

République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA)-El Harrach-Alger
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة



En vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3ème cycle dans la filière sciences agronomiques
Département: Zoologie Agricole et Forestière
Option : Santé végétale en milieux agricole et forestier

Thème

Composition chimique et activité insecticide de trois plantes spontanées Sahariennes :
salsola foetida, Cotula cinerea et Zygophyllum album vis-à-vis de Tribolium catsaneum
et Callosobruchus maculatus

Présentée et soutenue publiquement par: M^{elle} Imène RADJAI

Devant le Jury:

Mr. Pr. BENZEHRA Adelmadjid	ENSA, El Harrach, Alger	Président
Mr. Pr . CHAKALI Gahdab	ENSA, El Harrach, Alger	Directeur de thèse
Mme. Pr. MOUHOUCHE Fazia	ENSA, El Harrach, Alger	Examinatrice
Mme. Pr. CHAHBAR Nora	UMBB, Boumerdes	Examinatrice
Mr. MCA. KARAHACENE Tahar	Université de Khemiss Miliana	Examineur

Année Universitaire : 2023

Remerciements

*En premier lieu, je remercie **DIEU** le tout Puissant pour nous avoir accordé le courage, la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.*

*Mes sincères remerciements et ma profonde gratitude sont adressés à **Monsieur CHAKALI Gahdab**. Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, pour son encadrement, ses conseils, ses encouragements, sa compétence, sa gentillesse et sa modestie.*

*Je tiens à exprimer ma grande reconnaissance ainsi que mon respect à **Monsieur BENZEHRA Abdelmajid**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, pour m'avoir honoré en acceptant de présider le jury de cette thèse et pour ses encouragements pertinents.*

*Je voudrai également exprimer mes vifs remerciements aux membres du jury qui ont bien voulu examiner ce modeste travail à savoir : **Madame MOUHOUCHE Fazia**, professeur au Département de Zoologie Agricole et Forestière (ENSA, El-Harrach), **Madame CHAHBAR Nora**, professeur à l'université de Boumerdes UMBB, ainsi que **Monsieur KARAHACENE Tahar**, maître de conférences (A) à l'Université de Khemiss Miliana.*

*J'exprime ma gratitude à **Monsieur PABLO Velasco Pazos**, professeur de Biologie au laboratoire de « génétique, sélection et biochimie des Brassicas » de la Mission Biologique de Galice (MBG-CSIC) à la ville de Pontevedra en Espagne, ainsi qu'à toute son équipe pour leur accueil et leur mise à ma disposition de tous les moyens nécessaires à la réalisation d'une partie de cette thèse.*

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide précieux et l'apport scientifique de ces compétences avérées : les deux doctorantes du laboratoire de Technologie Alimentaire Mlles AIT CHAOUUCHE Feriel Sabrine et BELHACHAT Djamila, ainsi

que Mme BENCHIKHA Naima et ses collègues du laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) de L'Université D'El-Oued. Je tiens à les remercier chaleureusement pour leur disponibilité, leur soutien constant et leurs qualités humaines. Je remercie aussi SALHI Selma docteur à l'université de Laghouat.

*Je saisis cette opportunité pour adresser mes remerciements à **Mme BENHOUHOU**, professeur au département botanique à l'ENSA d'El-Harrach pour le travail accompli dans la détermination et la confirmation des espèces végétales.*

*Mes remerciements vont aussi à **Mme BENZEHRA Faiza**, Bibliothécaire au département de zoologie agricole et forestière à l'École nationale supérieure agronomique d'El Harrach pour ses encouragements et sa sympathie.*

Je saisis cette heureuse occasion pour adresser mes plus sincères remerciements à tous les membres de ma famille, pour les encouragements prodigués et pour leur constant soutien moral. Qu'ALLAH le tout Puissant les bénisse et les récompense.

Enfin, je remercie toutes les personnes, qui de loin ou de près ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Dédicace

A mon très cher papa

A ma très chère mère

A mes très cher frères et sœurs

A ma très chère grand-mère paternelle

Liste des tableaux

Tableau 1. Substances actives insecticides homologuées pour le traitement des grains et graines. (Deapea, 2005).....	38
Tableau 2. Les principaux métabolites secondaires isolées de <i>Zygophyllum album</i>	47
Tableau 3. Des informations sur les 3 plantes utilisées.....	51
Tableau 4. Caractéristiques des sites d'échantillonnages.....	51
Tableau 5. Rendement des extraits éthanoliques des différentes espèces testées.....	74
Tableau 6. Composition Chimique de <i>Cotula cinerea</i> analysée par GC/MS/QTOF.....	75
Tableau 7. Composition chimique de <i>Caroxylon imbricatum</i> (<i>Salsola foetida</i>) analysée par GC/MS/QTOF.....	76
Tableau 8. Composition Chimique de <i>Tetrana alba</i> (<i>Zygophyllum album</i>) analysée par GC/MS/QTOF.....	77
Tableau 9. Composition chimique de <i>Cotula cinerea</i> analysée par HPLC/MS/QTOF.....	79
Tableau 10. Composition chimique de <i>Caroxylon imbricatum</i> (Forssk.) analysée par HPLC/MS/QTOF.....	80
Tableau 11. Composition chimique de <i>Tetrana alba</i> analysée par HPLC/MS/QTOF.....	81
Tableau 12. Composition chimique en composés phénoliques des trois plantes.....	82
Tableau 13. Mortalité moyenne des adultes de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Salsola foetida</i>	85
Tableau 14. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Salsola foetida</i>	86
Tableau 15. Mortalité moyenne des adultes de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Cotula cinerea</i>	86
Tableau 16. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Cotula cinerea</i>	86
Tableau 17. Mortalité moyenne des adultes de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Zygophyllum album</i>	93
Tableau 18. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de <i>C.maculatus</i> traités par <i>Zygophyllum album</i>	94
Tableau 19. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour le traitement des adultes de la bruche.....	95

Tableau 20. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Salsola</i>	96
Tableau 21. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Salsola foetida</i> (effet ingestion).....	96
Tableau 22. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Cotula cinerea</i> (effet contact).....	97
Tableau 23. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Cotula cinerea</i> (effet ingestion).....	97
Tableau 24. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Zygophyllum album</i> (effet contact).....	102
Tableau 25. Mortalité moyenne des adultes de <i>Tribolium castaneum</i> traités par <i>Zygophyllum album</i> (effet ingestion).....	102
Tableau 26. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour l'effet contact sur Effet par ingestion.....	103
Tableau 27. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour l'effet ingestion sur <i>Tribolium castaneum</i>	103
Tableau 28. Activité antibactérienne de l'extrait de CH ₂ Cl ₂ (500 µg/mL).....	108
Tableau 29. Le profil de la sensibilité aux antibiotiques effectué par le système Vitek 2 (bioMérieux) de 4 isolats cliniques de <i>E. faecalis</i> une souche de référence de <i>E. faecalis</i> ATCC29212.....	110
Tableau 30. L'activité antibactérienne exprimée en pourcentage de l'inhibition maximale de la croissance inhibition (GI) (moyenne ± écartype) des composés de 1–5 à un rang de concentration de 300 à 9 µg/mL vis-à-vis des souches testées de <i>E. faecalis</i>	111
Tableau 31. L'inhibition de formation de biofilm en verre (BI) de <i>E. faecalis</i> , présentée par moyenne ± écartype, après un jour de traitement avec les composés 1–5 à une série de dilutions de concentrations de l'inhibition de la croissance sous-planctonique.....	112

Liste des figures

Figure 1. Les œufs de <i>Callosobchus maculatus</i> pondus sur le pois chiche (Grx10).....	26
Figure 2. Adulte de <i>Callosobchus maculatus</i> (Grx10).....	27
Figure 3 . Les dégâts causés par <i>Callosobuchus maculatus</i>	29
Figure 4. Les différents stades de développement de <i>Callosobruchus maculatus</i> (Ait Aider, 2017).....	30
Figure 5. Adulte de <i>Tribolium castaneum</i> (Bouchard,2016).....	33
Figure 6. <i>Salsola foetida</i>	42
Figure 7. La plante <i>Cotula cinerea</i>	45
Figure 8. <i>Zygophyllum album</i>	46
Figure 9 . Dispositif soxhlet à quatres montages.....	52
Figure 10. Les principales étapes de l'extraction par soxhlet.....	53
Figure 11. Schéma descriptif du protocole expérimental de l'extraction à base de l'éthanol.....	54
Figure 12. Schéma descriptif des étapes de la préparation des échantillons pour l'analyse à la GC	56
Figure 13. Schéma simplifié du dispositif GC-QTOF-MS (Gushue, 2013).....	57
Figure 14. Les principales étapes de l'extraction des métabolites à la GC-QTOF.....	57
Figure 15. Procédure descriptive des étapes de la préparation des échantillons pour l'analyse à HPLC-QTOF –MS.....	60
Figure 16. Schéma explicatif du dispositif HPLC-QTOF-MS (Zhou,2011).....	61
Figure 17. Dispositif expérimental de l'effet contact des extraits éthanoliques sur les adultes de la bruche	64
Figure 18. Dispositif expérimental de l'effet contact des extraits éthanoliques sur les adultes de Tribolium	67
Figure 19. Droite de régression pour le traitement des adultes de <i>C.maculatus</i> par <i>S. foetida</i>	87
Figure 20. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait de <i>S.foetida</i> sur les adultes de <i>C.maculatus</i>	87
Figure 21. Droite de régression pour le traitement des adultes de <i>C.maculatus</i> par l'extrait de <i>C.cinerea</i>	88

Figure 22. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de de <i>C. cinerea</i> sur les adultes de <i>C. maculatus</i>	88
Figure 23. Droite de régression pour le traitement des adultes de <i>C. maculatus</i> par l'extrait de <i>Z. album</i>	89
Figure 24. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Z. album</i> sur les adultes de <i>C. maculatus</i>	89
Figure 25. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre <i>Callosobruchus maculatus</i>	90
Figure 26. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Salsola foetida</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet contact)	98
Figure 27. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de <i>Salsola foetida</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet contact)	98
Figure 28. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Cotula cinerea</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet contact).....	99
Figure 29. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de <i>Cotula cinerea</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i>	99
Figure 30. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Zygophyllum album</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet contact).....	100
Figure 31. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de <i>Zygophyllum album</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i>	100
Figure 32. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre <i>Tribolium castaneum</i> par contact	101
Figure 33. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Salsola foetida</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet ingestion).....	104
Figure 34. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de <i>Salsola foetida</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i>	104
Figure 35. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Cotula cinerea</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet ingestion)	105
Figure 36. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de <i>Cotula cinerea</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i>	105
Figure 37. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par <i>Zygophyllum album</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (effet ingestion).....	106

Figure 38. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de <i>Zygophyllum album</i> sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i>	106
Figure 39. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre <i>Tribolium castaneum</i> par ingestion.....	107
Figure 40. Structures des métabolites secondaires isolées.....	109

Liste des abréviations

ACS : Société américaine de chimie.

CDCl₃ : Chloroforme deutéré.

CE : Concentration d'efficacité.

DAD : Détection de réseau d'iode.

Del: Alire Raffeneau Delile.

ESI : Ionisation par électropulvérisation.

ex : Exemple.

Forssk : Peter Forsskål.

g (rcf): Force ou force centrifugale relative.

GC : Chromatographie en phase gazeuse.

H₂O : L'eau.

HCl : L'acide chlorhydrique.

HP5-MS : (5%-phenyl)- phase méthylpolysiloxane.

HPLC: Chromatographie en phase liquide à haute performance.

Hz : Herz.

L: Litre.

L : Carl von Linné.

LC : Chromatographie en phase liquide.

M : Concentration molaire.

m / z : Masse/ taux de charge.

MeOH : Méthanol.

mg: Milligramme.

min : Minute.

ml: Millilitre.

mM : Millimolaire.

MS: Spectrométrie de masse.

NaOH : Sodium hydroxyde.

nm: Nanomètre.

QTOF: Temps de vol quadrupolaire.

RF: Radio-fréquence.

TLC : Chromatographie sur couche mince.

µg : Microgramme.

µL : Microlitre.

µm : Micromètre.

UV: Ultra-violet.

V : Volts.

Sommaire

Introduction générale	17
Partie I : Synthèse bibliographique	22
CHAPITRE I : Synthèse de données sur <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1775)	22
1.1.- Présentation de <i>Callosobruchus maculatus</i> (Fabricius, 1775) (Coleoptera Bruchidae).....	22
1.2.- Position systématique et synonymie de <i>Callosobruchus maculatus</i>	22
1.3.- Origine et répartition géographique	23
1.4.- Aspect morphologique de <i>Callosobruchus maculatus</i>	23
1.5. - Description des différents états évolutifs de cycle	24
1.5.1.- Œuf	24
1.5.2.- Stades larvaires.....	24
1.5.2.1.- Premier stade.....	24
1.5.2.2.- Deuxième stade.....	25
1.5.2.3.- Troisième stade	25
1.5.2.4.- Quatrième stade	25
1.5.3.- Stade nymphal	25
1.5.4.- Adulte.....	25
1.6. - Biologie et écologie	27
1.6.1. – Fécondité.....	28
1.6.2. - Régime alimentaire et dégâts.....	28
CHAPITRE II : Synthèse de données sur <i>Tribolium castaneum</i>	31
2.1.- Origine et distribution géographique de <i>Tribolium castaneum</i>	31
2.2.- Position systématique de <i>Tribolium castaneum</i>	31
2.3.- Aspect morphologique de <i>Tribolium castaneum</i>	32
2.4.- Description des différents états évolutifs de <i>Tribolium castaneum</i>	32
2.4.1.- L'œuf	32
2.4.2.- Les stades larvaires.....	32
2.4.3- La nymphe.....	33
2.4.4.- L'adulte.....	33
2.5.- Cycle évolutif et mode de reproduction de <i>Tribolium castaneum</i>	33

2.6.- Régime alimentaire et importance des dégâts de <i>Tribolium castaneum</i>	34
CHAPITRE III : Les alternatives de protection des denrées stockées.....	35
3.1.- Lutte préventive.....	35
3.2.- Lutte curative.....	35
3.2.1- Lutte physique	35
3.2.1.1- Irradiation gamma	36
3.2.1.2- Les températures extrêmes	36
3.2.1.3- Atmosphères contrôlées.....	36
3.2.2- Lutte chimique	36
3.2.2.1- Les insecticides de contact	37
3.2.2.2- Les fumigants	37
3.2.3- Lutte biologique.....	39
3.2.4- La sélection variétale et génie génétique	39
3.2.5- L'utilisation des plantes ou phytothérapie.....	40
CHAPITRE IV: Présentation des trois plantes expérimentées.....	41
IV.1. <i>Salsola Foetida</i> Del, (<i>Caroxylon imbricatum</i> (Forsk) Akhani & Roalson)	41
IV.1. 1.Origine et distribution.....	41
IV.1. 2.Systématique.....	41
IV.1. 3.Composition chimique.....	41
IV.1. 4.Propriétés et utilisation.....	41
IV.2. <i>Cotula cinerea</i> Del, (<i>Brocchia cinerea</i>) (Delile) Vis. (1836).....	43
IV.2. 1.Origine et distribution.....	43
IV.2. 2.Systématique.....	43
IV.2. 3.Composition chimique.....	43
IV.2. 4.Propriétés et utilisation.....	44
IV.3. <i>Zygophyllum album</i> L.(<i>Tetraena alba</i> Beier & Thulin 2003).....	45
IV.3. 1.Origine et distribution.....	45
IV.3. 2.Systématique.....	46
IV.3. 3.Composition chimique.....	46
IV.3. 4.Propriétés et utilisation.....	47
Partie II : Matériels et méthodes.....	50

II.1. Extraction des plantes et leur composition chimique	50
II.1.1. L'échantillonnage des plantes retenues.....	50
II.1.2. Méthode d'extraction à base de l'éthanol	51
II.1.3. Extraction de quelques métabolites secondaires des trois plantes considérées	54
II.1.3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC QTOF_MS)	54
II.1.3.1.1. Préparation des échantillons.....	54
II.1.3.1.2. Procédure d'extraction par GC QTOF_MS.....	56
II.1.3.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance couplé à la spectrométrie de masse (HPLC QTOF_MS)	57
II.1.3.2.1. Solution d'extraction de l'échantillon	58
II.1.3.2.2. Pratique d'extraction par HPLC QTOF_MS	58
II.1.3.3. Identification de quelques métabolites	62
II.1.4. Extraction de composés phénoliques des plantes.....	62
II.1.4.1. Préparation des solutions d'essai.....	62
II.1.4.2. Les Conditions de chromatographie et de spectrométrie de masse HPLC - QTOF-MS et l'analyse des composés phénoliques.....	62
II.2. Matériel biologique et activité insecticide des extraits de plantes testées ...	63
II.2. 1. Elevage des insectes.....	63
II.2. 1.1. <i>Callosobruchus maculatus</i>	63
II.2. 1. 2. <i>Tribolium castaneum</i>	63
II.2. 2. Evaluation de la toxicité de l'extrait éthanolique vis-à-vis <i>Callosobruchus maculatus</i>	64
II.2. 2. 1. Activité insecticide sur les adultes par contact	64
II.2. 2. 2. Activité insecticide sur la fécondité des adultes	65
II.2. 2. 3. Activité insecticide sur la fertilité des adultes	65
II.2. 2. 4. Activité insecticide sur la l'émergence de la F1	66
II.2. 3. Evaluation de la toxicité de l'extrait éthanolique vis-à-vis <i>Tribolium castaneum</i>	66
II.2. 3. 1. Activité insecticide sur les adultes par contact	66
II.2. 3. 2. Activité insecticide sur les adultes par ingestion	67
II.3. Analyse statistique des données	68
II.2.4. L'activité antibiotique de métabolites secondaires de <i>Cotula cinerea</i>	68

II.2.4.1. Procédures expérimentales.....	68
II.2.4.2 L'isolement des métabolites de plante.....	68
II.2.4.3.Les données Crystallographiques de 1,10-Epoxyhaagenolide (5).....	70
II.2.4.4.Les souches bactérienens et les conditions de culture	70
II.2.4.5.Tests antimicrobiens	71
II.2.4.6. Test d'inhibition de formation de biofilm.....	71
II.2.4.7.Les analyses statistiques des différents tests.....	72
Partie III : Résultats et discussion.....	74
III. 1. Données recueillies sur l'extraction des plantes.....	74
III. 1.1. Rendement des extraits éthanoliques	74
III. 1.2. Analyse des métabolites par la GC/QTOF/ MS.....	75
III. 1.3. Analyse des métabolites par la HPLC/QTOF/ MS.....	79
III. 1.4. Analyse des composés phénoliques.....	82
III.2. Activité insecticide des extraits de plantes testées.....	85
III.2.1. Etude de l'activité insecticide sur les adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i> par contact.....	85
III.2. 2.Etude de l'activité insecticide sur la fécondité des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i>	92
III.2. 3.Etude de l'activité insecticide sur la fertilité des adultes de <i>Callosobruchus maculatus</i>	93
III.2. 4.Etude de l'activité insecticide sur la l'émergence de la F1 de <i>Callosobruchus maculatus</i>	94
III.2. 5.Etude de l'activité insecticide sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> par contact.....	96
III.2. 6.Etude de l'activité insecticide sur les adultes de <i>Tribolium castaneum</i> par ingestion	102
III.3.L'activité antibiotique des sesquiterpènes lactones isolés de <i>Cotula cinerea</i> contre de <i>Enterococcus faecalis</i>.....	108
Conclusions et perspectives.....	115
Références bibliographiques.....	120
Annexe.....	152

Introduction

Introduction

La culture des légumineuses est une composante importante dans la plupart des systèmes agraires. Ces cultures se caractérisent par une adaptation facile aux différents milieux, réalisant ainsi, un rôle fondamental dans l'alimentation humaine (Soltiner, 1990 ; Khaldi *et al.*, 2002). En effet, les légumineuses constituent une source essentielle de protéines pour l'alimentation humaine et animale. Cette famille botanique constitue, en outre, un excellent précédent cultural, grâce à l'aptitude de ses plantes à fixer l'azote atmosphérique en symbiose avec des bactéries rhizobia (Bargaz, 2012).

Les espèces de légumineuses cultivées qui ont fait partie de l'alimentation des Algériens sont : le pois-chiche, la lentille, la fève, féverole et le haricot. Elles contribuent dans le régime alimentaire, particulièrement par l'apport des protéines végétales qu'elles approvisionnent (Abdelguerfi *et al.*, 1998). En outre, les légumineuses devraient tenir une place dans les systèmes de production. Néanmoins, la situation des légumineuses alimentaires en Algérie se définit par une disparition totale du paysage agricole des grandes cultures, tandis que la région soit à vocation céréalière (Boudjenouia *et al.*, 2003).

Les légumineuses alimentaires sont essentiellement cultivées pour leur rôle en alimentation humaine et dans l'amélioration et fertilité des sols dans le système de culture dominant à base de céréales avec une superficie soit de l'ordre de 90000 ha représentant 0,21% de la superficie agricole totale en 2014 (Rahmani, 2015). Avec l'augmentation de la demande intérieure des légumineuses (croissance démographique) et la stagnation des rendements, la production ne satisfait plus la demande locale ; d'où l'Algérie est devenue un distinctif importateur depuis 1979. (M. A. D. R., 2014. In : Rahmani, 2015).

Parmi les déprédateurs des légumineuses, la bruche de niébé, *Callosobruchus maculatus*, est originaire des régions tropicales et subtropicales (Balachowsky, 1962). Elle est considérée comme étant la bruche la plus nuisible aux stocks de niébé et les pertes peuvent atteindre 100% durant quelques mois à cause de son potentiel reproducteur élevé. Les stades larvaires se développent à l'intérieur des graines et consomment les réserves contenues dans les cotylédons. Par ailleurs, au cours de leur développement, les larves éliminent l'azote sous forme d'acide urique toxique qui s'accumule à l'intérieur des graines, ce qui rend le pois chiche impropre à la consommation (Kellouche et Soltani, 2004 ; Seri-Kouassi *et al.*, 2004).

D'autre part, *Tribolium castaneum* Herbst est une espèce cosmopolite qui colonise le milieu infesté et a une aptitude à persister dans de petites quantités d'aliments. Bien que ce dernier soit secondaire, requérant une infestation préalable par des ravageurs primaires, il peut facilement infester le blé ou d'autres graines endommagées durant la récolte (Farrell, 2010). Face aux menaces que constituent ces insectes nuisibles pour les graines stockées des légumineuses, les moyens de lutte ont été essentiellement articulés autour de l'utilisation de pesticides chimiques de synthèse qui restent à court et à moyen terme, le moyen le plus considéré pour assurer une protection efficace des stocks (Regnault-Roger, 2002; Benhalima *et al.*, 2004). Cependant, les effets néfastes des produits chimiques sur l'environnement et sur la santé humaine ne sont plus à démontrer et ont rendu fondamentale la recherche d'autres alternatives plus prometteuses, moins polluantes et compatibles avec le concept de développement durable de l'agrosystème. Dans ce contexte, la valorisation des plantes à effet insecticide est devenue fondamentale partout dans le monde. Ainsi, la recherche des méthodes alternatives par des agents de lutte à faibles conséquences écologiques s'est beaucoup développée (Seck *et al.*, 1991 ; Weaver *et al.*, 1991 ; Dabiré, 1993 ; Foua-Bi, 1993 ; Agboyi, 2006 et 2009). L'utilisation des insecticides botaniques représente de nos jours une alternative aux insecticides chimiques dans la protection des végétaux, mais aussi un moyen de lutte non polluant pour l'environnement (Sanon *et al.*, 2005). L'utilisation de plantes et ou d'extraits de plantes (racines, feuilles, écorces, fruits) dans la protection des récoltes contre les insectes ravageurs au cours du stockage est une pratique ancienne très répandue en Afrique et en Asie (Seck *et al.*, 1996 ; Sou, 1998). De nombreux chercheurs, qui sont à la recherche des insecticides efficaces, peu rémanents, respectueux de la santé humaine et de l'environnement, se sont penchés sur l'utilisation des plantes aromatiques (Camara, 2009). Ainsi, de nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens pour le contrôle des ravageurs du maïs et du niébé, notamment en zone tropicale. Seck (2009) a recensé quelques plantes et dérivées végétales utilisées contre les insectes des denrées stockées en Afrique Subsaharienne. Les molécules allélochimiques appartiennent à plusieurs familles chimiques différentes et leurs cibles biochimiques et moléculaires chez les organismes visés sont variées. De ce fait leur utilisation raisonnée diminue les risques de phénomène de résistance chez les organismes cibles, et par conséquent s'inscrit dans un meilleur respect des écosystèmes (Regnault-Roger, 2005). Plusieurs investigations se sont orientées à présent vers la mise au point d'insecticides à base de plantes. Il s'agit précisément des huiles essentielles extraites des plantes aromatiques et médicinales qui présentent des propriétés insecticides, larvicides et ovicides, stérilisantes, antiappétentes et répulsives (Hamraoui et Regnault-Roger, 1997 ; Stoll, 2000). Des recherches antérieures ont montré que l'utilisation de *Dinarmus basalis* (Rondani, 1877) permet de contrôler efficacement les

populations de *C. maculatus* et limite les pertes de poids de graines de niébé au cours de la période de stockage (Sanon *et al.*, 1998).

Bachrouch *et al.*, (2010) ont évalué l'effet insecticide de *Pistacia lentiscus* sur le troisième stade larvaire et les adultes de *Tribolium castaneum*. L'huile essentielle testée a montré une toxicité vis-à-vis des larves et des adultes. Le taux de mortalité étant de l'ordre de 51% pour les larves et de 100% pour les adultes à une concentration de 102,3 µl/l air après 24h d'exposition. L'effet fumigène est plus important sur les adultes (LC50 = 28.03 µl/l, LC95 = 63.46 µl/l) que sur les larves (LC50 = 112.12 µl/l, LC95 = 253.53 µl/l).

Les terpènes contenus dans les huiles essentielles ou les composés soufrés extraits de la Capparidacée sahélienne *Boscia senegalensis* sont très toxiques à l'égard des Coléoptères *Bruchinae* et sont susceptibles d'être utilisés en fumigation, si le mode d'action de quelques substances est connu (Huignard *et al.*, 2008b).

Camara (2009) a illustré la sensibilité de *Sitophilus oryzae* et de *Tribolium castaneum* aux huiles essentielles extraites des trois plantes, *Ocimum basilicum* L, *Ocimum gratissimum* L, et *Cymbopogon citratus* L. L'effet de ces huiles se manifeste par l'empêchement de l'émergence, la survie et le développement des insectes. Aucun adulte survivant n'a été dénombré dans les milieux utilisés pour toutes les concentrations utilisées sauf dans leur témoin. Ceci indique la toxicité des huiles tant pour les œufs que pour les adultes surtout dans le traitement des milieux infestés.

Un traitement par les huiles essentielles de *Clausena anisata* (Rutaceae) et de *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) contre le poux rouge de la farine *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae) a révélé que les insectes traités par imidaclopride présentaient une fécondité importante, développant ainsi une résistance à l'imidaclopride plus rapide que 2 autres huiles essentielles testées (Goudoum, 2010).

L'extrait aqueux des feuilles de *Juglans regia* pur obtenu par macération dans le méthanol (D1), est le plus toxique par rapport aux autres extraits avec une DL50= 112g/l après 24 heures. Les populations des adultes de *Tribolium castaneum* ne réagissent vraiment aux traitements qu'à partir du troisième jour de l'application. Cette résistance est liée à la rigidité de leur cuticule, qui empêche l'infiltration rapide du produit dans les couches tissulaires internes aux extraits aqueux (Belgeundouz, 2013)

L'anéthol en tant qu'un composant actif d'huile essentielle de *Illicium verum* a une très forte activité insecticide et un rôle de fumigant sur les adultes de *Tribolium castaneum* (Popović,2016).

Dans le cadre des stratégies de gestion intégrée des ravageurs, l'huile essentielle de *Azilia eryngioides* contient des composés insecticides qui sont toxiques pour *Sitophilus granarius* et *Tribolium castaneum* (Ebadollahi et Mahboubi, 2011).

Malgré les résultats très encourageants obtenus, les chercheurs ne considèrent pas que la lutte soit terminée. Aucune méthode de lutte ne viendra à bout, définitivement, des insectes ravageurs. Il faut, en régularité, jouer sur une combinaison de méthodes dans le cadre d'une lutte intégrée pour contenir la pression de ces ravageurs et leur stratégie de développement.

Dans un contexte général, il faut limiter les pertes à des seuils de dégâts économiquement acceptables. Il est nécessaire d'assurer un suivi des technologies mises en place chez les producteurs : assurer la formation des agriculteurs, non seulement sur le plan économique, mais également sur la biologie des insectes afin qu'ils puissent choisir la méthode adéquate de lutte (Glitho, 2011).

L'investigation proposée porte sur le contrôle des principaux insectes ravageurs des denrées stockées (*Tribolium castaneum* et *Callosobruchus maculatus*) par l'utilisation des extraits de plantes spontanées en provenance du désert : *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*. Elle comporte les deux activités qui sont les différentes analyses chimiques des plantes et les tests biologiques.

C'est dans ce contexte que nous avons réalisé ce présent travail, qui s'articule essentiellement sur trois volets. Après une introduction générale, une synthèse des données du Résultat biologique considéré est présentée. Dans le second volet nous présentons les résultats obtenus et les discussions. Les conclusions et les perspectives feront l'objet du dernier volet de la recherche.

Partie I

Synthèse bibliographique

PREMIER CHAPITRE

Synthèse de données sur *Callosobruchus maculatus* (Fabricius,1775)

1.1.- Présentation de *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera : Bruchidae)

Les bruches constituent un groupe diversifié comptant 135000 espèces connues de Coléoptères phytophages (Lawrence,1982).

Les bruches sont les insectes les plus importants ravageurs des légumineuses à grains entreposées dans les régions tropicales (FAO, 2009). Ces insectes infestent les graines au champ et continuent de se multiplier pendant l'entreposage (White, 2001). Selon Lawrence et Newton (1995), la famille des Bruchidae est considérée comme une sous-famille des Chrysomelidae. D'après divers auteurs, les *Bruchidae* renferment deux groupes. Delobel et Tran (1993) notent que les bruches des champs se développent dans les graines encore vertes et les bruches des entrepôts se développent dans les graines sèches. Les premières ont une seule génération annuelle (univoltine), comme la bruche du pois, *Bruchus pisorum* (Linnaeus, 1758), la bruche de la fève, *Bruchus rufimanus* (Bohemann, 1833) et la bruche des lentilles *Bruchus lentis* (Frölich, 1799). Les deuxièmes ont plusieurs générations annuelles (polyvoltines)cas de la bruche du pois chiche *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775), la bruche chinois *Callosobruchus chinensis* (Linnaeus, 1758), la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831), la bruche de l'arachide *Caryedon serratus* (Olivier, 1790). Actuellement, *Bruchidus atrolineatus* (Pic, 1919) (bruche africaine du niébé) est une synonymie de *Dieckmanniellus nitidulus* (Gyllenhal, 1838) qui est inclus dans la Superfamille *Curculionoidea* (Famille *Nanophyidae*). *Callosobruchus maculatus* est l'espèce de bruche la plus destructrice des graines de niébé. Des récoltes entières peuvent ainsi être détruites après 3 à 4 mois de stockage (Alzouma,1981). Cette espèce est la plus répandue dans les régions chaudes, les pertes occasionnées aux denrées entreposées par ces bruches sont très importantes, elles peuvent atteindre 100 % en Afrique tropicale (El-Sawaf, 1956 ; Lienard et Seck, 1994 : FAO, 2009).

1.2.- Position systématique et synonymie de *Callosobruchus maculatus*

En 1775, FABRICIUS a décrit la bruche de niébé pour la première fois sous le nom de *Bruchus maculatus*. En 1792 l'auteur a apporté une modification, sous le nom de *Bruchusquadri maculatus*. *Callosobruchus machulatus*(F) est la dernière dénomination proposée par BRIDWELL en 1929 et qui est utilisée actuellement par (Delobel et Tran, 1993). Selon Southgate (1979) la bruche de niébé appartient au :

Règne : Animalia
Embranchement : Arthropoda
Sous embranchement : Mandibulates (Antennates)
Classe : Insecta
Sous classe : Pterygota
Ordre : Coleoptera
Super famille : Chrysomeloideae
Famille : Bruchidae
Sous famille : Bruchinae
Genre : *Callosobruchus*
Espèce : *Callosobruchus maculatus* (Fabricius,1775)

Plusieurs études moléculaires conduites par (Duckett *et al.*,2003 ; Farell et Sequira, 2004 ; Gomez-Zurita *et al.*, 2007) ont mis en évidence une position phylogénétique relativement dérivée des bruches au sein de représentants de la famille des *Chrysomelidae*.

La bruche communément appelée bruche à 4 taches ou bruche maculée, comprend d'autres synonymies : *Bruchus quadri maculatus* (Fabricius,1792), *Lariaquadri maculatus* (Bedel, 1901), *Pachymerusquadi maculatus* (Schilsky, 1905), *Bruchidius maculatus*, *B.ornatus*, *B.ambigus* et *B.simatus*.

1.3.- Origine et répartition géographique

Decelle (1981) note que cette espèce serait originaire d'Afrique. Grubben (2004) a montré que *Callosobruchus maculatus* a une affinité subtropicale et tropicale. Elle est cosmopolite répandue dans le monde entier et dans les régions chaudes, et elle s'attaque aux genres *Vigna* et *Cicer*. Cette espèce de *Bruchinae* est présente dans toutes les zones tropicales (Huignard *et al.*, 2011).

1.4.- Aspect morphologique de *Callosobruchus maculatus*

L'adulte de *Callosobruchus maculatus* mesure 2,8 à 3,5 mm de longueur. Le corps de forme oblongue, est généralement rougeâtre et recouvert de soie blanche à blanc- jaunâtre. Les antennes sont de couleur brune (Taleb, 2015).

Chez les bruches une partie de l'abdomen dépasse légèrement les élytres, représentant le pygidium qui permet de distinguer le mâle de la femelle. La distinction entre les sexes se fait par l'observation générale, la plus caractéristique est la coloration du pygidium, ce dernier est élargi et de couleur

sombre sur les deux faces pour les femelles, petit et absence de rayures chez les mâles. Les femelles de couleur plus foncée sont de taille plus grande que les mâles qui sont de couleur brun clair (Beck *et al* ; 2007).

Callosobruchus maculatus a une colonne vertébrale triangulaire unique à l'extrémité apicale des deux crêtes du fémur ventral (Brier, 2008).

1.5. - Description des différents états évolutifs du cycle

Le cycle de développement de *Callosobruchus maculatus* passe essentiellement par 4 écophases.

1.5.1.-Œuf

Dans les stocks, après copulation la femelle de *Callosobruchus maculatus* dépose ses œufs ovoïdes directement sur le péricarpe des graines (Delobel et Tran, 1993). Au champ de cultures les œufs sont déposés directement sur les gousses vertes ou mûres de *Vigna unguiculata* (Alzouma, 1981). Dans ce cas la femelle fixe préférentiellement ses œufs le long des sutures des gousses (Biemont *et al.*, 1982). Ils sont fixés par la femelle à la surface des graines et des gousses par une substance gélatineuse qui s'étale autour de l'œuf (Taleb, 2015). Lors de la ponte, une phéromone de marquage est déposée en même temps que l'œuf. Elle permet à la femelle d'éviter les graines fortement infestées et de réduire ainsi la compétition inter-larvaire (Delobel et Tran, 1993).

L'œuf est asymétrique et présente deux extrémités, une arrondie correspondant au pôle postérieur. On note à ce niveau la présence d'une protubérance appelée «respiratorytube » ou « funnel » qui joue un rôle dans les échanges entre le milieu extérieur et l'intérieur de l'œuf. L'autre extrémité subconique correspondant au pôle antérieur. L'œuf est de couleur blanchâtre et adhère à la graine grâce à un liquide émis par la femelle au moment de l'expulsion de l'œuf. L'incubation de l'œuf dure 3 à 5 jours et aboutit à la formation de la larve néonate (Wightman et Southgate, 1982).

1.5.2.- Les stades larvaires

1.5.2.1.- Premier stade

A l'émergence la larve de type chrysomélien apparaît toujours à l'endroit de dépôt de l'œuf. Elle possède trois fines paires de pattes non fonctionnelles et une plaque prothoracique. Elle reste protégée à l'intérieur du chorion pendant 24 à 48 heures, puis perce le tégument de la graine en creusant une galerie dans l'épaisseur du cotylédon. Dès qu'elle pénètre dans la graine, elle effectue sa mue.

1.5.2.2.- Deuxième stade

Elle est de type rynchophorien à corps blanchâtre. La tête sclérifiée porte une paire d'antennes articulées. Elle ne possède ni pattes, ni plaque prothoracique. En grossissant, elle continue de creuser la galerie et l'élargit en une première logette où intervient la mue (Ait Aider, 2017)

1.5.2.3.- Troisième stade

Elle est du même type que le stade précédent. Elle continue à agrandir la galerie en une deuxième logette dans laquelle elle grossit considérablement et mue.

1.5.2.4.- Quatrième stade

Cette larve agée se différencie des larves L2 et L3 par sa taille plus conséquente. Elle continue à grossir en creusant une troisième logette à laquelle elle donne une taille et une forme définitive. Cette logette est arquée et tapissée d'acide urique et séparée de l'extérieur par une fine membrane tégumentaire de la graine. C'est le lieu définitif de la nymphose (Ouédraogo, 1978).

1.5.3.- Le stade nymphal

Callosobruchus maculatus effectue sa nymphose à l'intérieur d'une seule graine après avoir construit une fenêtre de sortie au niveau du tégument (Southgate, 1979). La durée de la nymphose varie entre 7 à 28 jours. (Kossou et Aho, 1993).

1.5.4.- Adulte

Au terme de la nymphose, l'adulte découpe à l'aide de ses mandibules le tégument de la graine recouvrant la loge nymphale et mène une vie libre (Huignard *et al.*, 2011). Deux types d'adultes sont observés : le morphe voilier et le morphe non voilier, différant par des caractéristiques morphologiques, physiologiques et comportementales (Utida, 1972).

Les adultes de morphe non voilier sont de couleur brun rougeâtre possédant deux taches noires sur leur pygidium, ils sont incapables de voler à cause de leurs muscles alaires qui ne sont pas fonctionnels. Les organes reproducteurs de ce morphe non voilier sont fonctionnels dès le début de leur vie imaginale.

Les adultes de morphe voilier sont de couleur brun noir à gris noir et ils n'ont pas de taches sur le pygidium. Leur corps et les antennes sont plus courts chez les adultes non voiliers. Ils sont très actifs. Leur activité reproductrice est beaucoup plus faible que celle des morphes non voiliers (Huignard *et al.*, 2011).

Les figures 1 et 2 illustrent, respectivement la ponte et l'adulte sur une graine de pois chiche



Figure 1. Les œufs de *Callosobchus maculatus* pondus sur le pois chiche (Grx10)



Figure 2. Adulte de *Callosobruchus maculatus*(Grx10)

1.6. - Biologie et écologie

Les adultes de *Callosobruchus maculatus* montrent un polymorphisme imaginal. Il existe deux formes phénotypiques : un morphe sédentaire de courte durée et très fécond alors qu'un morphe dispersant affiche le comportement migratoire et de reproduction retardée (Utida, 1954 et 1972 ; Beck et Blumer, 2014). Ce polymorphisme permet d'utiliser les légumineuses hôtes à la fois au stade du développement des gousses (attaquées par le morphe de dispersion) et à l'étape de graines séchées (attaquées par le morphe sédentaire). Les populations de stockage sont généralement fondées par quelques individus, mais une expansion rapide des graines séchées augmente leur pouvoir de croissance et leur nombre (Messina, 1993). Le développement de la bruche se réalise en fonction de la température, de l'humidité relative du milieu et du substrat de ponte (Huignard *et al.*, 1985). Kellouche (2005) note que la durée du cycle évolutif est en moyenne de 28 ± 3 jours dans les graines de pois chiche. L'incubation des œufs dure environ une semaine, le développement larvaire dure 15 jours et la nymphose dure 6 jours.

1.6.1. Fécondité

Les femelles pondent sur les gousses en voie de maturation, sur les gousses sèches ou sur les graines aussi bien dans les cultures que dans les systèmes de stockage. Les pontes sont dispersées le long du péricarpe. Les œufs adhèrent fortement sur celui-ci grâce à une sécrétion qui recouvre complètement le chorion et s'étale sur la gousse. Les larves se développent dans les graines sèches (Huignard *et al.*, 2011). La fécondité varie entre 70 et 100 œufs par femelle. La ponte est déclenchée chez la femelle gravide par un stimulus de nature chimique présent dans le tégument de la graine (Delobel et Tran, 1993).

1.6.2. Régime alimentaire et dégâts

La principale plante hôte de la bruche est le niébé (*Vigna unguiculata*). De même, l'espèce se développe dans une diversité de graines d'autres légumineuses comme *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*, *Lablab purpureus*, *Pisum sativum*, *Macrostyloma geocarpum* et *Glycine max* (Huignard *et al.*, 2011). *Callosobruchus maculatus* constitue une menace permanente aux légumineuses, due à sa grande polyphagie et sa faculté d'adaptation à des régions climatiques les plus diverses (Utida, 1981).

La bruche est l'une des espèces qui exerce une pression continue sur les légumineuses à cause des stades juvéniles qui occasionnent les dégâts aux stocks en consommant, avant le stade nymphal, une partie importante des réserves nutritives contenues dans les cotylédons de la graine de niébé. L'activité de consommation des réserves des graines par les larves provoque de la chaleur et de l'humidité qui entraînent la croissance des champignons conduisant à des pertes conséquentes (Djosson, 2006). En zone rurale où les techniques de conservation des denrées agricoles sont peu élaborées, ce ravageur entraîne des pertes post-récoltes pouvant atteindre 100% en quelques mois (Lienard et Seck, 1994). Selon Murdock *et al.* (1997), lorsque les dégâts excèdent un trou d'émergence par graine, la valeur marchande du niébé s'en trouve substantiellement réduite. Tchamou (1995) a montré qu'il existe une relation entre le nombre de trous d'émergence des bruches sur les graines et les pertes de poids (Fig. 3). Pendant l'entreposage des récoltes du niébé, le taux d'infestation initial par les bruches est généralement inférieur à 5% (Ouedraogo, 1991). Ce taux passe à 30% après 1 mois de conservation, puis de 80 à 100% en l'espace de 5 à 6 mois de stockage si aucune mesure de contrôle n'est entreprise (Nuto et Glitho, 1990).



Figure 3. Les dégâts causés par *Callosobruchus maculatus*

La figure 4 illustre les différents stades de développement de la bruche, *Callosobruchus maculatus*

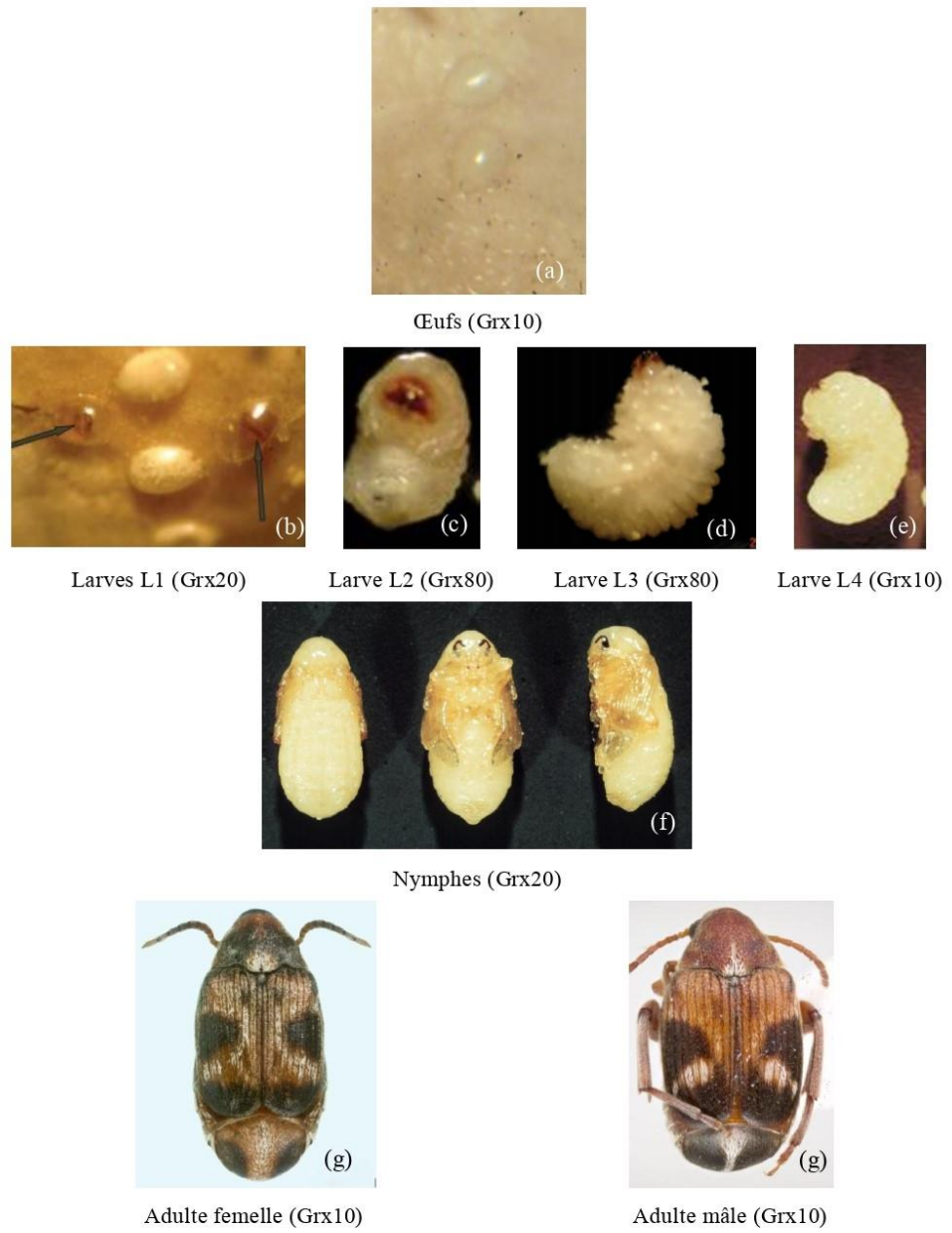


Figure 4. Les différents stades de développement de *Callosobruchus maculatus* (Ait Aider, 2017)

DEUXIEME CHAPITRE

Synthèse de données sur *Tribolium castaneum*

Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), est un ravageur très important des denrées stockées. Cette espèce a été repérée sur une large gamme de produits de base, y compris les céréales, la farine, les pois, la fève, le cacao, les noix, les fruits secs et les épices, mais la farine semble être sa nourriture préférée (Campbell, et Runnion, 2003).

2.1. Origine et distribution géographique de *Tribolium castaneum*

Le Tribolium rouge de la farine, est un déprédateur commun de céréales entreposées, holométabole, polyphage, cosmopolite et qui vit le plus souvent dans les régions à climat chaud (Belguendouz *et al.*,2013). Il est fréquent généralement dans les boulangeries et les minoteries. Ce déprédateur est très nuisible aux produits céréaliers, y compris les grains, la farine, les flocons d'avoine et le son. Le tribolium est un insecte qui préfère les régions tempérées et remonte dans le nord de l'Europe et de l'Amérique (Lepesme, 1944).

L'origine de cette espèce vient de l'Afrique. C'est un ravageur doté d'une grande faculté d'adaptation. Il est plus fréquent sous les climats chauds notamment les tropiques (Delobel et Tran, 1993).

2.2.- Position systématique de *Tribolium castaneum*

Selon Lepesme (1944) l'espèce *Tribolium castaneum*, fait partie du :

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Sous embranchement : Mandibulates (Antennates)

Classe : Insecta

Sous classe : Pterygota

Ordre : Coleoptera

Super ordre: Polyphaga

Super famille :Cucujoidea

Famille : Tenebrionidae

Sous famille : Ulominae

Genre : *Tribolium*

Espèce : *Tribolium castaneum* (Herbst)

2.3.-Aspect morphologique de *Tribolium castaneum*

C'est un insecte appartenant à la famille des Tenebrionidae. L'adulte mesure de 3 à 4mm, de couleur uniformément brun-rougeâtre. Il est étroit, allongé, à bord parallèles, à pronotum presque aussi large que les élytres et non rebordé antérieurement. Les 3 derniers articles des antennes sont nettement plus gros que les suivants (Balachowsky, 1962). Contrairement à l'espèce voisine, *T. confusum*, le chaperon ne dépasse pas l'œil latéralement. La larve mesure 6mm, environ 8 fois plus longue que large, d'un jaune très pâle à maturité, avec latéralement quelques courtes soies jaunes. La capsule céphalique et la face dorsale sont légèrement rougeâtres. La longévité de l'insecte est variable de 2 à 8 mois suivant les conditions abiotiques du milieu (Lepesme ,1944)

2.4. Description des différents états évolutifs de *Tribolium castaneum*

Tous les stades de ce ravageur (larves, nymphe et adulte) sont visibles dans la farine infestée, sauf les œufs car les particules de la farine adhérente aux œufs rendent leur identification plus difficile (Leelaja *et al.*, 2007).

2.4.1. L'œuf

Les œufs sont blanchâtres ou transparents et peuvent prendre la couleur des particules alimentaires adhérent à leur surface (Mason, 2003). Ils mesurent environ 0,7 mm de longueur et de l'ordre de 0,4 mm de largeur, et sont déposés en vrac sur les graines, difficiles à déceler. Ils sont fluorescents sous des longueurs d'onde de 365 nm (radiations ultra violettes) (Leelaja *et al.*, 2007).

2.4.2.Le stade larvaire

A son développement complet, la larve peut atteindre 6mm de long, portant trois paires de pattes. Elle est de forme vermiforme, cylindrique d'une couleur jaune très pâle, à maturité portant une tête brunâtre ornée latéralement de courtes soies jaunâtres (Lyon, 2000).

Cette larve se distingue par une rangée dorsale de courtes soies à la base du dernier segment abdominal et une paire d'urogomphes recourbée vers le haut, dans un plan perpendiculaire à celui du corps (Weidner et Rack, 1984)

2.4.3 La nymphe

A la fin du dernier stade larvaire, la larve s'immobilise, cesse de se nourrir et se transforme en nymphe. Elle mesure 5mm de long, de couleur blanchâtre à brunâtre à la fin de son stade nymphal (Lyon, 2000).

Il est plus facile de distinguer entre les sexes chez les nymphes que chez les adultes. Les mâles et les femelles se distinguent par la partie terminale de l'abdomen. Dans les deux sexes, l'abdomen se termine par une paire d'appendices pointus (urogomphes). Les nymphes femelles se reconnaissent par les papilles génitales, situées juste en avant des urogomphes, qui sont développées chez les femelles que chez les mâles (Sokoloff, 1974).

2.4.4. L'adulte

Tribolium castaneum est un coléoptère de couleur brun rougeâtre qui mesure de 3 à 4 mm de long, son corps est lisse et allongé (Weidner et Rack, 1984). Les antennes sont formées de onze articles dont les trois derniers se terminent par une massue (Fig. 5). Les yeux ne sont pas surmontés d'un bourrelet semblable à une paupière. Les élytres présentent des lignes longitudinales pointillées. Cette espèce se distingue des autres espèces de *Tribolium* par la forme de ses yeux qui sont relativement rapprochés (Bousquet, 1990).



Figure 5 . Adulte de *Tribolium castaneum* (Bouchard,2016).

2.5. Cycle évolutif et mode de reproduction de *Tribolium castaneum*

Les femelles pondent 300 à 400 œufs dans les aliments qu'elles infestent, au rythme de 2 à 3 œufs par jour. Ces œufs sont collants et s'agglutinent autour des particules alimentaires, ce qui les rend difficiles à distinguer. En post-oviposition (3 à 12 jours), les œufs vont éclore en petites larves actives qui restent cachées à l'intérieur de l'aliment, à l'abri de la lumière (Abdelsamad *et al.*, 1988 ; Mason, 2003).

Selon les conditions environnementales et la disponibilité de sources d'alimentation, les larves subissent 5 à 11 mues. Elles se métamorphosent après en nymphes nues. La durée de ce stade larvaire peut dépasser trois mois, de l'ordre de 100 jours selon la température, l'humidité et l'alimentation disponible. Les premiers accouplements auront lieu après deux jours de l'émergence des imagos et dure 3 à 15 minutes (Scotti, 1978), les mâles peuvent vivre jusqu'à trois ans et les femelles jusqu'à 2 ans (Lepesme, 1944).

La durée du cycle complet varie généralement entre 7 semaines et 3 mois. La température favorable pour le développement est de 20 à 37°C avec une humidité relative de 60 à 80%. Dans ces conditions, la durée d'une seule génération peut être de 27 à 35 jours (Shazali et Smith, 1986).

2.6. Régime alimentaire et importance des dégâts de *Tribolium castaneum*

C'est un insecte cosmopolite, qui affectionne les farines dans lesquelles il creuse des galeries. Il leur communique une teinte brunâtre et une odeur âcre et rend la panification difficile. Sur les graines d'arachide, *Tribolium castaneum* provoque un accroissement notable de la teneur en acides gras libres dans l'huile qui en est extraite et s'attaque aux : riz, blé, son et farine de riz et de blé, maïs, orge, sorgho, millet, manioc, tapioca et farine de manioc, sagou, igname, fruits séchés, toutes les légumineuses sous forme de farine : arachide, coprah, graines de coton, ricin, cabosses de cacao, chocolat, noix de muscade, poivre, gingembre et les insectes en collection (Lepesme, 1944).

La qualité alimentaire du lot infesté va également diminuer par la présence des exuvies et le changement de l'odeur de la denrée. En effet l'adulte du *Tribolium* possède des glandes produisant un liquide nauséabond riche en quinones, qui communique au lot une odeur désagréable et la farine en particulier perd rapidement sa valeur technologique et commerciale (Fourar, 1987).

Les insectes des denrées stockées dont *Tribolium castaneum* représentent une partie très importante des dommages des denrées stockées. Ils peuvent causer des pertes importantes en réduisant la qualité et la quantité des produits stockés.

Les infestations de *Tribolium castaneum* causent pour le blé stocké non protégé, une réduction variable de la germination de 9 à 39% ainsi qu'une augmentation de grains endommagés (Belguendouz *et al.*, 2013).

TROISIEME CHAPITRE

Les alternatives de protection de denrées stockées

Pour faire face à la croissance démographique, il serait impérieux de gérer à la fois les facteurs édaphiques, climatiques et biotiques qui influencent la pression parasitaire sur les cultures et leurs récoltes, ainsi que sur la pullulation d'insectes en champ comme au stock (Ngamo *et al.*, 2007).

Pour entreprendre une alternative de lutte contre les insectes ravageurs des graines stockées, deux méthodes sont recommandées, l'une est de nature préventive et se pratique avant l'installation des ravageurs et la seconde, de type curative, est utilisée quand les entrepôts sont déjà infestés.

3.1. Lutte préventive

Dans l'approche préventive nous pouvons inclure certaines techniques comme l'insolation qui est une pratique effectuée le plus souvent avant l'emmagasinage des récoltes. Elle permet de compléter le séchage et de faire fuir les insectes grâce à la chaleur et à l'incidence directe des rayons solaires. Des essais sur niébé ont donné une mortalité totale des bruches au bout de 6 heures d'exposition à 50°C (Lale *et al.*, 2003).

Les producteurs qui conservent une partie de leur récolte de légumes secs pour servir de semences préfèrent souvent utiliser les méthodes de prévention non chimiques plutôt que les pesticides pour préserver la capacité et la qualité germinative des semences : cendres, argile finement broyée, feuilles de neem, poudre fine d'eucalyptus, écorce d'agrumes et même parfois du sable peuvent être mélangés en forte proportion aux stocks de graines (Lienard et Seck, 1994 ; Murdock *et al.*, 2003).

3.2. Lutte curative

L'application des traitements préventifs reste insuffisante, pour cela il est nécessaire d'associer des traitements curatifs.

3.2.1. Lutte physique

Plusieurs procédés de lutte physique ont été adoptés pour protéger les légumineuses contre *Callosobruchus maculatus*. Il s'agit des radiations rayonnantes, les températures extrêmes et la teneur en oxygène et en dioxyde de carbone.

3.2.1.1. Irradiation gamma

Son principe repose sur l'exposition des populations d'insectes, soit à des doses élevées d'irradiation pour tuer tous les stades de développement de l'insecte, soit à des doses plus faibles pour les stériliser (Hekal et El-Kady, 1987). Or les études réalisées par l'US Food and Drug Administration ont montré qu'aux doses prescrites, l'irradiation n'altère aucune des propriétés de la denrée (Lienard et Seck, 1994).

3.2.1.2. Les températures extrêmes

Les procédés thermiques comme l'élévation de la température servent à sécher rapidement la récolte, de ralentir le développement des insectes et de prévenir une nouvelle infestation (Zeher, 1980).

3.2.1.3. Atmosphères contrôlées

L'utilisation de l'azote ou de dioxyde de carbone peut être valorisée pour le contrôle des insectes des denrées stockées. L'enrichissement de l'atmosphère par l'un de ces gaz fait limiter la teneur en oxygène et provoque ainsi l'asphyxie des insectes (Storey, 1975). Hassan *et al.* (2004) ont montré que l'enrichissement de l'atmosphère de 30 bars de CO₂ pendant 20 minutes tue tous les œufs de *C.maculatus* pondus sur le niébé.

En effet, les atmosphères modifiées peuvent fournir, une alternative efficace sans résidus de fumigants et d'autres produits chimiques pour le contrôle post-récolte des ravageurs (Navarro *et al.*, 2012).

3.2.2. Lutte chimique

Dans le souci de remédier les pertes dues aux Coléoptères bruchinae et particulièrement *Callosobruchus maculatus* qui est l'espèce qui se maintient dans les stocks durant toute l'année, les producteurs de niébé ont le plus souvent recours à la lutte chimique, dite classique qui, malgré son efficacité, a montré ses limites et ses conséquences néfastes (Toufique *et al.*, 2014).

La lutte chimique consiste à l'utilisation des pesticides chimiques de synthèse pour la protection des denrées stockées. Ces produits qui sont toxiques pour la santé des êtres vivants et pour

l'environnement s'avèrent très efficaces car ils produisent des résultats intéressants et discutables (Seck, 1994).

Deux approches de la lutte chimique contre les insectes en post- récolte sont régulièrement pratiquées dans le monde :

- L'utilisation des insecticides liquides ou en poudre ayant un effet létal par simple contact des ravageurs ciblés avec le dépôt de la substance active sur les graines.
- Le gazage dans une enceinte étanche avec un fumigant, c'est-à-dire un gaz à propriétés insecticides reconnues comme le phosphore d'hydrogène (PH₃) (Fleurad, 2011).

3.2.2.1. Les insecticides de contact

Ces insecticides persistants préservent les graines pendant plusieurs mois en tuant les adultes qui émergent des graines déjà infestées et ceux qui arrivent de l'extérieur. L'efficacité de traitement par les insecticides peut être améliorée par un enfermement dans une structure étanche aux insectes (jarre, grenier, technique du triple sac plastique.) (Delobel et Matokot, 1991 ; Murdock *et al.*, 1997).

3.2.2.2. Les fumigants

Ce sont des insecticides à haute tension de vapeur qui agissent sous forme gazeuse. Par rapport aux insecticides de contact, ils possèdent l'avantage de ne laisser aucun résidu sur les denrées (Hindmarsh *et al.*, 1978). La fumigation est un traitement purement curatif. Une fois réalisée, le stock n'est plus protégé contre de nouvelles infestations. Dans les pays chauds, la phosphorine (PH₃) est le fumigant le plus couramment utilisé (Howe, 1978 ; Hindmarsh *et al.*, 1978) et s'avère très efficace contre les œufs et les larves de *C. maculatus* (Singh *et al.*, 1990).

Les produits homologués représentés dans le tableau 1, pour les traitements des graines après la récolte contenant une substance active autorisée sont des organo-phosphorés, pyréthriinoïdes, fumigants, biopesticides et matières minérales (Deapea, 2005).

Tableau 1. Substances actives insecticides homologuées pour le traitement des grains (Deapea, 2005)

Famille chimique	Substance active (s.a.)	Principales spécialités commerciales (Spec)	Limite maximale de résidus de s.a.(mg/kg)	Dose d'applicat ion Spec en poudre	Dose d'application Spec après dilution dans l'eau (ml/ quintal)	
Organo-phosphoré	Pirimiphos-méthyl	Actellic ⁽²⁾	Non fixée ⁽¹⁾			
		Pirigrain ⁽²⁾				
	Chlorpyriphos-méthyl	Nuvan durée ⁽²⁾	Non fixée ⁽¹⁾			
	Chlorpyriphos-éthyl	Dubsan ^{(2)*}	0,1 (soja seulement)			
	Fénitrothion	NuvanoI ^{(2)*}	0,1 (soja seulement)			
		Sumithion ^{(2)*}				
Malathion*	Zithiol*	Cythion	2* (haricot sec seulement)	4 à 5 g/ quintal	50 à 80	
						Malatox
Pyréthroïdes	Deltaméthrine	K-Obiol	1 (toutes légumineuses)	2 à 3 g/quintal	25 à 40	
	Cyperméthrine	Talisma ⁽²⁾	0,05 (arachide et soja)			
	Perméthrine ⁽¹⁾	Ambush	0,1 (haricot et arachide) 0,05 (soja)			
Fumigants (gaz)	Phosphure d'aluminium ou de magnésium	Fumitoxin Phostoxin Quick-fume Fumi-cell	0,01 (arachide et toutes légumineuses)	3g/m ³ de graines, soit 4g/tonne		

	Fluorure de sulfuryle	Vikane Profume			
Biopesticides	Spinosad		0,01 (soja seulement)		50 à 80
Matières minérales	Terre de diatomées	Dryacide (liquide)	Non fixée ⁽¹⁾	30-50 g/quintal	50 à 80
		Diatomite (poudre)			
*pour indication (sans garantie du fabricant)					
⁽¹⁾ pas d'autorisation d'emploi sur légume sec					
⁽²⁾ spécialités commerciales homologuées sur céréales en grain					

Le principal inconvénient de l'usage régulier des pesticides pour la lutte contre les ravageurs des denrées stockées est le développement de phénomène de résistance. Les cas de résistance les plus inquiétants sont ceux de *Tribolium castaneum*(Herbt) dans les stocks de graines de céréales qui a acquis une résistance généralisée au lindane et au malathion. Un autre exemple est celui de *C. maculatus* qui a également développé une résistance à la phosphine (Ahmed *et al.*,2002) et à un insecticide organo-phosphoré au Nigeria (Odeyemi *et al.*,2006).

3.2.3. Lutte biologique

La lutte biologique peut se faire à deux niveaux :

- Soit en lâchant les parasitoïdes adultes à l'intérieur du système de stockage pour augmenter l'activité parasitaire. Cette méthode nécessite la mise en place d'élevage de parasitoïdes et il faut avoir une bonne connaissance de la bio-écologie des parasitoïdes et du taux de contamination des graines au moment du lâcher.
- Soit en favorisant la reproduction et le développement des Hyménoptères parasitoïdes dans le système de stockage par l'apport des nutriments qui accroissent la longévité des adultes et augmentent la fécondité des femelles (Huignard *et al.*, 2011).

3.2.4. La sélection variétale et génie génétique

Le choix des variétés résistantes de *V. unguicualtae* est une méthode de contrôle intéressante pour les petits agriculteurs dans la lutte contre *C. maculatus*. En effet, elle se substitue à la lutte chimique et élimine ainsi de nombreux inconvénients tels que les risques pour la santé et l'environnement, le coût élevé et les problèmes d'acceptation des différents produits par les paysans comme elle élimine les difficultés liées à l'utilisation de ces différentes substances (Fleurad *et al.*, 1998).

L'utilisation des variétés résistantes est liée essentiellement à leur composition en inhibiteurs d'enzymes tels que les inhibiteurs de protéases, d'alpha amylases et les arcelines (Baldin et Lara, 2008).

Le développement de la biotechnologie a permis d'extraire des gènes codant pour des protéines anti-métaboliques dans une espèce et de les introduire par transgénèse dans une autre espèce, afin de lui conférer une résistance vis-à-vis des larves des bruches. De plus, la sélection assistée par marqueurs (SAM) est un outil puissant pour aider le sélectionneur à connaître les caractéristiques génétiques qui permettent l'identification des gènes ou des groupements de gènes impliqués dans les phénomènes de résistance (Huignard et Renault-Roger, 2011).

3.2.5. L'utilisation des plantes ou phytothérapie

Les recherches à l'heure actuelle s'orientent vers les plantes aromatiques contenant des huiles essentielles qui agissent comme des phytopesticides. L'efficacité des huiles essentielles est démontrée par les travaux de nombreux chercheurs (Regnault-Roger *et al.*, 1993 ; Ketoh, 1998 ; Tapondjou *et al.*, 2003 ; Kellouche, 2005 ; Ngamo *et al.*, 2007). Il s'agit d'aider les populations locales à utiliser les ressources offertes par leur propre biodiversité pour résoudre leurs problèmes de stockage des denrées. D'après Isman (2000) et Kéita (1999), plus de 1000 plantes recensées ont des propriétés variant de la répulsion, à l'anti-appétence ou à la létalité contre les ennemis des cultures et des stocks. Les extraits de neem ont fait l'objet de nombreuses expérimentations en Afrique de l'ouest, que ce soit pour des extraits artisanaux ou pour une formulation appelée Reppellin. Ils ont été expérimentés sur le bruche *C. maculatus*, la pyrale du niébé *Maruca vitrata* Fab, ainsi que sur des termites (Copping, 2009).

La toxicité de l'huile essentielle de la partie aérienne d'*Agastache foeniculum* contre *Tribolium castaneum* et *Rhyzopertha dominica* a mis en évidence une forte activité insecticide de l'huile essentielle sur les insectes (Asgar, 2016).

QUATRIEME CHAPITRE

Présentation des trois plantes expérimentées

4.1. *Salsola Foetida* Del.

4.1. 1. Origine et distribution

Cette espèce est connue dans les régions arides et semi-arides de l'Asie centrale, le moyen orient, l'Afrique et l'Europe (Pyankov *et al.*, 2000 et 2001 ; Toderich *et al.*, 2012 ; Mosyakin *et al.*, 1996).

Cette plante pousse sur des sols généralement secs et légèrement salins, avec certaines espèces des marais salants. *Salsola* se révèle à être une espèce allélopathiquement active, (Sokolowska *et al.*, 2009).

4.1. 2. Systématique

Gbif (2014) note que l'espèce *Salsola foetida* appartient :

Régne : Plantae

Embranchement : Tracheobionta

Classe : Dicoltylédons

Ordre : Caryophyllales

Famille : Chenopodiaceae

Synonymies : *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) / *Salsola foetida* var. *Salsola imbricata* Forssk. *Salsola vermiculata* var. *Caroxylon imbricatum* (Forssk.)

La figure 6 illustre une vue de l'espèce *Salsola foetida* dans son aire naturelle.

4.1. 3. Composition chimique

Les espèces appartenant au genre *Salsola* sont riches en phyto-constituants, principalement flavonoïdes, composés phénoliques, les composés azotés, saponines, triterpènes, stérols, les composés volatiles, lignanes, coumarins et cardiaques glycosides. De plus, elles possèdent plusieurs propriétés biologiques à savoir : analgésique, anti-inflammatoire, antivirale, antibactérienne, anticancerigène, cardioprotective et hépatoprotective (Boulos *et al.*, 1991).

4.1. 4. Propriétés et utilisation

L'activité antibactérienne a démontré que les deux parties de la plante ont un pouvoir antibactérien remarquable. Les extraits aqueux exercent un effet antimicrobien et antifongique faible contre les sources bactériennes et fongiques. La plante a aussi une activité antioxydante pour trois essais à savoir : TPC, TFC, DPPH et ABTS (Ajaib *et al.*, 2020). Les plantes de genre *Salsola* sont connues

par leur usage en médecine traditionnelle comme les maladies de la peau et l'infestation par le ver solitaire (Chauhan *et al.*,2018 ; Abegaz *et al.*,1991 ; Rasheed *et al.*,2013). Les métabolites secondaires de *Salsola* sont : flavonoïdes, composés phénoliques, acides phénoliques, composés azotés, saponines, triterpènes, stérols, acides gras, lignans, coumarines de magastigmane, glycosides cardiaques, alcools cyanogènes, isoprénoïdes et le soufre (Zhao *et al.*,2004 ; Tundis *et al.*,2009). L'activité antibactérienne de l'extrait d'éthyl acétate de *Salsola imbricata* et phénylpropanoïdes A et B a été évaluée par la méthode de la concentration minimale inhibitrice. MIC (Xiang *et al.*, 2007 ; Syrchina *et al.*, 1992).

Biphénylesalsonoïde A a une forte activité antioxydante due à la présence de deux groupes phénoliques : quercitrine et acide rosmarinique, isolés à partir de *S. imbricata* (Xiang *et al.*,2007 ; Osman *et al.*, 2016). D'après (Wang *et al.*, 2020: Mahasneh *et al.*, 1999), les composés phénoliques isolés de *S. foetida* exercent une activité d'inhibition de la tyrosine avec un potentiel de traitement des maladies comme : l'hyper-pigmentation associée à la surproduction de mélanocytes. Ces molécules bioactives pourraient être utilisées comme matériau de départ dans la découverte de médicaments pour le traitement de maladies.



Figure 6. *Salsola foetida*.

4.2. *Cotula cinerea* Del.

C'est une plante herbacée annuelle. D'aspect laineux, couverte de petites poils denses, elle porte des feuilles de couleur vert-blanchâtre épaisses et très découpées. Les capitules de couleur jaune pâle ou jaune d'or sont de petite taille. Elle est connue sous le nom de Tkkélt en tergui et en Chihia en arabe.

4.2. 1. Origine et distribution

L'espèce est à feuilles laineuses blanchâtres, épaisses, divisées dans leurs parties supérieures en trois à cinq dents obtuses. Tiges de 10 à 40 cm, couchées puis redressées, capitules de 6 à 10 mm de diamètre, à involucre laineux à fleurs, toutes tubuleuses, brunes en boutons puis jaunes d'or lorsqu'elles s'ouvrent. Très connue dans tout le Sahara, notamment dans les sols un peu sablonneux (Bouziane, 2002).

C. cinerea est une espèce saharo-arabique qui préfère les sols sablonneux et les lits d'oued. Après la pluie, elle apparaît en nombre conséquent sur de vastes surfaces mais se dessèche rapidement.

4.2. 2. Systématique

Régne: Plantae Reference

Sub-régne : Tracheobionta (Quezel et Santa,1963) ; (Dupont et Guignard,2004)

Super-groupe : Spermatophyta

Groupe : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sub-classes : Asteridae

Ordre : Asterales

Famille : Asteraceae

Genre : *Cotula*

Espèce : *Cotula cinerea* Del

Synonymie : *Brocchia cinerea* Del Vernacular names Gartoufa, Gartoufa beida, Chouihya, Chihia, Shihit El Ebel, Chiria, Robita (Quezel et Santa,1963) ; (Dupont et Guignard,2004) ; (Malza et al,1993) et (Halis,2007).

4.2. 3. Composition chimique

Les tests phytochimiques ont été réalisés sur la partie aérienne broyée en poudre de la plante *Cotula Cinerea*, en utilisant des réactifs spécifiques de révélation. Le screening a permis de mettre en

évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux : alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, terpenoïdes et quinones (Azroug et Houna,2019).

4.2. 4.Propriétés et utilisation

Dans le médical la plante est utilisée pour les troubles bronchopulmonaires (toux), les problèmes digestifs, l'insolation et les rhumatismes. Elle est utilisée comme fébrifuge, pour combattre les coliques et les diarrhées. De plus, cette plante est utilisée pour aromatiser le lait (Azroug et Houna, 2019).

Deux extraits aqueux et méthanolique de *Cotula cinerea* ont été utilisés contre ces trois souches bactériennes :*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*,

Dans la zone saharienne, *Cotula cinerea* est utilisée comme un pâturage pour les chèvres (Fig.7). Ses propriétés aromatiques lui valent d'être plus appréciée dans la préparation du thé. On l'utilise aussi en infusion pour faciliter la digestion.

Aujourd'hui, elle fait l'objet d'un commerce local parce qu'elle a la réputation de bien conserver ses propriétés en séchant.

L'activité antimicrobienne des parties aériennes de *Cotula cinerea* a été évaluée à partir des différents solvants : l'éther de pétrol et n-butanol. L'extrait de n-butanol (16.67 依 5.77 mm) et de l'éther de pétrol (17 依 1.73mm) ont provoqué une forte inhibition de *Klebsiella pneumoniae* (Bensizrara *et al.*,2012).

La plante possède donc une activité pharmacologique de nature antiinflammatoire antiseptique et antibactérienne.



Figure 7 . *Cotula cinerea* en fleurs

4.3. *Zygophyllum album* L.

Zygophyllum album possède un pédoncule fructifère bien plus court que le fruit, la partie libre des carpelles est sensiblement aussi longue que la partie soudée. Commun dans le sud-tunisien, plus rare dans le sud algérien : El Goléa, Illizi (Ozenda, 1977). L'espèce *Zygophyllum album* (Nom vernaculaire : Aggaia) se présente, souvent, sous forme de buissons bas, ramifiés dont les feuilles opposées et composées en général de 2 folioles cylindriques, charnues et gorgées d'eau. Elle se rencontre, en pieds isolés dans les zones sableuses un peu salées, et en colonies sur de grandes surfaces, sur les sols salés et les sabkha. Elles sont commune dans tout le Sahara Septentrional (Chehema, 2006).

4.3. 1. Origine et distribution

Le genre *Zygophyllum* est très bien représenté dans les régions arides de l'Afrique du Sud et de l'Asie Centrale. L'espèce *Z. album* existe aussi dans la partie méridionale et orientale du bassin méditerranéen « Algérie, Libye, Egypte, Palestine » (El meskaoui *et al.*, 2008).

4.3. 2.Systématique

La classification selon Quezel et Santa (1963) se résume comme suit :

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Zygophyllales

Famille : Zygophyllaceae

Genre : *Zygophyllum*

Espèce : *Zygophyllum album* L. f.

Synonymie : *Tetraena alba* Beier & Thulin 2003

La figure 8 illustre une vue de l'espèce *Z. album* dans son biotope.



Figure 8 . *Zygophyllum album* dans son aire naturelle au sud

4.3. 3.Composition chimique

La famille des *Zygophyllaceae* comprend des plantes qui bio-synthétisent des métabolites secondaires (Tableau 2) parmi lesquels figurent des alcaloïdes, des terpènes, des flavonoïdes, mais aussi des saponines (Neffat et Sghaier, 2014). Malgré le fait que le *Z. album* a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques, cette espèce reste une espèce très peu étudiée si l'on considère le nombre de publications consacrées à d'autres espèces dans la même région (Ouis et Bakhtaoui, 2017).

Tableau 2. Les principaux métabolites secondaires isolés de *Zygodhryllum album*

Les métabolites secondaires	Littérature
Quercetin 3-O-rutinoside, Isorhamnetin 3-O-rutinoside, Isorhamnetin 3-O-glucoside	(Saleh et El-Hadidi, 1977).
Isorhamnetin-3-O-galactoside, Isorhamnetin-3-O-glucoside, Isorhamnetin-3-Orobinoside	(Hussein <i>et al.</i> , 2011).
Kaempferol, Isorhamnetin, Quercetin-3-o-glucoside, Harmine, Stigmasterol, β -sitostérol, Acidedecanoïque, acidepalmitique	(Amal et Moustafa, 2007).
β -sitostérol, isorhamnétine-3-O-rutinoside	(Ayad, 2008).
Carvone, α -terpineol, β -damascenone	(Tigrine-Kordjani <i>et al.</i> , 2011).

4.3. 4. Propriétés et utilisation

L'espèce *Z. album* est utilisée pour traiter une diversité de maladies : diabète, indigestion dermatose, l'asthme, les rhumatismes, la goutte et l'hypertension (Azroug et Houna, 2019).

En pharmacopée traditionnelle *Z. album* est utilisée, en décoction, en poudre ou en pommade pour les traitements du diabète, des indigestions et des dermatoses (Chehma, 2006). Elle est utilisée comme remède contre les caries dentaires et comme cicatrisant (feuilles, fleurs et tiges).

Les observations sur terrain par Jamaledine *et al.*, (2017) montrent que *Z. album* est peu appréciée par les herbivores. Ceci est un bon indicateur sur la présence éventuelle de métabolites secondaires qui jouent un rôle de défense chez cette espèce. De même, il paraît que cette espèce est bien broutée par le dromadaire (Chehma, 2006).

Beaucoup d'espèces de ce genre ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle. *Z. album* semble avoir une très grande importance thérapeutique. Leurs extraits sont carminatifs, anti-septiques, et stimulants (Atta et Mouneir, 2004 ; Meng *et al.*, 2002 ; Maiza *et al.*, 1993). D'après El hafian *et al.*, (2014), cette préparation est prise par voie orale contre les douleurs gastrointestinales.

Les résultats de l'utilisation des extraits des parties racinaire et aérienne de *Z. album* contre les souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa* et S5: *Enterococcus faecalis*) ont mis en évidence une bonne activité bactéricide. De plus, les extraits aqueux et méthanolique de *Z. album* ont un pouvoir antibactérien contre les souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Azroug et Houna, 2019).

Après trois jours d'incubation à 27°C, la présence de la croissance mycélienne pour l'extrait de la partie aérienne (A4) de *Z. album* est observée à la concentration de 25mg/ml ainsi que celle de sa partie racinaire (R4) à la concentration de 50mg/ml. Les résultats obtenus ont été négatifs pour le champignon *Fusarium oxysporum*. Pour l'extrait de la partie aérienne (A2) de champignon *Cistanche tinctoria*, à la concentration de 50mg/ml, il a été observé une présence de la croissance mycélienne (Kadri, 2020).

Partie II

Matériels et méthodes

Partie II : Matériels et méthodes

Ce travail a pour objectif d'apporter des éléments complémentaires pour une nouvelle stratégie de valorisation des substances naturelles d'origine végétale garantissant la conservation des denrées alimentaires sans risque sur la santé des consommateurs et sur l'équilibre écologique.

Les deux espèces de Coléoptères qui intéressent notre étude sont *Callosobruchus maculatus* et de *Tribolium castaneum*. Le choix de ces insectes est fait sur la base de l'importance des dégâts qu'ils occasionnent au niveau des stocks et pour la facilité d'élevage et de la manipulation de ces derniers au laboratoire.

La sélection des plantes a été conduite sur la base de leur usage dans la médecine et la pharmacopée, sur leur richesse en métabolites secondaires et leurs propriétés biologiques soulignées dans les études antérieures effectuées par : Hamraoui et Regnault-Roger (1997) et Stoll (2000).

Dans ce cadre, diverses plantes ont été testées notamment : *Salsola Foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album* sur les deux ravageurs des denrées stockées.

II.1. Extraction des plantes et leur composition chimique

II.1.1. La récolte des plantes retenues

Le matériel végétal considéré dérive de trois plantes appartenant à différentes familles botaniques, qui sont : *Salsla feotida* (*Caroxylon imbricatum*), de *Cotula cinerea* (*Brocchia cinerea*) et de *Zygophyllum album* (*Tetraena alba*). Ces plantes poussent à l'état spontané dans deux différentes régions du sud algérien à étage bioclimatique saharien. Elles ont été récoltées en 2016. Les données concernant ces plantes et leurs sites d'échantillonnage sont mentionnés dans les tableaux 3 et 4. L'identification de ces espèces végétales a été effectuée sur la base de l'herbier du Département de Botanique et la confirmation a été assurée par le Professeur Benhouhou.

Tableau 3. Caractéristiques relatives aux 3 plantes considérées

Plantes	Familles botaniques	Régions	Période de récolte (2016)	Partie de la plante considérée
<i>Salsola foetida</i>	Amaranthaceae	Aougrou (Adrar)	Fin de mois d'août	Aérienne
<i>Cotula cinerea</i>	Asteraceae	Djamaa (Oued Souf)	Mois de novembre	Aérienne
<i>Zygophyllum album</i>	Zygophyllaceae	Djamaa (Oued Souf)	Mois de novembre	Aaérienne

Tableau 4. Caractéristiques des régions de récolte

Régions	Coordonnées géographiques	Température annuelle moyenne	Précipitation annuelle moyenne	Superficie (km ²)	Altitude (m)
Oued Souf	33°21'21" N 6°51'47" E	21	77	35706	80
Adrar	27°52'27" N 0°17'37" O	24	12	427300	276

Dans un premier volet, le matériel végétal consiste en la partie aérienne de la plante. Les organes végétaux frais ont été récoltés et séchés à l'air ambiant à une température de l'ordre de 25 °C pendant un mois. Dans le second volet, le matériel biologique est broyé à l'aide d'un broyeur électrique jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, puis stocké dans des sachets et conservé à sec à l'abri de l'humidité. Le broyage de la plante augmente la surface de contact solvant-échantillon et assure une meilleure filtration du solvant au sein du matériel végétal. Ce qui a pour conséquence une augmentation de l'extraction (solide-solide).

II.1.2. Méthode d'extraction à base de l'éthanol

L'appareillage Soxhlet permet l'extraction, avec les solvants, des espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs du solvant. Les espèces chimiques passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon

(Fig.9). Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet de réduire le temps d'extraction, d'une part, et requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, d'autre part (Luque de Castro et Priego-Capote, 2010 ; Bimakr *et al.*, 2011). A propos de notre protocole, une extraction solide-liquide par Soxhlet a été réalisée au laboratoire de Valorisation et Technologie des Ressources Sahariennes (VTRS) de l'université D'El-Oued et au sein du laboratoire du Département Technologie Alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA).

Une quantité de (10 g) de poudre de la matière végétale préparée a été extraite avec 150 ml d'éthanol par Soxhlet pendant une durée de 3h. Les extraits ont été filtrés à l'aide des filtres WhatmanN ° 0,1. Le filtrat a été concentré sous vide à 40 °C par un évaporateur rotatif (R-210 BUCHI, Suisse) pour éliminer l'éthanol. L'extrait ainsi récupéré a été conservé à 4°C jusqu'à son utilisation (Fig.10 et 11)

Le taux d'extraction (le rendement de l'extraction) est calculé comme suit :

$$\text{Le taux de matière extraite (\%)} = [(P_1 - P_0) / E] * 100$$

P₀ : poids du ballon vide (g).

P₁ : poids du ballon après évaporation du solvant (g).

E : poids de l'échantillon (poudre) (g).

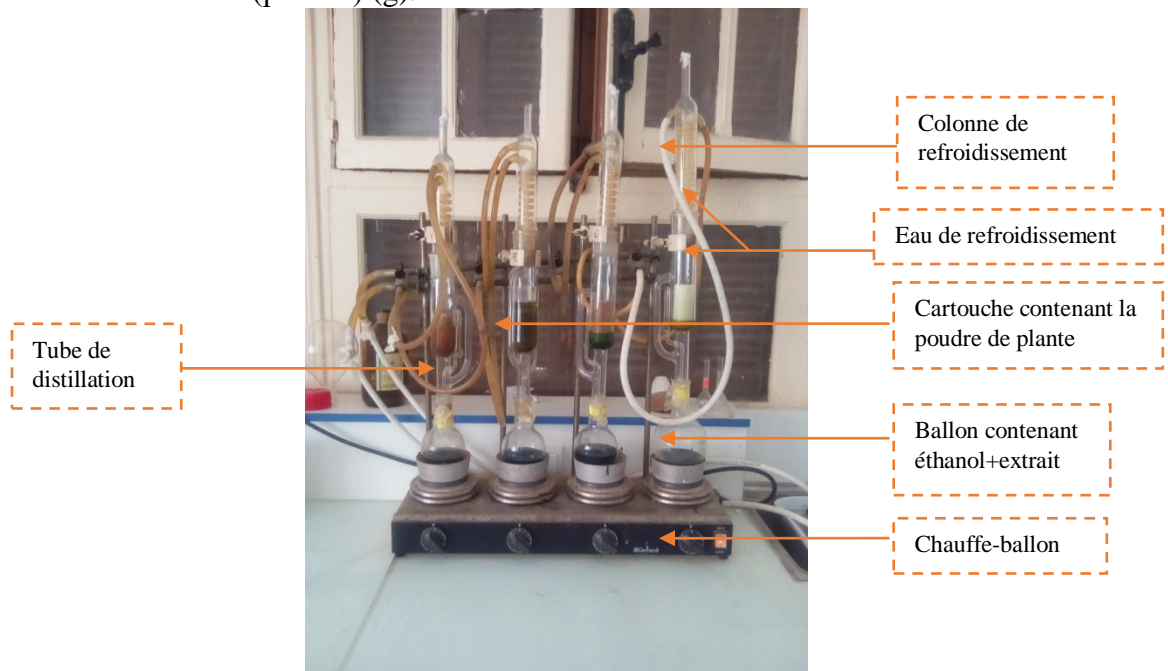


Figure 9. Dispositif soxhlet à quatre montages

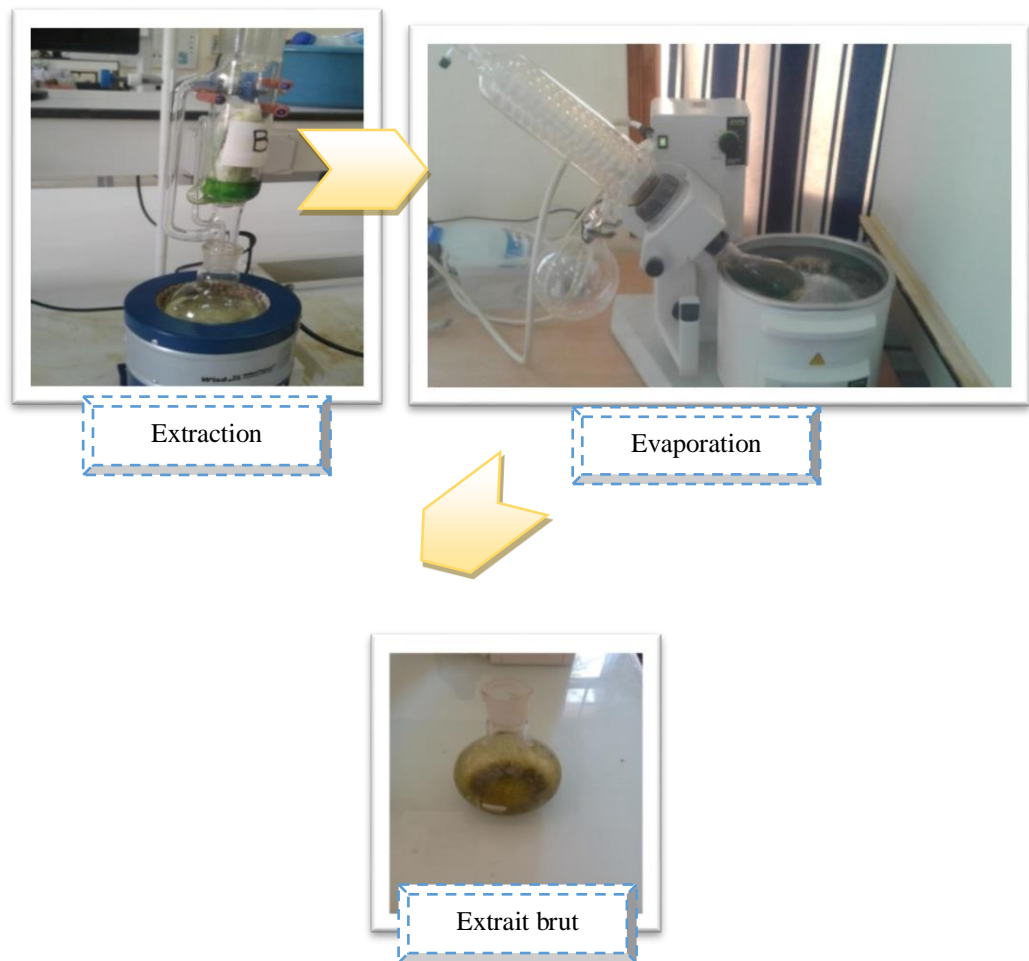
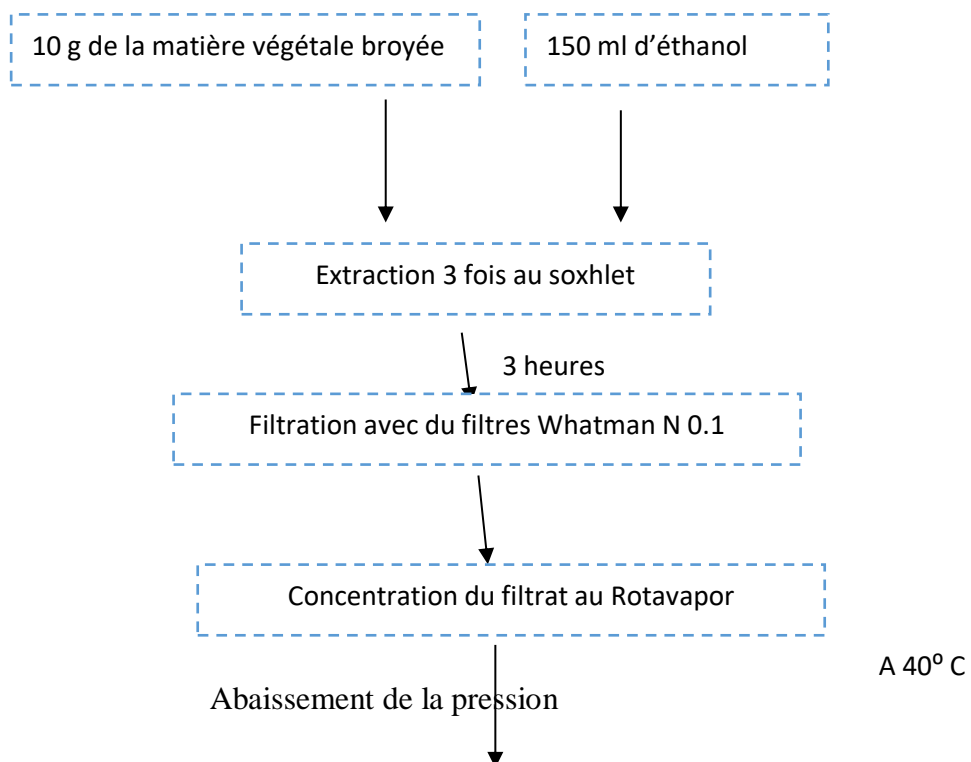


Figure 10. Les principales étapes de l'extraction par soxhlet



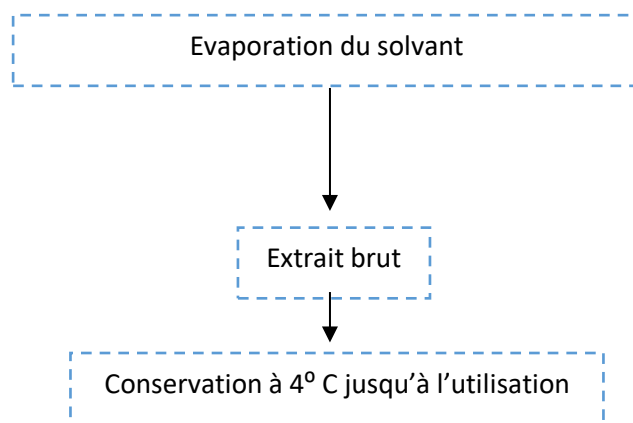


Figure 11. Schéma descriptif du protocole expérimental de l'extraction à base de l'éthanol

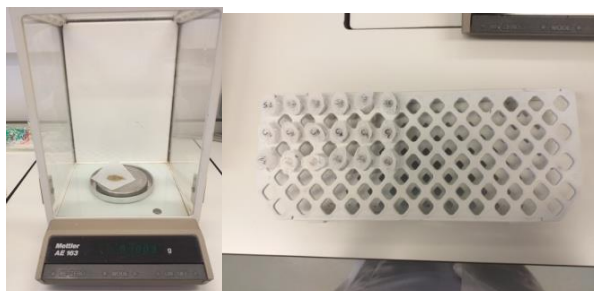
2.1.3. Extraction de quelques métabolites secondaires des trois plantes

L'expérimentation a été performée dans le laboratoire de « génétique, selection et biochimie des Brassicas » de la Mission Biologique de Galice (MBG-CSIC)- Pontevedra en Espagne. Pour chaque méthode d'extraction nous avons considéré 3 échantillons de 100 mg par plante.

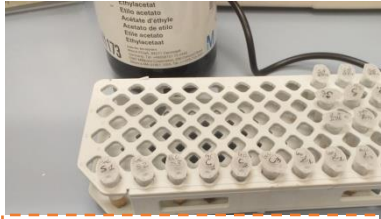
2.1.3.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC QTOF MS)

2.1.3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été préparés en ajoutant 1 ml d'acétate d'éthyle pour chaque échantillon dans des tubes eppendorf, en les plaçant dans l'agitateur de type vortex pendant 15 secondes et en les mettant dans le sonicateur pendant 15 minutes. Afin de séparer le liquide du solide, nous avons procédé à la centrifugation des échantillons à 20.000 g pendant 10 minutes. Les filtres WHATMAN 0,2µm ont été activés avec la même quantité de solvant (l'acétate d'éthyle) avant la filtration des échantillons. Ensuite, nous avons préparé une dilution de 10µl de l'échantillon filtré et 990µl de l'acétate d'éthyle dans des tubes en verre de 2 ml (Fig.12).



Pesée des poudres végétales : 3 échantillons de 100 mg pour chaque plante.



L'ajout de 1 ml d'Acétate d'éthyle



Agitation au vortex pendant 15 secondes



Mettre les échantillons au Sonicateur pendant 15 minutes



Centrifugation des surnageants à 20.000 g pendant 10 minutes



Activation des filtres WHATMAN
0.2um et filtration des échantillons



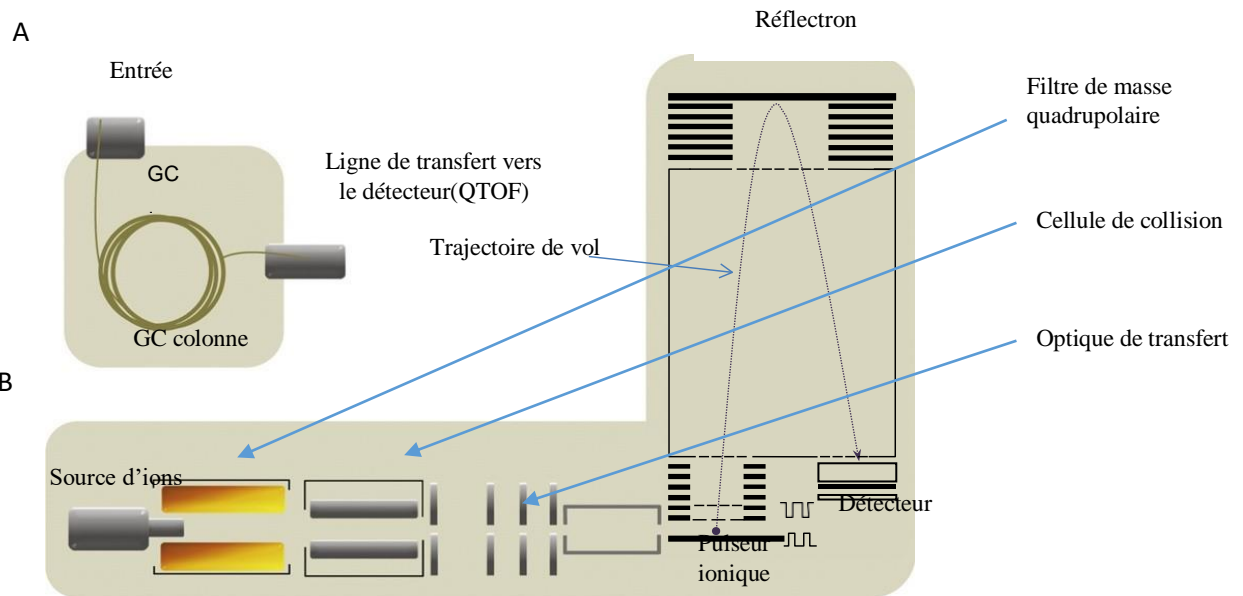
Préparation des dilutions de 10µl de
l'échantillon filtré + 990µl d'acétate
d'éthyle dans des tubes en verre de 2 ml

Figure 12. Schéma descriptif des étapes de la préparation des échantillons pour l'analyse à la GC

2.1.3.1.2. Procédure d'extraction par GC QTOF_MS

Les métabolites ont été analysés à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/QTOF/MS) constitué d'un chromatographe en phase gazeuse (7890B Agilent Technologies), d'un spectromètre de masse QTOF (7200 Agilent Technologies) et d'un échantillonneur automatique (GC Sampler 120 Agilent Technologies). La colonne était un HP5-MS (5% phenyl-methylpolysiloxane, 30m 0.25mm de diamètre intérieur, 0.25 µm d'épaisseur de film) Agilent Technologies (Fig.13). La température a été réglé comme suit: 60 °C gardé pendant 1 min puis rampé à 100 °C pendant 1 min et à une valeur finale de 245 °C à 15 °C/min. L'Helium a été utilisé comme un gaz vecteur à un débit de 1 mL/ min. Les conditions des sources MS étaient PCI utilisant du méthane (99.95%) sous forme de gaz d'ionisation (pression de 20%) à 150 µA de courant d'émission de filament (Benigno *et al.*, 2020).

La GC est appliqué pour séparer les composés volatils et semi-volatils et les métabolites. La séparation du mélange dépend de la longueur et de la température de la colonne (T = 290°C) (Jaroslav *et al.*,2014). Les principales étapes de l'extraction à la chromatographie en phase gazeuse –qTof couplée à la spectrométrie de masse sont illustrées dans la figure 14.



(A) Un chromatographe en phase gazeuse, avec entrée, colonne CG et ligne de transfert. (B) Schéma simplifié d'une MS quadripolaire à temps de vol, avec source d'ions, filtre de masse quadripolaire, cellule de collision, optique de transfert, tube de vol, réflectron et détecteur.

Figure 13. Schéma simplifié du dispositif GC-QTOF-MS (Gushue,2013)

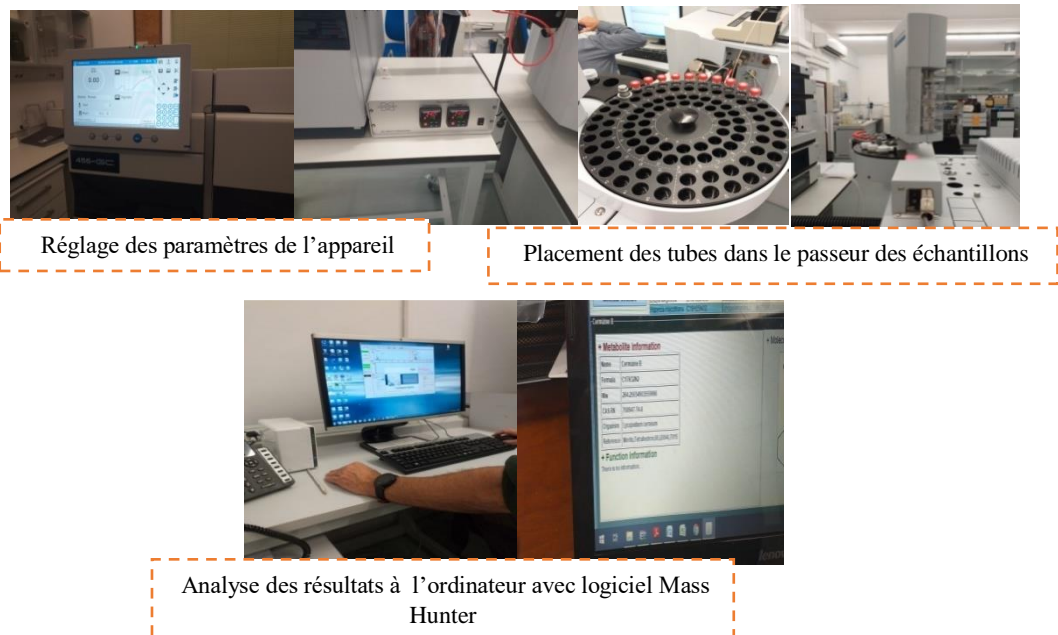


Figure 14. Principales étapes de l'extraction des métabolites à la GC-QTOF-MS.

2.1.3.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC QTOF _MS)

Cette méthode d'extraction a été modifiée à partir de plusieurs méthodes décrites par Hardy et Hall (2012) ; De vos *et al.*, (2011) ; Rogachev et Aharani (2011).

2.1.3.2.1. Solution d'extraction de l'échantillon

- Méthanol et eau grade HPLC-MS fournis de J.I.Baker.
- Acétonitrile grade HPLC-MS a été obtenu de Sigma Aldrich.
- Methotrexate : un standard interne qui est une substance de référence de Sigma Aldrich.
- Bleomycine : un standard de référence.
- La préparation pharmaceutique commerciale : Bleomedac.
- Solution d'acétate : 2,3 ml d'acide acétique et 3,41 g d'acétate d'ammonium dans 1 L d'eau purifiée par un système de purification Merck Millipore, la solution doit avoir un pH de 4,8, si non on rajoute 0,1 M de HCl ou 0,1 M de NaOH (reagent grade ou ACS grade).
- Solution d'extraction : mélanger 25 % de la solution d'acétate avec 75 % de méthanol, ex : mélanger 250 ml de la solution d'acétate avec 750 ml de méthanol.

2.1.3.2.2. Pratique d'extraction par HPLC QTOF _MS

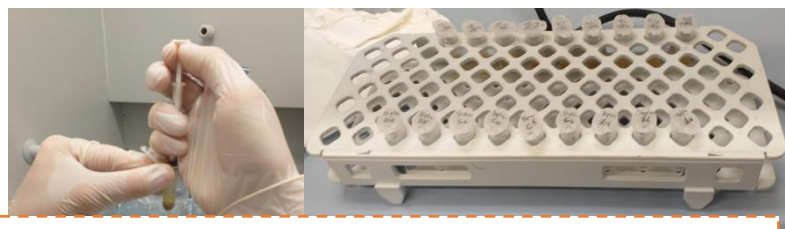
Les échantillons préparés à partir de 100 mg de poudre végétale + 1 ml de méthanol, ont été mis au vortex pendant 10 secondes, dans le sonicateur pendant 5 minutes à 30 Hz et à la centrifugeuse pendant 10 minutes. Ensuite, ils ont été filtrés et transférés dans de nouveaux tubes Eppendorf étiquetés. On a ajouté 1ml de la solution d'extraction (25 % de solution d'acétate +75 % de méthanol) pour chaque tube contenant de la matière végétale, puis on a fait passer l'ensemble au vortex pendant 10 secondes, dans le sonicateur pendant 5 minutes à 30 Hz et centrifuger pendant 10 minutes à 20.000g. Le surnageant pour chaque tube a été combiné avec le contenu qui lui correspond dans les eppendorfs de la première étape (les surnageants filtrés au début et portés à la centrifugation pendant 5 minutes. Par la suite, 200 μ L de chaque solution a été transférée dans des flacons HPLC (tubes en verre de 2 ml) et mélangée avec 800 μ L de la solution d'extraction pour obtenir une dilution de 1/5. Enfin, les tubes ont été analysés par HPLC-QTOF-MS (Hall,2012 ; De vos *et al.*, (2011) ; Rogachev et Aharani 2011), (Fig.15).



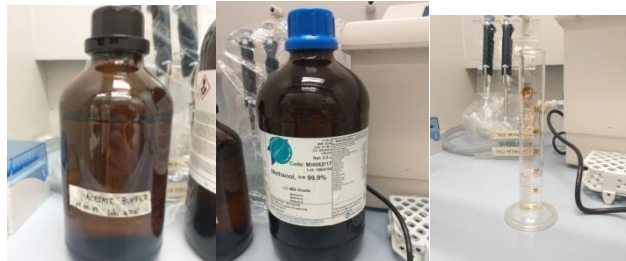
100 mg de poudre végétale+ 1 ml de méthanol dans chaque tube



Agitation au vortex + sonication à 30 Hz + centrifugation pendant 10 min



Filtration + transfert dans de nouveaux eppendorf + garder les eppendorf contenant la matière végétale



Préparation de la solution d'extraction : 25% de la solution d'acétate+ 75% de méthanol)



Ajouter 1 ml de la solution d'extraction à chaque tube contenant la matière végétale.

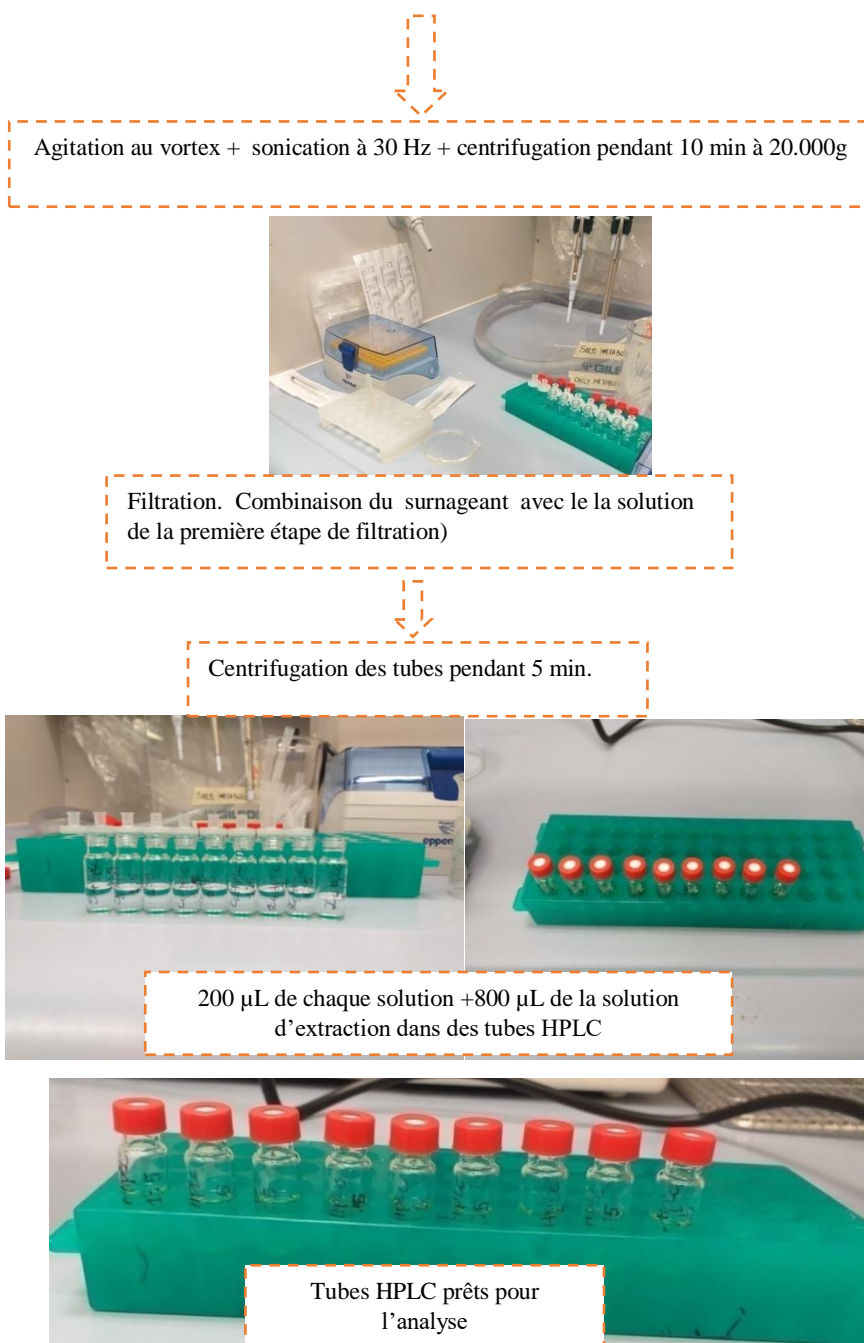


Figure 15. Procédure descriptive des étapes de la préparation des échantillons pour l'analyse à HPLC-QTOF –MS

L'appareil chromatographique est composé d'un système LC AgilentInfinity et équipé d'une pompe à gradient Infinity 1260, d'un injecteur automatique HiPals 1260, d'une colonne de 1290, d'un détecteur à réseau de photodiodes Infinity 1290, d'une masse précise quadrupôle du, temps de vol 6520 (QTOF/MS), Spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation par électropulvérisation, d'un ordinateur équipé du logiciel Mass Hunter pour l'acquisition et le traitement des données (Agilent Technologies) et des colonnes chromatographiques avec plusieurs phases

stationnaires utilisées : C18, C8, switterionique HILIC(ZIC-HILIC). La HPLC-QTOF-MS peut être utilisée pour identifier les composés solubles et un grand nombre de métabolites pour chaque échantillon. Elle utilise également des solvants H₂O et acétonitrile pour créer un gradient de polarité (95% d'eau et 5% d'acétonitrile). Les paramètres de mesure de HPLC-MS QTOF sont : un débit de la phase mobile de 0,4 ml/min, une pression de 250 bar, une température de la colonne de 30°C, un volume injecté de 30 µL. La spectrométrie de masse est réglée à : un débit de gaz de séchage de 5 L/min, la température de gaz de séchage de 300°C, pression de gaz de nubélisation de 30 psi, un voltage de la source ESI de 3500 V, un voltage du fragmenteur de 180 v et un type de gaz de collision N₂ (Lei *et al.*,2019).

L'échantillon est dissous dans un liquide appelé « phase mobile » (l'eau et l'acétonitrile). La pompe déplace la solution par une haute pression pour faire passer la phase mobile à travers la colonne LC qui est remplie avec « la phase stationnaire ». Les différents composés de l'échantillon analysé se séparent dans la colonne. Le moment où un composé se distingue est appelé son temps de rétention. Par la suite, les composés sont injectés dans le spectromètre de masse qui est constitué par 3 éléments fondamentaux. Un analyseur de masse quadripolaire (MS1), un analyseur de masse TOF (MS3) et une cellule de collision hexapole (MS2). La séparation des composés par les valeurs de m/z se fait dans l'analyseur TOF. Le spectre de masse enregistré par le détecteur fournit des informations sur les deux types d'ions : produits et moléculaires (M⁺). Il s'appelle : spectre MS/MS qui est important pour l'identification des métabolites car il fournit une empreinte caractéristique de différents composés, même s'ils ont la même formule (Fig.16).

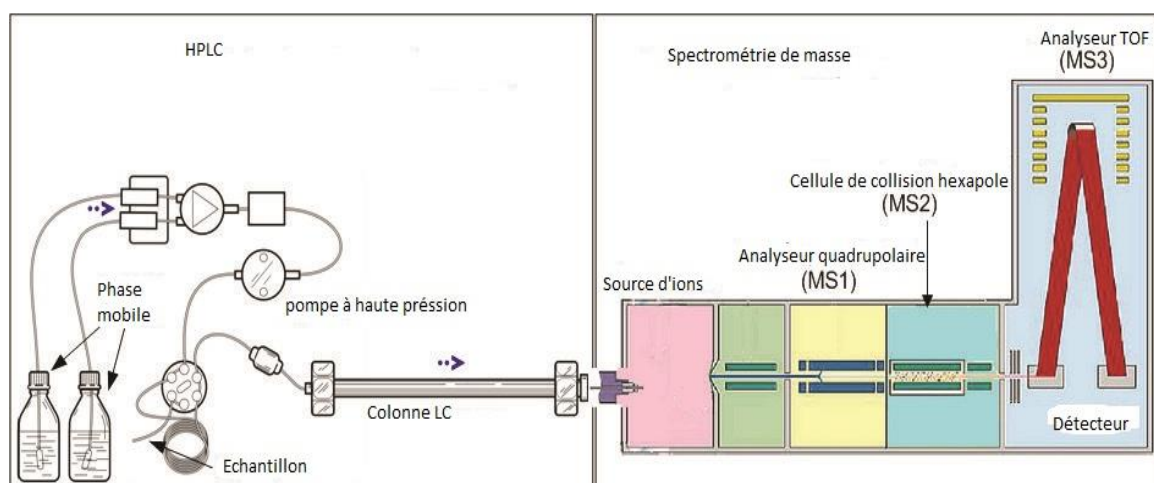


Figure 16. Schéma explicatif du dispositif HPLC-QTOF-MS (Zhou,2011)

2.1.3.3. Identification de quelques métabolites

Les deux techniques GC et LC-QTOF-MS permettent d'identifier des composés selon les prévisions de formule chimique à partir d'une mesure précise de la masse ionique et profil isotopique caractéristique.

Les métabolites ont été analysés par GC et LC avec détection QTOF/MS. Les paramètres : temps de rétention, formule moléculaire, m / z expérimental et calculé, m / z des fragments principaux et l'erreur et Score ont permis l'identification de ces composés. Les bases de données utilisées pour l'identification sont celles de Metaboscape de Bruker, de Sirius, Metlinscripps et de Knapsack metabolomics. Le logiciel spécifique utilisé pour HPLC est Chromeleon Chromatography Data System.

2.1.4. Extraction de composés phénoliques des plantes

2.1.4.1. Préparation de solutions d'essai :

Les échantillons de plantes à analyser ont été préparés de la même méthode décrite précédemment qui suit les mêmes étapes que celles de l'extraction par la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

2.1.4.2. Conditions de chromatographie et de spectrométrie de masse HPLC -QTOF –MS et analyse des composés phénoliques

La séparation de composés phénoliques a été effectuée à l'aide d'un système HPLC composé d'un dégazeur sous vide, d'un échantillonneur automatique et d'une pompe binaire avec une pression de 250 bars, Agilent Infinity (Agilent technologies, Allemagne) équipé d'une colonne analytique C18 en phase inverse de 2,5 x 50 mm et de particules de 1,8 µm (Zorbax 137 Eclipse XDB-C18). La température de la colonne a été maintenue à 23 °C. Le volume d'échantillon injecté est de 2 µl. La phase mobile A en mode ion négatif est composée d'une solution aqueuse d'acétate d'ammonium à 2 mM et d'acide formique à 0,2 %; la phase mobile B était l'acétonitrile. Le débit utilisé était de 0,4 ml/min. Le dispositif HPLC était connecté à un spectromètre de masse à temps de vol, AgilentTOF (Agilent technologies, Allemagne), équipé d'une interface d'électropulvérisation en mode négatif, en utilisant les paramètres de fonctionnement suivants : tension capillaire 3500 V, pression du nébuliseur 30 psig, gaz de séchage 8 l/min, température du gaz 325° C, fragment ou fragment de tension : 175 V, tension de l'écumeur : 65 V, octopôle RF : 750 V. Des spectres de masse LC ont

été enregistrés de 100-3000 m/z. Les données enregistrées ont été traitées avec le logiciel MassHunter (Waldbronn, Allemagne). Les spectres d'absorption des rayons UV ont été enregistrés en ligne pendant l'analyse HPLC. Le détecteur DAD a été réglé à un intervalle de balayage de 200 à 400 nm. Les composés phénoliques ont été identifiés principalement par leurs spectres UV et ESI-MS et par comparaison avec les données de la littérature. Les standards de composés phénoliques injectés étaient : acide phénolique, acide gallique, acide protocatéchique, acide caftarique, acide p-hydroxybenzoïque, acide chlorogénique, acide caféique, acide syringique, acide coumarique, catéchine, épicatechin gallate, quercétine-3-galactoside, quercétine-3-glucuronide (q-3-glucuronide), kaempferol-3-O-glucoside, quercetin et kaempferol) (Sigma-Aldrich), (António, 2018 ; Bewketu *et al.*, 2015).

2.2. Matériel biologique et activité insecticide des extraits de plantes testées

2.2. 1. Elevage des insectes

L'espèce d'insecte étudiée, *Callosobruchus maculatus* a été obtenue à partir des semences de niébé infestées. Par ailleurs, l'espèce *Tribolium castaneum* provient d'un élevage effectué au laboratoire d'entomologie de l'Institut National de la Protection des Végétaux (INPV). L'élevage des deux insectes est conduit au laboratoire de Biologie Animale du département de Zoologie Agricole et Forestière.

2.2. 1.1. *Callosobruchus maculatus*

L'élevage de masse de la bruche a été réalisé dans des bocaux en verre. Dans chaque bocal sont déposées 250 g de pois chiche et 10 couples de bruches. L'élevage a été maintenu à l'obscurité dans une étuve réglée à $30 \pm 1^\circ\text{C}$. L'humidité relative est de $70 \pm 5\%$, est assurée par un cristalliseur rempli d'eau. L'ouverture des bocaux est protégée par des tissus à mailles fines pour permettre une aération et d'empêcher la sortie des insectes. Les adultes considérés sont âgés de moins de 24 heures et ont été récupérés quotidiennement par tamisage.

2.2. 1. 2. *Tribolium castaneum*

Les adultes de tribolium rouge de la farine ont été placés dans des bocaux en verre contenant un milieu d'élevage composé de 250 g de farine commerciale infestée par 40 adultes de *Tribolium castaneum*, puis recouverts par un tissu à mailles fines pour permettre une aération suffisante. L'ensemble des bocaux est placé dans une étuve obscure réglée à une température de $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, et une humidité relative de 60-65% ; de telles conditions sont favorables pour une bonne multiplication

et un développement de cette espèce. Après deux semaines d'infestation la farine a été renouvelée après l'émergence de chaque génération d'insectes.

2.2. 2.Evaluation de la toxicité de l'extrait éthanolique vis-à-vis *Callosobruchus maculatus*

2.2. 2.1. Activité insecticide sur les adultes par contact

Le principe est de garder les adultes de *Callosobruchus maculatus* en contact avec les extraits (Méthode de l'imprégnation du papier filtre Whatman N° 1 de 9 cm de diamètre). Pour chaque extrait on a préparé 4 doses à savoir : 6, 12, 24 et 48 mg/ml sachant que le solvant de dilution est l'éthanol. Pour chaque dose et pour son témoin nous avons réalisé 6 répétitions à raison de 20 adultes de bruche âgés de moins de 24 heures. Les essais sont réalisés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (Fig.17). Après traitement du papier filtre, ce dernier est laissé pendant 10 min à la température ambiante pour une évaporation totale du solvant. Les papiers filtres des boîtes témoins sont traités uniquement par 1 ml de l'éthanol. Pour éviter la fuite des ravageurs les boîtes sont fermées par leur couvercle et conservés ensuite dans une étuve réglée à $28^{\circ}\text{C}\pm 1$ et 75% d'humidité. Le dénombrement des insectes morts est effectué chaque 24 heures pendant 7 jours.

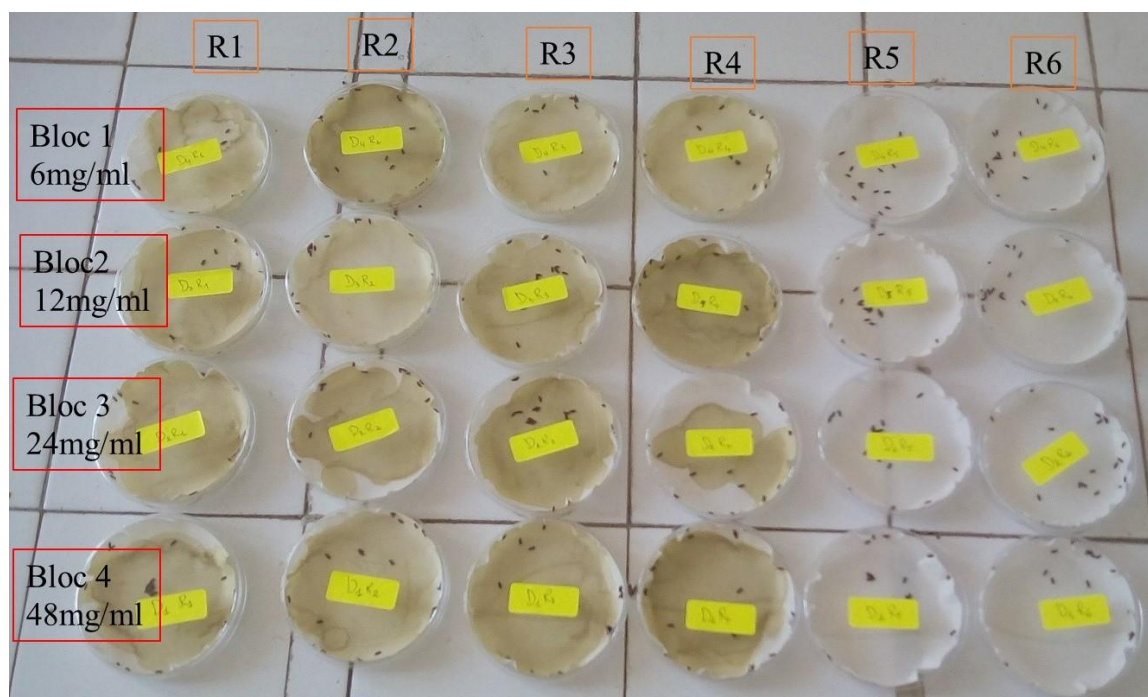


Figure 17. Dispositif expérimental de l'effet contact des extraits éthanoliques sur les adultes de la bruche.

Il existe souvent dans les lots d'insectes traités, une mortalité naturelle inévitable qui vient s'ajouter à la mortalité issue de l'intoxication proprement dite de l'insecte.

Pour cela Abbott (1925) propose une formule de correction des pourcentages de mortalités comme suit :

$$M_c \% = \frac{M_o - M_e}{100 - M_e} \times 100$$

Où : **Mo** : mortalité enregistrée dans les lots traités (%)

Me : mortalité enregistrée chez le témoin (%)

Mc : mortalité corrigée (%)

L'efficacité d'un toxique s'exprime par la DL₅₀ qui est définie comme la dose létale de 50 % de la population traitée. Elle est déterminée par la méthode des log-Probit (Finney, 1971). Cette concentration est obtenue à la suite de la résolution de l'équation : $Y = ax + b$

Y étant le taux de mortalité exprimé en valeur probit dont la fonction correspondante est

$Y = f[\ln(\text{dose})]$

2.2. 2. 2. Activité insecticide sur la fécondité des adultes

Le test a été mené dans des boîtes de Pétri en verre de 14 cm de diamètre. L'expérience a consisté à placer 10 femelles et 10 mâles de *Callosobruchus maculatus* âgés de 24 heures dans des boîtes de Pétri contenant 10 gr de pois chiche. Les doses retenues pour ce test sont les DL₅₀ évaluées pour chaque extrait de plante soit : 6.35 mg/ml pour *Salsola*, 12.55mg/ml pour *Cotula* et 36.59 mg/ml pour *Zygophyllum*, avec 6 répétitions pour chaque dose. Les boîtes témoins sont traitées toujours avec l'éthanol. Les boîtes ont été mises dans les mêmes conditions 28°C±1 et 75% d'humidité. Le nombre des œufs pondus stériles (non éclos) et fertiles (éclos) a été dénombré au moyen d'une loupe binoculaire, chaque 24 heures et éliminé les œufs pondus par graine à l'aide d'une épingle pour ne pas confondre le comptage. La période maximale de dénombrement des œufs est de 4 jours.

L'évaluation de la fécondité des femelles se fait par le dénombrement des œufs éclos et non éclos après le lancement des tests.

2.2. 2. 3. Activité insecticide sur la fertilité des adultes

Un nombre de graines de pois chiche précis a été pris en considération, à partir des pontes effectuées au test de la fécondité des adultes. Les œufs retenus pour chaque boîte sont de l'ordre de 20 œufs sur les graines. Les boîtes chez le témoin contiennent le même nombre d'œufs. Le dénombrement des œufs éclos a été réalisé 3 jours après.

Après comptage des œufs pondus le taux d'éclosion est exprimé par le pourcentage des œufs éclos par rapport au total des œufs pondus ; il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'éclosion des œufs (\%)} = (\text{nombre d'œufs éclos} / \text{nombre d'œufs pondus}) \times 100$$

2.2. 2. 4. Activité insecticide sur l'émergence de la première génération (F1)

Les émergences des adultes de *Callosobruchus maculatus* ont débuté environ 21 jours après le lancement des tests. Ces émergences ont été suivies pour dénombrer régulièrement les individus pendant une semaine. Les observations quotidiennes sont réalisées jusqu'aux dernières émergences. Ainsi le taux d'émergence, qui est le rapport entre le nombre d'adultes émergés et le nombre d'œufs pondus, est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'émergence (\%)} = \left(\frac{\text{Nombre d'adultes émergés}}{\text{nombre d'œufs total d'œufs pondus}} \right) \times 100$$

Nous avons pris en considération les paramètres suivants :

le pourcentage de réduction du nombre d'œufs pondus et des adultes émergés pour chaque dose d'extrait a été calculé par rapport aux témoins en utilisant la formule de Gusmão *et al.*, (2013).

PR= pourcentage de réduction de fécondité ou réduction d'émergence.

NC= nombre des œufs ou insectes émergés dans le témoin.

NT= nombre des œufs ou insectes émergés dans le traitement.

$$\text{PR} = (\text{NC}-\text{NT}) \times 100$$

2.2. 3. Evaluation de la toxicité de l'extrait éthanolique vis-à-vis de *Tribolium castaneum*

2.2. 3.1. Activité insecticide sur les adultes par contact

L'imprégnation des papiers filtres est la méthode utilisée pour déterminer la toxicité de l'extrait, en mettant directement l'insecte en contact avec ces substances actives. Ce procédé adopté a permis de travailler sur des échantillons comportant un grand nombre d'individus pris aléatoirement à partir d'une population d'insectes hétérogènes d'âges et sexes confondus (en surveillant l'émergence des adultes).

Les essais ont été réalisés dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre contenant du papier filtre Whattman N°1, et 5 g de substrat alimentaire (la farine) traités par la solution d'extrait de plante et de l'éthanol. Les doses retenues pour ce traitement ont été déduites après des tests préliminaires à partir d'une dose initiale et selon une progression géométrique de 2 pour chaque plante testée.

Pour l'ensemble des essais, six répétitions ont été réalisées pour chaque concentration (10, 20, 40 et 80 mg/ml) avec des témoins maintenus dans les mêmes conditions. Au total, nous avons introduit 20 insectes de *tribolium* adultes d'âges et de sexes différents dans chaque boîte. Les conditions de

traitement ont été fixées pour les lots traités et pour les lots témoins : une température de $28^{\circ}\text{C}\pm^{\circ}1\text{C}$ et une humidité relative de 60-65% (Fig.18).

Les symptômes de la mortalité pour cet insecte sont aperçus lorsqu'on constate l'absence de mouvements corporels des individus. Le comptage des insectes morts est effectué, chaque 24 heures pendant une période de 10 jours après le traitement.

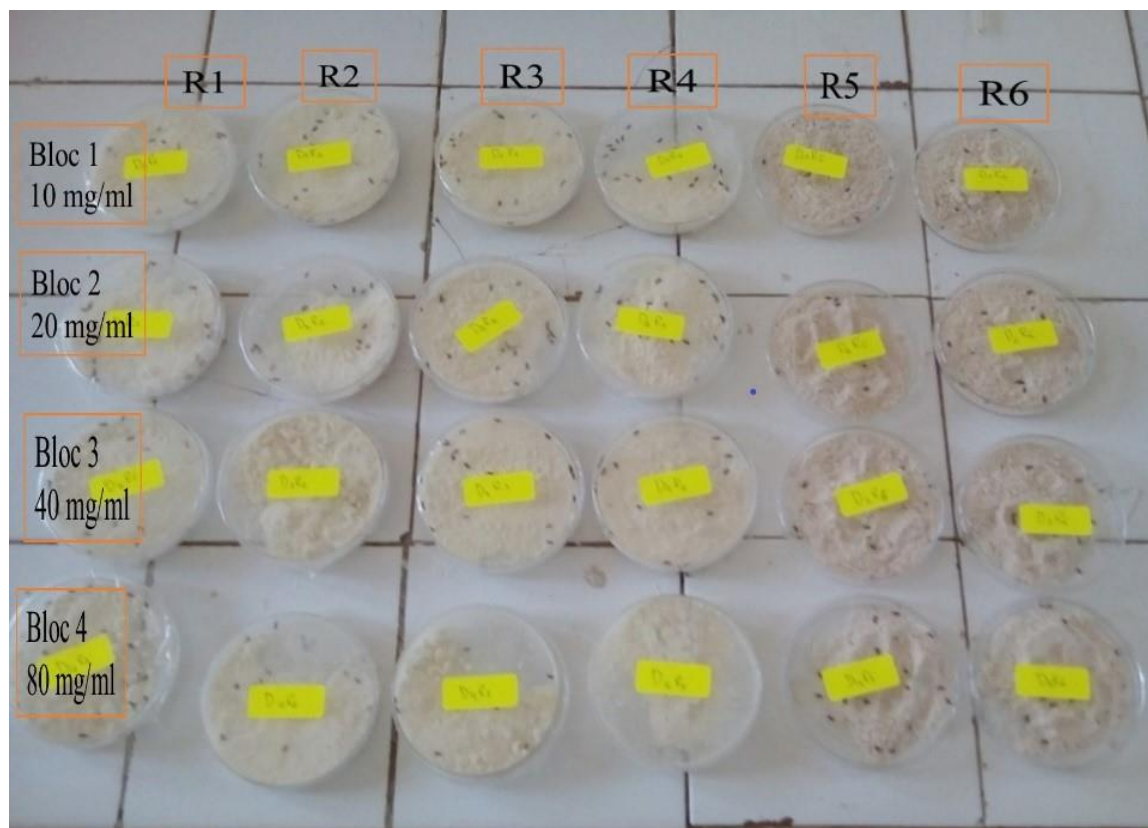


Figure 18. Dispositif expérimental de l'effet contact des extraits éthanoliques sur les adultes de *T. castaneum*

2.2. 3. 2. Activité insecticide sur les adultes par ingestion

L'évaluation de la toxicité des extraits par ingestion est déterminée par la méthode de graines reconstituées décrites par Huang *et al.*, (1999) : des graines reconstituées à partir d'une suspension d'extrait pour chaque plante dans de la farine à raison de 12 g pour 18 ml pour chaque concentration. Pour les témoins nous avons considéré les mêmes proportions pour la préparation avec uniquement une suspension d'éthanol et de la farine. Les essais ont été menés dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre Wattman. Un nombre de 20 individus de *Tribolium castaneum* (pas d'âges confondus) a été introduit dans chaque boîte ; 4 doses ont été choisies (les mêmes retenues pour le test de contact précédent) et le témoin avec six répétitions.

Les lectures de mortalités ont été réalisées quotidiennement pendant une période de 10 jours. Les mortalités enregistrées ont été exprimées comparativement avec les résultats du témoin.

2.3. Analyse statistique des données

Les résultats sont soumis aux tests de l'analyse de la variance à deux critères de classification, utile pour l'étude de l'action de deux facteurs (Dagnelie, 1975). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS version 23 (2017). Les résultats ont été exprimés par la moyenne et l'écart type. Pour estimer les effets insecticides des extraits de plantes, une analyse de la variance (ANOVA) avec deux critères de classification a été effectuée avec le nombre d'insectes morts en fonction des différentes doses. La corrélation entre l'effet dose DL50 sur les paramètres biologiques (fécondité, fertilité et émergence de la F1). La comparaison des moyennes des différents extraits éthanoliques a été effectuée par le test POST HOC (TUKEY HSD) pour détecter des différences significatives au niveau de 0,05% et pour séparer les groupes.

2.4. L'activité antibiotique de métabolites secondaires de *Cotula cinerea*

2.4.1. Procédures expérimentales

Le spectre de résonance magnétique nucléaire C^{13} et H^1 a été enregistré respectivement à 500 et 400 et à 125 et 100 MHz dans $CDCl_3$ avec Varian (Palo Alto, CA, USA) ou spectromètre de Bruker (Karlsruhe, Germany). Le même solvant a été utilisé comme un standard interne. La multiplicité de carbone a été déterminé par le spectre Dept. L'expérimentation de Dept, cosy-45, HSQC et HMBC a été effectuée en utilisant le microgramme de Bruker (Berger et Braun, 2004). HR ESIMS et ESIMS a été enregistré avec le système LC/MS ESIMS-TOF (Agilent 6230B, HPLC 1260 Infinity) (Milan, Italy). La séparation avec l'HPLC a été procédé à l'aide de phenomex LUNA (C18(2)5u150 \times 4.6mm) (Torrance, CA, USA). Les préparatives analytiques et chromatographie sur couche mince en phase inverse TLCs a été réalisé sur les plaques de gel de Silice (Merck, Kieselgel 60, F₂₅₄, 0.25.0.5 mm et RP-18F_{254s}) (Merck, Darmstadt, Germany). Les taches ont été visualisées par exposition au rayonnement UV ou par pulvérisation avec 10 % de H_2SO_4 dans le méthanol, 5% de l'acide phosphomolybdique dans EtOH et ensuite exposer à une température de 110°C pendant 10 min. La chromatographie sur couche mince a été effectuée avec le gel de silice (Kieselgel 60, 0.063-0.200 mm) (Merck, Darmstadt, Germany). Tous les solvants ont été fournis par Sigma-Aldrich (Milan, Italy). Le modèle de la balance utilisée est Analytical precisa ES 225SM-DR (Dietikon, Switzerland).

2.4.2 L'isolement des métabolites de plante

100 g de matière végétale ont été dissous dans 500 ml de l'eau et méthanol (1/1, v/v). Le mélange a été gardé sous agitation à température ambiante pendant 24 h ; centrifugé et le surnageant a été extrait n-hexane (3 \times 300 ml) et le dichlorométhane (3 \times 300 ml), puis éliminé le méthanol sous une basse pression EtOAc (3 \times 200 ml). Le résidu de l'extrait organique de CH_2Cl_2 qui possède une activité

antibacterienne spécifique contre *Enterococcus. Faecalis* a été purifié par la chromatographie sur colonne avec $\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (9/1, v/v) donnant 10 groupes de fractions homogènes. Parmi eux, les fractions F2, F3 et F4 retenues un pouvoir antibactérien, ont été purifiées par la chromatographie sur colonne et TLC élue. La purification de F2 par la CC avec l'éther de pétrole/acétone (7/3, v/v) a donné 7 fractions de groupes homogènes. Un pure solide amorphe : 6-acetoxy-1 α -hydroxyguaiantrienolide (**2**, Rf 0.73, 1.70 mg) a été identifié à partir de fraction F2.2 qui ont été purifiées par TLC élue avec $\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (95/5, v/v). F2.3 purifiée par TLC avec $\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (95/5, v/v), a donné 5 fractions homogènes. La troisième fraction a donné un composé pure solide amorphe : 6-acetoxy-1 β -hydroxyguaiantrienolide (**1**, Rf 0.45, 5.17 mg). La purification de la quatrième fraction par deux étapes successives: TLC en phase inverse et directe avec $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) et l'éther de pétrole/acétone (8/2, v/v), a donné un pure composé : 6-acetoxy-10 β -hydroxyguaiantrienolide (**3**, Rf 0.37, 1.07 mg). F3 a été aussi purifiée par CC élue avec l'éther de pétrole/acétone (7/3, v/v), donnant 7 fractions de groupes homogènes. La purification de la F3.2 par TLC élue avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/i\text{-PrOH}$ (95/5, v/v), donnant un a pure solide amorphe : haagenolide (**4**, Rf 0.41, 41.7 mg). F3.3 purifiée par TLC en phase inverse avec $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v), a donné un pure composé cristallisé par $\text{CHCl}_3/i\text{-PrOH}$ (1/1, v/v) : 1,10-epoxyhaagenolide (**5**, Rf 0.53, 9.7 mg). Cette procédure a été répétée plusieurs fois, en utilisant 1.1 kg de matière végétale. La caractérisation et procédures générales sont les suivantes :

6 α -acetoxy-1 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**1**): ^1H et ^{13}C ; ESIMS (+), m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6 α -acetoxy-1 α -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**2**): ^1H et ^{13}C ; ESIMS (+), m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6 α -acetoxy-10 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**3**): ^1H et ^{13}C ; ESIMS (+), m/z 305 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

Haagenolide (**4**) : $[\alpha]^{25}+40,0$ (c 0.4, CHCl_3) (Bohlman *et al.*,1987) : $[\alpha]^{24}38.6$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H et ^{13}C ; ESIMS (+), m/z 249 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

1,10-Epoxyhaagenolide (**5**) : $[\alpha]^{25}+10.0$ (c 0.4, CHCl_3) (Bohlmann *et al.*,1982) : $[\alpha]^{24}+ 7.5$ (c 0.24, CDCl_3). ^1H et ^{13}C ; ESIMS (+), m/z 256 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

9-*O*-(*S*)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetate (MTPA) ester de haagenolide (**6**): (*R*)-(-)-MPTA-Cl (10 μL) a été mélangé avec 1.1 mg de composé **4** et ont été dissous dans la pyridine sèche. Puis le mélange a été agité à la température ambiante pendant 3 jours et l'agitation a

été arrêtée par l'ajout de MeOH. La pyridine a été éliminée par N₂ comme un flux sous forme d'azéotrope constitué par C₆H₆. La purification of de résidu brut par TLC sur gel de silice, élué avec EtOAc- *n*-hexane (4:6, v/v), en donnant un solide homogène (0.70 mg, Rf 0.57): ¹H.

9-*O*-(*R*)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetate (MTPA) ester de haagenolide (**7**): (*S*)-(+)-MPTA-Cl (10 μ L) + 1.4 mg de composé **4** et ont été dissous dans la pyridine sèche (200 μ L). La réaction a été maintenue dans les mêmes conditions utilisées pour la préparation de composés **4** et **6**. La purification de résidu brut de par TLC sur gel de silice avec EtOAc-*n*-hexane (4:6, v/v) a donné un solide homogène **7**. (0.61 mg, Rf 0.57); ¹H.

2.4.3. Les données Crystallographiques de 1,10-Epoxyhaagenolide (**5**)

(C₁₅H₂₀O₄)₂ H₂O, M = 546.63, orthorhombique, P2₁2₁2₁, *a* = 7.6570(15) Å, *b* = 14.693(3) Å, *c* = 25.155(3) Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, V = 2830.0(9) Å³, T = 173(2) K, Z = 4, D_{calcd} = 1.283 Mg/m³, taille de cristal 0.30 0.050 0.010 mm, F(000) = 1176, le coefficient d'absorption 0.094 mm⁻¹, reflets receuillis 78093, reflets indépendantes 8560 [R_{int} = 0.0502], indices finals de R [I > 2 σ (I)], R1 = 0.0455, wR2 = 0.0897, indices de R (all data), R1 = 0.0667, wR2 = 0.1003. Paramètres absolus: Flack *x* déterminé en utilisant 2540 quotients: 0.1(2); Pasteurs *z*: 0.1(2); statistiques bayésiennes: P2(true) = 1.00, P3(true) = 0.896, P3(rac-twin) = 0.104, P3(false) = 0.7 10⁻⁷, Hooft *y* = 0.16(14), paires Bijvoet 3724, couverture de Friedel 97%. Les paramètres de structure absolus ont été calculés par les programmes SHELXL-2018/3 and PLATON-v30118.

2.4.4. Les souches bactériennes et les conditions de culture

Les souches bactériennes utilisées dans cette investigation étaient des souches de référence et cliniques: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 747, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, et 4 souches cliniques de *E. faecalis* (EF-91823 et EF-91804 isolés de PJI; EF-165 et EF-91705 isolé de l'infection du sang). Les souches ont été obtenues d'une collection d'isolats cliniques anonymes, ont été établis au Département de Médecine Moléculaire et Biotechnologies Médicales (Université de Naples Federico II). Aucune approbation éthique était nécessaire pour cette étude parce que il n'y avait pas d'accès aux données des patients. Toutes les souches ont été conservées à 15% (v/v) stocks de glycérol à 80 °C. Après chaque expérience, les cellules ont été sous-cultivées à partir des stocks dans des plaques TSA à une température de 37 °C pendant 24 h. Les souches

ont été identifiées par MS MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) et ont été caractérisées par l'étude de profil de sensibilité aux antibiotiques réalisé sur Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

2.4.5. Tests antimicrobiens

La méthode de bouillon standard dans 96-plaques de polystyrène a été utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (MIC) des extraits de plantes et des métabolites secondaires par bouillon Mueller Hinton 2 (MHB2) comme un milieu de culture. Pour chaque souche, on procède par une suspension bactérienne d'une turbidité de 0.50 McFarland (Correspond à $1-5 \times 10^8$ cells/mL) et ensuite ajusté à environ 5×10^6 CFU/mL⁻¹, 100 µL des aliquotes de la suspension qui ont été distribuées dans des puits en double. 100 µL de 500 µg/mL de la solution d'extrait de plante ont été ajoutés au puits et les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 19 h sous agitation (300 rpm) et dans des conditions aérobies, à l'exception des souches de *E. faecalis*, qui ont été incubées sous des conditions anaérobies. Pour évaluer l'activité de cinq métabolites, les puits ont été ajoutés à de volumes égaux (100 µL) de la suspension et d'une série de dilutions doubles à partir de 300 µg/mL pour chaque métabolite. Les puits avec l'absence de métabolites ont été utilisés comme un témoin positif (100% de croissance). Les antibiotiques conventionnels comme l'ampicilline et l'amikacine, ont été sélectionnés en fonction des profils de sensibilité aux antibiotiques des souches testées, respectivement comme un témoin de Gram positive et Gram négative.

La turbidité moyenne est mesurée par spectrophotomètre 595 nm (Bio-Rad Laboratoires S.r.l., Hercules, CA, USA). L'activité antimicrobienne a été exprimée en pourcentage d'inhibition de la croissance. Chaque dosage a été fait deux fois. Pour confirmer que 2% de DMSO présents dans les 2 solutions mères des extraits végétaux et les métabolites n'ont pas un effet sur la croissance bactérienne, l'effet de la série des dilutions DMSO à partir de 1% sur le test de la croissance des souches a été expérimenté séparément.

2.4.6. Test d'inhibition de formation de biofilm

La biomasse de biofilm en verre formé en présence de 5 métabolites secondaires a été mesurée par la méthode de coloration crystal violet (CV) à fond plat 96-puits microplaques décrite par Stepanovic *et al.*, 2007 avec quelques modifications. Pour chaque souche, une suspension de cellulaire de BHI additionnée à 1% (w/v) de glucose, a été préparée et diluée pour obtenir une

suspension de $1.5 \cdot 10^6$ CFU/mL. 100 μ L de cette suspension ont été incubés avec 100 μ L d'une série de dilution de concentrations de sub-MIC composés, ont montré aucune influence sur la croissance planctonique des souches. Les témoins positifs étaient des puits sans composés. Le microlitre a été incubé à une température de 37 °C pendant 24 h. Les cellules non adhérentes ont été supprimées avec une aspiration et un lavage doux avec PBS, le biofilm a été séché à une température de 60 °C pendant 30 min et puis coloré avec la solution de crystal violet 0.1% (*w/v*) pendant 30 min. Après un lavage avec PBS et une solubilisation avec l'éthanol absolu pour libérer le colorant à partir de biofilm, les valeurs de mesure d'absorbance à 570 nm ont été obtenues avec la lecture spectrométrique. L'absorbance enregistrée était corrélée avec la quantité de produit biofilm. Le pourcentage de réduction de masse biofilm a été calculé par la formule suivante: $[(Ac-At)/Ac] \times 100$, dont Ac est OD570 pour les puits témoins et At est OD570 en présence de composé testé.

2.4.7. Les analyses statistiques des différents tests

Les données ont été représentées par la moyenne et l'écartype et ont été analysées par une signification statistique à l'aide d'une analyse à sens unique ordinaire avec l'analyse de variance (ANOVA) et comparaisons multiples Tukey. Pour chaque test, la valeur de $p < 0.005$ était considérée pour indiquer la différence significative statistique.

Partie III

Résultats et discussion

III. 1. Données recueillies sur l'extraction des plantes

III. 1.1. Rendement des extraits éthanoliques

Les résultats des rendements obtenus des extractions des trois extraits de la partie aérienne de plantes sont consignés dans le tableau 5. Les valeurs des rendements des extraits éthanoliques varient d'une espèce à l'autre. Le rendement de l'extrait de *Salsola foetida* est le plus élevé avec une valeur de 34,1% suivi de celui de *Cotula cinerea* avec un pourcentage de 22,8% et celui de *Zygophyllum album* avec une valeur de 18,2%.

Tableau 5. Rendement des extraits éthanoliques des différentes espèces testées.

Plantes	<i>Salsola foetida</i>	<i>Cotula cinerea</i>	<i>Zygophyllum album</i>
Rendement(%)	34,1	22,8	18,2

Les valeurs obtenues sont différentes de celles mentionnées dans les recherches antérieures. En effet, Quaram *et al.*, (2021) ont montré que le rendement de l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Salsola foetida* collectée dans la région d'El Oued, se limite à 8,12%.

En outre, au Maroc, Guaouguaou *et al.*, (2018) ont rapporté que les rendements des trois extraits d'hexane, acétate d'éthyle, et n-butanol de *Cotula cinerea* sont respectivement de 1,00, de 3,00, et de 4.50%. Par ailleurs, les travaux de Ben Amor *et al.*, (2018) effectués à El Oued donnent un rendement d'extraction en huile essentielle de la partie aérienne de *Cotula cinerea* de l'ordre de 1%.

Pour les extraits méthanolique et aqueux de la partie aérienne de *Z. album* en provenance de la région de Biskra, Benslama et Harrar (2016) notent, respectivement, un rendement de 11,6% et de 24%. De plus, les rendements de l'extrait méthanolique et de l'huile essentielle extraite de la partie aérienne de *Z. album* cueillie dans la région d'Ouargla sont respectivement de l'ordre de 25,03% et de 0,05% (Belmimoun *et al.*, 2016).

Il ressort de cette étude que le rendement des différents extraits varie selon les régions et le solvant utilisé pour l'extraction et la méthode employée.

III. 1.2. Analyse des métabolites par la GC/QTOF/ MS

Les résultats de l'analyse par la GC/MS ont montré la présence de nombreux métabolites. Pour chaque plante, nous avons choisi quelques métabolites majoritaires pour l'identification (les composés les plus abondants). Les constituants identifiés sont présentés dans les tableaux de 6 à 8. Il est à noter que pour le même temps de rétention, les métabolites analysés ont des masses spectrométriques et des nominations différentes. De même nous avons remarqué que pour deux temps de rétention on obtient la même masse m/z et le même composé. Il est à noter que quelques métabolites ont une formule chimique mais leur identité n'est pas définie. Cependant, certains composés étaient prédominants et spécifiques à chaque plante. Les composés identifiés pour *Cotula cinerea* sont : Ethylmethanethiosulfonate, Valericacid, N-Carboxy-methionineresidue, N-Butyl benzene sulfonamide, Butanoicacid, Glycoaldehyde, Sulfoxycaprylicacid, Hydroxyhexanoicacid, D-Alanine D-2-Aminopropionic acid, D-Ala, Perilyl alcohol et 4-Chloro-6-(trifluoromethoxy)-2H-1-benzopyran-2one.

Tableau 6. Composition chimique de *Salsola foetida* analysée par GC/MS/QTOF

RT	masse m/z	Formule	MsMs	Composé	Concentration en pics
2.76	103.07	C5H10O2	Non	Valericacid	766270
7.39	355.07	C26H10O2	Non	Unkonown	678456
7.39	371.10	C27H14O2	Oui	Unkonown	1236250
9.3	445.12	C26H20O7	Non	Artomunoxanthentrione	2430172
9.3	429.09	C14H36S7	Non	Unkonown	1039114
13.92	371.10	C27H14O2	Non	Unkonown	532978
2.17	158.03	C6H9NO3S	Oui	N-Carboxy-methionineresidue	1077956
2.6	89.06	C4H8O2	Non	Butanoicacid	15203136
2.64	61.03	C2H4O2	Non	Glycoaldehyde	6714526
5.57	225.05	C14H8O3	Non	Hydroxyanthraquinone	356134
5.62	223.06	C8H16O6S	Oui	Sulfoxycaprylicacid	1135452
7.00	299.06	C20H10O3	Non	Unknown	457414
11.65	519.14	C18H48OS8		Unknown	1817064
11.65	503.11	C26H30O2S4	Oui	3-[[4-[(2-hydroxy-3phenylsulfanylpropyl)sulfanyl	669726

				methyl] phenyl]methylsulfanyl]-2- phenylsulfanylpropanol	
13.36	593.16	C18H50N4O2S8	Non	Unkonown	603538
16.03	371.10	C27H16O3	Oui	Unkonown	345250

RT: temps de rétention. m/z meas: masse divise par numéro de charge . Ms Ms : spectrometrie de masse en tandem.

Tableau 7. Composition Chimique de *Cotula cinerea* analysée par GC/MS/QTOF

RT	Masse m/z	Formule	MsMs	Composé	Concentration en piques
2.08	141.00	C3H8O2S2	Oui	Ethylmethanethiosulfonate	1276890
2.67	90.06	C9H25N5O2S	Non	Unkonown	2695480
2.76	103.07	C5H10O2	Non	Valericacid	1013080
7.39	371.10	C16H22N2O4S2	Oui	Unkonown	1354770
9.3	429.09	C26H20O7	Non	Unkonown	1305750
13.92	371.10	C27H14O2	Non	Unkonown	444846
2.17	158.03	C6H9NO3S	Oui	N-Carboxy- methionineresidue	1180594
2.17	214.09	C10H15NO2S	Oui	N- Butylbenzenesulfonamide	2582920
2.6	89.06	C4H8O2	Non	Butanoicacid	15164068
2.64	61.03	C2H4O2	Non	Glycoaldehyde	7111304
3.38	214.09	C10H15NO2S	Oui	N- Butylbenzenesulfonamide	2397204
5.62	223.06	C8H16O6S	Oui	Sulfoxycaprylicacid	826624
7.16	115.07	C6H12O3	Non	Hydroxyhexanoicacid	73556
7.74	153.12	C10H16O	Non	Perilylalcool	928884
11.65	519.14	C18H48OS8		Unkonown	2336198
2.63	89.13	C3H7NO2	Non	D-Alanine D-2- Aminopropionic acid D- Ala	483048
2.64	89.18	C10H4CLF3O3	Non	4-Chloro-6- (trifluoromethoxy)-2H-1- benzopyran-2one	487288

Tableau 8. Composition Chimique de *Zygodhylum album* analysée par GC/MS/QTOF

RT	masse m/z	Formule	MsMs	Composé	Concentration en piques
2.67	90.06	C9H25N5O2S	Non	Unkonown	2859908
2.76	103.07	C5H10O2	Non	Valericacid	1187254
6.7	223.06	C10H10N2O4	Non	6,7- Dimethoxyquinazoline- 2,4(1H,3H)-dione	989984
7.39	355.07	C26H10O2	Non	Unkonown	716462
7.39	371.10	C27H14O2	Oui	Unkonown	1364260
8.15	223.06	C6H14N4S2	Non	Unkonown	375394
9.3	445.12	C26H20O7	Non	Artomunoxanthentrione	2905232
9.3	429.09	C26H20O7	Non	Unkonown	1273610
2.17	214.09	C10H15NO2S	Oui	N- Butylbenzenesulfonamide	2723912
2.64	61.03	C2H4O2	Non	Glycoaldehyde	7301578
2.76	61.03	C2H4O2	Non	Glycoaldehyde	4568174
3.38	214.09	C10H15NO2S	Oui	N- Butylbenzenesulfonamide	2646564
4.87	149.04	C6H6N4O2	Non	Methylxanthine	368104
5.62	223.06	C8H16O6S	Oui	Sulfoxycaprylicacid	1166926
7	299.06	C20H10O3	Non	Unkonown	479744
8.49	355.07	C26H12O3	Non	Unkonown	378396
13.36	593.16	C18H50N4O2S8	Non	Unkonown	709480

Pour l'espèce *Salsola foetida*, les composés identifiés sont: Valericacid, Artomunoxanthentrione, N-Carboxy-methionineresidue, Butanoicacid, Glycoaldehyde, Hydroxyanthraquinone, 3-[[4-[(2-hydroxy-3phenylsulfanylpropyl)sulfanylmethyl] phenyl]methylsulfanyl]-2-phenylsulfanylpropanolet Sulfoxycaprylicacid.

De plus, les métabolites, Valericacid, 6,7-Dimethoxyquinazoline-2,4(1H,3H)-dione, N-Butylbenzenesulfonamide, Glycoaldehyde, Methylxanthine et Sulfoxycaprylicacid ont été identifiés à partir de *Zygodhylum album*.

Ces résultats révèlent la présence de Valeric acid, Glycoaldehyde et Sulfoxycaprylicacid dans les trois plantes. Par ailleurs, les métabolites N-Carboxy-methionineresidue et Butanoicacid ont été identifiés uniquement pour les deux plantes, *Cotula cinerea* et *Salsola foetida*.

Nos résultats diffèrent des résultats de diverses recherches, entre autre celles présentées par Djellouli *et al.*, (2015) sur l'identification des principaux constituants des plantes médicinales. L'huile essentielle extraite des parties aériennes de *Cotula cinerea* analysée par GC/MS a montré que (E)-citral, limoneneepoxide cis-, thymol methylether, carvacrol, trans-carveol, carvone et trans-piperitol sont les principaux composés. A ce propos, Chouikh *et al.*, (2015) ont noté la présence de 3-carène, de thujone, de santolinatriene et de camphre à partir de l'huile extraite d'une espèce recueillie dans la région d' El Oued pendant la phase de floraison. Au total, 21 composés chimiques ont été obtenus au cours de la période de fructification avec la dominance de : Thujone, 3-Carène, Eucalyptol, Santolinatriene et de Camphre.

Des observations similaires ont été conduites pour l'analyse phytochimique de *Cotula cinerea* par GC/MS et ont montré que l'huile essentielle contient des trans thujone, santalinatriène, α - pinène, sabinene, cineole, δ - terpinene, camphre, β - terpineol et terpin-4-ol comme des composés majoritaires (BenAmor *et al.*, 2019). La caractérisation des flavanones chirales isolées de l'extrait de méthanol des parties aériennes de *Cotula cinerae* par des méthodes TLC a montré la présence de trois composés : hespéridine, hespéritine et eriodoctyol (Belboukhari *et al.*,2012). A ce propos, Guaouguaou *et al.*, (2018) ont remarqué que l'huile essentielle et l'extrait d'hexane de *Cotula cinerea* ont été utilisés dans la médecine traditionnelle marocaine comme source de produits anticancéreux puissants, en raison de leurs divers composés bioactifs. D'autres part, la composition chimique de *Cotula cinera* est dominée par la présence de monoterpènes oxygénés, suivis d'hydrocarbures monoterpéniques, de sesquiterpènes oxygénés et d'hydrocarbures sesquiterpéniques (Abdenbi *et al.*,2014 ; Djellouli *et al.*,2015, Fathy *et al.*,2017).

En outre, Ayad *et al.*, (2008) ont travaillé sur la purification et la séparation par différentes méthodes chromatographiques qui ont permis l'identification de deux nouveaux composés : le β -sitosterol et le 3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine isolés pour la première fois à partir des espèce du genre *Zygophyllum*.

L'investigation de Alturkistani *et al.*, (2017) a mis en évidence l'isolement de quatre composés à savoir : lupéol, β -sitostérol, acide ursolique et β -sitostérol-3-O-glucoside, à partir de l'extrait d'éther de pétrole de *salsola kali*, qui a été fractionné au moyen de différentes techniques chromatographiques : la chromatographie sur colonne et la chromatographie en couche mince.

III. 1.3. Analyse des métabolites par la HPLC/QTOF/ MS

Les résultats de l'analyse par la LC/MS sont reportés dans les tableaux de 9 à 11. Les composés identifiés par cette méthode diffèrent d'une espèce de plante à l'autre. Cependant il existe aussi des métabolites communs entre ces plantes.

Tableau 9. Composition chimique de *Salsola foetida* analysée par HPLC/MS/QTOF

RT	Masse m/z	Formule	Composé	Concentration en piques
3.67	12.00	C ₈ H ₉ N	Indoline	1541908
0.53	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N- Butylbenzensulfonamide	1164118
0.67	14.10	C ₆ H ₄ O ₂ S	Unkonown	5862760
0.65	15.80	C ₆ H ₇ NO ₂ S	Benzensulfonamide	8946392
0.77	23.90	C ₅ H ₁₁ N ₄ O ₃ PS	Unkonown	718604
0.83	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N- Butylbenzensulfonamide	1429952
0.93	21.70	C ₅ H ₁₀ N ₆ O ₅	Unkonown	883612
0.95	11.80	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Valine	7734742
1.54	13.00	C ₅ H ₇ NO ₃	Oxoproline	1044958
19.27	46.93	C ₃₁ H ₄₀ N ₄	Unkonown	770664
27.2	30.92	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	Unkonown	1321130
27.21	11.11	C ₈ H ₁₄	Unkonown	2538900
27.34	29.72	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	Unkonown	871582
29.71	23.60	C ₈ H ₉ N ₇ S	Unkonown	835324
30.01	47.73	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ S	Unkonown	2197596
31.16	14.90	C ₈ H ₆ O ₄	Unkonown	3996648
31.16	11.31	C ₈ H ₁₆	Unkonown	1106416

Tableau 10. Composition chimique de *Cotula cinerea* analysée par HPLC/MS/QTOF

RT	Masse m/z	Formule	Composé	Concentration en piques
0.53	23.60	C10H15NO2S	N- Butylbenzensulfonamide	1079142
0.95	11.80	C5H11NO2	Valine	848112
0.99	11.60	C5H9NO2	Proline	3689010
0.99	7.00	C4H7N	Pyrraline	1492858
1.07	13.00	C6H11NO2	Pipécolicacid	1280286
17.98	36.42	C21H25N5O	Unkonown	1263114
19.96	28.70	C15H10O6	7-Hydroxy-2_- methoxyflavone	946286
20.1	23.11	C15H20O3	Pechueloicacid	1348494
21.74	23.11	C15H20O3	Le meme ou un isomere d'un autre composé	841496
22.68	23.02	C14H31NO	N,N- DimethyldodecylamineN- oxide	800554
27.2	30.92	C17H26N4	Unkonown	1264496
27.21	11.11	C8H14	Unkonown	2463980
27.21	19.91	C12H22O2	Dodecalactone	691366
27.34	29.72	C16H34O3	Unkonown	891446
29.59	59.32	C34H36N6O4	Unkonown	1276048
29.71	23.60	C8H9N7S	Unkonown	759070
30.01	47.73	C26H54N4S	Dodecalactone	2114226
31.16	14.90	C8H6O4	Unkonown	3943376
31.16	11.31	C8H16	Unkonown	1100718

Tableau 11 . Composition chimique de *Zygothymus album* analysée par HPLC/MS/QTOF

RT	masse m/z	Formule	Composé	Concentration en piques
3.67	12.00	C ₈ H ₉ N	Indoline	1569076
0.53	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N- Butylbenzensulfonamide	1095342
0.66	21.40	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N- Butylbenzensulfonamide	3256300
0.67	14.10	C ₆ H ₄ O ₂ S	Unkonown	5753590
0.65	15.80	C ₆ H ₇ NO ₂ S	Benzensulfonamide	8481880
0.83	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Unkonown	1635992
0.99	7.00	C ₄ H ₇ N	Pyrroline	1052656
1.54	13.00	C ₅ H ₇ NO ₃	Oxoproline	1296618
1.54	8.40	C ₄ H ₅ NO	Methylisoxazole	741024
27.2	30.92	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	Unkonown	1233910
27.21	11.11	C ₈ H ₁₄	Unkonown	2375228
27.34	29.72	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	Unkonown	942180
29.71	23.60	C ₈ H ₉ N ₇ S	Unkonown	795450
30.01	47.73	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ S	Unkonown	2212080
31.16	14.90	C ₈ H ₆ O ₄	Unkonown	3973650
31.16	11.31	C ₈ H ₁₆	Unkonown	1095698

L'espèce, *Salsola foetida* comporte les métabolites: Indoline, N-Butylbenzen sulfonamide, Benzensulfonamide, valine, Oxoproline.

L'analyse de *Cotula cinerea* a déduit la présence des composés suivants: N Butylbenzenesulfonamide, Valine, Proline, Pyrroline, Pipecolicacid, 7-Hydroxy-2_-methoxyflavone, Pechueloic acid, N,N-DimethyldodecylamineN-oxide, Dodecalactone et Octene.

L'espèce *Zygothymus album* contient les composés ; Indoline, N-Butyl benzensulfonamide, Benzensulfonamide, Pyrroline, Oxoproline et Methylisoxazole. Nous déduisons que N-Butylbenzenesulfonamide est présent dans les trois plantes. La Valine a été identifiée pour *Salsola foetida* et *Cotula cinerea*. Par ailleurs, Indoline,

Benzensulfonamide et Oxoproline sont présents dans *S. foetida* et *Z. album*. Nous retenons que la Pyrroline est le seul composé commun pour *Z. album* et *C.cinerea*.

Selon les informations formulées par Shipeng *et al.*, (2021), les métabolites primaires et secondaires de *Salsola collina* ont été étudiés à l'aide de la chromatographie en phase liquide ultra-électrospray ionisation-spectrométrie de masse en tandem (UPLC/ESI/MS/MS). Les principaux composés identifiés sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lipides, les acides aminiques et les dérivés. Arafa *et al.*, (2011) notent deux nouveaux triterpènes qui ont été isolés de *Salsola imbricata* en Egypte. Leurs structures ont été établies comme 3-O-b-D-xylopyranosyl- (1 - 2)-O-b-D-glucuronopyranosyl-akebonicacid 28-O-b-D-glucopyranoside et 3-O-b-D-xylopyranosyl- (1 - 2)-O-b-D-glucuronopyranosyl-29-hydroxyoléanolic acid 28-O-b-D-glucopyranoside . En outre, un dépistage phytochimique de *Salsola imbricata* a été signalé et a montré la présence de triterpène (Hamed *et al.*, 2011, Uzma *et al.*,2014).

En outre, L'extraction des espèces de *Salsola vermiculata* et *Salsola tetrandia* par UPLC/PDA/ ESI-QTOF-MS a mis en évidence les métabolites en commun : Hydroxy octadecenoicacid, 9,12,13-Trihydroxy octadeca-7-enoic acid, N-Caffeoyl tyramine, Kaempferolpentosyldihexoside, O-pentosyl-O-linoleoylglycerol et Isorhamnetin-3-O-rutinoside (Rasheed *et al.*, 2013).

III. 1.4. Analyse des composés phénoliques

Les résultats de l'identification des composés phénoliques par HPLC/MS/QTOF en mode négatif sont illustrés dans le tableau 12.

Tableau 12. Composition chimique en composés phénoliques des trois plantes

RT	Masse m/z	Composés	Formules	<i>C.</i> <i>cinerea</i>	<i>S.</i> <i>foetida</i>	<i>Z.</i> <i>album</i>
26.48	311.2214	13-HPODE	C18H32O4	15868	17020	16446
1.01	213.02321	2-Deoxyribose 1-phosphate	C5H11O7P	3078	4110	4146
27.53	165.05139	3-Ethoxybenzoate	C9H10O3	6226	6648	8912
30.28	165.0516	3-Ethoxybenzoate	C9H10O3	3306	4598	7206
31.37	165.05137	3-Ethoxybenzoate	C9H10O3	3508	4460	7198
4.62	299.09611	5,7-Dimethoxy-4-hydroxyflavanone	C17H16O5	1644	8436	2880
9.26	161.09213	5-Hydroxylysine	C6H14N2O3	8996	11020	18550
12.7	161.09229	5-Hydroxylysine	C6H14N2O3	3076	2550	8656
0.84	112.99263	Acetylendicarboxylate	C4H2O4	62438	6378	3498

29.36	112.99296	Acetylendicarboxylate	C4H2O4	14310	15974	14988
29.9	112.99284	Acetylendicarboxylate	C4H2O4	12202	15772	13064
30.17	112.99275	Acetylendicarboxylate	C4H2O4	11576	14614	14550
10.84	159.07652	Daminozide	C6H12N2O3	7816	6206	4240
12.16	159.07675	Daminozide	C6H12N2O3	7130	1544	2740
10.4	239.07181	Dinoseb	C10H12N2O5	154148	264894	16094
26.06	165.05139	Ethionamide	C8H10N2S	32912	24094	31396
12.33	179.0499	Methioninesulfoximine	C5H12N2O3S	2372	90744	139568
14.13	173.09312	N-Acetylornithine	C7H14N2O3	35360	28128	22936
1.46	163.03522	p-coumaricacid	C9H8O3	5498	8248	5652
16.81	307.14177	Phenylbutazone	C19H20N2O2	24736	701314	1047730
31.4	522.35758	Phosphatidylcholine lyso	C26H54NO7P	7752	10596	8206
9.68	137.03268	p-Nitroaniline	C6H6N2O2	3332	10220	4230
16.14	137.03319	p-Nitroaniline	C6H6N2O2	12350	2896	3092
1.82	243.07818	Ribavirin	C8H12N4O5	28230	14640	17392
1.5	191.03216	Scopoletin	C10H8O4	757082	242828	396204
1.5	111.01579	Uracil	C4H4N2O2	89118	27438	45850
1.56	167.03167	Vanillicacid	C8H8O4	25796	16948	23816
1.01	175.03623	Carbamoylaspartate	C5H8N2O5	12300	4984	3010
1	207.0643	Benzyl succinate	C11H12O4	3032	10200	4458
1.01	243.07801	Biotin	C10H16N2O3S	5990	6134	5554
23.16	191.12003	Isoproturonmonodemethyl	C11H16N2O	15658	14362	14002

Les composés phénoliques en commun ont été identifiés pour les trois plantes testées comme suit: 13-HPODE, 2-Deoxyribose 1-phosphate, 3-Ethoxybenzoate, 5,7-Dimethoxy-4-hydroxyflavanone, 5-Hydroxylysine, Acetylendicarboxylate, Daminozide, Dinoseb, Ethionamide, Methioninesulfoximine, N-Acetylornithine, p-coumaricacid, Phenylbutazone, Phosphatidylcholine lyso 18:0, p-Nitroaniline, Ribavirin, Scopoletin, Uracil, Vanillicacid, Carbamoylaspartate, Benzyl succinate, Biotin et Isoproturonmonodemethyl. Ces métabolites sont présents dans les trois plantes en proportions différentes : chaque composé a une concentration différente pour chaque plante. Les résultats recueillis mettent en évidence la présence de différences quantitatives et qualitatives dans la composition chimique de ces plantes par rapport aux études antérieures sur les composés phénoliques.

Pour *Cotula cinerea*, différents flavonoïdes ont été isolés et qui sont : le 7-O-f3-β-glucoside, le 7-O-β-d-diglucoiside, et le 6-hydroxy-7-0-BDglucoside de lutéoline, la lutéoline, ainsi que l'apigénine 7-0a-β-rhamnoside. 6-C-arabinosyl-8-C-glucosylapigénine, isoxhafcocide. Ces flavonoïdes sont les principaux constituants de cette espèce. En outre, des composés de petites concentrations sont identifiés : 3-O-β-glucoside, 3-O-p-β-galactoside et 7-O-β-d-glucoside de quercétine ainsi que 5,3',4'-trihydroxy 3,6,7-triméthoxyflavone. De même des flavones glycosylés sont identifiés tels que : 5-0-glycosylés (Krishnoswwamy *et al*, 1968 ; Rodriguez *et al*, 1972 ; Bonisov *et al*, 1976 ; Ragaa *et al*, 1983).

Les flavonoides suivants : Scopoletin (Coumarin), bergabtol (Furanocoumarin), daphnoretin, bergaptol 5-O-Beta-D-glucopoyranoside (Furanocoumarin), daphnori, Chrysoeriol 7-O-Beta-D-glucopoyranoside (Flavone) ont été identifiés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Salsola baryosma* par la technique de chromatographie sur colonne (Ahmed *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus par (Syrchina *et al.*, 1992 : Xiang *et al.*, 2007), ont mis en évidence l'activité anti inflammatoire de six composés phénoliques isolés à partir du mélange méthanol-eau des feuilles de *Salsola foetida*. Ces six composés phénoliques sont :isorhamnetin-3-O-β-D-glucuronyl (1''→4'')-β-D-glucuronicacid , isorhamnetin-3-O-β-D-digluconatedimethyl ester, isorhamnetin-3-O-β-D-galactopyranoside, isorhamnetin-3-O-β-D-glucopyranoside, isorhamnetin, *N-trans*-feruloyltyramine.

Shehab *et al.*, (2014) ont identifié des acides phénoliques et flavonoïdes à partir de l'extrait méthanol-eau par la méthode de HPLC PR. Les métabolites les plus abondants sont : Quercitrin, Coumaricacid ,Rosmarinicacid. De même, l'isorhamnetin-3-O-β-D-glucuronyl (1 '' → 4 '') glucuronide , Dimethyl ester;isorhamnetin-3-O-β-D-di glucuronate dimethyl ester, Tow isorhamnetin glycosides: Isorhamnetin-3-O-β-D-galactopyranoside, Isorhamnetin: Isorhamnetin-3-O-β-D-galactopyranoside, Isorhamnetin, Trans N-feruloyltyramine, p-hydroxy benzoicacid,ferulicacid, Isovanillicacid. Ces 9 composés phénoliques ont été extraits à partir de *Salsola foetida* (Osman *et al.*, 2016).

Khan *et al.*, (2003) ont noté l'identification de trois nouveaux composés phénoliques chez *Salsola foetida*:N-[2-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxyéthyl]-3-(4-méthoxyphényl) prop-2-énamide,N-[2-(3,4-dihydroxyphényl)-2-hydroxyéthyl]-3-(3,4-diméthoxyphényl) prop-2-énamide et N-[2-(3-hydroxy-4-méthoxyphényl) -2- hydroxyéthyl] 3-(4-méthoxyphényl)

-prop-2-énamide. Ces résultats sont en accord avec diverses études (Tundis *et al.*,2007 ; Lee *et al.*,2012 ; Asif *et al.*,2016, Ghorab *et al.*,2017, Zhao *et al.*,2020).

A cela s'ajoute de nouveaux triterpénoïdes saponines isolés à partir des racines de *Zygophyllum coccineum* et des parties aériennes de *Z. album* et de *Z. dumosum*, et qui sont : 3-O-[fl-D-2-O-sulfonylquinovopyranosyl], quinovicacid, 27-O-[fl-D-glucopyranosyl].

L'analyse chimique par LC-ESI-TOF-MS a détecté trois flavonoïdes à partir de la partie aérienne de *Z. album* : Isorhamnetin-3-O-rutinoside, Malvidin 3-rhamnoside et quercitin 3-sulfate (Ksouri *et al*, 2013). Cependant, les composés phénoliques : acide 3-O-β-D-quinovopyranosyl-quinovic, 28-β-D-glucopyranosyl ester et 3-O-[β-D-2-O-sulfonyl quinovopyranosyl]-quinovic, acid-27-O-[βD-glucopyranosyl] et l'ester zygophyloside F ont été déjà décrits par (Hassaneen *et al*,1993 ; Elgamal *et al*,1995) chez l'espèce en question. De plus, les études effectuées par (Belguidoum *et al.*, 2015 ; Kchaou *et al*, 2016) confirment la présence des composés phénoliques dans la composition de l'espèce *Z. album*.

III.2. Activité insecticide des extraits de plantes testées

III.2.1. Etude de l'activité insecticide sur les adultes de *Callosobruchus maculatus* par contact

L'effet insecticide a été évalué à partir des trois plantes spontanées : *S. foetida*, *Z. album* et *C. cinerea* à l'égard de l'insecte ravageur *Callosobruchus maculatus*. Les résultats des tableaux de 13 à 16, et les figures 25 à 30 regroupent les effets insecticides des trois extraits à base d'éthanol. Ces derniers exposent une toxicité remarquable pour le traitement contre la bruche de niébé.

Tableau 13. Mortalité moyenne des adultes de *C. maculatus* traités par les extraits de *Salsola foetida*.

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,5000 (a)	0,00	1,00
D1	11,5000(b)	9,00	14,00
D2	15,1667(c)	11,00	18,00
D3	18,8333(d)	18,00	20,00
D4	20,0000(d)	20,00	20,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 14. Mortalité moyenne des adultes de *C.maculatus* traités par les extraits de *Cotula cinerea*

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,5000(a)	0,00	1,00
D1	5,8333(b)	3,00	10,00
D2	8,5000(b)	5,00	13,00
D3	15,0000(c)	9,00	19,00
D4	18,1667(c)	16,00	20,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 15. Mortalité moyenne des adultes de *C. maculatus* traités par les extraits de *Zygophyllum album*

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,5000(a)	0,00	1,00
D1	5,1667(b)	2,00	7,00
D2	8,0000(c)	6,00	10,00
D3	9,3333(cd)	8,00	12,00
D4	10,6667(d)	9,00	13,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 16. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour le traitement des adultes de la bruche

Extraits des plantes	R ²	DL50
<i>Salsola foetida</i>	0.948	6.35
<i>Cotula cinerea</i>	0.980	12.55
<i>Zygophyllum album</i>	0.944	36.59

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

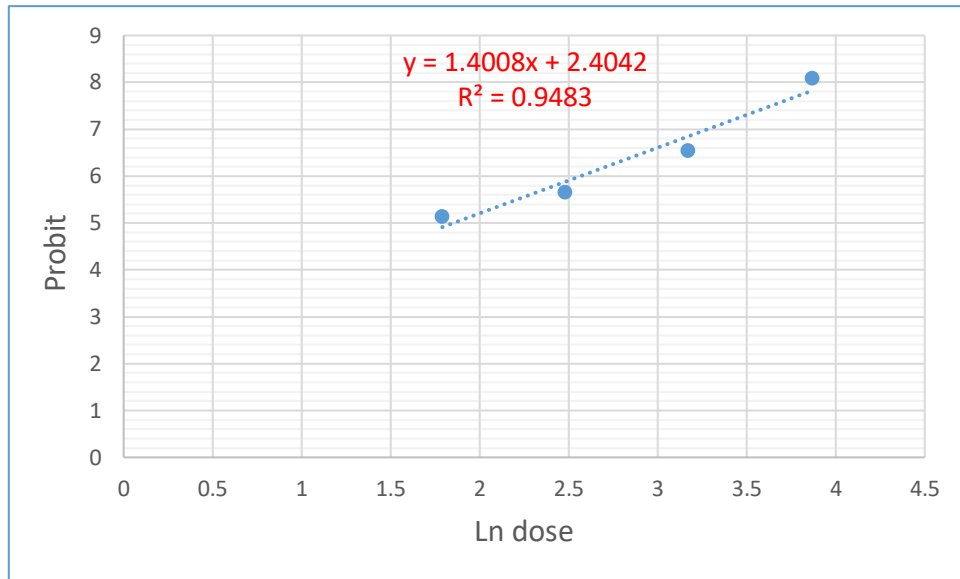


Figure 19. Droite de régression pour le traitement des adultes de *C.maculatus* par *S.foetida*

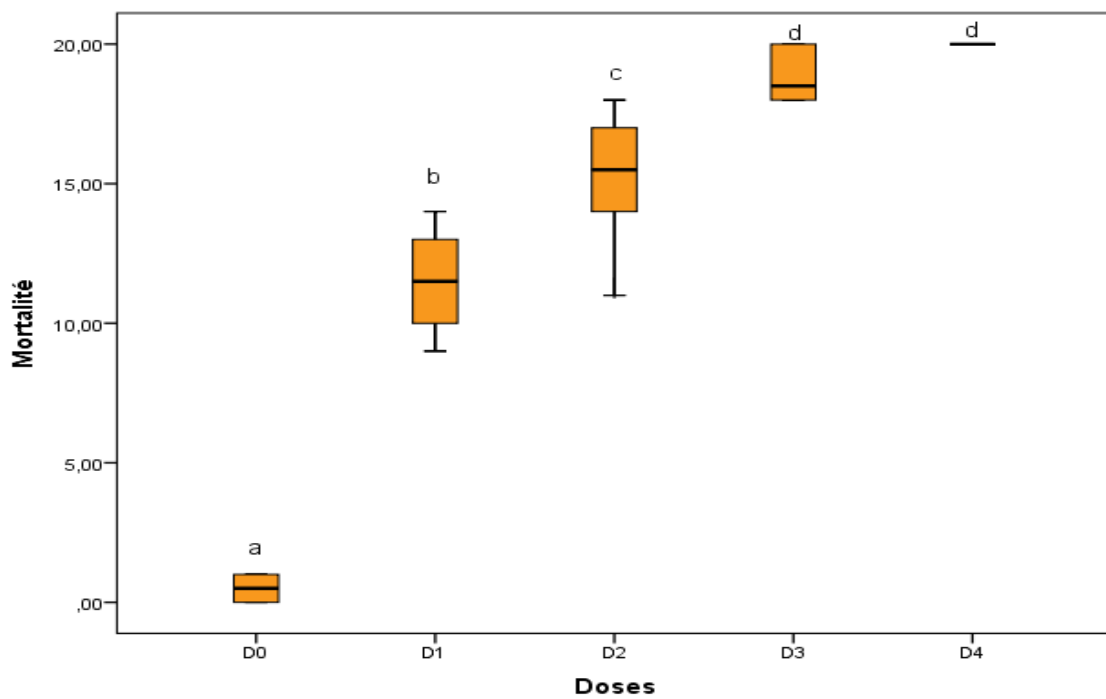


Figure 20. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait de *S.foetida* sur les adultes de *C.maculatus*

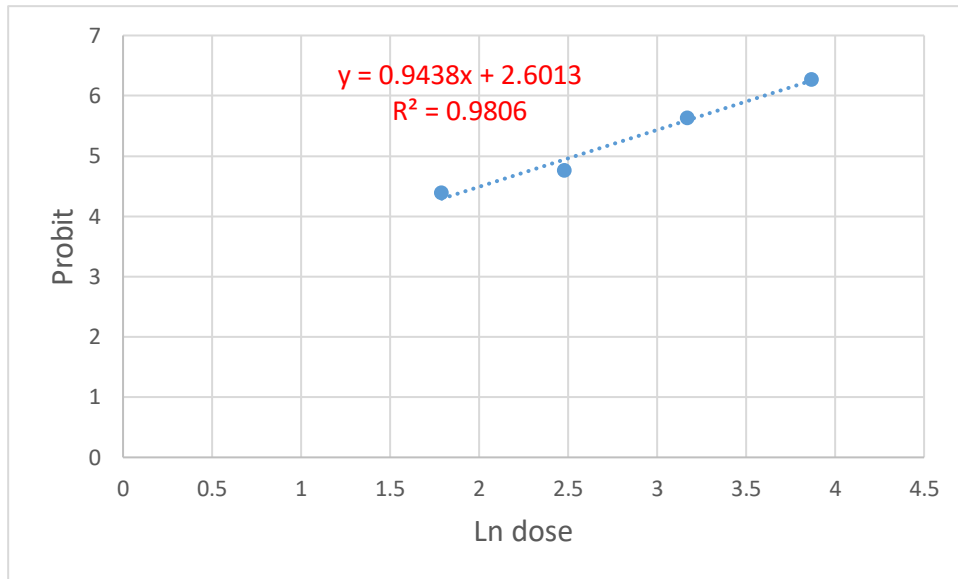


Figure 21. Droite de régression pour le traitement des adultes de *C.maculatus* par l'extrait de *C.cinerea*

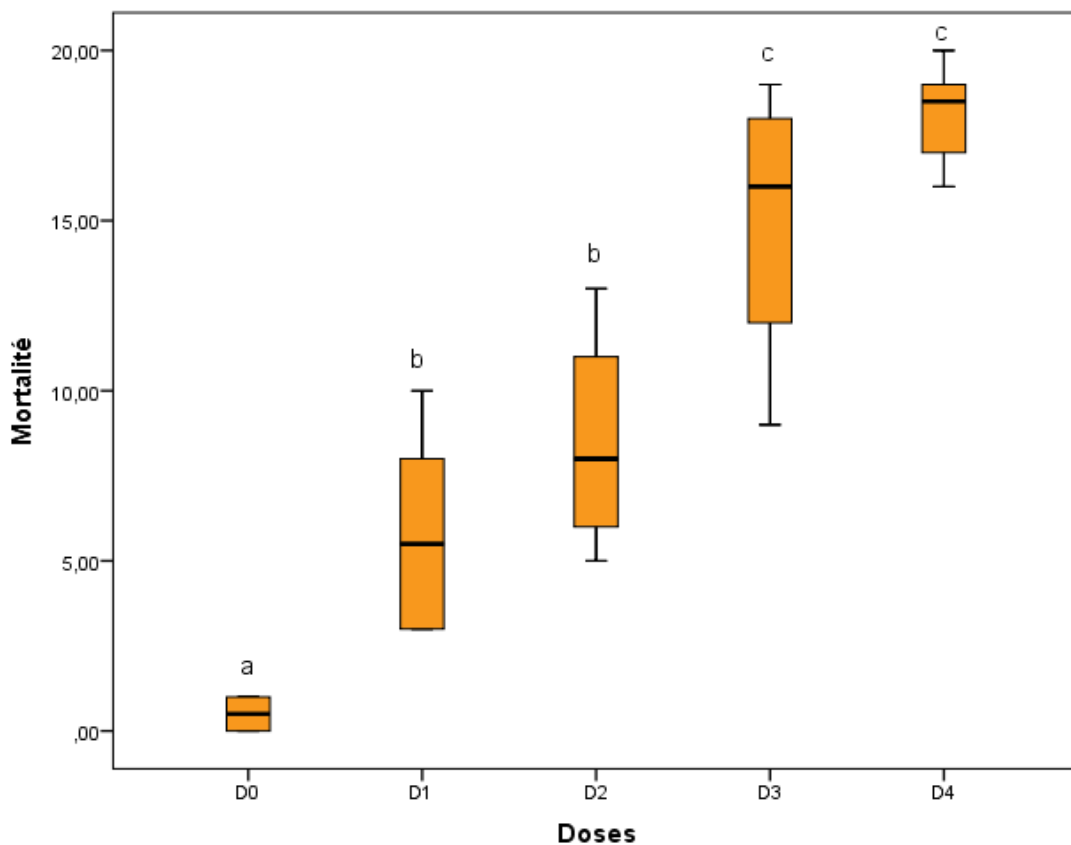


Figure 22. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de de *C. cinerea* sur les adultes de *C.maculatus*

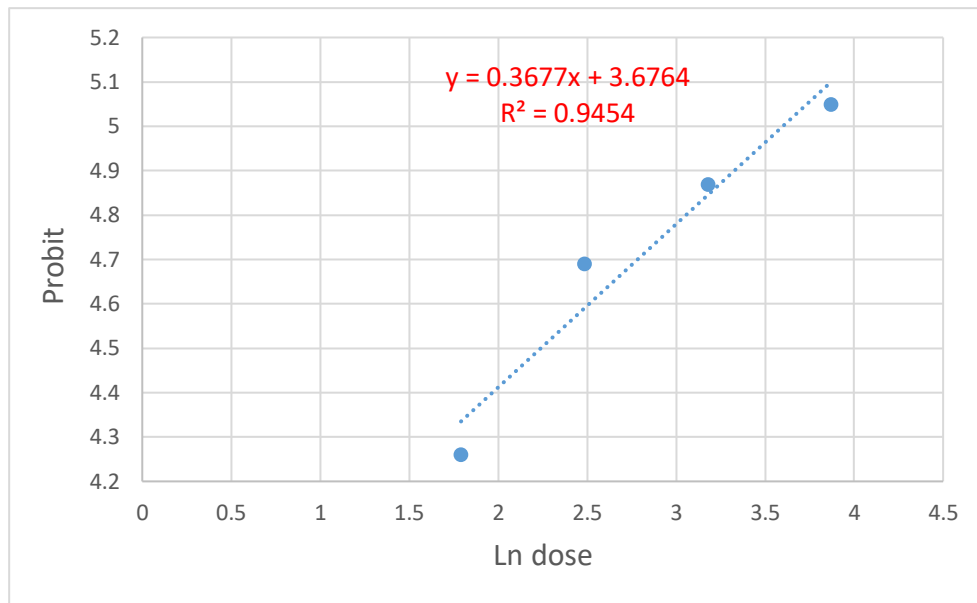


Figure 23. Droite de régression pour le traitement des adultes de *C.maculatus* par l'extrait de *Z. album*

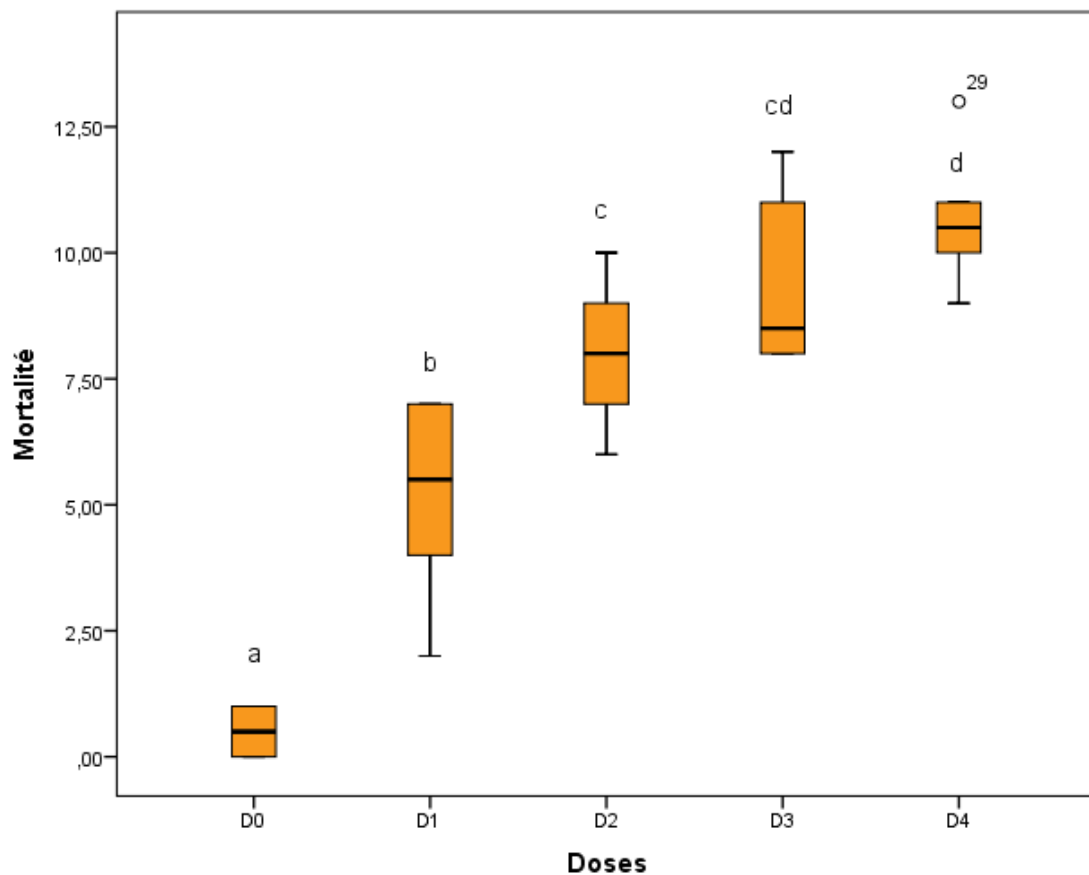


Figure 24. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Z. album* sur les adultes de *C.maculatus*

L'allure des courbes des mortalités corrigées des trois extraits est consignée dans la figure 25.

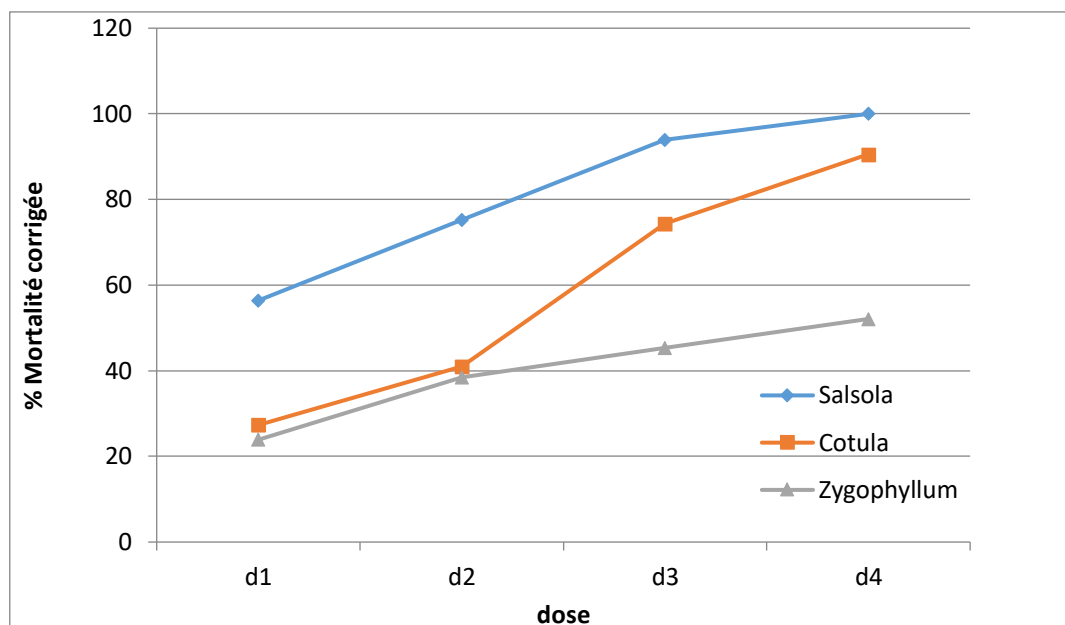


Figure 25. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre *Callosobruchus maculatus*

L'évaluation de l'activité insecticide des trois extraits éthanoliques est exprimée par les courbes des mortalités corrigées des adultes de *C. maculatus* soumis pour différentes durées d'expositions aux concentrations croissantes d'extraits. Les résultats ont montré que le pourcentage de mortalité dépend de l'espèce de la plante, de la concentration et de la période d'exposition. L'examen des données du tableau 13 indique la présence de 4 groupes hétérogènes : a, b, c et d dont le groupe d présente les deux doses d3 et d4 qui ont le même effet. La mortalité des adultes par contact de *Salsola foetida* a atteint un pourcentage de 100% pour la dose 48 mg/ml après les 72 heures de traitement, ce qui constitue la valeur la plus élevée entre les trois plantes. A la dose de 24 mg/ml, le taux de mortalité corrigée s'élève à 90%. Par contre, le traitement par la dose 12 mg/ml a enregistré une valeur de 75%. La toxicité exercée par la dose 6 mg/ml est de 56%. Cependant, les taux restent très différents de ceux du témoin.

Par contre, le traitement par *Cotula cinerea* a montré qu'après 48 h les pourcentages de mortalité des adultes de *C. maculatus* sont de l'ordre de : 30, 43, 56 et de 85 % respectivement pour les doses 6, 12, 24 et 48 mg/ml. Les données du tableau 14 montrent

la présence de 3 groupes hétérogènes : a, b et c dont le groupe b présente les deux doses d1 et d2 qui ont le même effet et le groupe c présente les deux doses d3 et d4.

L'évaluation de l'activité insecticide de *Zygophyllum album* est exprimée par les courbes des mortalités corrigées des adultes de *C. maculatus* en fonction des différentes doses croissantes. Les résultats montrent que les pourcentages de mortalité après 48h ont atteint les valeurs suivantes : 32, 35, 44 et 60% respectivement pour les doses 6, 12, 24 et 48 mg/ml. Le tableau 15 illustre 4 groupes hétérogènes : a, b, c et d dont le groupe b présente la dose d1 et le groupe b présente la dose d2, les groupes c et d présentent les deux doses d3 et d4 qui ont le même effet.

Il est nécessaire de vérifier si les données obtenues suivent une loi normale. Cet examen permet alors de choisir le test d'hypothèse le plus approprié. Selon le test Tukey, les analyses statistiques montrent qu'il existe une différence très hautement significative ($p= 0.0001^{***}$) entre la mortalité chez les lots témoins et les lots traités par chacun des trois extraits. Le boxplot de la mortalité des adultes de *C. maculatus* en fonction des doses de traitement, montre que la toxicité varie d'une dose à une autre. D'après les résultats de la détermination de l'efficacité de chaque traitement, les valeurs de DL50 des trois plantes ont été déduites à partir des droites de régression : 6,35 mg/ml pour *Salsola foetida*, 12,55mg/ml pour *Cotula cinerea* et de 36,59 mg/ml pour *Zygophyllum album* (tableau 16). L'évaluation de l'activité insecticide des plantes est exprimée par les courbes de la mortalité corrigée en fonction des probits.

Nos résultats corroborent les résultats antérieurs de Guerebis *et al.*, (2020) en termes de performance des métabolites testés (Inuloxines A, B et C et acide α costique). Une réaction rapide, provoquant une mortalité complète (100 %) des adultes de la bruche du niébé un jour seulement après l'exposition à la concentration la plus élevée (5 μ l/ml). Dans le même contexte, les taux de mortalité sur *Callosobruchus chinensis* L sont de 27% et 30% après 1 à 2 jours, respectivement, après le traitement. L'extrait des parties aériennes de l'*Inula racemosa* Hook a provoqué un taux de mortalité de 66,59% de *C. chinensis* infestant les graines de pois chiches après une journée d'exposition à l'extrait testé appliqué à une dose allant jusqu'à 2 % (Chandel et Singh, 2017).

En ce qui concerne le traitement par le Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) de *C. maculatus* Paranagama *et al.*, 2003 ont rapporté que les extraits de feuilles de neem appliqués à une concentration de 3, 8 g/l permettent d'obtenir une mortalité complète des adultes de *C.*

maculatus au 3^{ème} jour du traitement. En outre, la bio-activité de plusieurs huiles végétales a été rapportée par de nombreux auteurs comme Mustafa *et al* (2011), Silva *et al.* (2012), Uddin et Sanuzi (2013), Aboul Habou *et al.* (2014) et Wahedi *et al.* (2015). Ces huiles végétales présentent des effets très significatifs sur la mortalité des adultes de *C. maculatus* et surtout aux doses 1 et 1,5ml/10g de graines de niébé.

La répulsivité des huiles essentielles de *Citrus reticulata*, *Citrus limon* et *Citrus aurantium* a été évaluée contre les adultes de *C. maculatus*. Un effet significatif répulsif a été noté par l'huile de *Cirtus reticulata* à une concentration de 7µl/l d'air par rapport aux autres extraits (Saeidi *et al.*, 2011).

II.2. 2. Etude de l'activité insecticide sur la fécondité des adultes de *Callosobruchus maculatus*

Les résultats illustrés dans les tableaux 17 à 19 indiquent que les trois espèces de plantes ont un pouvoir sur la diminution de la fécondité des femelles de la bruche. Le nombre moyen des œufs pondus pour *Salsola foetida* de l'ordre de 7,8, pour le traitement à la concentration 6,35 mg/ml contre 426,21 œufs pour les témoins. Pour *Cotula cinerea*, la moyenne de fécondité soit 68,05 pour la dose 12,55mg/ml par rapport au témoin qui est de l'ordre de 479,11. Le nombre moyen des œufs pondus par les femelles traitées par *Zygophyllum album* soit 192,61 pour la dose 36,59 mg/ml contre 428,01 pour les témoins.

D'autres part, les tableaux 17,18 et 19 indiquent que les extraits éthanoliques des trois plantes réduisent le taux de fécondité des femelles de *C. maculatus*. En outre, on remarque que la réduction de la fécondité est enregistrée à la concentration DL50 soit 98.16%, 85.79% et 54.99% par rapport au témoin respectivement pour *Salsola*, *Cotula* et *Zygophyllum*. Les résultats montrent que les valeurs de r sont négatives : la corrélation est négative ce qui signifie que la dépendance est forte avec la fécondité. Plus la dose augmente plus la fécondité diminue. Le facteur dose agit d'une manière hautement significative sur le nombre d'œufs pondus par la bruche du niébé. Ceci est approuvé par le test de Kruskal-Wallis avec une p-value >0.01.

Tableau 17. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de *C.maculatus* traités par *Salsola foetida*

Paramètres	Doses	Moyenne	Min	Max	Les valeurs R et p	Taux de réduction (%)
Fécondité	D0(T)	426,21	324,2	501,20	R=-0.976	98,16
	D1(DL50)	7,83	5,50	11,60	p=0.0001**	
Fertilité	D0 (T)	97,233	95,50	98,00	R= -0.999	89,08
	D1 (DL50)	10,616	87,0	13,60	p=0.0001**	
Emergence de la F1	D0(T)	93,1667	87,40	99,30	R= -0.996	90,65
	D1 (DL50)	8,7167	6,30	10,90	p= 0.000**	

** La corrélation est significative au seuil 0,01.

A ce sujet, plusieurs auteurs mettent que les doses sub-létales d'huiles essentielles réduisaient la durée de vie adulte de *C. maculatus* et diminuaient la fécondité des femelles (Ketoh *et al.*, 2002 ; Dugravot *et al.*, 2002). Ces derniers ont souligné l'importance de la présence de feuilles de *Boscia senegalensis* qui libèrent du méthylisotiocyane (MITC) qui pourrait avoir un impact sur le nombre de *C. maculatus*. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Mustafa *et al* (2011), Silva *et al.* (2012), Uddin et Sanuzi (2013), Abdoul Habou *et al.* (2014) et Wahedi *et al.* (2015). Selon Credland (1992) et Lienard *et al.* (1993), l'huile d'olive, l'acide oléique, l'acide linoléique et le mélange des 4 acides gras testés ont manifesté une activité ovicide marquée des femelles de la bruche du niébé. En outre, Nyamador (2009), Le traitement avec des doses inférieures ou égales à 20 µl, de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* a provoqué la rétention des œufs par incapacité physique d'oviposition des femelles de *Callosobruchus subinnotatus*.

III.2. 3. Etude de l'activité insecticide sur la fertilité des adultes de *Callosobruchus maculatus*

Les valeurs des fécondités comparées à celles des éclosions des œufs, montrent que la dose létale 50 agit de manière hautement significative sur la viabilité des œufs. Ceci est prouvé par le test de Kruskal-Wallis avec une p-value >0,01, ce qui veut dire qu'il ya une forte dépendance entre le paramètre éclosion des œufs et la dose testée et indique une corrélation négative. Dans les lots témoins, le nombre moyen d'œufs éclos est de 10,61 pour *Salsola*, une valeur de 60,65 pour *Cotula* et de 70,25 pour *Zygophyllum*.

Les taux de réduction des œufs pondus par les femelles traitées par les trois extraits s'élèvent à : 89,08%, à 37,18% et à 27,07% respectivement pour *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*.

Tableau 18. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de *C.maculatus* traités par *Cotula cinerea*

Paramètres	Doses	Moyenne	Min	Max	Les valeurs de R et p	Taux de réduction (%)
Fécondité	D0(T)	479,1167	433,80	510.10	R= -0.99**	85.79
	D1(DL50)	68,0500	63,50	72.10	p=0,0001	
Fertilité	D0 (T)	96,5500	91,70	98.10	R=-0,98**	37.18
	D1(DL50)	60,6500	55,20	66.40	p =0.0001	
Emergence de la F1	D0(T)	98,1500	95,70	99.50	R=-0.95**	34.58
	D1(DL50)	64,2000	51,40	69.50	P=0.0001	

** La corrélation est significative au seuil 0,01

Ces résultats concordent avec ceux obtenus par (Tripathi *et al.*, 2000; Garcia *et al.*,2003; Nawrot et Harmatha 2012; Aliyu *et al.*, 2014; Russo *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2018) et témoignent que les sesquiterpènes exercent un large éventail d'effets sur les insectes nuisibles des denrées stockés, notamment, des activités répulsives et dissuasives, ainsi qu'une inhibition de la reproduction par des effets ovicides et larvicides. Pannuti *et al.* (2012) ont testé les poudres de *C. ambrosioides* L. et *P. nigrum* et ont relevé une diminution de l'oviposition et de l'émergence chez *C. maculatus*.

III.2. 4. Etude de l'activité insecticide sur l'émergence de la F1de *Callosobruchus maculatus*

Il est à rappeler que les valeurs moyennes des émergences de la descendance sont de 8,71, de 64,2 et de 76,4 respectivement pour *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album* qui sont consignées dans les tableaux précédents (tableaux 17 à 19).

Les résultats indiquent que le traitement par extrait de *Salsola foetida* réduit de façon significative les émergences de *C. maculatus*, comparativement à la série témoin (93,16 adultes). Le test de Kruskal-Wallis, avec une p-value très proche de zéro indique d'ailleurs une forte dépendance avec la descendance (la corrélation est négative). Le traitement par

les deux plantes *Cotula foetida* et *Zygophyllum album* agit de façon significative sur l'émergence des adultes par rapport au témoin.

Les résultats regroupés dans les tableaux montrent des taux de réduction de la F1 significative par rapport au témoin pour les trois traitements. Les valeurs obtenues sont de 90.65, de 34,58 et de 16,11%, respectivement pour *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*.

Tableau 19. Effet de la DL50 sur les paramètres de fécondité de *C.maculatus* traités par *Zygophyllum album*

Paramètres	Doses	Moyenne	Min	Max	Les valeurs de R et p	Taux de réduction
Fécondité	D0(T)	428.0167	360.000	500.000	R= -0.898** p=0,000	54.99%
	D1(DL50)	192.6167	100.30	276.70		
Fertilité	D0 (T)	96.3333	92.00	98.00	R= -0,910** p=0.0001	27.07%
	D1(DL50)	70.2500	59.50	83.00		
Emergence de la F1	D0(T)	91.0833	87.00	94.00	R=-0,852** p= 0,0001	16.11%
	D1(DL50)	76.4000	66.00	85.00		

** La corrélation est significative au seuil 0.01.

De nombreux chercheurs ont mis en évidence l'efficacité des extraits de plantes à l'égard de la bruche du niébé.(Raja *et al.*, 2001 ; Boeke *et al.*, 2004 ; Rahman *et Talukder*, 2006 ; Demnati *et Allache*, 2014).Osekre *et Ayertey* (2002) mentionnent que les huiles de coco, de palme et de frytol, appliquées aux doses de 4, de 6, et de 10 ml/kg de niébé, n'affectent pas la longévité, mais réduisent les pontes et les émergences de *C. maculatus*. D'après Kellouche (2005), la réduction des descendants de la première génération de *C. maculatus* est supérieure à 90% dans les traitements réalisés avec l'huile d'olive de 1ère et 2ème pression. De plus, les résultats de traitement par les métabolites purs de *D.viscosa*, ont montré que l'émergence de la génération F1 de *Callosobruchus maculatus* est significativement réduite (Guerebis *et al.*, 2020). La toxicité de l'huile essentielle d'*A. judaica* a été démontré contre *Callosobruchus maculatus* en utilisant une gamme de tests (fumigation, répulsion, éclosion d'oeufs, émergence d'adultes...) (Abd-Elhady, 2012). Selon Ghoneîm *et al.* (2012), les extraits d'une *Zygophyllaceae* spontanée du désert

égyptien, pourraient produire un biopesticide prometteur pour le contrôle des populations de *Schistocerca gregaria*.

Autrement, les extraits que nous avons testés sont riches en substances naturelles et qui ont un effet toxique sur les adultes de *Callosobruchus maculatus*. effectivement, ce qui démontre l'efficacité de ces substances qui serait la conséquence de leur richesse en composés phénoliques.

III.2. 5. Etude de l'activité insecticide sur les adultes de *Tribolium castaneum* par contact

Les tableaux de 20 à 22 montrent l'évaluation du taux de mortalité des individus de tribolium rouge de la farine par rapport aux quatre doses, pour chaque extrait testé. Les courbes de régression des probits en fonction des logs doses de chaque extrait sont présentées dans les figures 27 ,29 et 31. La toxicité des extraits éthanoliques de la partie aérienne des trois plantes est exprimée en DL50 (tableau 23). Globalement, les extraits ont montré leurs efficacités contre le ravageur secondaire des stocks.

Tableau 20. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par l'extrait *Salsola foetida* (effet contact)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,1667(a)	0,00	1,00
D1	7,3333 (b)	5,00	10,00
D2	13,6667 (c)	11,00	16,00
D3	17,1667 (d)	15,00	19,00
D4	19,6667 (e)	19,00	20,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 21. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par *Cotula cinerea* (effet contact)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,0000(a)	0,00	0,00
D1	6,1667(b)	2,00	9,00
D2	8,8333 (bc)	7,00	11,00
D3	11,1667 (c)	9,00	15,00
D4	17,1667(d)	15,00	19,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 22. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par *Zygophyllum album* (effet contact)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,0000 (a)	0,00	0,00
D1	4,5000(b)	3,00	5,00
D2	7,1667 (c)	5,00	9,00
D3	9,3333 (d)	6,00	11,00
D4	11,8333(e)	10,00	14,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 23. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour l'effet contact sur *Tribolium castaneum*

Extrait de plante	R ²	DL50
<i>Salsola foetida</i>	0.990	13.87
<i>Cotula cinerea</i>	0.927	23.57
<i>Zygophyllum album</i>	0.997	48.42

Les résultats de notre étude montrent clairement que le pourcentage de mortalité est proportionnel aux doses testées, et ceci quel que soit l'extrait exploité. De plus, l'analyse de la variance et la comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05 pour l'effet insecticide des extraits par contact est hautement significative $Pr < 0,0001$ (Tableaux 20 à 22). L'efficacité des traitements par l'analyse de la variance et la séparation des groupes a démontré que la différence est hautement significative, c'est à dire que les doses ont un effet sur la mortalité des adultes. En effet, l'extrait éthanolique de *Salsola foetida* démontre la présence de 5 groupes hétérogènes : a,b,c,d,e respectivement pour les doses : d0, d1, d2, d3,d4. Par ailleurs, le traitement par *Cotula cinerea* dévoile 4 groupes hétérogènes : d0 présente le groupe a, d1 et d2 ayant le même effet présente le groupe b, d3 présente le groupe c et la d4 présente le groupe d. Les résultats de la toxicité par *Zygophyllum album* ont révélé la présence de 5 groupes hétérogènes ;a,b,c,d,e respectivement pour les doses qui se suivent : d0,d1, d2, d3,d4 (fig 26, 28 et 30). D'autres part, la susceptibilité aux extraits éthanoliques a été exprimée par la dose létale 50 comme suit:13,87, 23,57 et 48,42 mg/ml respectivement pour les trois plantes *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*. L'extrait de *Salsola foetida*

est hautement toxique pour *Tribolium castaneum*, entraînant une mortalité corrigée de 97% en 48h à une dose de 80 mg/ml. En revanche, à la même dose et au même temps d'exposition, les extraits de *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album* ont provoqué respectivement des taux de mortalité de 83% et de 60% (Fig.32).

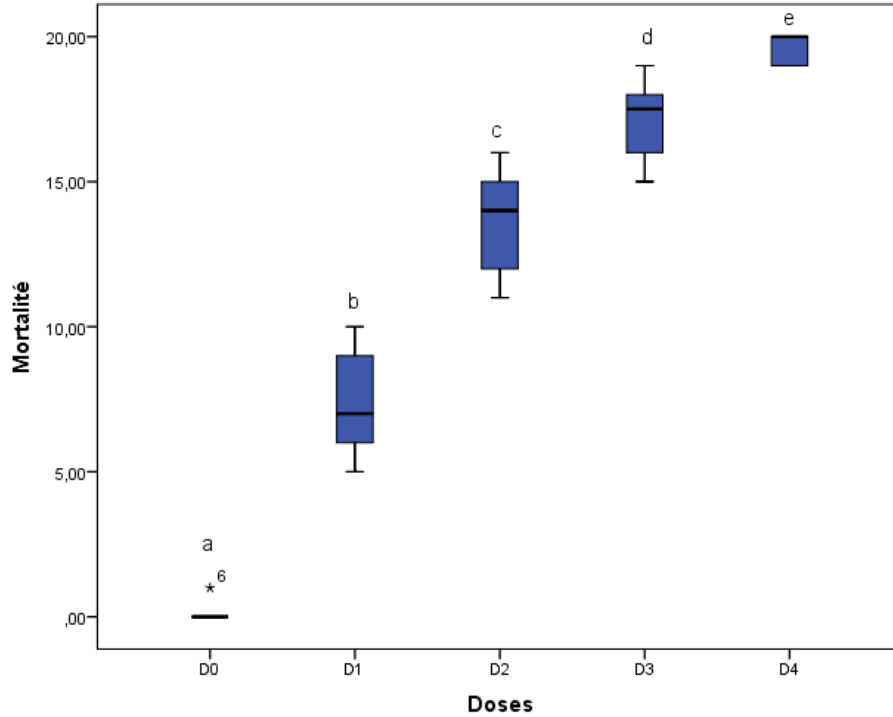


Figure 26. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Salsola foetida* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet contact)

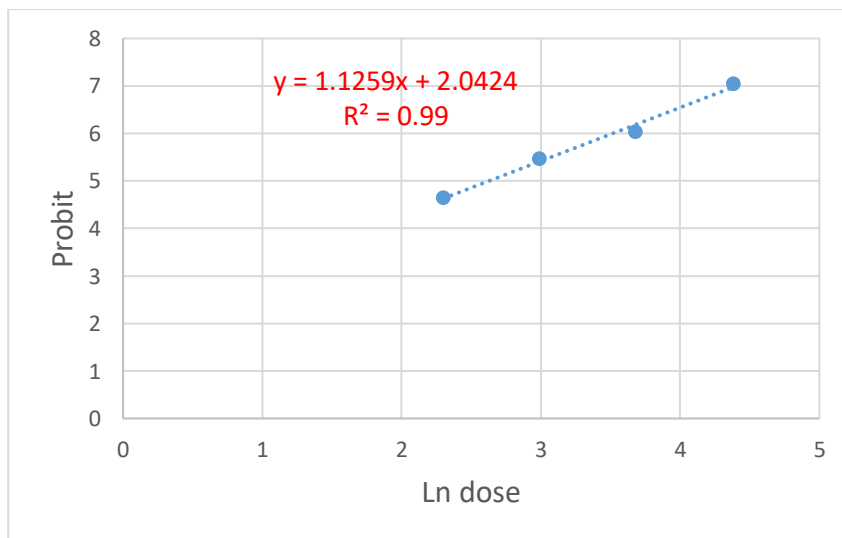


Figure 27. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de *Salsola foetida* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet contact)

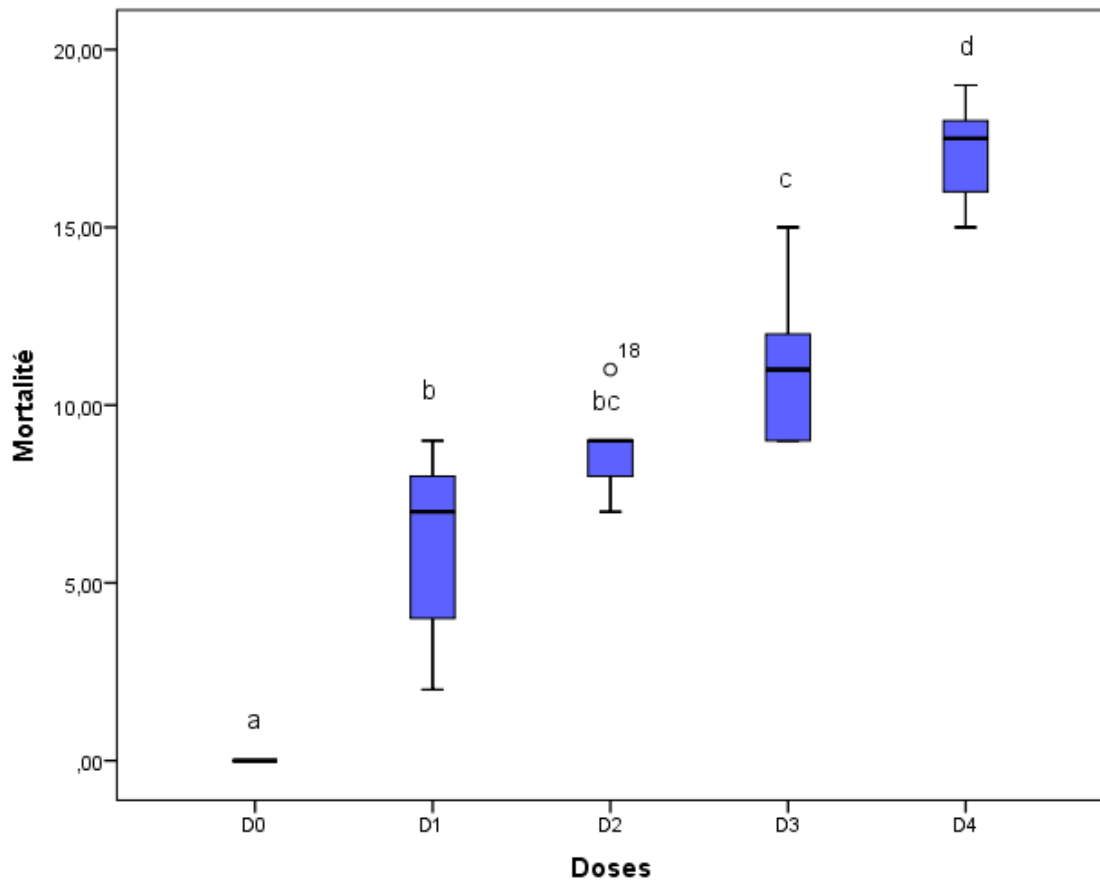


Figure 28. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Cotula cinerea* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet contact)

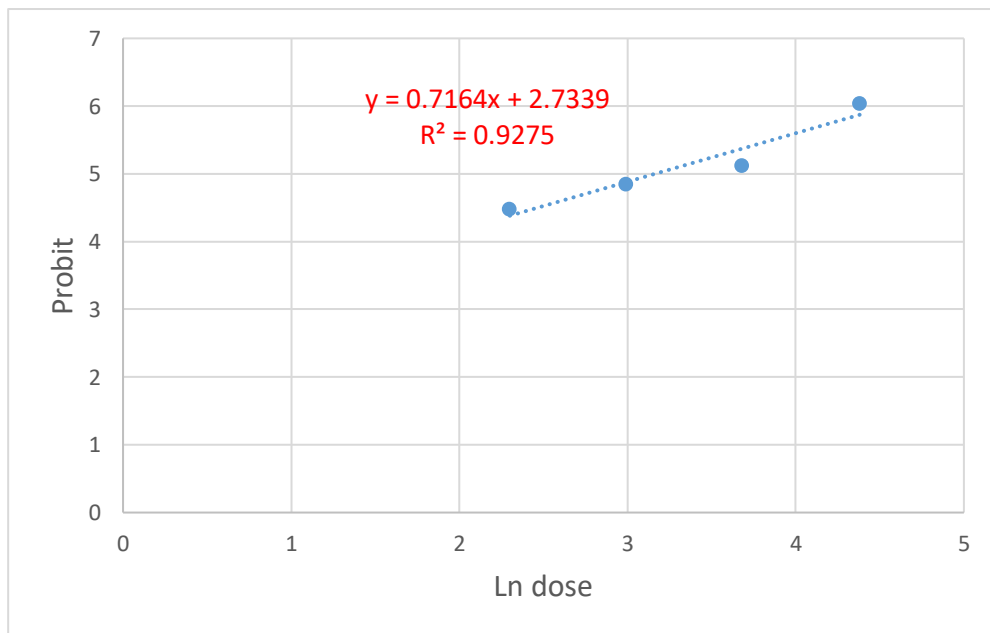


Figure 29. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de *Cotula cinerea* sur les adultes de *Tribolium castaneum*

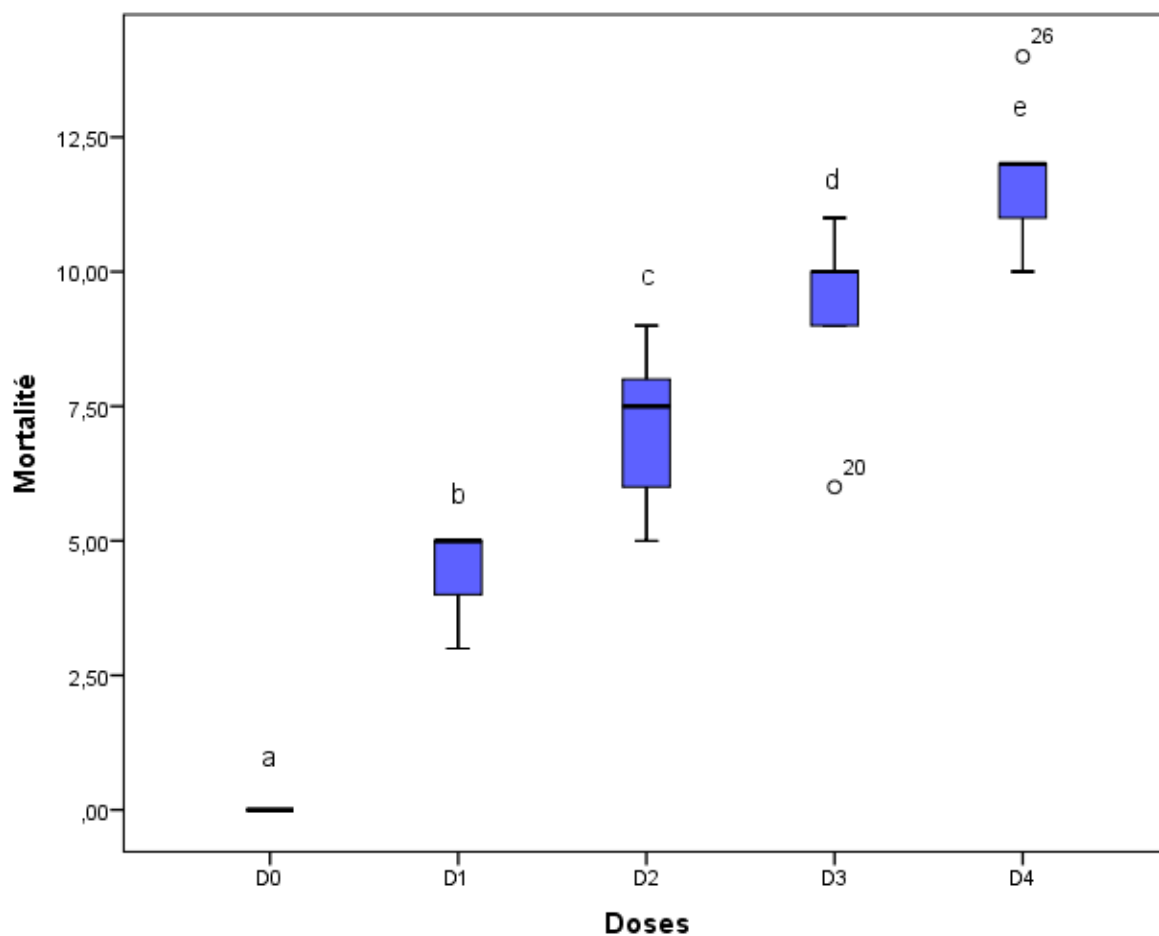


Figure 30. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Zygothymus album* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet contact)

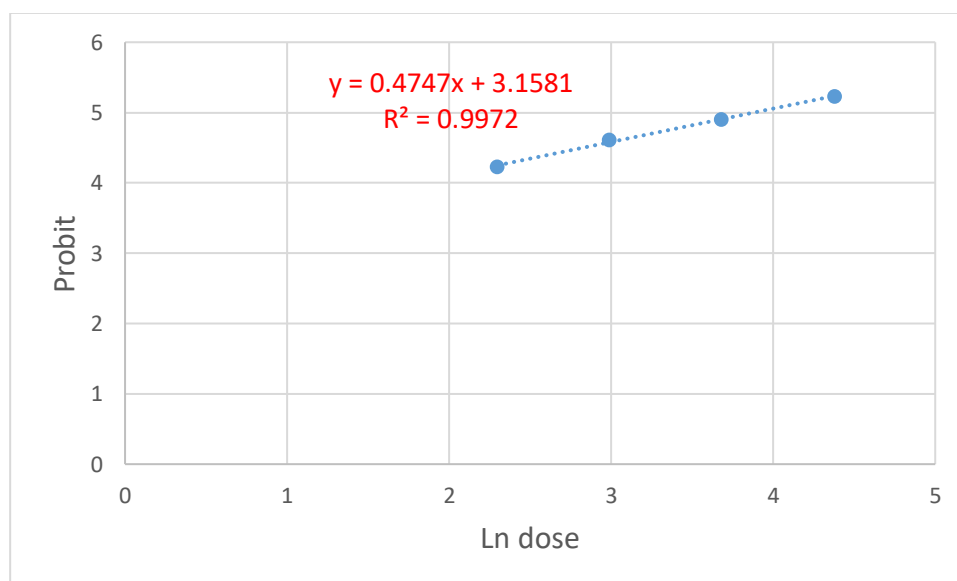


Figure 31. Droite de régression de l'effet insecticide par contact de *Zygothymus album* sur les adultes de *Tribolium castaneum*

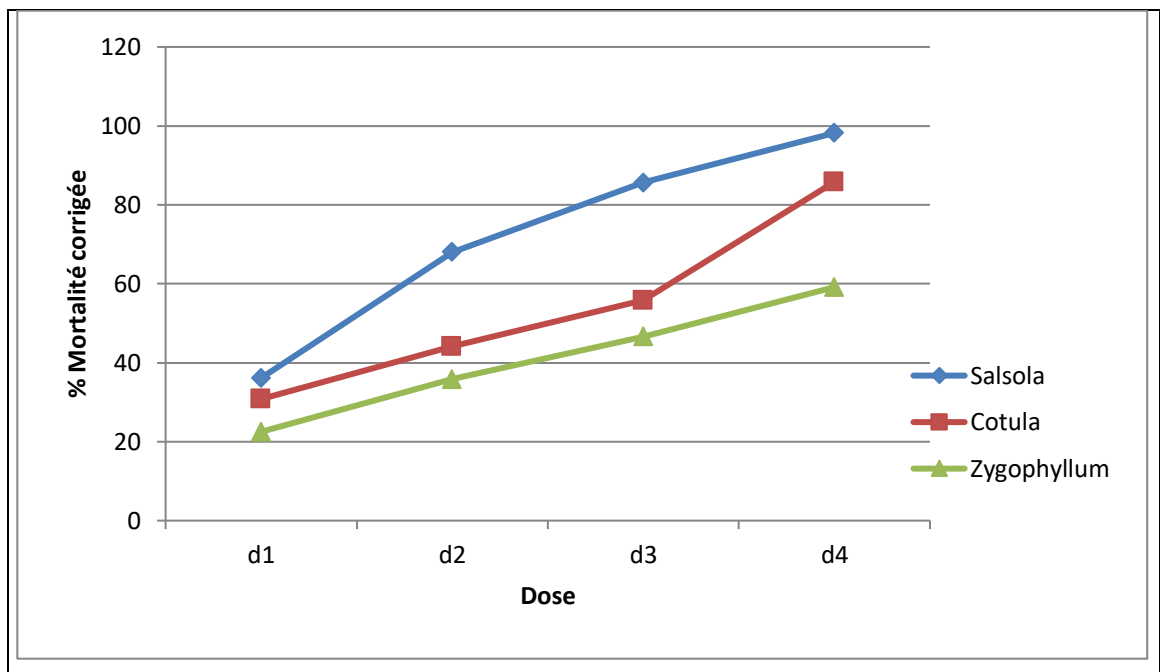


Figure 32. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre *Tribolium castaneum* par contact

A ce propos des recherches conduites sur l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* engendre une mortalité de 100% sur la population traitée de *Tribolium castaneum*. Ce pourcentage de mortalité est atteint au bout de moins 10 jours. L'estimation de la concentration d'efficacité 50 (CE50) montre le fort effet insecticide de ces préparations vis-à-vis des imagos de *Tribolium castaneum* (Kemassi *et al.*, 2019). L'évaluation de l'effet répulsif et insecticide de l'extrait éthanolique brut de *Limoniastrum guyonianum* contre les adultes du tribolium rouge de la farine a montré que la dose la plus élevée (800 µg/insecte) présente un effet répulsif remarquable de l'ordre de $90,14 \pm 2,5\%$ après 4 h d'exposition. L'extrait brut s'est montré toxique pour les adultes de *T. castaneum* et la DL50 correspondante était de 218,3 µg/insecte (Acheuk *et al.*, 2017). De même, les résultats de l'étude entamée par Tarigan *et al.*, (2016) indiquent que l'huile essentielle de la cannelle exerce une activité insecticide conséquente. Cette efficacité se traduit par l'effet remarquable sur les œufs, les larves et les adultes de *Tribolium castaneum* avec les valeurs de DL50 de : 1,051%, de 0,109%, et de 1,239%.

Garcia *et al.* (2005) déterminent que ce sont les groupements hydroxyle, contenus dans l' α terpinéol, le pulégol et le gérmacrol, qui sont imputés de l'activité insecticide vis-à-vis de *Tribolium castaneum*.

III.2. 6. Etude de l'activité insecticide sur les adultes de *Tribolium castaneum* par ingestion

L'effet des trois extraits sur les adultes de *Tribolium castaneum* a été évalué par le mode ingestion. Ce test montre que les moyennes de mortalité des adultes sont de l'ordre de : 19,66 pour *salsola foetida*, de 17,16 pour *Cotula cinerea* et de 11,83 pour *Zygophyllum album*. Les résultats illustrés dans le tableau 27 montrent les valeurs de DL50 pour chaque traitement. Elles sont similaires pour les deux effets contact et ingestion et sont de l'ordre de: 13,87 mg/ml pour *Salsola foetida*, 23.57 mg/ml pour *cotula cinerea* et de 48.42mg/ml pour *Zygophyllum album* (Figures 34, 36 et 38). Les mortalités corrigées en fonction des doses pour les trois plantes sont de l'ordre de : 98,85, et de 60% respectivement pour *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album* traitées à la plus forte dose de 80 mg/ml (Fig. 39).

Tableau 24. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par *Salsola foetida*(effet ingestion)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,0000 (a)	0,00	0,00
D1	8,6667(b)	7,00	11,00
D2	12,1667(c)	10,00	14,00
D3	16,0000 (d)	12,00	18,00
D4	19,6667(e)	18,00	20,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 25. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par *Cotula cinerea* (effet ingestion)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,1667(a)	0,00	1,00
D1	6,5000(b)	4,00	9,00
D2	8,6667 (b)	7,00	11,00
D3	13,1667(c)	11,00	15,00
D4	16,8333(d)	15,00	19,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 26. Mortalité moyenne des adultes de *Tribolium castaneum* traités par *Zygophyllum album* (effet ingestion)

Doses	Moyenne	Minimum	Maximum
D0	0,0000(a)	0,00	0,00
D1	4,3333(b)	2,00	6,00
D2	6,8333(c)	5,00	8,00
D3	11,3333 (d)	9,00	13,00
D4	11,8333(d)	9,00	13,00

Comparaison des groupes du test POST HOC (TUKEY HSD) au seuil de 0,05

Tableau 27. Les valeurs de la DL50 pour chaque extrait de plante pour l'effet ingestion sur *Tribolium castaneum*

Extrait de plante	R ²	DL50
<i>Salsola foetida</i>	0.990	13.87
<i>Cotula cinerea</i>	0.927	23.57
<i>Zygophyllum album</i>	0.997	48.42

Les résultats de l'analyse de la variance pour la toxicité des trois plantes testées sont exprimés par les tableaux 24 à 26 et par les figures 33,35 et 37. Ces derniers démontrent la présence de 5 groupes hétérogènes pour *Salsola foetida*, 4 groupes hétérogènes pour *Cotula cinerea* dont les deux doses d1 et d2 ont le même effet et constituent le groupe b, et 4 groupes aussi pour *Zygophyllum album* dont les doses d3 et d4 constituent un seul groupe d.

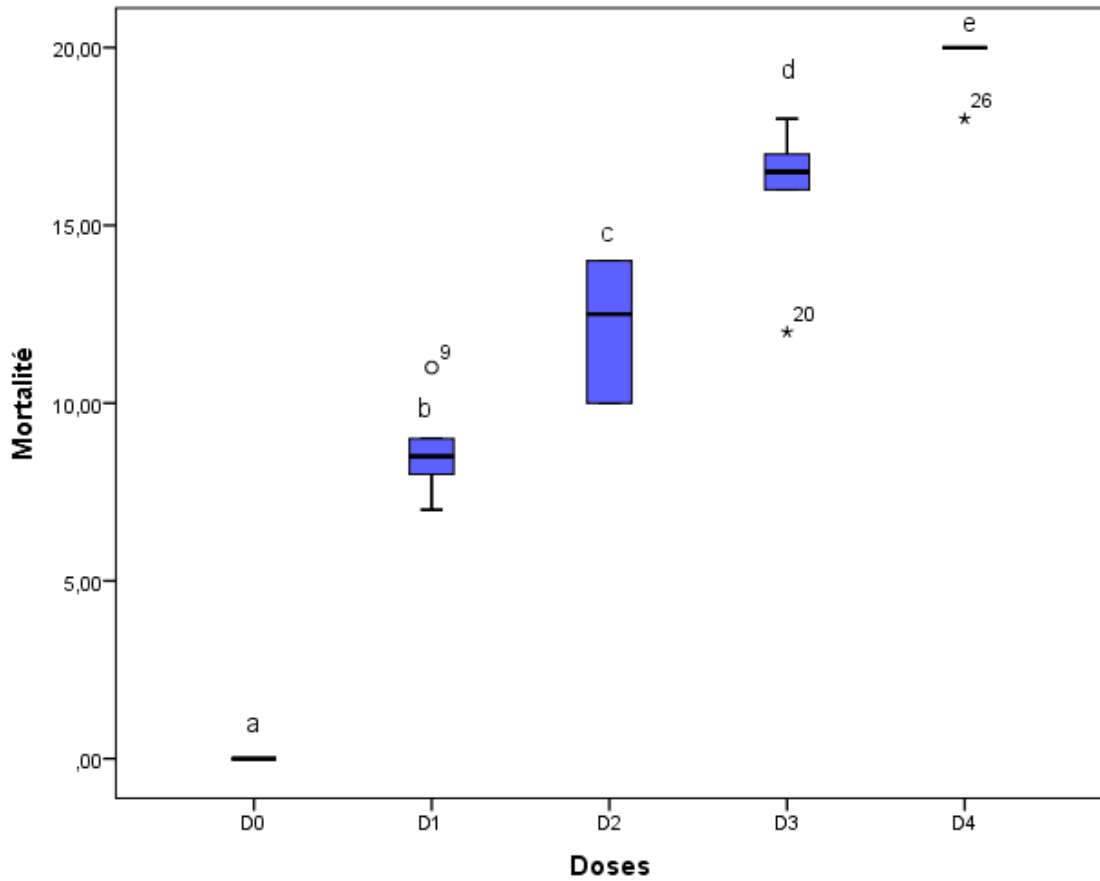


Figure 33. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Salsola foetida* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet ingestion)

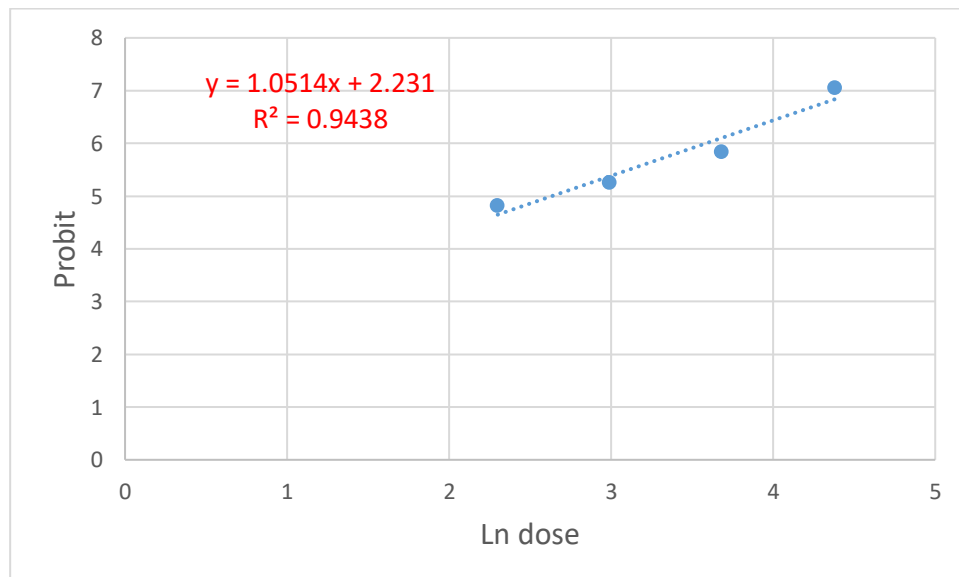


Figure 34. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de *Salsola foetida* sur les adultes de *Tribolium castaneum*

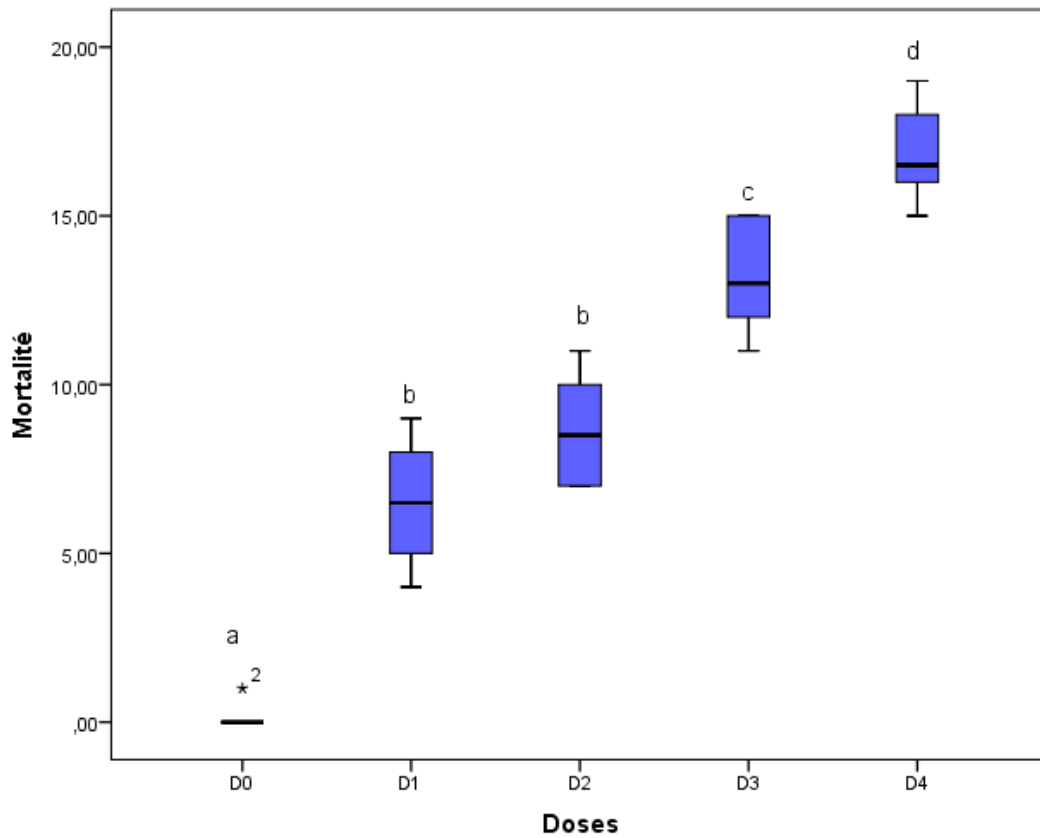


Figure 35. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Cotula cinerea* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet ingestion)

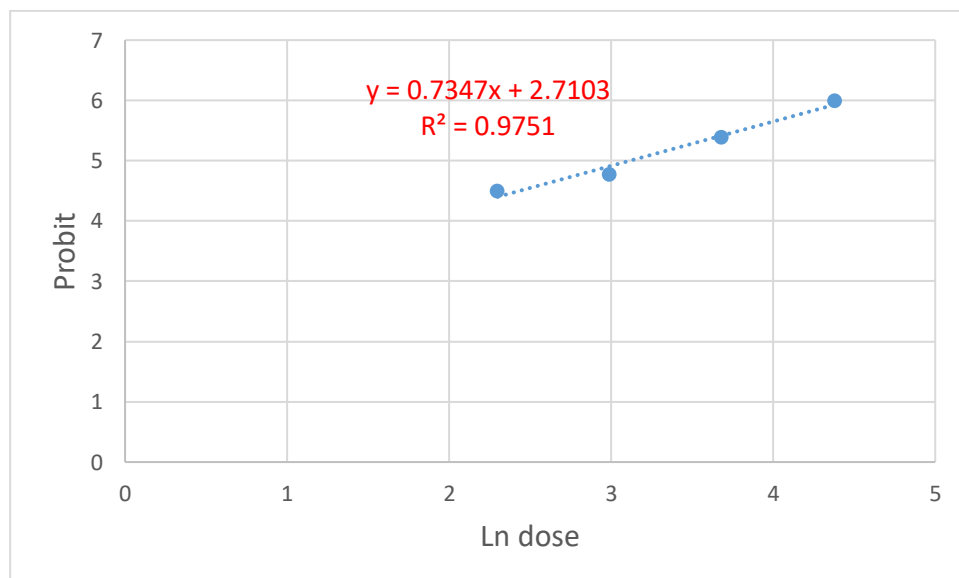


Figure 36. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de *Cotula cinerea* sur les adultes de *Tribolium castaneum*

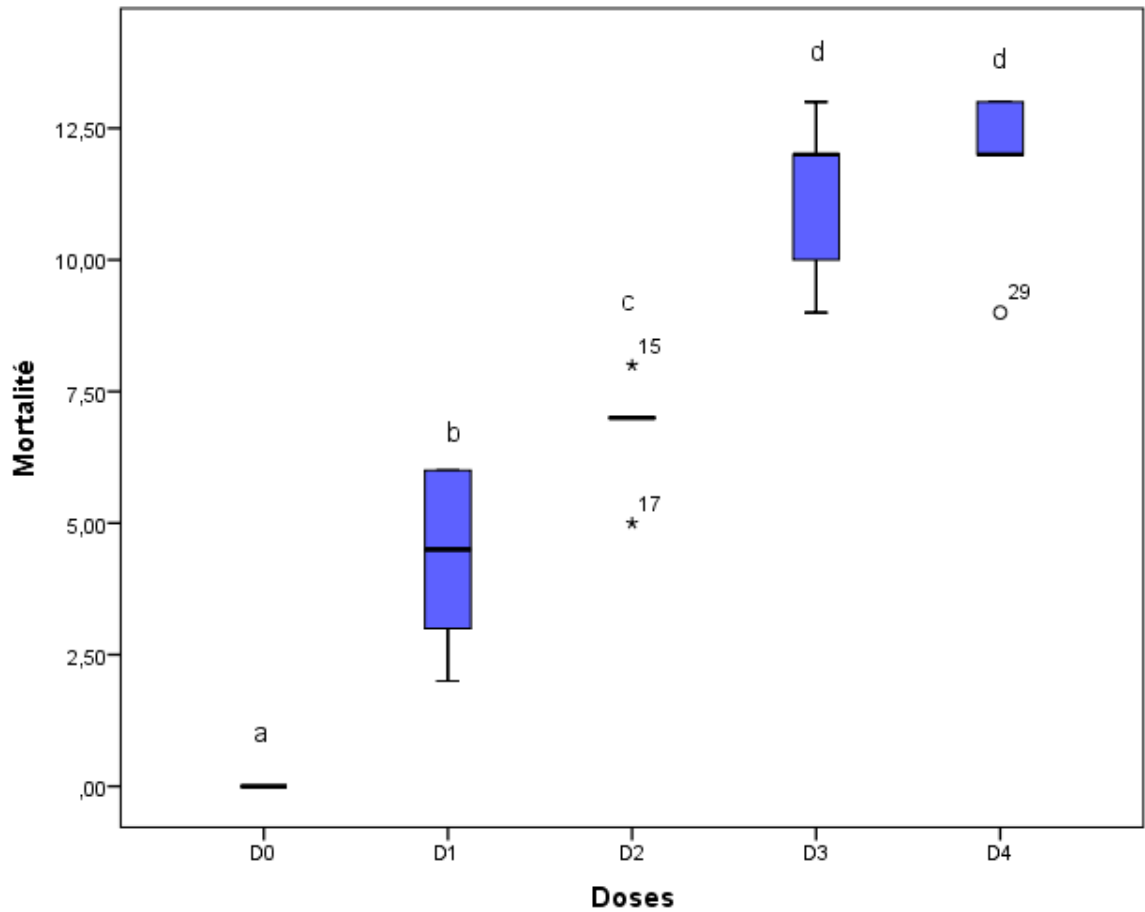


Figure 37. Analyse croisée entre la mortalité et les doses, cas de l'extrait par *Zygothymus album* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet ingestion)

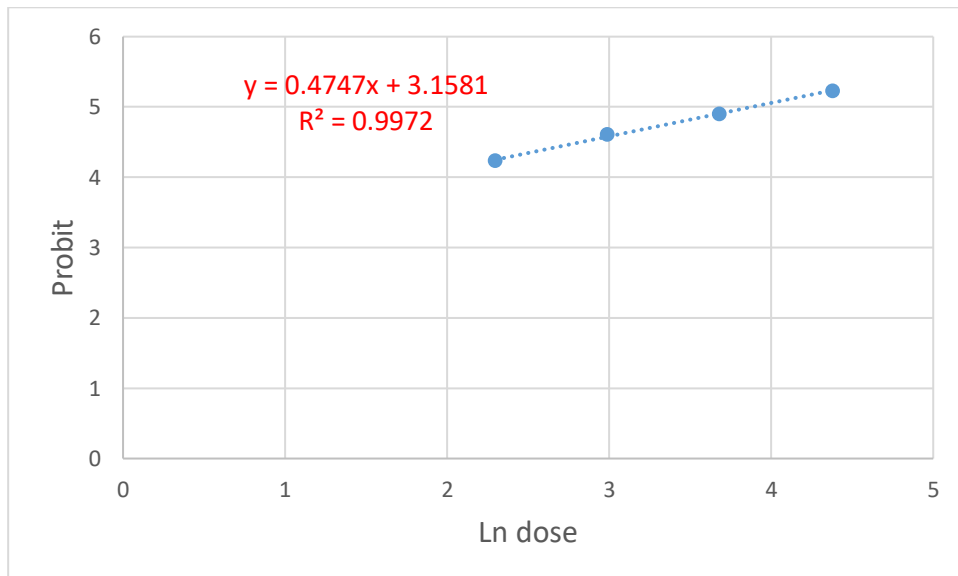


Figure 38. Droite de régression de l'effet insecticide par ingestion de *Zygothymus album* sur les adultes de *Tribolium castaneum* (effet ingestion)

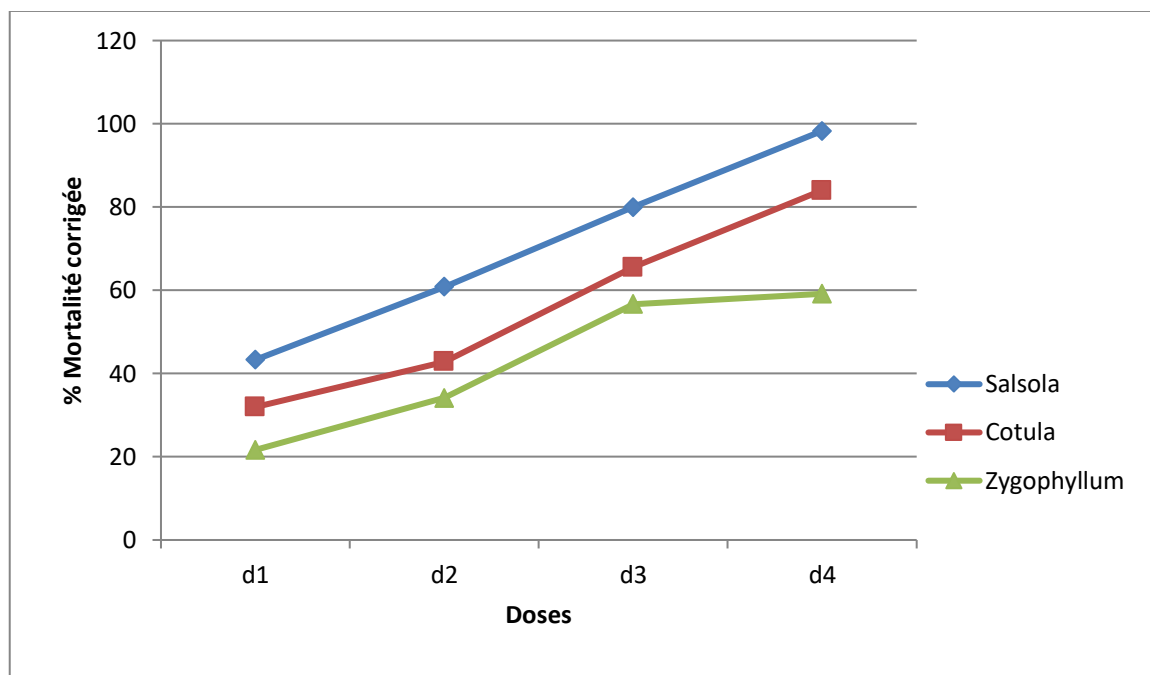


Figure 39. Mortalité corrigée en fonction des doses pour les trois plantes testées contre *Tribolium castaneum* par ingestion

Nos résultats sont en accord avec ceux de Gandhi *et al.*, (2010) qui ont montré que la fumigation moyennant les huiles essentielles de feuilles de *Punica granatum* et *Murraya koenigii* induisent un retard dans le développement et une réduction significative des populations de *Tribolium castaneum*. En outre, l'extrait éthanolique de l'écorce de *Punica granatum* a été testé contre *Tribolium* rouge de la farine par ingestion. Les mortalités les plus élevées notées sont de l'ordre de 56%. L'extrait a aussi montré un effet anti appétant et une activité répulsive (Ben Hamouda *et al.*, 2014). En outre, Lee *et al.* (2003) ont testé l'action de terpénoïdes sur *Tribolium castaneum*, et ont montré que le cinéol, le l- fenchone et le pulégone, à la concentration de 50 µg/ml air, ont exprimé une mortalité de 100% et ont déduit que les cétones sont les monoterpènes plus toxiques. L'huile essentielle de *J. phoenicea* a été dévisagée en tant qu'agent anti-appétant et insecticide contre *Tribolium confusum* (Bouzouita *et al.*, 2008).

Des études faites par Goławska *et al.* (2008) affirment que le refus des plantes aux attaques d'insectes peut être liée à la présence de flavonoïdes, et persuadent que les six aglycones de flavanols identifiées pendant leurs travaux de recherche (quercétine, kaempferol+RCO-, kaempferol, tricine, apigenine+RCO- et apigenine) sont imputés de l'effet répulsif et accablant contre *Acyrtosiphon pisum* (le puceron vert du pois). Dans la même optique,

Mierziak *et al.* (2014) rapportent que les flavonoïdes peuvent agir comme étant des agents stimulants ou inhibants pour contrôler l'oviposition chez les insectes.

III.3.L'activité antibiotique des sesquiterpènes lactones isolés de *Cotula cinerea* contre de *Enterococcus faecalis*

L'extrait organique de *C. cinerea* a été obtenu par différents solvants (*n*-hexane, CH₂Cl₂ et EtOAc), a été testé à une concentration seule forte sur *Staphylococcus aureus* ATCC 29231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 747 par test de microdilution de bouillon standard pour évaluer l'inhibition de la croissance bactérienne. Parmi les extraits, seulement l'extrait de CH₂Cl₂ a montré une activité antibactérienne (Tab.28), par une inhibition de la croissance des souches de Gram-positif testées avec un pourcentage de 49%±2,7 d'inhibition pour *S. aureus* et de 90%±1,5 pour *E.faecalis*.

Tableau 28. Activité antibactérienne de l'extrait de CH₂Cl₂ (500 µg/mL)

Souches	% d'inhibition par l'extrait de CH ₂ Cl ₂
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	49± 2.7
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	90±1.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.d.
<i>A. baumannii</i> ATCC 747	n.d.

L'activité antibactérienne est exprimé en pourcentage d'inhibition de croissance ± l'écartype(SD), contre les souches Gram-positif et Gram-négatif testées (n.d. = inhibition non détectée)

Markouk *et al.* (1999) ont constaté que l'extrait de *n*-butanol de *C. cinerea* était efficace contre les souches phytopathogéniques de *Pseudomonas* et *Bacillus*. Le même extrait était aussi efficace contre les isolats cliniques de *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. aureus* (Bensizerara *et al.* , 2013). Ghouti *et al.* (2018) ont testé l'extrait hydroéthanolique et l'infusion de *C. cinerea* vis à vis les deux bactéries Gram-négative et Gram-positif, et ont démontré une forte activité contre les Gram-positif. L'efficacité remarquable de l'extrait de CH₂Cl₂ en inhibant la croissance planktonique de *E. faecalis* s'est avéré très intéressante (Guiton *et al.*, 2013 ; Ch'ng *et al.*,2019).

Ainsi, l'extrait actif de CH₂Cl₂ a été fractionné par la colonne combinée et TLC en

phase directe et inverse pour isoler 5 métabolites purs. La première investigation de leur ^1H NMR et ESI MS spectres a mis en évidence que les composés identifiés sont des sesquiterpénoides appartenant aux différents sous-groupes. Les métabolites isolés sont les suivants: guaianolides, i.e., 6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy-1 α -and 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaianatrienolide (**1–3**, Figure 40), germacrenolides, i.e., haagenolide et 1,10-époxyhaagenolide (**4** and **5**, Figure 40), par la comparaison de leur données ^1H NMR et MS avec celles des études antérieures citées dans la littérature, particulièrement pour le composé **1–3** avec les données de Jakupovic *et al.* (1988). De plus, les données des composés **4** et **5** identifiés de la même plante ont été comparées avec celles des espèces d'*Inula* et d'*Inula heterolepis* (Bohlmann *et al.*, 78;82).

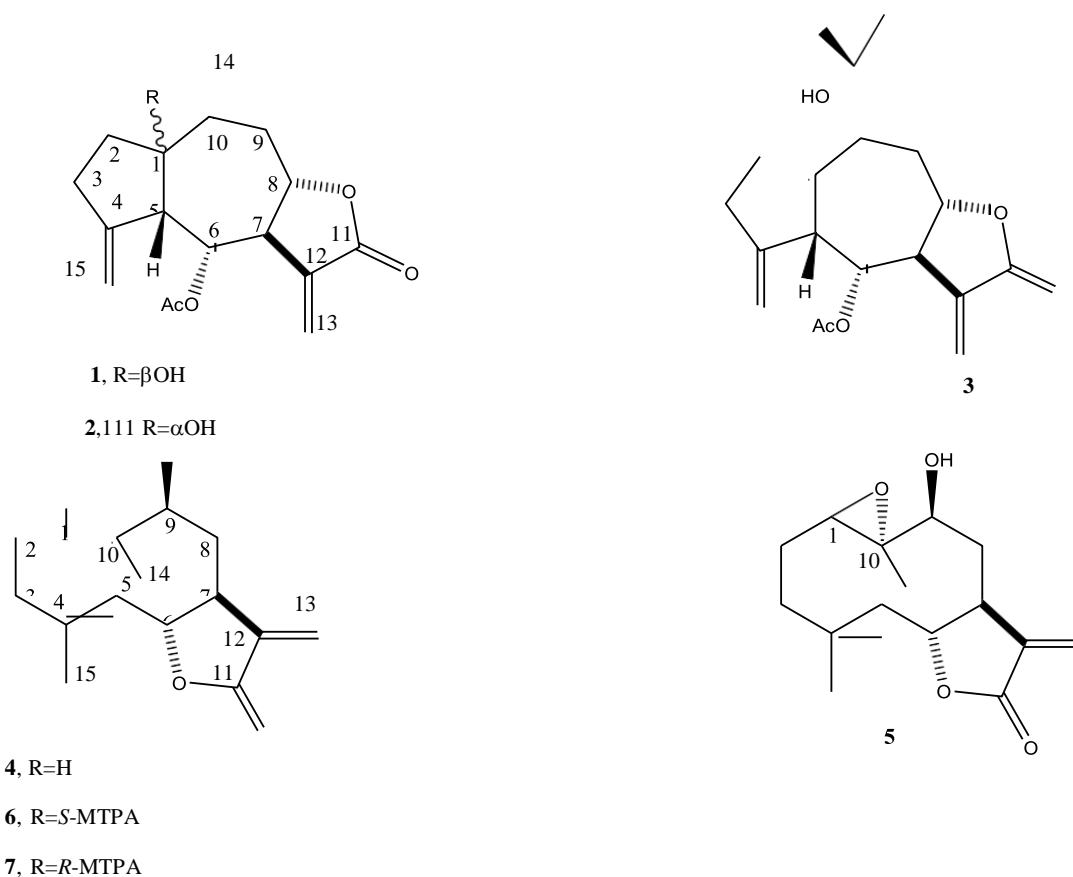


Figure 40. Structures des métabolites secondaires isolées

6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy-1 α -, 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaianatrienolide, haagenolide, 1,10-époxyhaagenolide (**1–5**), diastereomeric *S*- et *R*-MTPA esters de haagenolide (**6** et **7**).

Les Sesquiterpènes **1–5** étaient indépendamment testés contre des souches de référence de *E. faecalis* et 4 isolats cliniques en étudiant le profil de la sensibilité aux antibiotiques (Tab.29).

Tableau 29. Le profil de la sensibilité aux antibiotiques effectué par le système Vitek 2 (bioMérieux) de 4 isolats cliniques de *E. faecalis* une souche de référence de *E. faecalis* ATCC29212

Souches	Concentration minimale d'inhibition ($\mu\text{g/mL}$)					
	AMP	IM	LIN	TEI	Van	TIG
EF-91823	≤ 2	≤ 2	2	≤ 0.5	2	≤ 0.25
EF-91804	≤ 2	≤ 2	≤ 0.5	≤ 0.5	1	≤ 0.25
EF-165	≤ 2	≤ 1	$2 \leq 0.5$	$2 \leq 0.12$		EF-
91705	≤ 2	≤ 1	2	≤ 0.5	1	0.25
ATTC29212	≤ 2	≤ 1	2	≤ 0.5		≤ 0.12

AMP = ampicilline, IM = imipeneme, LIN = linezolide, TEI = teicoplanine, VAN = vancomycine, TIG = tigecycline.

Les composés ont été testés par la méthode de microdilution de bouillon avec un rang de concentration entre 300 et 9 $\mu\text{g/mL}$. Aux plus fortes concentrations de 150 et 300 $\mu\text{g/mL}$, les composés **3**, **4**, et **5** ont présenté un effet vis-à-vis les souches testées, pendant que le composé **2** était actif sur 4 parmi les 5 souches testées. Les taux d'inhibition de croissance variant de 50 à 90% (Tab.30). D'autres part, le Composé **1** n'a aucune activité inhibitrice contre aucune souche testée.

Tableau 30. L'activité antibactérienne exprimée en pourcentage de l'inhibition maximale de la croissance inhibition (GI) (moyenne \pm écartype) des composés de **1–5** à un rang de concentration de 300 à 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vis-à-vis des souches testées de *E. faecalis*.

Souches	Composé 1		Composé 2		Composé 3		Composé 4		Composé 5	
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%GI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%GI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%GI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%GI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%GI
EF-91804	300	nd	150	78 ± 1.5	150	80 ± 1.1	300	77 ± 1.5	300	82 ± 0.9
EF-91823	300	nd	300	50 ± 1.9	300	51 ± 0.9	300	49 ± 1.1	300	50 ± 1.6
EF-165	300	nd	300	nd	300	90 ± 0.7	300	80 ± 3	300	81 ± 3.3
EF-91705	300	nd	300	49 ± 2.2	300	50 ± 2.3	300	55 ± 2.6	150	80 ± 0.8
ATCC2921 2	300	nd	300	80 ± 1.1	300	79 ± 1.8	300	70 ± 2.1	300	79 ± 1.5

Concernant l'activité de sous-groupe des guaianolides (**1–3**), le substituant à C-10 apparaît inactif, alors que une caractéristique structurale importante semblait être la configuration. En effet, la présence d'un groupe hydroxyl saillant de α -side a déterminé une inactivité comme celle observée dans **1**. Comme décrits sous dessus, enterococci peut former des biofilms sur les biomatériaux étrangers. Les sous-populations bactériennes au sein de biofilm caractérisées par un faible métabolisme ont une absorption réduite des antibiotiques, particulièrement pour les molécules actives sur la paroi cellulaire comme beta-lactams et glycopeptides, utilisées à la fabrication des implants pour les infections difficiles à traiter (Hoiby *et al.*, 2010 ; Zaborowska *et al.*, 2017). Notre intérêt était d'étudier l'activité biofilm des 5 métabolites naturels sur les souches testées, en utilisant la méthode de coloration avec le crystal violet pour la quantification totale de la biomasse du biofilm. Une série de dilutions de composés a été testée en microplaques à partir de concentrations correspondant à 1/8 et 1/4 de la concentration inhibant respectivement 80% et 50% de la croissance planctonique. Les composés qui n'ont pas montré une activité inhibitrice contre la forme planctonique, ont été testés à partir de la concentration 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tab.31).

Tableau 31. L'inhibition de formation de biofilm en verre (BI) de *E. faecalis*, présentée par moyenne \pm écartype, après un jour de traitement avec les composés 1–5 à une série de dilutions de concentrations de l'inhibition de la croissance sous-planctonique.

Souches	Composé 1		Composé 2		Composé 3		Composé 4		Composé 5	
	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%BI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%BI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%BI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%BI	$\mu\text{g}/\text{mL}$	%BI
EF-91804	150	60 \pm 2,8	18	n.d.	18	52 \pm 2,4	37	n.d.	37	82 \pm 0.9
EF-91823	150	50 \pm 2,4	75	49 \pm 3,1	75	55 \pm 1,9	75	52 \pm 3,1	75	50 \pm 1.6
EF-165	150	52 \pm 1,7	150	50 \pm 2,4	37	62 \pm 1 ,1	37	65 \pm 1,8	37	81 \pm 3.3
EF-91705	150	55 \pm 3,3	75	50 \pm 3,6	75	48 \pm 2,2	75	50 \pm 2.2	37	80 \pm 0.8
ATCC2921 2	150	61 \pm 4,1	18	n.d.	18	n.d.	37	n.d.	37	79 \pm 1.5

La formation de biofilm a été déterminée par le test de crystal violet ; n.d. = non détecté (aucune différence détectée à par le témoin, $p > 0.005$).

Le composé 1 a inhibé la formation de biofilm par toutes les souches avec une concentration of 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aucune différence significative n'a été trouvée entre un pourcentage d'inhibition de biofilm entre 150 et 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p > 0.005$). Les composés 2–5 ont présenté une activité dépendante de la souche à la concentration maximale testée, montrant une inhibition de biofilm allant de 50 à 70% pour la plupart des souches testées. Le biofilm de *E. faecalis* est très résistant à l'action de l'ampicilline, vancomycine et linezolid, malgré les périodes de traitement prolongées (Sandoe *et al.*,2006 ; Bayston *et al.*,2012). Quelques auteurs ont testé l'efficacité en verre de la combinaison d'antibiotiques vis à vis enterococci dans les biofilms, et ils ont montrés le contenu des régimes antibiotiques en rifampicine, les combinaisons rifampicine-tigécycline et les combinaisons à base de fosfomycine qui étaient capables de réduire le nombre de biofilms bactériens pendant 24 H (Minardi *et al.*,2012; Oliva *et al.*,2014). Cependant, à ce jour, les stratégies de prise en charge des PJI entérococciques sont controversées, de même que celles des infections endodontiques entérococciques et la désinfection due à la cytotoxicité (De Sermeño *et al.*,2009 ; Maale *et al.*,2009). A la lumière de ces considérations, ces données préliminaires encouragent de nouvelles études visant à améliorer l'activité antibiofilm en combinant ces métabolites naturels avec des antibiotiques

conventionnels pour combattre les PJI ainsi qu'avec des agents d'irrigation endodontiques pour des médicaments intracanaux plus efficaces contre ce microorganisme.

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Les légumineuses et les céréales subissent de nombreuses attaques de la part d'une diversité de ravageurs aussi bien au champ que dans les entrepôts. En effet, la lutte au moyen des produits issus de plantes dans les stocks est une alternative qui limite les actions prédatrices des insectes et assure aux populations consommatrices des légumineuses, une autosuffisance alimentaire de qualité.

Sur la base de l'ensemble des résultats obtenus lors de cette investigation, nous retenons que les trois extraits de plantes testés : *Cotula cinerea*, *Salsola foetida* et *Zygophyllum album*, ont un effet sur le développement des deux insectes des denrées stockées : *Callosobruchus maculatus* et *Tribolium castaneum*.

A travers cette étude, on a réalisé des extraits éthanoliques à partir de trois plantes par la méthode de soxhlet. Le rendement de ces extraits des trois plantes diffère d'une espèce à l'autre. Les valeurs de rendement varient de : 18,2 ; 22,8 ; 34,1%. La valeur la plus élevée est celle de *Salsola foetida*. Car cette valeur est dépendante de la région géographique et de la saison de collecte de cette plante.

Pour extraire les métabolites majoritaires des trois plantes exploitées, on a appliqué la chromatographie en phase gazeuse (GC) qui est une méthode d'analyse et de séparation des composés volatils, semi-volatils et des métabolites. La séparation du mélange dépend de la longueur et de la température de la colonne ($T = 290^{\circ}\text{C}$). Les résultats de l'utilisation de cette méthode ont mis en évidence la présence de certains composés prédominants et spécifiques à chaque plante. Ainsi, les métabolites identifiés pour *Cotula cinerea* sont : Ethylmethanethiosulfonate, Valericacid, N-Carboxy-methionineresidue, N-Butylbenzenesulfonamide, Butanoicacid, Glycoaldehyde, Sulfoxycaprylicacid, Hydroxyhexanoicacid, D-Alanine D-2-Aminopropionic acid D-Ala, Perilyl alcohol et 4-Chloro-6-(trifluoromethoxy)-2H-1-benzopyran-2-one. Dans *Salsola foetida* (Forssk.), les composés suivants ont été identifiés : Valericacid, Artomunoxanthentrione, N-Carboxy-methionineresidue, Butanoicacid, Glycoaldehyde, Hydroxyanthraquinone, 3-[[4-[(2-hydroxy-3phenylsulfanylpropyl)sulfanylmethyl] phenyl]methylsulfanyl]-2-phenylsulfanylpropanol et Sulfoxycaprylicacid. De plus, Valericacid, 6,7-Dimethoxyquinazoline-2,4(1H,3H)-dione, N-Butylbenzenesulfonamide, Glycoaldehyde, Methylxanthine et Sulfoxycaprylicacid ont été identifiés au sein de *Zygophyllum album*. Ces

résultats révèlent aussi la présence des métabolites : Valericacid, Glycoaldehyde et Sulfoxycaprylicacid dans les trois plantes. Alors que N-Carboxy-methionineresidue et Butanoicacid ont été identifiés dans les deux plantes *Cotula cinerea* et *Salsola foetida*.

Pour compléter la partie d'identification des composés majoritaires, on a fait appel à une autre méthode d'extraction complémentaire dénommée HPLC-QTOF-MS qui est utilisée pour identifier les composés solubles et un grand nombre de métabolites qui n'ont pas été déjà identifiés pour chaque échantillon. La chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse Qtof (HPLC-QTOF-MS) utilise des solvants H₂O et l'acétonitrile pour créer un gradient de polarité (95% d'eau et 5% d'acétonitrile). Les résultats obtenus par cette méthode ont montré que N Butylbenzenesulfonamide est présent dans les trois plantes. Alors que Valine a été identifié pour *Salsola foetida* et *Cotula cinerea*, Indoline, Benzensulfonamide et Oxoproline sont présents tous les trois dans *Salsola foetida* et *Zygophyllum album* et pyrroline est le seul composé commun pour *Zygophyllum album* et *Cotula cinerea*.

De plus, pour valoriser les plantes testées, on a identifié les composés phénoliques essentielles de ces espèces, par la méthode HPLC/MS/QTOF dans les mêmes conditions que celles de la méthode précédente mais en mode négatif (ESI⁻). Cette analyse a révélé la présence des composés phénoliques suivants : 13-HPODE, 2-Deoxyribose 1-phosphate, 3-Ethoxybenzoate, 5,7-Dimethoxy-4-hydroxyflavanone, 5-Hydroxylysine, Acetylendi carboxylate, Daminozide, Dinoseb, Ethionamide, Methioninesulfoximine, N-Acetyl ornithine, p-coumaricacid, Phenylbutazone, Phosphatidylcholine lyso18:0, p-Nitroaniline, Ribavirin, Scopoletin, Uracil, Vanillicacid, Carbamoylaspartate, Benzyl succinate, Biotin et Isoproturon-monodemethyl.

Dans le cadre de la lutte contre les déprédateurs des denrées stockées considérés à l'aide des biopesticides à base de plantes médicinales, l'effet insecticide a été évalué à partir des trois plantes spontanées : *Salsola foetida*, *Zygophyllum album* et *Cotula cinerea* à l'égard des deux insectes ravageurs : *Callosobruchus maculatus* et *Tribolium castaneum*. Les résultats ont montré que les trois extraits à base d'éthanol exercent une toxicité remarquable dans le traitement contre la bruche de niébé. La mortalité des adultes par contact de *Salsola foetida* a atteint un pourcentage de 100% pour la D4 après les 72 heures de traitement. Les valeurs de DL50 des trois plantes ont été déduites à partir des droites de régression : 6.35 mg/ml pour *Salsola foetida*, 12.55mg/ml pour *Cotula cinerea* et 36.59 mg/ml pour *Zygophyllum album*. Les DL50 déterminent l'efficacité de chaque traitement.

En outre, les trois espèces de plantes ont un pouvoir sur la diminution de la fécondité et de la fertilité des femelles de la bruche. Les moyennes de ponte pour les trois extraits étaient : 7.83, 68.05 et 192.6 respectivement pour *salsola*, *cotula* et *Zygophyllum*, avec des taux de réduction de 98.16%, 85.79% et 54.99% respectivement pour les trois plantes. De plus, les résultats de l'effet des extraits sur la fertilité étaient les suivants : une moyenne d'éclosion des œufs de 10.61 pour *Salsola foetida*, une valeur de 60,65 pour *Cotula cinerea* et à l'ordre de 70.25 pour *Zygophyllum album*. Les pourcentages de réduction des œufs éclos étaient respectivement de l'ordre de 89.08, 37.18 et 27.07 % pour les trois plantes.

Les moyennes d'émergence de la descendance étaient respectivement de : 8.71, 64.2 et 76.4 pour *salsola*, *cotula* et *Zygophyllum*. Avec des taux de réduction de la F1 de : 90.65, 34.58 et 16.11% respectivement pour les trois plantes testées. L'efficacité des traitements a été confirmée par l'analyse de variance et la séparation des groupes qui ont démontré que la différence est hautement significative, c'est à dire que les doses ont un effet sur la mortalité des adultes et les différents paramètres.

Dans un second volet, nous avons évalué l'effet des trois extraits sur les adultes de *Tribolium castaneum* par les 2 types de traitement : le contact et l'ingestion. Ce test montre que les deux modes de toxicité ont un effet comparable sur l'insecte. En effet, les moyennes de mortalité des adultes par contact étaient de l'ordre de : 19,66 pour *salsola*, 17,16 pour *cotula* et 11,83 pour *Zygophyllum*. Ainsi que les DL50 sont similaires pour les deux effets contact et ingestion : 13.87 mg/ml de *salsola*, 23.57 mg/ml de *cotula* et 48.42mg/ml de *Zygophyllum*.

Sur la base des données recueillies, il ressort que les extraits des plantes testées ont montré une activité insecticide très prometteuse et une efficacité vis-à-vis des insectes des stocks. D'autres par, il est important de accentuer que les dérivées de la plante *Cotula cinerea* ont mis en évidence des actions antibiotiques dont l'extrait de dichlorométhane obtenu des parties aériennes qui a montré une activité antibiotique contre *Enterococcus faecalis*. Cet extrait de dichlorométhane a été fractionné par une purification bioguidée qui a donné 5 principales sesquiterpènes lactones. Ces composés identifiés sont: guaiantrienolides, 6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy1 α -, 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaiantrienolide (1-3), germacrenolides, haagenolide et 1,10 epoxyhaagenolide. Ils ont été extraits par une méthode spectroscopique (NMR et ESIMS).

Il est à souligner que les activités antibiotiques et antibiofilm ont été testées à partir des isolats cliniques de *Enterococcus faecalis*. Les résultats démontrent l'activité antibactérienne contre les souches de *E. faecalis*. Cependant, Le composé guaianolide., 6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy-1 α a exercé seulement une activité antibiofilm. Cette investigation a été faite pour la première fois sur l'activité antibiofilm et antimicrobienne de trois guaiantrienolides et deux germacrenolides isolés à partir de *Cotula cinerea* contre les souches de *Enterococcus faecalis* qui est un agent pathogène résistant aux médicaments traitant les infections. Les résultats sont des données préliminaires ; mais nous ne pouvons émettre l'hypothèse que ces substances naturelles pourraient être une alternative potentielle pour de nouvelles formulations d'antibiofilm dans les stratégies de prévention de l'infection persistante par *Enterococcus faecalis* (Cimmino *et al*,2021).

Cette étude a montré qu'il y a une possibilité de développer de nouvelles alternatives de lutte contre les ravageurs des légumineuses stockées avec l'utilisation des extraits éthanoliques de différentes espèces testées. Ainsi, nos résultats ont tendance à donner une importance aux plantes et composés majoritaires et composés phénoliques. En conséquence, de nombreuses recherches devraient être menées pour mettre en évidence les opportunités commerciales de développer des bio-insecticides à base d'extrait éthanolique de *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*. En outre, d'autres recherches peuvent être complémentaires à notre investigation. En effet, l'utilisation des extraits éthanoliques sur d'autres paramètres des insectes des denrées stockés et leur effet est un objectif dans des recherches ultérieures. Il aurait été intéressant de compléter cette étude par l'isolement des métabolites actifs qui sont à l'origine de cette toxicité. De plus, il est souhaitable de tester ces plantes pour d'autres activités biologiques de nature thérapeutique (les antimicrobiens, les antioxydants, les antibiotiques, les antibactériens, les antifongiques et les antiviraux).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abbott, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18, 265–267.
2. Abdelguerfi A., Boukecha D., Laouar M., Zine F. et Bouzid L., 1998. Les végétaux cultivées (locaux et introduits) cas des céréales, légumes secs, fourrages et arbres fruitiers. Rapport réalisé dans le cadre d'une consultation pour FEM-PNUD et la Direction Générale pour l'Environnement en vue de l'élaboration du projet (ALG 97/G31) sur « Stratégie et plan d'action pour l'utilisation durable de la diversité biologique ». 1-147.
3. Abd-Elhady H.K., 2012. Insecticidal activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia judaica* L. against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). Journal of plant protection research 52, (3), pp: 347-352.
4. Abdelsamad RM, Elhag EA, Eltayeb YM. 1988. Studies on the phenology of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the Sudan Gezira. Journal of Stored Products Research 24: 101–105.
5. Abdenbi A, Abdelwahed D, Bouaaza M, Touati B. Screening Phytochimique et Activite Antibacterienne De L'Huile Essentielle De Cotula Cinerea (Gartoufa) Dans La Region De Bechar. Int J Res Eng Technol. 2014; 2(2): 49–54.
6. Abegaz, B.M., & Woldu, Y. (1991). Isoflavonoids from the roots of *Salsola somalensis*. Phytochemistry, 30, 1281–1284.
7. Agboyi, L., 2006. Efficacité des extraits de feuilles de neem (*Azadirachta indica* Juss) et de papayer (*Carica papaya* L.) dans le contrôle des insectes ravageurs du chou (*Brassica oleracea* L.) et du gboma (*Solanum macrocarpon* L.). Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme d'Ingénieur Agronome, Université de Lomé, Togo, 69 p.
8. Agboyi, L., 2009. Vulnérabilité des agroécosystèmes maraîchers du Togo et essai de biocontrôle de deux ravageurs *Brevicoryne brassicae* et *Plutella xylostella* sur le chou à l'aide de *Beauveria bassiana* et de l'extrait aqueux d'amandes de graines de neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Mémoire de D.E.A., Université de Lomé, 61p.
9. AHMED ,S. AHSAN K ,M. AHMAD ,N.(2002). Determination of Susceptibility Level of Phosphine in Various Strains of Dhora (*Callosobruchus maculatus* F.).

10. INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY. Vol. 4, No. 3. 329–331. <http://www.ijab.org>.
11. Ahmed S, Ashraf M, Jabbar A, Janbaz KH, Khan MS, Gilani AH, Cho udhary MI. 2006a. Pharmacological screening of *Salsola baryosma*. J Chem Soc Pak. 28:82–83.
12. Ait Aider F. 2017. *Activité biologique des principaux constituants de l'huile d'olive de Kabylie sur Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae)*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri De Tizi-Ouzou. 123p.
13. 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 castaneum* (Herbst). Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research; 49:243–248.
14. Ajaib, M., Farooq, S., Khan, K.M., Perveen, S., Shah, S. (2019). Phytochemical analysis and anthelmintic activity of *Salsola imbricata*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 41(1), 198-202.
15. Akhtar, M., Arshad, M., Raza, A.B.M., Chaudhary, M.I., Iram, N., Akhtar, N., Mahmood, T. (2013). Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil *Sitophilus oryzae* L (Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Agricultural and Applied Sciences, 5(1), 69–73.
16. Alturkistania T , Bin Afifa M , Alzahrana R , Alnounoa R , M. Badrb J. 2017. Phytochemical investigation of *Salsola kali* extract. SHORT COMMUNICATION. Rec. Pharm. Biomed. Sci. 1 (1).
17. Alzouma I., 1981. Observations on the ecology of *Bruchidius atrolineatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) in Niger. In The ecology of bruchids attacking legumes (Pulses). Labeyrie V (ed). Junk the Hague. 205-213.
18. Amal M.Y. Moustafa, Ahmed I. Khodair, Faiza M. Hammouda and Husseiny A. Husseiny, 2007. Phytochemical and Toxicological Studies of *Zygophyllum album* L.f.. Journal of Pharmacology and Toxicology, 2: 220-237.
19. Amin, E., El Hawary, S.S., Fathy, M.M., Mohammed, R., Ali, Z., Tabanca, N. J . (2011). Zygophylloside S, a New Triterpenoid Saponin from the Aerial Parts of *Zygophyllum coccineum* L. Planta Medica, 77, 488-491. doi: 10.1055/s-0030-1251813.

20. António M.J. 2018. Phenolic compounds in fruit beverages. 4(2):35. <https://doi.org/10.3390/beverages4020035>.
21. António, C (ed.), 2018. Plant Metabolomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1778, , LLC, part of Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7819-9_9.
22. Arafa, I.H., Milena, M., Mohamed, G.S., Usama, A.M., Moatz, M.T., Angela, P. , Sonia, P. (2011). Triterpene saponins from *Salsola imbricata*. Phytochemistry Letters, 4,353–356.. doi: 10.1016/j.phytol.2011.07.010.
23. Asgar E., Ashrafi P.R., Farjaminezhad M. 2016. Phytochemistry, toxicity and feeding inhibitory activity of *Melissa officinalis* L. essential oil against a cosmopolitan insect pest; *Tribolium castaneum* Herbst. Toxin Rev., 35, 77-82.
24. Asif, R.M., Younas, M., Schlecht, E. (2016). In vitro efficacy of selected medicinal plants from Cholistan desert, Pakistan, against gastrointestinal helminths of sheep and goats. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics, 117 (2), 211–224.
25. Aszyk J, Kot-Wasik A., 2016. The use of HPLC-Q-TOF-MS for comprehensive screening of drugs and psychoactive substances in hair samples and several "legal highs" products. Monatsh Chem.;147:1407–1414. doi: 10.1007/s00706-016-1773-z.
26. Atta A.H., Mouneir S.M. (2004) Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. Journal of Ethnopharmacology. 92 : P:303–309.
27. Ayad ,R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce: *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae), Mémoire de Magister, Université de Constantine, 124.
28. Azroug D. Houna A. 2019.Effet Inhibiteur des extraits de trois plantes Saharienne *Cotula cinerea*, *Haloxylon scoparium* et *zygophyllum* sur les bactéries *S.aureus*, *E. coli* et *Pseudomonas sp.* . Mémoire .Université Abdelhamid Ibn Badis- Mostaganem, Algérie.
29. Bachrouch O., Ben Jemâa M J., Chaieb I., Talou T. (2010). Insecticidal activity of *Pistacia lentiscus* essential oil on *Tribolium castaneum* as alternative to chemical control in storage. Tunisian Journal of Plant Protection. Vol. 5, No. 1.

30. Balachowsky AS, Peter F. (1962). Family Tenebrionidae. In Entomology applied to agriculture. Treaty edited by AS Balachowsky Masson et Cie Editors. Volume I, Coleoptera 1: 374-392.
31. Balachowsky, A.S., 1962. Entomologie appliquée à l'agriculture. Ed. Masson et Cies, Tome I. Vol I, 564 p.
32. Baldin, E.I.L. & Lara F.M. (2008). Resistance of stored bean varieties to *BargazAcanthoscelides obtectus* (Coleoptera : Bruchidae). Insect Science. P: 326.
33. Bargaz, A., 2012. Caractérisation Agrophysiologique Et Biochimique De Symbioses Haricot (*Phaseolus vulgaris*)-Rhizobia Performantes Pour La Fixation Symbiotique De L'Azote Sous Déficit En Phosphore Présentée à la Faculté des Sciences et Techniques de Marrakech 146 pp.
34. Bayston, R.; Ullas, G.; Ashraf, W. 2012. Action of linezolid or vancomycin on biofilms in ventriculoperitoneal shunts in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56, 2842–2845.
35. 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.
36. BECK C.W. & BLUMER L.S. (2014): A Handbook on Bean Beetles, *Callosobruchus maculatus*. National Science Foundation Ed., 14p.
37. Belboukhari, N., Cheriti, A., Bouanini, M. (2012). Chiral separation of flavanones from *Cotula cinerea* by TLC methods. *Phytochem and Biosub Journal*, 6:2170-1768.
38. Belguidoum, M., Dendougui, H., Kendour , Z. (2015). In vitro antioxidant properties and phenolic contents of *Zygophyllum album* L. from Algeria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*,7(1), 510-514.
39. BELGUENDOZ,R. ; MOURAS ,L. & BELLATRECHE ,M. (2013) : Evaluation de la resistance du ravageur des grains de cereales *tribolium castaneum herbst*, 1797 (coleoptera : curculionidae) aux extraits aqueux des feuilles de *juglans regia* l. De la region de la kabylie. Séminaire International Protection Phytosanitaire : Situation et perspectives. Batna (Algérie).

40. Belmimoun, A., Meddah, B., Meddah, A.T., Sonnet, P. (2016). Antibacterial and antioxidant activities of the essential oils and phenolics extracts of *Myrtus communis* and *Zygophyllum album* from Algeria. *Journal of Fundamental and Applied sciences*, 8(2), 510-52. doi 10.4314/jfas.v8i2.22.
41. BenAmor, M.L., Benchikha, N., Eman, R., Neghmouche, N.S. (2018). Phytochemical characterization, in vitro cytotoxic and antibacterial activity of *Cotula cinerea* (Delile) vis essentail oil. *Journal of Natural Remedies*.
42. BenAmor, M.L., Benchikha, N., Eman, R., Neghmouche, N.S. (2019). Phytochemical characterization, in –vitro cytotoxic and antibacterial activity of *Cotula cinerea* (Delile) vis essentail oil. *Journal of Natural Remedies*, 18(3) .doi:10.18311/jnr/2018/22380.
43. BENHALIMA H., CHAUDHRY M.Q., MILLS K.A. & PRICE N.R. (2004): Phosphine resistance in stored-product insects collected from various grain storage facilities in Morocco. *Journal of Stored Products Research*, 40: 241-249.
44. Benigno J. S, Inmaculada C, Rosario R, José B. Q, Rafael C.2020. Determination of N-Nitrosamines by Gas Chromatography Coupled to Quadrupole–Time-of Flight Mass Spectrometry in Water Samples. *Separations* 2020, 7, 3; doi:10.3390/separations7010003.
45. Benslama, A., & Harrar, A. (2016). Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian sahara medicinal plants extracts. *International journal of Herbal Medicine*. 4(6), 158-161.doi:10.22271/flora.2016.v4.i6c.03.
46. Bensizerara D, Menasria T, Melouka M, Cheriet L, Chenchouni H. 2012.Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. *Asian Pac J Trop Biomed.*: 1–5.
47. Bensizerara, D.; Menasria, T.; Melouka, M.; Cheriet, L.; Chenchouni, H. 2013. Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Biol. Sci.*, 6, 266–271.

48. Benzi, V., Stefanazzi, N., Ferrero, A.A. (2009). Biological activity of essential oils from leaves and fruits of pepper tree (*Schinus molle L.*). Chilean Journal of Agricultural Res.arch, 69(2), 154-159. doi:10.4067/S0718-58392009000200004.
49. Berger, S.; Braun, S. 2004. *200 and More Basic NMR Experiments—A Practical Course*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany.
50. Bewketu M, Mesfin R.A, Bhagwan S.C, Minaleshewa A, Sandra C, Rob M. 2015. Simultaneous Determination of Alkaloids in Green Coffee Beans from Ethiopia: Chemometric Evaluation of Geographical Origin. Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-015-0340-2.
51. Bhatt, P., Thodsare, N., Srivastava, R.P. (2014). Toxicity of some bioactive medicinal plant extracts to Asian army worm, *Spodoptera litura*. Journal of Applied and Natural Sciences, 6 (1), 139-143.
52. Biémont J.C., Chauvin G. & Germain J.F., 1982. L'œuf de *Bruchidius atrolineatus* (Pic) et son système de fixation. Canadian Journal of Zoology. Vol. 60: 2610-2615.
53. Bimakr, M. ; Rahman, R.A., Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, et al., 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata L.*) leaves. Food Bioprod Process.;89(1):67-72.
54. Bohlmann, F.; Mahanta, P.K.; Jakupovic, J.; Rastogi, R.C.; Natu, A.A. 1978. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry*, 17, 1165–1172.
55. Bohlmann F.; Mahanta, P.K.; Jakupovic, J.; Rastogi, R.C.; Natu, A.A. 1978. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry*, 17, 1165–1172.
56. Bohlmann, F.; Ates, N.; Grenz, M. 1982, New germacranolides from *Inula heterolepis*. *Phytochemistry* 21, 1166–1168.

57. Bonisov, M.I. Rust. Resur. 1976.10, 66.
58. Bouchard, P., (2016). Coléoptères du monde : une Encyclopédie. Editeur Delachaux et Niestlé. 656p.
59. Boudjenouia A., Fleury A., Tacherifte A. (2003). Les légumineuses alimentaires dans les zones périurbaines de Sétif (Algérie): analyse d'une marginalisation. *New Medit*, 4, 23-27.
60. Boulos L, I Friis, MG Gilbert 1991 Notes on the Chenopodiaceae of Ethiopia, Somalia and Southern Arabia. *Nord J Bot* 11:309–316.
61. Bousquet Y. 1990. Beetles associated with stored products in Canada. Canadian Government Publishing Centre, Ottawa 189–192.
62. Bouziane, M. 2002. Caractérisation structurale de quelques molécules organiques dans la plante: *Cotula cinerea* de la région d'Ouargla. Mémoire magister en Chimie Organique Faculté des Sciences et Sciences de l'ingénieur. Université d'Ouargla (Algérie).
63. Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M.M., 2008. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea*. *Journal de la Société Chimique de Tunisie* 10, pp : 119-125.
64. Brier, H. 2008. Cowpea bruchid.
65. Camara A., 2009. Lutte contre *S. oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) et *Tribolium castaneum* herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en basse-guinée et l'utilisation des huiles essentielles végétales. Thèse doc. Université du Québec à Montréal, 154p.
66. Campbell JF, Runnion C. 2003. Patch Exploitation by female Red Flour Beetles, *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Science*, 3:20 :1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1673/031.003.2001>.

67. Cedric, B., Azucena, G.C., Claire, P.C. (2020). Plant metabolomics to the benefit of crop protection and growth stimulation. *Advances in Botanical Research*, 0065-2296. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.11.002>.
68. Chandel B.S., Singh A. 2017. Entomotoxicity of *Chromolaena odorata*, *Tagetes minuta* and *Reichardia tingitanina* suppressing oviposition and adult emergence of *Callasobruchus chinensis* s(L.) infesting stored chickpea seeds in U.P. *International Journal of Zoologystudies* 2:38-44.
69. Chauhan, B. S., Tanveer, A., Rasool, G., et al. (2018). Genus *Salsola*: Its benefits, uses, environmental perspectives and future aspects – A review. *Journal of Rangeland Science*, 8(3), 315–328.
70. CHEHMA A., 2006 : Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, Laboratoire de protections des écosystèmes en zones arides et semi arides, Université de Ouargla, Ed Dar El Houda, 146 p.
71. Ch'ng, J.H.; Chong, K.K.L.; Lam, L.N.; Wong, J.J.; Kline, K.A. Biofilm-associated infection by enterococci. 2019. *Nat. Rev. Microbiol.*, 17, 82–94.
72. Chouikh, A., Mayache, B., Maazi, M.C., Hadeif, Y., Chefrou, A. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils in Xerophytic plant *Cotula cinerea* Del (Asteraceae) during two stages of development: flowering and fruiting ARTIC. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 029-034. doi: 10.7324/JAPS.2015.50306.
73. Cimmino, A.; Roschetto, E.; Masi, M.; Tuzi, A.; Radjai, I.; Gahdab, C.; Paolillo, R.; Guarino, A.; Catania, M.R.; Evidente, A. Sesquiterpene Lactones from *Cotula cinerea* with Antibiotic Activity against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antibiotics* 2021, 10, 819. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070819>.
74. Credland F.1992.The structure of bruchid eggs may explain the ovicidal effects of oils.*J.Sto.Prod.Res.*28: 1-9.

75. Copping, L. G. (2009). Manual of biocontrol agents (4th ed.). Alton: British Crop Protection Council.
76. Dabiré, C., 1993. Méthodes traditionnelles de conservation du niébé (*Vigna unguiculata*) au Burkina-Faso. In : Thiam (A.) et Ducom (G.) (éd) Protection naturelle des végétaux en Afrique. Dakar : Enda, 45-56.
77. Dagnelie, P. (1975) Theorie et methodes statistiques, Applications agronomiques. Vol. 2. Les méthodes de l'inférence statistique. 2nd Edition, Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, 463 p.
78. Dalia M. Rasheed, Soheir M. El Zalabani, Mahmoud A. Koheil, Hala M. ElHefnawy & Mohamed A. Farag (2013) Metabolite profiling driven analysis of *Salsola* species and their anti-acetylcholinesterase potential, Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, 27:24, 2320-2327, DOI: 10.1080/14786419.2013.832676
79. Dane, Y., Mouhouche, F., Canela, G.R., Delpino, R.A. (2015). Phytochemical Analysis of Methanolic Extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* Mast, (Cupressaceae) 1892 and evaluation of their biological activity for stored grain protection. Arabian Journal for Science and Engineering. doi 10.1007/s13369-015-1977-2.
80. de Sermeño, R.F.; da Silva, L.A.; Herrera, H.; Herrera, H.; Silva, R.A.; Leonardo, M.R. 2009. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 108, e46–e49.
81. DEAPEA, 2005. Chapitre 13 Gestion des nuisibles II : Usage plus sûr des pesticides traduction de l'anglais janvier 2005. www.encapafrika.org/egssaa/PDF_French/Chapitre_13_Safer_Use_of_Pesticides_French_Final.pdf, 61 p.
82. DECELLE J., 1981- Bruchidae related to grain legumes in the Afro - Tropical Area. Series Entomologica , (Vol 19) : 193-197.
83. Delobel, A. & L. Matokot, 1991. Control of groundnut insect pests in African subsistence farming. In: F. Fleurat-Lessard & P. Ducom (eds). Proceedings 5th Int. Work. Conf. Stored Prod. Prot., Bordeaux, France, pp. 1599-1607.

84. Delobel A., Tran M., 1993. Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les régions chaudes, Paris, p 424.
85. De Vos R.C.H., Schipper B., Hall R.D., 2011. High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis of Plant Metabolites in *Brassicaceae*. In: Hardy N., Hall R. (eds) Plant Metabolomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 860. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7_8.
86. Djellouli, M., Benmehdi ,H., Mammeri, S., Moussaoui, A., Ziane, L., Hamidi, N. (2015). Chemical constituents in the essential oil of the endemic plant *Cotula cinerea* (Del.) from the southwest of Algeria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 5(10) , 870–873. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.06.007.
87. Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Benseradj, F., Aberrane, S., Aitmousa, S., Chelghoum, C., Lamari, L., Sabaou, N., Baaliouamer, A. (2014). In vitro synergistic/ antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) masters with antibiotic and anti- inflammatory agents. Industrial Crops and Products, 56, 60–66. doi:10.1016/j.indcrop.2014.02.035.
88. Djossou J., 2006. Etude des possibilites d'utilisations des formulations à base de fruits secs de *Xylopiya aethiopica* Dunal (Annonaceae) pour la protection des stocks de niebe contre *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera: Bruchidae). Master complémentaire. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux Belgique.
89. Dobignard, A., & Chatelain, C. (2011). Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. C.J.B.G. Genève : Editeur des conservatoire et Jardin botanique ville de Genève, Vol 2, p 430.
90. Duckett C.N., Gillespie J.J., Kjer K.M., 2003. Relationships among the subfamilies of Chrysomelidae inferred from small subunit ribosomal DNA and morphology, with special emphasis on the relationship among the flea beetles and the Galerucinae. In : New Contributions in Chrysomelidae Biology (P. Jolivet, M. Schmitt, J. Santiago-Blay, eds), SPB Academic Publications, 3-18.

91. Duckett, C.N., Kjer, K.M., 2003. Cladistic analysis of the Oedionychines of southern Brazil (Galerucinae: alticini) based on two molecular markers. In: Furth, D.G. (Ed.) Special Topics in Leaf Beetle Biology: Proceedings of 5th International Symposium on the Chrysomelidae. Pensoft Publishers, Sofia- Moscow, pp. 117–132.
92. Dugravot, S., Sanon, A., Thibout, E., Huignard, J., 2002. Susceptibility of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its Parasitoid *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to Sulphur-Containing Compounds: Consequences on biological control. *Env. Entomol.* 31, 550-557.
93. Dupont F, Guignard JL. Abrégés botanique systématique moléculaire. 13 édition révisée, Masson; 2004. 283 p. 11.
94. EBADOLLAHI A., MAHBOUBI M.(2011).Insecticidal activity of the essential oil isolated from *Azilia Eryngioidies* (PAU) HEDGE et LAMOND against two beetle pests. *Chilean Journal Of Agricultural Research* 71 (3).
95. Elgamal, M.H.A., Shaker, K.H., Pollman, K., & Seifert, K. (1995). Triterpenoid Saponins From *Zygophyllum* Species. *Phytochemistry*, 40, 1233–1236.
96. El Hafian M., Benlamdini N., Elyacoubi H., Zidane L. et Rochdi A., 2014.- Étude floristique et ethnobotanique des plantes médicinales utilisées au niveau de la préfecture d’Agadir-Ida – Outanane. Maroc. *Journal of Applied Biosciences* 81:7198 – 7213.
97. EL MESKAOUIGA et al.,2008 – Plantes médicinales et aromatiques marocaines : opportunités et défis, *Revue AFN Maroc*, n° 2-3, pp 74-87.
98. El-Sawaf S.K. . (1956). Some factors affecting the longevity, oviposition and rate of development in the southern cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae).*Bull. Soc. Ent. Egypte*. [https://doi.org/10.1016/0022-474X\(84\)90007-9](https://doi.org/10.1016/0022-474X(84)90007-9).
99. FAO, 2016. <http://www.fao.org/3/a-bb029f.pdf>.

100. Farrell, B.D., Sequeira, A.S., 2004. Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution*, 58, 1984-2001.
101. Farrell, J. 2010. Diagnostic Methods for Rust-red Flour Beetle and Confused Flour Beetle *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. <http://www.padil.gov.au/pbt>.
102. Fathy, K.F., Dekinash, M.F., Beltagy, A.M., Moataz, B.E.M., Khattab, A.R. (2017) .Chemical composition and biological activity of essential oil from *Cotula cinerea* (Del.) Growing Wildly in the Middle East: a short review. *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine*,1(1).
103. Fernández, T.A., Cimmino, A., Masi, M., Rubiales, D., Evidente, A. (2018). Antifeedant activity of long-chain alcohols, and fungal and plant metabolites against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) as potential biocontrol strategy. *Natural Product Research*. 33(17) , 2471–2479.
104. Finney, D.J., 1971. Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge UK.
105. Fleurat-Lessard F, Le Torc'h JM, Marchegay G. 1998. Effect of temperature on insecticidal efficiency of hypercarbic atmospheres against three insect species of packaged foodstuffs. In Proc. 7th Int. Working Conf. Stored Prod. Prot., Beijing, ed. Z Jin, Q Liang, Y Liang, X Tan, L Guan, 1:676–84. Chengdu, PR. China: Sichuan Publ. Sci. Tech.
106. FLEURAT-LESSARD, F. (2011). Détermination des facteurs de transfert des résidus de pesticides des céréales traitées aux produits transformés par une approche expérimentale a priori , 2ème rencontres techniques du RMT QUASAPROVE R Paris - 16 juin 2011 Journée séminaire : Evaluation et gestion des insectes et des résidus pesticides dans les grains stockés après récolte.
107. Foua-Bi, K., 1993. Produits naturels utilisés dans la préservation des stocks en Afrique noir, 84 95. In, Thiam, A. et Ducommun, G. (éds). Protection naturelle des végétaux en Afrique. ENDA, Tiers-monde, Dakar.

108. FOURAR R., 1987 - Inventaire des insectes du blé tendre, Estimation des dégâts et préservation de la qualité industrielle par l'emploi d'insecticides dans la région de blida. Mem.Ing.Agr.,I.N.A d'EL Harrach, 169p.
109. 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.
110. Garcia M., Donald O.J. Ardanaz C.E., Tonn G.E.& Sosa M.E., 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salcifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science* Vol.61:612-618.
111. Ghoneim K.E., Hamadah K.C.& El Hela A.A., 2012. Acetylcholinesterase activity in the desert locust *Schistocerca gregaria* (*Acrididae*) (Forsk) as a response to the action of the wild herb *Fagonia bruguieri* D.C (*Zygophyllaceae*) extracts. *Journal Entomology Research Society*. Vol. 14 (2) : 87-97.
112. Ghorab, H., Khetta, f. A., Lehbili, M., Kabouche, A., Magid, A.A., Harakat, D., Voutquenne, N.L., Kabouche, Z. (2017) .A new cardenolide and other compounds from *Salsola tetragona*. *Natural Product Communications*, 12, 1934578X1701200102.
113. Ghouti, D.; Rached, W.; Abdallah, M.; Pires, T.C.; Calhelha, R.C.; Alves, M.J.; Abderrahmane, L.H.; Barros, L.; Ferreira, I.C. 2018. Phenolic profile and in vitro bioactive potential of Saharan *Juniperus phoenicea* L. and *Cotula cinerea* (Del) growing in Algeria. *Food Funct.*, 9, 4664–4672.
114. GLITHO LA. , 2011- Comment assurer la protection des graines de légumineuses dans le cadre d'une agriculture durable, in HUIGNARD J et al : insectes ravageurs des graines de légumineuses. Ed. QUÆ., pp: 121-125.
115. Goławska S., Kapusta I., Łukasik I., Wójcicka A., 2008. Effect of phenolics on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) population on *Pisum sativum* L. (*Fabaceae*). *Pesticides* (3-4), pp: 71-77.
116. Gomez-Zurita J, Hunt T, Kopliku F, Vogler AP (2007) Recalibrated Tree of Leaf Beetles (*Chrysomelidae*) Indicates Independent Diversification of Angiosperms and Their Insect Herbivores. *PLoS ONE* 2(4): e360. doi:10.1371/journal.pone.0000360.

117. Goudoum A., 2010 - Impact des huiles essentielles sur le potentiel technologique et nutritionnel des grains et farine de maïs au cours du stockage. Thèse de Doctorat, ENSAI., Université de Ngaoundéré, Cameroun, 180 p.
118. GRUBBEN, G.J.H., 2004. Légumes, Ressources végétales de l'Afrique tropicale :618-626.
119. Guaouguaou, F.E., Ahl Beba, M.A., Taghzouti, K., Bouyahya, A., Bakri, Y., Dakka, N., EsSafi, N. (2018). Cytotoxicological Investigation of the Essential Oil and the extracts of *Cotula cinerea* and *Salvia verbenaca* from Morocco. Biomed Research International, 5. <https://doi.org/10.1155/2018/7163961>.
120. Guiton, P.S.; Hannan, T.J.; Ford, B.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. 2013. *Enterococcus faecalis* overcomes foreign body-mediated inflammation to establish urinary tract infections. *Infect. Immun.*, 81, 329–339.
121. Gurebis F.2020. 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. Thèse de Doctorat. ENSA, EL Harrach, Alger. p144.
122. Gushue, J.N., 2013. Principles and applications of gas chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Compr. Anal. Chem.* 61, 255– 270. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62623-3.00011-3>.
123. Gusmão, N.M.S., de Oliveira, J.V., Navarro, D.M. do A.F., Dutra, K.A., da Silva, W.A., Wanderley, M.J.A., 2013. Contact and fumigant toxicity and repellency of *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus staigeriana* F., *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Foeniculum vulgare* Mill. essential oils in the management of *Callosobruchus maculatus* (FABR.) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). *J. Stored Prod. Res.* 54, 41-47.
124. Habou, Z. A., Haougui, A., Basso, A., Toudou, A., & Haubruge, E. (2014). Insecticidal effect of *Jatropha curcas L.* seed oil on *Callosobruchus maculatus* Fab and *Bruchidius atrolineatus* Pic (Coleoptera: Bruchidae) on stored cowpea seeds

- (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Niger. African Journal of Agricultural Research. 9(32) : 2506-2510.
125. Halis Y. Plant Encyclopedia in area Oued Souf: desert plants common in the Big East race. El Oued, Algeria: El Walid 2007; 154-155.
 126. Hamed, AI., Masullo, M., Sheded, M.G., Mahalel, U.A., Tawfik, A.P., Piacente, S. (2011). Triterpene saponins from *Salsola imbricata*. Phytochemistry Letters, 4, 353-356.
 127. Hamraoui A. & C. Regnault-Roger, 1995.- Oviposition and larval growth of *Acanthoscelides obtectus* Say (*Coleoptera*, Bruchidae) in regards to host and nonhost plants from Leguminosae family. J. Appl. Entomol., 119, 195-199.
 128. Hani M. Elgamal A., kamel H. Shaker, karl P, KARLHEINZ S.1995.Triterpenoid saponins from zygophyllum species , Phytochemistry, Vol. 40, No. 4, pp. 1233-1236.
 129. Hardy, N. W., & Hall, R. D. (Eds.),2012. *Plant Metabolomics: Methods and Protocols*. (Methods in molecular biology; No. 860). Springer – Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7>.
 130. Hasan, M.R., Uddin, N., Hasan, M.M., Hossain ,M.M., Kamal, M.M., Fatema, K., Mazumder, H.M. L.R., Bashar, K., Rana, M.S. (2015). larvicidal and insecticidal effects of different extracts of *mallotus repandus* (willd.) Muell.- arg. Leaf and stem against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae) and *Sitophilus oryzae* linn. (Coleoptera: Curculionidae). International Journal of Pharmacy, 5(1), 127-133.
 131. Hassaneen, H.M., Shawali, A.S., Algharib, M.S. *et al.*1993. Regioselective synthesis of [1]benzopyrano[4,3-c]pyrazol-4-(1H)-one and [1]benzopyrano[3,4-c]pyrazol-4(3H)-one derivatives. *Arch. Pharm. Res.* **16**, 75–77. <https://doi.org/10.1007/BF02974133>.
 132. Hassaeen, H.A., El-Hamouly, M. M. A., El-Moghazy, S. A., & Bishay, D. W. (1993). 14- 397 decarboxyquinovic and quinovic acid glycosides from *Zygophyllum album*. 398 *Phytochemistry*, 33 (3), 667-670.
 133. Hassan ,S.[M. E.](#) Imamura, [T.](#) Miyanoshita ,[A.](#) (2004).Mortality of eggs of the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.) (*Coleoptera: Bruchidae*) in

- carbon dioxide under high pressure. [Applied Entomology and Zoology](#) 39(1):49-53. Doi:[10.1303/aez.2004.49](#).
134. Hekal A. M. et El-Kady E. A. (1987) Effect of gamma radiation on the level of infestation with *Callosobruchus maculatus* (F.) in stored cowpea seeds. *Ann. Agric. Sci., Egypt* 32(3), 1689–1698.
135. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 322–332.
136. Howe R. W. (1978) Introduction—The principles and problems of storage and pest control. *Outlook Agric.* 9(5), 198–203.
137. Huang Y., Ho S.H., et Kini M., 1999- Bioactivities of safrole and isosafrole on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, Lanham, Vol. 92, No.3: 676-683.
138. Huignard J., 1985. Importance des pertes dues aux insectes ravageurs des graines : Problèmes posés par la conservation des légumineuses alimentaires, source de protéines végétales. *Cath. Nutr. Diét.*, xx, 3, 193-200.
139. Huignard J., Lapied B., Dugravot S., Magnin-Robert M., Ketoh G.K., 2008b. Mode d'actions neurotoxiques des dérivés soufrés et de certaines huiles essentielles et risques liés à leur utilisation. In : *Biopesticides d'origine végétale* (C. Regnault-Roger, B.J.R. Philogène, C. Vincent, éd), Lavoisier, 219-230.
140. Huignard J. Renault-Roger C. 2011. Insecte ravageurs des graines de Légumineuses. Chap 8, Contrôle des Bruchinae par sélection variétale et génie génétique, Éditions Quæ RD 10, 78026 Versailles Cedex, France, 1773-7923, 101-108p.
141. HUIGNARD J., GLITHO A., MONGE J.P. ET REGNAULT-ROGER C., 2011. Insectes ravageurs des grains de légumineuses. *Biologie des Bruchinae et lutte raisonnée en Afrique*. Ed. Quæ, Paris, 145p.
142. Isman, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 2000, 19, 603-608.
143. Jakupovic, J.; Aal, M.A.; Eid, F.; Bohlmann, F.; El-Dahmy, S.; Sarg, T. 1988. Further glaucolides and other sesquiterpene lactones from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry*, 27, 2219–2224.

144. JAMALEDDINE M et al., 2017-Inventory and Conservation Status of Aromatic and Medicinal Plants in Morocco,114-122p.
145. Jaroslav
146. Jerraya A. (2003). Nuisibles des denrées stockées, Principaux nuisibles des plantes cultivées et des denrées stockées en Afrique du Nord : Leur biologie, leurs ennemis naturels, leurs dégâts et leur contrôle, Edition Climat Pub , pp 357-392.
147. KADRI Y. 2020. Etude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques dans le sud-ouest de l'Algérie.Thèse de doctorat,ENSA, El Harrach,Alger,281p.
148. Kchaou, M., BenSalah, H., Mnafigui, K., Abdennabi, R., Gharsallah, N., Elfeki, A., Damak, M., Allouche, N. (2016). Chemical Composition and Biological Activities of *Zygophyllum album* (L.) Essential Oil from Tunisia. Journal of Agricultural Science and Technology, 18, 1499-1510.
149. Kéita S.M., Amason J.T., Baum B.R., Marles R., Camara F., et Traoré A.K., 1999. Etude ethnopharmacologique traditionnelle de quelques plantes médicinales anthelminthiques de la Haute-Guinée (République de Guinée) Revue Med. Pharm. Afr., 13, 49-64.
150. Kellouche, A., Soltani, N. (2004). Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* (F.). Int. J. Trop. Insect Sci, 24, 184–191.
151. 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.
152. Kemassi, A., Herouini, A., Hadj, S. A., Cherif, R., & Ould El Hadj, M. D. (2019). Effet insecticide des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (*Euphorbiaceae*) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien) sur le *Tribolium castaneum*. Lebanese science journal, 20(1), 55-70.
153. Ketoh K.G.K., 1998.- Utilisation des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques du Togo comme biopesticides dans la gestion des stades de développement de *Callosobruchus maculatus* F (*Coleoptera : Bruchidae*). These doctoral, Université du Bénin, Togo, 141 p.
154. KETOH G.K., GLITHO I.A. & HUIGNARD J. (2002): Susceptibility of the bruchid *Callosobruchus maculatus* (*Coleoptera : Bruchidae*) and its parasitoid

- Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) to three essential oils. Journal of Economic Entomology, 95(1): 174-182.
155. Khaldi, R., Padilla, M., Haddad, M., 2002. La consommation du lait et des produits laitiers: attentes et attitudes des consommateurs de la commune de Tunis. Communication présentée au séminaire CIHEAM/CEE "Les stratégies des acteurs et la restructuration des marchés dans la filière lait", Montpellier, 28-29 mars 2002.
156. Khallouki ,F., Sellam, K., Koyun ,R., Ricarte, I., Alem ,C., Elrhaffari, L.,Owen, W.R. (2015.) Phytoconstituents and in vitro evaluation of antioxidant capacities of *Cotula cinerea* (Morocco) methanol extracts .Records of Natural Products, 9(4) 572-575.
157. Khan, K.M., Maharvi, G.M., Abbaskhan, A., Hayat, S., Khan ,M.T.H., Makhmoor, T., Choudhary, M.I., Shaheen, F., Atta, U.R. (2003). Three Tyrosinase Inhibitors and Antioxidant Compounds from *Salsola foetida*. Helvetica Chimica Acta, 86.
158. KOSSOU K.D. ; AHO N. (1993): Stockage et conservation des grains alimentaires tropicaux. Principes et pratiques. Flamboyant Ed. Cotonou, Benin, 125p.
159. Krishnoswamy N.R, Sheshadri T.R , Tahira P.J. 1968. Ind. J. Chem., 6, 676.
160. Ksouri, W.M., Medini, F., Mkadmini, K., Legault, J., Magné, C., Abdelly, C., Ksouri, R. 2013. LC-ESI-TOF-MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf., Food Chemistry, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.047>
161. Lakhdari ,W. , Dehliz, A., Acheuk ,F., Soud, A., Hammi, H., Mlik, R., Doumandji, M.B. (2015). Acaricidal activity of aqueous extracts against the mite of date palm *Oligonychus afrasiaticus* Meg (Acari: Tetranychidae). Journal of Medicinal2 Plants Studies, 3(6) 113-117.
162. Lakhdari, W., Dehliz, A., Acheuk, F., Mlik, R., Hammi, H., Maatallah, S., Doumandji, M.B. (2016). Biological control assay against date palm diseases by

- using an aqueous extract of *Zygophyllum album* in the southeast of Algeria. International Journal of Herbal Medicine, 4(4), 31-37.
163. Lale N.E.S. *et al.* (2003). Effect of constant temperature and humidity on oviposition and development of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus subinnotatus* (Pic) on bambara groundnut, *Vigna subterranean* (L.) Verdcourt. J. Stored Prod.Res. [Vol. 39, 5](#), pp.459-470. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(01\)00028-5](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(01)00028-5).
164. Lawrence J.F., 1982. *Coleoptera*. In: Synopsis and Classification of Living Organism, vol. 2 (S.P. Parker, éd.), MacGraw-Hill Publications, 482-553.
165. Lawrence J. F. Newton A. F. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera. *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A Crowson* 779-1006 [D. Smith/E. Leckey].
166. Lee S., Peterson C.& Jand Coast J.R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoides to several stored product insects. Journal of stored products research, Vol.39 (1) : 77, 85.
167. Lee, H.J., Pan, C.H., Kim, E.S., Kim, C.Y. (2012). Online high performance liquid chromatography (HPLC) -ABTS+ based assay and HPLC- electrospray ionization mass spectrometry analysis of antioxidant phenolic compounds in *Salsola komarovii*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 55, 317–321.
168. Leelaja B.C. *et al.* (2007). Detection of eggs of stored –product insects in flour with staining techniques.J.Stored Prod.Res.
169. Lepesme P., 1944 - Les coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés Ed.Chevalier., Paris, 335p.
170. LIENARD V., SECK D., LOGNAY G., GASPAR C. & SEVERIN M. (1993): Biological activity of *Cassia occidentalis* L. against (F.) (*Coleoptera: Bruchidae*). Journal of Stored Products Research, 29: 311-318.
171. LIENARD V. SECK D. (1994): Revue des méthodes de lutte contre *Callosobruchus maculatus* (*Coleoptera : Bruchidae*), ravageur des graines de niébé (*Vigna unguiculata*) en Afrique tropicale. International Journal of Tropical Insect Science, 15(3): 301-311.

172. Luque de Castro, M. D.; Priego-Capote, F., 2010. "Soxhlet Extraction: Past and Present Panacea," *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217, No. 16, pp. 2388-2389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.027>.
173. Lyon W.F., 2000- Confused and Red Flour Beetles. Ohio State University Extension Fact Sheet.HYG-2087-97.
174. Maale, G.E.; Eager, J.J.; Srinivasaraghavan, A.; Mohammadi, D.K.; Kennard, N. 2020.The evolution from the two stage to the one stage procedure for biofilm based periprosthetic joint infections (PJI). *Biofilm* 2, 100033.
175. MAHASNEH A.M., EL-OQLAH A.A. 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 64 (3), 271.
176. Maiza K, Brac DLP, Hammiche V. Pharmacopée traditionnelle saharienne: Sahara septentrional. in: Actes du 2ème Colloque Européen d’Ethnopharmacologie et 11ème Conférence Internationale d’Ethnomédecine. – Heidelberg; 1993. p. 169-171. 12.
177. Markouk, M.; Redwane, A.; Lazrek, H.B.; Jana, M.; Benjama, A. 1999. Antibacterial activity of *Cotula cinerea* extracts. *Fitoterapia*, 70,314–316.
178. Mason, L. J. (2003) Grain Insect Fact Sheet E-224-W: Red and Confused Flour Beetles, *Tribolium castaneum* (Bhst.) and *Tribolium confusum* Duval. Purdue University, Department of Entomology. Accessed on 24th July, 2015.
179. Mierziak J., Kostyn K., etKulma A., 2014. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. *Molecules*, 19, pp: 16240-16265 doi:10.3390/molecules191016240.
180. Minardi, D.; Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Silvestri, C.; Mocchegiani, F.; Gabrielli, E.; d’Anzeo, G.; Conti, A.; Orlando, F.; Rimini, M.; et al. . 2012. Efficacy of tigecycline and rifampin alone and in combination against *Enterococcus faecalis* biofilm infection in a rat model of ureteral stent. *J. Surg. Res*, 176, 1–6.
181. Meng X.L., Riordan,N.H., Casciari J.J., Zhu Y., Zhong J., Gonzlez M.J., Miranda- Massari J.R., Riordan H.D. (2002) Effects of a high

- molecular mass *Convolvulus arvensis* extract on tumor growth and angiogenesis. *PR Health Science Journal* .21: P: 323–328.
182. Mesbahi, M.A., Ouahrani, M.R., Rebiai, A., Amara, D.G., Chouikh, A. (2019). Characterization of *Zygophyllum album* L Monofloral Honey from El-Oued, Algeria. *Current Nutrition and Food Sciences*, 15, (5), 476-483.doi: 10.2174/1573401314666180223135430.
183. Messina, F.J., 1993. Heritability and ‘evolvability’ of fitness components in *Callosobruchus maculatus*. *Heredity* 71, 623–629.
184. Mnafigui, K., Kchaou, M., BenSalah, H., Hajji, R., Khabbabi, G., Elfeki, A., Allouche, N., Gharsallah, N. (2015). Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and hypertension and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, 1-8. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2015.1075049>.
185. Mosyakin, S.L. A taxonomic synopsis of the genus *Salsola* (*Chenopodiaceae*) in North America. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 1996, 387–395.
186. Murdock, L.L., Shade, R.E., Kitch, L.W., Ntougam, G., Lowenberg-DeBoer, J., Huesing, J.E., 1997. Postharvest storage of cowpea in sub-Saharan Africa. In: Singh, B.B., Mohan-Raj, D.R., Dashiell, K.E. Jackai, L.E.N.(Eds), *Advances in Cowpea Research* International Institute of Tropical Agriculture. Ibadan, Nigeria, pp. 302-312.
187. Murdock, L.L. Seck, D. Ntougam, G. Kitch, L. (2003), Preservation of cowpea grain in sub-Saharan Africa-Bean/Cowpea CRSP contributions, *Field Crops Research*, Vol. 82, pp. 169-178.
188. Mustafa AA, Man S, Sahoo RN, Nayan A, Manoj K, Sarangi A, Mishra AK A multi criteria decision making approach using remote sensing and GIS. In *Land suitability analysis for different crops*. New Delhi-110 012: Indian Agricultural Research Institute; 2011.
189. Navarro, M., Miyamoto, N. T., van der Kamp, J., Morya, E., Ranvaud, R., & Savelsbergh, G. (2012). The effects of high pressure on the point of no return in simulated penalty kicks. *Journal of Sport & Exercise Psychology*, 34, 81–101.

190. Nawrot, J., Harmatha, J. (2012). *Phytochemical feeding deterrents for stored product insect pests. Phytochemistry Reviews, 11(4), 543–566.* doi:10.1007/s11101-013-9273-9.
191. Neffati, M., Sghaier, M., (2014). Développement et valorisation des plantes aromatiques et médicinales (pam) au niveau des zones désertiques de la région mena (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie). Projet MENA-DELP, 155p.
192. Ngamo LST, Goudoum A, Ngassoum MB, Mapongmetsem PM, Hance T. 2007. Chronic toxicity of essential oils of 3 local aromatic plants towards *Sitophilus zeamais* Motsch. (*Coleoptera : Curculionidae*). African Journal of Agricultural Research, 2(4): 164-167.
193. Ngamo, T.S.L., I. Ngatanko, M.B. Ngassoum, P.M. Mapongmetsem and T. Hance, 2007. Persistence of insecticidal activities of crude essential oils of three aromatic plants towards four major stored product insect pests. Afr. J. Agric. Res., 2: 173-177.
194. Nuto Y. Glitho I.A., 1990. - Des rapports entre les Bruchidae prédateurs de Légumineuses alimentaires cultivées au Togo et leurs plantes-hôtes. Actes des Journées Scientifiques de l'Université du Bénin, 2: 312-325.
195. Nyamador S.W., 2009. Influence des traitements à base d'huiles essentielles sur les capacités de reproduction de *Callosobruchus subinnotatus* Pic. Et de *Callosobruchus maculatus* F. (*Coleoptera : Bruchidae*) : Mécanisme d'action de l'huile essentielle de *Cymbopogon giganteus* chiov. Thèse de doctorat en sciences de la vie. Biologie de développement .Entomologie appliquée. Université de Lomé –Togo, 177p.
196. Odeyemi O.O., Gbaye O.A., Akeju O., 2006. Resistance of *Callosobruchus maculatus* (Fab.) to pirimiphos methyl in three zones in Nigeria. In : Proceedings of IXth International Working Conference on Stored Product Protection (I. Lorini et al., éds), 324-329.
197. Oliva, A.; Furustrand Tafin, U.; Maiolo, E.M.; Jeddari, S.; Bétrisey, B.; Trampuz, A. 2014. Activities of fosfomycin and rifampin on planktonic and adherent *Enterococcus faecalis* strains in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58, 1284–1293.

198. Osman, S. M., El Kashak, W. A., Wink, M., & El Raey, M. A. (2016). New isorhamnetin derivatives from *Salsola imbricata* Forssk. leaves with distinct anti-inflammatory activity. *Pharmacognosy magazine*, 12(Suppl 1), S47.
199. OUEDRAOGO A.P. (1978): Etude de quelques aspects de la biologie de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae) et de l'influence des facteurs externes stimulants (plante hôte et copulations) sur l'activité reproductrice de la femelle. Thèse de 3ème cycle, Université Paul Sabatier, Toulouse, 101p.
200. 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.
201. Ouis, N., Bakhtaoui, H. 2017. L'étude phytothérapie des plantes médicinales dans la région Rélizane, 65p.
202. Ozenda, P., (1977): La flore du Sahara. Deuxième édition, Centre National de la Recherche Scientifique -617pages.
203. Pannuti L.E.R., Marchi L.S.& Baldin E.L.L., 2012. Use of vegetable powders as alternative to control of *Callosobruchus maculatus*. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*. Vol. 38: 33-40.
204. Popović A. , Petrović M., Šućur J., Aćimović M., Stanković J., Bursić V., Malenčić Đ.(2016). Effects of essential oil *Illicium verum* Hook. on the *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) adults. Conference paper. Malaga.
205. Pyankov, V., Voznesenskaya, E., Kuzmin, A. et al.: Occurrence of C3 and C4 photosynthesis in cotyledons and leaves of *Salsola* species. – *Photosynth. Res.* 63: 69-84, 2000.
206. Pyankov VI, Artyusheva EG, Edwards GE, Soltis PS. 2001. Phylogenetic analysis of tribe *Salsoleae* of *Chenopodiaceae* based on ribosomal ITS sequences: implications for the evolution of photosynthetic types. *American Journal of Botany* 88: 1189±1198.

207. Quaram, E., Messoudi, W., Bachiri, C. 2021. détermination de la teneur en composés phénoliques et de l'activité antioxydante de *Salola Foetida*. Thèse Master, faculté sciences de nature et de la vie, Université El Oued, 100p.
208. Quezel P, Santa S. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II, Ed. CNRS, Paris; 1963. 1170 p. 10.
209. Rahmani S., 2015. Effet de l'antracnose du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) sur le rendement et ses composantes en zone semi aride. Thèse de magister, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, 93p.
210. Ragaa M.A, Ahmed A.A., Nabel A.M., 1983. Phytochemistry, 22, 2630.
211. Regnault-Roger C., Hamraoui A., Holeman M., Théron É., Pinel R., 1993. Insecticidal effect of essential oils from Mediterranean plants upon *Acanthoscelides obtectus*, a pest of kidney bean. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1231-1242.
212. REGNAULT-ROGER C. & HAMRAOUI A. (1997): Lutte contre les insectes phytophages par les plantes aromatiques et leurs molécules allélochimiques. *Acta. Botanica Gallica*, 144(4): 401- 412.
213. REGNAULT-ROGER C., PHILOGÈNE J.R.B. & VINCENT C. (2002): Bio- pesticides d'origine végétale. Paris: Lavoisier, Editions Tec et Doc, 319p.
214. Regnault-Roger C. . 2002 ; BIOPESTICIDES D'ORIGINE VÉGÉTALE. B. Philogène ; C. Vincent, Paris : Lavoisier Technique et Documentation. .. 978-2-7430-0527-6. 337p.
215. Righi, K., Righi, F.A., Boubkeur, A., Boungab, K., Elouissi, A., Djendara, A.C. (2017). Toxicity and repellency of three algerian medicinal plants against pests of stored product: *Ryzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera: Bostrichidae). *Banat's Journal of Biotechnology*, IX, 17. doi: 10.7904/2068-4738-IX(17)-50.
216. Rodriguez E., Carman N. J., G. Vander Velde, J.H. McReynolds, T. J. Mabry, M.A. Irwin, et T.A. Geissman, (1972). *Phytochemistry*, 11, 3509.
217. Rogachev I., Aharoni A., 2011 UPLC-MS-Based Metabolite Analysis in Tomato. In: Hardy N., Hall R. (eds) *Plant Metabolomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 860. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-594-7_9.

218. Rondani C, 1877. *Vesparia parasita* Non vel minus cognita. *Boll. Soc. Ent. Ital.*, 9:166-213.
219. Rotundo, G., Paventi, G., Barberio, A., DeCristofaro, 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. *Scientific Reports*, 9, 6429. <https://doi.org/10.1038/s41598-01942886-4>.
220. 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 AGRICULTURAL RESEARCH* 75(3). doi:10.4067/S0718-58392015000400015.
221. Saeidi M, Moharramipour S, Sefidkon F , Aghajanzadeh S.2011. Insecticidal and repellent activities of *Citrus reticulata*, *Citrus limon* and *Citrus aurantium* essential oils on *Callosobruchus maculatus*.
222. Sandoe, J.A.; WYsome, J.; West, A.P.; Heritage, J.; Wilcox, M.H. 2006. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.*, 57, 767–770.
223. Sanon, A., Ouedraogo, A.P., Tricault, Y., Credland, P.F., Huignard, J., 1998. Biological control of bruchids in cowpea stores by release of *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) adults. *Environ. Entomol.* 27, 717-725.
224. SANON A., SOU S., DABIRE L.C.B., OUEDRAOGO A.P. & HUIGNARD J. (2005): Combining *Boscia senegalensis* Lam. (Capparaceae) leaves and augmentation and the larval parasitoid *Dinarmus basalis* Rondani (Hymenoptera: Pteromalidae) for bruchids control in stored cowpea. *Journal of Entomology*, 2(1): 40-45.

225. Schrader, K.K., Andolfi, A., Cantrell, C.L., Cimmino, A., Duke, S.O., Osbrink, W., Wedge, D.E., Evidente, A. (2010). A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management. *Chemistry and Biodiversity*, 7, 2261–2280.
226. Scotti, G., 1978 - Les insectes et les acariens des céréales stockées. Normes et Technique. Institut technique des céréales et des fourrages. Association française de Normalisation AFNOR.
227. SECK D., SIDIBE B., HAUBRUGE E., HEMPTINNE J.L. & GASPARD C.H. (1991): La protection chimique des stocks de niébé et de maïs contre les insectes au Sénégal. *Med. Fac. Landbouwwet. Rijkuniv.,Gent.* 56/3b: 1225-1233.
228. Seck D., 1994. Développement de méthodes alternatives de contrôle des principaux insectes ravageurs des denrées emmagasinées au Sénégal par l'utilisation de plantes indigènes. Thèse de Doctorat à la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, 192 p.
229. SECK D., LOGNAY G., HAUBRUGE E., MARLIER M., GASPARD C., (1996). ALTERNATIVE PROTECTION OF COWPEA SEEDS AGAINST *CALLOSBRUCHUS MACULATUS* (F.) (*COLEOPTERA: BRUCHIDAE*) USING HERMETIC STORAGE ALONE OR IN COMBINATION WITH *BOSCIA SENEGALENSIS* (PERS.) LAM EX POIR. *JOURNAL OF STORED PRODUCTS RESEARCH*, VOLUME 32, ISSUE 1, 39-44p. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/0022-474X\(95\)00035-6](https://doi.org/10.1016/0022-474X(95)00035-6).
-
230. 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.
231. Seri-Kouassi, B.P., Coffi, K., Abouz, L.R.N., Bekon, K.A., Glitho, A.I., Gérard, K., N'Guessan, Y.T., 2004. Action des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire sur *Callosobrochus maculatus* F. du niébé, *C.R. Chimie*. 7, 1043- 1046.
232. Shazali, M.E.H., et Smith, R.H. 1986- Life history studies of externally feeding pests of stored sorghum: *Corcyra cephalonica* (Staint.) and *Tribolium castaneum* (HBST). *Journal of Stored Products Research*, 22(2): 55-61.

233. Shehab, N. G., & Abu-Gharbieh, E. (2014). Phenolic profiling and evaluation of contraceptive effect of the ethanolic extract of *Salsola imbricata* Forssk. in male albino rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014.
234. Shehab, N.G., and E. Abu-Gharbieh (2014). Phenolic profiling and evaluation of contraceptive effect of the ethanolic extract of *Salsola imbricata* Forssk. in male albino rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014: 695291.
235. Shehab, N.G., E. Abu-Gharbieh. 2014. Phenolic profiling and evaluation of contraceptive effect of the ethanolic extract of *Salsola imbricata* Forssk. in male albino rats. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2014: 695291.
236. Shipeng, L., Ye, C., Ying, D., Yinhui, Z., Di, Z., Liyan, Z., Huiyuan, Y. (2021). Widely Targeted Metabolomics Analysis of Different Parts of *Salsola collina* Pall. *Molecules*, 26, 1126. <https://doi.org/10.3390/molecules26041126>.
237. SILVA, G. N. et al. Bioactivity of *Jatropha Curcas* L. to insect pests of stored products. *Journal of Stored Products Research*, v. 48, n. 1, p. 111-113, 2012.
238. Singh SP, Rawat YS, Rana BS, Negi GCS. 1990. Effects of unusually large seed crop on litterfall and nitrogen retranslocation in Himalaya oaks. *Forest Ecology and Management* 32: 79-86.
239. Smati, D., Offer, A.C.M., Miyamoto, T., Hammiche, V., Dubois, M. (2007). Ursane-type triterpene saponins from *Zygophyllum geslini*. *Helvetica Chimica Acta*, 90, 712–719.
240. Soltiner, D., 1990. *Les grandes productions végétales. Les collections sciences et techniques agricoles*, Ed. 17^{ème} édition, 464 p.
241. Sokoloff A., 1974- *The Biology of Tribolium: With Special Emphasis on Genetic Aspects*. Vol. 2. Clarendon Press, Oxford.
242. Sokolowska-Krzaczek, A., Skalicka-Wozniak, K., & Czubkowska, K. (2009). Variation of phenolic acids from herb and roots of *Salsola kali* L. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 78(3), 197–201.
243. SOU Sibiri.(1998). Etude des populations de bruches et de leurs parasitoïdes dans un agrosystème sahélien au Burkina Faso: mise en place de méthodes de lutte intégrée. Thèse de doctorat. Université de Ouagadougou. 153p.

244. Southgate, B.J. (1979) Biology of Bruchidae. Annual Review of Entomology, 24, 449-473. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002313>.
245. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS*, 115, 891–899.
246. Stoll, G., 2000. Natural crop protection in the tropics. CTA/AGRECOL. 376 p. Summerfield, R.J., (ed.) 1988. World crops: Cool season food legumes. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1180 pp.
247. Storey C. L., 1975. Mortality of adult stored-product insects in an atmosphere produced by an exothermic inert atmosphere generator. Journal of Economic Entomology, 68(3): 316- 318.
248. Syrchina, A.I., Gorshkov, A.G., Shcherbakov, V.V. *et al.* Flavonolignans of *Salsola collina*. *Chem Nat Compd* **28**, 155–158 (1992). <https://doi.org/10.1007/BF00630164>.
249. Taleb T K. ;(2015). Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : Bruchidae).Thèse de doctorat, Université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou.160p.
250. Tapondjou L. A, Carnel A, Hamilton B, Dominic A.F. 2003. Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de *Chenopodium ambrosioides* et *Eucalyptus saligna* à l'égard de la bruche du niébé, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera, Bruchidae). Cahiers Agricultures ; 12 : 401-7.
251. Tarigan, S. I., Dadang, Sakti Harahap, I. 2016. Toxicity and physiological effects of essential oils against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Biopesticides, 9 (2): 135-147.
252. Tchamou K.S. 1995. Impact des hyménoptères parasitoïdes: *Dinarmus basilis* R. et *Eupelmus vuilleti* Craw ; sur les populations de *Callosobruchus maculatus* F. dans un système de stockage de niébé : *Vigna unguiculata* L. Walp.

Mémoire de D.E.A. de Biologie de Développement. Univ. du Bénin. LoméTogo ;
54p.

253. Toderich K.N., Shuyskaya E.V., Faisal Taha, Shoaib Ismail, Gismatullina L.G. & Li E.V. 2012. Adaptive fruit structural mechanisms of asiatic *Salsola* species and its germplasm conservation and utilization. J. Arid Land Studies. 22: 73.
254. Toufique B. M., Moumouni D. A., Kadidjatou H. H., and Doumma A., 2014. Etude de quelques facteurs influençant l'efficacité de l'activité insecticide de *Boscia senegalensis* Lam (Ex. Poir) dans le contrôle de *Callosobruchus maculatus* F.(Coleoptera-Bruchinae), ravageur du niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp. International Journal of Innovation and Applied Studies 8 (1): 320-327.
255. TandisR. , F. Menichini, F. Confort, M.R. Loizzo, M. Bonesi, G. Statti, F. Menichini. 2009. A potential role of alkaloid extracts from *Salsola* species (*Chenopodiaceae*) in the treatment of Alzheimer's disease. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24 , pp. 818-824.
256. Tripathi, A.K., Prajapati, V., Aggarwal, K.K., Sushil Kumar, Prajapti, V., Kumar, S. Kukreja, A.K. Dwivedi, S. and Singh, A.K. (2000) Effects of volatile oil constituents of *Mentha* species against stored grain pests, *Callosobruchus maculatus* and *Tribolium castanum*. J. Med. Arom. Plant Sci., 22, 549–556.
257. Tundis, R., Loizzo, M.R., Statti, G.A., Menichini, F. (2007). Inhibitory effects on the digestive enzyme-amylase of three *Salsola* species (*Chenopodiaceae*) in vitro. Pharmazie, 62, 473–475.
258. Tyler f P. S., P. S. Webley D. J., 1978. Conserving grain on the small farm in the tropics. Outlook Agriculture, 9(5): 214-219.
259. Uddin II, R.O. Sanusi, S.A. 2013. Efficacy of olive oil, groundnut oil, soybean oil and palm kernel oil in the control of *Callosobruchus maculatus* (f.) In stored cowpea (*Vigna unguiculata* l. Walp). Agrosearch Volume 13(2):67-72.
260. Utida S., 1954. Phase dimorphism observed in the laboratory population of the cowpea weevil, *Callosobruchus quadrimaculatus*. Japanese Journal Applied of Zoology. Vol. 18: 161- 168.
261. Utida S., 1972. Density-dependent polymorphism in the adult of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Journal of Stored Product Research; 8: 111-126.

262. Utida, S. (1981) Polymorphism and phase dimorphism in *Callosobruchus*, Ser. Entomol. 19, 143–147.
263. Uzma, M., Anjum, P., Syeda, Q. (2014). Comparative Pharmacognostic evaluation of some species of the genera *Suaeda* and *Salsola* leaf (Chenopodiaceae). Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 27(5), 1309-1315.
264. Wahedi J, Zakariya R, Danba E, David D, Mshelmbula B, Buba U, et al. Ethnobotanical studies of the efficacy of five oils at graded levels on adult *C. maculate* reared on cowpea. *International Journal of Research Review*. 2015;2(8):481–486.
265. Wang Sh, Yan M, Guo Y, Sun R, Jin H, Gong Y. In vivo and in vitro effects of *Salsola collina* on gastrointestinal motility in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2020; 23:383-389. doi: 10.22038/IJBMS.2019.40613.9605.
266. Weaver, D.K., Dunkel, F.V., Ntezurubanza, L., Jackson, L.L., Stock, D.T., 1991. The efficacy of linalool, a major component of freshly-milled *Ocimum canum* Sims (Lamiaceae), Références 155 for protection against postharvest damage by certain stored product Coleoptera. *J. Stored Prod. Res.* 27, 213-230.
267. Weidner H., et Rack G., 1984- Tables de détermination des principaux ravageurs des denrées entreposées dans les pays chauds, Eschborn GTZ, p. 54 et 129.
268. Wei Dong J, Le Cai, Xue-Jiao L, Yan S, Jia-Peng W, ZhongT. D. 2018. A novel sesquiterpene derivative with a seven-membered B ring from *Illigera aromatica*, *Natural Product Research*, DOI: 10.1080/14786419.2018.1428596.
269. Wightman J A ; Southgate B J.(1982). Egg morphology, host, and probable regions of origin of the bruchids (Coleoptera: Bruchidae) that infest stored pulses—an identification aid. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*, Vol. 10: 95-99. DOI: 10.1080/03015521.1982.10427850.
270. Xiang Y, Li Y, Zhang J, et al. Studies on chemical constituents of *Salsola collina*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2007;32:409–13.
271. Xin, L.Z., Wen, Y., Zhao, Z.L., Hong, J., Yan, L.G. (2020). *Salsola collina* ethyl acetate extract alleviates diabetic gastroparesis possibly through oxidative stress inhibition. Paper presented at The 3rd International Conference on

Agricultural and Food Science , IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 559 012021.

272. Xu, L., Lao, F., Xu, Z., Wang, X., Chen, F., Liao, X., ... Yang, S. ,2019. Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and metabolomic approach to discriminate coffee brewed by different methods. *Food Chemistry*, 286, 106–112.
273. Zaborowska, M.; Tillander, J.; Brånemark, R.; Hagberg, L.; Thomsen, P.; Trobos, M. 2017. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 105, 2630–2640.
274. Zhao YX, Yao XB. *Xue Xue Bao* 2004;39:598–600.
275. Zhao X, Wang H, Zhang Z, Jin H, Gong Y. Effects of ethyl acetate extract of *Salsola collina* on brain-gut peptides and interstitial cells of gastric Cajal in rats with diabetic gastroparesis. *Iran J Basic Med Sci* 2020; 23:1218-1224. doi: 10.22038/ijbms.2020.43521.10223.
276. Zhou, B.,2011. Computational Analysis of LC-MS/MS Data for Metabolite Identification. Thesis Master of Science In Electrical Engineering., faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 55p.
277. Zehrer W., 1980. Méthodes traditionnelles de lutte contre les insectes dans le cas de la protection des stocks. Problèmes de post-récolte (113). Documentation sur un séminaire OUA/GTAz : 92-118.

Annexe

Cas de *Callosobruchus maculatus*

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Salsola foetida*

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
6 mg/ml	1,791	11,5	57,5	56,41	5,15
12mg/ml	2,484	15,16	75,8	75,17	5,67
24mg/ml	3,178	18,83	94,15	94	6,55
48mg/ml	3,871	20	100	100	8,09
Témoin		0,5	2,5		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Cotula cinerea*

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
6 mg/ml	1,791	5,83	29,15	27,33	4,39
12mg/ml	2,484	8,5	42,5	41,02	4,77
24mg/ml	3,178	15	75	74,35	5,64
48mg/ml	3,871	18,16	90,8	90,56	6,28
Témoin		0,5	2,5		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Zygodium album*

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
6 mg/ml	1,791	5,16	25,8	23,89	4,26
12mg/ml	2,484	8	40	38,46	4,69
24mg/ml	3,178	9,33	46,65	45,28	4,87
48mg/ml	3,871	10,66	53,3	52,10	5,05
Témoin		0,5	2,5		

Annexe 2

Cas de *Tribolium castaneum*

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Salsola foetida* (effet contact)

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	7,33	36,65	36,13	4,64
20mg/ml	2,99	13,66	68,3	68,04	5,47
40mg/ml	3,68	17,16	85,8	85,6	6,04
80mg/ml	4,38	19,66	98,3	98,2	7,05
Témoin		0,16	0,8		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Cotula cinerea* (effet contact)

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	6,16	30,8	30,8	4,48
20mg/ml	2,99	8,83	44,15	44,15	4,85
40mg/ml	3,68	11,16	55,8	55,8	5,13
80mg/ml	4,38	17,16	85,8	85,8	6,04
Témoin		0	0		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Zygodhryllum album* (effet contact)

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	4,5	22,5	22,5	4,23
20mg/ml	2,99	7,16	35,8	35,8	4,61
40mg/ml	3,68	9,33	46,65	46,65	4,90
80mg/ml	4,38	11,83	59,15	59,15	5,23
Témoin		0			

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Salsola foetida* (effet ingestion)

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	8,66	43,3	43,3	4,82
20mg/ml	2,99	12,16	60,8	60,8	5,25
40mg/ml	3,68	16	80	80	5,84
80mg/ml	4,38	19,66	98,3	98,3	7,05
Témoin		0	0		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Cotula cinerea* (effet ingestion)

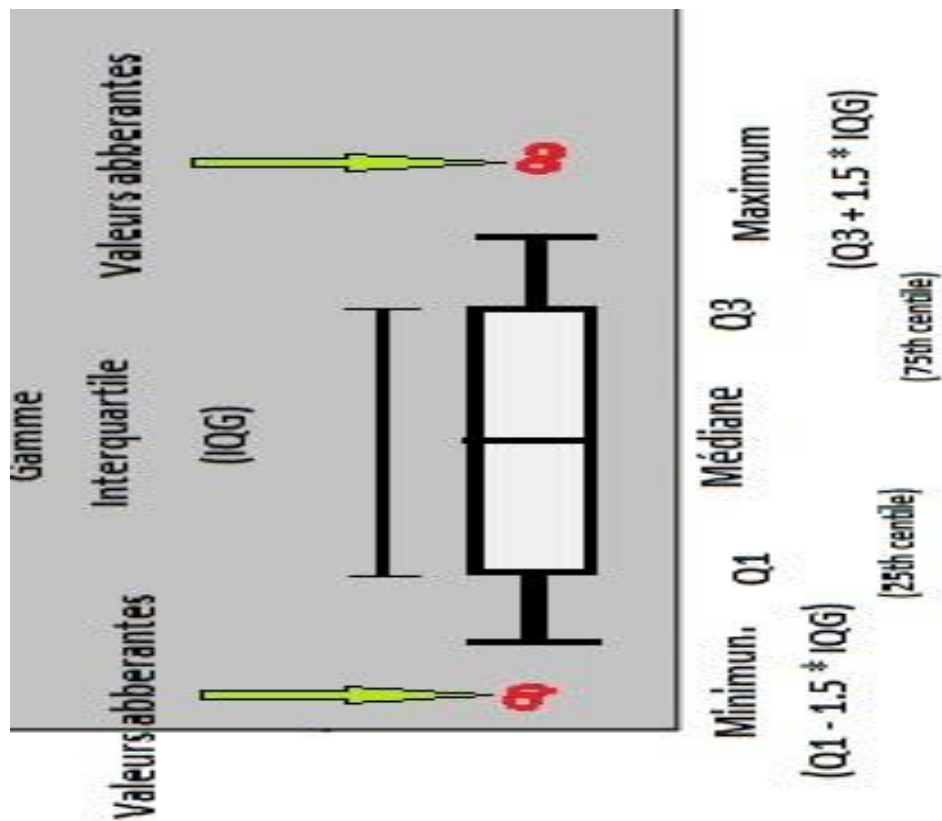
Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	6,5	32,5	31,95	4,50
20mg/ml	2,99	8,66	43,3	42,84	4,77
40mg/ml	3,68	13,16	65,8	65,52	5,39
80mg/ml	4,38	16,83	84,15	84,02	5,99
Témoin		0,16	0,8		

Détermination de la DL50 pour le traitement avec l'extrait de *Zygophyllum album* (effet ingestion)

Dose	Ln dose	Moyenne	% mortalité	%M corrigée	Probit
10 mg/ml	2,30	4,33	21,65	21,65	4,19
20mg/ml	2,99	6,83	34,15	34,15	4,59
40mg/ml	3,68	11,33	56,65	56,65	5,15
80mg/ml	4,38	11,83	59,15	59,15	5,23
Témoin		0	0		

Annexe 3

Les composantes de chaque boîte à moustache de l'analyse croisée



Chemical composition and insecticidal activity of three spontaneous plants from Sahara in relation to *Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus*

Abstract. This work is concerned with the study of the control of the main insect pests of stored foods (*Tribolium castaneum* and *Callosobruchus maculatus*) by the use of secondary metabolites of spontaneous desert plants: *Salsola foetida*, *Cotula cinerea* and *Zygophyllum album*. It comprises 2 activities including the different chemical analyses of plants and biological tests. In this context, the ethanolic extract of each plant was prepared by the Soxhlet device. The yields of ethanol extracts vary from one species to another. The yield of the *Salsola foetida* extract is the highest with a value of 34.1% followed by that of *Cotula cinerea* with a percentage of 22.8% and that of *Zygophyllum album* with a value of 18.2%. Metabolite analysis was performed by 2 devices, namely GC/MS/QTOF gas chromatography and HPLC/MS/QTOF high-performance liquid chromatography. The GC/MS/QTOF results showed the presence of Valeric acid, Glycoaldehyde and Sulfoxycaprylic acid in all three plants. N-Carboxy-methionineresidue and Butanoic acid were identified in both *Cotula cinerea* and *Caroxylon imbricatum* (Forssk.). In addition, N-Butylbenzenesulfonamide was inferred to be present in all three plants; Valine was identified for *Caroxylon imbricatum* and *Cotula cinerea*. Indoline, Benzenesulfonamide and Oxoproline are present in *Caroxylon imbricatum* and *Tetraena alba*. Pyrroline is the only common compound for *Tetraena alba* and *Cotula cinerea* for HPLC/MS/QTOF analysis. The insecticide effect of the three plants was then evaluated. However, the results showed that the three ethanol-based extracts exhibit remarkable toxicity for the treatment of cowpea hazel. Adult mortality from contact with *Salsola foetida* reached 100% for D4 after 72 hours of treatment, the highest value among the three plants. The LD₅₀ values of the three plants were derived from the regression lines; 6.35 mg/ml for *Salsola foetida*, 12.55 mg/ml for *Cotula cinerea* and 36.59 mg/ml for *Zygophyllum album*. The LD₅₀ determines the effectiveness of each treatment. In addition, plant species have a power on the decrease of fertility and fertility of female bunting. The spawning averages for the three extremes were 7.83, 68.05 and 192.6 respectively for *Salsola*, *cotula* and *Zygophyllum album*. In addition, the fertility results were as follows: an average of 10.61 for *Salsola foetida*, a value of 60.65 for *Cotula cinerea* and around 70.25 for *Zygophyllum album*. The means of emergence of the offspring were 8.71, 64.2 and 76.4 respectively for *salsola foetida*, *Cotula cinerea* and *Zygophyllum album*. The effect of the three extracts on adults of *Tribolium castaneum* was evaluated through contact and ingestion. This test shows that both modes of toxicity have almost the same effect on the insect. Adult mortality averages were 19.66 for *Salsola*, 17.16 for *Cotula* and 11.83 for *Zygophyllum*. As well as LD₅₀ are similar for both contact and ingestion effects: 13.87 mg/ml *salsola*, 23.57 mg/ml *cotula* and 48.42 mg/ml *Zygophyllum*. The results of this study can be used to develop an effective pest control strategy for stored grains.

Tribolium castaneum التركيب الكيميائي ونشاط مبيدات الحشرات لثلاثة نباتات عفوية صحراوية فيما يتعلق و **Callosobruchus maculatus**

Callosobruchus و castaneum) ويهتم العمل الحالي بدراسة مكافحة الآفات الحشرية الرئيسية للأغذية المخزنة (Cotula cinerea و Salsola Foetida: باستخدام المستقلبات الثانوية للنباتات الصحراوية العفوية (Zygophyllum و Cotula cinerea هو الأعلى بقيمة 34.1% يليه مستخلص Salsola Foetida من نوع إلى آخر. عائد مستخلص تم إجراء تحليل الأيض بواسطة أجهزة 2، وهي بقيمة 18.2% Zygophyllum بنسبة 22.8% وألبوم كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء. أظهرت نتائج HPLC/MS/QTOF كروماتوغرافيا الغاز و GC/MS/QTOF في جميع النباتات Sulfoxycaprylic acid و Glycoaldehyde و Valeric وجود حمض GC/MS/QTOF و Cotula cinerea في كل من Butanoic acid و N-Carboxy-methionin residue الثلاثة. تم التعرف على N وبالإضافة إلى ذلك، استدل على وجود Caroxylon imbricatum (Forssk.) في جميع النباتات الثلاثة؛ تم التعرف على فالين من أجل Butylbenzenesulfonamide يوجد الإندولين والبنزينسولفوناميد والأوكسوبرولين في كاروكسيلون Cotula cinerea و imbricatum Cotula و Tetraena alba. Pyrroline هو المركب المشترك الوحيد لـ Tetraena alba و imbricatum مع ذلك، أظهرت. ثم تم تقييم تأثير المبيدات الحشرية للنباتات الثلاثة. HPLC/MS/QTOF، لتحليل Cotula cinerea النتائج أن المستخلصات الثلاثة القائمة على الإيثانول تظهر سمية ملحوظة لعلاج بندق اللوبيا. وصلت وفيات البالغين بعد 72 ساعة من العلاج، وهي أعلى قيمة بين النباتات الثلاثة. وكانت D4 من ملامسة سالسولا فوتيدا إلى 100% لقيم الجرعة المميتة 50 للنباتات الثلاثة مستمدة من خطوط الانحدار؛ 6.35 ملغ/مل لفوتيدا سالسولا، 12.55 ملغ/مل بالإضافة إلى ذلك، إسينما كوتولا و 36.59 ملغ/مل لألبوم زيغوفيلوم. يحدد الجرعة المميتة 50 فعالية كل علاج. تتمتع الأنواع النباتية بقوة على تقليل الخصوبة والخصوبة في الرايات الأنثوية. كانت متوسطات التقريخ للأقصى الثلاثة 7.83 و 68.05 و 192.6 على التوالي لسالسولا والكوتولا والزيغوفيلوم. بالإضافة إلى ذلك، كانت نتائج الخصوبة على النحو التالي: 10.61 في المتوسط لسالسولا، بقيمة 60.65 لكوتولا وحوالي 70.25 لزيغوفيلوم. كانت وسائل تم تقييم تأثير المستخلصات الثلاثة. ظهور النسل 8.71 و 64.2 و 76.4 على التوالي لسالسولا والكوتولا والزيغوفيلوم من خلال الاتصال والابتلاع. يوضح هذا الاختبار أن كلا نوعي السمية Tribolium castaneum على البالغين من لهما نفس التأثير تقريباً على الحشرة. وبلغ متوسط وفيات البالغين 19.66 في السالسولا، و 17.16 في الكوتولا، و 11.83 في زيغوفيلوم. بالإضافة إلى الجرعة المميتة 50 متشابهة لكل من تأثيرات التلامس والابتلاع: 13.87 يمكن استخدام نتائج هذه الدراسة لوضع مجم/مل سالسولا، 23.57 مجم/مل كوتولا و 48.42 مجم/مل زيغوفيلوم استراتيجيات فعالة لمكافحة الآفات للحبوب المخزنة.

Composition chimique et activité insecticide de trois plantes spontanées Saharienne : *Salsola foetida*, *Cotula cinerea*, et *Zygophyllum album* vis-à-vis de *Tribolium castaneum* et *Callosobruchus maculatus*

Résumé. Le présent travail s'est intéressé à l'étude de contrôle des principaux insectes ravageurs des denrées stockées (*Tribolium castaneum* et *Callosobruchus maculatus*) par l'utilisation des métabolites secondaires des plantes spontanées du désert : *Salsola Foetida*, *Cotula cinerea* et *Zygophyllum album*. Il comporte 2 activités dont les différentes analyses chimiques des plantes et les tests biologiques. Dans ce contexte, l'extrait éthanolique a été préparé à partir de chaque plante par le dispositif Soxhlet. Les rendements des extraits éthanoliques varient d'une espèce à une autre. Le rendement de l'extrait de *Salsola Foetida* est le plus élevé avec une valeur de 34,1% suivi de celui de *Cotula cinerea* avec un pourcentage de 22.8% et de *Zygophyllum album* avec une valeur de 18.2%. L'analyse des métabolites a été effectuée par les 2 dispositifs suivants: la chromatographie en phase gazeuse GC/MS/QTOF et la chromatographie liquide à haute performance HPLC/MS/QTOF. Les résultats de la GC/MS/QTOF ont montré la présence de Valericacid, Glycoaldehyde et Sulfoxycaprylicacid dans les trois plantes. N-Carboxymethionineresidue et Butanoicacid ont été identifiés dans les deux plantes *Cotula cinerea* et *Salsola foetida*. En outre, On a déduit que N Butylbenzenesulfonamide est présent dans les trois plantes. Valine a été identifié pour *Salsola foetida* et *Cotula cinerea*. Indoline, Benzensulfonamide et Oxoproline sont présents dans *Salsola foetida* et *Zygophyllum album*. Par ailleurs, Pyrroline est le seul composé commun pour *Zygophyllum album* et *Cotula cinerea*, par l'analyse HPLC/MS/QTOF. Ensuite, on a évalué l'effet insecticide des trois plantes. Cependant, les résultats ont montré que les trois extraits à base d'éthanol possèdent une toxicité remarquable pour le traitement contre la bruche de niébé. La mortalité des adultes par contact de *Salsola foetida* a atteint un pourcentage de 100% pour la plus forte dose après les 72 heures de traitement et constitue la valeur la plus élevée entre les trois plantes. Les valeurs de DL50 des trois plantes ont été déduits à partir des droites de régression : 6.35 mg/ml pour *Salsola foetida*, 12.55mg/ml pour *Cotula cinerea* et 36.59 mg/ml pour *Zygophyllum album*. Les DL50 déterminent l'efficacité de chaque traitement. De plus, les espèces de plantes ont un pouvoir sur la diminution de la fécondité et de la fertilité des femelles de la bruche. Les moyennes de ponte pour les trois extraits étaient de 7.83, 68.05 et 192.6 respectivement pour *salsola*, *cotula* et *Zygophyllum*. Par ailleurs, les résultats de la fertilité indiquaient des moyennes d'éclosion des œufs de 10.61 pour *Salsola*, de 60.65 pour *Cotula* et de 70.25 pour *Zygophyllum*. Les moyennes d'émergence de la descendance étaient de : 8.71, 64.2 et 76.4 respectivement pour *salsola*, *cotula* et *Zygophyllum*. On a évalué l'effet des trois extraits sur les adultes de *Tribolium castaneum* par contact et ingestion. Ce test montre que les deux modes de toxicité ont presque le même effet sur l'insecte. En effet, les moyennes de mortalité des adultes étaient de l'ordre de : 19,66 pour *salsola*, de 17,16 pour *cotula* et de 11,83 pour *Zygophyllum*. De même que les DL50 sont similaires pour les deux effets contact et ingestion : 13.87 mg/ml pour *salsola*, 23.57 mg/ml pour *cotula* et 48.42mg/ml pour *Zygophyllum*. Les résultats de cette présente étude peuvent être utilisés dans le but de développer une stratégie de lutte contre les ravageurs des denrées stockées toute en respectant rigoureusement l'environnement.

Copies attachées des publications

Une partie des travaux réalisée dans cette thèse a donné lieu à la publication de deux articles scientifiques dans des revues internationales, Ukrainian Journal Of Ecology et Antibiotics.

Radjai, I., Chakali, G. (2022). Extraction and identification of some metabolites from three Algerian Sahara medicinal plants. Ukrainian Journal of Ecology. 12:57-65. doi: 10.15421/2022_354.

<https://www.ujecology.com/articles/extraction-and-identification-of-some-metabolites-from-three-algerian-sahara-medicinal-plants-90631.html>

Cimmino, A.; Roschetto, E.; Masi, M.; Tuzi, A.; **Radjai, I.; Gahdab, C.**; Paolillo, R.; Guarino, A.; Catania, M.R.; Evidente, A. Sesquiterpene Lactones from *Cotula cinerea* with Antibiotic Activity against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. Antibiotics **2021**, *10*, 819. <https://doi.org/10.3390/antibiotics1007081>

<https://www.mdpi.com/journal/antibiotics>

ORIGINAL ARTICLE

Extraction and identification of some metabolites from three Algerian Sahara medicinal plants

I. Radjai*, G. Chakali

Department of Agricultural and Forestry Zoology, Plant Protection Laboratory in Agricultural and Natural Environments Against Crop Pests in the Regions of Algiers and Blida, National School of Agronomics, El Harrach, 16200, Algiers, Algeria

*Corresponding author E-mail: imerad50@gmail.com

Received: 19-Feb-2022, **Manuscript No.** UJE-22-55007; **Accepted:** 14-Mar-2022, **Pre QC No.** P-55007;

Editor assigned: 23-Feb-2022, **Pre QC No.** P-55007; **Reviewed:** 01-Mar-2022, **QC No.** Q-55007;

Revised: 07-Mar-2022, **Manuscript No.** R-55007; **Published:** 21-Mar-2022.

Metabolites are widely distributed in plant kingdom and have an ample range of biological properties. Several investigations have reported the medical and insecticidal activities. Thus, the objective of this study is to identify and qualify metabolites of three spontaneous plants: *Caroxylon imbricatum*, *Tetraena alba* and *Cotula cinerea* collected from two ecotypes and analyzed by two known conventional methods: Gas Chromatography-Mass Spectrometry GC QTOF (quadrupole time of flight) MS and Liquid Chromatography-Mass spectrometry LCQTOF (quadrupole time of flight) MS. The chemical study revealed the main metabolites which have biological activities as a part of an alternative to synthetic insecticides, including the presence of N-Butylbenzenesulfonamide and Sulfoxycaprylic acid in the three plants. Both N-Carboxy-methionine residue, butanoic acid and valine were found in *Cotula cinerea* and *Caroxylon imbricatum* (Forssk.). While, Artomunoxanthentrione, Glycoaldehyde, Indoline, Benzenesulfonamide and Oxoproline were detected in extracts of *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) and *Tetraena alba* (L.f.). Furthermore, Pyrrolidine is the only compound common in *Cotula cinerea* and *Tetraena alba* (L.f.). A fundamental and applied study on the active compounds of the analyzed plants leads to chemical entities that enter the strategy of a biological control.

Keywords: Spontaneous plants, Metabolites, Insecticidal, Identification, Quantification.

Introduction

The research on the role of plant secondary metabolites as alternative defense to pests has developed considerably. Plant metabolites role against pests has developed considerably in the research for an alternative defence. The biological activity of various secondary metabolites, natural products, have prompted various researchers to take an interest in their medical and insecticidal applications. A variety of metabolites have a defensive role for the plants.

Currently, plant metabolomics are progressively applicable in agrochemistry and especially in biocontrol and development of alternative methods for crop protection (Schradler et al., 2010).

Metabolomics are as well a tool for apprehension plant-microorganism interactions and for the identification of bioactive compounds elaborate in those interactions that could induce inventive biocontrol products (Cedric et al., 2020). In this context, some plant metabolites have been evaluated against some aphids, such as pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). When tested in to evaluate their feeding deterrence and mortality effect on pea aphids by dual choice bioassays, 1-hexadecanol, gliotoxin, cyclopaldic acid and seiridin produced a high feeding deterrence. While aphid mortality was significant for 1-heptadecanol, cytochalasin A, 1-nonadecanol and gliotoxin. Moreover, the phytotoxicity estimation revealed low or non-perceptible plant damaged for cytochalasin A, seiridin and 1-nonadecanol. These results showed seiridin could be used as an alternative to synthetic insecticides. Nevertheless, more studies are required in spite of evaluate its realistic application (Fernández et al., 2018).

Many researchers have reported on the efficacy of plant extracts against insects, mainly those infesting stored products. For example, *Mallotus repandus* leaves and stems extracts have insecticidal activity against *Culex quinquefasciatus* and *Sitophilus Oryzae* (Akhtar et al., 2013, Benzi et al., 2009, Djouahri et al., 2014, Hasan et al., 2015).

Pesticides produced from plants are generally pest-specific and are relatively harmless to organisms. They are also biodegradable and do not pose a risk for the environment. Natural products generally inhibit the development and behaviour of insects (Cedric et al., 2020, Righi et al., 2017). Additionally, they cause early moulting and alter regulatory hormones, consequently insect malformations, sterility, or death (Bhatt et al., 2014).

Some authors (Benzi et al., 2009, Dane et al., 2015) considered that the methanolic extracts of *Artemisia absinthium*, *Juniperus phoenicea*, and *Tetraclinis articulata* have favourable insecticidal and antifungal activities. The test conducted by this investigation showed that the most toxic extract was that of *A. absinthium*, followed by that of *J. phoenicea*, and *T. articulata*. All three extracts reduced the growth of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*. *T. articulata* was the most effective against the fungi. Results revealed the potential of plant methanolic extracts to control pests common to stored grains due to the presence of several phenolic

acids, flavonoid glycosides, and flavonoid aglycones in plant extracts analyzed by UPLC/PDA/MS (Ultra-performance liquid chromatographic photodiode array detector mass spectrometry).

Inuloxins A, B and C and α -costic acid, extracted from aerial parts of *Dittrichia viscosa* were evaluated against the cowpea seed beetle *Callosobruchus maculatus*. The results released that oviposition, adult emergence and sex ratio diversified according to the sex of the treated reproducing partner what indicate that compounds tested can have a property of male (or indirect female) chemosterilants bringing on low fecundity of untreated females that intercoursed with treated males (Gueribis et al., 2019).

(Rotundo et al., 2019) reported that *Dittichia viscosa* compounds, in particular α - and γ -isomers of costic acid have a bio efficacy towards granary weevil *Sitophilus granarius*.

The results of *Schinus molle*, *Mirabilis rotundifolia* and *Satureja calamintha* essential oil effect against *Ryzopertha dominica*, which is the insect most frequently causing serious damages to stored products, showed that the essential oil of *M. rotundifolia* has a significant insecticidal effect, comparably the essential oil of *S. Calamintha* and *S. molle*. The repulsive effect results of the oils tested showed that the three essential oils have a remarkable repelling effect (Righi et al., 2017).

Studies have been performed in various regions of North Africa on the importance and activity of these three Saharan plants metabolites which evolve on saline soils with difficult conditions, characterized by very pronounced drought; whose precipitations does not exceed 20 mm/year. According to inspections conducted in their environment, these spontaneous plants are used in traditional medicine (Mnafgui et al., 2015). Moreover, (Belguidoum et al., 2015, Belmimoun et al., 2016, Fathy et al., 2017, Kchaou et al., 2016, Khallouki et al., 2015, Lakhdari et al., 2015, Lakhdari et al., 2016) are interested in some biological activities among these insecticidal, acaricidal, antibacterial and antioxidant.

About classification and nomenclature, *Cotula cinerea* (Syn. *Brocchia cinerea* (Del) Vis), belonging to the family "Asteraceae", *Tetraena alba* (L.f.) Beier and Thulin (formerly *Zygophyllum album*) *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) Akhani and Roalson (previously *Salsola foetida*) which had changed family from Salsolaceae to Amaranthaceae (Dobignard et al., 2011).

The present study was proposed to provide a qualitative and quantitative analysis of metabolites present in the three plants: *Caroxylon imbricatum* (Forssk.), *Tetraena alba* (L.f.) and *Cotula cinerea* using Gas Chromatography-Mass Spectrometry QTOF and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry QTOF. Here, the investigation focused on the chemical analysis of extracts in order to discover new bioactive molecules and the development of effective biopesticides. The purpose which is to assured protection plants against many pests and protect consumer health from insecticide residues.

Materials and Methods

Plant material

The choice of the plants to be tested was done according to their medicinal importance. Aerial parts of *Tetraena alba* and *Cotula cinerea* were collected in winter 2019 from the Oued Souf area located in southern Estand represented by dry weather. The third plant, *Caroxylon imbricatum* was assembled in august from Adrar area positioned in southern west of Algeria with hyper-dry weather. The Table 1 shows the characteristics study sites. After confirmation of species identified, aerial parts of each plant were air-dried and then powdered by using electric grinder then stored away from humidity in bags of conservation.

Table 1. Characterisation of sampling sites.

Loction	Geographical coordinates	Mean annual temperature	Mean annual precipitation	Area (Km ²)	Altitude a (m)
Oued Souf	33°21'21" N 6°51'47" E	21	77	35706	80
Adrar	27°52'27" N 0°17'37" O	24	12	427300	276

Experimental procedures

The extraction was performed in the laboratory of Genetics, Breeding and Biochemistry Group of Brassicas, Misión Biológica de Galicia (MBG-CSIC) (Pontevedra, Spain). For each extraction method we considered 3 samples of 100 mg per plant.

Gas chromatography-mass spectrometry GC QTOF (quadrupole time of flight)_MS

Samples were prepared by adding 1 mL of ethylacetate, placing them in Vortex during 15 seconds and putting them in the sonicate during 15 minutes. The material thus prepared is centrifuged for 10 minutes to separate the liquid from the solid. Samples were filtered using a 0.2 μ m WHATMAN filter. A dilution of 10 μ L of filtered sample and 990 μ L of ethylacetate was prepared.

Metabolites were analysed using a Gas Chromatograph coupled to a Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometer (GC/QTOF/MS) consisting of a Gas Chromatograph (7890B Agilent Technologies), QTOF Mass Spectrometer (7200 Agilent Technologies) and an autosampler (GC Sampler 120 Agilent Technologies). The column was an HP5-MS (30 m \times 0.25 mm inner diameter, 0.25 μ m film thickness) from Agilent Technologies. The GC/MS/QTOF is used to separate volatile and semi volatile compounds. The separation of the mixture depends on the length and temperature of the column (T=290°C).

Liquid chromatography-mass spectrometry LC/QTOF (quadrupole time of flight)_MS

The extraction method was modified from Plant Metabolomics by Hardy and Hall, chapter 8, Ric de Vos, for Brassicaceae from Plant Metabolomics. Chapter by Ilana Rogachev and Asaph Aharani.

Sample extraction solution

Three products are utilised for this procedure: Methanol (MeOH) HPLC grade, Acetate Buffer: 2.3 mL acetic acid and 3.41 g ammonium acetate in 1 L Milipore, Water the Buffer should have a pH of 4.8, if not adjust with 0.1 M or 0.1 M NaOH (Reagent grade or ACS grade) and Extraction Buffer: mix acetate buffer (25%) with Methanol (75%), e.g., mix 250 mL with acetate buffer with 750 mL methanol.

Extraction process

The solutions were prepared by dissolving 100 mg of biological material into 1 mL extraction solution, shaken in the vortex for 10 seconds and in the sonicate for 5 minutes at 30 Hz. Tubes were centrifuged for 10 minutes, solutions were transferred into a new labelled Eppendorf tube. 1 mL extraction solution was added to the pellet of the 1st extraction, shaken for 10 seconds and in the sonicate during 5 minutes at 30 Hz, centrifuge for 10 minutes at 20,000 g. Then, the supernatant was combined with the one from the first extraction and centrifuged for 5 minutes. Afterwards 200 µL of solution was transferred in a HPLC vial with 800 µL of the extraction solution to obtain a dilution of 1/5. Finally, the vials were transferred to the LC/MS for analysis.

The chromatographic apparatus composed of an LC Agilent Infinity System is equipped with an Infinity 1260 gradient pump, a 1260 HiPals automatic injector, a column thermostat 1290, a photodiode array detector Infinity 1290, Accurate-Mass Quadrupole Time of Flight 6520 (QTOF/MS) Mass Spectrometer equipped with an electrospray ionization source, and a computer with Mass Hunter software for data acquisition and processing (Agilent Technologies). The LC/MS is used to separate soluble and untargeted compounds. It also uses solvents H₂O and Acetonitril for create a gradient of polarity (95% water and 5% acetonitril). The measuring parameters of LC/MS QTOF are: a flow of 0.4 mL/min and a pressure of 250 bar.

Metabolites identification

Metabolites were analysed by GC and LC with QTOF/MS detection. The parameters: retention time, molecular formula, m/z experimental and calculated, m/z of the principal fragments and error and Score were allowed the identification of these compounds. The data bases were considered for identification are Metaboscape from Bruker, Sirius, MetlinScripps and Knapsack metabolomics. Specific software for HPLC is Chromeleon Chromatography Data System.

Results

Identification of compounds by GC/MS/QTOF

The results of the GC/MS analysis showed the presence of a substantial diversity of metabolites. Some compounds for each plant were retained for identification (the most abundant chemical components were chosen). The constituents identified are shown in the Tables 2-4.

Table 2. Chemical composition of *Cotula cinerea* analysed by GC/MS/QTOF.

RT	m/z meas	Formula	MsMs	Compound
2.08	141.00	C ₃ H ₈ O ₂ S ₂	Yes	Ethyl methanethiosulfonate
2.67	90.06	C ₉ H ₂₅ N ₅ O ₂ S	No	Unkonown
2.76	103.07	C ₅ H ₁₀ O ₂	No	Valericacid
7.39	371.10	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₄ S ₂	Yes	Unkonown
9.3	429.09	C ₂₆ H ₂₀ O ₇	No	Unkonown
13.92	371.10	C ₂₇ H ₁₄ O ₂	No	Unkonown
2.17	158.03	C ₆ H ₉ NO ₃ S	Yes	N-Carboxy-methionineresidue
2.17	214.09	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Yes	N-Butylbenzenesulfonamide
2.6	89.06	C ₄ H ₈ O ₂	No	Butanoicacid
2.64	61.03	C ₂ H ₄ O ₂	No	Glycoaldehyde
3.38	214.09	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Yes	N-Butylbenzenesulfonamide
5.62	223.06	C ₈ H ₁₆ O ₆ S	Yes	Sulfoxycaprylicacid
7.16	115.07	C ₆ H ₁₂ O ₃	No	Hydroxyhexanoicacid
7.74	153.12	C ₁₀ H ₁₆ O	No	Perilylcohol
11.65	519.14	C ₁₈ H ₄₈ OS ₈		Unkonown

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number, Ms Ms: tandem mass spectrometry.

Table 3. Chemical composition of *Caroxylon imbricatum* analysed by GC/MS/QTOF.

RT	m/z meas	Formula	MsMs	Compound
2.76	103.07	C ₅ H ₁₀ O ₂	No	Valeric acid
7.39	355.07	C ₂₆ H ₁₀ O ₂	No	Unkonown
7.39	371.1	C ₂₇ H ₁₄ O ₂	Yes	Unkonown
9.3	445.12	C ₂₆ H ₂₀ O ₇	No	Artomunoxanthentrione
9.3	429.09	C ₁₄ H ₃₆ S ₇	No	Unkonown
13.92	371.1	C ₂₇ H ₁₄ O ₂	No	Unkonown
2.17	158.03	C ₆ H ₉ NO ₃ S	Yes	N-Carboxy-methionine residue
2.6	89.06	C ₄ H ₈ O ₂	No	Butanoic acid
2.64	61.03	C ₂ H ₄ O ₂	No	Glycoaldehyde
5.57	225.05	C ₁₄ H ₈ O ₃	No	Hydroxyanthraquinone
5.62	223.06	C ₈ H ₁₆ O ₆ S	Yes	Sulfoxycaprylicacid
7	299.06	C ₂₀ H ₁₀ O ₃	No	Unknown
11.65	519.14	C ₁₈ H ₄₈ OS ₈		Unknown
11.65	503.11	C ₂₆ H ₃₀ O ₂ S ₄	Yes	3-[[4-[(2-hydroxy-3phenylsulfanylpropyl)sulfanylmethyl]phenyl]methylsulfanyl]-2-phenylsulfanylpropanol
13.36	593.16	C ₁₈ H ₅₀ N ₄ O ₂ S ₈	No	Unkonown
16.03	371.1	C ₂₇ H ₁₆ O ₃	Yes	Unkonown

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number, Ms Ms: tandem mass spectrometry.

Table 4. Chemical composition of *Tetrana alba* analysed by GC/MS/QTOF.

RT	m/z meas.	Formula	MsMs	Compound
2.67	90.06	C ₉ H ₂₅ N ₅ O ₂ S	No	Unkonown
2.76	103.07	C ₅ H ₁₀ O ₂	No	Valericacid Acides gras alphetiques
6.7	223.06	C ₁₀ H ₁₀ N ₂ O ₄	No	6,7-Dimethoxyquinazoline-2,4(1H,3H)-dione
7.39	355.07	C ₂₆ H ₁₀ O ₂	No	Unkonown
7.39	371.10	C ₂₇ H ₁₄ O ₂	Yes	Unkonown
8.15	223.06	C ₆ H ₁₄ N ₄ S ₂	No	Unkonown
9.3	445.12	C ₂₆ H ₂₀ O ₇	No	Artomunoxanthentrione
9.3	429.09	C ₂₆ H ₂₀ O ₇	No	Unkonown
2.17	214.09	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Yes	N-Butylbenzenesulfonamide
2.64	61.03	C ₂ H ₄ O ₂	No	Glycoaldehyde
2.76	61.03	C ₂ H ₄ O ₂	No	Glycoaldehyde
3.38	214.09	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Yes	N-Butylbenzenesulfonamide
4.87	149.04	C ₆ H ₆ N ₄ O ₂	No	Methylxanthine
5.62	223.06	C ₈ H ₁₆ O ₆ S	Yes	Sulfoxycaprylicacid
7	299.06	C ₂₀ H ₁₀ O ₃	No	Unkonown
8.49	355.07	C ₂₆ H ₁₂ O ₃	No	Unkonown
13.36	593.16	C ₁₈ H ₅₀ N ₄ O ₂ S ₈	No	Unkonown

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number, Ms Ms: tandem mass spectrometry.

Identification of compounds by LC/MS/QTOF

The results of LC/MS analysis are representing in the Tables 5-7.

The biological material tested revealed a diversity of plant-specific metabolites. Common compounds were identified in the plants tested. It should be noted that for the same retention time, the analyzed metabolites have different spectrometric masses and remain dependent on their composition. The compounds identified for *Cotula cinerea* are: Ethylmethanethiosulfonate, N-Butylbenzenesulfonamide, Glycoaldehyde, Hydroxyhexanoic acid, Perilyl alcohol, Proline, Pipecolic acid, 7-Hydroxy-2-methoxyflavone, Pechueloic acid, N,N-Dimethyldodecylamine N-oxide, Dodecalactone and Octene.

In *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) the following compounds identified are: Hydroxyanthraquinone, Sulfoxycaprylic acid and 3-[[4-[(2-hydroxy-3-phenylsulfanylpropyl) sulfanylmethyl] phenyl] methylsulfanyl]-2-phenylsulfanylpropanol. Valericacid, Methylxanthine and Methylisoxazole are identified from *Tetraena alba*.

Those results reveal the presence of N-Butylbenzensulfonamide and Sulfoxy-caprylic acid in the three plants. N-Carboxy-methionine residue, Butanoic acid and Valine were found in those of *Cotula cinerea* and *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) Artomunoxanthentrione, Glycoaldehyde, Indoline, Benzensulfonamide and Oxoproline were detected in extracts of *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) and *Tetraena alba*. Pyrroline is the only compound common in *Cotula cinerea* and *Tetraena alba*.

Table 5. Chemical composition of *Cotula cinerea* analysed by LC/MS/QTOF.

RT	m/z meas.	Formula	Compound
0.53	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N-Butylbenzensulfonamide
0.95	11.80	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Valine
0.99	11.60	C ₅ H ₉ NO ₂	Proline
0.99	7.00	C ₄ H ₇ N	Pyrroline
1.07	13.00	C ₆ H ₁₁ NO ₂	Pipecolic acid
17.98	36.42	C ₂₁ H ₂₅ N ₅ O	Unkonown
19.96	28.70	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	7-Hydroxy-2-methoxyflavone
20.1	23.11	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	Pechueloic acid
21.74	23.11	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	Same. Could be an isomer or other compound
22.68	23.02	C ₁₄ H ₃₁ NO	N,N-DimethyldodecylamineN-oxide
27.2	30.92	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	Unkonown
27.21	11.11	C ₈ H ₁₄	Unkonown
27.21	19.91	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	Dodecalactone
27.34	29.72	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	Unkonown
29.59	59.32	C ₃₄ H ₃₆ N ₆ O ₄	Unkonown
29.71	23.60	C ₈ H ₉ N ₇ S	Unkonown
30.01	47.73	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ S	Unkonown
31.16	14.90	C ₈ H ₆ O ₄	Unkonown
31.16	11.31	C ₈ H ₁₆	Octene

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number.

Table 6. Chemical composition of *Caroxylon imbricatum* (Forssk.) analysed by LC/MS/QTOF.

RT	m/z meas.	Formula	Compound
3.67	12.00	C ₈ H ₉ N	Indoline
0.53	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N-Butylbenzensulfonamide
0.67	14.10	C ₆ H ₄ O ₂ S	Unkonown
0.65	15.80	C ₆ H ₇ NO ₂ S	Benzensulfonamide
0.77	23.90	C ₅ H ₁₁ N ₄ O ₃ PS	Unkonown
0.83	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N-Butylbenzensulfonamide
0.93	21.70	C ₅ H ₁₀ N ₆ O ₅	Unkonown
0.95	11.80	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Valine
1.54	13.00	C ₅ H ₇ NO ₃	Oxoproline
19.27	46.93	C ₃₁ H ₄₀ N ₄	Unkonown
27.2	30.92	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	Unkonown
27.21	11.11	C ₈ H ₁₄	Unkonown
27.34	29.72	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	Unkonown
29.71	23.60	C ₈ H ₉ N ₇ S	Unkonown
30.01	47.73	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ S	Unkonown
31.16	14.90	C ₈ H ₆ O ₄	Unkonown
31.16	11.31	C ₈ H ₁₆	Unkonown

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number.

Table 7. Chemical composition of *Tetraena alba* analysed by LC/MS/QTOF.

RT	m/z meas.	Formula	Compound
----	-----------	---------	----------

3.67	12.00	C ₈ H ₉ N	Indoline
0.53	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N-Butylbenzensulfonamide
0.66	21.40	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	N-Butylbenzensulfonamide
0.67	14.10	C ₆ H ₄ O ₂ S	Unkonown
0.65	15.80	C ₆ H ₇ NO ₂ S	Benzensulfonamide
0.83	23.60	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ S	Unkonown
0.99	7.00	C ₄ H ₇ N	Pyrroline
1.54	13.00	C ₅ H ₇ NO ₃	Oxoproline
1.54	8.40	C ₄ H ₅ NO	Methylisoxazole
27.2	30.92	C ₁₇ H ₂₆ N ₄	Unkonown
27.21	11.11	C ₈ H ₁₄	Unkonown
27.34	29.72	C ₁₆ H ₃₄ O ₃	Unkonown
29.71	23.60	C ₈ H ₉ N ₇ S	Unkonown
30.01	47.73	C ₂₆ H ₅₄ N ₄ S	Unkonown
31.16	14.90	C ₈ H ₆ O ₄	Unkonown
31.16	11.31	C ₈ H ₁₆	Unkonown

RT: retention time, m/z meas: mass divided by charge number.

Discussion

Many investigations have reported on identification of medicinal plants main constituents because of their interesting biological properties. Essential oil extracted from aerial parts of *Cotula cinerea* analyzed by GC/MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) showed that (E)-citral, limonene epoxide cis-, thymol methyl ether, carvacrol, trans-carveol, carvone and trans-piperitol were the considerable compounds (Djellouli et al., 2015). Likewise, (Chouikh et al., 2015) noted the presence of 3-carène, thujone, santolinatriene and camphor from the oil obtained from a specimen collected in Oued Souf area. Phytochemical characterization of *Cotula cinerea* by GC/MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) showed that the oil contains trans thujone, santalina triène, α -pinène, sabinene, cineole, δ -terpinene, camphor, β -terpineol and terpin-4-ol as the major constituents (BenAmor et al., 2019). The chiral flavanones analysis isolated from methanol extract of *cotula cinerae* aerial parts by TLC methods showed the presence of three compounds: hesperidin, hesperitin and eriodoctyol (Belboukhari et al., 2012).

Khan et al., (2003) reported the identification of three metabolites from whole plant of *Caroxylon imbricatum*: N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(4-methoxyphenyl) prop-2-enamide, N-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxyethyl]-3-(3,4-dimethoxyphenyl) prop-2-enamide and N-[2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxy ethyl] 3-(4-methoxy phenyl)-prop-2-enamide. Those new phenolic compounds have an appreciable antioxidant activity and tyrosinase inhibition. These results are in accordance with many other studies (Asif et al., 2016, Lee et al., 2012, Ghorab et al., 2017, Zhao et al., 2020, Tundis et al., 2007). The primary and secondary metabolites of *salsola collina* were investigated using ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UPLC/ESI/MS/MS). The main compounds were flavonoids, phenolic acids, lipids, amino acids and derivatives. The flavonoids were the major putative antioxidant components (Shipeng et al., 2021). Phytochemical analysis of *Salsola imbricata* showed the presence of anthraquinones, reducing sugar, tannins, saponins, flavonoids, alkaloids and cardiac glycosides (Ajaib et al., 2019). In addition, two new triterpenes have been isolated from *Salsola imbricata* growing in Egypt. Their structures have been established as 3-O-b-D-xylopyranosyl-(1-2)-O-b-D-glucuronopyranosyl-akebonic acid 28-O-b-D-glucopyranoside and 3-O-b-D-xylopyranosyl-(1-2)-O-b-D-glucuronopyranosyl-29-hydroxyoleanolic acid 28-O-b-D-glucopyranoside (Arafa et al., 2011). HPLC (high performance liquid chromatography) and LC/MS (liquid chromatography) analysis was applied to recognize the main components in the ethyl acetate extract D-galacturonic acid, orsellinic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, salicylic acid, vanillic acid, syringic acid, 4-hydroxycinnamic acid, ferulic acid, 4-hydroxybenzoic acid (Xin et al., 2020). Furthermore, *Salsola imbricata* phytochemical screening has been reported and showed the presence of triterpene (Hamed et al., 2011, Uzma et al., 2014).

Also, the evaluation of antioxidant activity of *Tetraena alba* (L.f.) extracts showed that ascorbic acid have a considerable antioxidant effect (Benslama et al., 2016). Two phenolic compounds; Gallic acid and ascorbic acid were extracted from *Tetraena alba* (L.f.) floral honey, had a significantly antioxidant activity (Mesbahi et al., 2019). Phytochemical investigation of the aerial parts of *Zygophyllum coccineum* L. led to the isolation of 3-O- $[\beta$ -D-(2-O-sulphonyl)-quinovopyranosyl] quinovic acid, 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl] quinovic acid, 28-O- β -D-glucopyranosyl ester, 3-O- $[\beta$ -D-quinovopyranosyl] quinovic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester, 3-O- $[\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopyranosyl]quinovic acid, 3-O- $[\alpha$ -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopyranosyl]quinovic acid-28-O- β -D-glucopyranosyl ester, 3-O- $[\beta$ -D-(2-O-sulphonyl)quinovopyranosyl]quinovic acid-28-O- β -D-glucopyranosylester, and 3-O- $[\beta$ -D-(2-O-sulphonyl) glucopyranosyl] quinovic acid, isorhamnetin-3-O-rutinoside, and β -sitosterolglucoside (Amin et al., 2011, Smati et al., 2007). Similar observations have been made for (Ayad et al., 2008): purification and separation conducted by different chromatographic methods induced identification of two compounds, β -sitosterol isolated for the first time in the Zygophyllaceae and 3-O-rhamnoglucosyl isorhamnétine as a new compound of *Zygophyllum* genus.

Phytochemical content of *Cotula cinerea* analyzed to find principal components which may combine its use as a medicinal plant in the southeast of Morocco. The high echinoids and flavonoids quantity (Khallouki et al., 2015). Likewise, the chemical composition was dominated by the presence of oxygenated monoterpenes followed by monoterpene hydrocarbons, oxygenated sesquiterpenes and sesquiterpene hydrocarbons (Djellouli et al., 2015, Fathy et al., 2017, Abdenbi et al., 2014). In addition, (Chouikh et al., 2015) indicated that *cotula cinerea* essential oil analyzed by GC/MS, constituted of 22 chemical compounds dominated by: 3-Carène, Thujone, Santolinatriene and Camphor during the flowering stage. While 21 chemical compounds were obtained during the fruiting period with the dominance: Thujone, 3-Carène, Eucalyptol, Santolinatriene and Camphor. *Cotula cinerea* essential oil and hexane extract have been used in Moroccan traditional medicine as a source of potent anticancer products, due to their various bioactive compounds (Guaouguaou et al., 2018).

Conclusion

The three spontaneous plants collected from desert are rich of metabolites which ones could be applied as a potential source to control pests of insects. Also, it appears that these compounds are cure for some disease and possesses several biological activities such as antifungal, antibacterial, antioxidant. Further investigation on the isolation and identification of biocompounds in the plan may lead to chemical entities with the potential for biocontrol strategy use.

Acknowledgment

The study was funded by the Ministry of High Education and Scientific Research, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, PhD Program, Algeria. We would like to thank everyone who have provided a lot of help during the progress of this experiment. We thank Pablo Velasco (MBG-CSIC) for providing doctoral research collaboration.

References


- Abdenbi, A., Abdelwahed, D., Bouaaza, M., Touati, B. (2014). Screening phytochimique et activite antibacterienne de l'huile essentielle de *Cotula Cinerea* (Gartoufa) dans la région de Bechar. *International Journal of Research in Engineering and Technology*, 2:49-54.
- Ajaib, M., Farooq, S., Khan, K.M., Perveen, S., Shah, S. (2019). Phytochemical analysis and anthelmintic activity of *Salsola imbricata*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 41:198-202.
- Akhtar, M., Arshad, M., Raza, A.B.M., Chaudhary, M.I., Iram, N., Akhtar, N., Mahmood, T. (2013). Repellent effects of certain plant extracts against rice weevil *Sitophilus oryzae* L (Coleoptera:Curculionidae). *International Journal of Agricultural and Applied Sciences*, 5:69-73.
- Amin, E., El-Hawary, S.S., Fathy, M.M., Mohammed, R., Ali, Z., Tabanca, N.J. (2011). Zygophylloside S, a new triterpenoid saponin from the aerial parts of *Zygophyllum coccineum* L. *Planta Medica*, 77:488-491.
- Arafa, I.H., Milena, M., Mohamed, G.S., Usama, A.M., Moatz, M.T., Angela, P., Sonia, P. (2011). Triterpene saponins from *Salsola imbricata*. *Phytochemistry Letters*, 4:353-356.
- Asif, R.M., Younas, M., Schlecht, E. (2016). *In vitro* efficacy of selected medicinal plants from Cholistan desert, Pakistan, against gastrointestinal helminths of sheep and goats. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics*, 117:211-224.
- Ayad, R. (2008). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce: *Zygophyllum cornutum* (Zygophyllaceae). Mémoire de Magister, Université de Constantine, p:124.
- Belboukhari, N., Cheriti, A., Bouanini, M. (2012). Chiral separation of flavanones from *Cotula cinerea* by TLC methods. *Phytochem and Biosub Journal*, 6:2170-1768.
- Belguidoum, M., Dendougui, H., Kendour, Z. (2015). *In vitro* antioxidant properties and phenolic contents of *Zygophyllum album* L. from Algeria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7:510-514.
- Belmimoun, A., Meddah, B., Meddah, A.T., Sonnet, P. (2016). Antibacterial and antioxidant activities of the essential oils and phenolics extracts of *Myrtus communis* and *Zygophyllum album* from Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8:510-552.
- BenAmor, M.L., Benchikha, N., Eman, R., Neghmouche, N.S. (2019). Phytochemical characterization, *in vitro* cytotoxic and antibacterial activity of *Cotula cinerea* (Delile) vis essential oil. *Journal of Natural Remedies*.
- Benslama, A., Harrar, A. (2016). Free radicals scavenging activity and reducing power of two Algerian sahara medicinal plants extracts. *International Journal of Herbal Medicine*, 4:158-161.
- Benzi, V., Stefanazzi, N., Ferrero, A.A. (2009). Biological activity of essential oils from leaves and fruits of pepper tree (*Schinus molle* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 69:154-159.
- Bhatt, P., Thodsare, N., Srivastava, R.P. (2014). Toxicity of some bioactive medicinal plant extracts to Asian army worm, *Spodoptera litura*. *Journal of Applied and Natural Sciences*, 6:139-143.
- Cedric, B., Azucena, G.C., Claire, P.C. (2020). Plant metabolomics to the benefit of crop protection and growth stimulation. *Advances in Botanical Research*.
- Chouikh, A., Mayache, B., Maazi, M.C., Hadeif, Y., Chefrour, A. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils in Xerophytic plant *Cotula cinerea* Del (Asteraceae) during two stages of development:flowering and fruiting ARTIC. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5:029-034.

- Dane, Y., Mouhouche, F., Canela, G.R., Delpino, R.A. (2015). Phytochemical analysis of methanolic extracts of *Artemisia absinthium* L. 1753 (Asteraceae), *Juniperus phoenicea* L., and *Tetraclinis articulata* Mast, (Cupressaceae) 1892 and evaluation of their biological activity for stored grain protection. *Arabian Journal for Science and Engineering*.
- Djellouli, M., Benmehdi, H., Mammeri, S., Moussaoui, A., Ziane, L., Hamidi, N. (2015). Chemical constituents in the essential oil of the endemic plant *Cotula cinerea* (Del.) from the southwest of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5:870-873.
- Djouahri, A., Saka, B., Boudarene, L., Benseradj, F., Aberrane, S., Aitmoussa, S., Chelghoum, C., Lamari, L., Sabaou, N., Baaliouamer, A. (2014). *In vitro* synergistic/antagonistic antibacterial and anti-inflammatory effect of various extracts/essential oil from cones of *Tetraclinis articulata* (Vahl) masters with antibiotic and anti-inflammatory agents. *Industrial Crops and Products*, 56:60-66.
- Dobignard, A., Chatelain, C. (2011). Index synonymique et bibliographique de la flore d'Afrique du Nord. C.J.B.G. Genève:Editeur des conservatoire et Jardin botanique ville de Genève, 2:430.
- Fathy, K.F., Deginash, M.F., Beltagy, A.M., Moataz, B.E.M., Khattab, A.R. (2017). Chemical composition and biological activity of essential oil from *Cotula cinerea* (Del.) growing wildly in the middle east:a short review. *International Journal of Pharmacognosy and Chinese Medicine*.
- Fernández, T.A., Cimmino, A., Masi, M., Rubiales, D., Evidente, A. (2018). Antifeedant activity of long-chain alcohols, and fungal and plant metabolites against pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) as potential biocontrol strategy. *Natural Product Research*, 33:2471-2479.
- Ghorab, H., Khetta, F.A., Lehbili, M., Kabouche, A., Magid, A.A., Harakat, D., Voutquenne, N.L., Kabouche, Z. (2017). A new cardenolide and other compounds from *Salsola tetragona*. *Natural Product Communications*.
- Guaouguaou, F.E., Ahl-Bebaha, M.A., Taghzouti, K., Bouyahya, A., Bakri, Y., Dakka, N., EsSafi, N. (2018). Cytotoxicological investigation of the essential oil and the extracts of *Cotula cinerea* and *Salvia verbenaca* from Morocco. *Biomedical Research International*.
- Gueribis, F., Zermane, N., Khalfi, H.O., Siafa, A., Cimmino, A., Boari, A., Evidente, A. (2019). Bioefficacy 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*.
- Hasan, M.R., Uddin, N., Hasan, M.M., Hossain, M.M., Kamal, M.M., Fatema, K., Mazumder, H.M.L.R., Bashar, K., Rana, M.S. (2015). Larvicidal and insecticidal effects of different extracts of *mallotus repandus* (willd.) Muellarg leaf and stem against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera:Culicidae) and *Sitophilus oryzae* linn. (Coleoptera:Curculionidae). *International Journal of Pharmacy*, 5:127-133.
- Kchaou, M., BenSalah, H., Mnafigui, K., Abdennabi, R., Gharsallah, N., Elfeki, A., Damak, M., Allouche, N. (2016). Chemical composition and biological activities of *Zygophyllum album* (L.) essential oil from Tunisia. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18:1499-1510.
- Khallouki, F., Sellam, K., Koyun, R., Ricarte, I., Alem, C., Elrhaffari, L.,Owen, W.R. (2015). Phytoconstituents and *in vitro* evaluation of antioxidant capacities of *Cotula cinerea* (Morocco) methanol extracts. *Records of Natural Products*, 9:572-575.
- Khan, K.M., Maharvi, G.M., Abbaskhan, A., Hayat, S., Khan, M.T.H., Makhmoor, T., Choudhary, M.I., Shaheen, F., Atta, U.R. (2003). Three tyrosinase inhibitors and antioxidant compounds from *salsola foetida*. *Helvetica Chimica Acta*, p:86.
- Lakhdari, W., Dehliz, A., Acheuk, F., Soud, A., Hammi, H., Mlik, R., Doumandji, M.B. (2015). Acaricidal activity of aqueous extracts against the mite of date palm *Oligonychus afrasiaticus* Meg (Acari:Tetranychidae). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 3:113-117.
- Lakhdari, W., Dehliz, A., Acheuk, F., Mlik, R., Hammi, H., Maatallah, S., Doumandji, M.B. (2016). Biological control assay against date palm diseases by using an aqueous extract of *Zygophyllum album* in the southeast of Algeria. *International Journal of Herbal Medicine*, 4:31-37.
- Lee, H.J., Pan, C.H., Kim, E.S., Kim, C.Y. (2012). Online high performance liquid chromatography (HPLC)-ABTS+ based assay and HPLC-electrospray ionization mass spectrometry analysis of antioxidant phenolic compounds in *Salsola komarovii*. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55:317-321.
- Mesbahi, M.A., Ouahrani, M.R., Rebiai, A., Amara, D.G., Chouikh, A. (2019). Characterization of *Zygophyllum album* L. monofloral honey from el-oued, Algeria. *Current Nutrition and Food Sciences*, 15:476-483.
- Mnafigui, K., Kchaou, M., BenSalah, H., Hajji, R., Khabbabi, G., Elfeki, A., Allouche, N., Gharsallah, N. (2015). Essential oil of *Zygophyllum album* inhibits key-digestive enzymes related to diabetes and hypertension and attenuates symptoms of diarrhea in alloxan-induced diabetic rats. *Pharmaceutical Biology*, pp:1-8.
- Righi, K., Righi, F.A., Boubkeur, A., Boungab, K., Elouissi, A., Djendara, A.C. (2017). Toxicity and repellency of three algerian medicinal plants against pests of stored product: *Ryzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera:Bostrichidae). *Banat's Journal of Biotechnology*.
- Rotundo, G., Paventi, G., Barberio, A., DeCristofaro, 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. *Scientific Reports*, 9:6429.
- Schrader, K.K., Andolfi, A., Cantrell, C.L., Cimmino, A., Duke, S.O., Osbrink, W., Wedge, D.E., Evidente, A. (2010). A survey of phytotoxic microbial and plant metabolites as potential natural products for pest management. *Chemistry and Biodiversity*, 7:2261-2280.
- Shipeng, L., Ye, C., Ying, D., Yinhu, Z., Di, Z., Liyan, Z., Huiyuan, Y. (2021). Widely targeted metabolomics analysis of different parts of *salsola collina* pall. *Molecules*, 26:1126.

- Smati, D., Offer, A.C.M., Miyamoto, T., Hammiche, V., Dubois, M. (2007). Ursane-type triterpene saponins from *Zygophyllum geslini*. *Helvetica Chimica Acta*, 90:712-719.
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Statti, G.A., Menichini, F. (2007). Inhibitory effects on the digestive enzyme-amylase of three *Salsola* species (Chenopodiaceae) *in vitro*. *Pharmazie*, 62:473-475.
- Uzma, M., Anjum, P., Syeda, Q. (2014). Comparative pharmacognostic evaluation of some species of the genera *Suaeda* and *Salsola* leaf (Chenopodiaceae). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27:1309-1315.
- Xin, L.Z., Wen, Y., Zhao, Z.L., Hong, J., Yan, L.G. (2020). *Salsola collina* ethyl acetate extract alleviates diabetic gastroparesis possibly through oxidative stress inhibition. Paper presented at The 3rd International Conference on Agricultural and Food Science, IOP Conference Series:Earth and Environmental Science, 559:012021.
- Zhao, X., Wang, H., Zhang, Z., Jin, H., Gong, Y. (2020). Effects of ethyl acetate extract of *salsola collina* on brain-gut peptides and interstitial cells of gastric Cajal in rats with diabetic gastroparesis. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 23:1218-1224.
-

Citation:

Radjai, I., Chakali, G. (2022). Extraction and identification of some metabolites from three Algerian Sahara medicinal plants. *Ukrainian Journal of Ecology*. 12:57-65.

 This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 License

Article

Sesquiterpene Lactones from *Cotula cinerea* with Antibiotic Activity against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*

Alessio Cimmino ^{1,*}, Emanuela Roscetto ^{2,*}, Marco Masi ¹, Angela Tuzi ¹, Imene Radjai ³, Chakali Gahdab ³, Rossella Paolillo ², Amedeo Guarino ⁴, Maria Rosaria Catania ² and Antonio Evidente ¹

- ¹ Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, Complesso Universitario Monte Sant' Angelo, via Cintia 4, 80126 Napoli, Italy; marco.masi@unina.it (M.M.); angela.tuzi@unina.it (A.T.); evidente@unina.it (A.E.)
- ² Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, via Pansini 5, 80131 Napoli, Italy; rossella.paolillo@unina.it (R.P.); mariarosaria.catania@unina.it (M.R.C.)
- ³ Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Département de Zoologie Agricole et Forestière, Belfort, El-Harrach, Algiers 16200, Algeria; imerad50@gmail.com (I.R.); chakali_gahdab@yahoo.fr (C.G.)
- ⁴ Department of Public Health, Section of Orthopaedic Surgery, University of Naples Federico II, via Pansini 5, 80131 Napoli, Italy; amedeo.guarino1@gmail.com
- * Correspondence: alessio.cimmino@unina.it (A.C.); emanuela.roschetto@unina.it (E.R.)

Abstract: *Cotula cinerea*, belonging to the tribe Anthemideae, is a plant widespread in the Southern hemisphere. It is frequently used in folk medicine in North African countries for several of its medical properties, shown by its extracts and essential oils. The dichloromethane extract obtained from its aerial parts demonstrated antibiotic activity against *Enterococcus faecalis* and was fractionated by bioguided purification procedures affording five main sesquiterpene lactones. They were identified by spectroscopic methods (NMR and ESIMS data) as guaianatrienolides, i.e., 6-acetoxy-1 β -,6-acetoxy-1 α -, and 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaianatrienolide (**1–3**), and germacrenolides, i.e., haagenolide and 1,10-epoxyhaagenolide (**4** and **5**). The absolute configuration was assigned by applying the advanced Mosher's method to haagenolide and by X-ray diffraction analysis to 1,10-epoxyhaagenolide. The specific antibiotic and antibiofilm activities were tested toward the clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. The results showed that compounds **3–5** have antibacterial activity against all the strains of *E. faecalis*, while compound **2** exhibited activity only toward some strains. Compound **1** did not show this activity but had only antibiofilm properties. Thus, these metabolites have potential as new antibiotics and antibiofilm against drug resistant opportunistic pathogens.

Keywords: *Cotula cinerea*; sesquiterpenes; germacrenolides; guaianolides; *Enterococcus faecalis*; antibiotic activity; antibiofilm



Citation: Cimmino, A.; Roscetto, E.; Masi, M.; Tuzi, A.; Radjai, I.; Gahdab, C.; Paolillo, R.; Guarino, A.; Catania, M.R.; Evidente, A. Sesquiterpene Lactones from *Cotula cinerea* with Antibiotic Activity against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 819. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070819>

Academic Editor: Débora C. Coraça-Huber

Received: 10 June 2021
Accepted: 1 July 2021
Published: 6 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

There has been remarkable interest in the last twenty years in the discovery of natural substances as a potential reservoir of innovative therapeutic solutions for human health, with the prospect of integrating and sometimes replacing conventional drugs. In particular, there is a growing interest in the study of natural substances extracted from plants to counter the galloping phenomenon of antibiotic resistance, i.e., the development and spread of microorganisms resistant to the drugs used in anti-infective therapies [1–4]. The misuse and abuse of antimicrobials in humans and animals have accelerated the growing phenomenon of antimicrobial resistance worldwide. Over the last few decades, antibiotic resistance (AR) has become a global threat to health systems and public health around the world. If it cannot be effectively counteracted, it is estimated that by 2050 the spread of multidrug-resistant strains will hamper the control of many infectious diseases, undermining the achievements of modern medicine [5].

Today, two main problems affect the effectiveness of antibiotics. The first is that following the introduction of a new antibiotic, resistance to it will arise sooner or later;

the second is the growing gap between the increase in antimicrobial resistance and the development of new compounds. This means that the pace of discovery and development of new antibiotics is slower than the emergence and spread of resistance mechanisms among bacteria, which are able to respond rapidly to selective pressures and pass resistance genes to the offspring.

About 80% of microbial infections are associated with the formation of biofilm, a film formed by bacteria enclosed in a self-produced extracellular polymeric matrix that adheres to biotic and abiotic surfaces such as those of implantable materials (prostheses, cardiac devices or dental implants) [6–9]. The antimicrobial resistance of biofilms is not genotypic; instead, it occurs due to the multicellular strategies and/or the ability of individual cells, within the biofilm, to differentiate in a phenotypic state tolerant of the action of antimicrobials. Several studies have shown that living bacteria in sessile form are much less susceptible to antibiotics than living bacteria in planktonic form because they are protected by the matrix of the biofilm. In fact, this represents a barrier for antimicrobial agents, blocking or delaying their diffusion, or interacting chemically with the antibiotic [10,11]. Another mechanism responsible for the resistance of biofilms to antimicrobial agents is linked to the timing of cell growth. Cells that live in sessile form have a much slower growth time than planktonic cells and can consequently take on antimicrobial agents more slowly [12]. The fight against AR has therefore been a challenge for doctors and researchers all over the world for more than twenty years.

One of the sources of new antibiotics that have original carbon skeleton to overcome AR are plants. They produce a plethora of bioactive secondary metabolites as thousands of alkaloids, polyketides, phenylpropanoids, phenols, quinones, terpenes, flavanoids, etc. Several of these metabolites are used as defense against pathogens and are involved in electron transport chains, mitochondria function, and membrane integrity [13,14]. Plant metabolites could have different applications in agriculture as biopesticides [15], but they also have several applications in medicine for new drug discovery [16]. Thus, this kingdom has a particular niche, including native plants, many of which were used in folk medicine.

Among them there is *Cotula cinerea* L., syn. *Brocchia cinerea* Del. (Asteraceae), belonging to *Cotula* L., the largest genus in the Anthemideae tribe, which is widespread in the Southern hemisphere, including about 80 species [17]. The Anthemideae was grouped into seven provisional subtribes, and *Cotula* was placed in the group “Cotuleae” by Lloyd (1972) [18]. *C. cinerea*, commonly known as “Al gartoufa”, is used in Morocco as an anti-inflammatory, analgesic, antiseptic treatment and for the treatment of stomachache [19]. In Algerian Sahara, its hydroethanolic and infusion extracts were used for their antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic, and antimicrobial properties [20]. Recently, the antioxidant, antidiabetic, and antilipidemic effects of the aqueous extracts of its aerial parts were assessed [21].

A phytochemical investigation was carried out in 1976 on *C. cinerea* roots and different flavonoids as kaempferitin, quercetrin, quercetin, and kaempferol were isolated [22]. Successively, from another population of the same plant, luteolin and its 7-O- β -D-glucoside, 7-O- β -D-diglycoside and 6-hydroxy-7-O- β -D-glucoside, apigenin, 7-O-L-rhamnoside, 6-C-arabinosyl-8-C-glucosylapigenin, and isochaftoside were isolated as the primary flavonoids as well as to lesser extent the 3-O- β -D-glucoside, 3-O- β -D-galactoside, 7-3-O- β -D-glucoside of quercetin, and 5,3',4'-trihydroxy 3,6,7-trimethoxyflavone [23]. In addition, a characteristic diacetylenic spiroketal enol-ether and several sesquiterpene lactones, three of them being glucosylated, were also isolated from the plant aerial parts [24]. From the same extract, new isofraxidin-derived sesquiterpene ethers and the new 8-farnesylscopoletin were isolated together with known spiroketal-enol ether polyenes and sesquiterpene coumarin ethers [25], and these metabolites seemed to have chemotaxonomic value.

The biological activities of aqueous and organic extracts (ethyl ether, ethyl acetate, and *n*-butanol) obtained from this plant were investigated as the antibacterial activity against *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. [19], as the larvicidal activity against *Anopheles labranchiae* mosquito larvae [26], as the antipyretic activity in rats [27], and as the antifungal

activity against *Fusarium graminearum* and *Fusarium sporotrichioides* [28]. Furthermore, the antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic, and antimicrobial activities of its hydroethanolic and infusion extracts were also described [25]. Finally, it was also used as a bioherbicide for the biological control of the noxious weed *Melilotus indicus* L. [29].

However, up to now any report that exists has described biological activities of the metabolites isolated from this plant, and some of them are only partially chemical characterized. In addition, the organic plant extracts showed variability in the quality and quantity of their components. The differences in chemical profile do not surprise, and as for other plants they could be assigned to several factors, such as the geographical origin, the inter- and intraspecific genetic variability, and the plant vegetative stage.

In our study, organic extracts from *Cotula cinerea* isolated in Algerian Sahara are tested against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. The preliminary antibiotic activity of the CH₂Cl₂ plant extract prompts a complete chemical and biological characterization of the secondary metabolites. Thus, this manuscript reports the complete spectroscopic properties, the absolute stereochemistry of five sesquiterpene lactones belonging to guaianolides and germacrenolides subgroups, and their specific antibiotic and antibiofilm activity against the clinical and reference isolates of *Enterococcus faecalis*.

2. Results and Discussion

The organic extracts of *C. cinerea* obtained using different solvents (in succession *n*-hexane, CH₂Cl₂ and EtOAc) as detailed in Section 3 were assayed at a single high concentration on *Staphylococcus aureus* ATCC 29231, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 747 by standard broth microdilution assay to test the bacterial growth inhibition. Among them, only the CH₂Cl₂ extract showed an antibacterial activity (Table 1), inhibiting in particular only the growth of Gram-positive test strains with 49% ± 2.7 of inhibition for *S. aureus* and 90% ± 1.5 for *E. faecalis*.

Table 1. Antibacterial activity of CH₂Cl₂ extract (500 µg/mL), expressed as percentage of growth inhibition, with ± standard deviation (SD), against Gram-positive and Gram-negative test strains (n.d. = inhibition not detected).

Strain	CH ₂ Cl ₂ Extract % Inhibition
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	49 ± 2.7
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	90 ± 1.5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	n.d.
<i>A. baumannii</i> ATCC 747	n.d.

Markouk et al. (1999) [19] showed that the *n*-butanol extract of *C. cinerea* was active against phytopathogenic strains of *Pseudomonas* and *Bacillus*. The *C. cinerea* *n*-butanol extract was found to be active also against clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *S. aureus* [30]. Ghouti et al. (2018) [20] tested a hydroethanolic extract and infusion of *C. cinerea* against both Gram-negative and Gram-positive bacteria, and the findings showed a higher activity toward Gram-positive ones.

The high efficacy showed by the CH₂Cl₂ plant extract in inhibiting the planktonic growth of *E. faecalis* appeared to be very interesting. *E. faecalis*, a commensal organism of human gastrointestinal tract, is recognized as an important nosocomial pathogen whose control is of paramount importance since this bacterium can cause bacteremia, urinary tract infections, endocarditis, intra-abdominal and pelvic infections, and burn and surgical site wound infections [31–33]. It has also become increasingly recognized as an important pathogen that causes infections of catheters and other implanted medical devices, including those that are orthopedic [34–36]. *E. faecalis* is in fact the most frequently identified species in enterococcal prosthetic joint infection (PJI) [37,38]. In dentistry, *E. faecalis* is particularly prevalent in root canals with a diagnosis of apical periodontitis and has been implicated

as the main pathogen in persistent secondary endodontic infections [39,40]. The success of *E. faecalis* as a pathogen mostly linked to hospital-acquired infections (HAIs) is due to its intrinsic resistance to many antimicrobials and its capacity to acquire new genetic determinants of resistance to different classes of antibiotics. Furthermore, it is capable of forming a well-organized biofilm, which makes it more resistant to antibiotic killing and the action of human immune defenses, and it tolerates extreme environmental conditions (poor nutrient availability, low O₂ potential, alkaline pH) [41]. Furthermore, it can induce hydroxyapatite precipitation in a mature biofilm to form a calcified biofilm [42].

Thus, the active CH₂Cl₂ extract was fractionated by combined column and TLC on direct and reverse phase to afford five pure metabolites. The first investigation of their ¹H NMR and ESI MS spectra showed that they are sesquiterpenoids belonging to different subgroups. They were identified as the guaianolides, i.e., 6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy-1 α - and 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaianatrienolide (1–3, Figure 1), and the germacrenolides, i.e., haagenolide and 1,10-epoxyhaagenolide (4 and 5, Figure 1), by comparing their ¹H NMR and MS data with those reported in literature, in particular for 1–3 with the data reported by Jakupovic et al. (1988) [43] when isolated from the same plant and for 4 and 5 with those reported when isolated, respectively, from the *Inula* species [44] and from *Inula heterolepis* [45].

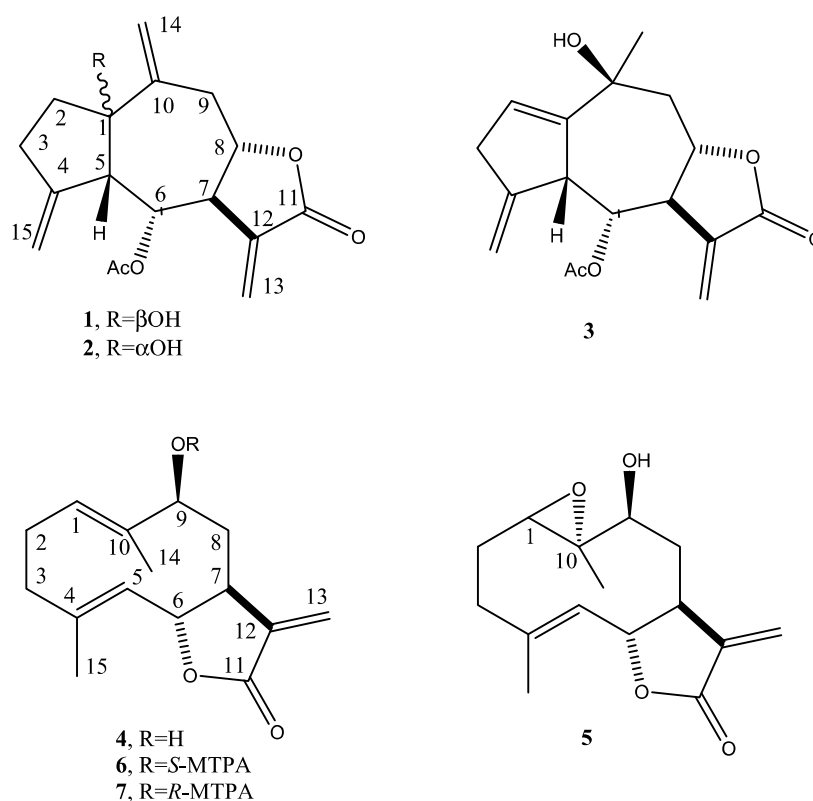


Figure 1. Structure of 6-acetoxy-1 β -, 6-acetoxy-1 α -, and 6-acetoxy-10- β -hydroxyguaianatrienolide, haagenolide, and 1,10-epoxyhaagenolide (1–5), and the diastereomeric *S*- and *R*-MTPA esters of haagenolide (6 and 7).

However, the authors that were cited above only partially reported the ¹H NMR data of the five sesquiterpenoids. Thus, by extensive use of 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR spectra (COSY, HSQC and HMBC), the chemical shifts to all the carbons and protons were assigned for the first time and reported in Tables 2–6.

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR data of 6 α -acetoxy-1 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (1) ^{a,b}.

Position	δC^c	δH (J in Hz)	HMBC
1	84.6 s		H ₂ -14, H-9B, H-6, H-2B
2	37.4 t	2.32 ddd (12.0, 8.7, 3.5) 1.88 br dd (12.0, 7.8, 1.5)	
3	29.8 t	2.68 m 2.43 br dd (15.8, 8.7)	H ₂ -15, H-2A
4	149.1 s		H-6, H-2B
5	55.4 d	2.78 m	H ₂ -15, H-6
6	73.2 d	5.49 dd (5.9, 4.1)	H-8, H-7
7	48.5 d	3.09 br dd (10.9, 5.9)	H ₂ -13, H-9A, H-6
8	75.6 d	4.62 dt (10.9, 8.0)	H ₂ -9
9	38.3 t	3.58 ddt (14.2, 8.0, 1.7) 2.51 dd (14.2, 8.0)	
10	145.6		H ₂ -9
11	169.5		H ₂ -13
12	137.5		H-13A, H-6
13	122.2	6.28 d (4.4) 5.95 d (4.4)	
14	116.9	5.37 br s 5.15 br s	H ₂ -9
15	109.3	5.14 br s 4.98 br s	
CH ₃ CO	169.5		CH ₃ CO, H-6
CH ₃ CO	20.9	2.02 s	

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS. ^b 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , and ^1H (HSQC) NMR experiments delineated the correlations of all the protons and the corresponding carbons. ^c Multiplicities were assigned by DEPT spectrum.

Table 3. ^1H and ^{13}C NMR data of 6 α -acetoxy-1 α -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (2) ^{a,b}.

Position	δC^c	δH (J in Hz)	HMBC
1	84.3 s		H ₂ -14, H-6, H-3A, H-2B
2	37.1 t	2.16 br dd (12.7, 6.8) 1.84 br dd (12.7, 6.3)	
3	31.9 t	2.47 br d (15.0, 6.8) 1.34 m	
4	147.9 s		H-3A, H-2B
5	54.6 d	2.68	
6	72.3 d	5.87 dd (7.8, 5.2)	H ₂ -13, H ₂ -9
7	51.6 d	3.73 br dd (10.0, 7.8)	H ₂ -9
8	77.8 d	4.18 td (10.0, 3.8)	H ₂ -14
9	41.3 t	3.06 (2H) m	H ₂ -9
10	146.0 s		H ₂ -9
11	169.1 s		H ₂ -13
12	138.1 s		H-13A, H-6
13	121.6 t	6.25 d (4.1) 5.76 d (4.1)	
14	113.6 t	5.17 br s 5.08 br s	H ₂ -9
15	109.0 t	5.14 br s 4.85 br s	
CH ₃ CO	170.0 s		CH ₃ CO, H-6
CH ₃ CO	21.2 q	2.10	

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS. ^b 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , and ^1H (HSQC) NMR experiments delineated the correlations of all the protons and the corresponding carbons. ^c Multiplicities were assigned by DEPT spectrum.

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR data of 6 α -acetoxy-10 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (3) ^{a,b}.

Position	δC^c	δH (J in Hz)	HMBC
1	146.9 s		Me-14, H-9, H-6, H-5
2	137.7 d	6.04 br s	H-5
3	39.1 t	3.15 2.88 m ^d	H ₂ -15
4	148.7 s		H-5
5	50.7 d	3.80 br d (6.8)	H ₂ -15
6	75.0 d	5.65 dd (7.8, 6.8)	
7	51.4 d	2.92 m ^d	H-9A
8	74.7 d	4.59 br t (10.5, 2.3)	H ₂ -9
9	48.4 t	2.61 dd (13.2, 2.3) 1.80 br t (13.0)	Me-14
10	69.4 s		Me-14, H-9
11	169.4 s		H ₂ -13
12	137.7 s		H ₂ -13
13	122.2 t	6.25 d (3.3) 5.69 d (3.3)	
14	29.4 q	1.61 br s	
15	109.8 t	5.05 br s 4.96 br s	H-5
CH ₃ CO	170.1 s		CH ₃ CO, H-6
CH ₃ CO	21.3 q	2.07	

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS. ^b 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , and ^1H (HSQC) NMR experiments delineated the correlations of all the protons and the corresponding carbons. ^c Multiplicities were assigned by DEPT spectrum.

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR data of haagenolide (4) ^{a,b}.

Position	δC^c	δH (J in Hz)	HMBC
1	129.4 d	5.12 br d (10.7, 1.2)	H ₂ -3, H-9, Me-14
2	35.6 t	2.00 m	H ₂ -3, Me-15
3	39.4 t	2.38 br t (11.7) 2.07 td (11.7, 4.6)	H-5, Me-15
4	141.3 s		H-6, Me-15
5	127.1 d	4.65 d (9.9)	H-3A, H-6, Me-15
6	81.3 d	4.59 dd (9.9)	H ₂ -8
7	47.3 d	2.69 br td (9.9, 3.5) 2.31 br t (13.8)	H-5, H ₂ -8, H ₂ -13,
8	25.5 t	1.95 ddd (13.8, 10.6, 2.2)	H-6
9	79.7 d	4.26 dd (10.6, 2.2)	H-1, H ₂ -8, Me-14
10	139.0 s	-	H-2, H ₂ -8 Me-14
11	170.0 s	-	H ₂ -13
12	139.2 s	-	H ₂ -13
13	120.1 t	6.31 d (3.5) 5.61 d (3.5)	H-7
14	10.9 q	1.48 s	H-1, H-9
15	17.5 q	1.75 s	H ₂ -3, H-5

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS. ^b 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , and ^1H (HSQC) NMR experiments delineated the correlations of all the protons and the corresponding carbons. ^c Multiplicities were assigned by DEPT spectrum.

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR data of 1,10-epoxyhaagenolide (**5**)^{a,b}.

Position	δC^c	δH (J in Hz)	HMBC
1	67.1 d	2.90 dd (11.2, 2.3)	H-9, H-3B
2	23.4 t	2.14 br ddd (13.7, 4.8, 2.3) 1.50 br ddd (13.7, 11.2, 4.8)	H-3A, H-1
3	35.9 t	2.43 d t (12.5, 4.8) 2.21 m	H-5, Me-15
4	144.6 s		H-6, H-3B, Me-15
5	123.9 d	5.21 d (10.2)	H-3A, Me-15
6	80.2 d	4.62 t (10.2)	H ₂ -8
7	47.2 d	2.70 br t (9.5)	
8	32.9 t	2.29 br d (15.0, 2.0) 1.79 dt (15.0, 9.5)	H-5, H-6, H ₂ -8, H ₂ -13
9	79.9 d	3.24 dd (9.5, 2.0)	H ₂ -8, Me-14
10	64.7 s		H ₂ -8 Me-14
11	170.0 s		H ₂ -13
12	138.7 s		H-13A
13	120.1 t	6.31 d (3.5) 5.61 d (3.5)	
14	11.8 q	1.48 s	H-9
15	17.9 q	1.75 s	H-3A

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS. ^b 2D ^1H , ^1H (COSY) ^{13}C , and ^1H (HSQC) NMR experiments delineated the correlations of all the protons and the corresponding carbons. ^c Multiplicities were assigned by DEPT spectrum.

The relative configuration of **1–5** were supported by correlations observed in their NOESY spectra (see Figures S6, S12, S18, S24 and S30).

The absolute configuration of haagenolide (**4**) was determined by applying the advanced Mosher's method [46] to the hydroxylated methine (C-9). The haagenolide (**4**) was converted into the corresponding *S*-MTPA (**6**) and *R*-MTPA (**7**) monoesters at C-9 (Figure 1) by reaction with *R*-(-)- α -methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetyl (MTPA) and *S*-(+)-MTPA chloride, the spectroscopic data of which were consistent with the structure assigned to **4**.

The ^1H NMR spectra of both **6** and **7** (Table 7) substantially differed from that of **4** for the downfield shift ($\Delta\delta$ 1.27 and 1.24, respectively) of H-9 and for the presence of the proton of benzene ring system and the singlet of the methoxy group at δ 7.508–7.384 and 7.532–7.367 and 3.519 and 3.557, respectively. Subtracting the chemical shifts of the protons (Table 6) of 9-*O*-*S*-MTPA of **4** (**7**) from those of 9-*O*-*R*-MTPA of **4** (**6**) esters, the $\Delta\delta$ (**7–6**) values for all of the protons were determined as reported in Figure 2. The positive $\Delta\delta$ values are located on the right-hand side and the negative values on the left-hand side of model A as reported previously [46]. This model allowed us to assign the *S* configuration to C-9 and consequently the *S* and *R* configuration to C-7 and C-6, respectively. Thus, **4** was formulated as (6*R*,7*S*,9*S*)-5-hydroxy-6,10-dimethyl-3-methylene-3*a*,4,5,8,9,11*a*-hexahydro-3*H*-cyclodeca[*b*]furan-2-one.

For compound **5**, the relative configuration was confirmed by an X-ray analysis carried out on the single crystal obtained by the slow evaporation of CHCl_3 -*i*-PrOH (1/1, *v/v*) in a water-saturated atmosphere at 5 °C. The ORTEP view of the epoxyhaagenolide molecular structure is reported in Figure 3.

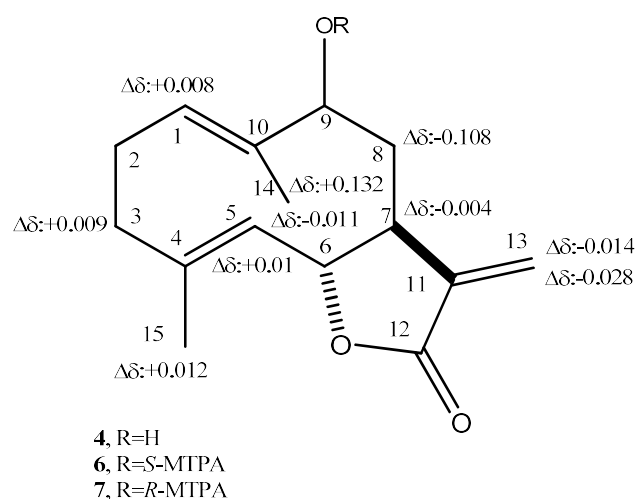


Figure 2. Structures of 9-*O*-*S*- (6) and 9-*O*-*R*-MTPA (7), esters of haagenolide (4), reporting the $\Delta\delta$ values obtained by comparison of each proton system.

Table 7. ^1H NMR data of *R*-MTPA (6) and *S*-MTPA (7) monoesters ^a.

	6	7
Position	δH	δH
2	2.310 (2H)	2.296 (2H)
3	2.388	2.379
5	4.678	4.668
6	4.551	4.562
7	2.753	2.757
8	2.090	2.198
9	2.019	2.100
13	5.482	5.454
14	6.299	6.313
15	5.482	5.510
OMe	1.436	1.304
Ph	1.725	1.713
	3.519	3.557
	7.508–7.384	7.532–7.367

^a The chemical shifts are in δ values (ppm) from TMS.

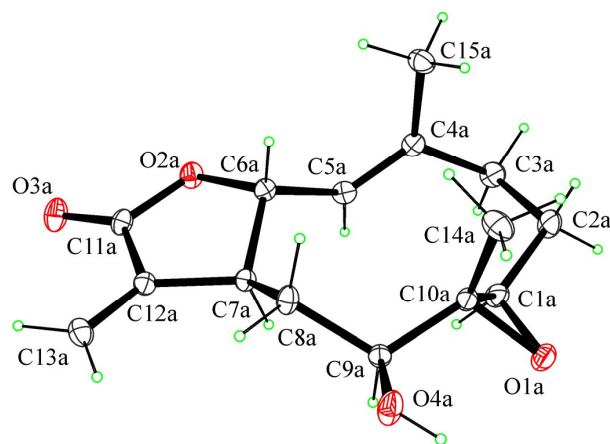


Figure 3. ORTEP view of the molecular structure of 5 with thermal ellipsoids drawn at 30% probability level.

The 1*R*, 6*R*, 7*S*, 9*S*, and 10*R* absolute configurations of **5** at the C1, C6, C7, C9, and C10 stereogenic centers were determined on the basis of the anomalous scattering in the X-ray diffraction data by performing X-ray diffraction data collection according to the literature methods reported to assigning the absolute configuration in light-atom structures when MoK α radiation is used (see Section 3 for details).

As shown in Figure 3, the molecule is a sesquiterpene lactone with a 10-membered ring transfused with a 5-membered lactone ring. The lactone ring is in the conformation twisted on C6–C7. The 10-membered ring adopts the chair–chair–chair conformation with methyl groups in axial positions and hydroxy and 1,10-epoxy groups in equatorial positions (see the Supplementary Materials for crystallographic data).

Sesquiterpenes **1–5** were independently assayed against *E. faecalis* reference strains and four clinical isolates typed by studying the susceptibility profile to antibiotics (Table 8).

Table 8. Antibiotic susceptibility profile performed to Vitek 2 system (bioMérieux) of four clinical isolates of *E. faecalis* and reference strain *E. faecalis* ATCC29212.

Strains	Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g/mL}$)					
	AMP	IM	LIN	TEI	VAN	TIG
EF-91823	≤ 2	≤ 2	2	≤ 0.5	2	≤ 0.25
EF-91804	≤ 2	≤ 2	≤ 0.5	≤ 0.5	1	≤ 0.25
EF-165	≤ 2	≤ 1	2	≤ 0.5	2	≤ 0.12
EF-91705	≤ 2	≤ 1	2	≤ 0.5	1	0.25
ATCC29212	≤ 2	≤ 1	2	≤ 0.5	2	≤ 0.12

AMP = ampicillin, IM = imipenem, LIN = linezolid, TEI = teicoplanin, VAN = vancomycin, TIG = tigecycline.

Compounds were tested by broth microdilution method in a concentration range between 300 and 9 $\mu\text{g/mL}$. At the highest tested concentrations of 150 and 300 $\mu\text{g/mL}$, compounds **3**, **4**, and **5** showed activity against all tested strains while compound **2** was active on four of the five tested strains. Growth inhibition rates ranged from 50 to 90% (Table 9). Compound **1**, on the other hand, did not show inhibitory activity against any of the test strains.

Table 9. Antibacterial activity, expressed as percentage of maximum growth inhibition (GI) (mean percentage \pm SD) of compounds **1–5** at concentrations ranged from 300 to 9 $\mu\text{g/mL}$ against *E. faecalis* test strains.

Strains	Compound 1		Compound 2		Compound 3		Compound 4		Compound 5	
	$\mu\text{g/mL}$	%GI	$\mu\text{g/mL}$	%GI	$\mu\text{g/mL}$	%GI	$\mu\text{g/mL}$	%GI	$\mu\text{g/mL}$	%GI
EF-91804	300	nd	150	78 ± 1.5	150	80 ± 1.1	300	77 ± 1.5	300	82 ± 0.9
EF-91823	300	nd	300	50 ± 1.9	300	51 ± 0.9	300	49 ± 1.1	300	50 ± 1.6
EF-165	300	nd	300	nd	300	90 ± 0.7	300	80 ± 3	300	81 ± 3.3
EF-91705	300	nd	300	49 ± 2.2	300	50 ± 2.3	300	55 ± 2.6	150	80 ± 0.8
ATCC29212	300	nd	300	80 ± 1.1	300	79 ± 1.8	300	70 ± 2.1	300	79 ± 1.5

Considering the activity in the subgroup of guaianolides (**1–3**), the substituent at C-10 seems not important for the activity, while an important structural feature appeared to be the configuration. In fact, the presence of a hydroxy group protruding from the α -side determined inactivity as observed in **1**. In the subgroup of germacrenolides, the nature of the substituents at C-1 and C-10 did not seem to play a role to impart activity.

As described above, enterococci can form biofilms on foreign biomaterials. Bacterial subpopulations within the biofilm characterized by low metabolism have a reduced absorption of antibiotics, especially for the active molecules on the cell wall as beta-lactams and glycopeptides, making the implant-device infections difficult to treat [47–49].

Our interest was to investigate the antibiofilm activity of the five natural metabolites on the test strains of *E. faecalis*, using crystal violet as a staining method for total biofilm biomass quantification. Serial dilutions of compounds **1–5** were tested in microplates

starting from concentrations corresponding to 1/8 or 1/4 of the concentration inhibiting 80% and 50% of planktonic growth, respectively. The compounds, which did not show inhibitory activity against the planktonic form, were tested starting from the concentration of 300 µg/mL (Table 10).

Table 10. In vitro biofilm formation inhibition (BI) of *E. faecalis* test strains, presented as mean percentage ± SD, following overnight treatment with compounds 1–5 at serial dilutions of sub-planktonic growth inhibitory concentrations.

Strains	Compound 1		Compound 2		Compound 3		Compound 4		Compound 5	
	µg/mL	%BI	µg/mL	%BI	µg/mL	%BI	µg/mL	%BI	µg/mL	%BI
EF-91804	150	60 ± 2.8	18	n.d.	18	52 ± 2.4	37	n.d.	37	53 ± 2
EF-91823	150	50 ± 2.1	75	49 ± 3.1	75	55 ± 1.9	75	52 ± 3.1	75	73 ± 1.1
EF-165	150	52 ± 1.7	150	50 ± 2.4	37	62 ± 1.1	37	65 ± 1.8	37	50 ± 1.2
EF-91705	150	55 ± 3.3	75	50 ± 3.6	75	48 ± 2.2	75	50 ± 2.2	37	56 ± 3.4
ATCC29212	150	61 ± 4.1	18	n.d.	18	n.d.	37	n.d.	37	n.d.

Biofilm formation was determined by crystal violet assay; n.d. = not detected (no difference detected with respect to the control, $p > 0.005$).

Compound 1 inhibited biofilm formation by all test strains at a concentration of 150 µg/mL. No significant differences were found between biofilm inhibition percentage at 150 and 300 µg/mL ($p > 0.005$). Compounds 2–5 exhibited a strain-dependent activity at the maximum concentration tested, showing a biofilm inhibition ranging from 50 to 70% for most of the test strains.

The *E. faecalis* biofilm is highly resistant to the action of ampicillin, vancomycin, and linezolid, despite prolonged times of treatment [50,51]. Some authors have tested the in vitro efficacy of antibiotic combinations against enterococci in biofilms, and they showed how rifampicin-containing antibiotic regimes, rifampicin–tigecycline combinations, and fosfomycin-based combinations were able to reduce the number of bacteria in biofilms formed within 24 h [52–54]. However, to date, management strategies in enterococcal PJI are controversial and nonstandardized as well as those in enterococcal endodontic infections, and the disinfection of root canals with commonly used antimicrobial irrigations is very challenging due to cytotoxicity [55–58].

In light of these considerations, these preliminary data encourage further studies aimed to reach improved antibiofilm activity by combining these natural metabolites with conventional antibiotics to fight PJI as well as with endodontic irrigating agents for more effective intracanal medicaments against this microorganism.

3. Materials and Methods

3.1. General Experimental Procedures

¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded at 500 and 400 MHz and at 125 and 100 MHz, respectively, in CDCl₃ by Varian (Palo Alto, CA, USA) and/or Bruker (Karlsruhe, Germany) spectrometers. The same solvent was used as the internal standard. Carbon multiplicities were determined by DEPT spectra [59]. DEPT, COSY-45, HSQC, and HMBC experiments were performed using Bruker microprograms [59]. HR ESIMS and ESIMS were recorded using LC/MS ESIMS-TOF system (Agilent 6230B, HPLC 1260 Infinity) (Milan, Italy). The HPLC separations were performed using a Phenomenex LUNA (C18 (2) 5u 150 × 4.6 mm) (Torrance, CA, USA). Analytical, preparative, and reverse phase thin layer chromatography TLCs were carried out on silica gel (Merck, Kieselgel 60, F₂₅₄, 0.25, 0.5 mm, and RP-18 F_{254s}, respectively) plates (Merck, Darmstadt, Germany). The spots were visualized by exposure to UV radiation, or by spraying first with 10% H₂SO₄ in MeOH, and then with 5% phosphomolybdic acid in EtOH, followed by heating at 110 °C for 10 min. Column chromatography (CC) was performed using silica gel (Kieselgel 60, 0.063–0.200 mm) (Merck, Darmstadt, Germany). All the solvents were supplied by Sigma-Aldrich (Milan, Italy). The balance model used was Analytical Precisa ES 225SM-DR (Dietikon, Switzerland).

3.2. Plant Material

Whole aerial parts of *Cotula cinerea* plants were collected in winter 2019 from the Oued Souf area located in Southern Algeria, which is characterized by dry weather, Saharan climate (33°21'21" N 6°51'47" E; mean annual temperature: 21 °C; mean annual precipitation: 75 mm; elevation: 80 m). Plant samples were dried naturally on laboratory benches at room temperature (24 °C) for 1 month. The dried plant materials were powdered by using a blender and then stored away from humidity in bags of conservation. A specimen of the plant was deposited in the collection of the Nationale Supérieure Agronomique, Département de Zoologie Agricole et Forestière, El-Harrach, Alger, Algeria.

3.3. Isolation of Plant Metabolites

Plant material (100 g) was extracted (1 × 500 mL) by H₂O/MeOH (1/1, v/v) under stirred conditions at room temperature for 24 h; the suspension was centrifuged and the supernatant extracted by *n*-hexane (3 × 300 mL) and successively with CH₂Cl₂ (3 × 300 mL) and, after removing methanol under reduced pressure, with EtOAc (3 × 200 mL). The residue (1.04 g) of CH₂Cl₂ organic extract, which showed specific antibacterial activity against *E. faecalis*, was purified by CC eluted with CHCl₃/*i*-PrOH (9/1, v/v), yielding ten groups of homogeneous fractions (F1–F10). Among them, the residues of fractions F2, F3, and F4 retained antibiotic activity and were further purified using different steps of CC and TLC. F2 was further purified by CC eluted with petroleum ether/acetone (7/3, v/v), yielding seven groups of homogeneous fractions. Fractions F2.2 was further purified by TLC eluted with CHCl₃/*i*-PrOH (95/5, v/v), giving a pure amorphous solid identified as 6-acetoxy-1 α -hydroxyguaianatrienolide (**2**, Rf 0.73, 1.70 mg). F2.3 was further purified by TLC eluted with CHCl₃/*i*-PrOH (95/5, v/v), giving five homogeneous fractions. The third one gave a pure amorphous solid identified as 6-acetoxy-1 β -hydroxyguaianatrienolide (**1**, Rf 0.45, 5.17 mg). The fourth one was further purified by two successive steps of reverse and direct phase TLC eluted with CH₃CN/H₂O (1/1, v/v), and petroleum ether/acetone (8/2, v/v), yielding a pure compound identified as 6-acetoxy-10 β -hydroxyguaianatrienolide (**3**, Rf 0.37, 1.07 mg). F3 was further purified by CC eluted with petroleum ether/acetone (7/3, v/v), yielding seven groups of homogeneous fractions. Fractions F3.2 was further purified by TLC eluted with CH₂Cl₂/*i*-PrOH (95/5, v/v), giving a pure amorphous solid identified as haagenolide (**4**, Rf 0.41, 41.7 mg). F3.3 was further purified by reverse-phase TLC eluted with CH₃CN/H₂O (1/1, v/v), yielding a pure compound which crystallized by CHCl₃/*i*-PrOH (1/1, v/v), identified as 1,10-epoxyhaagenolide (**5**, Rf 0.53, 9.7 mg). This procedure was repeated a few more times using a total of 1.1 kg of plant material.

The characterization and general procedures are described as follows:

6 α -acetoxy-1 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**1**): ¹H and ¹³C NMR data: see Table 2; ESIMS (+), *m/z* 305 [M + H]⁺.

6 α -acetoxy-1 α -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**2**): ¹H and ¹³C NMR data: see Table 3; ESIMS (+), *m/z* 305 [M + H]⁺.

6 α -acetoxy-10 β -hydroxyguaia-4 (15),10(14),11(13)-trien-8 α -12-olide (**3**): ¹H and ¹³C NMR data: see Table 4; ESIMS (+), *m/z* 305 [M + H]⁺.

Haagenolide (**4**): [α]_D²⁵ + 40.0 (c 0.4, CHCl₃) (lit. [44]: [α]_D²⁴ + 38.6 (c 1.0, CHCl₃). ¹H and ¹³C NMR data: see Table 5; ESIMS (+), *m/z* 249 [M + H]⁺.

1,10-Epoxyhaagenolide (**5**): [α]_D²⁵ + 10.0 (c 0.4, CHCl₃) (lit. [45]: [α]_D²⁴ + 7.5 (c 0.24, CDCl₃). ¹H and ¹³C NMR data: see Table 6; ESIMS (+), *m/z* 265 [M + H]⁺.

9-*O*-(*S*)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetate (MTPA) ester of haagenolide (**6**): (*R*)-(-)-MPTA-Cl (10 μ L) was added to **4** (1.1 mg) dissolved in dry pyridine (200 μ L). The reaction was stirred at room temperature for 3 days and then was stopped by adding MeOH. Pyridine was removed by a N₂ stream as azeotrope formed with C₆H₆. The purification of the crude residue by preparative TLC on silica gel, eluted with EtOAc-*n*-hexane (4:6, v/v), gave **6** as a homogeneous solid (0.70 mg, Rf 0.57): ¹H NMR, see Table 7.

9-*O*-(*R*)- α -Methoxy- α -trifluoromethyl- α -phenylacetate (MTPA) ester of haagenolide (**7**): (*S*)-(+)-MPTA-Cl (10 μ L) was added to **4** (1.4 mg) dissolved in dry pyridine (200 μ L).

The reaction was carried out under the same conditions used for preparing 6 from 4. The purification of the crude residue by preparative TLC on silica gel, eluted with EtOAc-*n*-hexane (4:6, *v/v*), gave 7 as a homogeneous solid (0.61 mg, R_f 0.57); ¹H NMR, see Table 7.

3.4. Crystallographic Data of 1,10-Epoxyhaagenolide (5)

Single crystals of 5, which were suitable for X-ray structure analysis, were obtained by slow evaporation of CHCl₃-*i*-PrOH (1/1, *v/v*) in a water-saturated atmosphere at 5 °C. One selected crystal was mounted in flowing N₂ at 173 K on a Bruker-Nonius Kappa CCD diffractometer equipped with an Oxford Cryostream apparatus (graphite monochromated MoK α radiation $\lambda = 0.71073$ Å; CCD rotation images, thick slices; φ and ω scans to fill the asymmetric unit). A semiempirical absorption correction (multiscan, SADABS) was applied. The structure was solved by direct methods using SIR97 program [60] and anisotropically refined by the full matrix least-squares method on F² against all independent measured reflections using the SHELXL-2018/3 [61] and WinGX software [62]. Crystallization solvent water molecules were found in the crystal structure. All the hydroxy and water H atoms were individuated in difference Fourier maps and freely refined with $U_{\text{iso}}(\text{H})$ equal to 1.2 U_{eq} of the carrier atom. All the other H atoms were placed in calculated positions and refined accordingly to a riding model with C–H distances in the range 0.95–1.00 Å and $U_{\text{iso}}(\text{H})$ equal to 1.2 U_{eq} of the carrier atom (1.5 U_{eq} for C_{methyl}). The 1*R*, 6*R*, 7*S*, 9*S*, and 10*R* absolute configurations of 5 at C1, C6, C7, C9, and C10 stereogenic centers were determined by performing X-ray diffraction data collection according to the literature methods reported in order to assign the absolute configuration in light-atom structures when MoK α radiation is used. The calculated absolute parameters and the Bayesian statistics *p* values indicate a very high probability that the absolute configuration is correctly assigned [63–65]. Bijvoet-pair analysis and Bayesian statistics were performed using the program PLATON [66]. The figures were generated using ORTEP-3 [62] and Mercury CSD 4.0 [67]. Structural details are reported in the Supplementary Materials. The crystallographic data for 5 were deposited in the Cambridge Crystallographic Data Centre with deposition numbers CCDC 2076390. These data can be obtained free of charge from the Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif (accessed on 5 July 2021).

Crystallographic Data of 5: (C₁₅H₂₀O₄)₂·H₂O, M = 546.63, orthorhombic, P2₁2₁2₁, $a = 7.6570(15)$ Å, $b = 14.693(3)$ Å, $c = 25.155(3)$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 2830.0(9)$ Å³, $T = 173(2)$ K, $Z = 4$, $D_{\text{calcd}} = 1.283$ Mg/m³, crystal size 0.30 × 0.050 × 0.010 mm, $F(000) = 1176$, absorption coefficient 0.094 mm⁻¹, reflections collected 78093, independent reflections 8560 [$R_{\text{int}} = 0.0502$], final R indices [$I > 2\sigma(I)$], $R1 = 0.0455$, $wR2 = 0.0897$, R indices (all data), $R1 = 0.0667$, $wR2 = 0.1003$. Absolute parameters: Flack x determined using 2540 quotients: 0.1(2); Parsons z : 0.1(2); Bayesian statistics: $P2(\text{true}) = 1.00$, $P3(\text{true}) = 0.896$, $P3(\text{rac-twin}) = 0.104$, $P3(\text{false}) = 0.7 \times 10^{-7}$, Hooft $y = 0.16(14)$, Bijvoet pairs 3724, Friedel coverage 97%. Absolute structure parameters were calculated using the programs SHELXL-2018/3 and PLATON-v30118.

3.5. Test Bacterial Strains and Culture Conditions

Bacterial strains used in this study were reference and clinical strains: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Acinetobacter baumannii* ATCC 747, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and four clinical strains of *E. faecalis* (EF-91823 and EF-91804 isolated from PJI; EF-165 and EF-91705 isolated from bloodstream infections). The strains were obtained from a collection of anonymous clinical isolates previously established at the Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies (University of Naples Federico II). No ethical approval was required for the study because there was no access to patients' data. All strains were stored as 15% (*v/v*) glycerol stocks at –80 °C. Before each experiment, cells were subcultured from the stocks onto TSA plates at 37 °C for 24 h. The strains were identified by MS MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and were characterized by studying the antibiotic susceptibility profile performed on Vitek 2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

3.6. Antimicrobial Assays

Standard broth microdilution method in 96-well polystyrene plates was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts and secondary metabolites using Mueller-Hinton Broth 2 (MHB2) as culture medium. For each test strain, starting from bacterial suspensions with a turbidity of 0.5 McFarland (corresponding to $1\text{--}5 \times 10^8$ cells/mL) and subsequently adjusted to approximately 5×10^6 CFU/mL⁻¹, 100 µL aliquots of the suspension were dispensed in wells in triplicate. Then 100 µL of 500 µg/mL of plant extract solution were added to the wells, and plates were incubated at 37 °C for 19 h under shaking (300 rpm) and under aerobic conditions, except for *E. faecalis* strains, which were incubated under anaerobic conditions. Instead, to test the activity of the five metabolites, the wells were added with equal volumes (100 µL) of the suspensions and twofold serial dilutions starting from 300 µg/mL for each metabolite. Wells with no compounds were used as positive controls (100% growth). Conventional antibiotics as ampicillin and amikacin, selected depending on antibiotic-susceptibility profiles of the test strains, were included as control for Gram positive and Gram negative, respectively. The medium turbidity was measured by a spectrophotometer at 595 nm (Bio-Rad Laboratories S.r.l., Hercules, CA, USA). Antimicrobial activity was expressed as a percentage of microbial growth inhibition. Each assay was performed twice. To be sure that the 2% of DMSO present in the 2× stock solutions of the plant extracts and that metabolites did not act on bacterial growth, the effect of serial dilutions of DMSO starting from 1% on the growth of test strains was separately tested.

3.7. Biofilm Formation Inhibition Assay

Biofilm biomass formed *in vitro* in the presence of the five secondary metabolites was measured using the crystal violet (CV) staining method in flat-bottomed 96-well microplates as described by Stepanović et al. with some modifications [68]. For each strain, a cell suspension in BHI supplemented with 1% (*w/v*) glucose was prepared and diluted to obtain a suspension of 1.5×10^6 CFU/mL. One hundred microliters of this suspension were incubated with 100 µL of serial dilutions of sub-MIC compounds concentrations, showing no influence on planktonic growth of the test strains. The positive controls were compound-free wells. The microtiter was incubated at 37 °C for 24 h. The nonadherent cells were then removed with gentle aspiration and gentle washings with PBS, and the biofilm was dried at 60 °C for 30 min and subsequently stained with 0.1% (*w/v*) crystal violet solution for 30 min. After washing with PBS and solubilization with absolute ethanol to release the dye from the biofilm, absorbance measurement values at 570 nm were obtained using the spectrophotometric reading. The absorbance recorded was correlated to the amount of biofilm produced. The percentage of biofilm mass reduction was calculated using the formula $[(Ac-At)/Ac] \times 100$, where Ac is the OD570 for control wells, and At is the OD570 in the presence of the tested compound.

3.8. Statistical Analysis

Data were represented as the mean \pm standard deviation and analyzed for statistical significance using ordinary one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparisons test. For all tests, $p < 0.005$ was considered to indicate a statistically significant difference.

4. Conclusions

This is the first report on the antimicrobial and antibiofilm activities of three guaiantriolenolides and two germacrenolides isolated from *Cotula cinerea* against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*, a common drug-resistant opportunistic pathogen responsible for important biofilm-related infections. Our results are preliminary data, but we can hypothesize that these natural substances could be a potential alternative for new antibiofilm formulations in strategies for the prevention of persistent infection by *Enterococcus faecalis*. The introduction of modifications in their structure on the basis of structure–function stud-

ies could lead to the synthesis of derivatives with higher antibiofilm activity. In addition, the absolute configuration of two of the three germacranolides was also assigned.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics10070819/s1>. 1D and 2D ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds 1–5 and X-ray data of compound 5.

Author Contributions: Conceptualization, A.C., E.R., M.M. and A.E.; methodology, A.C., E.R., M.M., I.R., A.T. and R.P.; investigation, A.C. and E.R.; data curation, A.C. and E.R.; writing—original draft preparation, A.C., E.R. and A.E.; writing—review and editing, M.R.C., A.C., C.G., A.G. and A.E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Data are contained within the text and the Supplementary Materials.

Acknowledgments: Evidente is associated with Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR, Pozzuoli, Italy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dias, D.A.; Urban, S.; Roessner, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* **2012**, *16*, 303–336. [CrossRef]
2. Thomford, N.E.; Senthebane, D.A.; Rowe, A.; Munro, D.; Seele, P.; Maroyi, A.; Dzobo, K. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1578. [CrossRef] [PubMed]
3. Anastasiou, T.I.; Mandalakis, M.; Krigas, N.; Vézignol, T.; Lazari, D.; Katharios, P.; Dailianis, T.; Antonopoulou, E. Comparative evaluation of essential oils from medicinal-aromatic plants of Greece: Chemical composition, antioxidant capacity and antimicrobial activity against bacterial fish pathogens. *Molecules* **2019**, *25*, 148. [CrossRef] [PubMed]
4. Masi, M.; Roscetto, E.; Cimmino, A.; Catania, M.R.; Surico, G.; Evidente, A. Farnesane-type sesquiterpenoids with antibiotic activity from *Chiliadenus Lopadusanus*. *Antibiotics* **2021**, *10*, 148. [CrossRef] [PubMed]
5. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. Available online: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_EN.pdf?ua=1 (accessed on 8 April 2020).
6. Ciofu, O.; Mandsberg, L.F.; Wang, H.; Høiby, N. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: Implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 215–225. [CrossRef]
7. Percival, S.L.; Suleman, L.; Vuotto, C.; Donelli, G. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: Risk, tolerance and control. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 323–334. [CrossRef] [PubMed]
8. Prada, I.; Micó-Muñoz, P.; Giner-Lluesma, T.; Micó-Martínez, P.; Collado-Castellano, N.; Manzano-Saiz, A. Influence of microbiology on endodontic failure. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2019**, *24*, e364–e372. [CrossRef]
9. Balato, G.; Roscetto, E.; Vollaro, A.; Galasso, O.; Gasparini, G.; Ascione, T.; Catania, M.R.; Mariconda, M. Bacterial biofilm formation is variably inhibited by different formulations of antibiotic-loaded bone cement in vitro. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **2019**, *27*, 1943–1952. [CrossRef] [PubMed]
10. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2017**, *41*, 276–301. [CrossRef] [PubMed]
11. Gebreyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhata, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5*, e02192. [CrossRef]
12. Van Gestel, J.; Vlamakis, H.; Kolter, R. Division of labor in biofilms: The ecology of cell differentiation. *Microbiol Spectr.* **2015**, *3*, 67–97. [CrossRef]
13. Osbourn, A.E.; Lanzotti, V. *Plant-Derived Products*; Springer: Dordrecht, Germany, 2009; ISBN 978-0-38-785497-7.
14. Dewick, P.M. *Medicinal Natural Products—A Biosynthetic Approach*; Wiley and Sons Ltd.: Chichester, UK, 2009; ISBN 978-0-47-074168-9.
15. Marrone, P.G. Pesticidal natural products—Status and future potential. *Pest Man. Sci.* **2019**, *75*, 2325–2340. [CrossRef]
16. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661. [CrossRef] [PubMed]
17. Heywood, V.B.; Harborne, J.B.; Turner, B.L. *The Biology and Chemistry of the Compositae*; Academic Press: New York, NY, USA, 1977.
18. Lloyd, D.G. A revision of the New Zealand, Subantarctic, and South American species of *Cotula*, section *Leptinella*. *N. Z. J. Bot.* **1972**, *10*, 277–372. [CrossRef]
19. Markouk, M.; Redwane, A.; Lazrek, H.B.; Jana, M.; Benjama, A. Antibacterial activity of *Cotula cinerea* extracts. *Fitoterapia* **1999**, *70*, 314–316. [CrossRef]

20. Ghouti, D.; Rached, W.; Abdallah, M.; Pires, T.C.; Calhelha, R.C.; Alves, M.J.; Abderrahmane, L.H.; Barros, L.; Ferreira, I.C. Phenolic profile and in vitro bioactive potential of Saharan *Juniperus phoenicea* L. and *Cotula cinerea* (Del) growing in Algeria. *Food Funct.* **2018**, *9*, 4664–4672. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Amssayef, A.; Eddouks, M. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of *Cotula cinerea* (Del) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets* **2020**, *20*, 1504–1513. [[CrossRef](#)]
22. Mahran, G.H.; Salah, M.A.; Ansary, S.M. A study of the flavonoid content of *Cotula cinerea* Del. *Bull. Far. Pbann. (Cairo Univ.)* **1976**, *14*, 237.
23. Ahmed, A.A.; El-Sayed, N.H.; El-Negoumy, S.I.; Mabry, T.J. Flavonoids of *Cotula cinerea*. *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 519–520. [[CrossRef](#)]
24. Metwally, M.A.; El-Dahmy, S.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; Dawidar, A.M.; Metwally, S.A. Glaucolide-like sesquiterpene lactones from *Cotula cinerea*. *Phytochemistry* **1985**, *25*, 255–257. [[CrossRef](#)]
25. Greger, H.; Hofer, O. Sesquiterpene-coumarin ethers and polyacetylenes from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 85–88. [[CrossRef](#)]
26. Markouk, M.; Bekkouche, K.; Larhsini, M.; Bousaid, M.; Lazrek, H.B.; Jana, M. Evaluation of some Moroccan medicinal plant extracts for larvicidal activity. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *73*, 293–297. [[CrossRef](#)]
27. Larhsini, M.; Markouk, M.; Jaouhari, J.T.; Bekkouche, K.; Lazrek, H.B.; Jana, M. The antipyretic activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 97–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Salhi, N.; Mohammed Saghir, S.A.; Terzi, V.; Brahmi, I.; Ghedairi, N.; Bissati, S. Antifungal activity of aqueous extracts of some dominant Algerian medicinal plants. *BioMed Res. Int.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hemada, M.M.; El-Darier, S.M. Management of a noxious weed; *Melilotus indicus* L. via allelopathy of *Cotula cinerea*. *Int. J. Adv. Res.* **2015**, *3*, 553–561.
30. Bensizerara, D.; Menasria, T.; Melouka, M.; Cheriet, L.; Chenchouni, H. Antimicrobial activity of xerophytic plant (*Cotula cinerea* Delile) extracts against some pathogenic bacteria and fungi. *J. Appl. Biol. Sci.* **2013**, *6*, 266–271. [[CrossRef](#)]
31. Guiton, P.S.; Hannan, T.J.; Ford, B.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. *Enterococcus faecalis* overcomes foreign body-mediated inflammation to establish urinary tract infections. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 329–339. [[CrossRef](#)]
32. O’Driscoll, T.; Crank, C.W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect. Drug Resist.* **2015**, *24*, 217–230.
33. Ch’ng, J.H.; Chong, K.K.L.; Lam, L.N.; Wong, J.J.; Kline, K.A. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 82–94. [[CrossRef](#)]
34. El Helou, O.C.; Berbari, E.F.; Marculescu, C.E.; El Atrouni, W.I.; Razonable, R.R.; Steckelberg, J.M.; Hanssen, A.D.; Osmon, D.R. Outcome of enterococcal prosthetic joint infection: Is combination systemic therapy superior to monotherapy? *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *47*, 903–909. [[CrossRef](#)]
35. Zimmerli, W.; Trampuz, A.; Ochsner, P.E. Prosthetic-joint infections. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1645–1654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Stefánsdóttir, A.; Johansson, D.; Knutson, K.; Lidgren, L.; Robertsson, O. Microbiology of the infected knee arthroplasty: Report from the Swedish Knee Arthroplasty Register on 426 surgically revised cases. *Scand. J. Infect. Dis.* **2009**, *41*, 831–840. [[CrossRef](#)]
37. Rasouli, M.R.; Tripathi, M.S.; Kenyon, R.; Wetters, N.; Della Valle, C.J.; Parvizi, J. Low rate of infection control in enterococcal periprosthetic joint infections. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2012**, *470*, 2708–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Davidson, D.J.; Spratt, D.; Liddle, A.D. Implant materials and prosthetic joint infection: The battle with the biofilm. *EFORT Open Rev.* **2019**, *4*, 633–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Barbosa-Ribeiro, M.; De-Jesus-Soares, A.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.R.; Almeida, J.F.A.; Gomes, B.P.F.A. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *J. Endod.* **2016**, *42*, 552–556. [[CrossRef](#)]
40. Alghamdi, F.; Shakir, M. The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus* **2020**, *12*, e7257. [[CrossRef](#)]
41. García-Solache, M.; Ricea, L.B. The enterococcus: A model of adaptability to its environment. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00058-18. [[CrossRef](#)]
42. Del Fabbro, M.; Samaranyake, L.P.; Lolato, A.; Weinstein, T.; Taschieri, S. Analysis of the secondary endodontic lesions focusing on the extraradicular microorganisms: An overview. *J. Investig. Clin. Dent.* **2014**, *5*, 245–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Jakupovic, J.; Aal, M.A.; Eid, F.; Bohlmann, F.; El-Dahmy, S.; Sarg, T. Further glaucolides and other sesquiterpene lactones from *Brocchia cinerea*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2219–2224. [[CrossRef](#)]
44. Bohlmann, F.; Mahanta, P.K.; Jakupovic, J.; Rastogi, R.C.; Natu, A.A. New sesquiterpene lactones from *Inula* species. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1165–1172. [[CrossRef](#)]
45. Bohlmann, F.; Ates, N.; Grenz, M. New germacranolides from *Inula heterolepis*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1166–1168. [[CrossRef](#)]
46. Cimmino, A.; Masi, M.; Evidente, M.; Superchi, S.; Evidente, A. Application of Mosher’s method for absolute configuration assignment to bioactive plants and fungi metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *144*, 59–89. [[CrossRef](#)]
47. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lebeaux, D.; Ghigo, J.M.; Beloin, C. Biofilm-related infections: Bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78*, 510–543. [[CrossRef](#)]

49. Zaborowska, M.; Tillander, J.; Brånemark, R.; Hagberg, L.; Thomsen, P.; Trobos, M. Biofilm formation and antimicrobial susceptibility of staphylococci and enterococci from osteomyelitis associated with percutaneous orthopaedic implants. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2017**, *105*, 2630–2640. [[CrossRef](#)]
50. Sandoe, J.A.; Wysome, J.; West, A.P.; Heritage, J.; Wilcox, M.H. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 767–770. [[CrossRef](#)]
51. Bayston, R.; Ullas, G.; Ashraf, W. Action of linezolid or vancomycin on biofilms in ventriculoperitoneal shunts in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2842–2845. [[CrossRef](#)]
52. Minardi, D.; Cirioni, O.; Ghiselli, R.; Silvestri, C.; Mocchegiani, F.; Gabrielli, E.; d’Anzeo, G.; Conti, A.; Orlando, F.; Rimini, M.; et al. Efficacy of tigecycline and rifampin alone and in combination against *Enterococcus faecalis* biofilm infection in a rat model of ureteral stent. *J. Surg. Res.* **2012**, *176*, 1–6. [[CrossRef](#)]
53. Tang, H.J.; Chen, C.C.; Zhang, C.C.; Su, B.A.; Li, C.M.; Weng, T.C.; Chiang, S.R.; Ko, W.C.; Chuang, Y.C. In vitro efficacy of fosfomycin-based combinations against clinical vancomycin-resistant *Enterococcus* isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *77*, 254–257. [[CrossRef](#)]
54. Oliva, A.; Furustrand Tabin, U.; Maiolo, E.M.; Jeddari, S.; Bétrisey, B.; Trampuz, A. Activities of fosfomycin and rifampin on planktonic and adherent *Enterococcus faecalis* strains in an experimental foreign-body infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1284–1293. [[CrossRef](#)]
55. de Sermeño, R.F.; da Silva, L.A.; Herrera, H.; Herrera, H.; Silva, R.A.; Leonardo, M.R. Tissue damage after sodium hypochlorite extrusion during root canal treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2009**, *108*, e46–e49. [[CrossRef](#)]
56. Mohammadi, Z.; Abbott, P.V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int. Endod. J.* **2009**, *42*, 288–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Tornero, E.; Senneville, E.; Euba, G.; Petersdorf, S.; Rodriguez-Pardo, D.; Lakatos, B.; Ferrari, M.C.; Pilares, M.; Bahamonde, A.; Trebse, R.; et al. Characteristics of prosthetic joint infections due to *Enterococcus* sp. and predictors of failure: A multi-national study. *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 1219–1224. [[CrossRef](#)]
58. Maale, G.E.; Eager, J.J.; Srinivasaraghavan, A.; Mohammadi, D.K.; Kennard, N. The evolution from the two stage to the one stage procedure for biofilm based periprosthetic joint infections (PJI). *Biofilm* **2020**, *2*, 100033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Berger, S.; Braun, S. *200 and More Basic NMR Experiments—A Practical Course*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004.
60. Altomare, A.; Burla, M.C.; Camalli, M.; Cascarano, G.L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A.G.G.; Polidori, G.; Spagna, R.J. SIR97: A new tool for crystal structure determination and refinement. *Appl. Cryst.* **1999**, *32*, 115–119. [[CrossRef](#)]
61. Sheldrick, G.M. SHELXT—Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Cryst.* **2015**, *C71*, 3–8. [[CrossRef](#)]
62. Farrugia, L.J. WinGX and ORTEP for Windows: An update. *J. Appl. Cryst.* **2012**, *45*, 849–854. [[CrossRef](#)]
63. Escudero-Adan, E.C.; Benet-Buchholz, J.; Ballester, P. The use of Mo K α radiation in the assignment of the absolute configuration of light-atom molecules; the importance of high-resolution data. *Acta Cryst.* **2014**, *B70*, 660–668. [[CrossRef](#)]
64. Parsons, S.; Flack, H.D.; Wagner, T. Use of intensity quotients and differences in absolute structure refinement. *Acta Cryst.* **2013**, *B69*, 249–259. [[CrossRef](#)]
65. Parsons, S. Determination of absolute configuration using X-ray diffraction. *Tetrahedron Asymmetry* **2017**, *28*, 1304–1313. [[CrossRef](#)]
66. Spek, J.A.L. Single-crystal structure validation with the program PLATON. *Appl. Crystallogr.* **2003**, *36*, 7–13. [[CrossRef](#)]
67. Macrae, C.F.; Bruno, I.J.; Chisholm, J.A.; Edgington, P.R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P.A. Mercury CSD 2.0—New features for the visualization and investigation of crystal structures. *J. Appl. Cryst.* **2008**, *41*, 466–470. [[CrossRef](#)]
68. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]