of Plant Sciences*; 6: 1519-1526.
10. **Almela L., Sanchez-Munoz B., Fernandez-Lopez J A., Roca M.J, Rabe V. 2006.** Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*; 1120: 221- 229.

11. **Alouani A., Rehim N., Soltani N. 2009.** Larvicidal activity of a Neem tree extract (Azadirachtin) against mosquito larvae in the republic of Algeria. *Jordan Journal of Biological Sciences*; 2 (1) :15-22
12. **Alzouma I. 1995.** Connaissance et contrôle des coléoptères bruchidae ravageurs des légumineuses alimentaires au sahel. *Sahel Ipm N°1 Février*, 2-16.
13. **Amari E.G.D., Kone D., Dick E., Traore S., Kobenan K., Anno P.A. 2008.** Etude comparée de paramètres photosynthétiques chez différentes variétés de bananiers après infiltration de la juglone, un métabolite toxique de *Mycosphaerella fijiensis*, agent causal de la cercosporiose noire. *Journal of Applied Biosciences*; 10 (2): 523 - 531.
14. **Ambrosi D., Barralis G., Cluzeau-Moulay S., Coutin R., Faivre-Amiot A., Muller B., De La Rocque B. 2007.** Commission des essais biologiques: repertoire terminologique en protection des plantes. Association française de protection des plantes. 95p.
15. **Andolfi A., Zermane N., Cimmino A., Avolio F., Boari A., Vurro M., Evidente A. 2013.** Inuloxins A–D, phytotoxic cyclic sesquiterpene lactones produced by *Inula viscosa*: potential for broomrapes and feld dodder management. *Phytochemistry*; 86:112–120.
16. **Andriamialiharisoa R.F., 2011.** Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *Mascaro coffea* et des endophytes des feuilles de *Coffea sp* A315, Thèse de Magister, Université D'Antananarivo.103p.
17. **Andry C., 2005.** Biopesticides, a global perspective. Natural Resources Institute, University of Greenwich UK. Ghana. 34p.
18. **Aouar L. 2012.** Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat En Sciences En Biochimie Et Microbiologie Appliquées. Université Mentouri-Constantine. 240p
19. **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). *Biotechnology, Agronomy, Society And Environment*; 10 (2): 67 – 71.

- 20. Arnaud P., Jamart B., Bodiguel J., Brosse N. 2015.** Les cours de Paul Arnaud, chimie organique. 19e edition. © Dunod, Paris. 669p.
- 21. Arumugam, G., Velayutham, V., Shanmugavel, S., Sundaram J. 2016.** Efficacy of nanostructured silica as a stored pulse protector against the infestation of bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Nanoscience* ; 6 (3): 445–450.
- 22. Aşkin Çelik T. Aslantürk Ö.S. 2010.** Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of *Inula viscosa* Leaf extracts with *Allium* Test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 1-9.
- 23. Asselin A. 2012.** Maladies des plantes. 3p. (disponible en ligne sur: <http://www.thecanadianencyclopedia.com/articles/fr/maladies-des-plantes>).
- 24. Ayodele O., Kolawole-Raphael E., Okonji-Joshua O., Ajele. 2011.** *Tithonia diversifolia*, *Cyperus rotundus* and *Hyptis suaveolens* ethanol extracts combinatorially and competitively inhibit affinity purified cowpea storage bruchid (*Callosobruchus maculatus*) glutathione S-transferase. *Arthropod-Plant Interactions*; 5:175–184.
- 25. Balachowsky A.S., 1962.** Entomologie appliquée à l'agriculture, Tome 1: Colioptères. premier volume. Ed. Liason et Cie, Paris
- 26. Barbouche N., Hajjem B., Lognay G., Ammar M. 2001.** Contribution à l'étude de l'activité biologique d'extraits de feuilles de *Cestrum parqui* L'Hérit. (Solanaceae) sur le criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* (Forsk.). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*; 5(2): 85-90.
- 27. Beck C.W., Blumer L.S. 2007.** Bean beetles, *Callosobruchus maculatus*, a model system for inquiry-based undergraduate laboratories. Pages 274-283, in *Tested Studies for Laboratory Teaching*, Volume 28 (M.A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 28th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 403 pages.
- 28. Belabid L., Baum M., Fortas Z., Bouznad Z., Eujayl I. 2004.** Pathogenic and genetic characterization of Algerian isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* by rapd and aflp analysis. *African Journal of Biotechnology*; 3(1): 25-31.
- 29. Bellahcene M., Fortas Z., Fernandez D., Nicole M. 2005.** Vegetative compatibility of *Verticillium Dahlia* isolated from olive trees (*Olea europea* L.) in Algeria. *African Journal of Biotechnology*; 4 (9): 963-967.

- 30. Ben Halima K.M, Rebhi R., Ommezine A .2010.** Habitats et proies de *Coccinella algerica* Kovar dans différentes régions côtières de la Tunisie. *Faunistic Entomology* ; 63 (1): 35-45
- 31. Ben Tekaya I., Hassouna M. 2007.** Effets des chlorophylles, du bêta-carotène, de l'alphatocophérol, du tyrosol et de leurs interactions sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive tunisienne. *Oilseeds and fats, Crops and Lipids* ; 14 (1):60-67.
- 32. Benayache S., Banayache F., Dendoughi H., Jay M. 1991.** Les Flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* ; 25(4): 170-176.
- 33. Benchohra M.A., Hamel L., Bendimered F.Z., Benchohra M. 2011.** Chemical composition of essential oil of *Inula viscosa*. ScienceLib Editions Mersenne 3.
- 34. Benguerba A. 2008.** Etude phytochimique et de la phase butanolique de l'espèce *Inula crithmoides* L., Thèse de magister. Université Mentouri Constantine. 101 p.
- 35. Benhammou N .2012.** Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen. 161p.
- 36. Benhammou N. 2006.** Etude des activités antimicrobiennes et anti oxydantes des huiles essentielles et des composés phénoliques de *Pistacia lentiscus*, *Pistacia atlantica*, et *Inula viscosa* de la région de Tlemcen. Thèse de Magister. Université Aboubekr Belkaid.145p.
- 37. Benyahia A. 2014.** Contribution à l'étude photochimique et activités biologique de deux plantes médicinales *Inula viscosa* et *Inulamontana*. Master En Chimie. Université aboubakr belkaid - Tlemcen, 53p.
- 38. Boeke S.J., Barnaud C., van Loon J.J.A., Kossou D.K., Van Huis A., Dicke M.2004.** Efficacy of plant extracts against the cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus*. *International Journal of Pest Management*; 50:251–258.
- 39. Boivin G.2001.** « Parasitoïdes et lutte biologique: paradigme ou panacée? », *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*; 2 (2). Online since 01 October
URL :<http://journals.openedition.org/vertigo/4096> ; DOI:
<https://doi.org/10.4000/vertigo.4096>
- 40. Borowiec N., Fleisch A., Kreiter P., Tabone E., Malausa T., Fauvergue X., Quilici S., Ris N., Malausa J.C. 2011.** Lutte biologique classique et insectes phytophages: Ou en

est la recherche? Quels en sont les enjeux et dans quel contexte? Quelle évolution future?. *Phytoma* -La Défense des Végétaux. (647):16-20.

41. **Bouhadjera W. 2017.** Étude histométrique de l'espèce *Inula viscosa*, dans la région de Tlemcen. Mémoire de Master en Ecologie végétale et environnement. Université de Tlemcen.79p.
42. **Boumaza D.2011.**Séparation et caractérisation chimique de quelques biomolécules actives de deux plantes médicinales ; *Inula viscosa* , *Rosmarinus officinalis* de la région d'Oran.Thèse Magister En Chimie Organique. Université D'Oran.78p.
43. **Bouregghda H., Bouznad Z. 2009.** Biological control of fusarium wilt of chickpea using isolates of *Trichoderma harzianum* And *T. longibrachiatum*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungaria*; 44(1):25-38.
44. **Bousba R., Ykhlef N., Djekoun A. 2009.** Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum Desf*).*World Journal of Agricultural Sciences*; 5(5): 609 -616.
45. **Bouzerida K., Mandi R., Lahlouh B. 2016.** La lutte biologique contre les insectes nuisibles: Utilisation des plantes et des extraits de plantes. Mémoire de Master. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Constantine.115p.
46. **Brown, E.A., Gay L., Vasudev R., Tregenza T., Eady P.E., Hosken D.J. 2009.**Negative phenotypic and genetic associations between copulation duration and longevity in male seed beetles.*Heredity*; 103: 340– 345.
47. **Brullo S., De Marco G. 2000.** Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (*Asteraceae*). *Portugaliae Acta Biologica*.19: 341-354.
48. **Brunel S., Tison J. 2005.**Study on invasive plants in the Mediterranean Basin. Rencontre Environnement, n° 59: 49 - 50 p.
49. **BssaibisF., GmiraN., Meziane. 2009.** Activité antibactérienne de *Dittrichia viscosa* (L.) W Greuter. *Industrial, sanitary and environmental microbiology journal*; 13 (1) :44-45.
50. **Bssaibis F., Gmira N. & Ounine KH. 2007.** Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et activité biologique de *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. *Journée Scientifique «Ressources Naturelles Et Antibiothérapie»*, Faculté Des Sciences – Kenitra.

- 51. Cafarchia C., De Laurentis N., Milillo M.A, Losacco V., Puccini V. 2001.**Fungistatic activity of a sesquiterpene lactone (Tomentosin) isolated from fresh *Inula viscosa* (*Asteraceae*) flowers from the Puglia region. *Parassitologia*; 43 (3): 117-121.
- 52. Camara M. 1997.** Recherche sur les nouvelles substances biocides végétales -Application au contrôle des bruches du niébe *Callosobruchus maculatus* (F.) et de l'arachide *Caryedon serratus* (O1.). Diplôme d'ingénieur Agronome. ENSA-Sénégal. 102p.
- 53. Caswell G.H.1960.** Observations on an abnormal form of *Callosobruchus maculatus* (F.). *Bulletin of entomological research*; 50: 671-680.
- 54. Chadwick M., Trewin H., Gawthrop F., Wagstaf C. 2013.** Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*; 14:12780–12805.
- 55. Chahmi N., Anissi D., Jennan S., Farah A., Sendide K., El Hassouni M. 2015.**Antioxidant activities and total phenol content of *Inula viscosa* extracts selected from three regions of Morocco. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*; 5(3): 228-233.
- 56. Chandel B.S., Singh A. 2017.** Entomotoxicity of *Chromolaena odorata*, *Tagetes minuta* and *Reichardia tingitanain* suppressing oviposition and adult emergence of *Callasobruchus chinensis* s(L.) infesting stored chickpea seeds in U.P. *International Journal of Zoologystudies* 2:38–44.
- 57. Cheikh M'hamed R., Abdellaoui K., Kadri M., Ben Naceur S., Bel Hadj. 2008.** Evaluation de la tolérance au stress salin de quelques accessions d'orge (*Hordium vulgare*) cultivées en Tunisie: approche physiologique. *Sciences & Technologie*: 30 -37.
- 58. Chen Y., Zhou G., Liu L., Xiong Z., Li Y.2001.**Enantioselective total synthesis of eudesma-3, 11 (13)-dien-12-oic acid. *Synthesis* (9): 1305-1307.
- 59. Chi Y.H., Ahn J.E., Yun D.J., Lee S.Y., Liu T.X., Zhu- Salz Man K. 2011.**Changes in oxygen and carbon dioxide environment alter gene expression of cowpea bruchids.*Journal of Insect Physiology*; 57: 220- 230.
- 60. Chougourou D.C., Alavo T.B.C. 2011.** Storage systems and endogenous tactics for insect pests control in stored grain legumes in central Benin. *Revue CAMES - Série A*; 12 (2): 137-141.

- 61. Ciccarelli D., Garbari F., Pagni A., 2007.** Glandular hairs of the ovary: A helpful character for asteroideae (*Asteraceae*) taxonomy. *Annales Botanici Fennici* ; 44: 1-7.
- 62. Cimmino A., Fernández-Aparicio M., Andolfi A., Basso S., Rubiales D., Evidente A. 2014.** Effect of Fungal and Plant Metabolites on Broomrapes (*Orobanche and Phelipanche spp.*) Seed Germination and Radicle Growth. *Agricultural. Food Chemistry*; 62 :10485–10492.
- 63. Cimmino A., Fernández-Aparicio M., Avolio F., Yoneyama K., Rubiales D., Evidente A. 2015.** Ryecyanatines A and B and ryecarbonitrilines A and B, substituted cyanatophenol, cyanatobenzo[1, 3]dioxole, and benzo[1, 3]dioxolecarbonitriles from rye (*Secale cereale L.*) root exudates: Novel metabolites with allelopathic activity on *Orobanche* seed germination and radicle growth. *Phytochemistry*; 109 :57–65.
- 64. Correia A.A., Wanderley-Teixeira V., Teixeira A.A.C., Oliveira J.V., Gonçalves G.G.A., Cavalcanti M.G.S., Brayner F.A., Alves L.A. 2013.** Microscopic analysis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with azadirachtin, lufenuron, and deltamethrin. *Journal of Economic Entomology*; 106 (2): 747-755.
- 65. Daghdak H., Zaitar R. 2014.** Evaluation de l'activité anti-oxydante et anti inflammatoire de la plante medicinale algerienne *Inula viscosa*: Université Constantine1: 91p.
- 66. DeLuca Y., 1979.** Ingrédients naturels de préservations des graines stockées dans les pays en voie de développement. *Journées D'agriculture Traditionnelle Et De Botanique appliquée* ; 26 (1): 29-52.
- 67. De Lara M., Maure A. 2017.** Stratégies optimales d'introduction de coccinelles pour lutter contre des pucerons ravageurs de cultures. 21p.
- 68. Delobel A., Tran M., 1993.** Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, Paris, p 424.
- 69. Demnati F., Allache F. 2014.** Effect of *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae) on oviposition of *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae). *Journal of Crop Protection* ; 3: 327–334.
- 70. Deravel J., Krier F., Jacques P. 2013.** les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*; 18(2): 220-232.

- 71. Derron J.O., Goy G. 2006.** Prévion des lâchers de trichogrammes dans la lutte biologique contre la pyrale du maïs. *Revue Suisse d'Agriculture* ; 38 (5): 237-240.
- 72. Dharmagada V.S.S., Naik S.N., Mittal P.K., Vasudevan P. 2005.** Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, 96: 1235-1240.
- 73. Djossou J., 2006.** Etude des possibilités d'utilisations des formulations à base de fruits secs de *Xylopiya aethiopica* Dunal (Annonaceae) pour la protection des stocks de niébe contre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). Master complémentaire. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgique.
- 74. Dobignard A., Chatelain C. 2011.** Index synonymique de la flore d'Afrique du nord. Volume 2: Dicotyledoneae: Acanthaceae – Asteraceae . Ville de Genève, Éditions des conservatoire et jardin botaniques, Genève, 430p.
- 75. Dor E., Hershenhorn J. 2004.** Metabolite from *Inula viscosa* is toxic to dodder (*Cuscuta campestris*). Proceeding of plant management in sustainable agriculture «use of natural compounds for parasitic plant management ». Naples, Italy: 5.
- 76. Druart F. 2017.** Production de micro-organismes entomopathogènes pour lutter contre les moustiques et caractérisation de leurs métabolites. diplôme de master bioingénieur en sciences agronomiques. Faculté: Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT). 80p.
- 77. Dua V.K., Pandey A.C., Alam M.E., Dash A.P. 2006.** Larvicidal activity of *Hibiscus obelmoschus* Linn. (Malvaceae) against mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association*; 22: 155-157.
- 78. Eady P.E. 1991.** Sperm competition in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): a comparison of two methods used to estimate paternity. *Ecological Entomology*; 16: 45- 53.
- 79. Ekeh F.N., Onah I., Atama C.I., Ivoke N., Eyo J.E. 2013.** Effectiveness of botanical powders against *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in some stored leguminous grains under laboratory conditions. *African Journal of Biotechnology*; 12 (12),: 1384-1391.
- 80. El Ajjouri M., Ghanmi M., Satrani B., Amarti F., Rahouti M., Aafi A., Ismaili R., Abdellah F. 2013.** Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles

de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Botanica Gallica* ; 157 (2): 285-294.

- 81. El-Sabroun A., Bressac C. 2012.** Influence de l'environnement sur la reproduction des mâles d'hyménoptères parasitoïdes d'intérêt agronomique. BOURSES DE Perfectionnement A La Formation Par L'AUF. Université d'Alexandrie. 15p.
- 82. Etilé E., 2012.** Agricultural Practices that Promote Crop Pest Suppression by Natural predators. Review of the Literature Submitted to Agriculture and Agri-Food Canada: 36p.
- 83. Everts K.L., Osborne L., Gevens A.J., Vasquez S.J., Gugino B.K., Ivors O.K., Harmon C. 2012.** Extension plant pathology: strengthening resources to continue serving the public interest. *Journal of Phytopathology*; 102 (7): 652-655.
- 84. Evidente A, Fernandez-Aparicio M., Andolfi A., Rubiales D., Motta A. 2007.** Trigoxazonane, a monosubstituted trioxazonane from *Trigonella foenum-graecum* root exudate, inhibits *Orobanche crenata* seed germination. *Phytochemistry*; 68: 2487–2492.
- 85. Evidente A., Andolfi A., Cimmino A. 2013.** Microbial and plant metabolites as potential herbicides for the control of parasitic plants. *Pest Management with Natural Products Chapter 11*: 153–166.
- 86. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 1995.** Comment la Communauté internationale peut promouvoir la sécurité alimentaire?. Rome. 49 p.
- 87. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2015.** Action plan for the international year of pulses: Nutritious seeds for a sustainable future. [accessed 27 March 2018]:[13p.]. <http://www.fao.org/3/a-bl213e.pdf>.
- 88. Fournier P. 1947.** Livre des plantes médicinales et vénéneuses de France. Ed. Le Chevalier, Paris, Tome 1:176-178, 447p.
- 89. Fox C.W., Bush M.L., Roff D.A., Wallin W.G. 2004.** Evolutionary genetics of lifespan and mortality rates in two populations of seed beetles, *Callosobruchus maculatus*. *Heredity*; 92: 170- 181.
- 90. Frandon J., Kabiri F. 1998.** La lutte biologique contre la Pyrale du maïs avec les *Trichogrammes*. Évolution de la technique pour une utilisation à grande échelle. Communication présentée au 1er Colloque transnational sur les luttés biologiques, intégrées et raisonnées réuni les 21, 22 et 23 janvier 1998 à Lille.

- 91. Gakuru S., Fouabi K. 1996.** Effet d'extraits de plantes sur la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus*) et le charançon de riz (*Sitophilus oryzae* L). *Cahiers Agricultures*; 5(1):34-42.
- 92. García M., Sosa M.E., Donadel O.J., Giordano O.S., Tonn C.E. 2003.** Effects of some sesquiterpenes on the stored-product insect *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista de la Sociedad Entomologica Argentina*; 62: 17 – 26.
- 93. Gauthier P. 2016.** Mise au point d'une technique de pulvérisation des pupes de trichogramme pour la lutte biologique contre la pyrale dans la culture du maïs sucré. Maîtrise en génie agroalimentaire, Maître ès sciences (M.Sc.). Université de Laval. 112p.
- 94. George S., Vincent S. 2005.** Comparative efficacy of *Annona squamosa* Linn. and *Pongamia glabra* Vent. to *Azadirachta indica* A. Juss against mosquitoes *Journal of Vector Borne Diseases*; 42:159-163.
- 95. Gloria C. 2012.** Le graphique - Le marché phyto divise le monde en quatre. Réussir les grandes cultures. (En ligne): <http://grandescultures.reussir.fr/actualites/le-graphique-le-marche-phyto-divise-le-monde-en-quatre:RRAHZQY6.html>.
- 96. Govindaraj S., Kumari B.D.R. 2013.** Composition And Larvicidal Activity Of *Artemisia Vulgaris* L. Stem Essential Oil Against *Aedes Aegypti*. *Jordan Journal Of Biological Sciences*; 6 (1):11-16
- 97. Grafton-Cadwell E.F., Godfery L.D., Chaney W.F., Bentley W.J., 2005.** Various novel insecticides are less toxic to humans, more specific to key pests. *California Agriculture* ; 59:29-34.
- 98. Guettouche R. 1990.** Contribution à l'identification des caractères morphophysiologiques d'adaptation à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum* Desf). Thèse de diplôme d'Agronomie approfondie. Mise en valeur du milieu naturel. ENSAM. 85p.
- 99. Guèye M.T., Seck D., Wathelet J. P., Lognay G., 2011.** Lutte contre les ravageurs des stocks de cereals et de légumineuses au Sénégal et en Afrique occidentale: A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*; 15(1): 183.
- 100. Gupta S., Dikshit A.K. 2010.** Biopesticides: An ecofriendly approach for pest control. *Journal of Biopesticides*; 3(1): 186 – 188.

- 101. Gwinner J., Harnisch R., Muck O. 1996.** Manual on the Prevention of Post-Harvest Grain Losses. Getz. *Postharvest Protection Project*, Frg. 330pp.
- 102. Habbachi W., Benhissen S., Ouakid M.L., Jean-Pierr F. 2013.** Effets biologiques d'extraits aqueux de *Peganum harmala* (L.) (Zygophyllaceae) sur la mortalité et le développement larvaire de *Drosophila melanogaster* (Diptera-Drosophilidae). *Algerian Journal of Arid Environment*; 3 (1): 82-88.
- 103. Hadjel-Chebheb M., 2014.** Identification des principes actifs des huiles essentielles de quelques résineux et plantes aromatiques de provenance Algérienne et Tunisienne. Etude de leurs activités biologiques à l'égard d'un insecte ravageur des graines stockées, *Callosobruchus maculatus* F. 1775 (Coleoptera: Bruchidae). Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri De Tizi Ouzou. 103p.
- 104. Hainque B., Bruno B., Philippe L., 2008.** Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire. Ed.Médecine sciences Flammarion, Paris, 449p.
- 105. Harman G.E., Obregon M.A., Samuels G.J., Lorito M., 2010.** Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease*; 94 (8): 928- 939.
- 106. Hassani A., Seddiki D., Kouadria M., Bouchenafa N., Negadi M., Labdaoui D.2014:** Effet de la salinité sur le comportement physiologique et biochimique de l'Oléastre (Olivier spontané) et l'olivier cultivé (variété Sigoise). *Revue Ecologie-Environnement* ; 10p.
- 107. Helmut, D. 1969,** Chromatographie Sur Gel, 25-27.
- 108. Hernández V., Recio M.C., Máñez S., Giner R.M., Ríos J.L. 2007.** Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Science*; 81: 480-488.
- 109. Hikosaka K., Ishikawa K., Borjigidai A., Muller O., Onoda Y. 2006.** Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in emperature dependence of photosynthetic rate. *Journal of Experimental Botany*; 57: 291-302 p.
- 110. Huang X.D, El-Alawi Y., Penrose D.M, Glick B.R., Greenberg B.M. 2004.** Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*; 130: 453-463

- 111. Ilboudo Z., 2009.** Activité Biologique de quatre huiles essentielles contre *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Bruchidae), insecte ravageur des stocks de niébé au Burkina Faso. Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou. 150p.
- 112. Inderjit.2001.** Soil ; Environmental effects on allelochemical activity. *Agronomy journal* ; 93: 79-84.
- 113. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). 2010.** Economiser en pesticides: Contrainte ou opportunité?. *Innovations Agronomiques*; 8:1-13.
- 114. Isman M.B., 2000.** Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*; 19: 603-608.
- 115. Ivbijaro M.F. 1990.** The efficacy of seed oils of *Azadirachta indica* A. Juss and *Piper Guineense* Schum and Thonn on the control of *Callosobruchus maculatus* F. *International Journal of Tropical Insect Science*; 11: 149–152.
- 116. Jafer F.S., Annon M.R. 2018.** Larvicidal Effect of Pure and Green-Synthesized Silver Nanoparticles against *Tribolium castaneum* (Herb.) and *Callosobruchus maculatus* (Fab.). *Journal of Global Pharma Technology*; 10(03):448-454.
- 117. Joseph R.M., Devineni A.V., King I.F. Heberlein U. 2009.** Oviposition preference for and positional avoidance of acetic acid provide a model for competing behavioral drives in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 106 (27): 11352-11357.
- 118. Johnson F., Seri-Kouassi B., Aboua K. Foua-Bi L. R. N. 2006.** Utilisation de poudres et d'extraits totaux issus de plantes locales des genres *Ocimum sp.* et *Mentha sp.* comme biopesticides dans la lutte contre *Callosobruchus maculatus* Fab. *Agronomie Africaine* ; 18 (3): 221-233.
- 119. Jurd L., 1962** - The chemistry of flavonoid compounds. Ed.Geissman, T.A, Pergamon Press, Oxford, 107-155.
- 120. Keita S.M., Vincent C., Schmita J.P., Arnasonc J.T., Bélanger A. 2001.** Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicum* L. and *O. gratissimum* L. applied as an insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus* (Fab.) [Coleoptera: Bruchidae]. *Journal of Stored Products Research*; 37: 339–349

- 121. Kellouche A., Ait-Aider F., Labdaoui K., Moula D., Ouendi K., Hamadi N., Ouramdane A., Frerot B., Mellouk M. 2010.** Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Integrative Biology*; 10 (2):86-89.
- 122. Kellouche A. 2005.** Etude de la bruche du pois-chiche, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): Biologie, physiologie, reproduction et lutte. Thèse de doctorat d'état, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, 155p.
- 123. Kellouche A., Soltani N. 2004.** Activité de reproduction et capacité de développement de la descendance de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) dans les graines de différents cultivars de *Vigna unguiculata* (Walp.) et *Cicer arietum* (L.). *International Journal of Tropical Insect Science* ; 24 (4): 304-310.
- 124. Kergoat G.J. 2007.** Evolution de la spécificité des relations entre les bruches et leurs plantes-hôtes en relation avec leur capacité à devenir des ravageurs des denrées stockées. In Book: Insectes ravageurs des graines de légumineuses: Biologie des Bruchinae et lutte raisonnée en Afrique :25-31.
- 125. Khashaveh A., Ziaee M., Safaralizadeh M.H. 2011.** Control of pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* f. (coleoptera: bruchidae) in different cereals using spinosad dust in storage conditions. *Journal of plant protection research*; 51(1): 77-81.
- 126. Kim B.J., Choi C.H., Lee C.H., Jeong S.Y., Kim J.S., Kim B.Y., Yim H.S., Kang S.O. 2005.** Glutathione is required for growth and prespore cell differentiation in *Dictyostelium*. *Developmental biology*; 284: 387-398.
- 127. Kima S.I., Roha J.Y., Kima D.H., Leeb H.S., Ahna Y.J. 2003.** Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Product Research*; 39:293–303.
- 128. Kostyukovsky M., Chen B., Atsm S., Shaaya F. 2000.** Biological activity of two juvenoids and two ectysteroids against three stored product insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 53: 61-81.
- 129. Laëtitia M., 2017.** Contribution à l'étude de l'effet d'une culture associée entre l'armoise africaine (*Artemisia Afra* Jacq. Ex Willd.) et le chou pomme (*Brassica Oleracea* Var. *Capitata* L.) sur les ravageurs du chou pomme dans la région de Thies au Sénégal. Master en bioingénieur: sciences agronomiques. 90p.

- 130. Lagnika L. 2005.** Etude phytochimique et activité antipaludique de substances naturelles issues de plantes Béninoises. Thèse de Doctorat, Université Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-Calavi, Bénin, 268 pp.
- 131. Lakhdar L. 2015.** Evaluation de l'activité antibactérienne d'huiles essentielles marocaines sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Étude InVitro. Thèse De Doctorat: Sciences Odontologiques. Université Mohammed V De Rabat, 10-14.
- 132. Lambert N. 2010.** Applicabilité de la lutte biologique aux ravageurs au Québec. Essai effectué en vue de l'obtention du grade de maître en environnement (M.Env.). Université de Sherbrooke. 103p.
- 133. Labrada R. 2005.** Gestion des mauvaises herbes pour les pays en développement. Etude FAO Production Végétale Et Protection Des Plantes 120 Add.1 Organisation Des Nations Unis Pour L'alimentation Et L'agriculture. 300p.
- 134. Lecomte J. 2015.** Lutter naturellement contre la Mouche de l'Olive, Saint-Rémy de Provence, édition sud, « Le choix durable », France: 216 p.
- 135. Lee K.H. 2004.** Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product lead. *Journal of Natural Products*; 67: 273-283.
- 136. Leng P., Zhiming Z., Guangtang P., Maojun Z. 2011.** Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*; 10: 19864-19873.
- 137. Levizou E., Karageorgou P., Psaras G.K., Manetas Y. 2002.** Inhibitory effects of water soluble leaf leachates from *Dittrichia viscosa* on lettuce root growth, statocyte development and graviperception. *Flora*; 197: 152-157.
- 138. Maoz E., Newman J.A., Ferrarese L., Stetson P.B., Zepf S.E., Davis M., Freedman W.Y., Madore B.F. 1999.** A distance to the galaxy NGC4258 from observations of Cepheid variable stars. *Nature*; 401: 351–354.
- 139. Martinez-Villar A., Saenz-De-Cabezón F.J., Moreno-Grijalba F., Vicente M., Perez-Moreno I. 2005.** Effects of azadirachtin on the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology*; 35: 215–222.
- 140. Mediouni Ben Jemâa J., Tersim N., Taleb Toudert K., Khouja M.L. 2012.** Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia,

- Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *Journal of Stored Products Research*; 48: 97-104.
- 141. Mehaoua M.S., Hadjeb A., Lagha M., Bensalah M.K., Ouakid M.L. 2013.** Study of the toxicity of azadirachtin on larval mortality and fertility of carob moth's female *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera, Pyralidae) under controlled conditions. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*; 7(1): 1-9.
- 142. Merghoub N., Benbacer L., El Btaouri V., Ait Benhassou V., Terryn C., Attaleb M., Madoulet C., Benjouad A., El Mzibri M., Morjani H., Amzazi S. 2011.** In vitro antiproliferative effect and induction of apoptosis by *Retama Monosperma* L. extract in human cervical cancer cells. *Cellular & Molecular Biology*; 57: 1581- 1591.
- 143. Merzougui K., Aichour A. 2013.** Contribution dans l'estimation des maladies de l'orge dans les champs de la région de Guelma. Faculte des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre et de l'univers. Mémoire De Master. 90p.
- 144. Morallo R.B., Tantengco G.B., 1986.** Biological activity of flowers extract as insecticides. *NTSA Technology Journal d'Entomologie*; 11 (1): 37 - 46.
- 145. Moumouni D.A., Doumma A., Sembene M. 2013.** Influence des zones agroécologiques sur les paramètres biologiques de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera-Bruchidea), ravageurs des graines du niébé (*Vigna unguiculata* Walp.) au Niger. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*; 7(5): 1866-1876.
- 146. Murdoch A.J., Njuguna J.M., Lukuyu B., Musembi F., Mwangi D., Maina J.M., Kivuva B.M., Mburu M.W.K., Mcleod A. 2003.** Integrated pest management options to improve maize forage yield and quality for small-scale dairy farmers in central Kenya. *Aspects of Applied Biology*; 70: 1-7.
- 147. Navarrete Fuentes P. 2011.** Adhésifs naturels à base de tanin, tanin/lignine et tanin/gluten pour la fabrication de panneaux de bois. Faculté des Science et Technique Nancy 1, Thèse, p. 16-44.
- 148. Nawrot J., Harmatha J. 2012.** Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pests. *Phytochemistry Reviews*; 11: 543-566.
- 149. Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Ngamo L.S.T., Hance T. 2008.** Insecticidal effects of the powdery formulation based on clay and essential oil from the leaves of *Clausena*

- anisata* (Willd.) J. D. Hook Ex. Benth. (Rutaceae) against *Acanthoscelide*. *Journal of Pest Science*; 81(4): 227-234.
- 150. Ndoutoume-Ndong A., Rojas-Rousse D. 2007.** Ya-t-il élimination d'*Eupelmus orientalis* Crawford par *Eupelmus vuilleti* Crawford (Hymenoptera: Eupelmidae) des systèmes de stockage du niébé (*Vigna unguiculata*). *International Journal of Entomology* ; 43(2):139-144.
- 151. Nkouka N. 1995.** Les plantes pesticides dans la lutte intégrée contre les nuisibles In. Intégration de la résistance des plantes et de la lutte biologique. Actes du Séminaire CTA/IAR/IILB, Addis Abeba (Ethiopia), 9-14 Oct. 1997. CTA (ed.) Pg 10-11.
- 152. Oka Y., Ben-Daniel B.H., Cohen Y. 2006.** Contrôle de *Meloidogyne Javanica* par des formulations d'*Inula viscosa* extraits de feuilles. *Journal of Nematology* ; 38(1): 46-51.
- 153. Oksöz S., 1976.** Taraxasterol acetate from *Inula viscosa*. *Plantamed*; 29(4): 343-345.
- 154. Omezzine F., Daami-Remadi M., Rinez A., Ladhari A., Haouala R. 2011.** In vitro assessment of *Inula ssp.* organic extracts for their antifungal activity against some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*; 5: 3527-3531.
- 155. Orphanides G.M. 1993.** Control of *Saissetia oleae* (Hom.: Coccidae) in Cyprus through establishment of *Metaphycus barletti* and *M. Helvolus* (Hym.: Encyrtidae). *BioControl*; 38(2):235-239.
- 156. Ouédraogo A.P., Monge J.P., Huignard J. 1991.** Importance of temperature and seed water content on the induction of imaginal polymorphism in *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *Entomologia Experimentalis et Applicata*; 59: 59-66.
- 157. Ouedraogo P.A. 1978.** Etude de quelques aspects de la biologie de *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coloptera: Bruchidae) et de l'influence des facteurs externes stimulants (plante hôte et copulation) sur l'activité reproductrice de la femelle. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier de Toulouse (sciences). 101 p.
- 158. Ouedraogo P.A. 1991.** Le déterminisme du polymorphisme imaginal chez *Callosobruchus maculatus* F. (Coloptera: Bruchidae). importance des facteurs climatiques sur l'évolution des populations de ce bruchidae dans un système expérimental de stockage des graines de *Vigna unguiculata* (Walp.). Thèse de doctorat. Université Nationale de Côte d'Ivoire. 225p.

- 159. Pacha H.Y., Benayache F., Benayache S. 1993.** Caractéristiques moléculaires et antibactériens de *Centaurea pullata* et *Inula viscosa*. *Algerian Journal of Medicine*; 3 (3): 183-186.
- 160. Paquet J.M. 2014.** L'Inule visqueuse (*Inula viscosa*). *Bulletin de la Société Botanique de France*; 70 (1): 139-141.
- 161. Paranagama P.A., Adhikari A.A.C.K., Abeywickrama K.P., Bandara K. 2003.** Evaluation of volatile constituents of Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) leaf extracts against *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*; 31:445- 458.
- 162. Pierrard. 1981.** Lutte biologique contre les ravageurs et ses possibilités en Afrique de l'ouest. *Compte Rendu du Séminaire qui a eu lieu du 9-13 février 1981 à Dakar, Sénégal.* 275p.
- 163. Pompelli M.F., França S.C., Tigre R.C., De Oliveira M.T., Sacilot M., Pereira E.C. 2013.** Spectrophotometric determinations of chloroplastidic pigments in acetone, ethanol and dimethylsulphoxide. *Brazilian Journal of Biosciences. Porto Alegre*; 11 (1):52-58.
- 164. Preethi R., Devanathan V.V., Loganathan M. 2010.** Antimicrobial and antioxidant efficacy of some medicinal plants against food borne pathogens. *Advances in Biological Research*; 4 (2): 122-125.
- 165. PCA. 2004.** Plateforme Du Chimie Analytique Urf De Chimie Université Joseph Fournier.
- 166. Quezel P., Santa S., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques et méridionales, Tome II, Ed. Cnrs, Paris, 590-593.
- 167. Rahman A., Talukder F.A. 2006.** Bioefficacy of some plant derivatives that protect grain against the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Science*; 6:1–10.
- 168. Rahmouni M., Belhamra M., Ben Salah M.K. 2017.** Biological control by (*Coccinella algerica*, Kovar 1977) against the pest of crops under greenhouses (station bioressources of el outaya) Biskra; Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*; 9(3): 1585-1597.

- 169. Raja N., Albert S., Ignacimuthu S., Dorn S. 2001.** Effect of plant volatile oils in protecting stored cowpea *Vigna Unguiculata* (L.) Walpers against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) infestation. *Journal of Stored Products Research*; 37 (2): 127-132.
- 170. Reeb, 2009.** Plantes Mellifères, Inule Visqueuse. Abeilles et Fleurs. N° 720. Université Paris Vi: 19-20.
- 171. Regnault-Roger C., Silvy C., Alabouvette C. 2005.** Biopesticides, réalités et perspectives commerciales. In: *Enjeux phytosanitaires pour l'Agriculture et l'Environnement du XXI^{ème} siècle*. Regnault-Roger C. ed., Tec & Doc Lavoisier, 849-879.
- 172. Righi K, Righi A.F, Mokabli A. 2014.** Dispersion du nématode à kyste des céréales (*Heterodera Avenae*) dans quelques régions céréalières de l'ouest Algérien. Proceedings Du Séminaire National Sur La Biodiversité Faunistique, ENSA Alger.
- 173. Rotundo G., Paventi G., Barberio A., De Cristofaro A, Notardonato I., Russo M.V., Germinara G.S. 2019.** Biological activity of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter extracts against adult *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Curculionidae) and identification of active compounds. *Sci Rep* 9:6429. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42886-4>;
- 174. Russo S., Cabrera N., Chludil H., Yaber-Grass M., Leicach S. 2015.** Insecticidal activity of young and mature leaves essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill. against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae). *Chilean Journal of Agriculture Research*; 75: 375- 379.
- 175. Sabaou N., Bounaga N., Bounaga D. 1983.** Actions antibiotique, mycolytique et parasitaire de deux actinomycètes envers *Fusarium oxysporum f.sp albedinis* et autres formae speciales. *Canadian Journal of Microbiology*; 29 (2): 194-199.
- 176. Saliou N. 2018.** Prospections pour la mise au point d'une lutte biologique par conservation contre *Tuta absoluta* dans les cultures de tomate au Sénégal. Dakar. Mémoire de master 2. Université Cheikh Anta Diop. 45p.
- 177. Sanon A., Ouedraogo A.P. 1998.** Etude de variation des paramètres démographiques de *Callosobruchus maculatus* (F.) et de ses parasitoides, *Dinarmus basalis* (Rond) et *Eupelmus vuiletti* sur le niébé dans une perspective de lutte biologique. *Insect Science and its Application* ; 18 (3) :241-5250.

- 178. Sas-Piotrowska B., Piotrowski W.2010.** Vitality and healthiness of barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds treated with plant extracts. *Journal of Plant Protection Research*; 50 (1):118-124.
- 179. Sassi A., Skhiri F., Bourgougnon N., Aouni M. 2008.**Antiviral activity of some tunisian medicinal plants against herpes simplex virus type 1. *Natural Product Research*; 22: 53-65.
- 180. Saxena B.P., Koul O., Tikku K., Atal C.K.1977.**A new insect chemosterilant isolated from *Acorus calamus* L. *Nature* ; 270: 512- 513.
- 181. Sbahi K. 2017.** Etude épidémiologique, paramétrique et phytothérapeutique de la lithiase urinaire.Thèse De Doctorat. Université Abd Elhamid Ibn Badis Mostaganem.189p.
- 182. Scholthof K.B.G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G.D. 2011.** Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*; 12(9): 938–954.
- 183. Seck D. 2009.** Stockage, conservation et transformation des récoltes en zones tropicales. Note de cours. Université Cheick Anta Diop (Sénégal) et faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux (Belgique):1-31.
- 184. Seck D., 1992.** Importance économique et développement d’une approche de lutte intégrée contre les insectes ravageurs des stocks de maïs, mil et niébé en milieu paysan proceedings deuxième séminaire sur la lutte intégrée contre les ennemis des cultures vivrières dans le sahel :315- 355.
- 185. Shah D.B., Pesiridou A., Baltuch G.H., Malone D.A., O’reardon, J.P. 2008.** Functional neurosurgery in the treatment of severe obsessive compulsive disorder and major depression: overview of disease circuits and therapeutic targeting for the clinician. *Psychiatry*; 5(9), 24-33.
- 186. Shah F.M., Usman A., Sohail K., Afzaal M., Shah B., Adnan M., Ahmed N., Junaid K., Shah S.R.A, Inayat-ur-Rahman.2016.** Rearing and identification of *Callosobruchus maculatus* (Bruchidae: Coleoptera) in Chickpea. *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 4(2): 264-266.
- 187. Sharma H.C., Gowda C.L.L., Stevenson P.C., Ridsdill-Smith T.J., Clement S.L., Ranga Rao G.V., Romeis J., MilesM., El Bouhssini M. 2007.**Host plant resistance and

- insect pest management in chickpea. Cab International. *Chickpea Breeding and Management*; 520-537.
- 188. Shtacher G., Kashman, Y. 1970.** 12-Carboxyheptadec-3, 11 (13)-diene. Novel sesquiterpenic acid with a narrow antifungal spectrum. *Journal of Medicinal Chemistry*; 13: 1221-1223.
- 189. Side Larbi K., Meddah B., Tir-Touil Meddah A., Sonnet P. 2016.** The antibacterial effect of two medicinal plants *Inula viscosa*, *Anacyclus valentinus* (Asteraceae) and their synergistic interaction with antibiotic drugs. *Journal of Fundamental And Applied Sciences*; 8(2): 244-255.
- 190. Singh S. 2017.** Natural plant products- As protectant during grain storage: A review. , *Journal of Entomology and Zoology Studies*.5: 1873 – 1885.
- 191. Singh B., Yadav R.P. 1999.** Location of sources of resistance amongst chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes against gram pod borer (*Heliothis armigera* Hub.) under normal sown conditions using new parameters. *Journal of Entomological Research*; 23:19–26.
- 192. Small S.A, Schobel S.A., Buxton R.B., Witter M.P., Barnes C.A. 2011.** A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. *Nature Reviews Neuroscience*; 12: 585-601.
- 193. Srivastava M, Raizada R. 2007.** Lack of toxic effect of technical azadirachtin during postnatal development of rats. *Food and Chemical Toxicology*; 45: 465-471.
- 194. Suffert F.2003.** Utilisation volontaire d'agents phytopathogènes contre des cultures l'agro-terrorisme et ses conséquences sur notre approche de la lutte contre les maladies des plantes. *Phytoma - La Défense Des Végétaux*; 563: 8-12.
- 195. Suleiman M., Yusuf M.A. 2011.** The potential of some plant powders as biopesticides against *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) on stored grains: A Review. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*; 4(2): 204 - 207.
- 196. Suty L. 2010.** La lutte biologique vers de nouveaux équilibres écologiques. Ed. Educagri; 44-45.
- 197. Tahri E.H., Belabed A., Sadki K. 1998.** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine

- synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). *The Bulletin of Materials Science*; 21: 81-87.
- 198. Tait M.A., Hik D.S. 2003.** Is dimethylsulfoxide a reliable solvent for extracting chlorophyll under field conditions?. *Photosynthesis Research*; 78: 87–91.
- 199. Tandon P., Sirohi A. 2010.** Assessment of larvicidal properties of aqueous extracts of four plants against *Culex quinquefasciatus* larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences*; 3(1): 1-5.
- 200. Tchaker F.Z., Merah O., Djazouli Z. 2016.** Toxicity evaluation of *Dittrichia viscosa* L.'s aqueous extracts in combination with bio-adjuvant *silene fuscata* on *Chaitophorus leucomelas* Koch. (Hom., Aphididae) and biocenotic resumption of Functional groups. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 12 (3).797-814.
- 201. Tegegne G., Pretorius J.C. 2007.** *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of crude extracts and powdered dry material from Ethiopian wild plants against economically important plant pathogens. *BioControl*; 52: 877–888.
- 202. Thiec M. 2007.** La lutte biologique et les biopesticides. Thèse de doctat en pharmacie. Université de Nantes. Faculté de pharmacie. 140p.
- 203. Thierry D., Xuereb A. 2004.** Vers une lutte biologique contre l'Eudémis (*Lobesia botrana*). Exposé de recherche. UMR INRA ENITAB en Santé Végétale. 7p.
- 204. Toufique B.M., Moumouni D.A., Kadidjatou H.H., Doumma A. 2014.** Study of some factors influencing the efficacy of insecticidal activity of *Boscia senegalensis* Lam (E.g. Poir) in the control of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchinae), pest of Cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *International Journal of Innovation and Applied Studies*; 8 (1): 320-327.
- 205. Tripathi A.K., Prajapati V., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S., Kumar S. 2000.** Repellency and toxicity of oil from *Artemisia annua* to certain stored-product beetles. *Journal of Economic Entomology*; 93:43- 47.
- 206. Trizelia, Haliatur R., Martinius. 2017.** Potential of endophytic fungi from chilli as bioinsecticides against *Tenebrio molitor* Lin. and *Spodoptera litura* Fab.larvae. *Journal of Biopesticides*;10 (1): 10-16.

- 207. U.S.Congress, Office of Technology Assessment (OTA). 1995.** Biologically based technologies for pest control. In Princeton University. Biologically based technologies for pest control, [En ligne]. <http://www.princeton.edu/~ota/disk1/1995/9506/9506.PDF>.
- 208. Utida S., 1954.** « Phase » dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil *Callosobruchus quadrimaculatus* JAP. (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Applied Zoology*; 18: 161-168.
- 209. Utida S., 1972.** Density-dependent polymorphism in the adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Product Research*; 8: 111-126.
- 210. Vazirani T.G. 1976.** A contribution to the knowledge of Oriental Bruchidae. *Journal of the Bombay Natural History Society*; 72:740-757.
- 211. Verscheure R. 2017.** Influence de l'utilisation de méthodes alternatives aux pesticides pour lutter contre les ravageurs de la pomme de terre dans la province du Shandong (Chine). Diplôme de master bioingénieur en sciences agronomiques. Faculté: Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT).
- 212. Viji R., Alaguraja P., Mani P., Velavan S. 2013.** Biological control of *Calotropis gigantea* leaf extracts against pathogenic fungus, infecting *Oryza sativa*. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*; 3 (4): 107-112.
- 213. Vurro M., Boari A., Evidente A., Andolfi A., Zermane N. 2009.** Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Management Science*; 65(5):566-71.
- 214. Vurro M., Evidente A., Andolfi A., Zonno M., Giordano F., Motta A. 1998.** Brefeldin A and a, b-dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. *Plant Science*; 138: 67-79.
- 215. Warlop F., 2006.** Limitation des ravageurs de l'olivier par le recours à la lutte biologique par conservation. *Cahiers Agriculture*; 15(5): 449-455. http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/agr/edocs/00/04/1F/42/article.phtml
- 216. Wei X.M., Guo S.S., Yan H., Cheng X.L., Wei F., Du S.H. 2018.** Contact toxicity and repellency of the essential oil from *Bupleurum bicaule* helm against two stored product insects. *Journal of Chemistry*; Article ID 5830864, 8 pages.

- 217. Wellburn A.R.1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*; 144: 307-313.
- 218. Werker E., Fahn A. 1981.** Secretory Hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.-Development, Ultrastructure, and Secretion. *Botanical Gazette*; 12 (4):461-476.
- 219. Yadav J.S.1971.** Karyological studies on the three species of Bruchidae (Coleoptera). *Caryologia*; 24 (2): 157-166.
- 220. Yezza A. 2005.** Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Université du Québec, Institut national de la recherche scientifique.
- 221. Zeggwagh N.A., Ouahidi N.A., Lemhadri A., Eddouks M. 2006.** Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* ; 108 (24): 223-227.
- 222. Zekeya N., Shahada F., Chacha M. 2014.** Bioefficacy of *Bersama abyssinica* extracts against cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* in storage. *International Journal of Innovative Research & Development*; 3:8.
- 223. Zuoxin L., Junxia G., Jiujiang Y. 2006.** Aflatoxins in stored maize and rice grains in liaoning province, China. *Journal of Stored Product Research*; 42: 468-479.

ANNEXES

Annexe 1: Les flavonoïdes d'*Inula viscosa* L. (Pacha et al., 1993)

NOM DU FLAVONOÏDE
7- Méthyléther Naringénine (Sakuranétine)
7- O-méthyl aromadendrine
3- O-acétyl taxifoline
3- O-acétyl padmatine
4, 7, 4'- Trihydroxyflavone (Apigénine)
6- Méthyl éther scrutellareine (Hispiduline)
5, 7, 3', 4' Tétrahydroxyflavone (Lutéoline)
6- Méthoxylutéoline (Népétine)
5, 7- Dihydroxy - 6, 3'- Diméthoxyflavone (Jacéosidine)
5, 4'- Dihydroxy - 7- Méthoxyflavone (Genkivanine)
7-Méthyl éther kaempférol (Rhamnocitrine)
5, 7, 4' - Trihydroxy - 3- Ethoxyflavine
3, 5, 7 - Trihydroxy - 4' - Ethoxyflavine
3, 5, 7, 3', 4'- Pentahydroxyflavone (quercétine)
5, 7, 3', 4'- Tétrahydroxy - 3-Méthoxyflavone
3, 5, 7, 4' - Tétrahydroxy – 3'-Méthoxyflavone
3, 5, 3', 4' -Tétrahydroxy – 7-Méthoxyflavone
3- Glucosyl –5, 7, 3', 4'- Tétrahydroxyflavone
7- Glucosyl –3, 5, 3', 4'- Tétrahydroxyflavone
7- Glucosyl –5, 3', 4'-Trihydroxy- 3-Méthoxyflavone
5, 7, 4'- Trihydroxy-3, 3'- Diméthoxyflavone
5, 7, 3', 4'- Tétrahydroxy –3, 6- Diméthoxyflavone
5, 7, 3', 4' - Tétrahydroxy –6, 3- Diméthoxyflavone
5, 6, 3', 4' - Tétrahydroxy –3, 7- Diméthoxyflavone
7-Glucosyl –5, 6, 3', 4'-Tétrahydroxy-3-Méthoxyflavone
5, 7, 4'-Trihydroxy –3, 3'-Diméthoxyflavone
(2S)-5, 7, 4' – Trihydroxyflavone (Naungénine)
(2S)-5, 4' - Dihydroxy-Méthoxyflavone

(2R) (3R)-5, 7, 3', 4 – Tétrahydroxyflavone
(2R) (3R)- 5, 3', 4-Trihydroxy –7- Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3, 5, 4'-Trihydroxy –7-Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3-0- Acétoxy – 5, 7, 4'-Trihydroxyflavone
(2R) (3R)- 3-0- Acétoxy-5, 4'-Dihydroxy –7-Méthoxyflavone
(2R) (3R)- 3, 5, 7, 3', 4'-Pentahydroxyflavone
(2R)(3R)-3, 5, 3', 4'-Tétrahydroxy-7-Méthoxyflavone
(2R)(3R)- 3-0-Acétoxy- 5, 3', 4'-Trihydroxy-7- Méthoxyflavone
3-Méthyl éther kaempférol (isokaempféride)
3-Méthyl quercétine
3-Méthoxyquercétine
3-Méthoxy quercétine-7-Glucoside
3- Méthyl éther quercétine
7- Méthyl éther quercétine (Rhamnétine)
3'-Méthyl éther quercétine (Isoramnétine)
3, 3'-Diméthyl éther quercétine
3, 6-Diméthyl éther quercétagétine (Axillarine)
6, 3'-Dithyl éther quercétagétine (Spinacétine)
Eriodictyol
7-Méthyl éther Eriodicyol
3-Acétate aromadendrine
7-Méthyl éther aromadendrine
3-Acétate taxifoline
7-Méthyl éther taxifoline
7-Méthyl éther –3- Acétate taxifoline
Aromadendrine (dihydrokaempférol)
Taxifoline (dihydroquercétine)
7-Méthyl éther taxifoline
7-Méthyl éther –3- Acétate taxifoline
Aromadendrine (dihydrokaempférol)
Taxifoline (dihydroquercétine)

Annexe 2: Les acides sesquiterpéniques d'*Inula viscosa* L. (Pacha et al., 1993).

Acides sesquiterpeniques
Acide eudesma-3, 11 (13) – diène –12 oïque
12- Carboxyeudesma -3, 11 (13) diène
2-Déacétoxy-inviscolide, Xanthinin
Gérmacranolides
Acide ilicique
Acide 3a – Hydroxycostique
Acide 3a - Dydroxy-3, 4-Dahydro 4, 5- Dihydrocostique
Acide costique A
Acide isocostique A
Acide ilicique A
Acide viscique A
Acide viscosique A
Inuviscolide

Annexe 3: Les tritèrènes esters d'*Inula viscosa* L.(Pacha et al., 1993)

Triterpenes esters
Acétate de dammaradiényl
Acétate de taraxastéryle
Acétate de pseudataraxastérite
Fridelin
3- Epifridelinol
20(29) Lupène – 3, 16, b – diol
3 b -monoacétate de tritèrène diol
Y -Acétate de taraxastérole
3, 16-Dihydroxylupéol 3- Palmitate
3, 16- Dihydroxylupéol 3- Myristate
Esters de l'a – Amyrine
Isobutyrate de 3- Méthoxy –para-cymène-7yle
Isovatérate du 3-Métoxy-para-cymène-7yle
Nérotidol

Annexe 4: Les espèces adventices utilisées



Convolvulus arvensis



Anagallis arvensis



Chenopodium album



Oxalis pes-caprae

Annexe 5: Aspect des plantes parasites utilisées



Cuscuta campestris sur tomate



Orobanche crenata sur fève

Annexe 6: Composition du milieu PDA

- 200g Pomme de terre
- 20 g Glucose
- 20 g Agar
- 1litre d'eau distillée stérile

Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 20mn

Annexe 7: Determination de la DL50

Détermination de la DL50 de Inuloxin B (7 jours)/20 individus.

Dose	In dos	Mort. Rep1	Mort. Rep2	Mort. Rep3	Mort. Rep4	Mort. Rep5	Moyenne	%	%Mort corg	Probit
5 ul/ml	1.6094	20	20	20	20	20	20	100%	100	8.09
2.5 ul/ml	0.9162	2	5	8	11	14	8	40%	38.77	4.694
1.25ul/ml	0.2231	12	5	6	9	9	8.2	41%	39.79	4.722
Témoin acétone		0	1	0	1	0	0.4	2		

Mort. : Mortalité/ Rep : Répition/ % Mort.corg. : Pourcentage de la mortalié corrigée

Détermination de la DL50 de Inuloxin A (7 jours) 20/ individus

Dose	Ingdos	Mort. Rep1	Mort. Rep2	Mort. Rep3	Mort. Rep4	Mort. Rep5	Moyenne	%	%Mort corg	Probit
5 ul/ml	1.6094	20	20	20	20	20	20	100	100	8.09
2.5 ul/ml	0.9162	20	20	20	11	20	18.2	91	90.81	6.284
1.25ul/ml	0.2231	5	6	2	10	9	6.4	32	30.61	4.481
Témoin acétone		0	1	0	1	0	0.4	2		

Mort. : Mortalité/ Rep : Répition/ % Mort.corg. : Pourcentage de la mortalié corrigée

Détermination de la DL50 de Inuloxin C (7 jours) /20 individus.

Dose	Ingdos	Mort. Rep1	Mort. Rep2	Mort. Rep3	Mort. Rep4	Mort. Rep5	Moyenne	%	%Mort corg	Probit
5 ul/ml	1.6094	20	20	20	20	20	20	100	100	8.09
2.5 ul/ml	0.9162	20	20	19	11	8	15.6	78	77.55	5.741
1.25 l/ml	0.2231	2	6	5	14	9	7.2	36	34.69	4.591
Témoin acetone		0	1	0	1	0	0.4	2		

Mort. : Mortalité/ Rep : Répition/ % Mort.corg. : Pourcentage de la mortalié corrigée

Détermination de la DL50 de costique acide (7 jours) /20 individus.

Dose	Ingdos	Mort. Rep1	Mort. Rep2	Mort. Rep3	Mort. Rep4	Mort. Rep5	Moyenne	%	%Mort .corg	Probit
5 ul/ml	1.6094	20	20	20	20	20	20	100	100	8.09
2.5 ul/ml	0.9162	20	20	19	11	20	18	90	89.79	6.233
1.25ul/ml	0.2231	5	1	3	10	18	7.4	37	35.71	4.612
Témoin acetone		0	1	0	1	0	0.4	2		

Mort. : Mortalité/ Rep : Répition/ % Mort.corg. : Pourcentage de la mortalié corrigée

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, *Journal of Plant Diseases and Protection*: 126 (2). DOI 10.1007/s41348-019-00240-w.

Cité:

Faiza Gueribis¹, Nadjia Zermane², Ouassila Khalf-Habess¹, Abderrahmane Siafa¹, Alessio Cimmino³, Angela Boari⁴, Antonio Evidente³.2019. Bioefcacy of compounds from *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) as protectant of chickpea seeds against the cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Plant Diseases and Protection*; 123 (2). ISSN 1861-3829, DOI 10.1007/s41348-019-00240-w.

ملخص: في هذه الدراسة ، تم تقييم النشاط البيولوجي لأربعة سيسكيتيربينات ثنائية وثلاثية الحلقات وهي inuloxins A و B و C و α -costique، المستخرجة من الأجزاء الهوائية من *Dittrichia viscosa* التي تم جمعها في الجزائر مقابل أربعة أنواع مختلفة من الاعتداءات الحيوية. أظهرت الاختبارات التي تم إجراؤها أن المستقلبات ليس لها أي تأثير على النمو الفطري للفطريات المختبرة. من ناحية أخرى، أظهر تحليل النتائج أن جميع الحشائش خضعت لانخفاض في محتوياتها من الكلوروفيل ، مع معدل اختزال يتراوح من 22.08% إلى 83.32% ، لكن اللبلاب أرفينسيس أثبت أنه الأكثر مقاومة بواسطة زيادة محتويات الكلوروفيل من 30 إلى أكثر من 60%. من خلال الاختبارات المختلفة التي تم إجراؤها ، تمكنا أيضاً من تقييم النشاط البيولوجي لهذه المستقلبات على نوعين من النباتات الطفيلية (*Cuscuta campestris*) و (*Orobanche crenata*) تسبب Inuloxins A و C في تثبيط تام (100%) لإنبات البذور لهذين النباتين الطفيليين مع تأثير كبير جداً على تطور الأنبوب الجرثومي لـ *Orobanche crenata* على خنفساء بذور اللوبيا *Callosobruchus maculatus* تم تقييم تأثيرها على معدل وفيات البالغين ، وضع البيض وظهور البالغين. تم تحقيق معدل وفيات كاملة للبالغين (100%) في يوم واحد فقط بعد التعرض للإينولوكسينات B و C وحمض α -costic مع DL50 أقل من 1.8 ميكروغرام / مل. انخفض بشكل ملحوظ وضع البيض وظهور ذرية (F1) إلى 27% و 73% على التوالي بعد العلاج بمركبات *D. viscosa*.

Résumé : La présente étude vise à l'évaluation de l'activité biologique de quatre sesquiterpènes bi- et tricycliques, nommé inuloxines A, B et C et l'acide α -costique, extraits et purifiés à partir de *Dittrichia viscosa* vis à vis de quatre bio agresseurs différents. Les tests réalisés révèlent que les métabolites ne présentent aucun effet sur la croissance mycélienne des champignons testés. En revanche l'analyse des résultats fait ressortir que toutes les adventices ont subi une diminution de leurs teneurs en chlorophylle a, b et totale, avec un taux de réduction allant de 22,08% à 83,32 % à l'exception de *Convolvulus arvensis* qui s'est montrée la plus résistante en augmentant plutôt ses teneurs en chlorophylle, de 30 à plus de 60%. D'autre part, à travers les différents tests réalisés, nous avons pu évaluer l'activité biologique de ces métabolites sur deux types de plantes parasites (*Cuscuta campestris* et *Orobanche crenata*). Les Inuloxines A et C ont causé une inhibition totale (100%) de la germination des graines de ces deux plantes parasites avec une incidence très significative sur le développement du tube germinatif de l'Orobanche. Les métabolites ont été également évalués pour leur effet sur la mortalité des adultes, la ponte et l'émergence des adultes de *Callosobruchus maculatus*. Trois concentrations (1.25, 2.5, 5µl/ml) de chaque composé ont été testées. Une mortalité complète des adultes (100 %) a été obtenue un jour seulement après l'exposition aux inuloxines B et C et à l'acide α -costique avec des DL50 inférieures à 1.8 µl/ml. La ponte et l'émergence de la progéniture F1 ont été significativement réduites (à 27% et 73%, respectivement) après traitement avec les métabolites de *D. viscosa*.

Mots clé : Lutte biologique, Bioagresseur, *Dittrichia viscosa*, Métabolites, Sesquiterpènes. *Callosobruchus maculatus*

Abstract : In this study, the biological activity of four bi- and tricyclic sesquiterpenes namely, inuloxins A, B and C and α -costic acid, extracted from aerial parts of *Dittrichia viscosa* collected in Algeria was assessed against four different bio-aggressors. The tests carried out show that the metabolites have no effect on the mycelial growth of the tested fungi. On the other hand, the analysis of the results shows that all the weeds underwent a reduction in their chlorophyll contents, with a reduction rate ranging from 22.08% to 83.32%, but *Convolvulus arvensis* has proved to be the most resistant by increasing its chlorophyll contents from 30 to more than 60%. Through the different tests performed, we were able also to evaluate the biological activity of these metabolites on two types of parasitic plants (*Cuscuta campestris* and *Orobanche crenata*). Inuloxins A and C caused a total inhibition (100%) of seeds germination of these two parasitic plants with a very significant impact on the development of the germinative tube of *Orobanche crenata*. On cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus*, the compounds were evaluated for their effect on adult mortality, oviposition and adult emergence. Complete adult mortality (100 %) was achieved at only one day after exposure to inuloxins B and C and α -costic acid with DL50 less than 1.8 µl/ml. Oviposition and F1 progeny emergence were significantly reduced (to 27 % and 73 %, respectively) after treatment with *D. viscosa* compounds.

Keys words: Biological control, Bio-aggressor, *Dittrichia viscosa*, Metabolite, sesquiterpenes, *Callosobruchus maculatus*