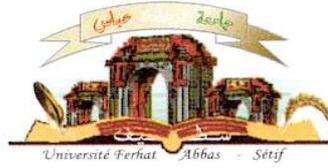


الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

LEBLALTA Amina

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: AGRONOMIE

Spécialité: PROTECTION DES VÉGÉTAUX

THÈME

**Activités insecticide et antifongique des extraits et de l'huile
essentielle de *Mentha rotundifolia* (Linné, 1762)**

Soutenue publiquement le 11/11/2018

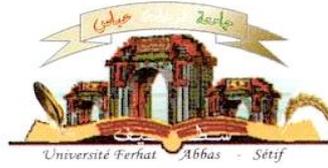
DEVANT LE JURY

Président	BOUNECHADA Mustapha	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examineurs	FRAH Naama	Pr. Université El Hadj Lakhdar Batna 1
	GUEZOUL Omar	Pr. Université Kasdi Merbah Ouargla
	SENOUSSI Abdelhakim	Pr. Université Kasdi Merbah Ouargla
	ROUAG Noureddine	MCA. Université Ferhat Abbas Sétif 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES

N°...../SNV/2018

THÈSE

Présentée par

LEBLALTA Amina

Pour l'obtention du diplôme de

DOCTORAT EN SCIENCES

Filière: AGRONOMIE

Spécialité: PROTECTION DES VÉGÉTAUX

THÈME

**Activités insecticide et antifongique des extraits et de l'huile
essentielle de *Mentha rotundifolia* (Linné, 1762)**

Soutenue publiquement le 11/11/2018

DEVANT LE JURY

Président	BOUNECHADA Mustapha	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Directeur	HARZALLAH Daoud	Pr. Université Ferhat Abbas Sétif 1
Examineurs	FRAH Naama	Pr. Université El Hadj Lakhdar Batna 1
	GUEZOUL Omar	Pr. Université Kasdi Merbah Ouargla
	SENOUSSI Abdelhakim	Pr. Université Kasdi Merbah Ouargla
	ROUAG Noureddine	MCA. Université Ferhat Abbas Sétif 1

Laboratoire de Microbiologie Appliquée

Remerciements

Les travaux de recherches de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire de Microbiologie Appliquée FSNV-UFA Sétif 1, sous la direction du Professeur HARZALLAH Daoud. Je lui exprime ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé sa confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années de recherches. Son expérience, sa patience et ses encouragements m'ont été bénéfiques. Ses précieux conseils et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail de recherche. Qu'il trouvera ici toute mon affection et mes remerciements pour son encadrement.

Ma plus profonde gratitude va au Professeur BOUNECHADA Mustapha FSNV- UFA Sétif 1 pour m'avoir honoré en acceptant de présider le Jury. Le destin a bien voulu qu'il soit président de mon jury plutôt qu'être mon encadreur. Je le remercie pour ses conseils toujours pertinents, pour son enthousiasme et pour son soutien moral et professionnel non seulement pendant les années de la thèse mais aussi pendant toutes mes années à la faculté SNV de Sétif. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

Mes chaleureux remerciements vont au Professeur FRAH Naama, Département d'Agronomie, Université Batna 1, d'avoir accepté avec bonne volonté d'être parmi les membres de jury pour évaluer cette thèse. C'est un honneur et un immense plaisir de présenter mon travail devant elle.

Un immense merci pour le Professeur SENOUSSEI Abdelhakim, Département d'Agronomie, Université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir aimablement accepté de faire partie du jury.

J'exprime également mes remerciements au Professeur GUEZOUL Omar, Département d'Agronomie, Université Kasdi Merbah Ouargla, d'avoir accepté de juger cette thèse.

Mes plus sincères remerciements vont au Dr. ROUAG Noureddine FSNV Sétif 1, pour avoir bien accepté examiner et juger mon travail. Il m'a beaucoup apporté pendant la réalisation de cette recherche, il m'a également fait partager sa sagesse et ses conseils et par sa disponibilité et sa manière de faciliter les tâches il m'a permis de découvrir et d'appréhender l'univers des champignons.

Mes vifs remerciements vont au Professeur AKKAL Salah, Université Frères Mentouri Constantine, qui m'a beaucoup aidé pendant la réalisation de ce travail et même pour l'encadrement des étudiants en effectuant les analyses GC/MS de leurs échantillons. Je suis

profondément reconnaissante pour sa gentillesse, sa sympathie, son dévouement et en particulier son aide pour bénéficier d'un stage au niveau du laboratoire de Phytochimie à l'université de Çankırı Karatekin (Turquie), sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir. Je le remercie aussi

Ma reconnaissance va également au Pr. DHAMNA Saliha, FSNV-UFA Sétif 1, pour m'avoir si cordialement aidé, pour sa disponibilité et la pertinence de ses conseils. Je remercie également Pr. LAOUAR Hocine, monsieur et madame SELINI, Dr. AOUF Hakim, Dr. MOUAFAK Nacer, Pr. TEDJAR Laamri, pour leur aide précieuse.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr. BOULAACHAB Nacira, Département de Pharmacie, UFA Sétif 1, pour sa contribution au choix et à l'identification de la plante étudiée. Je remercie également Dr. ROUABHI Amar, Département d'Agronomie, UFA Sétif 1, pour ses sages conseils, sa disponibilité et son aide lors de l'analyse statistique des résultats.

Mes remerciements vont également à l'ensemble des doctorants, des enseignants chercheurs du laboratoire de Microbiologie Appliquée dans lequel ce travail a été réalisé, pour la sympathie qu'ils m'ont témoigné, pour tous les moments passés ensemble, pour leur aide, leur disponibilité et leur serviabilité à chaque fois que je désirais avancer dans la recherche, qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond remerciement.

Je remercie également Pr. DEMIRTAS Ibrahim de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Phytochimie à l'Université de Çankırı Karatekin (Turquie), sa sympathie et ses précieuses discussions m'ont donné d'importantes idées durant mon séjour scientifique en Turquie. Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé avec qui j'ai partagé des bons moments et qui ont rendu plus agréable mon séjour au sein de ce laboratoire. Je leur serai toujours reconnaissante pour leur disponibilité, pour leur aide et leurs conseils et je pense spécialement à OKE-ALTUNTAS Feyza (pour ses déplacements pour l'activité antioxydante), SAHIN YAGLIOGLU Ayse (pour la réalisation de l'activité antiproliférative), KARAKOÇ Ömer Cem (pour avoir bien s'occuper du test insecticide), GÜL Fatih (pour les analyses GC/MS et HPLC), OKAY Sezer (pour l'activité antibactérienne), TÜFEKÇI Ali Rıza (pour ses conseils et ses encouragements), ALTUN Muhammed (pour son aide et sa disponibilité pendant le Bayram), DEMIRCI Mehmet Ali (pour l'analyse de la RMN), IPEK Yasar (pour son aide précieuse) et un grand merci à KOLDAŞ Serkan, thésard, pour sa disponibilité, son aide précieuse et sa sympathie.

L'identification moléculaire des souches fongiques n'aurait jamais été réalisée sans l'aide du Dr. CHERRAD Semcheddine, responsable de la division sites et sols pollués au Laboratoire Conidia conseil expert en moisissures, Lyon (France). Tous mes remerciements pour les efforts fournis volontairement.

Je remercie spécialement Mr BOUDJADI Abdelhamid, ingénieur de laboratoire de Chimie, Faculté des Sciences, pour son aide irremplaçable, pour son assistance et ses conseils précieux au niveau de la lecture et la correction de cette thèse.

Je ne peux penser à mes enseignants sans remercier ici du fond du cœur Mm DOUMANDJI Hafiza pour son soutien lors des moments difficiles que j'ai pu traverser ces dernières années. Je la remercie profondément de sa disponibilité, de son aide, de sa gentillesse et de ses conseils permanents tout au long de ma thèse et également pour la relation d'amitié qui a été établie et de son agréable compagnie.

Parmi les gens qui m'ont formé, j'adresse toute ma gratitude au Dr. DEHIMI Mohamed Laaziz pour son soutien, sa disponibilité, sa patience, ses conseils toujours pertinents et pour le fait de m'avoir fait partager son expérience.

Je dois beaucoup à Mr. ZERARI Abbas, pour son aide précieuse à fournir les produits phytosanitaires. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite remercier Mr. BOUTOUCHENT Toufik qui m'a toujours soutenu et pour l'intérêt qu'il a porté à la documentation scientifique.

Merci également à tous les collègues qui m'ont soutenue au cours de ce travail. Je n'ose pas citer de noms par peur d'oublier quelqu'un ! J'espère que vous vous reconnaitrez.

Je ne saurais terminer mes remerciements sans penser à tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé et encouragé au cours de la réalisation de ce travail, qu'ils reçoivent mes remerciements sincères.

...À la mémoire de Hayri

ملخص

يشهد استخدام المبيدات الحيوية رغبة متجددة في حماية النباتات . سلطت هذه الدراسة الضوء على نشاط المبيد الحيوي للمستخلصات والزيت الأساسي لـ *Mentha rotundifolia* التي تقطت في منطقة سطيف ، لمحاربة آفات مختلفة. كشف تحليل HPLC عن غنى المستخلصات المدروسة بـ scutellarin الذي سجل مستخلص الميثانول أعلى تركيز له (40.24 مجم / كجم). أظهر تحليل الزيت الأساسي بواسطة GC / MS وجودًا سائدًا لـ 3-Cyclopenten-1-one و 2-(3-methyl-2-butenyl-3-hydroxy) - بنسبة 89.09% ، مركب لم يسبق العثور عليه في الزيت العطري لـ *M. rotundifolia*. سجل نشاط المبيد الحشري عن طريق الاتصال واستنشاق الزيوت الأساسية والمركب المعزول من هذا الزيت ضد سوسة القمح *Sitophilus granarius* ، معدل وفيات كامل تم الحصول عليه بعد 24 ساعة من الحضانة. أظهر نشاط المبيدات الحشرية من الزيت العطري لـ *M. rotundifolia* ضد *Rhopalosiphum padi* و *Sitobion avenae* ، من الحبوب ، زيادة في الوفيات اعتمادًا على مدة تعرض حشرات المن للزيوت واعتمادًا على التركيزات المدروسة. هذا الزيت العطري له تأثير طارد قوي ضد *R. padi* و *S. avenae*. أظهر النشاط المضاد للفطريات في المختبر ، بعد 7 أيام من الحضانة ، من المستخلص الإيثانولي والميثانولي ضد *Fusarium* و *Alternaria alternata* و *oxysporum* ، فطريات معزولة من الطماطم ، تثبيطًا معنويًا لنمو الفطريين . كشف النشاط المضاد للفطريات من الزيت العطري عن تثبيط تام لنمو الفطرين بعد 7 أيام من الحضانة. إن الأنواع *M. rotundifolia* بتراء مستخلصاتها وزيتها الأساسي بالمستقلبات الثانوية ، مؤهلة لتكون بديلاً مثيراً للاهتمام لحماية النباتات.

الكلمات المفتاحية : *Mentha rotundifolia* ، سوسة القمح ، حشرات المن ، طارد ، تثبيط نمو الفطر ، مستقلبات ثانوية ، سطيف .

Résumé

Le recours aux biopesticides connaît un regain d'intérêt en protection des végétaux. Cette étude a mis en exergue l'activité biocide des extraits et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* récoltée dans la région de Sétif, à l'égard de différents bioagresseurs. L'analyse par CLHP a révélée la richesse majoritaire des extraits étudiés par la scutellarine dont l'extrait méthanolique a enregistré la concentration la plus élevée (40.24 mg /kg). L'analyse de l'huile essentielle par GC/MS a révélée l'existence majoritaire de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- avec un pourcentage de 89.09%, composé qui n'a jamais été trouvé dans l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. L'activité insecticide par contact et par inhalation de l'huile essentielle et du composé isolé de cette huile contre *Sitophilus granarius*, charançon du blé, a enregistré une mortalité totale obtenue après 24h d'incubation. L'activité insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*, pucerons des céréales, a montré une augmentation de la mortalité en fonction de la durée d'exposition des pucerons à l'huile et en fonction des concentrations étudiées. Cette huile essentielle présente un fort pouvoir répulsif à l'égard des adultes de *R. padi* et *S. avenae*. L'activité antifongique *in vitro*, après 7 jours d'incubation, de l'extrait éthanolique et méthanolique vis-à-vis *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*, champignons isolés sur tomate, a montré une inhibition importante de la croissance mycélienne des deux espèces fongiques. L'activité antifongique de l'huile essentielle a révélée une inhibition totale de la croissance mycélienne des deux espèces, après 7 jours d'incubation. L'espèce *M. rotundifolia* par la richesse de ses extraits et de son huile essentielle en métabolites secondaires, est qualifiée d'être une alternative naturelle intéressante pour la protection des végétaux.

Mots clés : *Mentha rotundifolia*, charançon du blé, pucerons des céréales, répulsif, inhibition de la croissance mycélienne, métabolites secondaires, Sétif.

Abstract

The use of biopesticides is seeing renewed interest in plant protection. This study highlighted the biocidal activity of the extracts and the essential oil of *Mentha rotundifolia* harvested in the region of Setif, with regard to various pests. HPLC analysis revealed the majority of extracts studied by scutellarin whose methanolic extract recorded the highest concentration (40.24 mg / kg). Analysis of the essential oil by GC / MS revealed the predominant existence of 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3- (3-methyl-2-butenyl) - with a percentage of 89.09%, compound that has never been found in the essential oil of *M. rotundifolia*. The insecticidal activity by contact and inhalation of the essential oil and the isolated compound of this oil against *Sitophilus granarius*, wheat weevil, recorded a total mortality obtained after 24 hours of incubation. The insecticidal activity of *M. rotundifolia* essential oil against *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*, cereal aphids, showed an increase in mortality depending on the duration of exposure of aphids to oil. This essential oil has a strong repellent effect against adults of *R. padi* and *S. avenae*. The antifungal activity *in vitro*, after 7 days of incubation, of the ethanolic and methanolic extract against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*, fungi isolated on tomato, showed a significant inhibition of the mycelial growth of the two fungal species. The antifungal activity of the essential oil revealed a total inhibition of the mycelial growth of the two species after 7 days of incubation. The species *M. rotundifolia* by the richness of its extracts and its essential oil in secondary metabolites, is qualified to be an interesting natural alternative for the protection of the plants.

Key words: *Mentha rotundifolia*, wheat weevil, cereal aphids, repellent, inhibition of mycelial growth, secondary metabolites, Setif.

Sommaire

Remerciements	i
Dédicaces	iv
ملخص	v
Résumé	vi
Abstract	vii
Sommaire	viii
Liste des abréviations	xv
Liste des figures	xvi
Liste des tableaux	xviii
Introduction générale	1
Revue bibliographique	
I-Etude phytochimique des extraits et des huiles essentielles	4
I.1- Généralités	4
I.2- Extraction solide-liquide	5
I.3- Facteurs influençant le transfert	5
I.3.1- Influence du solide	5
I.3.2- Influence du soluté	6
I.3.3- Influence du solvant	6
I.3.4- Influence de la température	6
I.3.5- Influence de l'agitation	7
I.3.6- Influence de l'humidité	7
I.4- Mise en contact entre le solide et le liquide	7
I.5- Conditions de séchage	8
I.6- Degré de fragmentation : Broyage	8
I.7- Technique extractive	9
I.7.1- Hydrodistillation	9
I.8- Composition chimique des plantes	9
I.8.1- Composés organiques non volatils	10
I.8.1.1- Les composés phénoliques	10
I.8.1.2- Les flavonoïdes	10
I.8.1.3- Les alcaloïdes	11
I.8.1.4- Les coumarines	12

I.8.1.5- Les terpènes	12
I.8.2- Composés organiques volatils	13
I.8.2.1- Les terpènes	13
a- Les monoterpènes	13
b- Les sesquiterpènes	13
c- Les diterpènes	14
I.8.2.2- Composés phénylpropaniques (aromatiques)	14
I.9- Techniques analytiques	14
I.9.1- Technique d'analyse des extraits végétaux	14
I.9.1.1- Chromatographie en phase liquide à haute performance	14
I.9.2- Techniques d'analyses des huiles essentielles	15
I.9.2.1- Chromatographie en Phase Gazeuse	15
I.9.2.2- Le couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)	15
I.9.2.3- La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-13C)	16
I.10- Activités biologiques des extraits et de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	16
II- Présentation du coléoptère des denrées stockées	19
II.1-Taxonomie de <i>Sitophilus granarius</i>	19
II.2- Biologie et cycle de développement	20
II.3- Dégâts causés sur grains stockés	23
III- Présentation des deux espèces de pucerons	24
III.1- Taxonomie de <i>Rhopalosiphum padi</i> et <i>Sitobion avenae</i>	24
III.2- Morphologie, caractéristiques et cycle de vie	24
III.3- Dégâts causés sur céréales	26
III.3.1- Dégâts directs	27
III.3.2- Dégâts indirects	27
IV- Présentation des deux espèces de champignons	28
IV.1- Généralités sur <i>Alternaria alternata</i>	28
IV.2- Généralités sur <i>Fusarium oxysporum</i>	29
IV.3- Dégâts des deux champignons	30
V- Substances naturelles antioxydantes d'origine végétale	32
VI- Substances naturelles antiprolifératives	34
VI.1- Généralités sur le cancer en Algérie	34

VI.2- Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate	35
VI.3- Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de l'utérus	35
VI.4- Epidémiologie et facteurs de risque du cancer du côlon	36
VI.5- Incidence et mortalité	37
VI.6- Stratégies de lutte contre le cancer en Algérie	37
VI.7- Substances naturelles anticancéreuses	37
Partie expérimentale	
I- Extractions, séparation et analyses des extraits, de l'huile essentielle et du composé majoritaire de <i>M. rotundifolia</i>	39
1- Introduction	39
2- Etude botanique de la menthe	40
3- Répartition géographique	40
4- Classification et systématique	41
5- Description botanique	41
6- Usages et propriétés thérapeutiques	42
7- Matériel et Méthodes	42
7.1- Récolte de la plante	42
7.2- Préparation des différents extraits	43
7.3- Rendement en extraits	43
7.4- Analyse des extraits de <i>M. rotundifolia</i>	44
7.5- Screening phytochimique (analyse qualitative)	44
7.5.1- Les alcaloïdes	44
7.5.2- Les anthocyanosides	44
7.5.3- Les anthracénosides	45
7.5.4- Les anthraquinones	45
7.5.5- Les coumarines	45
7.5.6- Les flavonoïdes	45
7.5.7- Les polyphénols	46
7.5.8- Les quinones	46
7.5.9- Les saponosides	46
7.5.10- Les stérols	46
7.5.11- Les tanins	47
7.6- Analyse quantitative par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée	47

avec une spectroscopie de masse (HPLC-TOF/MS)	
7.7- L'extraction de l'huile essentielle	48
7.8- Rendement en huile essentielle	48
7.9- Séparation du composé majoritaire	48
7.10- Analyses de l'huile essentielle	49
7.10.1- Analyse par GC	49
7.10.2- Analyse par GC-MS	49
8- Résultats et Discussion	50
8.1- Rendement en extraits et en huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	50
8.2- Screening phytochimique	51
8.3- Identification des acides phénoliques et des flavonoïdes par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée avec une spectroscopie de masse (HPLC- TOF/MS)	53
8.4- Composition chimique de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> et de son composé majoritaire	56
9- Conclusion	60
II- Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de <i>Mentha rotundifolia</i> L. à l'égard de <i>Sitophilus granarius</i>	61
1-Introduction	61
2- Matériel et Méthodes	63
2.1- Elevage de l'insecte	63
2.2- Activité insecticide	63
2.2.1- Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire sur <i>S. granarius</i> par contact	63
2.2.2- Activité insecticide de l'huile essentielle et de son composé majoritaire sur <i>S.</i> <i>granarius</i> par inhalation	64
2.3- Analyses statistiques	65
3- Résultats et Discussion	65
3.1- Activité insecticide par contact	65
3.1.1- De l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> et de son composé majoritaire	65
3.1.2- Des extraits aqueux, éthanolique et méthanolique de <i>M. rotundifolia</i>	67
3.2- Activité insecticide par inhalation	69
4- Conclusion	70

III- Activité insecticide et répulsive de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i> L.	72
à l'égard de <i>Rhopalosiphum padi</i> et <i>Sitobion avenae</i> (Hemiptera: Aphididae), pucerons de céréales à Sétif, Algérie	
1-Introduction	72
2- Matériel et méthodes	73
2.1- Elevage des insectes	73
2.2- Tests biologiques	74
2.2.1- Activité insecticide	74
2.2.2- Effet répulsif de l'huile essentielle sur papier filtre	75
2.3- Analyse statistique	76
3- Résultats et discussion	77
3.1- Etude de la variation des taux de mortalité en fonction des durées d'exposition pour chaque concentration	77
3.2- Etude de la variation des taux de mortalité en fonction des concentration après 1h, 3h, 5h et 24h d'exposition	80
3.3- Détermination de la CL ₅₀ de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	82
3.4- Etude de l'effet répulsif de l'huile essentielle de <i>Mentha rotundifolia</i>	83
4- Conclusion	84
IV- Activité antifongique des extraits et de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> vis-à-vis <i>Alternaria alternata</i> et <i>Fusarium oxysporum</i>	86
1-Introduction	86
2- Matériel et Méthodes	87
2.1- Isolement et purification des souches fongiques	87
2.2- Identification macroscopique des souches	88
2.3- Identification moléculaire des souches	88
2.4- Tests biologiques	88
2.4.1- Activité antifongique des extraits éthanolique et méthanolique de <i>M. rotundifolia</i> sur la croissance mycélienne de <i>A. alternata</i> et <i>F. oxysporum</i>	88
2.4.2- Activité antifongique de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	89
3- Résultats et Discussion	90
3.1- Identification macroscopique et microscopique des souches	90
3.2- Identification moléculaire	92
3.3- Activité antifongique des extraits	93

3.4- Activité antifongique de l'huile essentielle	100
4- Conclusion	102
V- Activité antioxydante des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de <i>Mentha rotundifolia</i>	103
1-Introduction	103
2- Matériel et méthodes	104
2.1- Produits chimiques et réactifs	104
2.2- Activité antioxydante	104
2.2.1- Activité de piégeage du radical DPPH	104
2.2.2- Activité de chélation des métaux sur les ions ferreux (Fe^{2+})	105
2.3- Détermination de la teneur en phénols totaux	105
2.4- Analyses statistiques	105
3- Résultats et Discussion	106
4- Conclusion	111
VI- Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i> contre trois lignées cellulaires HeLa PC3 et HT29	112
1-Introduction	112
2- Matériel et Méthodes	113
2.1- Bioessais	113
2.2- Préparation de la solution mère	113
2.3- Lignées et culture cellulaire	113
2.4- Test de prolifération cellulaire	114
2.5- Détermination de CI_{50} et CI_{75}	114
2.6- Analyses statistiques	115
3- Résultats et Discussion	115
3.1- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HeLa par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	116
3.2- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée PC3 par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	117
3.3- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HT29 par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de <i>M. rotundifolia</i>	118
4- Conclusion	119
Conclusion générale	121

Liste des abréviations

CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
HEs	Huiles Essentielles
PAM	Plantes Aromatiques et Médicinales
pH	Potentiel Hydrogène
CPG	Chromatographie en Phase Gazeuse
SM	Spectrométrie de Masse
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
DPPH	1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl
BYDV	Barley Yellow Dwarf Virus
ROS	Reactive Oxygen Species
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
FNUAP	Fonds des Nations Unies pour la Population
UV	Ultra Violet
HPLC-TOF/MS	High Performance Liquid ChromatographyTime Of Flight Mass Spectrometry
PDA	Potato Dextrose Agar
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
PR	Pourcentage de Répulsivité
MADR	Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
FAO	Food & Agriculture Organisation
ITCMI	Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
PCR	Polymerase Chain Reaction
IAA	Indole-3-Acetic Acid
IBA	Indole-3-Butyric Acid
GA₃	Gibberellic Acid ₃
BHT	Butylated Hydroxy Toluene
EDTA	Ethylène Diamine Tétracétique
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
5-FU	5- fluorouracile
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

Liste des figures

- Figure 1** Cycle de vie du charançon du blé
- Figure 2** Morphologie externe de *Sitophilus granarius*
- Figure 3** Dégâts causés par la larve, la nymphe et l'adulte de *S. granarius* sur grains de céréales
- Figure 4** Microphotographies d'un puceron
- Figure 5** Acquisition et circulation d'un virus par un puceron
- Figure 6** *Alternaria alternata* A,B: Conidiophores et conidies. (Watanabe, 1975)
- Figure 7** *Fusarium oxysporum*. A: Hyphes, macroconidies, microconidies, et chlamydospores.
- Figure 8** *Alternaria alternata* : sur tomates, conidies.
- Figure 9** Symptômes de la fusariose vasculaire et la pourriture racinaire sur plant de tomate (Blancard, 2013).
- Figure 10** *Mentha rotundifolia*
- Figure 11** Lieu de cueillette de la plante
- Figure 12** Colonne chromatographie avec gel de silice
- Figure 13** Chromatogramme de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*
- Figure 14** Chromatogramme du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*
- Figure 15** 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)-
- Figure 16** Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *M. rotundifolia* vis-à-vis *S. granarius*, par contact
- Figure 17** Activité insecticide de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *M. rotundifolia* vis-à-vis *S. granarius*, par inhalation
- Figure 18** Activité insecticide par contact de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de son composé majoritaire à l'égard de *S. granarius* après 24h d' incubation.
- Figure 19** Activité insecticide par contact des trois extraits de *M. rotundifolia* à l'égard de *S. granarius* après 24h d'incubation
- Figure 20** Activité insecticide par inhalation de l'huile essentielle et du 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- de *M. rotundifolia* à l'égard de *S. granarius* après 24h d' incubation.
- Figure 21** Elevage des pucerons en conditions de laboratoire
- Figure 22** Activité insecticide par la méthode IRAC
- Figure 23** Effet répulsif de l'huile essentielle sur papier filtre

- Figure 24** Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition pour chaque concentration
- Figure 25** Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 1h, 3h, 5h et 24 h d'exposition
- Figure 26** Observation macroscopique des deux souches fongiques.
- Figure 27** Profil microscopique de *Alternaria alternata* isolée de la tomate
- Figure 28** Profil microscopique de la souche *F. oxysporum*
- Figure 29** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *A. alternata*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait éthanolique.
- Figure 30** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait éthanolique.
- Figure 31** Croissance *in vitro* du mycélium des souches *A. alternata* et *F. oxysporum* en présence d'extrait éthanolique de la partie aérienne de *M. rotundifolia* après 7 jours d'incubation.
- Figure 32** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique.
- Figure 33** Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *A. alternata*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique.
- Figure 34** Croissance *in vitro* du mycélium des souches *A. alternata* et *F. oxysporum* en présence d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *M. rotundifolia* après 7 jours d'incubation.
- Figure 35** Activité d'inhibition de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la croissance des deux champignons après 7 jours d'incubation
- Figure 36** Activité de piégeage du radical DPPH des échantillons de *M. rotundifolia* aux concentrations testées.
- Figure 37** Activité de chélation des métaux des échantillons de *M. rotundifolia* aux concentrations testées.
- Figure 38** Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse HeLa.
- Figure 39** Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse PC3.
- Figure 40** Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse HT29.

Liste des tableaux

- Tableau 1** Rendement en (%) des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*
- Tableau 2** Screening phytochimique des extraits de *M. rotundifolia*
- Tableau 3** Analyse des extraits par Chromatographie Liquide à Haute Performance.
- Tableau 4** Composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*
- Tableau 5** Composition chimique du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*
- Tableau 6** Groupes homogènes issus du test de Duncun sur la sensibilité de *R. padi* et *S. avenae* après 24h d'exposition à l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.
- Tableau 7** CL_{50} de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* pour chaque heure d'exposition et pour les deux espèces de pucerons.
- Tableau 8** Pourcentages de répulsion sur papier filtre de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis des adultes de *R. padi* et *S. avenae*
- Tableau 9** Concentration (mg/mL) en extrait réduisant de 50% (CI_{50}) et 90% (CI_{90}) la croissance mycélienne de *A. alternata* et *F. oxysporum*.
- Tableau 10** Activité d'inhibition de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la croissance de *A. alternata* et *F. oxysporum*
- Tableau 11** Activité antioxydante des différents échantillons de *M. rotundifolia*
- Tableau 12** Les valeurs de CI_{50} et CI_{75} de l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis des lignées cellulaires HeLa, HT29 et PC3.

SPUTNIK



Introduction générale



Introduction générale

Parmi les nombreux facteurs qui influent sur la production agricole en Algérie on retrouve les ravageurs et les maladies qui peuvent compromettre la totalité de la récolte (Anjarwalla et *al.* 2016). Divers insectes, champignons, bactéries, virus, et autres ravageurs attaquent les plantes aux différents stades de leur développement (Tapwal et *al.*, 2011). La pression des bioagresseurs a été identifiée comme la contrainte majeure du fait des pertes de récoltes infligées (Mondédji et *al.*, 2015). Quand sont évoquées les méthodes de lutte contre les maladies des végétaux cultivés, viennent d'abord à l'esprit les progrès considérables amenés par l'usage des produits phytosanitaires (Durand-Tardif & Pelletier, 2003). L'accessibilité aux pesticides synthétiques pour lutter contre les ravageurs et les maladies est limitée pour de nombreux producteurs en raison de leur coût et de leur réseau de distribution restreint (Anjarwalla et *al.* 2016). Ainsi, pour améliorer les rendements et répondre à la demande des marchés sans cesse croissante, le recours à l'usage des pesticides de synthèse par les producteurs est quasiment systématique (Mondédji et *al.*, 2015). Pourtant, leurs effets néfastes sur l'homme et l'environnement et la résistance des bioagresseurs aux insecticides ont été démontrés (Agboyi et *al.*, 2016).

Aussi, au vu de la propagation du phénomène de résistance et du nombre de produits phytosanitaires en cours de développement, la découverte de nouveaux composés anti phytopathogènes est devenue plus qu'indispensable. A cet effet, de nombreux travaux récents se sont penchés sur la recherche de substances ayant des pouvoirs insecticides, fongicides, bactéricides, nématicides respectueux de la santé humaine et de l'environnement.

Les plantes représentent une source pratiquement illimitée de métabolites primaires et secondaires. Les métabolites secondaires végétaux sont d'intérêt majeur à cause de leurs différentes fonctions et de la gamme impressionnante de leurs activités biologiques (L'Ecuyer-Coelho, 2000). Ainsi, les chercheurs de diverses disciplines scientifiques sont confrontés au défi d'extraire le matériel végétal avec des solvants, souvent dans un premier temps pour isoler et identifier les composés spécifiques responsables des activités biologiques associées à une plante ou à un extrait de plante (Jones & Kinghorn, 2012).

La toxicité d'un grand nombre d'extraits végétaux, d'huiles essentielles et de leurs constituants a été évaluée à l'égard de *Sitophilus granarius*, l'un des ravageurs primaires les plus répandus et les plus destructeurs des céréales stockées telles que le blé, le maïs, le riz, l'avoine, le sorgho et l'orge (Karakas, 2016). Les composés dérivés de plantes sont issus du

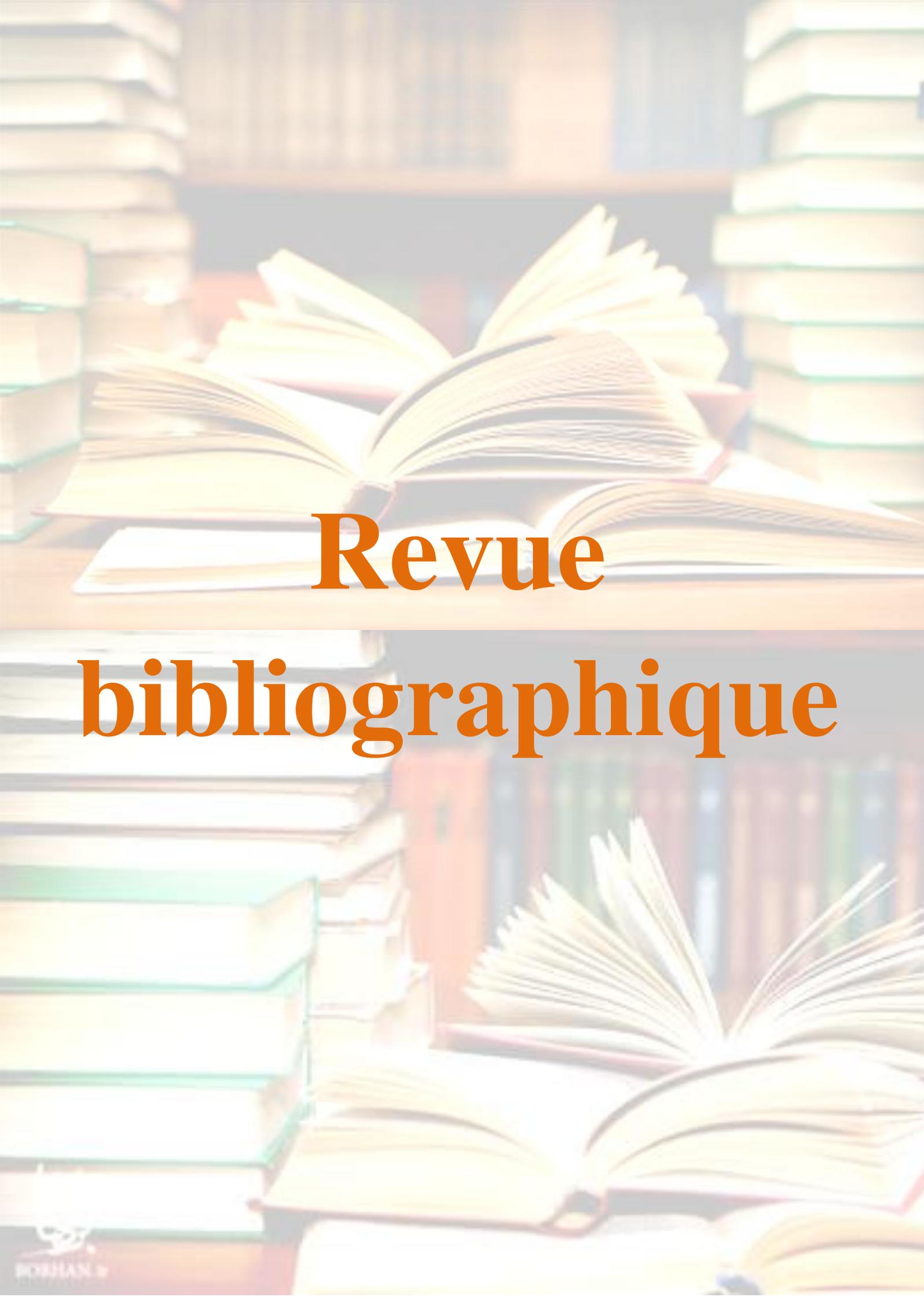
développement de substances alternatives face à la limitation de l'utilisation d'insecticides synthétiques (Kimbaris et *al.*, 2010) pour le contrôle des *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* ; pucerons des céréales (Sallam 2009). L'effet antifongique des extraits et des huiles essentielles de plantes aromatiques a eu un intérêt croissant pour la recherche concernant les fongicides alternatifs (Labioud et *al.*, 2015). Les antioxydants les mieux tolérés par l'organisme et les plus efficaces proviennent des végétaux (Ribéreau-Gayon, 1968). Récemment, l'intérêt s'est considérablement accru en trouvant des antioxydants naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques, qui ont été limités en raison de leurs effets secondaires tels que la cancérogenèse (Puangpronpitag & Sittiwet, 2009). Les plantes sont une excellente source de substances antitumorales cliniquement pertinentes (Melo et *al.*, 2011). Les huiles essentielles peuvent jouer un rôle important dans la prévention de cancer (Kamatou & Viljoen, 2010). Certains polyphénols dont principalement les flavonoïdes inhiberaient fortement la prolifération et la migration des cellules tumorales et peuvent représenter de nouvelles molécules anticancéreuses (Bruneton, 2009).

En luttant contre ces agents phytopathogènes et en évaluant l'activité antioxydante et antiproliférative, le pouvoir biologique des extraits et de l'huile essentielle de la lamiacée *Mentha rotundifolia* a été représenté par de très peu de travaux. *M. rotundifolia* une lamiacée très répandue dans la région de Sétif, est très riche en huile essentielle, en flavonoïdes et en acides phénoliques. Elle a fait l'objet de plusieurs recherches sur la composition phytochimique et activités biologiques.

L'objectif de cette étude est d'évaluer les activités biologiques des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. Pour atteindre cet objectif les points suivants ont été traités :

- Screening phytochimiques des extraits et composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et aussi séparer les composés majeurs qui apparaissent en grande quantité en fractions et déterminer la teneur phytochimique quantitative de chaque fraction en utilisant des méthodes chromatographiques.
- Evaluer l'activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et du composé majoritaire de *M. rotundifolia* à l'égard de *Sitophilus granarius*, ravageur nuisible bien connu qui provoque une perte de rendement économiquement importante dans les produits stockés.

- Déterminer les activités insecticides et répulsives de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* ; deux pucerons de blé économiquement importants.
- Mesurer l'activité antifongique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis deux souches de champignons causant des dégâts sur tomate à savoir *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*.
- Estimer l'activité antioxydante des extraits, de l'huile essentielle et du composé isolé de *M. rotundifolia* par deux méthodes.
- Examiner *in vitro* les propriétés antiprolifératives de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre trois lignées cellulaires cancéreuses à savoir HeLa, PC3 et HT29.



Revue bibliographique

I-Etude phytochimique des extraits et des huiles essentielles

I.1-Généralités

Historiquement, l'extraction solide-liquide et l'utilisation des principes actifs des plantes est très ancienne, puisque l'homme préhistorique pratiquait déjà, à sa manière, l'extraction des principes odorants des plantes (Poirot, 2007). Il plongeait, dans un même récipient rempli d'eau, des plantes odorantes et des pierres brûlantes. La vapeur ainsi dégagée entraînait les molécules volatiles, puis le tout était recueilli à l'aide d'une peau d'animal dont l'essorage donnait quelques gouttes d'huile essentielle (Robert, 2000). De la percolation à l'infusion en passant par la macération ou la concoction, chaque terme évoque une mise en œuvre domestique d'un procédé d'extraction solide-liquide, dont le solvant est généralement de l'eau ou de l'alcool (Poirot, 2007). Au fil des siècles, l'extraction et l'usage des principes odorants des plantes sont développés, notamment par les civilisations arabe et égyptienne, qui leurs attribuent avant tout un usage religieux (Sell, 2006).

Les procédés d'extraction sont basés sur la différence de solubilité des composés présents dans un mélange et dans un solvant. Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits à haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques peuvent être dites conventionnelles (utilisées depuis longtemps) et nouvelles (développées plus récemment). Les techniques conventionnelles utilisent des solvants organiques (tels que l'hexane, l'acétone, le méthanol, l'éthanol etc.) ou l'eau et se réalisent, en général, à pression atmosphérique.

Les nouvelles techniques utilisent des pressions et/ou des températures élevées (Penchev, 2010). Quant aux huiles essentielles, leur extraction s'effectue par expression à froid, par hydrodistillation et l'hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau (El Haib, 2011). D'autres méthodes d'extraction ont également été mises au point comme l'hydrodiffusion pulsée et l'extraction aux fluides comme le CO₂ supercritique (Tuley Da Silva, 1995).

Les plantes représentent une source de principes actifs inépuisable et renouvelable, dont l'usage traditionnel et médical est connu depuis bien longtemps (Penchev, 2010). Il existe donc un besoin d'extraire de substances bioactives pour une utilisation dans un large champ d'application (agricole, cosmétiques, pharmaceutiques, additifs nutritionnels...).

La présente partie constitue une synthèse bibliographique du procédé d'extraction végétale. Nous aborderons tout d'abord les notions d'extraction solide-liquide, ensuite la technique extractive des extraits et de l'huile essentielle ainsi que leurs méthodes analytiques.

I.2- Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est l'opération fondamentale qui a pour but d'extraire, de séparer, de dissoudre soit par immersion soit par percolation d'un liquide, un ou plusieurs composants (liquide ou solide) mélangés à un solide (Poirot, 2007). C'est une opération de transfert ou d'échange de matière entre une phase solide, qui contient la matière à extraire et une phase liquide, le solvant d'extraction (Leybros & Fremeaux, 1990).

La complexité de la structure et la variabilité (avec les saisons, les récoltes, . . .) de la matière végétale ainsi que la large variété des composés à extraire (différents poids moléculaires, polarité, lien avec la structure, . . .) ont conduit à l'apparition d'une grande variété de technologies d'extraction (Poirot, 2007).

I.3. Facteurs influençant le transfert

Les phénomènes de transfert de soluté dans le solide, en l'occurrence la matière végétale, sont affectés par plusieurs facteurs caractérisant la matière solide, le soluté et le solvant, ainsi que par les conditions opératoires (Lalou, 1995).

I.3.1. Influence du solide

Le solide a une double influence sur le transfert de matière, l'une par sa taille, l'autre par sa structure. La taille du substrat joue un rôle déterminant dans ce procédé qui est contrôlé par le transfert interne. Réduire la taille des particules diminue la longueur de diffusion du solvant et des solutés. Cependant, si les particules sont trop petites, on peut avoir des problèmes d'imperméabilité du lit d'extraction. La matière végétale a une microstructure complexe formée de cellules, d'espaces intercellulaires, de capillaires et de pores. Sa description par les outils classiques du génie chimique n'est pas toujours aisée. On peut toutefois tenter de définir et de mesurer les caractéristiques suivantes : la porosité, la tortuosité, la taille et la forme des particules et la surface spécifique d'échange.

I.3.2- Influence du soluté

Le soluté à extraire influence la diffusion de par sa structure moléculaire, sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons dans la matière végétale avec d'autres composés. Il a été montré que la vitesse de diffusion diminue quand la taille moléculaire augmente. Par exemple, les vitesses d'extraction des composants hydrosolubles sont dans l'ordre croissant suivant : acide acétique > sucres > phénol > pectines (Lalou, 1995).

Les substances à extraire, localisées à l'intérieur des cellules, se présentent sous forme libre alors que celles qui participent à la structure sont liées à d'autres composés. Leurs concentrations varient selon les conditions climatiques de croissance, les conditions de récoltes, l'état de maturité et le conditionnement, c'est pourquoi elles varient beaucoup d'un lot à l'autre et au sein d'un même lot.

I.3.3- Influence du solvant

Les solvants souvent utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), le CO₂ supercritique. Comme dans le cas du soluté, la taille des molécules de solvant exerce une influence sur la diffusion. Il est également question de sélectivité, afin d'extraire le maximum de soluté et le minimum des autres constituants du cytoplasme et plus généralement de la matière végétale. Car il va falloir ensuite séparer le soluté des autres molécules extraites. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion dans le solvant, l'agitation et la séparation mécanique (Leybros & Fremeaux, 1990).

I.3.4- Influence de la température

L'élévation de la température augmente la solubilité et la diffusivité de la solution et réduit sa viscosité. Mais elle augmente aussi la perméabilité des parois cellulaires et donc diminue la sélectivité. La température opératoire est limitée par les risques de dégradation thermique des produits et par la sécurité de l'installation en présence de solvants. En effet, Chambers et *al.* (1996) ont étudié la cinétique lors de l'extraction de soluté des oranges. Ils mettent en évidence l'influence de la température sur la vitesse d'extraction mais également son implication dans la dégradation du soluté. Son augmentation facilite la diffusion. Mais il faut trouver un compromis car à température élevée (80°C), au bout d'un certain temps la cinétique décroît suite à l'altération de l'extrait. La température favorise aussi l'éclatement des cellules (Wongkittipong et *al.*, 2004) et entraîne la récupération d'un jus plus concentré en

ballast. Celui-ci représente l'ensemble des éléments extraits de la plante en dehors du soluté, comme la chlorophylle par exemple.

I.3.5- Influence de l'agitation

Une agitation mécanique des particules dans le solvant permet le maintien en suspension de celles-ci et l'homogénéisation du milieu. Elle a donc une grande influence sur le transfert de matière à l'interface solide-liquide.

I.3.6- Influence de l'humidité

En règle générale, les matières végétales sont séchées pour faciliter leur conditionnement et surtout leur stockage. Un surplus d'humidité peut donc détériorer le substrat. De plus, lors de l'utilisation de solvants hydrophobes, la diffusivité est inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide (Leybros & Fremeaux, 1990).

I.4. Mise en contact entre le solide et le liquide

La mise en contact entre le solide et le liquide peut se réaliser de diverses manières : par percolation, par pulvérisation, par immersion totale et par drainage intermittent. Si le contact des deux phases s'effectue à co-courant, et que le temps de séjour est suffisamment long ou que la cinétique de transfert de matière est rapide, les compositions des deux flux sortant sont en équilibre.

Pour une simple extraction, la plante est mise en contact avec le solvant pour avoir l'extrait végétal. L'extraction par des solvants volatils consiste à dissoudre la matière odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer. Cette technique pratiquée dès le 18^{ème} siècle avec de l'éther, produit coûteux et fortement inflammable, utilise de nos jours des solvants plus adaptés comme l'hexane ou l'éthanol. Cette méthode est utilisée pour les plantes dont les substances aromatiques risqueraient d'être dégradées par la distillation et lorsque le matériel végétal ne peut être chauffé (par exemple le jasmin), contient une faible concentration de substances aromatiques (comme la rose), contient une substance résineuse (comme le benjoin).

Plusieurs paramètres influencent l'extraction : l'état de la plante (frais / sec), le degré de fragmentation de la plante, la température d'extraction, la nature du solvant (polarité) et la durée de l'extraction.

I.5. Conditions de séchage

Le séchage des végétaux est l'une des opérations les plus importantes dans le processus d'extraction des plantes aromatiques et médicinales. Il permet la conservation des principes actifs de la plante et sa protection contre toute dépréciation ou pourriture.

Le séchage naturel est un mode de récolte et de conservation gratuit, respectueux de l'environnement et efficace. En effet, cette technique n'engendre ni déchets, ni rejets polluants. De plus, elle permet d'améliorer la qualité des produits en évitant leur contamination, de conserver leurs principes actifs, d'augmenter leur durée de vie, de diminuer leurs poids afin de faciliter leur transport et de diversifier leur utilisation (Aghfir et *al.*, 2007; Ankila, 2007).

Une semaine après leur récolte, la teneur en huiles essentielles serait à son maximum. Au-delà de cette période, elles perdent qualitativement et quantitativement leurs huiles essentielles (Bourkhiss et *al.*, 2009).

Sellami et *al.* (2011) ont étudié l'effet de six différentes méthodes de séchage (séchage à l'air, étuve à 45 et 65 °C, Microonde 500 W, Infrarouge 45 et 65 °C) sur le rendement et la composition chimique de l'huile essentielle des feuilles de Laurier noble. Ils ont montré que le séchage à l'air ambiant et séchage par infrarouge à 45 °C a augmenté significativement le rendement en huile essentielle.

I.6. Degré de fragmentation : Broyage

Le broyage est une étape critique de la préparation de l'échantillon pour analyse. L'échantillon doit atteindre une granulométrie suffisante pour d'une part faciliter l'homogénéisation de l'échantillon et permettre une prise d'essai représentative (Masson, 2005) et d'autre part faciliter l'attaque de l'échantillon par des acides ou des oxydants. Le choix d'un type de broyeur dépend, dans un premier temps, de la nature du végétal à broyer (grains, tiges, racines). Les modes de broyages proposés ainsi que les dimensions des cuves de broyeurs devront être adaptés. Il existe une grande variété de broyeurs : à couteaux, à marteaux, à fléaux, oscillo-vibrants, planétaires, centrifuges (Markert, 1995).

Le deuxième critère de choix est la facilité d'utilisation et d'entretien du broyeur : ainsi le nettoyage du broyeur doit être facile pour optimiser le temps de manipulation et limiter les risques de contaminations entre deux échantillons.

I.7- Technique extractive

Le procédé d'extraction est basé sur la différence de solubilités des composés d'un mélange dans un solvant. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Il existe les techniques classiques et les techniques innovantes (Luque de Castro & Garcia-Ayuso, 1998).

I.7.1- Hydrodistillation

L'hydrodistillation proprement dite, est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle ainsi que pour le contrôle de qualité (Lucchesi, 2005). Le principe de l'hydrodistillation correspond à une distillation hétérogène. Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. La température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures. Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées. Il est ensuite refroidi et condensé dans un essencier ou vase florentin. Une fois condensées, eau et molécules aromatiques du fait de leurs différences de densité, se séparent en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle.

La durée d'une hydrodistillation peut considérablement varier, pouvant atteindre plusieurs heures selon le matériel utilisé et la matière végétale à traiter. La durée de la distillation influe non seulement sur le rendement mais également sur la composition de l'extrait. Afin de traiter des matières premières pour lesquelles il est difficile d'extraire l'huile essentielle ou pour les essences difficilement entraînables.

I.8- Composition chimique des plantes

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe et est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle (El Kalamouni, 2010). La deuxième fraction dite non volatile de la plante,

composés organiques non volatils, est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes (Cisowski, 1985), composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques phénols ou polyphénols jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante (Kubeczka et *al.*, 1982).

I.8.1- Composés organiques non volatils

I.8.1.1- Les composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire et qui sont ubiquitaires du règne végétal et notamment des angiospermes. Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils sont ainsi impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques...), dans les mécanismes de défenses de la plante (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydante (Macheix et *al.*, 2005).

Les composés phénoliques sont une famille thérapeutiquement et économiquement intéressante. Ils sont exploités en phytothérapie et dans des spécialités pour des propriétés vasculoprotectrices (flavonoïdes, anthocyanes, tanins), antispasmodiques (phloroglucinols) et suscitent beaucoup d'intérêt par leur potentiel antioxydant (Abedini, 2013).

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) et les acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃), (Macheix et *al.*, 2005). Plusieurs composés acides phénoliques sont antibactériens et antifongiques, en particulier à l'égard des organismes phytopathogènes (Bruneton, 1999).

I.8.1.2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles, ils sont

caractérisés par la présence d'une structure phénolique dans leur molécule, et même d'une structure flavone ce qui les distingue des autres polyphénols (Harborne, 1986).

On classe les flavonoïdes en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles, par l'existence ou non de substituants sur la génine (Bruneton, 1999).

Aujourd'hui plus de 9000 flavonoïdes ont été répertoriés et il en reste des milliers d'autres à découvrir puisque le squelette des flavonoïdes peut être substitué par différents groupements comme des groupements hydroxyles, méthoxyles, méthyles, benzyles, isoprényles et autres (Kueny-Stotz et *al.*, 2008).

Les flavonoïdes montrent des propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire des métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries (Marfak, 2003).

I.8.1.3- Les alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique azoté plus ou moins basique, de masse moléculaire rarement supérieure à 1000, doué à faible dose de propriétés pharmacologiques. Le nombre dépasse les 10000 molécules identifiées (morphine, codéine, narcotine, strychnine, aricine, veatropine, caféine, quinine,...) (Aneb, 2017).

Les alcaloïdes sont les composés azotés les plus connus. Ils ont une distribution restreinte car ils sont rencontrés chez 20% des angiospermes seulement. En plus des alcaloïdes, on trouve dans ce groupe : les acides aminés non protéiques, les glycosides cyanogéniques et les glucosinolates (Walton et Brown, 1999).

L'activité biologique de beaucoup d'alcaloïdes dépend souvent de la fonction amine étant transformée en système quaternaire par ionisation aux pHs physiologiques (Dewick, 1999). Ce sont pour la plupart des poisons végétaux très actifs, dotés d'une action spécifique. Les plantes les utilisent pour la plupart d'entre eux dans leur système de défense contre les herbivores et les pathogènes car ces composés sont toxiques (Azzouzi, 2017).

I.8.1.4- Les coumarines

Les coumarines sont issues du métabolisme de la phénylalanine via un acide cinnamique, l'acide P-coumarique. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor Passi, 2002). Les conditions structurales requises pour l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Madhavi et al, 1996).

I.8.1.5- Les terpènes

Les terpénoïdes sont des métabolites secondaires synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux, ils résultent de l'enchaînement de plusieurs unités isoprénique (Bhat, Nagasampigi et Sivakumar, 2005). Ils ont deux voies de biosynthèse : celle de l'acide mévalonique et du desoxyxylulose phosphate.

Les terpénoïdes ou isoprénoïdes sont des polymères de l'isoprène formé de 5 carbones. Ils dérivent de l'isopentényldiphosphate et son isomère le diméthylallyldiphosphate assemblés et modifiés de milliers de façons (Dewick, 1999).

La majorité des terpénoïdes connus ont été isolés à partir de plantes où ils jouent le rôle de métabolites primaires et secondaires (Aneb, 2017). Chez les végétaux, les terpénoïdes sont produits par tous les tissus végétatifs dont les racines et par les diverses pièces florales (Dudareva et al., 2004).

En raison de leurs nombreuses structures, les terpénoïdes constituent un groupe hétérogène de molécules avec différentes propriétés physiques et chimiques. Ils peuvent être volatils, semi-volatils ou non-volatils, saturés et insaturés, à chaîne droite, à chaîne ramifiée, cycliques ou acycliques, chiraux ou achiraux, portant éventuellement divers groupes fonctionnels oxygénés (ex. alcools, aldéhydes, cétones, esters et éthers) ou contenant de l'azote ou du soufre et sont solubles ou insolubles dans l'eau (Bohlmann & Keeling, 2008 ; Schwab et al., 2008).

Certains terpénoïdes végétaux tels que les stérols et les carotènes font partie du métabolisme primaire et sont présents dans toutes les plantes. Cependant, la majorité des terpénoïdes végétaux sont des métabolites secondaires (Chen & Tholl, 2011).

I.8.2- Composés organiques volatils

La composition chimique d'une huile essentielle est complexe, on y retrouve couramment plus d'une centaine de composés, parmi lesquels nombre de familles chimiques sont représentées (Jouault, 2012). Il s'agit des terpènes (mono, di et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Kurkin, 2003).

I.8.2.1- Les terpènes

Les terpènes sont des molécules composées d'un nombre variable d'unités d'isoprène, comptant les monoterpènes, les sesquiterpènes et les diterpènes. Ils ont généralement des effets thérapeutiques **assez faibles**, mais ils viennent nuancer ou compléter les actions des composants plus actifs. On peut citer les monoterpènes formés de deux isoprènes $C_{10}H_{16}$; les sesquiterpènes formés de trois isoprènes $C_{15}H_{24}$; les diterpènes formés de quatre isoprènes $C_{20}H_{32}$ (Ayaidia, 2011).

a- Les monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les huiles essentielles (90%) (Padua, Bunyaphatsara et Lemmens 1999). Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. Les monoterpènes monocycliques sont les plus nombreux. Certains composés de ce groupe présentent un cycle benzénique et sont appelés monoterpènes aromatiques. Ils sont courants dans les huiles essentielles et sont souvent signes d'une activité biologique de l'huile essentielle (Thormar, 2011).

b- Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes représentent la classe la plus diversifiée des terpènes qui se divisent en plusieurs catégories structurelles, acycliques, monocycliques, bicycliques, tricycliques, polycycliques. Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones dans la nature (El Haib, 2011). Les sesquiterpènes sont, en termes de fréquence, le deuxième groupe le plus présent dans les huiles essentielles après les monoterpènes (Thormar, 2011).

c- Les diterpènes

Les composés diterpéniques sont très communs dans les résines végétales mais ils ne sont généralement présents dans les huiles essentielles qu'en faible quantité (Deschepper, 2017). Leur poids moléculaire plus élevé est en effet un frein à leur entrainement à la vapeur, ce qui explique en partie leur présence discrète dans les huiles essentielles.

Il a été montré que leur teneur augmentait avec le temps de distillation. De même, l'utilisation du CO₂ supercritique plutôt que de l'hydrodistillation pour l'extraction augmente la concentration en diterpènes dans l'extrait obtenu (Thormar, 2011).

I.8.2.2- Composés phénylpropaniques (aromatiques)

Les phénylpropanoïdes sont des composés volatiles issus de la voie de biosynthèse de l'acide shikimique. Cette voie que l'on retrouve chez les micro-organismes et les plantes est totalement absente dans le règne animal. Elle aboutit à plusieurs familles de composés (lignanes, tannoïdes, coumarines...) dont seulement une cinquantaine se retrouve dans les huiles essentielles (Thormar, 2011). Ces composés sont bien moins fréquents que les terpènes et se retrouvent généralement en plus petite quantité dans les huiles essentielles. Il existe cependant des exceptions, comme l'eugénol qui compte pour 70 à 90% de la composition de l'huile essentielle de clou de girofle (Deschepper, 2017).

Certaines familles botaniques sont reconnues pour contenir plus de phénylpropanoïdes que les autres, ce sont les Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Pipéraceae ou encore Rutaceae. La technique employée pour l'extraction de l'huile essentielle semble également avoir une influence sur la concentration finale de ces composés dans l'huile (Thormar, 2011).

I.9- Techniques analytiques

I.9.1- Technique d'analyse des extraits végétaux

Une fois l'extrait le plus représentatif obtenu, l'analyse permet d'identifier et de quantifier les produits qui le composent. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de constituants (El Kalamouni, 2010).

I.9.1.1- Chromatographie en phase liquide à haute performance

C'est une phase mobile liquide qui entraîne les composés à analyser. La chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique de séparation

analytique basée sur l'hydrophobicité des molécules d'un composé ou d'un mélange de composés (Penchev, 2010).

L'échantillon à analyser est entraîné par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés les uns des autres en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases stationnaire et mobile. Ceci permet de mieux séparer les constituants qui apparaissent sous forme de pic sur un chromatogramme. L'aire du pic est relative à la quantité présente dans l'extrait.

I.9.2- Techniques d'analyses des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles consiste à l'identification et la détermination de la teneur des différents composés constituant une essence. C'est une opération délicate qui nécessite la mise en œuvre de plusieurs techniques (El Ajjouri, 2013).

I.9.2.1- Chromatographie en Phase Gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer les composés d'un mélange. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. La différence principale par rapport à la CLHP vient du fait que dans la CPG la phase mobile est gazeuse. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne. La phase stationnaire dans la colonne peut être solide ou liquide. Le mélange est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel - le détecteur. Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur.

I.9.2.2- Le couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM)

Les premiers appareils de routine CPG/SM à colonnes capillaires datent de 1975 (McLafferty & Michnowicz, 1992). La CPG/SM est la technique la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles. Elle permet de connaître, dans la grande majorité des cas, la

masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation (Constantin, 1996). Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981).

Le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse (CPG/SM) permet d'effectuer simultanément la séparation et l'analyse des différents constituants d'un mélange complexe. Il existe deux modes d'ionisation : l'ionisation par impact électronique et l'ionisation chimique. Dans ce dernier cas, on distingue l'ionisation chimique positive et l'ionisation chimique négative (Paolini, 2005). Les systèmes actuels de CPG/SM sont très performants pour la séparation, la détection et l'identification des molécules.

I.9.2.3- La Résonance Magnétique Nucléaire du carbone-13 (RMN-13C)

Une alternative aux méthodes d'analyse décrites précédemment est la RMN du carbone-13 des mélanges, sans séparation préalable des constituants. Cette technique, initié par Formáček et Kubeczka (Kubeczka et al., 1988), développée par Casanova et al. (Tomi et al., 1995 ; Bradesi et al., 1996) offre des potentialités fortement intéressantes.

Le principe consiste à attribuer les raies de résonance de chacun des carbones de chaque composé à partir du spectre unique du mélange et de les comparer à des produits de référence répertoriés dans des bibliothèques (Bradesi et al., 1996).

Différents aspects sont à considérer, à savoir l'observation et l'individualisation des différentes raies de résonance dans le spectre du mélange et l'attribution de chacune de ces raies de résonance à un produit donné permettant son identification. La RMN du carbone-13 des mélanges est efficace particulièrement pour la différenciation et l'identification de molécules structurellement très proches, des composés qui coéluent en CPG, de molécules thermosensibles et thermolabiles (Paolini, 2005).

I.10- Activités biologiques des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

De la variabilité chimique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* il a été effectué plusieurs recherches sur les activités biologiques. El Arch et al. (2003) ont étudié l'activité antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* poussant au Maroc. La sensibilité des bactéries (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus*

aureus), des champignons (*Trametes pini*, *Aspergillus niger*, *Penicillium parasiticus*) et des insectes des céréales stockées (*Rhyzopertha dominica* et *Sitophilus oryzae*) vis-a-vis de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été étudiée à différentes concentrations. A une concentration de 1/1000VN, l'huile essentielle a inhibé toutes les bactéries et tous les champignons, alors que pour les insectes des céréales stockées, elle a pu détruire la totalité des insectes à une concentration de $6,5.10^{-2}$ ml/cm³.

Clemente et al. (2003) ont comparé l'efficacité insecticide des infusions et des extraits dichlorométhaniques (5000 ppm) de cinq espèces de Lamiaceae contre les larves de *Tribolium castaneum*. L'extrait dichlorométhanique de *M. rotundifolia* (L.) Huds avéré être plus efficace causant une mortalité de ~74% tandis que les infusions ont causé seulement ~ 19% de mortalité larvaire.

Selon Brada et al. (2007), la richesse de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* en oxyde de pipériténone, un monoterpène oxygéné possède des effets biologiques très intéressants, présente des effets cardiovasculaires (activité hypotensive, vasodilatateur, bradycardie), une activité sur les centres nerveux sympathiques (relaxant, stimulant, dépressant), des propriétés antibactériennes et antifongiques, et agit aussi comme agent retardant la reproduction du vecteur de malaria *Anopheles stephensis* (Damien Dorman et al., 2003 ; Tripathi et al., 2004).

Aziz et Abbass (2010) ont testé la bio-efficacité de différentes concentrations (0,25-1,0%) de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* (L.) Huds sur *Callosobruchus maculatus* à travers une série de bioessais. L'huile essentielle à la plus grande concentration a eu un effet très significatif sur la réduction de la ponte de *C. maculatus* sur les graines de niébé à 10,2 œufs / 2femelles. Elle a également un effet drastique sur le taux d'éclosion enregistré seulement (14,77%) par rapport à 94,95% dans le contrôle. L'huile essentielle testée a prolongé les périodes larvaires et pupales et a causé une très forte mortalité entre les larves et les pupes de *C. maculatus* (98,12%).

Derwich et al. (2010) ont mené un test *in vitro* l'effet antibactérien de l'huile essentielle des feuilles de *M. rotundifolia* cultivée au Maroc sur neuf souches bactériennes. L'huile essentielle extraite a montré la plus haute activité contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, avec la plus forte zone d'inhibition 45, 34 et 31mm, respectivement.

L'étude de Nedel *et al.* (2012), utilisant le test sulforhodamine B (SRB), a évalué l'effet antiprolifératif *in vitro* de l'extrait d'hexane obtenu des fleurs de *M. spicata* associée à *M. rotundifolia* contre l'adénocarcinome du sein humain (MCF-7), épidermique de la bouche humaine carcinome (KB) et des lignées cellulaires de fibroblastes embryonnaires de souris (NIH 3T3). Les résultats indiquent que l'extrait d'hexane obtenu de fleurs à partir de *M. spicata* associé à *M. rotundifolia* présente une activité antinéoplasique contre KB et MCF-7, bien qu'un effet antiprolifératif à une concentration élevée de l'extrait a été observé vers NIH 3T3.

Le travail de Moldovan *et al.* (2014) a fait l'objet d'évaluer l'activité antioxydante des composés phénoliques de *M. rotundifolia* poussant en Roumanie. Ces extraits ont montré une activité antioxydante et antimicrobienne importantes. Ces résultats pourraient être importants pour la valorisation thérapeutique de l'espèce comme agent antioxydant ou antimicrobien.

Seladji *et al.* (2014) ont déterminé l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait méthanolique et aqueux de tiges et de feuilles de *M. rotundifolia* L. d'Algérie. Cependant l'extrait méthanolique des feuilles avait la capacité de piégeage de DPPH la plus élevée avec la plus faible valeur IC_{50} ($0,7 \pm 0,028$ mg/ml), la même tendance a été observée avec un pouvoir réducteur ferrique. En ce qui concerne les tests de blanchiment du β -carotène, les résultats ont montré que l'extrait aqueux a une capacité antioxydante la plus élevée avec une CI_{50} proche des standards ($0,52 \pm 0,024$ mg/ml). L'activité antimicrobienne a été étudiée; tous les extraits ont été testés contre cinq bactéries et trois espèces fongiques.

Elhartiti *et al.* (2015) ont réalisé une étude pour l'isolement, la purification et l'identification des bactéries endophytes qui produisent des substances antifongiques à partir des racines de *M. rotundifolia*. Les 59 isolats bactériens obtenus ont été testés pour leur activité antagoniste par la double confrontation contre les champignons phytopathogènes *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* et *Botrytis cinerea*. Huit souches bactériennes, qui appartiennent à la famille des Bacillaceae et à la famille des Pseudomonadaceae, ont été sélectionnées pour leur forte activité antifongique.

La recherche de Bounihi (2016) a été consacrée à l'étude toxicologique des extraits aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* qui a permis la détermination de leurs doses létales 50 chez les souris. La toxicité chronique a pour objectif de mettre en évidence les altérations fonctionnelles et/ou anatomo-pathologiques consécutives aux administrations répétées (pendant 90 jours) des extraits. La détermination du profil pharmacologique des

extraits (l'activité sédatrice, anti-inflammatoire et analgésique *in vivo* et l'activité antioxydante et antibactérienne *in vitro*) a démontré que les différents extraits testés (aqueux et HE) possèdent des propriétés anti-inflammatoires et analgésique intéressantes. D'autre part, l'auteur a montré que seulement l'huile essentielle de la menthe exerce chez l'animal une activité sédatrice et que les extraits aqueux de la plante étudiée possèdent une forte activité antioxydante par rapport à l'huile essentielle qui présente une faible activité. L'huile essentielle de *M. rotundifolia* exerce une remarquable activité antibactérienne.

L'étude de Taalbi (2016) sur l'activité antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *M. rotundifolia* riche en oxyde de pipéritenone, ainsi que l'activité antifongique *in vivo* vis-à-vis *Botrytis cinerea* sur fraise, a révélé, en tant que substitut naturel, un fort potentiel économique de l'huile essentielle et de l'hydrolat de *M. rotundifolia* vu l'intérêt porté à cette molécule par l'industrie pharmaceutique.

Brahmi et al. (2017a) ont évalué la capacité antioxydante et la teneur en composés phénoliques de deux espèces de Menthes, à savoir *M. pulegium* L. et *M. rotundifolia* L. Huds avec six solvants d'extraction différents. L'efficacité des solvants utilisés pour extraire les phénols des deux espèces variait considérablement. La teneur en composés phénoliques totaux la plus élevée a été obtenue à partir d'un extrait méthanolique de *M. pulegium* et la teneur en flavonoïdes de l'extrait méthanolique de *M. rotundifolia*. La teneur élevée en phénol était significativement corrélée avec une capacité antioxydante élevée.

II- Présentation du coléoptère des denrées stockées

II.1- Taxonomie de *Sitophilus granarius*

Le charançon du blé est un petit insecte noir-brun. Sa taille, qui dépend principalement de son approvisionnement alimentaire et la taille du grain de développement (Surtees, 1965), varie entre 3,8 et 5,1 mm (y compris le rostre). À 25 °C et une humidité relative élevée, la période de développement d'une génération est en moyenne de 40 jours. Sa durée de vie peut s'étaler de plusieurs mois à un an. Les adultes et les larves peuvent être identifiés en utilisant les clés de Gorham (1991).

Règne: Animalia
Embranchement: Arthropoda
Sous-embranchement: Hexapoda
Classe: Insecta (Insects)
Ordre: Coleoptera (Beetles)
Sous-ordre: Polyphaga
Super famille: Curculionoidea
Famille: Curculionidae
Sous-famille: Dryophthorinae
Tribu: Rhynchophorini
Genre: *Sitophilus*
Espèce : *Sitophilus granarius* (Linnaeus, 1758)



II.2- Biologie et cycle de développement

Les œufs pondus sont de l'ordre de 250 par femelle, en moyenne 200 œufs, ils se trouvent à l'intérieur du grain. Les larves aussi de l'insecte se trouvent dans les grains; elles peuvent survivre au moins 10 semaines à 5 °C. Les adultes sont de 2 à 3 mm de long (Figure 4), incapables de voler; ils passent facilement l'hiver dans les bâtiments non chauffés et les grains en vrac (Plarre, 2010).

Les larves sont de couleur blanc-crème avec une tête bronzée et sans pattes (Figure 1). Ils passent toute leur vie à l'intérieur du noyau, en le creusant. Le développement de l'œuf à l'adulte à 21 °C (69,8 °F) varie de 57 à 71 jours, selon l'humidité du grain (Khan, 1948 ; Richards, 1947).

À des températures plus chaudes, les périodes de développement sont plus courtes. Par exemple, à 25 °C (77 °F), le développement est terminé en 45 jours. Il y a quatre stades larvaires, la dernière forme une cellule nymphale à partir de la déjection, de la farine et des sécrétions larvaires.

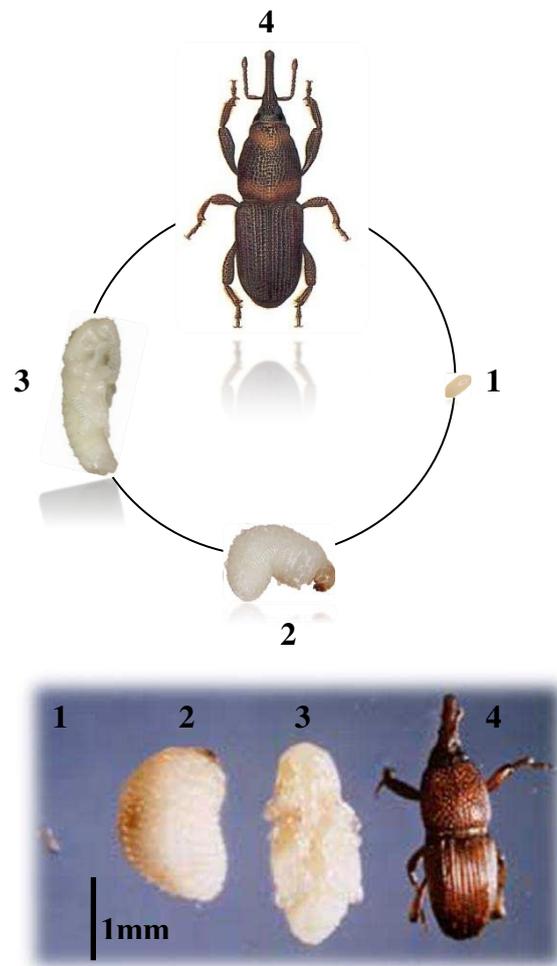


Figure 1: Cycle de vie du charançon du blé

(1 : œuf, 2 : larve, 3 : nymphe, 4 : adulte)

(<https://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepote/aafc-aac/pfsg-pgef-6-fra.htm>)

Les adultes nouvellement émergés ne quittent pas immédiatement le noyau. Ils restent souvent à l'intérieur du grain pendant que leur cuticule durcit et peut y rester jusqu'à une semaine. Les adultes vivent de sept à huit mois, se déplaçant autour de la masse de grain tout au long de la journée. Il peut y avoir quatre générations par an. Les adultes feignent la mort lorsqu'ils sont dérangés (Plarre, 2010).

La caractéristique la plus citée est celle du rostre (Figure 2: 1 et 2). La longueur moyenne du bec (mesurée de la base des yeux à la pointe des mandibules) chez le mâle et la femelle respectivement est de 0,87 et 1,03 mm avec une largeur moyenne de 0,18 et 0,15 mm (Tombes, 1971).

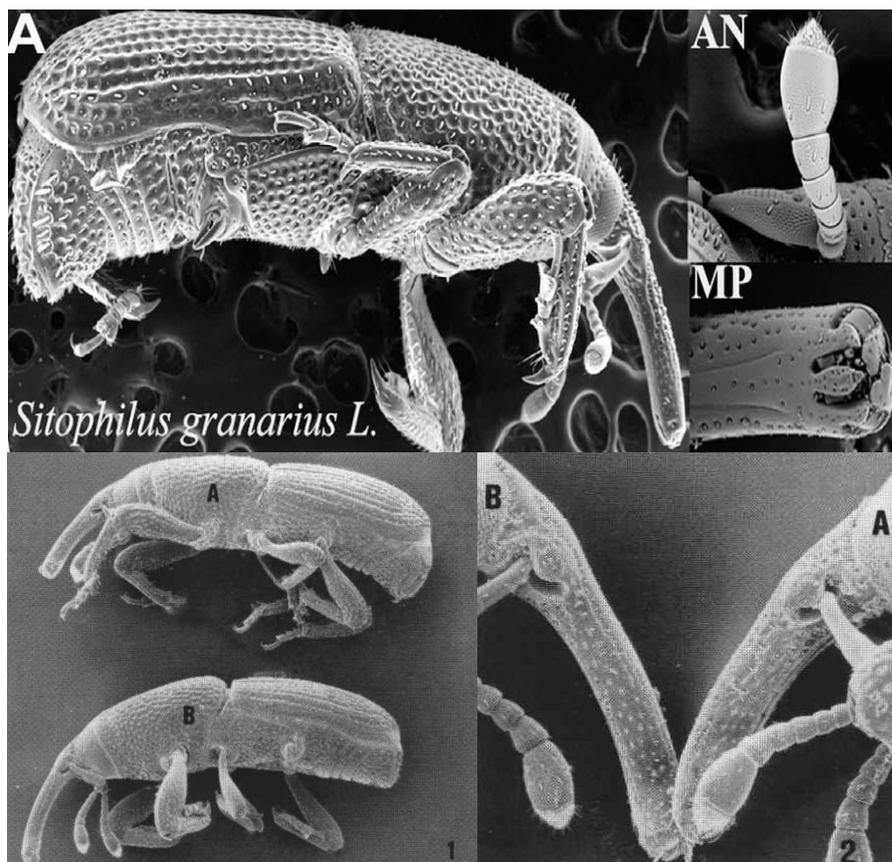


Figure 2: Morphologie externe de *Sitophilus granarius* A : vue générale, AN : antenne, MP : pièces buccales. Abd El-Ghany & Abd El-Aziz (2017).

1 : Adultes ; male (A) et femelle (B). 2 : Têtes des adultes montrant le dimorphisme sexuel dans les dimensions des rostres (x 70) ; male (A) et femelle (B), Tombes (1971).

Les pièces buccales sont composées d'un labre, d'une paire de mandibules fortement développées et sclérifiées, d'une paire de maxilles et d'un labium (Figure 2: MP). Leurs surfaces externes portent des sensilles. L'antenne du charançon du blé constituée de huit segments représentant le scape (le segment le plus long et mesure plus d'un tiers de la longueur de l'antenne), le pédicelle et le flagelle (Figure 2: AN). Les antennes sont insérées sur le rostre par le scape, puis, faisant un coude avec lui. Une série d'articles formant le funicule et une massue, ovoïde ou fusiforme, de 3 ou 4 articles. L'ensemble peut se plier à l'intérieur d'un profond sillon, réduit parfois à une fossette, qui court parallèlement à l'axe du rostre (Abd El-Ghany & Abd El-Aziz, 2017).

II.3. Dégâts causés sur grains stockés

Les charançons du blé se nourrissent de grains non cassés et cassés, y compris l'orge, le sarrasin, le maïs, le millet, l'avoine, le riz, le seigle et le blé. Ils ont été signalés chez les graines pour oiseaux, les graines de tournesol et les châtaignes (Lyon, 2011).

Ils ne se développent pas sur des produits finement moulus, comme la farine, mais ils peuvent survivre sur de nombreux produits céréaliers manufacturés comme les aliments pour animaux de compagnie, les macaronis, les spaghettis et les nouilles. Si le grain est broyé en une taille de particule plus petite que nécessite le développement larvaire, la ponte n'aura pas lieu. Généralement, un ou deux œufs sont pondus dans l'endosperme ou le germe d'un seul noyau.

Lorsque plus d'un œuf sont pondus, un seul adulte émergera (Figure 3) d'un seul grain en raison du cannibalisme larvaire. Quatre-vingt pour cent des œufs éclosent lorsque les conditions sont bonnes; les œufs pondus par des femelles plus âgées ont des taux d'éclosion plus faibles (Arbogast, 1991). Le taux de ponte augmente à mesure que la disponibilité de la nourriture augmente, ce qui indique que dans une trémie à grains avec un approvisionnement alimentaire illimité, la ponte sera au maximum (Fava et Burlando, 1995).



Figure 3 : Dégâts causés par 1 : la larve, 2 : la nymphe et 3 : l'adulte de *S. granarius* sur grains de céréales

(<https://www.alamy.es/imagenes/curculionidae.html?pe=001&so=5>)

III- Présentation des deux espèces de pucerons

III.1- Taxonomie de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*

Les pucerons appartiennent à l'ordre des Hemiptera, au sous-ordre des Sternorrhyncha et à la superfamille des Aphidoidea. On distingue trois familles : les Phylloxeridae, les Adelgidae et les Aphididae. On compte aujourd'hui 4700 espèces de pucerons dans le monde, dont 250 sont des ravageurs (Chinery, 2012). Les pucerons ravageurs n'induisent pas uniquement des dommages directs en se nourrissant du phloème mais aussi des dégâts indirects en transmettant des phytovirus (Lin et al., 2016). Parmi les 14 espèces de pucerons les plus importants en agriculture, on peut citer *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* (Blackman & Eastop, 2007).

Règne : Animalia	Règne : Animalia
Classe : Insecta	Classe : Insecta
Ordre : Hemiptera	Ordre : Hemiptera
Sous-ordre : Sternorrhyncha	Sous-ordre : Sternorrhyncha
Super-famille : Aphidoidea	Super-famille : Aphidoidea
Famille : Aphididae	Famille : Aphididae
Tribu : Aphidini	Tribu : Macrosiphini
Genre : <i>Rhopalosiphum</i>	Genre : <i>Sitobion</i>
Espèce : <i>Rhopalosiphum padi</i> (Linnaeus, 1758)	Espèce : <i>Sitobion avenae</i> (Fabricius, 1775)

III.2- Morphologie, caractéristiques et cycle de vie

Les pucerons sont des insectes de 2 à 4 mm à téguments mous avec un corps ovale et aplati. La tête est composée d'un rostre contenant 2 stylets mandibulaires protégeant 2 stylets maxillaires. Sur la tête se trouve les antennes filiformes, de 3 à 6 articles, implantées directement sur le front ou sur des protubérances appelées tubercules frontaux. Ces antennes portent des rhinaries, organes sensoriels et le dernier article, généralement plus long, est formé d'une partie basale et d'une partie terminale appelée fouet. Sur le thorax, nous retrouvons les paires d'ailes membraneuses, qui se replient en toit au repos, et les trois paires de pattes. La partie postérieure de l'abdomen porte une paire de cornicules. Celles-ci rejettent des gouttelettes de cire et des phéromones d'alarme l'(E)- β -farnésène (Pickett & Griffiths 1980). L'abdomen est composé de 10 segments, le dernier étant le cauda dont la fonction

principale est d'éviter que le miellat ne glisse sur le corps de l'insecte car celui-ci se nourrit la tête en bas. Sous le cauda se trouve l'anus qui excrète le miellat (Fraval, 2006 ; Inra, 2010).

Selon la clé de détermination des pucerons (Blackman & Eastop, 2007), les deux espèces ont les caractéristiques suivantes :



Sitobion avenae (Fabricius) aptère vert jaunâtre ou brun rougeâtre sale, parfois plutôt brillant, avec des antennes et des cornicules noires; la longueur du corps est entre 1,3-3,3 mm. Il se trouve sur de nombreuses graminées, y compris toutes les céréales et les graminées des climats tempérés, et de nombreux autres monocotylédones. Sur les céréales, les pucerons préfèrent se nourrir des feuilles supérieures et des oreillettes une fois que celles-ci ont émergé. Il se trouve partout en Europe, en Méditerranée, au Moyen-Orient, en Asie, particulièrement en Inde, au Népal, au Pakistan, en Afrique; en Amérique du nord, du centre et du sud. Il se nourrit uniquement de graminées et de céréales (Poaceae) (Hand, 1989). Bien que *S. avenae* soit monoécique (un seul hôte) et holocyclique (un cycle complet), les ovipares ne sont produites que par des femelles asexuées ailées qui, comme les mâles ailés, peuvent migrer vers de nouveaux hôtes si nécessaire, par exemple si leur plante hôte devient nutritionnellement inadaptée (Hille Ris Lambers, 1939 ; Müller, 1977). Espèce anholocyclique en hivernage et commune dans les régions où les hivers sont doux.



Rhopalosiphum padi (L.) aptère se trouve sur les graminées, à corps ovale, vert jaunâtre marbré vert olive, ou vert olive ou olive foncé à noir verdâtre; souvent avec des taches de couleur rouille autour des bases de cornicules; la longueur du corps est de 1,2-2,4 mm. Il se trouve sur de nombreuses espèces de graminées, y compris toutes les principales graminées et parfois sur Cyperaceae, Iridaceae (en particulier Iris), Juncaceae et Typhaceae. Cet insecte est peut-être paléarctique d'origine, maintenant il est pratiquement partout dans le monde. C'est une espèce hétéroécique (alternance d'hôtes) et holocyclique avec une phase sexuelle sur *Prunus* spp. *Prunus padus* L. (Rosaceae) est le principal hôte hivernal et de nombreuses espèces de graminées servent d'hôtes secondaires estivaux (Pettersson, 1970 ; Blackman et Eastop, 2000). Ladite espèce est anholocyclique partout où les conditions hivernales le permettent.

III.3- Dégâts causés sur céréales

Les pucerons des céréales sont des ravageurs occasionnellement graves du blé au printemps. En cas de fortes pullulations, ils peuvent entraîner des baisses de rendement pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de quintaux à l'hectare (Dedryver et *al.*, 2006).

En prélevant de la sève sur une plante infectée, le puceron devient virulifère. Les particules virales ingérées circulent dans le tube digestif. Certaines particules sont dégradées pendant la digestion ou éliminées dans le miellat, d'autres traversent la paroi de l'intestin et s'accumulent dans le corps du puceron. Les particules virales présentes dans le bol alimentaire passent dans le tube digestif du puceron et dans son corps jusqu'à sa mort. Lorsque les particules virales atteignent les glandes salivaires, elles peuvent être inoculées aux plantes sur lesquelles le puceron se nourrira. Grâce à son stylet (Figure 4), le puceron peut avoir accès aux différents tissus de la plante.

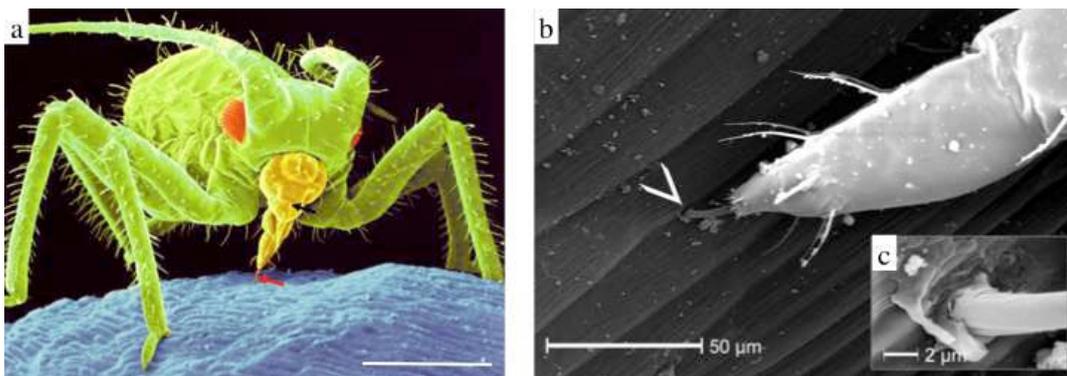


Figure 4 : Microphotographies d'un puceron montrant (a) ses pièces buccales constituées d'un rostre (flèche noire) et d'un faisceau de stylets (flèche rouge), barre = 1 mm (b) le point d'entrée des stylets de *Macrosiphum euphorbiae* (pointe de flèche) qui semble toujours localisé entre les cellules épidermiques au niveau de l'affaissement des bords de cellules et des jonctions pariétales anticlines ; (c) détail du point d'insertion de (b) montrant le matériel salivaire recouvrant partiellement la surface de la feuille autour des stylets. (Photo de Gilles Bourdonnais/Gégep de Sainte Foy).

Les composés dont l'insecte a besoin pour se nourrir sont dans la sève élaborée dans les vaisseaux de la plante. Grâce au stylet du puceron, le virus peut passer : de la sève au tube digestif donc de la plante hôte à son vecteur (acquisition virale) et de la salive à la sève donc de son vecteur à la plante (inoculation de l'hôte). En quelques heures, les particules se multiplient et s'accumulent dans la cellule puis colonisent la plante.

La répartition des dégâts se fait en deux catégories :

- les dégâts directs liés à la succion de la sève et à la toxicité de la salive ;
- les dégâts indirects liés à la transmission des virus et à l'action des pucerons à la surface de la plante.

III.3.1- Dégâts directs

Le dégât direct le plus important est le prélèvement de sève phloémienne par le puceron (Figure 5). En effet, ce prélèvement affaiblit la plante et peut conduire à la mort en fonction de la durée de présence et du nombre de pucerons sur la plante. On peut également citer l'effet phytotoxique de la salive du puceron. La phytotoxicité en question a des impacts différents selon la plante visée (enroulement, boursoufflement, les feuilles tombent, etc.) (Harmel *et al.*, 2008 ; Dedryver *et al.*, 2010). Sur blé, un grand nombre de pucerons, au moment de l'épiaison, provoquera une diminution du nombre de grains par épi mais une infestation plus tardive n'entraînera qu'un mauvais remplissage des grains. La perte de rendement due à des dégâts directs s'élève à 10% en blé et peut monter jusqu'à 85% avec les dégâts indirects (Inra, 2010).

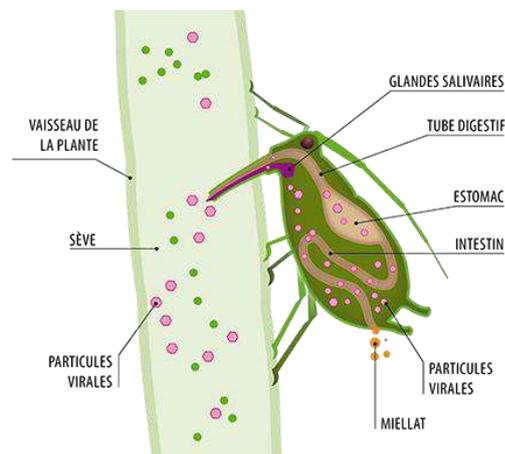


Figure 5 : Acquisition et circulation d'un virus par un puceron

(<https://www.bayer-agri.fr/articles/3936/comment-se-passent-lacquisition-et-la-circulation-dun-virus-par-un-puceron/>)

III.3.2- Dégâts indirects

Le miellat excrété par les pucerons, bien que non toxique, constitue un milieu favorable au développement de microorganismes notamment des champignons saprophytes (*Alternaria spp.*, *Verticillium spp.*) responsables des fumagines. Les fumagines vont contribuer

à l'occlusion des stomates et à la réduction de la photosynthèse (Rossing 1991). Cependant, les dégâts les plus sévères résultent de la transmission de virus phytopathogènes. En effet, les pucerons sont capables de transmettre 28 % des phytovirus transmis par les insectes (197 sur 697) (Hogenhout et al., 2008). Les virus, situés dans le phloème ou le parenchyme, peuvent provoquer des perturbations physiologiques, se traduisant par exemple par un affaiblissement du végétal voire sa mort mais aussi par une déformation de fruits les rendant non commercialisables (Dedryver et al., 2010).

Parmi ces phytovirus, on cite le BYDV (Barley Yellow Dwarf Virus) transmis par les pucerons des céréales, en particulier *Rhopalosiphum padi* L. et *S. avenae*. Ils acquièrent le virus sur des chaumes, du maïs et des graminées fourragères et le transmettent aux céréales d'hiver qui ont levé avant la fin des vols des derniers pucerons, en novembre dans les régions tempérées. Le BYDV est plus dévastateur quand les cultures sont infectées dès le semis. Les premiers symptômes en orge se manifesteront en février (mortalité des plantules, jaunissement des feuilles, tallage aberrant) et s'aggraveront au printemps (mauvaise montaison, faible épiaison et petits grains). Les symptômes sont moins violents chez le blé (plantes adultes plus petites et rougissement de la dernière feuille) mais dans les deux cultures, les baisses de rendement sont les mêmes. Il n'y a aucun traitement curatif contre le BYDV donc il est indispensable de lutter contre le vecteur (Dewar, 2007 ; Poehling et al., 2007).

IV- Présentation des deux espèces de champignons

IV.1- Généralités sur *Alternaria alternata*

Ce champignon appartient à la division des Ascomycota, classe des Dothideomycètes, sous-classe des Pleosporomycetidae, ordre des Pleosporales, famille des Pleosporaceae (Botton et al., 1990).

Morphologie: Les conidiophores sont de couleur brun pâle, simples ou ramifiés, portant des conidies caténulées au sommet et des parties fertiles apicales. Les conidies se caténulent, la plupart du temps jusqu'à 9 dans une chaîne, souvent ramifiée (Figure 6). Les conidies sont porospores, à développement acropétique, brun foncé, cylindrique ou fusiforme, souvent à bec cylindrique, muriforme composé de 3-4 (-8) parois transversales et de 1-2 parois longitudinales.

Dimensions: Les conidiophores 17–40 (-139) × 3–3.9 μm. Les conidies 18–45 (-70.5) × 6.5–15.5 (-17) μm: les becs 2.5–35 × 7–7.5 μm.

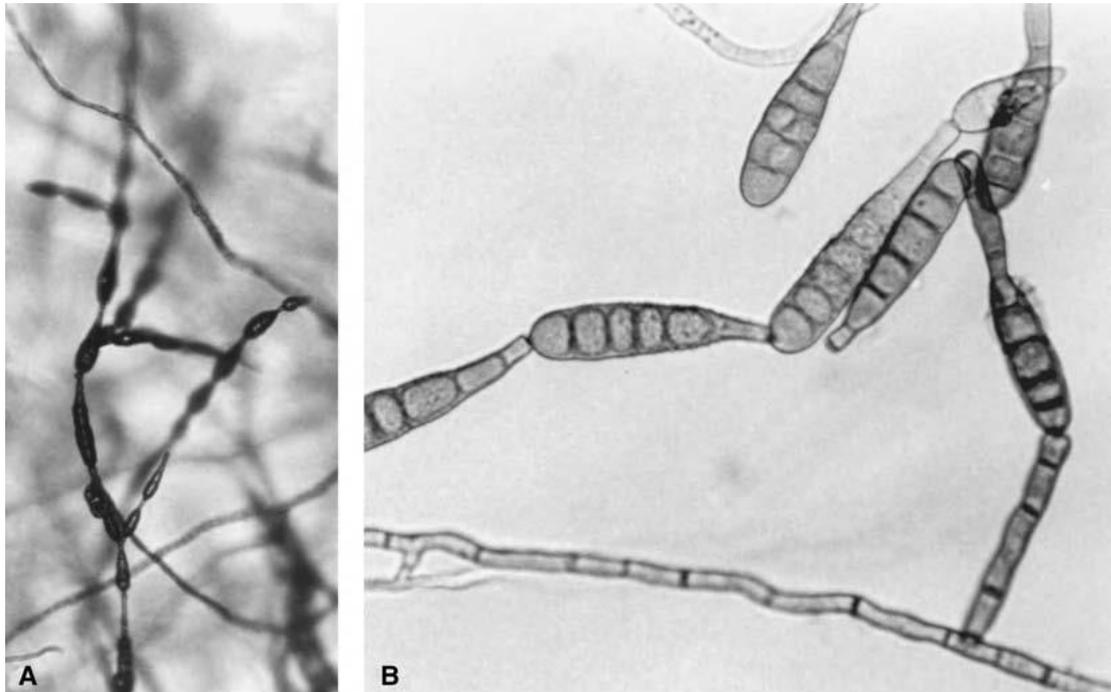


Figure 6 : *Alternaria alternata* A,B: Conidiophores et conidies. (Watanabe, 1975)

IV.2- Généralités sur *Fusarium oxysporum*

Cette espèce appartient à la division des Ascomycota, classe des Hymenoascomycètes, sous-classe des Pyrenomycetidae, ordre des Hypocreales, famille des Nectriaceae (Di Pietro et al., 2003).

Morphologie: Les conidiophores sont hyalins, simples, courts ou peu différenciés des hyphes, portant des masses de spores aux sommets. Les conidies sont phialospores, hyalines, de deux types: macroconidies en forme de bateau (Figure 7), avec des cellules apicales légèrement effilées et des cellules basales crochues, 4-loculaires; et microconidie ellipsoïdale, 1-cellulaire. Les chlamydospores sont brunes, globuleuses, généralement solitaires.

Dimensions: Les conidies: sont macroconidies (17.5-) 29.1–45 × 2.9–4.7 μm: sont microconidies 6–15.8 × 1.9–3.7 (-5) μm. Les chlamydospores sont de (5.3-) 10.2–15 μm de diamètre. Plus de 54 formes spéciales ont été enregistrées (Holliday 1989).

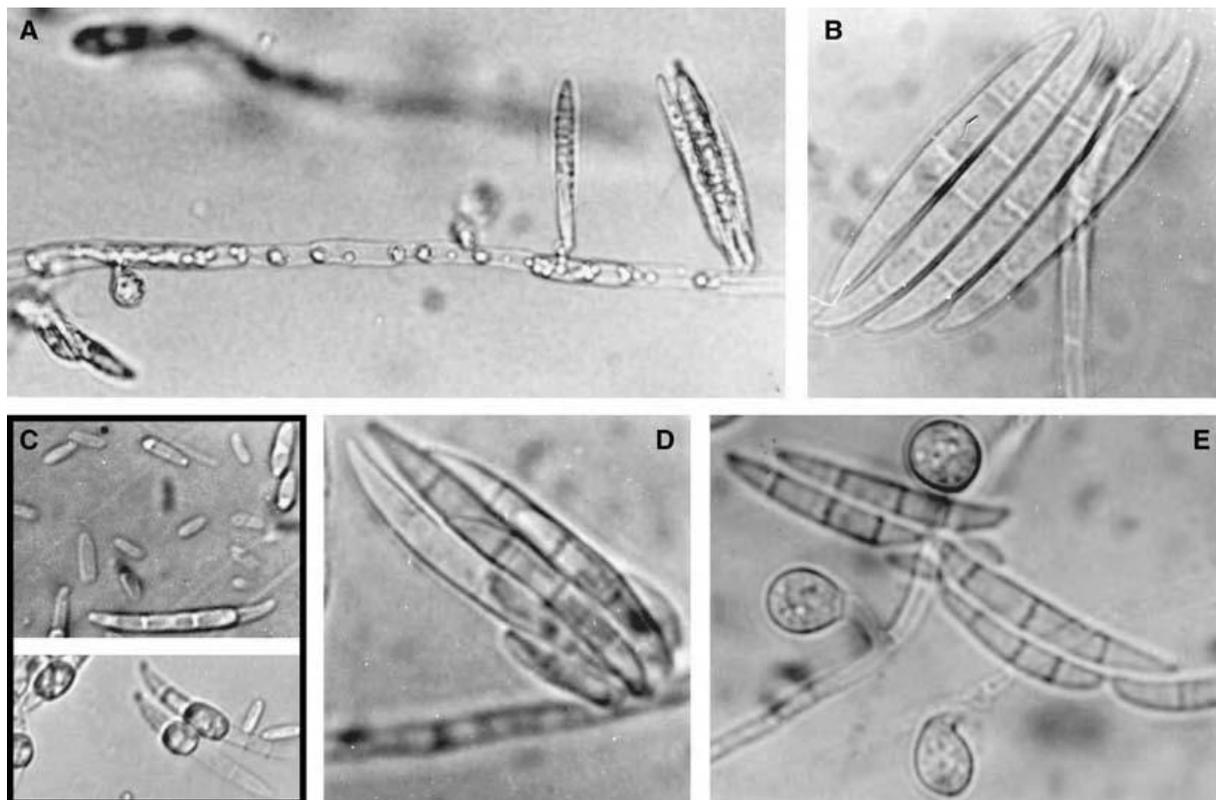


Figure 7 : *Fusarium oxysporum*. A: Hyphes, macroconidies, microconidies, et chlamydospores. B: Macroconidies. C: Macroconidies, microconidies et chlamydospores. D: Macroconidies. E: Macroconidies and chlamydospores. (Watanabe, 1975)

IV.3- Dégâts des deux champignons

Les maladies fongiques ont été l'une des causes les plus importantes de pertes de récoltes depuis que l'homme a commencé à cultiver des plantes. Les champignons sont omniprésents dans l'environnement et l'infection due aux pathogènes fongiques est devenue plus fréquente (Dellavalle et *al.*, 2011).

Le genre *Alternaria* est largement répandu dans la nature et ses espèces sont parmi les champignons les plus communs sur la phyllosphère (Lopes & Martins, 2008). Il comprend à la fois des espèces phytopathogènes et des espèces végétales saprophytes qui peuvent endommager les cultures sur le terrain ou causer la pourriture après la récolte (Griffin & Chu, 1983), causant des pertes économiques considérables pour les agriculteurs et les industries alimentaires (Figure 8). En outre, le genre produit des mycotoxines et des phytotoxines, et les études de la dernière décennie ont mis en évidence ses propriétés toxicogènes plutôt que simplement celles qui provoquent la détérioration. Les toxines alternariol, l'éther méthylique d'alternariol, l'altenuène et l'acide ténozoïque sont connus comme contaminants alimentaires

possibles avec risque toxicologique potentiel (Pose et *al.*, 2004). Au moins 20% de l'altération agricole est causée par des espèces d'*Alternaria*; les pertes les plus sévères peuvent atteindre jusqu'à 80% du rendement (Nowicki et *al.*, 2012).

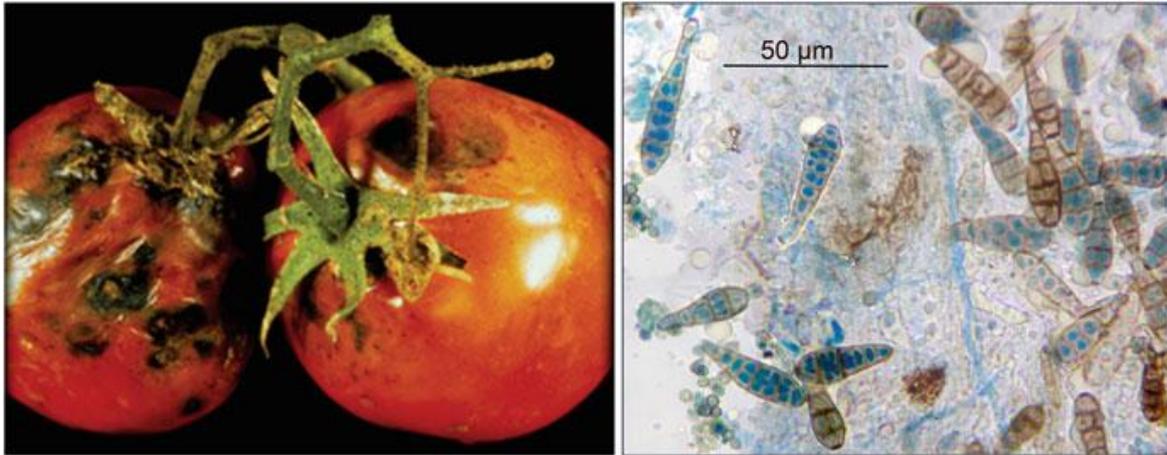


Figure 8 : *Alternaria alternata* sur tomates, conidies (Bräse et *al.*, 2013)

La fusariose induite par *Fusarium oxysporum* est l'une des plus difficiles à contrôler et c'est une maladie grave de plusieurs cultures, plantes sous serre et arbres. Elle provoque des pertes importantes dans la production agricole et a été signalé dans au moins 32 pays (Jones et *al.*, 1991).

En plus de la flétrissure fusarienne et la pourriture racinaire causées par *Fusarium oxysporum*, l'agent pathogène met en place une série d'enzymes hydrolytiques sécrétées au niveau des vaisseaux conducteurs de la sève brute (Semal, 1989), le champignon élabore aussi deux type de toxines les lycomarasmines et les acides fusariques (Gaumann, 1957) responsables de l'augmentation de la perméabilité cellulaire et une transpiration importantes des plantes (Corbaz, 1990).

Cette espèce est plus dommageable des cultures d'intérêt économique, elle est connue par sa haute phytopathogénicité. Sa capacité à vivre en saprophyte lors des conditions non propices (en hiver) grâce à la formation de chlamydospores ou par le développement d'hyphes sur des résidus organiques (Burgess et *al.*, 1994), lui permet d'être une source de contamination importante au champs (Schaafsma et *al.*, 2001). La dissémination des spores par le vent ou les insectes est également une autre voie de contamination (Sutton, 1982).

Deux maladies fusariennes sont à l'origine de pertes considérables sur tomate, il s'agit de la fusariose vasculaire (Figure 9) (*Fusarium wilt*) causée par *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Fol) et la pourriture des racines et du collet (*Fusarium crown and root rot*) causée par *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (Forl) (Katan et al., 1997).



Figure 9 : Symptômes de la fusariose vasculaire et la pourriture racinaire sur plant de tomate (Blancard, 2013).

V- Substances naturelles antioxydantes d'origine végétale

Les cellules et tissus humains peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermique), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant, dues à l'exagération d'un phénomène physiologique, normalement très contrôlé, la production de radicaux dérivés de l'oxygène (Walker et al., 1982).

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (Ekoumou, 2003).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des espèces chimiques formées dans le corps au cours du métabolisme qui sont hautement réactives et peuvent avoir un ou plusieurs électrons non appariés. Le stress oxydatif, c'est-à-dire un déséquilibre entre les ROS et les défenses antioxydantes, a des effets délétères, tels que la peroxydation des lipides membranaires et l'attaque des biomolécules (protéines, enzymes membranaires, hydrates de carbone et ADN) (de Sousa Barros et *al.*, 2015).

Les systèmes de lutte contre les espèces réactives oxygénées sont classés dans trois catégories : la prévention à temps plein (la prévention passive), la détoxification active suite à une attaque oxydante et la détoxification passive (Viro, 2004). Les antioxydants, tels que les vitamines, les enzymes ou Fe^{2+} , etc. sont capables de neutraliser les radicaux libres. Ils exercent un effet bénéfique sur la santé de l'organisme humain, car ils protègent les cellules contre les dommages causés par les oxydants (Adorjan & Buchbauer, 2010).

Différents types de composés des plantes aromatiques et médicinales reçoivent une attention particulière en raison de leurs propriétés de piégeage des radicaux (Brahmi et *al.*, 2017a). Les extraits de *Mentha* ou leurs huiles essentielles ont été signalés avoir des effets antioxydants (Teixeira et *al.*, 2012; Benedec et *al.*, 2013; Biswas et *al.*, 2014; Dhifi et *al.*, 2011; Dorman et *al.*, 2009 ; Gulluce et *al.*, 2007). Les acides phénoliques (par exemple les acides rosmarinique et caféique), les flavones (par exemple, les dérivés de la lutéoline) et les flavanones (par exemple les dérivés d'ériocitrine) sont probablement les principaux antioxydants. Les antioxydants vitaminiques (par exemple l'acide ascorbique et les caroténoïdes) sont des contributeurs mineurs au potentiel antioxydant global. Dans les huiles essentielles, les terpènes insaturés ayant une structure cyclohexadiène (par exemple, terpinène) et les terpènes oxygénés cycliques mineurs (par exemple thymol) peuvent contribuer au potentiel antioxydant, tandis que les monoterpènes oxygénés acycliques insaturés (par exemple, le linalol) peuvent agir comme pro-oxydants. (Riachi & De Maria, 2015).

Le test DPPH, un test largement utilisé pour mesurer la capacité de donner des atomes d'hydrogène (Mata et *al.*, 2007), a été appliqué pour mesurer les capacités antioxydantes des

espèces de *Mentha* extraites par différents systèmes de solvants et a également été utilisé pour évaluer l'activité antioxydante de ses huiles essentielles. D'autres tests sont moins utilisés dans la littérature pour évaluer le potentiel antioxydant/capacité d'absorption des radicaux libres des extraits polaires et des huiles essentielles de l'espèce *Mentha* (Brahmi et al., 2017a).

VI- Substances naturelles antiprolifératives

VI.1- Généralités sur le cancer en Algérie

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme conduisant à l'envahissement des tissus voisins par une croissance illimitée, l'invasion et la métastase des cellules (Chang et al., 2011; Takahashi et al., 2006). Le cancer représente un phénomène tout à fait particulier dans le domaine de la santé. Le nombre de patients atteints de cancer continue d'augmenter de manière constante. Dans le monde, on a dénombré 14,1 millions de nouveaux cas durant l'année 2012 avec 8,2 millions de décès déclarés dans la même année. 70% de ces cas sont signalés dans les pays en développement. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prévoit que ces chiffres pourraient doubler d'ici 2030. Les pays à haut revenu peuvent et doivent accentuer leur soutien aux actions des équipes des pays en développement dans leur lutte pour réduire la morbidité et la mortalité dues aux cancers (Bayala, 2014).

En Algérie, l'augmentation de l'incidence du cancer qui est passée de 80 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 1990 à plus de 130 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 2010 est significative et il est prévisible qu'elle va progresser, pouvant atteindre rapidement 50.000 cas par an (Anonyme, 2014). Près de 40% des patients n'étaient pas retrouvés dans le circuit thérapeutique et seul 1/3 des malades bénéficiait d'un protocole thérapeutique complet. Le délai moyen d'attente pour une cure de radiothérapie était de six (06) mois. Actuellement, l'âge moyen pour tous les cancers est de 54 ans. Cet âge est bas comparé à l'âge médian des cancers dans les pays développés (62 ans en moyenne). L'ascension de la courbe d'incidence s'amorce tôt, avant 40 ans puis évolue de manière exponentielle jusqu'à la fin de la vie. Dès l'âge de 60 ans, les taux d'incidence enregistrés en Algérie s'alignent sur ceux enregistrés dans les pays développés, particulièrement ceux d'Europe du Sud. Ceci se vérifie autant pour les hommes que pour les femmes.

Les formes de cancer les plus fréquentes chez l'homme sont ceux du poumon, du colo rectum, de la vessie, de la prostate et de l'estomac. Ils constituent 52,5% de tous les cancers

masculins. Le cancer du poumon à lui seul représente environ 15% des cancers masculins. Ceci confirme et consolide les tendances depuis 2001 avec la prédominance, chez l'homme, des cancers liés au tabagisme (poumon, vessie), du cancer de la prostate qui connaît une augmentation rapide depuis le début des années 2000 et des cancers digestifs notamment colorectaux. L'élévation de l'incidence des cancers de la prostate se confirme. Il est, aujourd'hui, le 3^{ème} cancer chez l'homme.

Les formes de cancer les plus fréquentes chez la femme sont celles du sein, du côlon rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, et de l'ovaire. Ils constituent 68,2% de tous les cancers féminins. Les cancers du sein (40,45%) et du col de l'utérus (12,5%) qui totalisent, à eux deux, 52,95% de tous les cancers féminins.

VI.2- Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate constitue un important problème de santé chez l'homme à travers le monde (Basu & Tindall, 2010). Le cancer de la prostate est le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes dans les pays occidentaux (Isaacs, 1994). Il constitue une pathologie majeure des pays industrialisés (Califice et *al.*, 2004). En France, le cancer de la prostate est le deuxième cancer le plus fréquent chez l'homme et représente la quatrième cause de décès par cancer chez l'homme (Guérin & Hill, 2010). La prévalence du cancer de la prostate est la plus haute parmi les cancers chez l'homme de plus de 50 ans et son incidence augmente avec l'âge (Bennani, 2007).

En Algérie, le cancer de la prostate dont la progression croissante le classe aujourd'hui en 3^{ème} position des cancers chez l'homme. Cette progression risque encore de s'aggraver comme cela s'est passé dans les pays développés.

VI.3- Epidémiologie et facteurs de risque du cancer de l'utérus

Le cancer du col est souvent diagnostiqué à des stades avancés d'où l'importance du dépistage qui seul permet la réduction de l'incidence des stades invasifs et un traitement efficace surtout en cas de lésions précancéreuses.

L'Algérie a opté en 1997 pour la mise en œuvre d'un plan national de dépistage du cancer du col utérin par cytodiagnostics, en coopération avec l'OMS et le FNUAP en assurant notamment une formation annuelle de screeners et de colposcopistes au niveau du laboratoire de Référence de Cytodiagnostic de l'INSP. La stratégie nationale, adoptée en 2001,

a impliqué notamment l'intégration du dépistage dans les structures sanitaires de base, permettant ainsi l'ouverture d'unités de dépistage réparties sur les 48 wilayas. L'action entamée en 2001 a été évaluée de manière objective en 2014 a permis de constater que les résultats ne sont pas à la hauteur des objectifs fixés, ceci à cause d'insuffisances et de dysfonctionnements qui devraient être corrigés par à une couverture plus adéquate du dépistage par cytologie conventionnelle traditionnelle et aussi en partie grâce à l'introduction de nouvelles techniques de dépistage plus modernes mondialement reconnues. Par ailleurs le recours à des établissements centralisés experts serait d'un grand intérêt par le volume important d'exams effectués, l'encadrement hautement qualifié bien sélectionné, le contrôle de qualité organisé et la gestion informatisée des dossiers.

Il faut noter la stagnation, voire une petite diminution de l'incidence brute du cancer du col de l'utérus qui a été longtemps le deuxième cancer féminin. Cette stagnation a été signalée dans la wilaya d'Alger, il y a quelques années déjà mais aussi dans la wilaya de Sétif. La même tendance à la stagnation s'observerait pour les cancers de l'estomac et du nasopharynx tant chez l'homme que chez la femme.

VI.4- Épidémiologie et facteurs de risque du cancer du côlon

Les régions à haut risque représentées par l'Australie, les pays d'Amérique du nord et la plupart des pays d'Europe occidentale. Les pays d'Europe de l'est et l'Europe du nord sont des régions à risque intermédiaire et les pays à faible risque sont les régions rurales d'Afrique, les pays d'Amérique du sud, la Chine et l'Inde (Boyle Pet Ferlay, 2005).

Actuellement, les taux les plus élevés sont enregistrés dans les pays d'Europe, d'Amérique du nord, en Australie et New Zélande. L'incidence a également augmenté dans certains pays où le risque était historiquement bas (Japon). Les plus fortes hausses sont observées en Asie (Japon, Koweït et Israël) et en Europe de l'est (République tchèque, Slovaquie et Slovénie) au point où les taux d'incidence chez les hommes en République tchèque, en Slovaquie et au Japon ont dépassé les taux les plus élevés observés de longue date dans les pays développés tels que les USA, le Canada et l'Australie (Anonyme, 2016).

En Algérie, avec 544 nouveaux cas en 2011, le cancer du colon se situe, tous sexes confondus, au 2ème rang des cancers les plus fréquents après le cancer du sein chez la femme et celui du poumon chez l'homme. Le nombre de cas incidents annuels augmente régulièrement d'année en année (0.5% par an), Anonyme (2016).

VI.5- Incidence et mortalité

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. Selon l’OMS, le nombre de nouveaux cas de cancer en 2012 est estimé à 14,1 millions et le nombre de décès à 8,2 millions. Il a été estimé en 2008 que 70% des décès par cancer dans le monde survenaient dans les pays en développement. La fréquence des cancers pourrait augmenter de 50 % dans le monde, avec 15 millions de nouveaux cas par an en 2020.

A l’horizon 2030, il est prévu que le nombre de décès par cancer dans le monde s’élève à 13,1 millions. Bien que son incidence soit en augmentation dans la plupart des régions du monde, les taux d’incidence demeurent les plus élevés dans les régions les plus développées, mais la mortalité est relativement beaucoup plus élevée dans les pays en développement, faute de détection précoce et d’accès aux traitements.

En Algérie, l’augmentation de l’incidence du cancer qui est passée de 80 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 1990 à plus de 130 nouveaux cas pour 100.000 habitants en 2010 est significative et il est prévisible qu’elle va progresser, pouvant atteindre rapidement 50.000 cas par an.

VI.6- Stratégies de lutte contre le cancer en Algérie

Un Plan National de Lutte Contre le Cancer a été lancé en 2015 (Anonyme, 2016), pour diminuer l’incidence du cancer, réduire la mortalité liée au cancer, allonger la durée de survie des patients cancéreux et améliorer leur qualité de vie. Pour la mise en œuvre systématique d’une stratégie, trois points essentiels sont à suivre : la prévention, la détection précoce et le diagnostic et traitements. Pour améliorer l’accès aux soins, de nouveaux centres anti cancer ont été créés avec des services de soins palliatifs et de prise en charge de la douleur et l’assurance de la disponibilité du traitement (Anonyme, 2012).

VI.7- Substances naturelles anticancéreuses

Les polyphénols correspondent aux substances actives de plusieurs plantes médicinales, notamment celles utilisées pour le traitement du cancer (Sawadogo *et al.*, 2012). Ils modulent l’activité d’enzymes et de récepteurs cellulaires impliqués dans la transduction du signal des voies de signalisation de la cancérogenèse (Gonzalez-Vallinas *et al.*, 2013). Les effets chimiopréventifs des polyphénols sur les cellules cancéreuses consistent à prévenir les dommages à l’ADN causés par les radicaux libres (potentiel antioxydant) (Nakagawa *et al.*,

2004), à interagir avec les enzymes liées au métabolisme des xénobiotiques (Schwarz & Roots, 2003), à bloquer la prolifération des cellules tumorales en interaction avec des protéines spécifiques régissant la régulation du cycle cellulaire (Thangapazham et al., 2007) et à induire l'apoptose des cellules tumorales (Surh, 2003). La résistance accrue et les effets secondaires des traitements de chimiothérapie ont fait émerger les recherches sur le potentiel pharmacologique des polyphénols (Miclette, 2016). Les composés phénoliques exercent des effets anti-angiogéniques en entravant la libération de facteurs de croissance, en inhibant leur synthèse et celle de leurs récepteurs ou en bloquant les voies de signalisation qu'ils induisent, ils exercent aussi des effets anti-métastatiques (Fingleton, 2006).

Les flavonoïdes représentent 60% des composés phénoliques disponibles dans l'alimentation provenant des plantes (Beecher, 2003). Plusieurs flavonoïdes ont fait l'objet d'études ayant pour but l'évaluation de leur potentiel comme agent thérapeutique anticarcinogène (Noble et al., 2004) et certaines molécules synthétiques les ayant comme modèle ont été approuvées comme traitement de chimiothérapie anticancéreuse. Outre leurs mécanismes d'action liés à leurs propriétés antioxydantes et de chélateur d'ions métalliques, ils interagissent directement avec des enzymes liées à la progression du cancer telles que l'aromatase (CYP19), Ibrahim & Abulhadj (1990), des enzymes responsables de la biosynthèse des œstrogènes et la topoisomérase, des enzymes contrôlant la torsion et l'enroulement de l'ADN (Yamashita, 1990).

Certaines huiles essentielles présentent des activités anti-tumorales et sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers. L'huile essentielle isolée des graines de *Nigella sativa* L., démontre une activité cytotoxique *in vitro* contre différentes lignées tumorales. *In vivo*, elle limite la prolifération des métastases hépatiques et retarde la mort des souris ayant développé la tumeur P815 (Mbarek et al., 2007). L'huile essentielle de *Melissa officinalis* s'est, quant à elle, révélée efficace contre des cellules de lignées cancéreuses humaines, incluant des cellules leucémiques HL-60 et K562 (De Sousa et al., 2004).

D'autres applications médicales ont fait l'objet d'études. Les travaux réalisés par Oussou (2009), ont prouvé la capacité de l'huile essentielle de *Ocimum canum* à limiter la formation d'ulcères gastriques induits par l'éthanol. Ceux de Monti et al., (2002) ont montré que les huiles essentielles facilitent la pénétration transdermique de substances médicamenteuses lipophiles, comme l'oestradiol.



Partie expérimentale



**I- Extractions,
séparation et analyses
des extraits, de l'huile
essentielle et du
composé majoritaire
de *M. rotundifolia***

I- Extractions, séparation et analyses des extraits, de l'huile essentielle et du composé majoritaire de *M. rotundifolia*

1-Introduction

De part sa situation géographique particulière, l'Algérie bénéficie d'une gamme très variée de climats favorisant le développement d'une flore riche et diversifiée. En effet, le territoire algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, la steppe, le Sahara et est autour des points d'eau. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région (Kholkhal, 2014).

Les métabolites secondaires des plantes sont des composés chimiques structurellement très divers. Ils exercent divers effets biologiques même à très faible concentration et, par conséquent, jouent un rôle important dans les communications écologiques. Contrairement au vingtième siècle, les écologistes sont maintenant bien conscients de l'impact que peuvent avoir les métabolites secondaires à travers leur interaction avec l'environnement biotique et abiotique dans lequel ils existent (Wink, 2003).

Ainsi, les chercheurs de diverses disciplines scientifiques sont confrontés au défi d'extraire le matériel végétal avec des solvants, souvent dans un premier temps pour isoler et identifier les composés spécifiques responsables des activités biologiques associées à une plante ou à un extrait de plante (Jones & Kinghorn, 2012).

Durant la guerre d'Algérie, le docteur Jean Valnet soignait les blessures par les huiles essentielles. Tous ses remèdes ont été publiés en 1976, dans son livre « Aromathérapie », ce qui relance une vague d'intérêt pour les huiles essentielles par le grand public (Thomas, 2016). Avec les progrès de la chimie organique, nous en sommes maintenant dans une étape de démonstration. La connaissance des composants sert à expliquer l'action physique, chimique, biochimique, et thérapeutique des huiles.

En raison du mode d'extraction des plantes aromatiques, principalement par hydrodistillation, elles contiennent une variété de molécules volatiles telles que les terpènes et les terpénoïdes, les composants aromatiques dérivés du phénol et les composants aliphatiques (Bakkali et al., 2008).

L'objectif principal du criblage phytochimique est d'identifier la nature des composés présents dans un extrait végétal donné, qui peut être responsable de l'effet biologique observé. Le criblage phytochimique du principe actif et des composés contenus dans les plantes a ainsi permis de découvrir des composés tels que les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponines, les stéroïdes, la scopolamine, les coumarines et les glycosides (Shinkafi, 2014).

Cette partie a été réalisée pour déterminer les composés phytochimiques des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et aussi pour séparer les composés majeurs qui apparaissent en grande quantité en fractions, et pour déterminer la teneur phytochimique quantitative de chaque fraction en utilisant des techniques chromatographiques.

2- Etude botanique de la menthe

Les menthes (Lamiaceae) sont des plantes herbacées, vivaces, très odorantes que l'on trouve particulièrement dans les milieux humides. Le genre *Mentha* qui comprend 20 espèces distribué dans le monde entier est parmi les principaux genres appartenant à la famille des Lamiaceae (McKay & Blumberg, 2006). Il existe de nombreuses espèces de menthe dont certaines, telle *M. rotundifolia*, pousse spontanément en Algérie. C'est une plante aromatique très utilisée en médecine traditionnelle, dans les préparations culinaires, les confiseries, en cosmétique et parfumerie (Brada et al., 2007). Les parties aériennes des espèces de *Mentha* ont été largement utilisées en traitement du rhume, du choléra, de la bronchite, de la tuberculose, la sinusite et pour leur propriétés diurétique, carminative, anti flatulente, propriétés expectorantes, anti-tussives et antioxydantes (McKay & Blumberg, 2006 ; Kamkar et al., 2010).

3- Répartition géographique

Le genre *Mentha* est principalement distribué dans les régions tempérées et subtempérées du monde (Bhat et al., 2002). En Algérie, *M. rotundifolia* est une espèce spontanée, vivace répandue dans toutes les régions humide. Elle se développe sur les endroits humides, terrains vagues jusqu'à 1300m (Beauquesne et al., 1980) c'est une espèce commune des ruisseaux, fossés, bords d'eau, prairies humides, bords de chemins, sentiers ombragés. Sa floraison s'effectue de juillet à septembre.

4- Classification et systématique

M. rotundifolia, dont le nom vernaculaire est « *Timarssat* » en langue arabe, est un hybride de *M. longifolia* et de *M. suaveolens* (Kokkini & Papageorgiou, 1988 ; Lorenzo *et al.*, 2002) alors que pour d'autres auteurs *M. rotundifolia* et *M. suaveolens* correspondent à la même espèce (Hendriks, Van Os, 1976).

La menthe à feuilles rondes communément appelée مقل السيف est classée selon Iserin *et al.*, 1997 comme suit :

Embranchement : Spermaphytes
Sous Embranchement : Angiospermes
Classe : Dicotylédones
Sous Classe : Gamopétales
Ordre : Lamiales
Famille : Lamiacées
Genre : *Mentha*
Espèce: *Mentha rotundifolia* (Linné, 1762)



5- Description botanique Menthe à feuilles rondes, Menthe baume مرسييت، تيميجو Timijo, Mersit

La famille des Lamiacées ce sont des plantes angiospermes dicotylédones à fleurs gamopétales irrégulières qui regroupe surtout des plantes herbacées et sous-arbustives réparties dans le monde entier. Les Lamiacées comptent plus de trois mille cinq cents espèces, quelque deux cents genres, répartis en sept sous-familles (El Kalamouni, 2010).

Mentha est dérivé du nom grec Minthé, nymphe qu'une déesse métamorphosa en plante. *Rotundifolia* fait référence à l'extrémité des feuilles, plus ronde que chez les autres espèces. La Menthe à feuilles rondes est présente en Europe ainsi qu'au Maghreb. Elle est très commune en Algérie, en particulier dans les lieux humides et inondés. Cette menthe, en usage interne, sert à soigner les palpitations et les gripes; elle peut aussi être employée comme laxatif. En usage externe, elle est utilisée comme cicatrisant, pour le traitement des hémorroïdes, les douleurs du bas ventre, les abcès et les furoncles. Elle sert parfois à parfumer le thé.

C'est une plante herbacée, pubescente très odorante de 30 à 60cm de hauteur. Les feuilles sont arrondies aux bords, elles sont odorantes. Les fleurs sont réunies en épis, elles sont de couleur rose ou blanche, groupées en épis relativement denses. Les feuilles sont ridées, opposées sans pétiole ou presque, entières et de forme ovale ou arrondie (Figure 10).



Figure 10: *Mentha rotundifolia*

6- Usages et propriétés thérapeutiques

En Algérie, *M. rotundifolia* est largement utilisée, par exemple la décoction des feuilles est faite pour une application topique pour traiter la furonculose et les abcès, pour réduire la fièvre et comme bain-bouche pour les douleurs dentaires (Brahmi et *al.*, 2014). De plus, la plante traiterait la bronchite, la toux et la colite ulcéreuse. Elle est également prise comme tonique, utilisée comme stimulant, stomachique, carminatif, analgésique, cholérétique, antispasmodique, sédatif et hypotensif (Ladjel et *al.*, 2011).

7- Matériel et Méthodes

7.1- Récolte de la plante

Les parties aériennes de *M. rotundifolia* ont été collectées en juin 2014 dans la région de Chouf Lakdad (Setif, Algérie), (Figure 11). La plante a été identifiée par le Pr. Boulaacheb Nacira (Département de Pharmacie, UFA Sétif 1). Les échantillons ont été séchés à l'ombre à

l'abri de la lumière à température ambiante. Le site de prélèvement de la plante *M. rotundifolia* est présenté sur la figure 11 (36.209291° latitude et 5.378833° longitude).

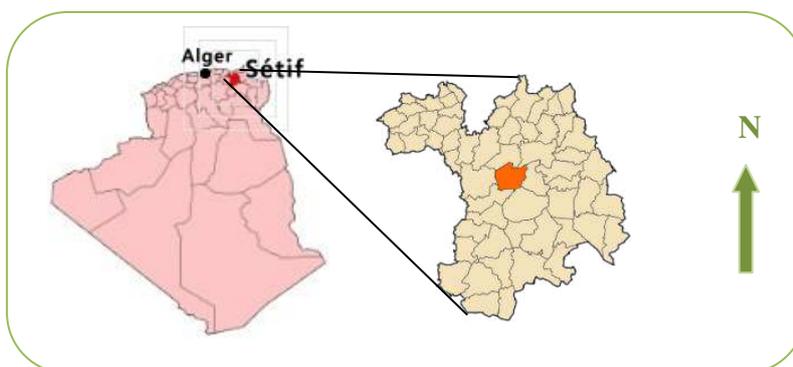


Figure 11 : Lieu de cueillette de la plante.

7.2- Préparation des différents extraits

Après séchage de la plante, un échantillon (100 g) de *M. rotundifolia* a été broyé en une fine poudre. L'extrait aqueux a été obtenu par macération d'échantillons (50 g) avec de l'eau distillée (500 mL) pendant 24 heures, à 80 ° C. Après filtration avec filtre Whatman n °1, le filtrat est ensuite évaporé à sec sous 65 ° C sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi Rotavapor R-200). Les extraits éthanoliques et méthanoliques ont été obtenus par macération d'échantillons (20 g) avec 200 ml de solvant, pendant 24h. Les macérats ont été filtrés et évaporés des surnageants, en utilisant un évaporateur rotatif Buchi. La macération s'effectue dans des Erlenmeyer scellés sur une plaque agitatrice. Tous les extraits obtenus ont été pesés et stockés à 4 ° C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

7.3- Rendement en extraits

Les rendements d'extraction ont été déterminés par rapport à la quantité de matière végétale utilisée (Carré, 1953) selon la formule :

$$\mathbf{R \% = Me / Ms \times 100}$$

Me : masse de l'extrait obtenu (après évaporation du solvant)

Ms : masse de matière sèche réduite en poudre utilisée

7.4- Analyse des extraits de *M. rotundifolia*

7.5- Screening phytochimique (analyse qualitative)

Le screening phytochimique est le moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des groupes de familles chimiques présentes dans une plante donnée. Toute fois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules chimiques. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative (Badiaga, 2011).

L'espèce sélectionnée fait l'objet d'une étude phytochimique qui consiste à détecter les différents composés chimiques existant dans la plante. Trois solvants de polarités différentes (eau, éthanol, éther diéthylique) ont été utilisés, au cours de ces tests qui sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation ainsi que des examens en lumière ultraviolette.

7.5.1- Les alcaloïdes

La présence des alcaloïdes est établie par la précipitation de sels et la révélation à l'aide du réactif de Mayer : Iodure de potassium (KI) 25 g, chlorure mercurique (HgCl_2) 6,8 g, eau distillée (1000 ml), Sofowora (1982).

10g de plante, mise en poudre, est pesé puis mélangé à 50 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est ensuite filtré puis on y ajoute NH_3 jusqu'à un pH: 8 à 9, on fait ensuite l'extraction par CHCl_3 (3 fois), on évapore CHCl_3 , on ajoute à l'extrait sec 2 ml HCl (1%), puis on ajoute 3 gouttes de réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc ou une phase trouble indique la présence des alcaloïdes.

7.5.2- Les anthocyanosides

Le test effectué consiste à doser la solution aqueuse acide avec une solution NaOH. Les anthocyanosides ont des colorations variant en fonction du pH :

-  coloration rouge stable en pH < 3 ;
-  coloration bleu en milieu en $4 < \text{pH} < 6$.

7.5.3- Les anthracénosides

La détection des anthracénosides est réalisée par le réactif de Borntrager, en traitant 8ml de la solution extractive éthanolique par ce dernier. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée-rouge au violet- pourpre (Bruneton, 1999).

Réactif de Borntrager : en milieu alcalin aqueux NH_4OH , les anthracénosides donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituant de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

7.5.4- Les anthraquinones

La détection des anthraquinones consiste à :

- Traiter 1g du matériel végétal avec 10 ml de KOH (0,5N) et 1 ml H_2O_2 dilué à 5%;
- Bouillir et refroidir le mélange;
- Filtrer, puis acidifier le filtrat avec de l'acide acétique;
- Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de toluène;
- Agiter l'extrait de toluène en présence de 5 ml de NH_4OH ;

Une réaction positive est révélée par formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline (Bruneton, 1999).

7.5.5- Les coumarines

La présence des coumarines est indiquée par une fluorescence intense (Bruneton, 1999). Leur détection consiste à :

- Evaporer à sec 5 ml de la solution extractive étherique
- Le résidu obtenu est repris dans 2 ml d'eau chaude, puis diviser le volume en deux parties ; Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0,5 ml de NH_4OH à 10 % ,
- Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV.

7.5.6- Les flavonoïdes

10g de plante, mise en poudre , est pesé puis mélangé à 100 ml d'une solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24 h, après filtration on ajoute NH_4OH au filtrat jusqu'à

la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes Benzahi (2001).

7.5.7- Les polyphénols

La réaction au chlorure ferrique (FeCl_3) a permis de caractériser les polyphénols. A 2 ml de chaque extrait (étherdiéthylique, méthanolique et aqueux), nous avons ajouté une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2%. L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols (N'guessan et *al.*, 2009).

7.5.8- Les quinones

Les substances quinoniques ont été recherchées à partir du réactif de Bornstraëgen. Deux (2) ml de chacun des 3 extraits ont été évaporés à sec. Le résidu est trituré dans 5 ml d'acide chlorhydrique au 1/5. Le triturât est versé dans un tube à essais. Le triturât est porté ensuite au bain-marie pendant 30 min. Après refroidissement, il est extrait par 20 ml de chloroforme. L'ammoniaque dilué 2 fois (0,5 ml) a été ajouté à la solution chloroformique. Une coloration rouge ou violette constituait le signe de la présence de quinones. (N'guessan et *al.*, 2009).

7.5.9- Les saponosides

Les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse (Bruneton, 1999). Leur détection est réalisée en ajoutant 1 ml d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, après une forte agitation d'une minute, le mélange est laissé pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée par la mesure de la hauteur de la mousse:

- Pas de mousse = test négatif (-).
- Hauteur de mousse moins de 1cm = test faiblement positif (+).
- Hauteur de mousse de 1 à 2cm = test positif (++).
- Hauteur de mousse plus de 2cm = test très positif (+++).

7.5.10- Les stérols

La présence des stérols est mise en évidence à l'aide de H_2SO_4 (Bruneton, 2009). 5g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme. Après filtration la solution obtenue est répartie entre deux tubes à essais (l'un servira de référence). On ajoute d'abord

l'anhydride d'acétate ($C_4H_6O_3$); ensuite nous avons ajouté 1ml d' H_2SO_4 au fond du tube sans agiter.

La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides et d'une coloration violette de la couche surnageante révèlent la présence des stérols. C'est la réaction de Liebermann-Buchard.

7.5.11- Les tanins

La présence des tanins est mise en évidence en ajoutant, à 1 ml de l'extrait aqueux, 1 ml d'eau distillé et 1 à 2 gouttes de solution de FeCl diluée à 1%. L'apparition d'une coloration verte foncée ou bleu-verte indique la présence des tanins (Trease et Evans, 1987).

7.6- Analyse quantitative par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée avec une spectroscopie de masse (HPLC-TOF/MS)

L'analyse CLHP a été réalisée avec un système de Agilent Technology of 1260 Infinity HPLC, équipé d'un détecteur LC/MS de temps de vol 6210 (TOF). Avec une colonne ZORBAX SB-C18 (4.6 x100mm, 3.5 μ m). Les phases mobiles A et B étaient des eaux ultrapures avec 0,1% d'acide formique et d'acétonitrile, respectivement. Le débit est de 0,6 mL.min⁻¹ et la température de la colonne était de 35 °C. Le volume d'injection est de 10 μ L. Le programme de solvant est le suivant: 0-1 min 10% B; 1-20 min 50% B; 20-23 min 80% B; 23-30 min 10% B. Le mode d'ionisation de l'instrument HPLC-TOF/MS est négatif et fonctionne avec une température de gaz d'azote de 325 °C, le débit d'azote gazeux est de 10L.min⁻¹, le nébuliseur de 40 psi, le voltage capillaire est de 4000V et finalement, le voltage fragmentaire est de 175V. Pour l'analyse des échantillons, les extraits bruts séchés (200 ppm) ont été dissous dans du méthanol à température ambiante. Les échantillons ont été filtrés en passant par un filtre PTFE (0.45 μ m) par un injecteur pour éliminer les petites particules.

En comparant les chromatogrammes standards avec ceux des échantillons, différents composés ont été trouvés dans nos extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique).

7.7- L'extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation d'un échantillon de 100g de masse végétale séchée dans un ballon de 2 litres, on y ajoute une quantité d'eau distillée correspondant à 2/3 du volume du ballon. Le tout est monté dans un appareil de type Clevenger (1928) pendant approximativement 3 heures à partir de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur. L'huile récupérée, après sa pesée, est conservée dans un flacon fumé et bien scellé à 4°C jusqu'à son utilisation.



7.8- Rendement en huile essentielle

Le rendement, exprimé en pourcentage est calculé par la formule ci-dessous (Carré, 1953).

$$R (\%) = (m / m_0) \times 100$$

R (%) : Rendement en huile essentielle exprimé en %.

m : Masse en grammes de l'huile essentielle.

m₀ : Masse en grammes du matériel végétal sec à traiter.

7.9- Séparation du composé majoritaire

Un échantillon de l'huile essentielle (1660 mg) a été séparé par colonne Chromatographie (Figure 12) avec le gel de silice (200-500 mL) en utilisant un gradient de solvants hexan, dichloromethan, ethyle acetate. 360 fractions ont été éluées avec un gradient de solvants d'augmentation de polarité. Toutes les fractions étaient soumises à une analyse GC-MS. Sur la base des résultats de dépistage du GC-MS des fractions collectives, le principal composé a été recueilli dans les fractions 326-330. Les fractions combinées ont été

évaporées et déterminées par GC-MS et RMN. Autres fractions ont été recueillies et soumises à la GC-MS.



Figure 12 : Colonne chromatographie avec gel de silice

7.10- Analyses de l'huile essentielle

7.10.1- Analyse par GC

L'analyse par GC de l'huile essentielle a été analysée par GC-MS sur un modèle Agilent Technologies GC 7890A et injectée avec une colonne capillaire HP-5ms (30 m x 250 mm x 0,25 mm), à une tension d'ionisation de 70 eV. Le gaz porteur (1 ml min⁻¹) était de l'hélium. La température de la colonne a été augmentée de 60 ° C à 240 ° C à une vitesse de 4 ° C min⁻¹, pour une durée totale de fonctionnement de 45 minutes. Un échantillon dilué de 1 µl a été injecté en mode divisé (20: 1).

7.10.2- Analyse par GC-MS

L'huile essentielle a été effectuée sur Agilent Technologies GC 7890A avec un système intégré détecteur à trois axes 5975, un système d'ionisation équipé, une colonne HP5-ms (30 m x 250 mm x 0,25 mm) et une énergie d'ionisation (70 eV) pour la détection par GC-MS. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un débit (1 ml min⁻¹). La même colonne tempérée a été obtenue avec l'analyse GC, en comparant leurs modèles de fragmentation spectrale de masse (base de données WILLEY et NIST / système de données ChemStation) et leurs indices de rétention (déterminés par rapport aux séries homologues d'alcane normaux).

8- Résultats et Discussion

8.1- Rendement en extraits et en huile essentielle de *M. rotundifolia*

Les rendements en extraits aqueux, éthanolique et méthanolique ainsi qu'en huile essentielle sont enregistrés au tableau 1. Il en ressort que le rendement en extrait aqueux fait état d'un rendement élevé de l'ordre de (20.08%) par rapport à l'extrait méthanolique (9.15%) et éthanolique (2.2%).

Tableau 1 : Rendement en (%) des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

	Extrait aqueux	Extrait éthanolique	Extrait méthanolique	Huile essentielle
<i>M. rotundifolia</i>	20.08%	2.2%	9.15%	1.27%

À partir de ces résultats, nous constatons que l'extrait aqueux fournit le meilleur rendement d'extraction par rapport à l'extrait éthanolique et méthanolique. Ce qui corrobore avec les travaux de Ciulei (1980) qui a démontré que la différence de rendement au sein du même organe d'une plante en relation avec le solvant utilisé s'explique par le fait que la fixation des composés chimiques de la plante par un solvant donné peut dépendre de sa polarité et/ou de la teneur en composés apolaires ou de l'organe végétal considéré.

Cependant, il reste difficile de comparer nos résultats à ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et semble être lié aux propriétés des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions environnementales, à la durée du stockage, à la période de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées, le rapport poids de la plante/volume du solvant et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Seladji, 2015).

Le rendement en huile essentielle de *M. rotundifolia* obtenu par hydrodistillation étant de l'ordre de 1,27%; en est supérieur aux résultats de ceux obtenus par Arab et *al.*, 2016 (0,95%) dans la même région (Sétif, Algérie). Dans d'autres régions d'Algérie, notre résultat est inférieur aux rendements obtenus par Lehabab (2013) à Tlemcen (1,7%) et supérieur aux résultats de Brada et *al.*, 2006 (0,2%), Brada et *al.*, 2007 (0,8 %) et Brahmi et *al.*, 2016a (0,49%) dans la région de Chlef, Ain Defla et Bejaia, respectivement.

En d'autres pays, le rendement de notre étude en huile essentielle de *M. rotundifolia* est inférieur à celui de Derwich et *al.*, 2010 (1,54% au Maroc). En outre, notre résultat est

supérieur aux résultats de Riahi et *al.*, 2013 à Beja (1.26%) et à Bizerte (1.04%) en Tunisie et supérieur à celui de Lorenzo et *al.*, 2002 (1.02% en Uruguay) et Pino et *al.*, 1999 (0,2% à Cuba).

Brada et *al.* (2007), soulignent que le faible rendement est attribué à la sénescence des feuilles récoltées en novembre (après la floraison). Les mêmes auteurs ont remarqué que de meilleurs rendements (1,6-1,8%) sont obtenus lorsque la récolte est effectuée entre juin et juillet durant la période de floraison.

De plus, le rendement en huile essentielle dépend de plusieurs facteurs, notamment l'espèce, le milieu de récolte, la période de récolte, les pratiques culturales et les méthodes d'extraction (Benayad, 2008).

8.2- Screening phytochimique

Les résultats du screening phytochimique sont classés en fonction des différents critères d'observation, entre autres, réaction positive ou test négatif. Les résultats du screening phytochimique sont représentés au tableau 2.

Tableau 2 : Screening phytochimique des extraits de *M. rotundifolia*

Composés	Partie aérienne de <i>M. rotundifolia</i>
Saponosides	-
Tanins	+
Anthraquinones	-
Flavonoïdes	+
Alcaloïdes	-
Anthracénosides	-
Coumarines	+
Anthocyanosides	-
Stérols	+
Quinones	-
Polyphénols	+

+ Présence ; - Absence

Les principaux groupes chimiques mis en évidence par la caractérisation phytochimique sont des stérols et coumarines ; des polyphénols ; des flavonoïdes et des tanins.

Par ailleurs, il est à noter l'absence des saponosides, d'alcaloïdes et d'antraquinones. Parmi les groupes chimiques mis en évidence on peut citer les flavonoïdes et les polyphénols dont l'activité biologique a été démontrée.

Les flavonoïdes constituent un des plus vastes groupes de polyphénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Richter, 1993; Stevens et *al.*, 1998) et ils présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines à l'instar des industries agroalimentaires, pharmaceutiques (antioxydants), cosmétiques (antivieillessement), etc. (Diallo, 2003) et en agriculture tant efficaces pour la lutte contre les champignons pathogènes des grains de céréales (Kalt, 2000).

Les polyphénols constituent une grande classe chimique. Ils comprennent une extrême variété de structures et d'activités biologiques (Queiroz-Monici et *al.*, 2005). Les polyphénols sont des composés principaux antimicrobiens des plantes, aux modes d'action diverses et des activités inhibitrices et létales vis-à-vis d'une grande catégorie de microorganismes procaryotes et eucaryotes (bactéries et champignons) (Cowan, 1999).

Les coumarines de différents types se rencontrent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour l'activité antipéroxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes (Madhavi et *al.*, 1996). Ainsi donc, les coumarines possèdent des propriétés physiologiques et antimicrobiennes. La warfarine est une coumarine utilisée comme anticoagulant aux propriétés antivirales (Cowan, 1999). De même, les coumarines présentes dans la plante *Galium odoratum*, seraient responsables de l'activité antibactérienne et antifongique de cette plante (Hostettmann, 1991). Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexine (Vivas de Gaulejac, 2001).

La présence des tanins dans la plante pourrait expliquer la forte activité antioxydante puisqu'ils sont des bons piègeurs des radicaux libres et inhibent la formation du radical superoxyde (Badiaga, 2011). Les tanins des plantes inhibent la croissance des insectes

(Schultz, 1988). Selon les études de Scalbert (1991), les tanins peuvent être toxiques pour les champignons filamenteux, les levures et les bactéries. Leur présence confère à cette dernière des propriétés astringente, antiseptique, antioxydante et antidiarrhéique (Vivas de Gaulejac, 2002). Les composés phénoliques (quinones, tannins et lignines) en plus de leurs incidences sur le comportement présentent un effet à large spectre, limitant la viabilité et le potentiel de reproduction des insectes (Strebler, 1989).

En somme, le screening phytochimique réalisé à partir des extraits de *M. rotundifolia* montre la présence surtout des flavonoïdes, des polyphénols et des tanins possédant des activités biologiques intéressantes. Ces résultats corroborent à ceux mentionnés par Seladji (2015) et Bounihi (2016).

La présence de familles chimiques si importantes que recèle *M. rotundifolia* est à l'origine d'activités biologiques intéressantes sur divers plans. Cette plante constitue donc une source privilégiée pour enrichir la production des biopesticides.

8.3- Identification des acides phénoliques et des flavonoïdes par Chromatographie Liquide de Haute Performance couplée avec une spectroscopie de masse (HPLC-TOF/MS)

L'analyse par CLHP nous a donné différents composés (les acides phénoliques et les flavonoïdes) dans les trois extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique). Les résultats quantitatifs sont regroupés au Tableau 3.

L'identification des composés phénoliques a été effectuée par comparaison de leurs temps de rétention et leurs masses aux standards.

L'analyse par CLHP a clairement montré la richesse des extraits étudiés et a permis d'identifier :

- 14 composés pour l'extrait aqueux dont 9 acides phénoliques et 5 flavonoïdes ;
- 14 composés pour l'extrait éthanolique dont 7 acides phénoliques et 7 flavonoïdes ;
- 17 composés pour l'extrait méthanolique dont 9 acides phénoliques et 8 flavonoïdes.

Comme le montre le tableau ci-dessous, les extraits analysés comportent un mélange complexe des métabolites secondaires. Ces constituants appartiennent à deux groupes chimiques importants, à savoir, les acides phénoliques et les flavonoïdes connus pour leurs multiples activités biologiques.

Dans l'extrait aqueux, les acides phénoliques ont été identifiés comme étant: l'acide fumarique, l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechuique, l'acide caféique, l'acide syringique, l'acide férulique et l'acide cinnamique avec l'acide fumarique ayant la concentration la plus élevée (7.39 mg/kg plante). Or, les flavonoïdes ont été identifiés comme étant la catéchine, la quercétine-3- β -D-glucoside, la scutellarine, la diosmine, la naringine, avec la scutellarine ayant le taux le plus élevé (30.39 mg/kg plante).

Tableau 3 : Analyse des extraits par Chromatographie Liquide à Haute Performance.

Composé	Extrait aqueux (mg/kg plante)	Extrait éthanolique (mg /kg plante)	Extrait méthanolique (mg /kg plante)
Acide fumarique	7.39	2.60	2.57
Acide gentisique	0.73	1.60	0.57
Acide chlorogénique	3.28	12.25	7.31
Catéchine	0.56	0.13	0.51
Rutine	ND ¹	0.13	0.29
Acide 4-hydroxybenzoic	2.15	5.74	2.05
Acide protocatechuique	1.03	3.42	0.93
Acide Cafféique	0.79	1.52	0.78
Acide syringique	1.43	3.83	1.53
Scutellarine	30.39	25.33	40.24
Acide vanillique	ND ¹	ND ¹	0.36
Quercetine-3-β-D-glucoside	0.27	0.90	1.47
Naringine	0.12	0.60	0.40
Acide ferulique	5.80	ND ¹	ND ¹
Morine	ND ¹	2.45	0.66
Diosmine	2.11	8.49	2.93
Acide cinnamique	0.52	ND	0.47
Wogonine	ND	14.75	2.08

¹ND: non déterminé

Pour ce qui est de l'extrait éthanolique, les acides phénoliques ont été identifiés comme étant l'acide fumarique, l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechuique, l'acide caféique, l'acide syringique avec l'acide chlorogénique ayant la concentration la plus élevée (12.25 mg/kg plante). Alors que

les flavonoïdes ont été identifiés comme étant la rutine, la scutellarine, la quercétine-3- β -D-glucoside, la naringine, la morine, la diosmine, la wogonine avec la scutellarine ayant le taux le plus élevé (25.33 mg/kg plante).

Cependant les acides phénoliques de l'extrait méthanolique ont été identifiés comme étant l'acide fumarique, l'acide gentisique, l'acide chlorogénique, l'acide 4-hydroxybenzoïque, l'acide protocatechuique, l'acide caféique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide cinnamique, avec l'acide chlorogénique ayant la concentration la plus élevée (7.31 mg/kg plante). Les flavonoïdes, pour leur part, ont été identifiés comme étant la cetechine, la rutine, la scutellarine, la wogonine, la naringine, la diosmine, la morine, la quercétine-3- β -D-glucoside, avec la scutellarine ayant le taux le plus élevé (40.24 mg/kg plante). La CLHP montre que la scutellarine était déterminée comme le composé phénolique majoritaire de tous les extraits.

Selon Ramdan *et al.* (2017), la comparaison de ces résultats à ceux de la littérature semble difficile car les résultats de la CLHP varient en fonction du solvant (Puttipan, Okonogi, 2014), des organes de la plante (Mahmoudi *et al.*, 2013) et d'une espèce ou famille à une autre (Adjou *et al.*, 2013).

En effet, les résultats des analyses de la CLHP dépendent de la génétique caractéristique des plantes aromatiques médicinales, leur origine géographique, la période de récolte, les conditions et la durée de stockage et enfin de la méthode et la durée de la macération (OMS, 2011).

D'après Meirinhos *et al.* (2005) cité *in* Cheurfa (2015), les différences constatées dans les quantités des composés phénoliques par rapport à la bibliographie peuvent être dues au procédé d'extraction appliqué, la température utilisée ou la polarité des solvants. D'autre part, l'influence de l'origine géographique des échantillons et aussi l'année de la collecte, ne peut pas être exclue.

Ouchemoukh Amessis *et al.*, (2014) rapportent que les différences entre les résultats obtenus et la littérature peuvent être attribuées à des facteurs intrinsèques (génétique végétale) et extrinsèques (environnement, protocole d'extraction, conservation et stockage ...).

8.4- Composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de son composé majoritaire

L'analyse de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (GC-MS) a permis d'identifier 14 composés (Tableau 4). Le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- est le constituant majoritaire de cette huile d'un taux d'environ 89,09%. Le reste est constitué de monoterpènes et de sesquiterpènes (Figure 13).

L'examen du Tableau 4, nous a permis de constater la présence dans l'échantillon de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* de certains nombres de composés identiques (β -Pinene). Deux composés minoritaires dont les teneurs ne dépassent pas 0,5% de l'huile essentielle totale ont été identifiés : 1-Octen-3-ol, acetate (0,29 %) et Bornéol (0,38 %).

Tableau 4 : Composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Composé	TR (mn)	IR	%	Nom
1	11.751	907	1.18	α -Pinene
2	12.951	947	0.54	β -Pinene
3	13.135	953	1.17	β -Pinene
4	13.337	959	0.68	β -Pinene
5	14.749	1001	1.74	β -Terpinyl acetate
6	17.304	1077	0.29	1-Octen-3-ol,acetate
7	19.619	1144	0.38	Borneol
8	22.873	1237	0.52	Carvone oxide
9	26.509	1346	89.09	3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)-
10	27.352	1372	0.77	3-Méthyl-2-pent-2-enyl-cyclopent-2-enone
11	27.548	1378	1.25	Cinerolone
12	28.212	1397	0.91	Caryophyllene
13	28.867	1419	0.70	β -Farnesene
14	30.078	1458	0.79	β -Cubebene

TR: Temps de rétention; **IR :** Indice de rétention

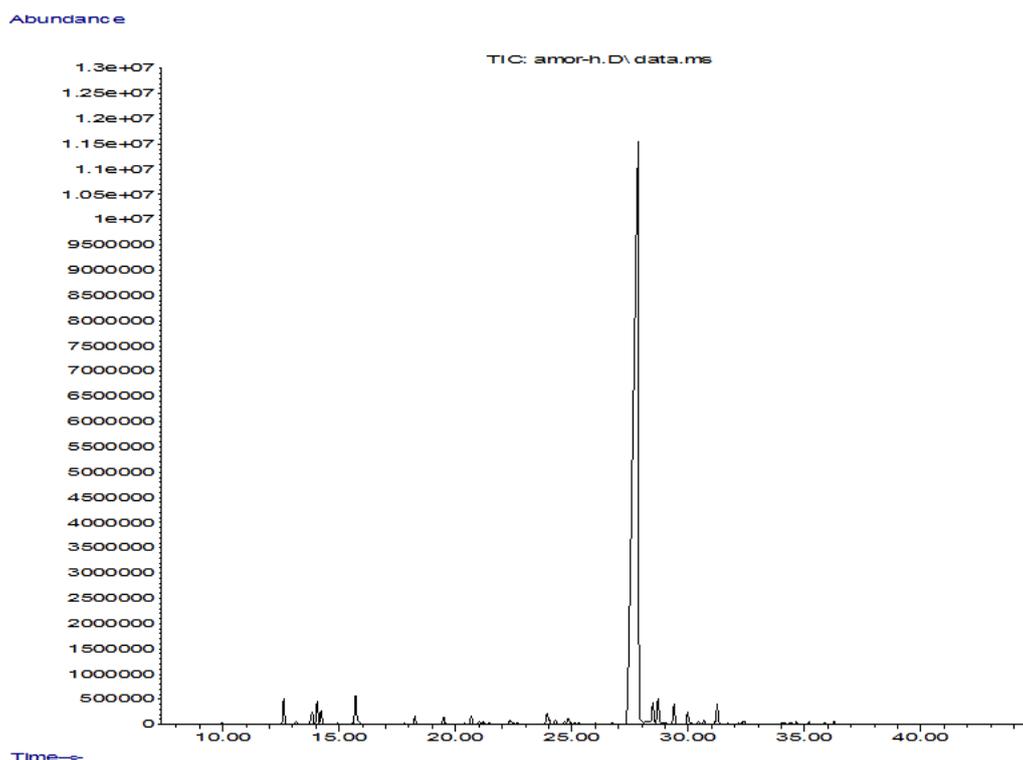


Figure 13 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

La séparation de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* nous a donné 360 fractions (jugées différentes visuellement). Après combinaison des fractions identiques, la GC/MS a donné 13 fractions dont la 10^{ème} a prouvé d'importante activité insecticide.

La GCMS du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est indiquée sur le Tableau 5. Son chromatogramme est présenté sur la figure 14.

Tableau 5 : Composition chimique du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Composé	TR(min)	%	Nom
1	22,967	0,73	Bicyclo[4.1.0]heptane,-3-cyclopropyl,-7-hydroxymethyl, trans
2	23,862	0,11	3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde, 3,4-dimethyl-
3	26,604	98,96	3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-
4	27,623	0,20	Cinerolone

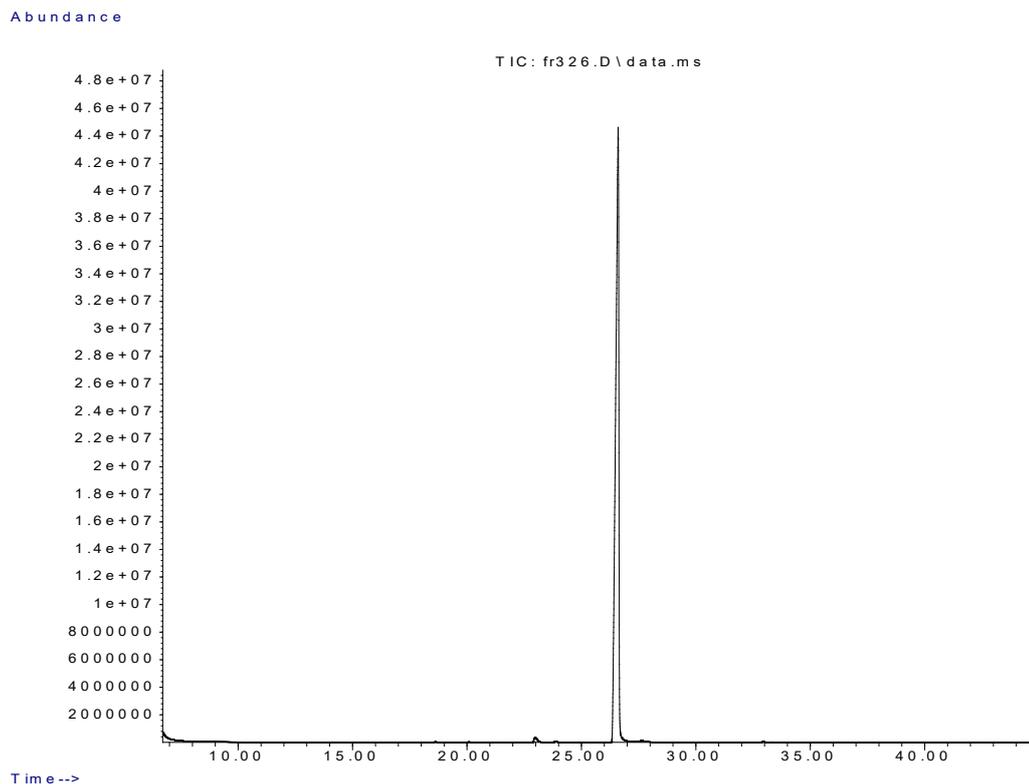


Figure 14: Chromatogramme du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Avec comme principe actif le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- (Figure 15), l'huile essentielle de *M. rotundifolia* ne présente pas les mêmes caractéristiques chimiques des huiles essentielles de *M. rotundifolia* d'origine algérienne comme composé majoritaire.

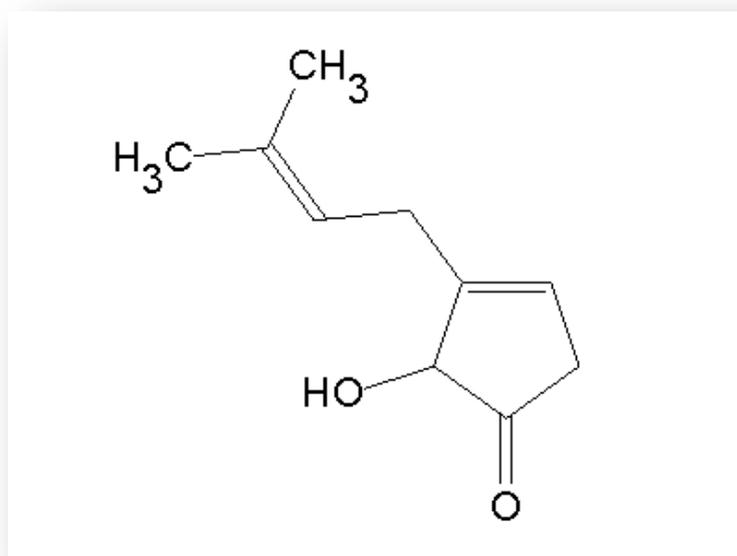


Figure 15 : 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)-

Arab et *al.*, (2016) ont trouvé l'oxyde de pipériténone (72,87 %), Brahmi et *al.*, (2016a) ont pu identifier la pulégone (70.4%), Lehabab (2013) c'est la pipériténone (33,06 %), Brada et *al.*, (2007) les composés majoritaires sont l'oxyde de pipéritone (Miliana : 31,4 % ; Rouina : 19,7 %) et l'oxyde de pipériténone (Miliana : 27,8 % ; Rouina : 29,4 %) représentant le chémotype 1 ; et pour l'échantillon provenant de Chlef, les molécules majoritaires sont la pipériténone (54,9 %) et l'oxyde de pipériténone (17,6 %) représentant le chémotype 2. Tandis que Brada et *al.*, (2006) ont trouvé l'oxyde de pipériténone dont les teneurs sont de 38.6 % à Rouina et 23.5 % Miliana.

Des études antérieures dans d'autres pays sur la composition chimique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* ont révélé l'existence de chémotypes avec des composants majeurs différents, comme le β -Caryophyllène (26.67%) à Beja et la pulégone (32.09%) à Bizerte (Riahi et *al.*, 2013), le 2,4(8),6-p-menthatrien-2,3-diol (14.5%) à Cuba (Pino' et *al.*, 1999), le linolool (35,32 %) en Egypte (Aziz, Abbass 2010), le pipéritol (57.6%) en Espagne (Raya et *al.*, 1990), la pulégone (85%) (El Arch et *al.*, 2003), le menthol (40.50%) (Derwich et *al.*, 2010) au Maroc. L'oxyde de pipériténone a été rapporté comme constituant caractéristique des huiles volatiles des chémotypes de *M. rotundifolia* avec une teneur de 80,8 % en Uruguay (Lorenzo et *al.*, 2002) et de 81,5 % en Allemagne (Nagell, Hefendehl, 1974).

Aihetasham et *al.*, 2015 ont trouvé le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- avec un pourcentage de composition de 10.07% chez *Mentha arvensis* (Pakistan). Malgré le nombre important de types chimiques cités dans la littérature concernant les huiles essentielles de *M. rotundifolia*, la présence majoritaire de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- de notre huile n'a jamais été décrite, ce qui confère une certaine originalité à cet échantillon.

Selon Herzi (2013), de nombreux facteurs peuvent influencer sur la composition chimique de l'huile essentielle. Un ensemble de paramètres a été étudié dont certains avec Bowes et *al.* (Bowes & Zheljaskov, 2004), et autres, comme l'origine géographique (Sari et *al.*, 2006), la saison de récolte (Msaada et *al.*, 2007 ; Shanjani et *al.*, 2010) et la méthode d'extraction (Maffei et *al.*, 1999 ; Bendahou et *al.*, 2008).

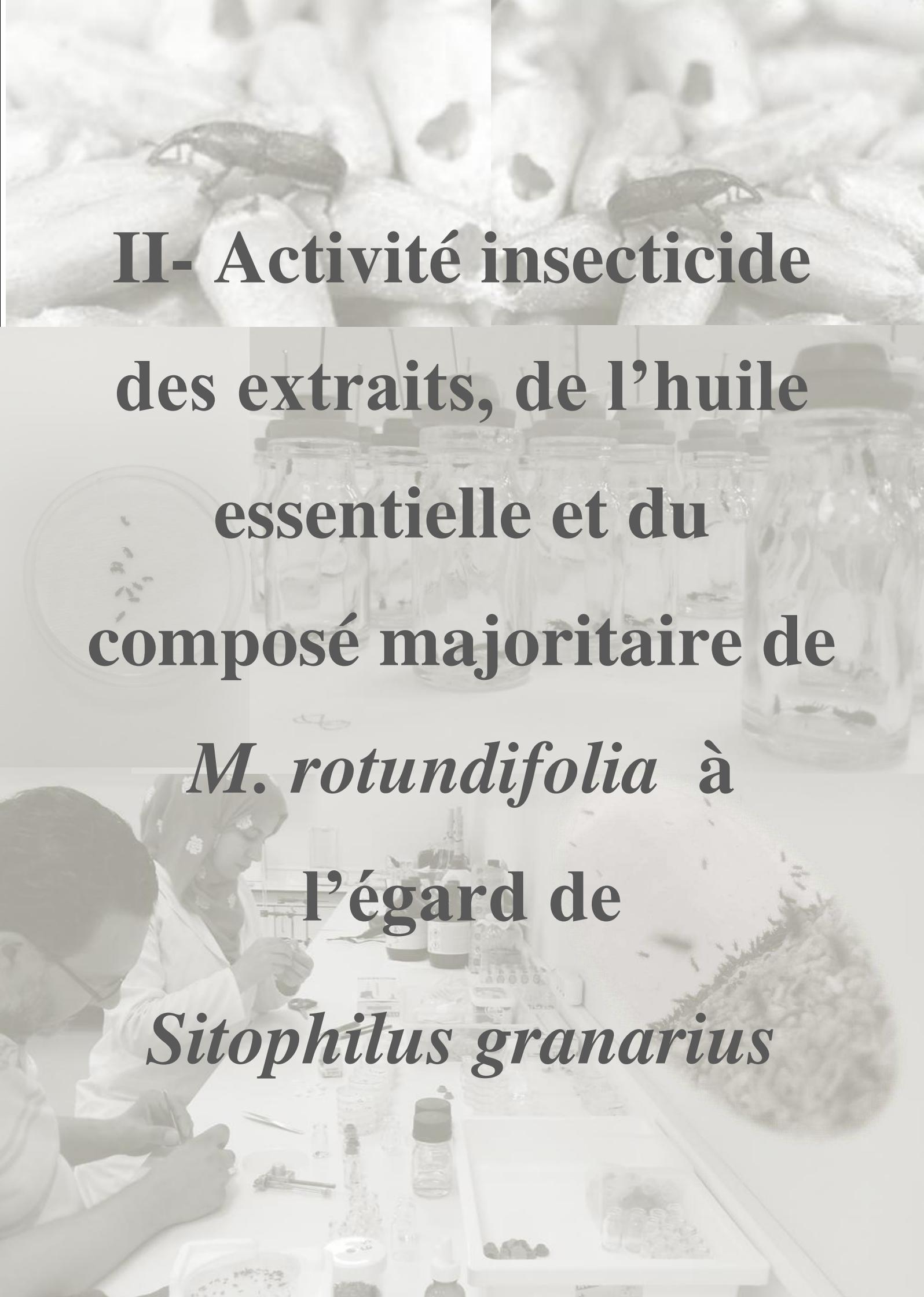
Les différences de composition chimique observées avec les huiles essentielles sont probablement liées à des facteurs abiotiques tels que le climat, les régions spécifiques de la provenance des échantillons et à des facteurs géographiques tels que l'altitude et le type de sol (Brada et *al.*, 2007).

D'après Riahi et *al.* (2013), les facteurs génétiques ne doivent pas être exclus en expliquant la variation chimique des huiles essentielles. De plus, les différences chimiques dans la composition de l'huile des espèces végétales relatives avec la saison de récolte ont été rapportées (Giray et *al.*, 2008).

Holopainen & Gershenzon (2010) montrent aussi que le type de composés organiques volatiles émis varie fortement selon l'espèce végétale, l'organe en jeu, l'étape de développement et les conditions environnementales.

9- Conclusion

En cette partie, nous avons employé des méthodes conventionnelles les plus usitées pour préparer les extraits et extraire de l'huile essentielle de la partie aérienne de *M. rotundifolia*. Les extraits ont présenté des rendements variables ; le rendement le plus élevé est celui de l'extrait aqueux (20.08%) tandis que l'extrait méthanolique et éthanolique ne présentent que 9.15 et 2.2%, respectivement. Le rendement en huile essentielle (1.27%) est jugé important pour des raisons qui seront précisées ultérieurement, ceci, comparé à ceux obtenus à l'issue d'autres travaux. Le screening phytochimique a montré une richesse importante en métabolites secondaires prouvés avoir des propriétés biocides intéressantes. La séparation du composé majoritaire a été faite sur colonne chromatographique en utilisant un gradient de solvants. L'analyse de l'huile essentielle par GC/MS a révélé l'existence de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- comme composé majoritaire d'un pourcentage de 89.09%. L'existence du dit composé en tant que majoritaire n'a, jusque là, jamais été rapportée dans les travaux d'analyses ayant trait à l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. L'étude phytochimique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a révélé l'existence de composés ayant un vaste champ d'activité biologique.



**II- Activité insecticide
des extraits, de l'huile
essentielle et du
composé majoritaire de
M. rotundifolia à
l'égard de
*Sitophilus granarius***

II- Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *Mentha rotundifolia* L. à l'égard de *Sitophilus granarius*

1-Introduction

En Algérie, la céréaliculture a une importance stratégique puisqu'elle est à la base de la sécurité alimentaire du pays (Fourar-Belaifa et Fleurat-Lessard, 2015). Les grains de céréales constituent depuis toujours la principale ressource alimentaire de l'homme et des animaux domestiques. La connaissance des phénomènes régissant leur conservation et la maîtrise des techniques de leur stockage sont déterminantes pour la survie de la population mondiale qui enregistre des taux d'accroissement à peine concevables faisant passer l'humanité de 1,5 milliards d'individus vers 1850 à plus de 7 milliards aujourd'hui (Mason et al., 2017). Les conditions de stockage, les caractéristiques physiologiques et le type du grain, les variétés de céréales et leurs origines, ont contribué de manière significative au degré de l'infestation, la richesse en espèces et le niveau de présence d'insectes (Bounechada et al., 2011). Environ 600 espèces d'insectes appartenant à différentes familles ont été identifiées à partir de produits stockés dans diverses parties du monde (Karakas, 2016). Dans le cas du blé, ces insectes peuvent occasionner des pertes considérables, allant jusqu'à 50%, (Mebarkia et al. 2012 ; De Lira et al. 2015) et peuvent atteindre 90% de perte de stocks céréalières après 5 mois de stockage (Nguemtchouin et al., 2010). Actuellement, la stratégie de lutte contre les insectes des denrées stockées dépend fortement de l'utilisation de fumigants gazeux et d'insecticides résiduels, qui posent tous les deux de sérieux dangers pour les animaux à sang chaud et l'environnement (Kordali et al., 2012). La phosphine et le bromure de méthyle sont les deux fumigants couramment utilisés pour la protection dans le monde entier (Rajendran & Sriranjini, 2008). En raison de l'utilisation limitée au niveau international du bromure de méthyle, l'importance de la phosphine dans le contrôle des coléoptères des produits stockés a relativement augmenté (Zettler et Arthur, 2000), ce qui a engendré le problème de résistance à la phosphine. A l'apparition de la résistance au malathion, insecticide de contact important très répandu, le groupe des pyréthroides était la seule alternative chimique jouant un rôle important dans la gestion des ravageurs mais la première détection de résistance a été enregistrée en Australie (1990) (Collins et al., 1993). Pour surmonter ce problème de résistance, le méthoprène, analogue de l'hormone juvénile, a été introduit. Malheureusement, la résistance à ce produit chimique a été détectée chez *Rhyzopertha dominica* vers 1996. Ainsi, l'hydroprène peut être considéré comme une autre alternative aux insecticides conventionnels en raison de son activité spécifique contre les stades immatures des insectes, sa faible

persistance dans l'environnement et ses effets pratiquement non toxiques sur les mammifères (Mohandass et *al.*, 2006). Cependant, les adaptations comportementales des insectes cibles peuvent jouer un rôle important dans le développement de la résistance à l'hydroprène.

Le charançon du blé *Sitophilus granarius* L. est l'un des ravageurs primaires les plus répandus et les plus destructeurs des céréales stockés tels que le blé, le maïs, le riz, l'avoine, le sorgho et l'orge (Karakas, 2016). En plus des dommages physiques qu'il cause aux grains, cette espèce d'insectes permet également l'entrée d'organismes pathogènes, tels que les champignons ou les bactéries (Bakkali et *al.*, 2008). L'infestation de *S. granarius* provoque des pertes quantitatives et qualitatives importantes dues à l'alimentation de l'insecte à partir de grains, à la réduction de la valeur nutritive et esthétique et à la contamination des grains (Germinara et *al.*, 2012). Cet insecte se nourrit de grains au stade adulte et à l'intérieur de l'endosperme des grains au stade larvaire (Keskin & Oskaya, 2015). Par conséquent, les larves de *S. granarius* sont généralement non détectées. Ce type d'infestation est un problème majeur pour l'industrie céréalière parce que les larves, qui sont une source importante de contamination par les insectes dans les produits céréaliers, ne peuvent pas être éliminées par des opérations de nettoyage ordinaire. De plus, les adultes de *S. granarius* peuvent survivre dans des conditions défavorables au niveau des silos de stockage pendant un certain temps (Strelec et *al.*, 2012). De nos jours, la lutte contre les insectes se complexifie. En quelques années, le nombre de produits phytopharmaceutiques disponibles s'est considérablement réduit, et de plus en plus de débouchés excluent leur usage. L'utilisation de méthodes alternatives devient donc un impératif.

Selon Aydin et *al.* (2017), ces dernières années, on s'intéresse de plus en plus au contrôle des ravageurs du stockage par les produits naturels, notamment les extraits de plantes, les huiles essentielles et leurs composants purs (Kordali et *al.*, 2007, 2008, Tozlu et *al.*, 2011, Gokce et *al.*, 2012, Aydin et *al.*, 2014, Bedini et *al.*, 2015, Jackowski et *al.*, 2015, Stejskal et *al.* 2015, Cakir et *al.*, 2016).

La toxicité d'un grand nombre d'extraits végétaux, d'huiles essentielles et de leurs constituants a été évaluée à l'égard de *S. granarius* (Aslan et *al.*, 2004 ; Yildirim et *al.*, 2005; Kordali et *al.*, 2006 ; Rozman et *al.*, 2006 ; Kotan et *al.*, 2008 ; Rajendran & Sriranjini, 2008; Shayesteh & Ashouri, 2010 ; Conti et *al.*, 2011 ; Ebadallahi, 2011 ; Yildirim et *al.*, 2011 ; Benelli et *al.*, 2012 ; Kordali et *al.*, 2012 ; Yildirim et *al.*, 2012 ; Norambuena et *al.*, 2016 ; Polatoğlu et *al.*, 2016). Un grand nombre d'études portant sur l'activité insecticide des espèces

de *Mentha* (propriétés répulsives, activité de fumigation, activité antiappétante, ...) contre des organismes nuisibles des produits stockés ont été rapportées (Kumar et *al.*, 2011).

Le but de ce travail consiste à évaluer l'activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et du composé majoritaire de *Mentha rotundifolia* à l'égard de *Sitophilus granarius*, ravageur nuisible bien connu qui provoque une perte de rendement économiquement importante dans les produits stockés.

2- Matériel et Méthodes

2.1- Elevage de l'insecte

Les espèces de *S. granarius* ont été élevées en laboratoire à 27 ± 2 °C et $60 \pm 5\%$, dans une chambre à l'école professionnelle Yapraklı, Département de Production Animale et Végétale, à l'Université Karatekin de Çankırı (Turquie). Le milieu alimentaire utilisé était le blé et les adultes de 1 à 2 mois ont été utilisés dans les essais. Les tests sont également effectués dans les mêmes conditions.

2.2- Activité insecticide

2.2.1- Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire sur *S. granarius* par contact

Les trois extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique) ont été dilués avec de l'acétone à raison de 100 µg/µL. L'huile essentielle *M. rotundifolia* a été diluée avec de l'acétone pour obtenir des concentrations de 4%, 2%, 1%, 0,75% et 0,50% (v/v), tandis que son composé majoritaire a été dilué avec de l'acétone pour obtenir une concentration de 10% (v/v). Les trois extraits, l'huile essentielle et son composé majoritaire ont été appliqués à raison de 1µL/insecte avec une seringue Hamilton de 50µL (Gökçe et *al.*, 2010). Les contrôles ont été déterminés à l'aide d'acétone. Les échantillons préparés ont été appliqués sur la face dorsale du thorax des insectes (Polatoğlu et *al.*, 2011). Les insectes traités ont été transférés dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre et mises en incubation à 25 ± 2 °C (Figure 16). Le nombre d'insectes morts a été enregistré après 24h d'incubation. Pour chaque test, 10 insectes ont été utilisés et chaque expérience a été répétée cinq fois.



Figure 16 : Activité insecticide des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *M. rotundifolia* vis-à-vis *S. granarius*, par contact

2.2.2- Activité insecticide de l'huile essentielle et de son composé majoritaire sur *S. granarius* par inhalation

La toxicité par inhalation de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été déterminée selon le protocole de Çam et al. (2012). L'huile essentielle a été diluée avec de l'acétone pour obtenir des concentrations de 1%, 0.50% et 0.25% (v/v), tandis que le composé majoritaire est dilué pour donner une concentration de 10% (v/v). Pour cette méthode, on a utilisé des tubes en verre (10mL) dans lesquels les adultes de *S. granarius* ont été transférés. Des disques du papier filtre ont été découpés de 1cm de diamètre et à l'aide d'une micropipette on les imprègne avec 10 μ L de l'huile essentielle déjà préparée. Les contrôles ont été déterminés à l'aide de l'acétone (Figure 17). Après 5min, temps nécessaire pour évaporer l'acétone, les disques ont été attachés aux bouchons en caoutchouc des tubes avec une aiguille puis bien reboucher avec du parafilm. L'incubation des tubes a été faite à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ et le nombre d'insectes morts a été enregistré après 24h. Pour chaque test, 10 insectes ont été utilisés et chaque expérience a été répétée trois fois.



Figure 17 : Activité insecticide de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *M. rotundifolia* vis-à-vis *S. granarius*, par inhalation

2.3- Analyses statistiques

Les résultats obtenus des deux activités insecticides ont été exprimés en pourcentage de mortalité et ont été utilisés pour obtenir les valeurs d'arcsin (Zar, 1996). Les valeurs d'arcsin ont été soumises à l'analyse de variance (ANOVA) suivies du test de comparaison multiple de Tukey d'un niveau de signification de $P < 0,05$. Toute l'analyse statistique a été effectuée avec le programme Minitab Release 14 (Mckenzie and Goldman, 2005).

3- Résultats et Discussion

3.1- Activité insecticide par contact

3.1.1- De l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de son composé majoritaire

La figure 18 montre que l'activité insecticide par contact de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de son composé majoritaire à l'égard de *S. granarius* a révélé une activité biologique très intéressante.

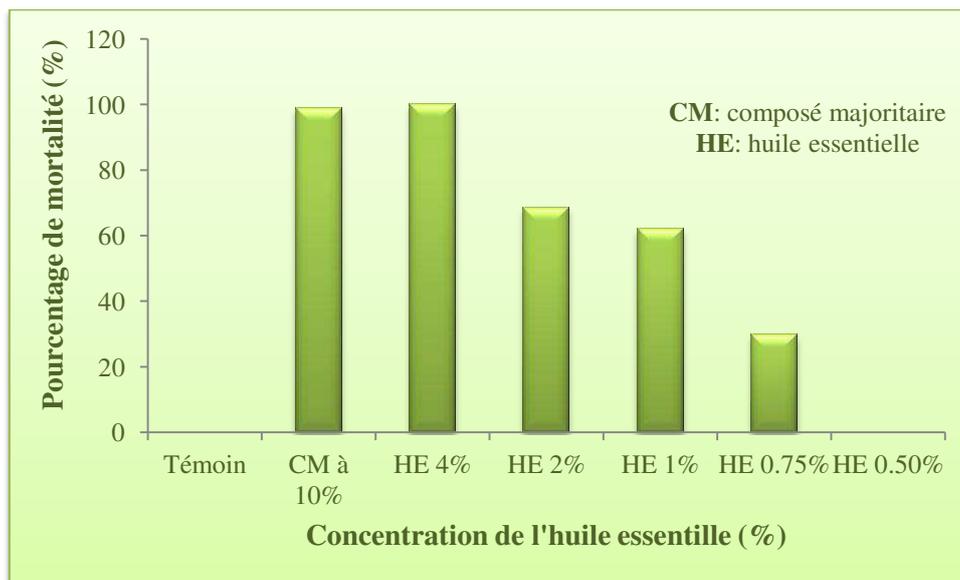


Figure 18 : Activité insecticide par contact de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et de son composé majoritaire à l'égard de *S. granarius* après 24h d' incubation.

À 4% de concentration de cette huile, la mortalité des insectes est marquée de 100% après 24h d'incubation due probablement à son composé majoritaire le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- qui a présenté un taux de 89,09% par rapport aux autres composés. Ce composé et à 10% de concentration a enregistré une mortalité de l'ordre de

98.85%, obtenue après 24h d'incubation. Cela signifie qu'il y a probablement une infime synergie entre lui et l'un ou les composés minoritaires.

A la concentration 1% et 2% , l'huile essentielle a enregistré des taux de mortalité élevés de 62.05% et 68.46%, respectivement, qui est du probablement à l'effet synergétique entre le composé majoritaire et les ou l'un des éléments présents dans la composition de cette huile. L'effet de l'huile essentielle commence à diminuer à 0.75% de concentration là où il a présenté 29.52% de mortalité. La concentration 0.50% n'a enregistré aucune mortalité des insectes traités.

Selon Yildirim et *al.* (2011), des études antérieures ont démontré qu'en général, la toxicité des huiles essentielles isolées à partir d'échantillons de plantes contre des organismes nuisibles des denrées stockées est liée à leurs composés majoritaires.

En effet, l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, contient essentiellement des monoterpènes hydrocarbonés tel que l' α -pinène dont les propriétés insecticides ont déjà été démontrées et des monoterpènes oxygénés comme le bornéol, le cinérolone dont les propriétés insecticides ont également déjà été démontrées vis-à-vis de plusieurs insectes.

L'activité insecticide contre *S. granarius* de l'huile essentielle de plusieurs plantes a été évaluée (Yildirim et *al.*, 2005 ; Kordali et *al.*, 2006 ; Kotan et *al.*, 2008 ; Ebadollahi 2011 ; Yildirim et *al.*, 2011 ; Benelli et *al.*, 2012 ; Kordali et *al.*, 2012 ; Norambuena et *al.*, 2016).

Cependant, il serait difficile d'avancer que l'activité insecticide de l'huile se limite uniquement à certains de ses constituants majoritaires; elle pourrait aussi être due à certains constituants minoritaires ou à un effet synergique de plusieurs constituants (Ndomo et *al.*, 2009).

D'après Kim et *al.* (2003), les effets toxiques des huiles essentielles dépendent de l'espèce d'insectes, du temps d'exposition et de la plante. Pour ce dernier point, Polatoğlu et *al.* (2016) ont trouvé que l'huile essentielle de *Crithmum maritimum* a donné une faible activité de contact contre *S. granarius*.

3.1.2- Des extraits aqueux, éthanologique et méthanologique de *M. rotundifolia*

Les résultats de la figure 19 indiquent une faible activité insecticide des trois extraits de *M. rotundifolia* : aqueux, éthanologique et méthanologique avec des taux de mortalité inférieurs à 50%, dont 36.45% a été le meilleur taux de mortalité marqué par l'extrait méthanologique. Cela peut être dû à la quantité de scutellarine (40.24mg/kg) trouvée dans l'extrait méthanologique, plus élevée que celle trouvée dans l'extrait aqueux (30.39mg/kg) et éthanologique (25.33mg/kg) par chromatographie liquide à haute performance. Par contre, la différence d'efficacité entre l'extrait éthanologique et aqueux est peut être due aux autres composés phénoliques se trouvant dans les deux extraits.

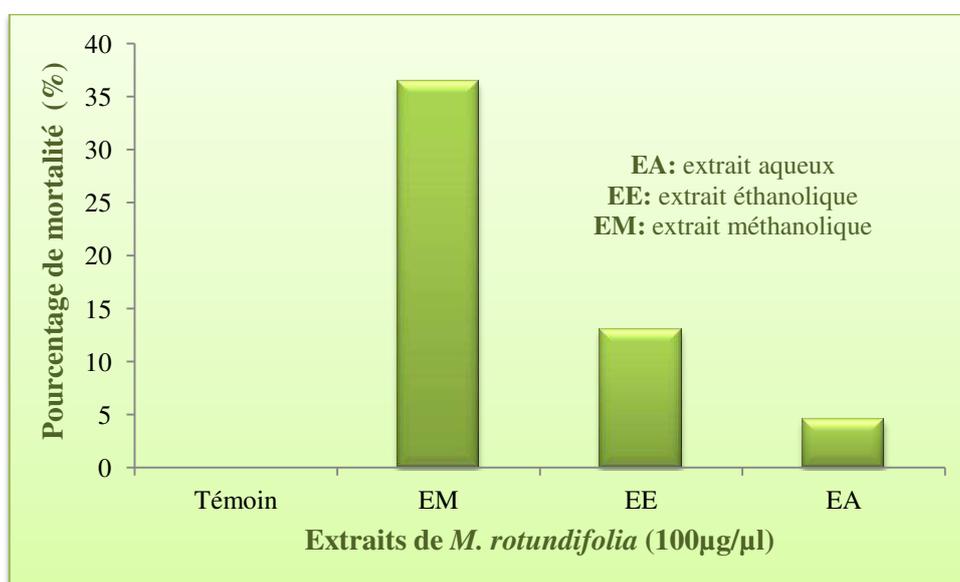


Figure 19 : Activité insecticide par contact des trois extraits de *M. rotundifolia* à l'égard de *S. granarius* après 24h d'incubation

Aucune recherche antérieure n'a été trouvée dans la littérature où les mêmes extraits de la plante, qui ont été utilisés dans cette étude, ont été utilisés précédemment contre le *S. granarius*. Cependant, les résultats de certains travaux de recherche peuvent être comparables à nos résultats.

Ce faible taux de mortalité est dû selon Isman (2000) à la méthode d'exposition d'insecte au produit, du type d'extraction, des mécanismes de défense développés par les organismes cibles, de la concentration et de la composition des extraits, ces derniers dépendant à leur tour de facteurs environnementaux physiques et chimiques.

Selon de Oliveira et *al.* (2012), la discussion sur les solvants utilisés pour l'extraction et leur relation avec les parties de la plante est controversée. Certains auteurs suggèrent que les solvants polaires extraient des substances comme les sucres et les tanins, à faible activité insecticide (Cunha et *al.*, 2006).

De tout ce qui a été trouvé, la plus faible polarité du solvant a entraîné un meilleur pourcentage de mortalité des insectes. Weast & Selby (1966) rapportent que les extraits d'éthanol ont provoqué des effets de mortalité plus rapide, probablement à cause de la plus grande solubilité des composés organiques dans ce solvant ayant une constante diélectrique absolue de 25 à 25 ° C et une polarité inférieure à celle de l'eau dont la constante est de 79 à la même température.

Dinesh et *al.* (2015) ont montré que l'effet insecticide des plantes varie selon la distribution des espèces végétales dans différentes localités, la saison, la partie de la plante étudiée et le solvant utilisé pour l'extraction.

Certaines recherches ont fait l'objet de l'effet insecticide à l'égard de *S. granarius* des extraits végétaux de différentes plantes (Aslan et *al.*, 2006 ; Omar et *al.*, 2012 ; Yildirim et *al.*, 2012, Karakas 2016).

Dans de nombreuses études, des extraits de plantes ont été obtenus en utilisant le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'hexane et différents composés biologiquement actifs d'activité variable ; ont été identifiés (Abay et *al.*, 2012). Iloki-Assanga et *al.* (2015) ont révélé que le solvant d'extraction le plus efficace pour bien extraire les composés phénoliques était le méthanol. Karakas (2016) a trouvé que l'effet de l'extrait méthanolique des feuilles de deux plantes aromatiques à l'égard de *S. granarius*, est plus efficace de l'extrait aqueux. Pour effectuer l'activité insecticide des extraits de *Decalepis hamiltonii*, le criblage préliminaire de Rajashekar et *al.* (2010) a montré que l'extrait méthanolique était le plus toxique contre *S. oryzae*, suivi de l'acétate d'éthyle de l'hexane et de l'acétone.

L'activité la plus élevée contre les insectes des produits stockés a été rapportée à partir d'extraits méthanolique (Kim & Ahn, 2001) en raison de la polarité et de la solubilité des composés bioactifs observés dans différentes plantes. Par contre, Abay et *al.* (2013) ont révélé que l'activité insecticide la plus faible contre *Sitophilus granarius* a été enregistrée avec l'extrait méthanolique de *Polytrichastrum formosum*. Clemente et *al.* (2003) ont montré que les résultats de l'activité insecticide de l'extrait aqueux et l'extrait dichlorométhanique de *M.*

rotundifolia contre *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae), impliquent que le solvant organique pourrait être mieux que l'eau pour extraire les métabolites à activité biologiques.

La différence peut être attribuée à la concentration de dilutions des extraits dans différents produits chimiques et de nombreuses autres causes imprévues (Saljoqi et al., 2006). Zhang et al. (2013) ont signalé que la longueur appropriée de la chaîne latérale des composants était très importante pour leur activité insecticide.

3.2- Activité insecticide par inhalation

L'analyse de la figure 20 montre une activité insecticide par inhalation très intéressante de l'huile essentielle avec un taux qui dépasse les 80% de mortalité à 0.5% de concentration et 100% de mortalité à 1% de concentration. Le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- a montré une mortalité de 100% après 24h d'incubation à 10% de concentration. Nous constatons que l'écart de concentration entre l'huile essentielle et le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- est très important (1% et 10%), cela peut être expliqué par le fait que l'effet insecticide par inhalation des deux produits est dû à l'effet synergétique entre le composé majoritaire et l'un des ou les composés minoritaires.

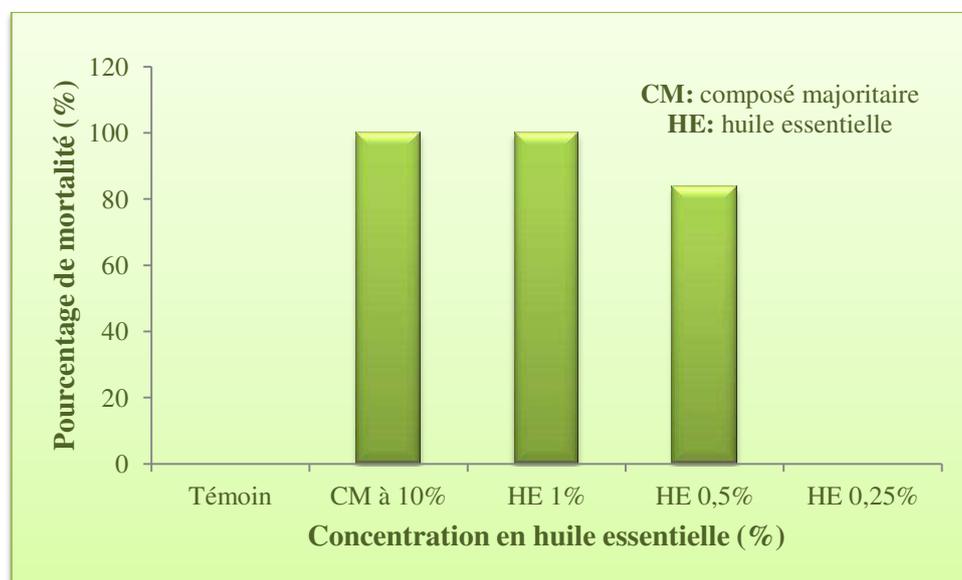


Figure 20 : Activité insecticide par inhalation de l'huile essentielle et du 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- de *M. rotundifolia* à l'égard de *S. granarius* après 24h d' incubation.

Selon Rajendran & Sriranjini (2008), parmi les composants de l'huile essentielle, les monoterpénoïdes ont attiré la plus grande attention pour leur activité de fumigation contre les insectes des produits stockés. Plusieurs rapports indiquent que les monoterpénoïdes provoquent la mortalité des insectes en inhibant l'activité de l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) (Houghton et al., 2006). Par conséquent, on soupçonne que, outre l'inhibition de l'AChE, les monoterpènes peuvent également agir sur d'autres sites vulnérables (par exemple les mono-oxygénases dépendant du cytochrome P450) (Ketoh et al., 2002).

La toxicité des huiles essentielles contre les insectes des produits stockés est influencée par la composition chimique de l'huile essentielle, qui dépend de la source, de la saison et des conditions écologiques, de la méthode d'extraction, du moment de l'extraction et de la partie végétale utilisée (Lee et al., 2001).

Selon Rajendran & Sriranjini (2008), il est bien connu que pour l'utilisation des fumigants contre les insectes des denrées stockées, aux stades actifs (adultes et larves non diapausées) sont plus sensibles qu'aux stades sédentaires (œufs et nymphes) en raison de la différence de la fréquence respiratoire.

D'après Lee et al. (2003), les tests de laboratoire avec des produits végétaux en présence d'un produit stocké tel que le blé, se sont révélés moins efficaces qu'en absence du produit stocké, principalement en raison de la forte sorption de l'huile/des composants par le produit.

D'après Yildirim et al. (2011), l'activité par inhalation montre que les huiles essentielles sont des sources de vapeurs biologiquement actives qui sont des insecticides potentiellement efficaces. Par conséquent, la possibilité d'employer ces fumigants naturels pour contrôler les insectes dans les produits stockés peut être digne d'une enquête plus approfondie (Shaaya et al. 1991).

4- Conclusion

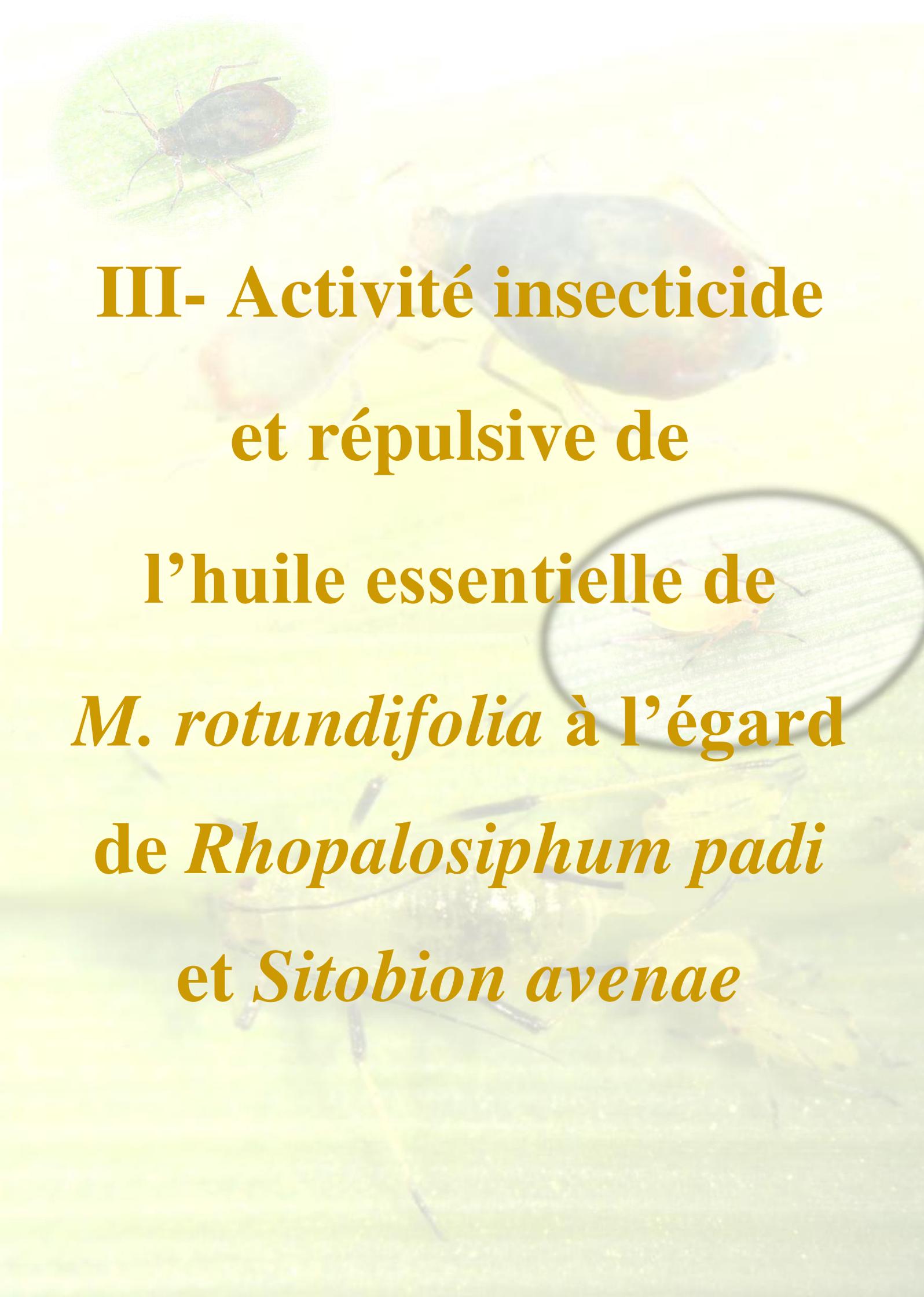
L'activité insecticide par contact de l'huile essentielle et le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- de *M. rotundifolia* à l'égard de *S. granarius* a révélé une activité biologique très intéressante. À 4% de concentration de cette huile, la mortalité des insectes est marquée de 100% après 24h d'incubation. Le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- à 10% de concentration a enregistré une mortalité de l'ordre de 98.85%, obtenue après 24h d'incubation. L'activité insecticide par inhalation de l'huile

essentielle à 1% de concentration a donné un taux de mortalité de 100%. Le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- a montré une mortalité de 100% après 24h d'incubation à 10% de concentration. L'écart de concentration entre l'huile essentielle et le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- explique que l'effet insecticide par contact ou par inhalation des deux produits est dû à l'effet synergétique entre le composé majoritaire et l'un des ou les composés minoritaires.

La faible activité insecticide des trois extraits (aqueux, éthanolique et méthanolique) de *M. rotundifolia* est enregistrée avec des taux de mortalité inférieurs à 50%, dont 36.45% a été le meilleur taux de mortalité marqué par l'extrait méthanolique. L'analyse par CLHP a révélée l'existence majoritaire de scutéllarine (40.24mg/kg) dans l'extrait méthanolique, plus élevée que celle trouvée dans l'extrait aqueux (30.39mg/kg) et éthanolique (25.33mg/kg). Par contre, la différence d'efficacité entre l'extrait éthanolique et aqueux est peut être due aux autres composés phénoliques trouvant dans les deux extraits.

Compte tenu de l'importance agricole et alimentaire des grains de céréales et vu que le développement d'insecticides naturels ou biologiques contribuera à réduire les effets négatifs (résidus, résistance et pollution environnementale) des insecticides chimiques synthétiques, l'utilisation par contact ou par inhalation de l'huile essentielle et le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- de *M. rotundifolia* comme bioinsecticides, peut également être efficace, sélective, biodégradable, à faible développement de résistance dans la population de *S. granarius*.

En conclusion, une identification et une caractérisation plus poussées de la (des) molécule (s) active (s) des extraits ou de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, sont nécessaires pour formuler un insecticide potentiel contre le charançon de blé.



**III- Activité insecticide
et répulsive de**

l'huile essentielle de

***M. rotundifolia* à l'égard
de *Rhopalosiphum padi*
et *Sitobion avenae***

III- Activité insecticide et répulsive de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* L. à l'égard de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae), pucerons de céréales à Sétif, Algérie

1- Introduction

De nombreux facteurs sont responsables de la faible production/rendement du blé (Zeb et al., 2016). Les pucerons peuvent réduire la production de blé en causant des pertes de rendement directes de 35 à 40% dues aux blessures causées par la succion et de 20 à 80% des pertes de rendement indirectes par la transmission de maladies virales et fongiques (Akhtar et al., 2010). Habituellement, *R. padi* coexiste avec *S. avenae* à la fin du printemps causant des dommages par l'alimentation directe et transmettent des virus pathogènes aux plantes (Lu et al., 2013). *R. padi* et *S. avenae* sont les principaux vecteurs du virus de la jaunisse nanissante de l'orge (BYDV) qui se transmet de la plante au puceron ou vice versa pendant l'alimentation à base de phloème sur la plante (West & Mordue, 1992). Le contrôle de *R. padi* et de *S. avenae* dépend principalement de l'application d'insecticides, mais la résistance des deux espèces de pucerons s'est développée lentement en raison de leurs courtes périodes d'éclosion. Par conséquent, les insecticides sélectifs sont recommandés pour conserver les ennemis naturels (Chen et al., 2007). Les bioessais ont montré que les deux espèces de pucerons sont différents par leur sensibilité aux insecticides. *R. padi* était plus sensible que *S. avenae* à la plupart des insecticides utilisés pour lutter contre les pucerons du blé (Lu & Gao, 2009).

Cependant, l'utilisation d'insecticides synthétiques pour lutter contre les pucerons est inadéquate pour le blé en raison de la présence de résidus de pesticides, du développement d'une résistance aux insecticides et de la pollution de l'environnement (Bushra et al., 2014).

Pour ces raisons, la limitation de l'utilisation d'insecticides synthétiques a motivé le développement de substances alternatives qui sont respectueuses de l'environnement et pratiques à utiliser telles que les composés dérivés de plantes (Kimbaris et al., 2010). Pour le contrôle des pucerons des céréales, d'autres matériaux de contrôle sont des insecticides botaniques (Sallam 2009). Récemment, quelques informations ont été accumulées sur le potentiel des huiles essentielles dans la lutte contre les pucerons et plusieurs études ont rapporté des applications utiles (Işık & Görür, 2009). L'utilité des huiles essentielles dans le contrôle des pucerons a été rapportée pour la répulsion et l'activité dissuasive de l'alimentation (Digilio et al., 2008).

Le genre *Mentha*, un des genres importants de la famille des Lamiaceae, joue un rôle intéressant dans la lutte antiparasitaire. Il est représenté par six espèces principales: *M. rotundifolia*, *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. aquatic*, *M. pulegium* et *M. piperita*, selon la flore de l'Algérie (Quezel et Santa, 1963). Les huiles essentielles de différentes espèces de menthe ont été signalées avoir une excellente activité insecticide (Kumar et al., 2011).

Cette propriété a été attribuée à la présence de nombreux monoterpènes oxygénés, dont le menthone, le menthol, la pulégone, l'oxyde de pipéritone, le pipériténone et le carvone (Kasrati et al. 2015). Pour ces caractéristiques, de nombreuses études ont été rapportées sur l'activité insecticide de plusieurs espèces de *Mentha* telles que *M. pulegium*, *M. piperita*, *M. suaveolens* et *M. spicata* contre quelques pucerons, notamment *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* et *Toxoptera aurantii* (Petrakis et al., 2014 ; Teixeira et al., 2014 ; Zekri et al., 2015 ; Brahmi et al., 2016b).

Sétif, à l'instar de nombreuses régions de l'Algérie, recèle un patrimoine floristique important qu'il est utile d'explorer et de valoriser en utilisant les substances bioactives issues des métabolisme secondaire de ces plantes, dans différents domaines y compris la formulation de biopesticides.

Cependant, jusqu'à présent, aucune recherche n'a été faite sur l'effet de l'huile essentielle de *Mentha* sur les pucerons des céréales, en particulier *R. padi* et *S. avenae*. Par conséquent, la présente étude vise à évaluer les activités insecticides et répulsives de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre deux pucerons de blé, économiquement importants.

2- Matériel et méthodes

2.1- Elevage des insectes

Les deux espèces de pucerons ont été récupérées des feuilles infestées de maïs sur une parcelle privée dans la région de Chouf Lakdad (Sétif). Une culture de différentes céréales (blé dur, blé tendre et orge) a été mise en pots au niveau du laboratoire (Figure 21) en conditions contrôlées (20 ± 2 °C ; photophase : 16 h) a servi pour l'élevage de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*. Des feuilles saines ont été récoltées des pots non infestés le jour de l'expérimentation pour servir de support végétal.

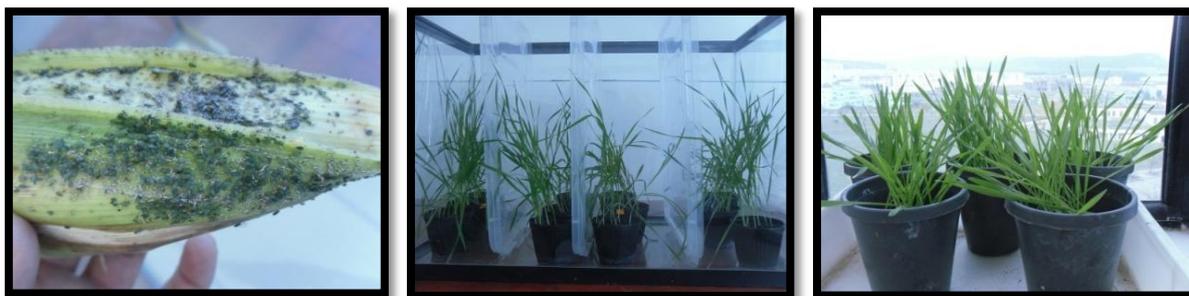


Figure 21 : Elevage des pucerons en conditions de laboratoire (1 : pucerons sur maïs infesté ; 2 : blé en pot pour élever les deux espèces ; 3 : orge en pot non infesté pour servir de support végétal).

2.2- Tests biologiques

2.2.1- Activité insecticide

Six différentes concentrations (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 et 1mL/L) de l'huile essentielle de *Menta rotundifolia* et de l'insecticide chimique commercial Karaté ont été préparées pour les différents tests. La concentration zéro (0) constituée de l'eau distillée a servi de témoin négatif (contrôle).

Les bioessais ont été effectués en utilisant la méthode IRAC (Insecticide Resistance Action Committee) N°1 Version 2 (IRAC, 2009). Ils ont été effectués sur les adultes non ailés. Les feuilles saines de céréales collectées ont été soigneusement nettoyées pour servir, après leur trempage dans les différentes solutions, de support aux pucerons au cours des différents tests.

Les solutions ont été bien agitées avant le trempage des feuilles de céréales pendant 5 secondes. Les feuilles ainsi trempées dans les différentes solutions ont été ensuite séchées pendant 5 minutes à l'air libre pour évaporer l'eau de leurs surfaces.

Enfin vingt (20) pucerons adultes aptères de stade 4 récoltés sur des plants de céréales sans aucune protection phytosanitaire ont été transférés sur la face inférieure de chaque feuille ainsi traitée (Figure 22) à l'aide d'une brosse fine. Chaque feuille correspondant à une concentration donnée et portant 20 pucerons a été placée dans une boîte de Pétri. Les tests ont été répétés 5 fois.

Un petit morceau de coton hydrophile imbibé d'eau est placé à la base du pétiole de chaque feuille pour la maintenir fraîche pendant 24 heures. Les boîtes de Pétri et leurs

contenus ont été ensuite placés dans les conditions de laboratoire (température ambiante : 28°C ; humidité relative :80%) pour les différentes observations.



Figure 22 : Activité insecticide par la méthode IRAC

Les taux de mortalité des insectes soumis aux différents produits à différentes concentrations, ont été évalués après 24 heures. Une loupe binoculaire a été utilisée pour dénombrer les insectes morts. Un insecte est considéré comme mort quand il ne réagit plus à un contact à l'aide d'une aiguille légèrement chauffée et posée sur les parties sensibles comme les antennes. La mortalité a été calculée et corrigée selon la formule d'Abbott (1925) :

$$Mc = Me - Mt / 100 - Mt \times 100$$

Mc = mortalité corrigée en pourcentage

Me = mortalité de l'échantillon testé

Mt = mortalité dans le témoin non traité

2.2.2- Effet répulsif de l'huile essentielle sur papier filtre

L'effet répulsif de l'huile essentielle à l'égard des adultes de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae* a été évalué en utilisant la méthode de la zone préférentielle sur papier filtre décrite par McDonald *et al.* (1970). Ainsi, les disques de papier filtre de 9 cm de diamètre utilisés à cet effet ont été coupés en deux parties égales. Quatre doses d'huile ont été préparées (1, 2, 4 et 8 µL/mL) par dilution dans l'acétone. Ensuite; 0,5 mL de chacune des solutions ainsi préparées a été répandue uniformément sur une moitié du disque tandis que l'autre moitié a reçu uniquement 0,5 mL d'acétone. Après quinze minutes, temps nécessaire pour l'évaporation complète du solvant de dilution, les deux moitiés des disques ont été

ressoudées au moyen d'une bande adhésive. Le disque de papier filtre ainsi reconstitué a été placé dans une boîte de Pétri et un lot de 20 insectes adultes non sexés, âgés de deux jours au plus a été placé au centre de chaque disque (Figure 23). Cinq répétitions ont été effectuées pour chaque dose.

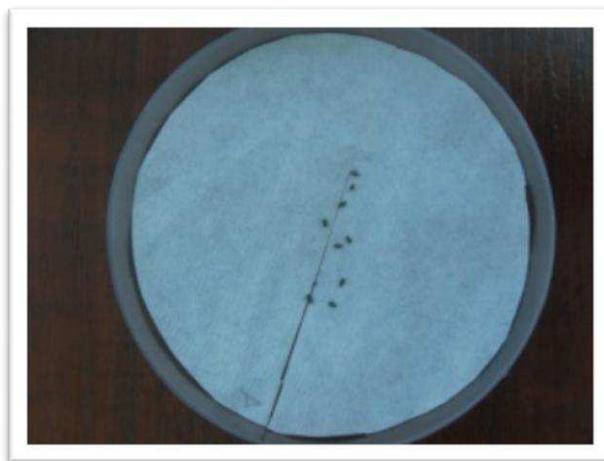


Figure 23 : Effet répulsif de l'huile essentielle sur papier filtre

Au bout de deux heures, le nombre d'insectes présents sur la partie de papier filtre traitée à l'huile essentielle (Nt) et le nombre de ceux présents sur la partie traitée uniquement à l'acétone (Nc) ont été relevés. Le pourcentage de répulsion (PR) a été calculé en utilisant la formule suivante:

$$PR = \frac{Nc - Nt}{Nc + Nt} \times 100$$

Le pourcentage moyen de répulsion pour l'huile essentielle a été calculé et attribué selon le classement de McDonald *et al.* (1970) à l'une des différentes classes répulsives variant de 0 à V: classe 0 (PR < 0,1%), classe I (PR = 0,1 – 20%), classe II (PR = 20,1 – 40%), classe III (PR = 40,1 – 60%), classe IV (PR = 60,1 – 80%) et classe V (PR = 80,1 – 100%).

2.3- Analyse statistique

Les traitements statistiques ont été portés sur des analyses de variances suivies par des tests de comparaison de moyennes, en l'occurrence le test de Duncun (1955) au seuil de risque (5%). Par ailleurs, la régression multiple a été utilisée pour modéliser le taux de mortalité étant comme variable dépendante. Les résultats obtenus ont été analysés à l'aide du logiciel SPSS V 18. Toutes les variables étudiées et les valeurs de la concentration létale

(CL₅₀) de l'huile essentielle ont été déterminées par l'analyse de probit (Finney, 1971). Les données sur la mortalité ont été corrigées selon la formule d'Abbott (Abbott, 1925).

3- Résultats et discussion

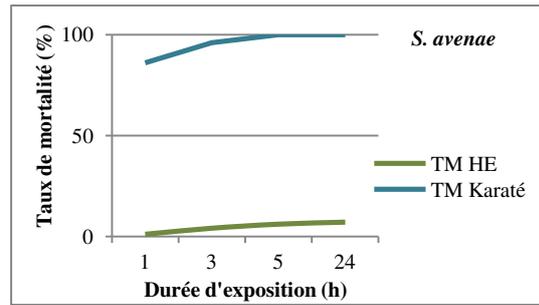
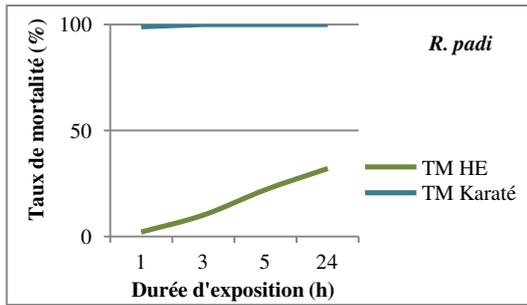
3.1- Etude de la variation des taux de mortalité en fonction des durées d'exposition pour chaque concentration

La figure 24 montre les variations des taux de mortalité en fonction des durées d'exposition à l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et à l'insecticide chimique de synthèse, karaté sur *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*. A toutes les concentrations, pour les deux espèces, le taux de mortalité de l'huile essentielle augmente en fonction de la durée d'exposition. Il apparaît qu'à toutes les concentrations (0,1, 0,2, 0,3, 0,5 et 1 mL/L) l'insecticide chimique de synthèse est plus efficace que l'huile essentielle dès la première heure d'exposition (86-100%). Mais pour les deux espèces, l'huile essentielle paraît plus efficace contre *R. padi* que contre *S. avenae*.

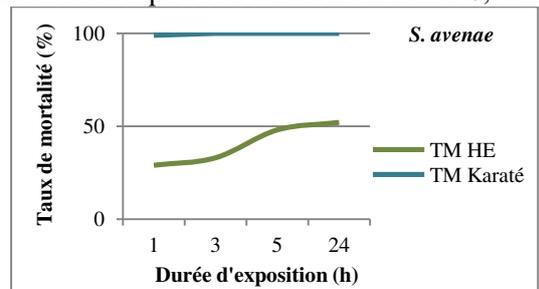
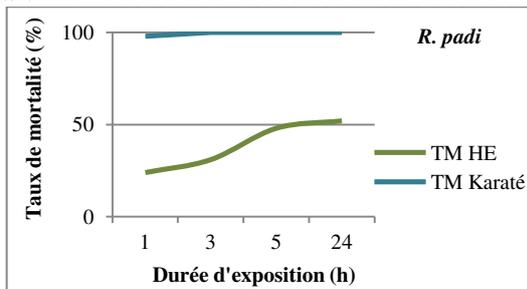
Karaté montre une excellente efficacité, meilleure que l'huile testée. Cette efficacité résulte de son effet de choc et d'une longue persistance d'action. Le triple mode d'action de Karaté obtient la meilleure efficacité contre les [pucerons des épis](#).

Dans cette expérimentation, l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a eu un effet sur la survie des adultes des pucerons de *R. padi* et *S. avenae*. Les résultats obtenus ont montré une relation directe entre les taux de mortalité des pucerons et la concentration de l'huile d'une part, et d'autre part entre le taux de mortalité et la durée d'exposition.

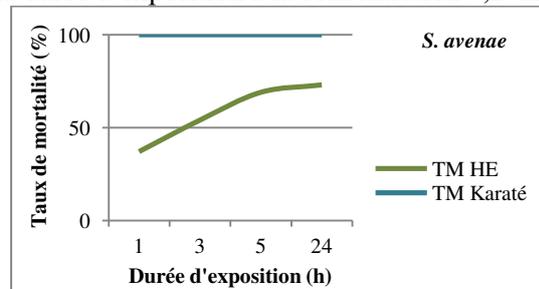
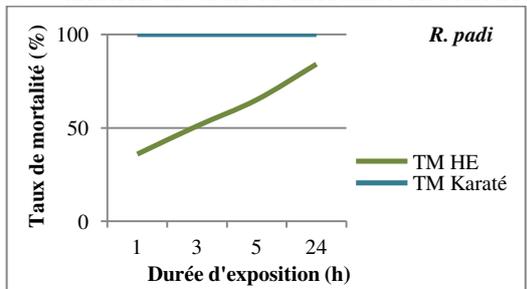
Ainsi, l'analyse de la variance au seuil de $p < 0,0001$ a confirmé l'évolution positive bien marquée des taux de mortalité moyens avec l'augmentation de la concentration de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et quelle que soit la durée d'exposition des pucerons à l'huile essentielle.



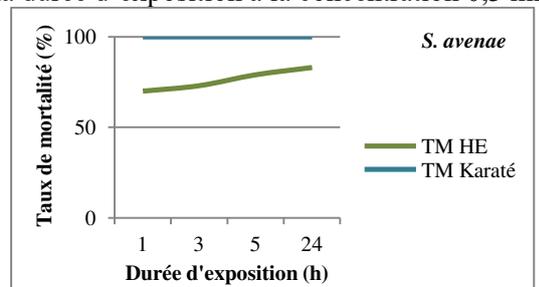
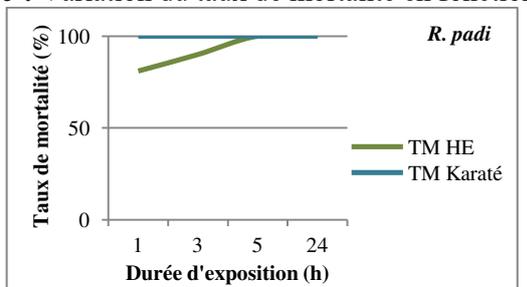
a : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition à la concentration 0,1 ml/L



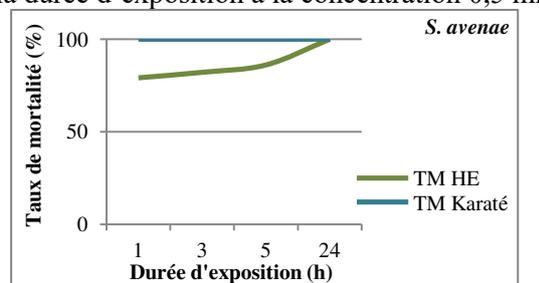
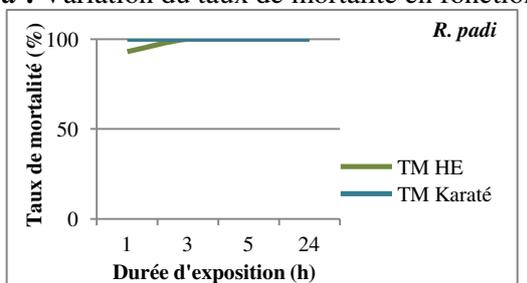
b : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition à la concentration 0,2 ml/L



c : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition à la concentration 0,3 ml/L



d : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition à la concentration 0,5 ml/L



e : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition à la concentration 1 ml/L

Figure 24 : Variation du taux de mortalité en fonction de la durée d'exposition pour chaque concentration.

Selon Bokobana et *al* (2014), l'évolution du taux de mortalité montre que les effets toxiques dépendent des facteurs comme la concentration en produit et la durée d'exposition à ces produits. L'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été efficace et présente une activité insecticide remarquable car après 3h et à 0,5 mL/L, elle présente une activité insecticide comparable au produit chimique contre *R. padi* avec un taux de mortalité de 100%. L'exposition des individus de *R. padi* et *S. avenae* à l'huile essentielle de *M. rotundifolia* montre une variation importante dans les réponses obtenues.

Les travaux de Yaka (2007) ont montré que les effets toxiques ou répulsifs d'une huile essentielle ou d'un extrait végétal dépendraient de plusieurs facteurs, entre autres sa concentration, sa composition chimique et le niveau de sensibilité des insectes cibles ; ce qui confirme les résultats obtenus. Chiasson et Beloin (2007) ont, dans une étude, émis l'hypothèse selon laquelle les huiles essentielles agiraient directement sur la cuticule des insectes et acariens surtout ceux à corps mou dont les pucerons.

L'efficacité de l'huile essentielle peut être attribuée à sa composition chimique généralement et particulièrement à son composé majoritaire et son taux élevé. L'activité insecticide de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)-, constituant majoritaire de notre huile, n'a pas été étudiée auparavant. Ndomo et *al* (2009), suggère que l'activité insecticide des huiles essentielles n'est pas seulement limitée à ses constituants majeurs; il pourrait aussi être dû à l'effet synergique de plusieurs constituants minoritaires.

Des études récentes ont rapporté que les huiles essentielles affectent la physiologie d'insecte de façons diverses. De plus, les monoterpènes oxygénés ont été examinés pour leur neurotoxicité (Kumar et *al*, 2011); ils sont typiquement volatils et plutôt lipophiles et peuvent pénétrer dans les insectes rapidement et se heurter à leurs fonctions physiologiques (Lee et *al*, 2002) en inhibant l'activité d'acétylcholinestérase (López, Pascual-Villalobos, 2010) et agissant sur les sites octopaminergique des insectes (Price, Berry, 2006).

L'octopamine, un biogénique structurellement proche de la noradrénaline des vertébrés, agit comme un neurotransmetteur chez les invertébrés. L'octopamine a un effet régulateur sur les battements du cœur, la motricité, la ventilation, le vol et le métabolisme des invertébrés (Roeder, 1999). Les huiles essentielles agiraient en se fixant sur les récepteurs de l'octopamine qui constituent de bonnes cibles pour les biopesticides (Taleb-Toudert, 2015).

En effet l'activité insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* qui renferme 89,09% de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- ou les constituants minoritaires, pourrait expliquer l'inhibition de l'acétylcholinestérase, de l'octopamine ou du cytochrome P450 des mono-oxygénases.

3.2- Etude de la variation des taux de mortalité en fonction des concentration après 1h, 3h, 5h et 24h d'exposition

La figure 25 montre les variations des taux de mortalité en fonction des concentrations pour chaque durée d'exposition à l'huile essentielle de *M. rotundifolia* et à l'insecticide chimique de synthèse, Karaté. Nous remarquons pour chaque figure, que plus la concentration de l'huile essentielle augmente plus le taux de mortalité des deux espèces de pucerons augmente, pour les quatre durées d'exposition (1, 3, 5 et 24h).

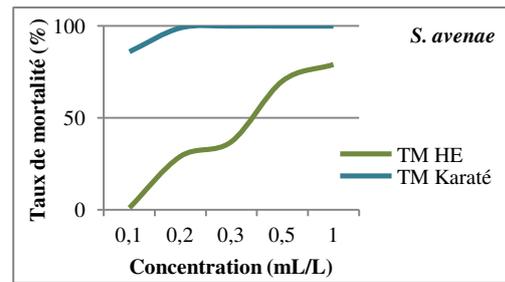
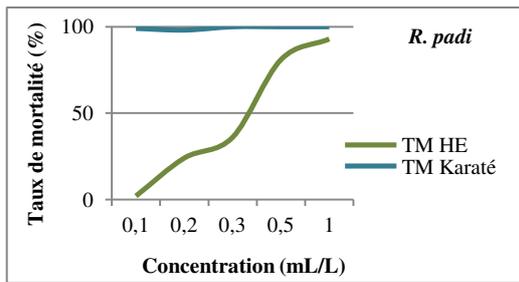
À la première heure d'exposition, l'insecticide chimique de synthèse, a induit à la concentration 0,1 mL/L un taux de mortalité de 99% et 86% et à la concentration 0,2 mL/L 98% et 99% avec *R. padi* et *S. avenae*, respectivement. Mais à partir de la troisième heure d'exposition le taux de mortalité est enregistré de 100% chez *R. padi* et 96% *S. avenae*. À part cette différence, les taux de mortalité observés n'ont pas varié pour les deux espèces (100% de mortalité).

L'effet insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* aux différentes concentrations testées et durant toutes les heures d'exposition est représenté par une courbe de tendance linéaire et une formule de régression multiple (Formule 1 et 2) :

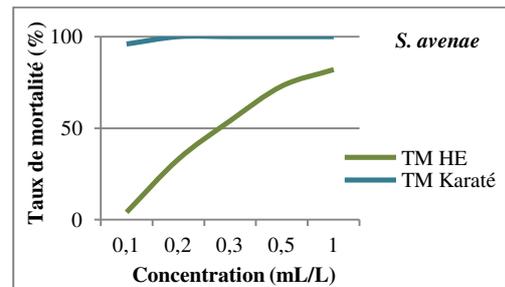
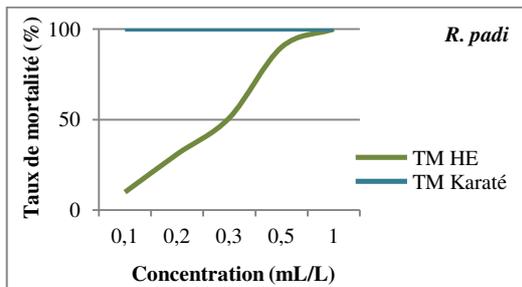
$$(Y_{HE,R.padi} = 4,45 X_1 - 3,96 X_2 + 4,49 ; R^2 \text{ ajusté} = 0,907), \text{ Formule 1}$$

$$(Y_{HE,S.avenae} = 7,20 X_1 - 3,42 X_2 + 2,31 ; R^2 \text{ ajusté} = 0,894). \text{ Formule 2}$$

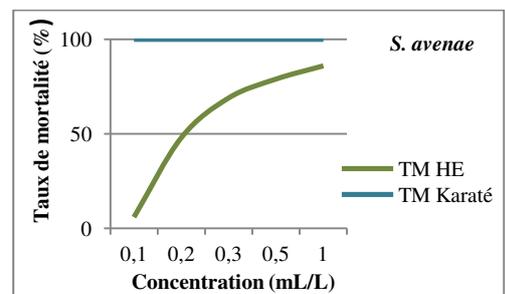
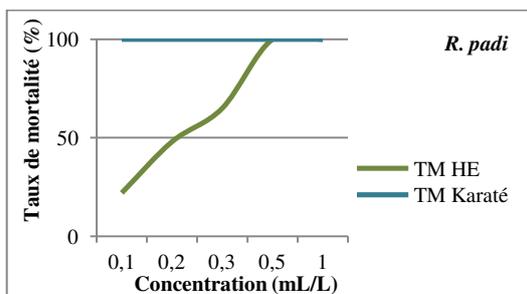
L'analyse comparée de la sensibilité des deux espèces montre qu'à toutes les heures d'exposition, l'activité insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis *R. padi* est meilleure par rapport à celle enregistrée avec *S. avenae*.



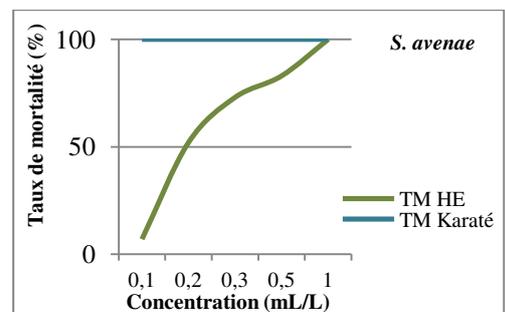
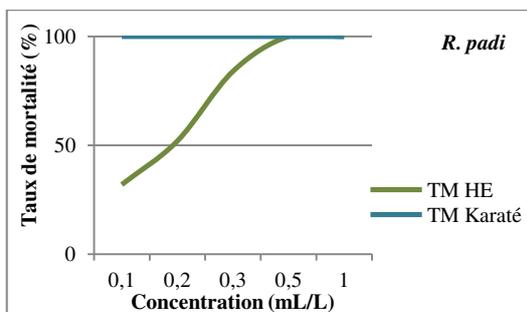
a : Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 1h d'exposition



b : Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 3h d'exposition



c : Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 5h d'exposition



d : Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 24h d'exposition

Figure 25 : Variation du taux de mortalité en fonction de la concentration après 1h, 3h, 5h et 24h d'exposition

Les résultats de l'analyse de variance au seuil de 5%, suivi par le test de Duncun permettent de distinguer quatre groupes homogènes pour *R. padi* et cinq groupes homogènes pour *S. avenae* (Tableau 6).

Tableau 6 : Groupes homogènes issus du test de Duncun sur la sensibilité de *R. padi* et *S. avenae* après 24h d'exposition à l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

Concentration (mL/L)	<i>R. padi</i>		<i>S. avenae</i>	
	Moyenne de mortalité (%)	Groupe homogène	Moyenne (%)	Groupe Homogène
0,1	32	a	26	A
0,2	52	b	41	b
0,3	84	c	69	c
0,5	100	d	97	d
1	100	d	100	E

En effet, de l'analyse de ce tableau, il en ressort qu'avec *R. padi*, l'activité de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* aux concentrations de 0,1 à 0,5 mL/L sont toutes statistiquement différentes à l'exception des concentrations de 0,5 et 1 mL/L qui forment un groupe homogène. En ce qui concerne *S. avenae*, les résultats issus de la comparaison de moyennes au seuil de 5% après 24h d'exposition permettent de distinguer cinq groupes homogènes, disant que, toutes les concentrations sont statistiquement différentes, avec une association positivement linéaire entre les concentrations et les doses.

3.3- Détermination de la CL₅₀ de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Les concentrations létales à 50% de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* pour *R. padi* et *S. avenae* sont indiquées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : CL₅₀ de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* pour chaque heure d'exposition et pour les deux espèces de pucerons.

Durée d'exposition (h)	CL ₅₀ (mL/L)	
	<i>R. padi</i>	<i>S. avenae</i>
1	0,34	0,37
3	0,27	0,24
5	0,21	0,21
24	0,16	0,20

En comparant les CL₅₀ à chaque période d'exposition pour chaque puceron, on note que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* devient plus efficace lorsque la durée d'exposition

augmente (Bokobana *et al.*, 2014). La CL₅₀ la plus élevée est obtenue 1 heure après traitement (0,37 mL/L) avec *S. avenae*, comprise entre les doses 3 et 4 testées et elle est de 0,34 mL/L avec *R. padi* mais aussi comprise entre la 3^{ème} et la 4^{ème} dose testées.

La plus faible CL₅₀ était de 0,16 mL/L avec *R. padi*, vient après celle de *S. avenae* avec une valeur de 0,20 mL/L, elles ont été obtenues 24h après traitement. Ces résultats montrent que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* s'avère toxique pour *R. padi* et *S. avenae*, mais ces dernières espèces ne répondent pas de la même manière.

Les bioessais de Lu et Gao (2009), ont montré que les deux espèces de pucerons diffèrent par leur sensibilité aux insecticides. *R. padi* était plus sensible que *S. avenae* à la plupart des insecticides utilisés pour lutter contre les pucerons du blé.

Les résultats obtenus confirment les travaux antérieurs qui ont mis en évidence la forte toxicité des huiles essentielles provenant d'espèces de *Mentha* contre diverses espèces d'insectes (Kasrati *et al* 2015).

3.4- Etude de l'effet répulsif de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Les pourcentages de répulsion des différentes doses de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis *R. padi* et *S. avenae* sont récapitulés dans le Tableau 8. Il en ressort qu'après deux heures d'exposition, les différentes doses de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* (1; 2; 4; et 8µL) ont occasionné respectivement 76; 80; 84 et 100% de répulsion vis-à-vis des adultes de *R. padi* et 56 ; 72 ; 76 et 83,58% de répulsion vis-à-vis des adultes de *S. avenae*. Ceci montre clairement que le pourcentage de répulsion augmente en fonction de la dose, (Ndomo *et al*, 2009).

Tableau 8 : Pourcentages de répulsion sur papier filtre de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis des adultes de *R. padi* et *S. avenae*

Espèce de puceron	Concentration de l'huile (µL)				Répulsivité moyenne	Classe	Effet de la substance
	1	2	4	8			
<i>R. padi</i>	76%	80%	84%	100%	85%	V	Très répulsive
<i>S. avenae</i>	56%	72%	76%	83,58%	71,90%	IV	Répulsive

À la lumière de ces résultats, on peut noter que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a une forte activité insectifuge à l'égard des adultes de *R. padi* et *S. avenae* et appartient selon le classement de McDonald et al. (1970) à la classe répulsive V avec un taux de répulsion moyen de 85 % pour *R. padi* et à la classe IV avec un taux de répulsion moyen de 71,90% pour *S. avenae* (Tableau 8).

Les effets toxiques et répulsifs de cette huile essentielle pourraient dépendre de sa composition chimique et du niveau de sensibilité des insectes (Casida, 1990). Ce dernier point confirme la sensibilité de *R. padi* par rapport à *S. avenae*.

Kumar et al (2011) ont rapporté que les propriétés répulsives des huiles essentielles et des extraits du genre *Mentha* sont bien documentées. Cependant, la plupart de ces études sont concentrées sur les ravageurs appartenant aux coléoptères et aux diptères. Ce qui donne une nouvelle vision de l'effet de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur les pucerons.

Murray (2000) a rapporté que certaines huiles essentielles ont une toxicité qui va tuer le nuisible cherchant à se nourrir de la plante, et les autres vont avoir une action simplement répulsive. Selon Goucem (2014), le pouvoir répulsif est hautement dépendant de la concentration et de la durée d'exposition et pourrait être attribué à des taux élevés des composés majoritaires, cas probable de notre huile. Les propriétés répulsives des huiles essentielles sont souvent associées à la présence de monoterpénoides et de sesquiterpènes bien que les effets toxiques dépendent de l'espèce d'insecte, de la plante et du temps d'exposition à l'huile essentielle (Kim et al., 2002).

4- Conclusion

Lutter contre les pucerons de céréales constitue l'objectif prioritaire d'un programme à deux traitements: le traitement des semences à l'aide d'un insecticide systémique et le traitement des parcelles par pulvérisation d'insecticide lorsque la proportion de plantes infectées menace de dépasser le seuil au-delà duquel des dégâts inacceptables peuvent survenir. Ces insecticides se sont avérés d'une grande efficacité pour contrôler les populations de pucerons, cependant une stratégie fondée sur leur emploi immodéré a montré ses limites et est contestée pour ses conséquences sur la santé humaine et l'environnement.

L'absence d'effets sur les prédateurs naturels des pucerons et le mode d'action spécifique des huiles essentielles en font un outil répondant aux nouveaux enjeux de la protection des cultures. En effet, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité insecticide

et répulsive de l'huile essentielle extraite d'une lamiacée qui pousse à Sétif (Algérie) *M. rotundifolia*.

L'huile essentielle de *M. rotundifolia* a montré une activité biocide intéressante sur les deux espèces de pucerons étudiés. Cette huile a montré aussi un effet répulsif à l'égard des adultes de *R. padi* et *S. avenae* et appartient selon le classement de McDonald et *al.* (1970) à la classe répulsive V avec un taux de répulsion moyen de 85 % pour *R. padi* et à la classe IV avec un taux de répulsion moyen de 71,90% pour *S. avenae*.

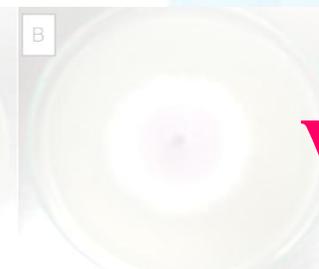
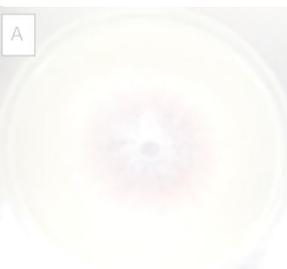
En raison de son activité insecticide et répulsive, cette huile essentielle pourrait être utilisée en guise de solution alternative dans les systèmes intégrés de lutte biologique contre les pucerons de céréales.



**IV- Activité antifongique
des extraits
et de l'huile essentielle
de *M. rotundifolia***



vis-à-vis



***Alternaria alternata* et**



Fusarium oxysporum

IV- Activité antifongique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*

1- Introduction

Au cours des vingt dernières années, une forte progression des maladies causées par des champignons, qui touchent un éventail d'hôtes très large a été constatée. Ces maladies sont causées par un nombre étonnamment élevé d'espèces fongiques (Bitar et *al.*, 2013).

Les superficies de la culture de la tomate se répartissent à 90% sur les régions de Annaba, Guelma, Skikda, et Taref, les 25% restants se situent au centre et à l'ouest du pays. Concernant la campagne agricole 2015/2016, la production nationale de tomate industrielle a atteint 1 205 779 tonnes dont seulement 599 303 tonnes ont été transformées. Le rendement à l'hectare a évolué pour atteindre les 800 quintaux au cours de la campagne 2015/2016, alors qu'il ne dépassait guère les 80 q/ha dans un passé récent. Aussi, on prévoit un rendement de 1 000 q/ha à l'horizon 2019/2020 (MADR, 2017). Ainsi il faut le rappeler, au sujet des rendements, nous sommes classés les derniers au niveau des pays du bassin méditerranéen où les rendements peuvent atteindre 1040 Qx/ha pour la saison culturale (FAO, 2011).

Cet état de fait est lié en partie aux différents bio-agresseurs inféodés à cette culture. La production de tomate sous serre nécessite un environnement humide et des températures optimales de 20°C à 25°C (Chaux et Foury, 1994), ce qui correspond aux exigences climatiques pour la propagation des agents phytopathogènes (Baptista, 2012). La tomate est attaquée par plus de 20 genres de champignons, 19 espèces de virus et 7 espèces bactériennes ainsi que plusieurs ravageurs (Blancard, 2009). Les agents pathogènes fongiques peuvent affecter la tomate et provoquer plusieurs maladies, à savoir : *Rhizoctonia solani*, *Cladosporium fulvum*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Sclerotium spp.* et *Phytophthora spp.* Elles sont favorisées par une humidité relative forte et une température élevée.

L'Alternariose de la tomate constitue une maladie fongique aérienne importante qui touche les feuilles, les tiges et les fruits. Si aucune méthode de protection n'est envisagée, elle entraîne des défoliations importantes et de nombreuses lésions sur fruit (Blancard et *al.*, 2012). En Algérie, l'Alternariose est une maladie très présente; elle affecte toutes les productions de plein champ et sous les tunnels plastique (serre), les conséquences de la défoliation sont graves, elles contribuent au ralentissement et à la diminution de la production voir même la perte de fruit (ITCMI, 2010).

La fusariose de la tomate ne s'attaque qu'à certains cultivars. Les plantes infectées par ce mycète du sol présentent un jaunissement des feuilles et un flétrissement se propageant à partir de la base de la tige. Au départ, les symptômes ne sont visibles que sur une seule moitié de la surface des feuilles, des branches ou des plantes, avant de se propager à l'ensemble de la plante (Messiaen et *al.*, 1993).

L'application de fongicides synthétiques a conduit à un certain nombre de problèmes environnementaux et sanitaires, car ils sont eux-mêmes cancérigènes, tératogènes et hautement toxiques à forte durée de dégradation (Lingk, 1991 ; Tian et *al.*, 2011).

Une nouvelle sensibilisation visant à réduire l'utilisation des pesticides chimiques en développant des stratégies ou des technologies alternatives afin d'améliorer la résistance aux maladies des plantes et le contrôle des agents pathogènes est encouragée (Labioud et *al.*, 2015).

Par conséquent, il y a eu un intérêt croissant pour la recherche concernant les pesticides alternatifs et les composés actifs antimicrobiens, y compris les extraits de plantes et les huiles essentielles de plantes aromatiques (Pradhanang et *al.*, 2003, Kotan et *al.*, 2013).

L'activité antifongique des espèces de *Mentha* a été étudiée sur différents champignons (McKay & Blumberg, 2006 ; Mimica-Dukić & Bozin, 2008 ; Peixoto et *al.*, 2009). L'activité antifongique des extraits de *Mentha* a été étudiée dans une moindre mesure. Néanmoins, des extraits ont montré une activité antifongique intéressante (Gulluce et *al.*, 2007 ; Hussain et *al.*, 2010).

Pour cette raison, l'objectif de cette partie est d'évaluer l'activité antifongique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis deux souche de champignons causant des dégâts sur tomate.

2- Matériel et Méthodes

2.1- Isolement et purification des souches fongiques

Les microorganismes testés sont des pathogènes isolés à partir d'une tomate infectée. L'isolement des pathogènes s'est fait suivant le protocole décrit par Zhu et *al.* (2001). Des fragments issus de jeunes lésions sur tomate (baie, feuilles, tige) ont été désinfectés avec de l'eau de Javel dilué à 5% pendant 5 min puis déposés dans des boîtes de pétri contenant du PDA fraîchement préparé et supplémenté en antibiotiques « Gentamicine 80mg/2mL » (Zhu

et *al.*, 2001; Djeugap et *al.*, 2009). Après 4 à 6 jours d'incubation à 28°C, des repiquages successifs sur milieu dépourvu d'antibiotique ont permis de purifier les souches et les cultures pures obtenues ont été conservées à 4°C.

2.2- Identification macroscopique des souches

L'identification des pathogènes s'est faite sur la base de la description macroscopique (la vitesse de croissance, la couleur de face et du revers de la boîte de Pétri, la forme et l'aspect de la colonie) et microscopique (l'aspect du thalle cloisonné ou non, la forme et la disposition des spores, la structure du mycélium, ...) en se référant aux documents de systématiques fongiques (Alexopoulos, 1979 ; Viennot-Bourgin, 1980 ; Botton et *al.*, 1990 ; Pitt & Hocking, 1997).

2.3- Identification moléculaire des souches

L'identification moléculaire des souches fongiques a été effectuée au niveau du Laboratoire Conidia Expert en Moisissures, à Lyon. L'identification des souches se base sur une comparaison (BLAST) des séquences obtenues contre une base de donnée. L'identification est souvent complétée par des observations microscopiques. Après séquençage « SANGER » des produits PCR, on reçoit les séquences sous format FASTA.

2.4- Tests biologiques

2.4.1- Activité antifongique des extraits éthanolique et méthanolique de *M. rotundifolia* sur la croissance mycélienne de *A. alternata* et *F. oxysporum*

Après une étude préliminaire, l'activité antifongique de l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* n'était perceptible qu'à 500 mg/mL sur les deux souches de champignons, c'est pour cette raison qu'on a choisi l'extrait éthanolique et méthanolique pour l'évaluation de cette activité, qui ont réagi à moindre dose. L'activité antifongique des extraits a été recherchée *in vitro*. Le paramètre d'étude est la croissance mycélienne des deux souches : *Alternaria sp* et *Fusarium sp*.

L'incorporation des deux extraits végétaux au milieu de culture a été faite selon la méthode de la double dilution de liaison géométrique de raison ½ (Zirih et Kra, 2003 ; Ahon et *al.*, 2011). L'extrait à tester est pesé dans un tube à hémolyse et solubilisé dans une solution de Dimethyl Sulfoxide (DMSO). La concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne doit pas être supérieure à 2%. Huit concentrations ont été retenues pour les deux extraits

éthanolique et méthanolique (200 mg/mL, 100 mg/mL, 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL et 1,56 mg/mL). Le témoin n'a subi aucun amendement avec les extraits. Les différents milieux ont été coulés à 40 °C dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Trois boîtes de Pétri ont été utilisées par répétition élémentaire et l'essai a été répété 3 fois. Un explant de 6 mm de diamètre, de chaque champignon âgé de 7 jours, est placé au centre géométrique de la boîte de Pétri sur le milieu solidifié. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du Parafilm et mises en incubation à l'étuve, pendant 7 jours, à 25 ± 2 °C. Le taux d'inhibition de la croissance radiale mycélienne a été mesuré quotidiennement pendant 7 jours comparativement au témoin. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition (PI) (Leroux & Gredet, 1978) :

$$PI = \frac{A-B}{A} \times 100$$

A : Diamètre moyen de la croissance du champignon sur milieu témoin.

B : Diamètre moyen de la croissance du champignon en présence de l'extrait à tester.

Trois boîtes de Pétri ont été utilisées par condition et au moins trois répétitions ont été effectuées. Les explants de mycélium issus des boîtes où la croissance a été totalement inhibée ont été repiqués de nouveau sur le milieu organique gélosé frais dépourvu d'extrait. L'activité fongicide ou fongistatique de l'extrait végétal a été évaluée sur des cultures âgées de 10 jours selon qu'il y ait eu reprise de croissance fongique ou non (Pandey et al., 1982).

De l'équation de régression linéaire entre les logarithmes népériens des concentrations (en abscisses) et les pourcentages d'inhibition de la croissance ou de la sporulation (en ordonnées), on détermine les concentrations réduisant de 50% (CI₅₀) et 90% (CI₉₀) la croissance mycélienne Brown (1988).

Les CI₅₀ et les CI₉₀ ont été déterminés graphiquement par la relation linéaire entre le logarithme des concentrations et les pourcentages d'inhibition de la croissance. L'analyse statistique des résultats a été réalisée par le test « Duncan's multiple range » au seuil de 5 %.

2.4.2- Activité antifongique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

L'incorporation de l'huile essentielle au milieu de culture a été faite selon la méthode de (Remmal et al., 1993). Du fait de la non-miscibilité des huiles essentielles à l'eau et donc aux milieux de culture, une mise en émulsion de l'huile a été réalisée grâce à une solution d'agar agar à 0,2%. Elle permet d'obtenir dans le milieu une répartition homogène des

composés à l'état dispersé , elle donne au milieu une viscosité capable d'empêcher les constituants des huiles essentielles de se réassocier après agitation et d'augmenter au maximum le contact germe/compose.

L'huile essentielle est diluée d'abord au 1/10^e dans la solution d'agar-agar. À partir des différents tubes contenant des concentrations différentes en HEs, des quantités de cette dilution (2 mL) ont été ajoutées aux tubes à essais stérilisés et refroidis à 45 °C, contenant 18 mL de PDA. Ces tubes sont ensuite agités au Vortex et versés dans des boîtes de Pétri. Les concentrations finales (V/V) en huile essentielle sont 10% (1/10^e), 4% (1/25^e), 2% (1/50^e), 1% (1/100^e), 0.1% (1/200^e) et 0.01% (1/300^e). Des boîtes témoins, contenant le milieu de culture plus la solution d'agar-agar 0,2% seul, sont également préparées.

Après solidification du PDA, l'ensemencement se fait par dépôt d'un explant de 6 mm de diamètre, prélevés à partir de la périphérie d'un tapis mycélien et provenant d'une culture de sept jours. Les boîtes de Pétri ont été scellées avec du Parafilm et mises en incubation à température ambiante pendant une semaine. Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

L'activité antifongique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été évaluée *in vitro* en observant l'inhibition de la croissance des champignons à tester en contact avec cette huile à différentes concentrations. Les résultats de cette étude sont représentés par la sensibilité des souches à cette huile (inhibition ou développement).

3- Résultats et Discussion

3.1- Identification macroscopique et microscopique des souches

Après l'isolement et l'incubation des souches trouvées sur tomate, l'identification des genres fongiques a été réalisée en se référant aux clés d'identification de Champion (1997); Botton et *al.* (1990); Watanabe (2002); Navi et *al.* (1999) en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, odeur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques (cloisonnement du mycélium, forme des spores et conidies, forme des organes de fructification, etc.). Sur la base des caractères microscopiques retenus après l'observation au microscope optique avec des grossissements x4 et x10, nous sommes arrivés à identifier: *Alternaria sp* et *Fusarium sp*.

L'observation macroscopique et microscopique des deux souches (Figure 29) a révélé l'existence des caractères suivants : chez *Alternaria sp* la couleur de la colonie est grise et blanche sur la face de la boîte de Pétri tandis que son revers est noir orangé, la texture de la colonie est cotonneuse, sous microscope la souche a présenté un mycélium cloisonné avec des conidies et des spores lisses et des hyphes septés. Pour *Fusarium sp* la couleur de sa colonie est blanchâtre à rose pale sur la face de la boîte de Pétri et rose sur son revers, la texture de la colonie est duveteuse, sous microscope la souche a présenté des mycéliums cloisonnés avec différents types de conidies (microconidies, macroconidies et les monophialides) et des chlamydo spores intercalaires ou terminales.

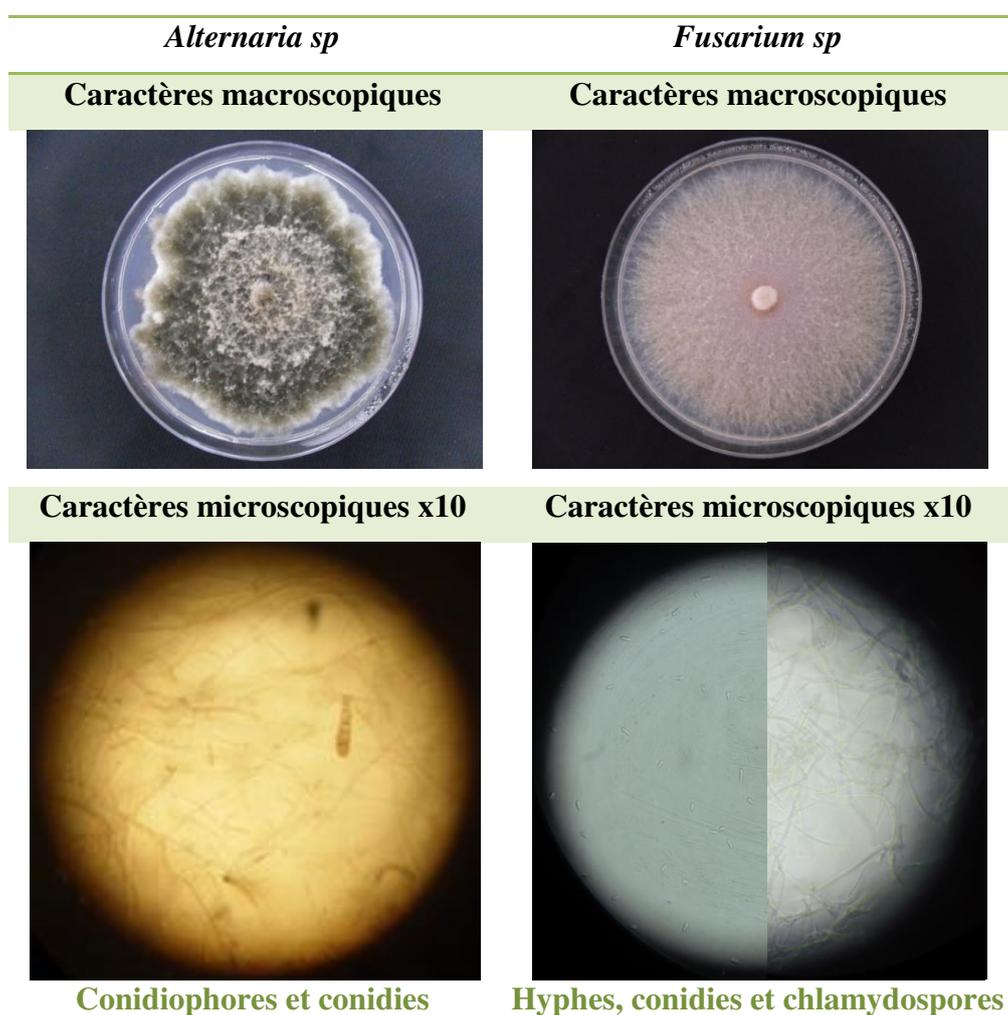


Figure 26 : Observation macroscopique et microscopique des deux souches fongiques.

3.2- Identification moléculaire

Après séquençage « SANGER » des produits PCR, les séquences sous format FASTA sont représentées par deux séquences pour chaque souche. Les séquences sont analysées par BLAST sur : base de donnée interne, NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et unité (<https://unite.ut.ee/analysis.php>). Par exemple, pour la séquence 1 le résultat sur unité donne : *A. alternata* en premier suivi par *A. quercus*. Pour la séquence 2 le résultat sur unité donne : *A. alternata* (Figure 27).

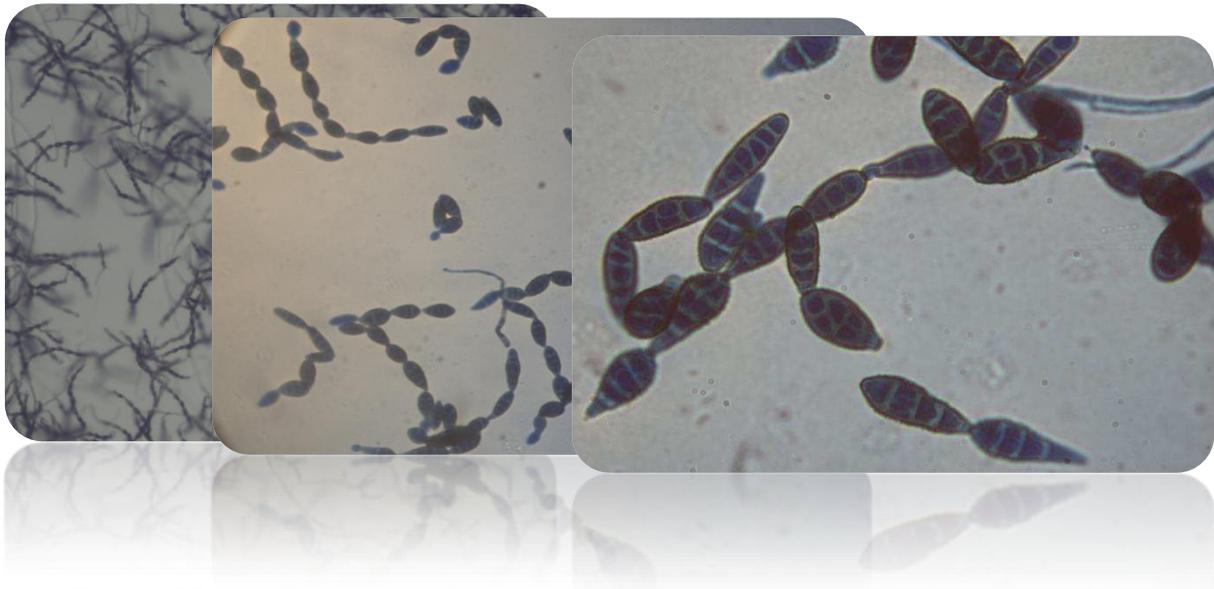


Figure 27 : Profil microscopique de *Alternaria alternata* conidiophores et conidies

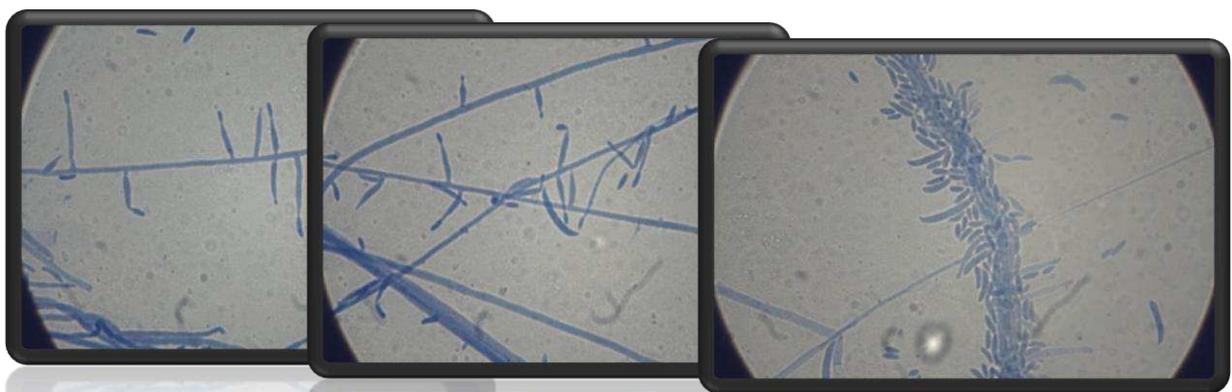


Figure 28 : Profil microscopique de la souche *Fusarium oxysporum* (hyphes, microconidies, macroconidies).

3.3- Activité antifongique des extraits

Nous avons remarqué dans notre étude (Figure 29, 30) que l'inhibition de la croissance mycélienne (100%) par l'extrait éthanolique sur *A. alternata* et *F. oxysporum* est enregistrée avec les concentrations 25, 50, 100 et 200mg/mL après 24 heures d'incubation. Cette inhibition a duré deux jours avec la concentration 200mg/mL en inhibant la croissance de *A. alternata*. L'inhibition mycélienne de *F. oxysporum* est totale pendant deux jours avec les concentrations 100 et 200mg/mL.

La croissance mycélienne des deux souches fongiques démarre le troisième jour pour les concentrations 200mg/mL; par contre pour la souche *A. alternata* et pour la concentration 100mg/mL, elle démarre le deuxième jour avec un taux d'inhibition de 88% (Photos). Après 7 jours d'incubation, une inhibition de croissance importante (>85% et <95%) de mycélium des deux souches a été observée pour les concentrations 100 et 200 mg/ml.

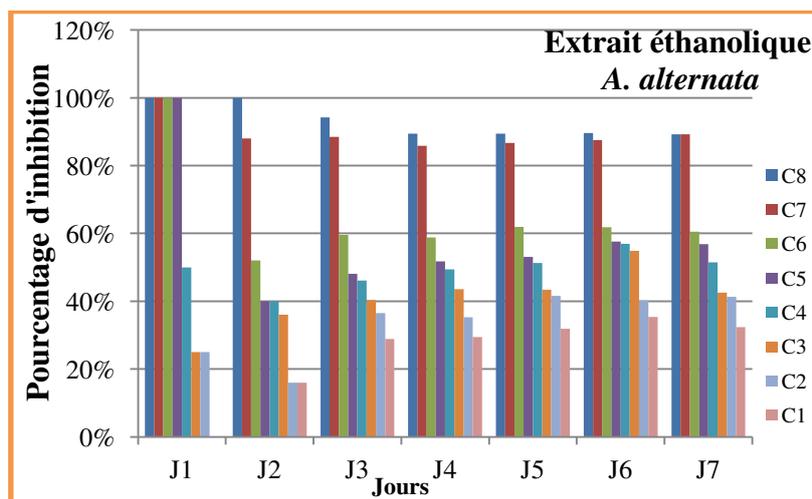


Figure 29 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *A. alternata*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait éthanolique. C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

En utilisant l'extrait éthanolique ; la souche *A. alternata* était la plus résistante à 200mg/mL avec un taux d'inhibition de 93.12% comparé à *F. oxysporum* avec un taux d'inhibition de 92.40% après 7 jours d'incubation (Figure 31).

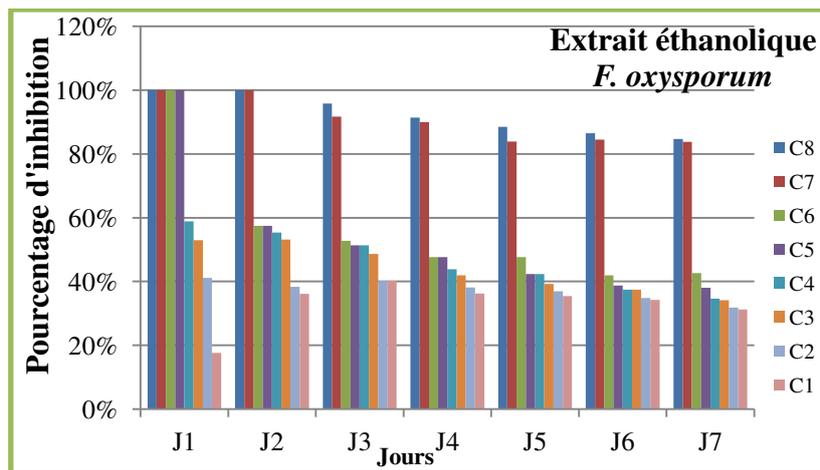


Figure 30 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait éthanologique. C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

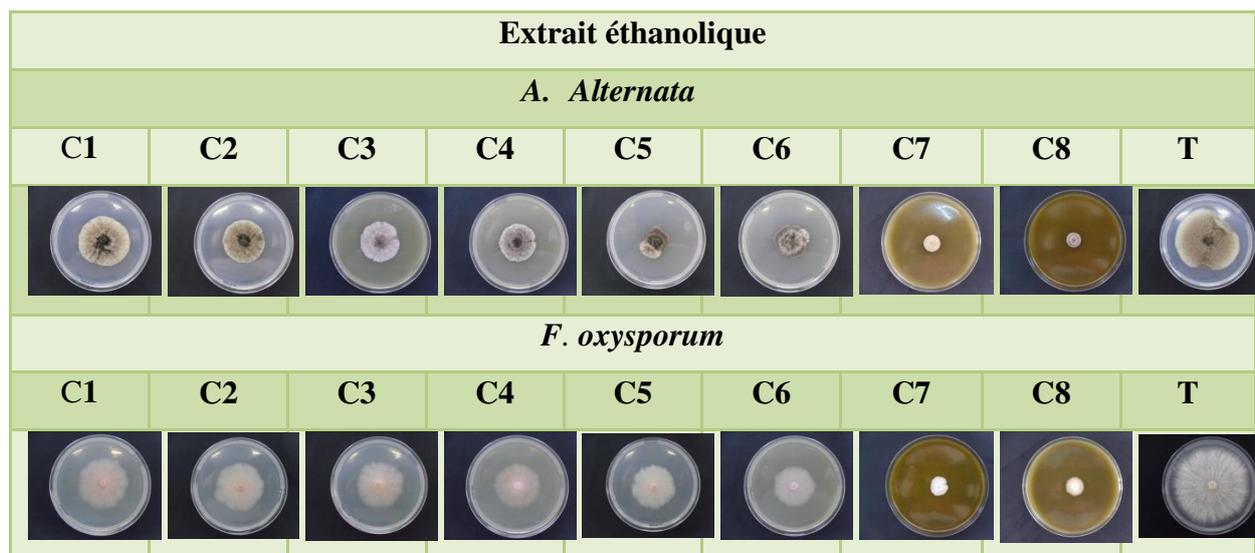


Figure 31 : Croissance *in vitro* du mycélium des souches *A. alternata* et *F. oxysporum* en présence d'extrait éthanologique de la partie aérienne de *M. rotundifolia* après 7 jours d'incubation.

T : Témoin 0 mg/mL ; C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

L'analyse quantitative par CLHP a montré la richesse des deux extrais (éthanologique et méthanolique) de *M. rotundifolia* en acides phénoliques et en flavonoïdes connus pour leurs multiples activités biologiques. Parmi les flavonoïdes trouvés, la scutéllarine est le composé

majoritaire dans les deux extraits avec une quantité de 40.24mg/kg trouvée dans l'extrait méthanolique, plus élevée que celle trouvée dans l'extrait éthanolique (25.33mg/kg). La différence d'efficacité entre l'extrait éthanolique et méthanolique en inhibant la croissance mycélienne des deux souches fongiques peut être due à la quantité de scutéllarine et/ou aux autres composés phénoliques trouvant dans les deux extraits.

L'activité d'une substance végétale dépend de sa concentration en principes actifs (Thangara *et al.*, 2000). Les études de Nickavar *et al.* (2008) ; Seladji *et al.* (2014) ; Moldovan *et al.* (2014) ; Brahmi *et al.* (2017b) sur le criblage phytochimique des extraits de *M. rotundifolia* a mis en évidence la présence de métabolismes secondaires tels que : les saponosides, les tanins, les flavonoïdes, les lactones, les sesquiterpéniques, les phénols, les alcaloïdes et les coumarines. La majorité de ces composés seraient à la base des activités fongicides contre les microorganismes pathogènes selon Okigbo & Ajalie (2005). Toutefois, dans leur mode d'action, les tannins peuvent s'accrocher sur la membrane cellulaire des micro-organismes grâce à leur capacité de précipiter les protéines (Vasconcelos *et al.*, 2003).

Kabran *et al.* (2012) ont signalé que les phénols totaux sont synthétisés par les plantes comme réponse aux conditions de stress telles que les infections, les blessures, les radiations UV. Ce qui justifierait leurs nombreux usages en pharmacopée traditionnelle. Les plantes riches en flavonoïdes ont des propriétés analgésiques, antifongiques, antimicrobiennes, hémostatiques, aphrodisiaques et astringentes. Ce qui expliquerait l'utilisation probable de *M. rotundifolia* dans la lutte contre *A. alternata* et *F. oxysporum*, deux champignons phytopathogènes étudiés dans ce travail.

La différence de sensibilité observée au paramètre testé (inhibition de la croissance mycélienne) est due principalement, à la diversité structurelle des agents pathogènes, d'après (Chang *et al.*, 2007). Le mécanisme de résistance des champignons aux extraits antifongiques est dû généralement à l'ergostérol, principal constituant de la membrane fongique. Par contre leurs sensibilités étaient dues à la formation des complexes insolubles ; à l'altération de la perméabilité cellulaire ; à l'inhibition de la synthèse protéique par incorporation de l'ARN et à l'inhibition de la synthèse d'ADN (Boiron, 1996). Ces perturbations cellulaires conduisent à l'altération de la paroi du filament fongique (Epstein *et al.*, 1972).

Selon Kalemba & Kunicka (2003) et Klervi (2005), l'efficacité d'un extrait dépend de sa concentration, de la plante à partir de laquelle il est issu et de la souche testée. L'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la

concentration en principe actif (Wagner et *al.*, 1996). L'éthanol et le méthanol ont extrait différentes substances antimicrobiennes de la même plante, nos résultats étaient comparables à ceux obtenus par Pesewu et *al.* (2008).

Kanoun et *al.* (2014) ont montré que la diminution de la croissance mycélienne de *Ascochyta rabiei* et de *Fusarium oxysporum*, correspond à la diminution du nombre de leurs spores sous l'effet de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica granatum*.

L'effet antifongique de nos extraits est dû aux composés antifongiques présents dans notre plante, qui sont responsables de l'inhibition de la croissance mycélienne des champignons. Des protéines antifongiques telles que les chitinases, les b-1,3-glucanases et les protéines inactivant les ribosomes présentes dans les plantes ont été décrites par Vigers et *al.* (1991).

Les propriétés phytostimulantes des extraits de plantes peuvent probablement être dues à des facteurs favorisant la croissance tels que IAA, IBA, GA₃ ou leurs précurseurs. Les propriétés antifongiques peuvent également être dues aux concentrations enrichies de substances phénoliques, de tanins, d'alcaloïdes et de phytoalexines (Begum et *al.*, 2009).

Nous remarquons que l'inhibition de la croissance mycélienne (100%) par l'extrait méthanolique sur *A. alternata* et *F. oxysporum* est enregistrée avec les concentrations 25, 50, 100 et 200mg/mL après 24 heures d'incubation (Figure 32 et 33). Cette inhibition a duré deux jours avec la concentration 200mg/mL en inhibant la croissance de *A. alternata* et cinq jours avec la concentration 200mg/mL en inhibant la croissance mycélienne de *F. oxysporum*.

La croissance mycélienne de *F. oxysporum* démarre le sixième jour pour la concentration 200mg/mL et le deuxième jour pour les concentrations 25, 50, 100mg/mL ; par contre pour la souche *A. alternata* elle démarre le troisième jour pour la concentration 200mg/mL et le deuxième jour pour les concentrations 25, 50, 100mg/mL. Après 7 jours d'incubation, une inhibition de croissance importante (>50% et <95%) de mycélium des deux souches a été observée pour les concentrations 100 et 200 mg/mL.

Avec l'extrait méthanolique, la souche *F. oxysporum* est légèrement plus résistante à 200mg/mL avec un taux d'inhibition de 93.12% comparé à *A. alternata* avec un taux d'inhibition de 91.80% après 7 jours d'incubation (Figure 34).

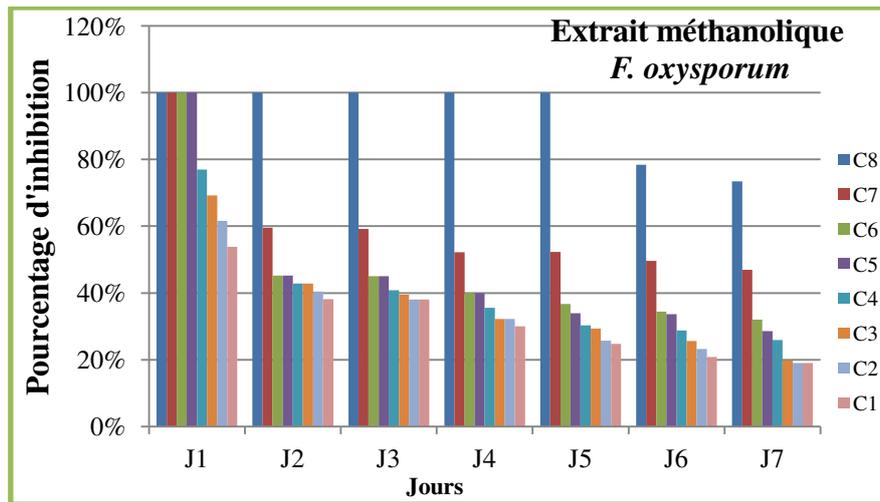


Figure 32 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *F. oxysporum*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique. C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

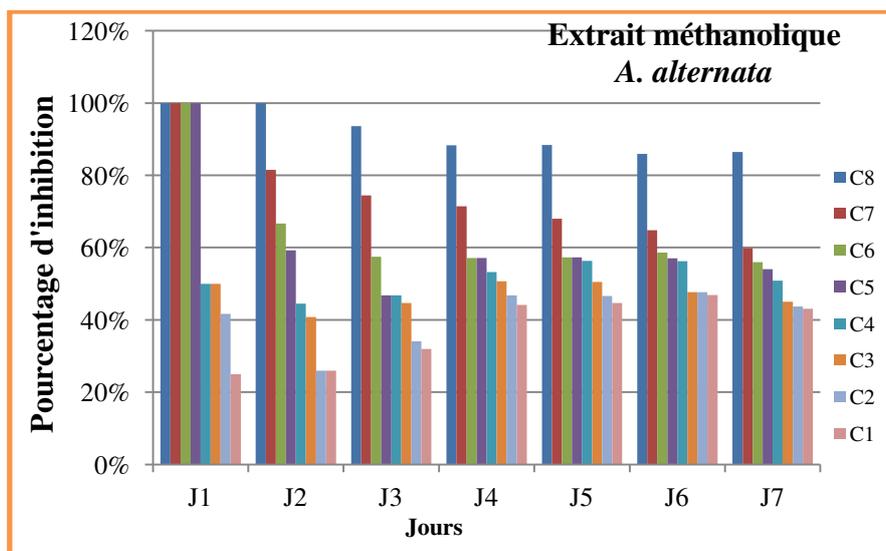


Figure 33 : Pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne de *A. alternata*, en fonction du temps et de la concentration de l'extrait méthanolique. C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

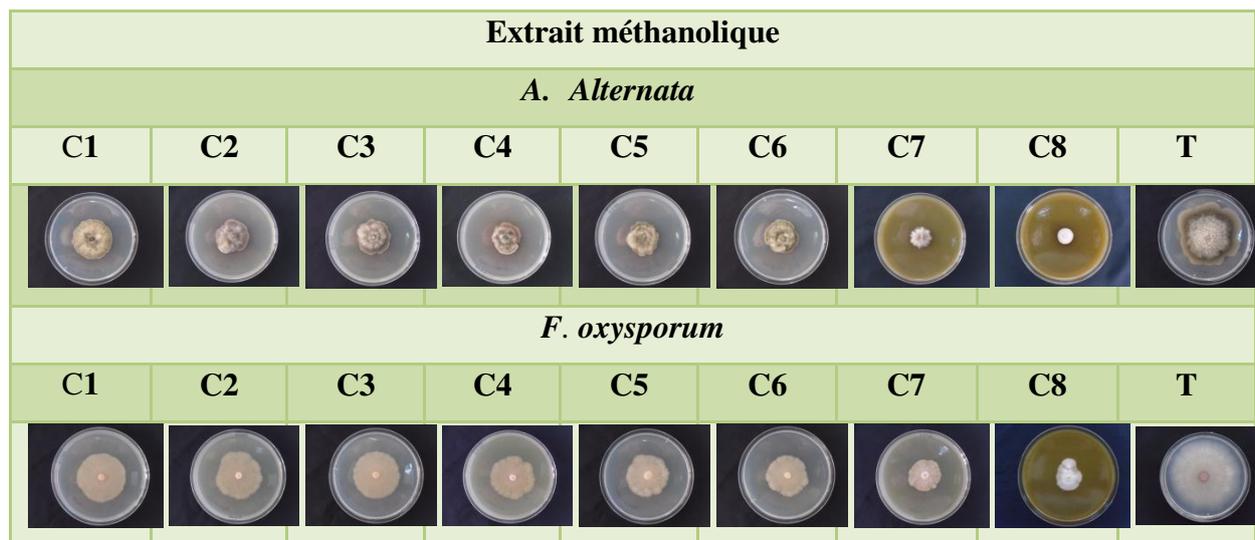


Figure 34 : Croissance *in vitro* du mycélium des souches *A. alternata* et *F. oxysporum* en présence d'extrait méthanolique de la partie aérienne de *M. rotundifolia* après 7 jours d'incubation. T : Témoin 0 mg/mL ; C1 : 1,56 mg/mL ; C2 : 3,12 mg/mL ; C3 : 6,25 mg/mL ; C4 : 12,5mg/mL ; C5 : 25 mg/mL ; C6 : 50 mg/mL ; C7 : 100 mg/mL ; C8 : 200 mg/mL.

Bajwa et *al.* (2004). ont montré que pour leurs réponses de croissance périodiquement variées, il semble probable qu'une croissance fongique plus faible au début de la période soit due à la plus forte concentration de composés allélochimiques dans le milieu causant un contrôle de la croissance. D'autre part, cette lente réponse est due au fait qu'avec le temps les produits des métabolites fongiques dénaturaient les composés allélochimiques avec la décomposition et l'autophagie, les champignons en raison du manque de nutriments résultant la production de biomasse.

Selon Kanoun (2014), la différence de susceptibilité s'explique principalement par la sensibilité et la résistance naturelle des souches testées. L'activité antifongique des extraits n'est pas fonction du rendement d'extraction. L'efficacité serait liée au pouvoir du solvant à solubiliser un ou plusieurs composés chimiques contenus dans le broyat de la plante (Senhaji et *al.*, 2005).

Les activités antibactériennes et antifongiques des espèces de *Mentha* ont été étudiées sur diverses bactéries et champignons (Kapp, 2015). Mais il y a peu d'informations sur les extraits de *M. rotundifolia* et leurs dérivés contre les cellules fongiques qui favorisent l'effet fongistatique ou fongicide (Figueiredo et *al.*, 2008).

L'isolat *A. alternata* est très sensible à l'extrait méthanolique de *M. rotundifolia* alors que l'isolat *F. oxysporum* nécessite des doses beaucoup plus élevées pour l'inhibition de sa croissance mycélienne (Tableau 9). Les deux champignons sont inhibés de manière similaire par l'extrait éthanolique par des valeurs de CI₅₀ de 28.25mg/mL pour *A. alternata* et 28.20mg/mL pour *F.oxysporum*. Ce dernier a enregistré une CI₉₀ (161.53) plus élevée que celle de *A. alternata* avec une valeur de 153.25mg/mL.

Tableau 9 : Concentration (mg/mL) en extrait réduisant de 50% (CI₅₀) et 90% (CI₉₀) la croissance mycélienne de *A. alternata* et *F. oxysporum*.

Extrait	Champignon	Croissance mycélienne	
		CI ₅₀	CI ₉₀
Extrait éthanolique	<i>A. alternata</i>	28.25	153.25
	<i>F. oxysporum</i>	28.20	161.53
	<i>A. alternata</i>	15.12	175.12
Extrait méthanolique	<i>F. oxysporum</i>	53.13	191.06

Le potentiel antifongique des phénols et des tanins des extraits de plantes a été prouvé par diverses recherches contre les espèces fongiques pathogènes (Duke, 2002 ; Castillo et al. 2010 ; Zuniga et al., 2012). Les flavonoïdes et les polyphénols apparentés protègent les plantes contre les invasions microbiennes (Harborne & Williams, 1995) et il ne devrait pas être surprenant qu'ils ont été trouvés *in vitro* pour être des substances antimicrobiennes efficaces contre un large éventail de micro-organismes. Il a été prouvé hors de tout doute que l'effet de l'extrait sur l'inhibition fongique dépend du solvant utilisé pour l'extraction (Castillo et al., 2010).

Dans l'étude établie par Ameziane et al. (2007), les extraits méthanoliques d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus villosus* étaient plus actifs contre *Penicillium digitatum* et *Geotrichum candidum* que les extraits chloroformiques. Ainsi, il peut être suggéré que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des composés antifongiques de ces deux espèces végétales.

Les extraits de *M. rotundifolia* par la présence de différentes familles chimiques (polyphénols, flavonoïdes, tanins, coumarines) révèlent des activités antifongiques potentielles, ces composés constituent donc une cible de choix pour enrichir la production des antifongiques naturels.

3.4- Activité antifongique de l'huile essentielle

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques selon leurs constituants majoritaires. Dans les domaines phytosanitaires et agroalimentaires, les huiles essentielles ou leurs composés actifs pourraient également être employés comme agents de protection contre les microorganismes, les champignons et le processus d'oxydation des aliments (Farhat, 2010).

Pour évaluer l'activité antifongique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, nous avons adopté la technique de contact direct sur gélose. Les résultats ont montré que l'huile essentielle a une activité significative contre les deux champignons testés (Figure 35).

A. alternata a continué de croître sur les milieux sans huile à 1% et 0.1% ; aussi sur les milieux dont la concentration en huile est de 0,01%. *F. oxysporum* a poussé sur les milieux dont la concentration en huile est de 0,01% et n'a pas développé sur les milieux sans huile à 0.1% ; 1% ; 2% ; 4% ; 10%. L'huile essentielle de *M. rotundifolia* inhibe complètement la croissance des deux champignons à des concentrations égales à 0.1%.

Le tableau 10 résume les résultats de l'inhibition de la croissance des deux champignons par l'huile essentielle. Ainsi, en fonction de leur sensibilité, l'espèce *A. alternata* a montré la sensibilité la plus importante par rapport à *F. oxysporum*, tandis que la souche *F. oxysporum* a montré une sensibilité plus faible à l'huile essentielle.

Tableau 10 : Activité d'inhibition de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la croissance de *A. alternata* et *F. oxysporum*

Champignons	Concentration en HE %						Témoin
	0.01	0.1	1	2	4	10	
<i>A. alternata</i>	+	-	-	-	-	-	+
<i>F. oxysporum</i>	+	-	-	-	-	-	+

+ croissance, - inhibition

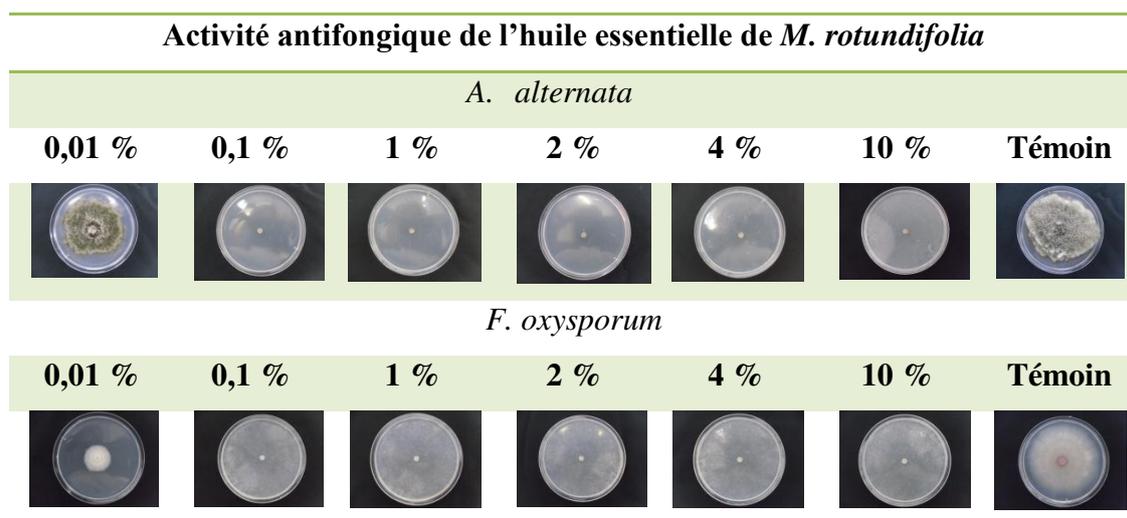


Figure 35 : Activité d'inhibition de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la croissance des deux champignons après 7 jours d'incubation

Les explants des deux champignons, qui n'ont pas poussé, ont été réensemencés dans des nouvelles boîtes de Pétri dépourvues d'huile. Les deux champignons prélevés des boîtes dont la concentration en huile essentielle est de 1 ; 0.1 et 0.01% ont continué de croître (effet fongistatique). Tandis que les explants des deux champignons prélevés des boîtes dont la concentration en huile essentielle est de 2 ; 4 et 10% n'ont pas poussé (effet fongicide).

Plusieurs études ont été effectuées sur l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Mentha sp* (Oumzil et al., 2002 ; Norsati et al., 2011 ; Moghaddam et al., 2013 ; Moghtader, 2013 ; Mehani et al., 2015 ; Dehghanpour-Farashah & Taheril, 2016 ; Park et al., 2016 ; Reddy et al., 2017). Cependant, rares sont celles qui ont été consacrées à l'activité antifongique de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre ces deux souches trouvées sur tomate.

L'huile essentielle de *M. rotundifolia* a exercé une très forte activité antifongique contre les deux champignons par rapport aux extraits éthanolique et méthanolique. Les huiles essentielles sont des antifongiques plus efficaces que les extraits polaires (Hajlaoui et al., 2009 ; Mkaddem et al., 2009 ; Teixeira et al., 2012). Elle a inhibé leur croissance mycélienne à partir d'une très faible concentration de l'ordre de 1/200 v/v. Les deux souches fongiques testées ont montré une grande sensibilité à l'huile essentielle de *M. rotundifolia* riche en phénols. Il a été prouvé que les phénols agissent par l'inactivation des enzymes fongiques qui contiennent le groupement SH dans leur site actif (Farg et al., 1989 ; Celimene et al., 1999). Les terpènes phénoliques agissent aussi en se fixant sur les groupes amine et hydroxylamine

des protéines membranaires microbiennes provoquant l'altération de la perméabilité et la fuite des constituants intracellulaires (Knowles et *al.*, 2005 ; Lopez-Malo et *al.*, 2005).

L'activité antifongique de l'huile essentielle analysée peut être attribuée principalement à son constituant majoritaire, le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- avec un pourcentage d'environ 89,09%. D'après El Ajjouri et *al.* (2010), la composition chimique des huiles essentielles doit être prise dans sa totalité. En effet, il ne faut pas négliger l'effet synergique entre différents constituants, y compris les constituants minoritaires.

L'action antifongique des huiles essentielles est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et la mort de la levure (Mann et *al.*, 2000).

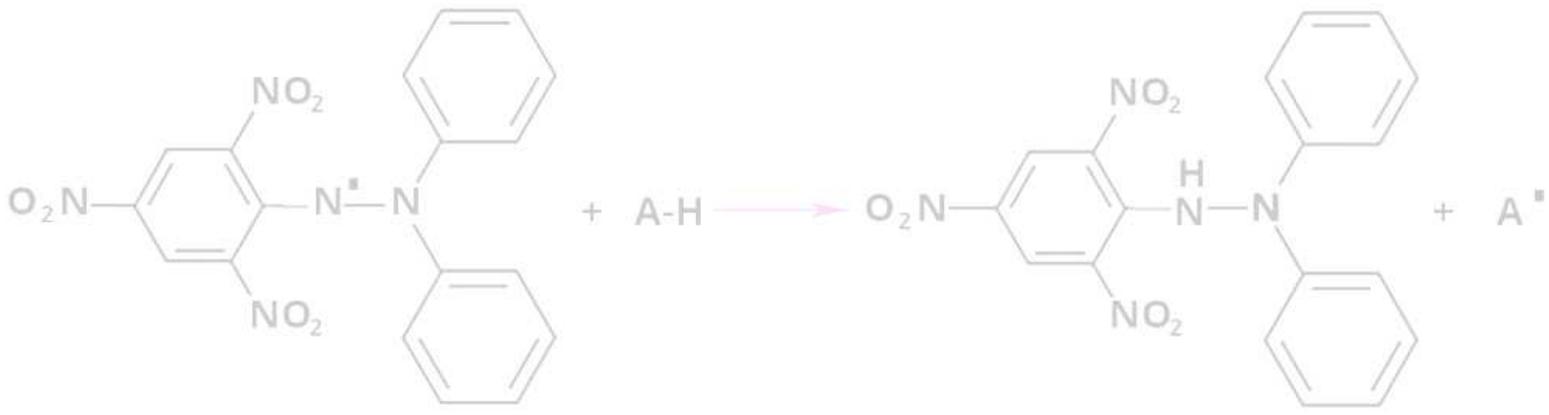
Les chercheurs expliquent que l'activité antibactérienne et antifongique maximales des huiles essentielles des plantes sont causées par des constituants chimiques contenant des hétéroatomes tels que l'oxygène (Dorman et Deans, 2000 ; Proestos et *al.*, 2006 ; Ben-Bnina et *al.*, 2010).

4- Conclusion

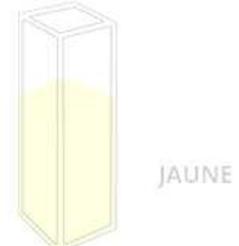
Le pouvoir inhibiteur de la croissance mycélienne des deux extraits (éthanolique et méthanolique) et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été mis en évidence par la réduction ou l'inhibition de la croissance mycélienne avec l'augmentation de la concentration de l'extrait et de l'huile.

L'effet antifongique très intéressant de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* par rapport à l'effet des extraits éthanolique et méthanolique indique le potentiel de cette espèce végétale comme source de matière fongicide naturelle. La présente étude a révélé que cette menthe présente un effet antifongique contre *A. alternata* et *F. oxysporum*, ce qui offre une base scientifique pour l'utilisation de cette espèce comme une bonne source de composés antifongiques.

Ce travail préliminaire pourrait constituer une base pour la détermination des concentrations suffisantes et efficaces pour les études *in planta*, en vue de la lutte biologique par des substances actives naturelles de *M. rotundifolia* contre les agents phytopathogènes de *A. alternata* et *F. oxysporum*.



V- Activité



antioxydante des

extraits, de l'huile
essentielle et de son
composé majoritaire
de *Mentha rotundifolia*



V- Activité antioxydante des extraits, de l'huile essentielle et de son composé majoritaire de *Mentha rotundifolia* L.

1- Introduction

La plupart des plantes aromatiques et médicinales contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydantes (Benabdallah et al., 2016). Récemment, l'intérêt s'est considérablement accru en trouvant des antioxydants naturels pour remplacer les antioxydants synthétiques, qui ont été limités en raison de leurs effets secondaires tels que la cancérogenèse (Puangpronpitag & Sittiwet, 2009). Parmi ces composés naturels, les phénols et les composés volatils constituent l'un des principaux groupes de composés à base de plantes agissant en tant qu'absorbants de radicaux et antioxydants (Malik et al., 2012; Benmansour et al., 2015).

Les *Lamiaceae* est l'une des familles les plus utilisées comme source de biomolécules à effet antioxydant élevé (Boussouf et al., 2017). Dans cette famille, le genre *Mentha* est représenté par six espèces principales: *M. rotundifolia*, *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. aquatic*, *M. pulegium* et *M. piperita*, selon la flore de l'Algérie (Quezel & Santa, 1963). Divers extraits ou huiles essentielles d'espèces de *Mentha* ont démontré une activité antioxydante (Kapp, 2015). En Algérie et en Afrique du nord, cette plante aromatique a été appliquée en médecine traditionnelle pour un large éventail d'actions comprenant le froid, le choléra, la bronchite, la tuberculose, la sinusite, l'antiflatulente, l'expectorante, l'antitussive, la tonique, la stomachique, la carminative, l'analgésique l'antispasmodique, l'anti-inflammatoire, la sédative, l'hypotensif et l'insecticide (Bremnes, 2002; McKay & Blumberg, 2006; Kamkar et al., 2010). De plus, il est bien documenté que l'huile essentielle et les extraits d'espèces de *Mentha* possèdent des propriétés antimicrobiennes, fongicides, antivirales, insecticides et antioxydantes (Brahmi et al., 2017a). De telles activités biologiques multiples des huiles essentielles de *Mentha* pourraient être attribuées à la présence de certains composants chimiques, tels que le menthone, l'oxyde de pipéritone, le camphre et le linalol (Mimica-Dukic et al., 2003; Hussain et al., 2008; Bendaoud et al., 2009).

L'activité antioxydante des extraits et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* a été considérée dans la littérature, mais il y a très peu de rapports sur l'effet du composé majoritaire de son huile. Sur la base de ces considérations, cette étude vise à évaluer l'activité antioxydante des extraits, de l'huile essentielle et du composé isolé de *Mentha rotundifolia* L. récoltée du nord-est algérien.

2- Matériel et méthodes

2.1- Produits chimiques et réactifs

Le carbonate de sodium anhydre, le réactif phénolique de Folin-Ciocalteu, le méthanol (réactif analytique et gradient de qualité HPLC) ont été achetés auprès de Merck (Darmstadt, Allemagne). L'acide éthylènediaminetétra-acétique (EDTA), le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH), l'acide 3- (2-pyridyl) -5,6-bis (4-phénylsulfonique) -1,2,4-triazine (ferrozine), le chlorure de fer (II) (FeCl_2), l'acide gallique, le 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol (BHT), le diméthylsulfoxyde (DMSO) ont été achetés chez Sigma-Aldrich GmbH. (Taufkirchen, Allemagne). Tous les autres produits chimiques étaient de qualité analytique et obtenus à partir de Sigma ou Merck.

2.2- Activité antioxydante

2.2.1- Activité de piégeage du radical DPPH

L'activité de piégeage radicalaire a été déterminée par une méthode spectrophotométrique basée sur la réduction d'une solution méthanolique de DPPH selon la méthode de Blois (1958). Les solutions d'échantillon ont été ajoutées à une solution méthanolique à 0,004% de DPPH. Le mélange a été agité vigoureusement et laissé reposer à une température ambiante pendant 30 minutes dans l'obscurité. L'absorbance est mesurée à 517 nm contre un blanc par un spectrophotomètre (Rayleigh, UV-2601). Le piégeage du radical DPPH est calculé selon la formule:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Activité du piégeage du radical DPPH} \\ & = [(A_{517(\text{contrôle})} - A_{517(\text{échantillon})}) / A_{517(\text{contrôle})}] \times 100 \end{aligned}$$

dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de la réaction du contrôle (contenant tous les réactifs sauf le composé d'essai), et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du composé d'essai.

L'activité de piégeage du radical DPPH a été exprimée en valeurs de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) pour comparaison. La valeur IC_{50} de chaque échantillon est définie comme la concentration de l'échantillon requise pour une diminution de 50% de l'absorbance de l'échantillon. Le BHT est utilisé comme un contrôle positif.

2.2.2- Activité de chélation des métaux sur les ions ferreux (Fe²⁺)

L'activité de chélation des métaux a été déterminée selon la méthode de Decker et Welch (1990) avec quelques modifications. Brièvement, 250 µL des échantillons ont été mélangés avec 25 µl de 2 mmol/L de FeCl₂ et 100 µL de 5 mmol/L de ferrozine. Le mélange est dilué avec de l'éthanol et laissé au repos à température ambiante pendant 10 minutes. L'absorbance de la solution est mesurée par spectrophotométrie à 562 nm. L'activité de chélation des métaux est calculé selon la formule:

$$\begin{aligned} & \% \text{ Activité de chélation des métaux} \\ & = [(A_{562(\text{contrôle})} - A_{562(\text{échantillon})}) / A_{562(\text{contrôle})}] \times 100 \end{aligned}$$

dont: $A_{\text{contrôle}}$ est l'absorbance de la réaction du contrôle (contenant tous les réactifs sauf le composé d'essai), et $A_{\text{échantillon}}$ est l'absorbance du composé d'essai.

L'activité de chélation des métaux a été exprimée en valeurs de CI_{50} (mg/mL) pour comparaison. La valeur IC_{50} de chaque échantillon est définie comme la concentration de l'échantillon requise pour une diminution de 50% de l'absorbance de l'échantillon. L'EDTA est utilisé comme témoin positif.

2.3- Détermination de la teneur en phénols totaux

Le contenu des phénols totaux des échantillons a été analysé en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode de Singleton et Rossi (1965), en utilisant l'acide gallique en standard, avec quelques modifications (Yegenoglu, Aslim & Oke, 2011). Les solutions de fraction ont été mélangées avec 0,2 mL de réactif Folin-Ciocalteu à 50% et laissées réagir pendant 3 minutes et 1 mL de solution aqueuse de Na₂CO₃ à 2% a été ajouté. A la fin de l'incubation de 45 min à température ambiante, l'absorbance de chaque mélange a été mesurée à 760 nm. La même procédure a également été appliquée aux solutions standard de l'acide gallique. Les teneurs en composés phénoliques totaux ont été exprimées en µg d'équivalent d'acide gallique par mg de fractions.

2.4- Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en trois répétitions. Les résultats ont été exprimés en moyennes ± écarts-types. Les analyses statistiques sont effectuées en utilisant le SPSS 11.5 (SPSS, Chicago, IL). Les différences entre les moyennes sont faites par analyse de variance (ANOVA) et les moyennes sont comparées en utilisant le test de Tukey. L'analyse de

corrélation de Pearson est utilisée pour comparer le contenu phénolique total et l'activité antioxydante des extraits.

3- Résultats et Discussion

L'identification des antioxydants des plantes médicinales est un domaine de recherche en croissance rapide et de nombreux antioxydants ont été étudiés par plusieurs méthodes (Seladji et *al.*, 2014). Le test DPPH est une méthode rapide, fiable et peu coûteuse qui a souvent été utilisée pour évaluer le potentiel antioxydant de divers composés naturels (Molyneux, 2004).

L'activité de piégeage des radicaux DPPH de l'huile essentielle, du composé isolé, des extraits et de l'antioxydant synthétique de référence sont données dans le tableau 11. Une faible valeur de IC_{50} indique une plus grande activité de piégeage des radicaux libres. Selon ces valeurs IC_{50} , l'ordre des capacités de piégeage des radicaux DPPH des échantillons de *M. rotundifolia* est : l'extrait méthanolique > l'extrait aqueux > l'extrait éthanolique > l'huile essentielle > le composé majoritaire ($p < 0,05$). Le piégeage des radicaux libres le plus élevé est observé chez l'extrait méthanolique avec une CI_{50} de $36,4 \pm 1,1 \mu\text{g} / \text{mL}$.

Dans notre étude, la teneur en composés phénoliques totaux dans les échantillons variait entre 18,9 et 112,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Tableau 11). Benabdellah et *al.*, 2016 ont montré que la teneur en phénols totaux de l'extrait méthanolique de *M. rotundifolia* est de l'ordre de 15.10 mg/g , très inférieure à celle trouvée dans notre échantillon (112.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Les mêmes auteurs ont révélé que l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *M. rotundifolia* par DPPH est enregistrée par une valeur de IC_{50} de l'ordre de 31.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$, inférieure à la valeur de notre plante de l'ordre de 36.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Seladji et *al.* (2014) ont déterminé que la teneur en composés phénoliques totaux des extraits aqueux était supérieure à celle des extraits méthanoliques de *M. rotundifolia*, contrairement aux résultats de notre étude. Dans ce travail, une corrélation significative ($R = 0,953$, $p < 0,01$) est observée entre la teneur en composés phénoliques totaux et l'activité de piégeage de DPPH indiquant que les composés phénoliques étaient principalement responsables de cette activité. Nickavar et *al.* (2010) ont observé une corrélation positive entre les activités de DPPH et le contenu phénolique total des espèces de *Mentha*, y compris *M. rotundifolia*. Même observation a été relevé par Dorman et *al.* (2003).

Tableau 11 : Activité antioxydante des différents échantillons de *M. rotundifolia*¹

Matériel	Piégeage du radical DPPH IC ₅₀ (µg/mL)	Chélation des métaux IC ₅₀ (mg/mL)	Teneur en phénols totaux (µg GAE/mg extrait)
Huile essentielle	> 100	3.3 ± 0.4 ^c	18.9 ± 0.4 ^c
Extrait aqueux	45.3 ± 1.2 ^c	0.5 ± 0.1^a	85.9 ± 2.9 ^b
Extrait méthanolique	36.4 ± 1.1^b	4.2 ± 0.0 ^d	112.7 ± 3.6^a
Extrait éthanolique	60.5 ± 0.7 ^d	>5	65.3 ± 1.3 ^d
Composé isolé	> 100	1.3 ± 0.2 ^b	NE ²
BHT	23.3 ± 1.6 ^a	NE ²	NE ²
EDTA	NE ²	<0.5	NE ²

¹ Les valeurs représentent des moyennes ± écarts types pour les trois répétitions. Les valeurs dans la même colonne avec différents exposants sont significativement différentes (p <0,05), ² Non étudiés.

La forte corrélation entre les valeurs de concentration en phénols dans les extraits de plantes et l'activité antioxydante est bien documentée (Borneo et al., 2009; Waheed et al., 2014 ; Benabdellah et al., 2016). À cet égard, Luximun-Ramma et al. (2002) ont montré une corrélation linéaire entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique des extraits de plantes. En outre, il convient de tenir compte du fait que les capacités antioxydantes peuvent être attribuées à la structure chimique des composés, ainsi qu'à l'effet synergique ou antagoniste des composés présents dans l'extrait brut (Al-Owaisi et al., 2014). D'autre part, les coefficients de corrélation entre la teneur en phénols totaux et l'activité antioxydante de *M. rotundifolia* suggère que l'activité antioxydante est fortement corrélée à la teneur en tannins et polyphénols et faiblement corrélée aux flavonoïdes (Benabdellah et al., 2016). Les données de la littérature sur les activités antioxydantes des espèces de *Mentha* sont souvent difficiles à comparer en raison des différences dans les méthodologies (Moldovan et al., 2014).

La figure 36 montre les courbes dose-réponse des activités de piégeage du radical DPPH des extraits et de l'huile essentielle. Les capacités de piégeage des radicaux DPPH augmentent avec la concentration accrue des échantillons d'essai. L'extrait méthanolique présentait 66% d'activité de piégeage à la concentration de 50 µg/mL. Dans cette étude, les extraits de *M. rotundifolia* avaient une activité de piégeage inférieure à celle de l'antioxydant synthétique BHT. Seladji et al. (2014) ont rapporté que les activités de piégeage des radicaux des extraits aqueux et méthanoliques de *M. rotundifolia* étaient inférieures à celles des

témoins positifs (l'hydroxyanisole butylé (BHA) et l'acide ascorbique). Dans une autre étude (Moldovan et al., 2014), la plus forte activité de piégeage radicalaire des extraits chez *M. rotundifolia* est observée avec l'extrait éthanolique ($IC_{50} = 104.74 \pm 1.76 \mu\text{g/mL}$). Brahmi et al., (2015) ont rapporté que les extraits éthanoliques de *M. pulegium* sont plus riches que les extraits éthanoliques de *M. rotundifolia* par les composés phénoliques totaux mais plus faibles pour la teneur en flavonoïdes. Selon Benabdallah et al. (2016), les extraits méthanoliques des espèces de *Mentha* évalués ont montré des niveaux antioxydants considérables corrélés à la forte teneur en polyphénols.

Les extraits de *Mentha* sont largement connus pour agir en tant que piègeurs de radicaux libres *in vitro*. Les extraits éthanoliques de *M. rotundifolia*, ont été montrés pour éteindre les radicaux superoxyde (Brahmi et al., 2015). Le test du DPPH est appliqué pour mesurer les capacités antioxydantes des extraits de *Mentha* extraits par différents systèmes de solvants; ceux-ci comprennent l'extrait éthanolique de *M. rotundifolia* (Triantaphyllou et al., 2001, Nickavar et al., 2010); l'extrait méthanolique de *M. rotundifolia* (Benabdallah et al., 2016) et l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* (Ramdani et al., 2017). L'activité de piégeage du radical DPPH a également été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* (Riahi et al., 2013, Brahmi et al., 2016b).

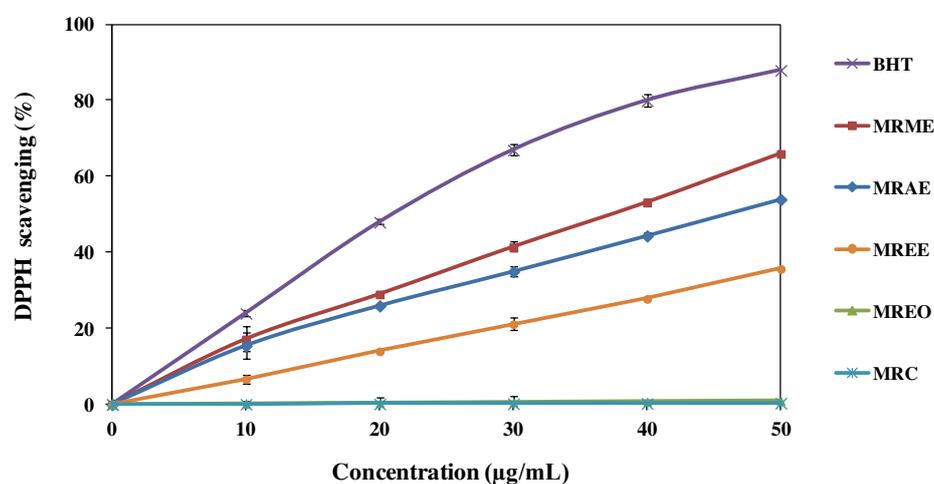


Figure 36 : Activité de piégeage du radical DPPH des échantillons de *M. rotundifolia* aux concentrations testées. MREO: huile essentielle de *M. rotundifolia*, MRAE: extrait aqueux de *M. rotundifolia*, MRME: extrait méthanolique de *M. rotundifolia*, MRC: composé isolé de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

L'activité chélatante (Figure 37) des extraits est déterminée par le dosage de la ferrozine. La ferrozine peut former quantitativement des complexes avec Fe^{2+} . En présence d'autres agents chélatants, la formation du complexe est perturbée, ce qui entraîne une diminution de la couleur rouge du complexe.

En présence d'autres agents chélatants, la formation du complexe est perturbée, ce qui fait disparaître progressivement la couleur rouge du complexe. La mesure de la vitesse de réduction de la couleur permet d'estimer l'activité chélatante du chélateur coexistant (Yamaguchi et al., 2000). Dans ce test, les extraits de *M. rotundifolia* et l'antioxydant standard ont interféré avec la formation du complexe ferrozine Fe^{2+} , suggérant qu'ils ont une activité chélatante et capturent les ions ferreux avant la ferrozine. Comme le montre le tableau 11, la formation du complexe ferrozine Fe^{2+} est rompue en présence d'extraits, ce qui indique que les extraits de *M. rotundifolia* chélatent le fer. L'activité chélatante des métaux de l'extrait aqueux de *M. rotundifolia* à 2 $\mu\text{g/mL}$ a montré une nette activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène. L'activité chélatante métallique des échantillons a diminué dans l'ordre suivant: EDTA>extrait aqueux>composé majoritaire>huile essentielle>extrait méthanolique>extrait éthanolique ($P < 0,05$). Il a été noté que les agents chélatants qui forment des liaisons avec un métal sont des antioxydants secondaires en raison de la réduction du potentiel redox. Le fer peut stimuler la peroxydation lipidique par la réaction de Fenton et peut également accélérer la peroxydation en décomposant les hydroperoxydes lipidiques en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent eux-mêmes extraire l'hydrogène et perpétuer la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique (Halliwell, 1991).

L'activité chélatante la plus élevée est observée dans l'extrait aqueux ($IC_{50} = 0.5 \pm 0.1 \text{ mg/mL}$) très intéressante en la comparant avec celle du témoin EDTA ($IC_{50} < 0.5 \text{ mg/mL}$). Cette capacité est peut être attribuée à sa richesse en phénols (85.9 $\mu\text{g/mg}$), en particulier, en scutellarine (30.39 mg/kg). Selon Nakagawa et al. (2004), les polyphénols peuvent agir comme chélateur d'ions en agissant directement avec les radicaux libres. Le composé isolé de l'huile essentielle présente une capacité de chélation ($IC_{50} = 1.3 \pm 0.2 \text{ mg/mL}$) supérieure que celle de l'huile essentielle ($IC_{50} = 3.3 \pm 0.4 \text{ mg/mL}$), dû probablement au composé majoritaire le 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3- (3-méthyl-2-butényl)-.

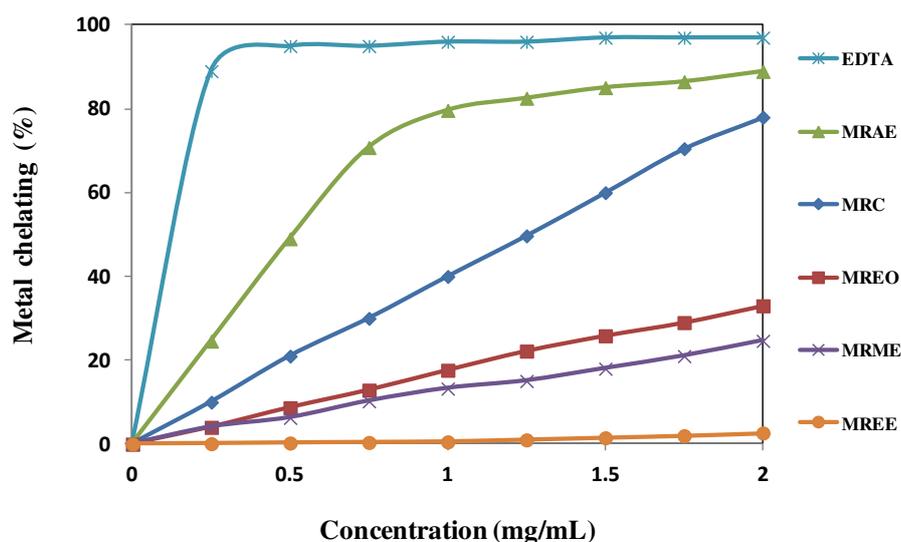


Figure 37 : Activité de chélation des métaux des échantillons de *M. rotundifolia* aux concentrations testées. MREO: huile essentielle de *M. rotundifolia*, MRAE: extrait aqueux de *M. rotundifolia*, MRME: extrait méthanolique de *M. rotundifolia*, MRC: composé isolé de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

La présente étude incorpore principalement la puissance de chélation des métaux des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. L'huile essentielle de *M. rotundifolia* examinée pour sa capacité antioxydante dans le test de chélation, a montré une activité antioxydante intéressante, qui est attribuée au composant 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butényl)-. Les ions de fer libres sont responsables de la génération de radicaux libres. Ainsi la chélation du fer peut être une propriété utile pour prévenir la formation de radicaux libres (Deep et al., 2017). Le chélateur EDTA est souvent utilisé à une concentration unique. Ce dernier est souvent trop élevé pour mettre en évidence toute relation dose-réponse linéaire. En effet, la réponse maximale est atteinte aux concentrations testées (Canabady-Rochelle et al., 2015).

Selon Gonçalves et al., (2009), la capacité à chélater les espèces de fer (II) dépend de la composition chimique de chaque variété de *Mentha*. Ils supposent que la capacité à chélater les espèces de fer (II) est liée au composé chimique principal présent dans chaque huile essentielle.

La chélation des ions métalliques est considérée comme une stratégie antioxydante très importante dans les plantes médicinales aromatiques (Dastmalchi et al., 2008), parce que ces métaux peuvent générer des EOAs *in vitro* et *in vivo* (Wong et al., 2006) et contribuer à

déclencher la peroxydation lipidique. En effet, il a été montré que les solvants polaires ont une grande capacité à chélater les ions métalliques (Nguyen et *al.*, 2001), ce qui est en accord avec nos résultats où l'extrait aqueux ($IC_{50} = 0,5 \pm 0,1$ mg/ mL) présente le plus fort pouvoir de chélation. De plus, comme attendu de leur composition, les extraits polaires des espèces de *Mentha* ont montré une meilleure activité que les huiles essentielles (Kamkar et *al.*, 2010).

4- Conclusion

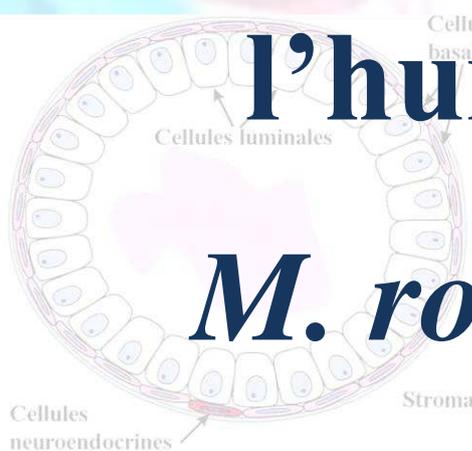
La composition chimique de l'huile essentielle hydrodistillée de *M. rotundifolia*, cultivée à Sétif (Algérie), est déterminée par GC et GC / MS. Quatorze composants ont été identifiés avec le 3-Cyclopenten-1-one, le 2-hydroxy-3- (3-méthyl-2-butényl) - (89,09%) comme composant principal. Par rapport aux huiles essentielles de *M. rotundifolia* qui poussent en Algérie et dans d'autres pays, la présence prédominante de ce composé rapporté ici, pour la première fois, n'a jamais été décrite, ce qui donne une certaine originalité à notre étude. L'analyse CLHP a montré que la scutéllarine est le principal composé phénolique de tous les extraits, ce qui pourrait être une source prometteuse d'antioxydants naturels. Cette étude a montré que les extraits, l'huile essentielle et le composé isolé de *M. rotundifolia* présentent des activités anti-oxydantes intéressantes. Ces résultats peuvent être exploités pour la purification des principes actifs et la préparation de formes améliorées de plantes médicinales efficaces comme *M. rotundifolia*. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour étudier les activités antioxydantes *in vivo* et pour identifier tous les composés actifs présents dans *M. rotundifolia* et leurs mécanismes d'action précis.

**VI- Activité
antiproliférative de
l'extrait aqueux et de**

**l'huile essentielle de
M. rotundifolia contre**

trois lignées cellulaires

HeLa PC3 et HT29



VI- Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre trois lignées cellulaires HeLa PC3 et HT29

1- Introduction

En Algérie, les registres du cancer reconnus par les instances internationales, confirment la progression de cette maladie: actuellement on comptabilise environ 45 000 nouveaux cas de cancer par an, avec 24 000 décès. Ce chiffre s'explique par le caractère particulièrement accéléré de la transition démographique et épidémiologique dans notre pays et d'un développement socio-économique très rapide traduisant une profonde mutation des modes de vie de nos concitoyens (Anonyme, 2014).

Le traitement du cancer a pour but de guérir, de prolonger la vie et d'améliorer la qualité de vie des patients. Il existe trois types de stratégies thérapeutiques anticancéreuses à savoir la stratégie chirurgicale, la stratégie radio thérapeutique et la stratégie médicale comprenant l'immunothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie (Kihindo, 2011). Par ailleurs, le traitement du cancer est onéreux, compliqué et difficile d'accès pour la population. La prise en charge des cancers requiert des combinaisons de plusieurs classes de médicaments anticancéreux (Chauvergne & Hoerni, 2001). Ceci expose le patient à la cumulation des effets indésirables (souvent graves) des différents médicaments associés. Environ 60% des médicaments actuellement utilisés pour le traitement du cancer ont été isolés à partir de produits naturels (Gordaliza, 2007); le taxol, la vincristine et la vinblastine isolés à partir de *Taxus sp* et *Catharanthus roseus* (Vanchaelen, 1992; Vanchaelen et *al.*, 1995).

Les plantes sont une source inestimable pour le développement de nouveaux médicaments, en particulier parce qu'il a déjà été déterminé que les plantes sont une excellente source de substances antitumorales cliniquement pertinentes (Melo et *al.*, 2011). Par conséquent, il y a un intérêt croissant d'étudier le potentiel thérapeutique des herbes médicinales (Pan et *al.*, 2010). Les huiles essentielles qui sont capables de piéger les radicaux libres peuvent jouer un rôle important dans la prévention de certaines maladies telles que le dysfonctionnement cérébral, le cancer, les maladies cardiaques et le déclin du système immunitaire (Kamatou & Viljoen, 2010). Certains polyphénols dont principalement les flavonoïdes présentent un pouvoir antioxydant très marqué, ils inhiberaient fortement la prolifération et la migration des cellules tumorales et peuvent représenter de nouvelles molécules anticancéreuses (Bruneton, 2009).

Mentha rotundifolia une lamiacée très répandue dans la région de Sétif, est très riche en huile essentielle, en flavonoïdes et en acides phénoliques. Elle a fait l'objet de plusieurs recherches sur la composition phytochimique et activités biologiques. Toutefois, l'activité antiproliférative de *M. rotundifolia* a été représentée par de très peu travaux. Un fait important est que *Mentha rotundifolia* pourrait être une source possible d'agents thérapeutiques contre le cancer (Manosroi et al., 2006). De plus, l'huile de *Mentha* et ses composants sont connus pour leurs propriétés anti-cancéreuses (Bakkali et al., 2008; Kapp, 2015), ce qui les rend dignes d'être explorés.

Par conséquent, l'objectif de cette étude est d'évaluer *in vitro* les propriétés antiprolifératives de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* contre trois lignées cellulaires à savoir HeLa, PC3 et HT29.

2- Matériel et Méthodes

2.1- Bioessais

Des kits ELISA de prolifération cellulaire, BrdU (colorimétriques) ont été obtenus auprès de Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Allemagne). Le médicament anti-tumoral 5-fluorouracil a été fourni par Sigma. D'autres produits chimiques antiprolifératifs utilisés étaient de qualité analytique et obtenus auprès de Sigma-Aldrich, Merck et Roche.

2.2- Préparation de la solution mère

La solution mère d'échantillons et le 5-FU sont préparés dans du DMSO et dilués avec du Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) et du RPMI-1640. La concentration finale de DMSO est inférieure à 1% dans tous les tests.

2.3- Lignées et culture cellulaire

Les lignées cellulaires HeLa et HT29 sont mises en culture dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et la lignée cellulaire PC3 mise en culture dans un milieu RPMI-1640 supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin (FBS), 2% de Pénicilline Streptomycine. Les cultures sont ensuite maintenues à 37°C dans un incubateur à 5 % de CO₂ et à saturation en vapeur d'eau et le milieu est changé tous les 2 jours.

2.4- Test de prolifération cellulaire

Les effets antiprolifératifs de l'extrait et de l'huile ont été étudiés sur les lignées HeLa, HT29 et PC3 en utilisant le test de prolifération BrdU ELISA (Ceyhan *et al.*, 2013 ; Demirtas *et al.*, 2013 ; Karakus *et al.*, 2013 ; Mert *et al.*, 2013 ; Sahin Yaglioglu *et al.*, 2013). Le 5-fluorouracile (5-FU) a été utilisé comme témoin positif.

Les cellules cultivées sont cultivées dans des microplaques de 96 puits (COSTAR, Corning, USA) à une densité de 3×10^4 cellules/puits. Dans chaque ensemble expérimental, les cellules sont étalées en triple et répliquées deux fois.

Les lignées cellulaires sont exposées à quatre concentrations d'échantillons et de 5-FU pendant 24 h à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée de 5% de CO₂. Les cellules sont incubées pendant une nuit avant d'appliquer le réactif de dosage ELISA BrdU Cell Prolifération (Roche, Allemagne) selon la procédure du fabricant.

La quantité de prolifération cellulaire est évaluée en déterminant le A₄₅₀ nm du milieu de culture après addition de la solution de substrat en utilisant un lecteur de microplaque (Awareness Chromate, USA).

Les résultats sont rapportés en pourcentage de l'inhibition de la prolifération cellulaire, où la densité optique mesurée à partir des cellules traitées par le témoin est considérée comme étant égale à 100% de la prolifération. Tous les essais sont répétés au moins deux fois en utilisant les cellules HeLa, PC3 et HT29.

Le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire est calculé comme suit:

$$(1 - A_{\text{échantillon}} / A_{\text{contrôle}}) \times 100$$

dont : A_{échantillon} : absorbance de l'échantillon, A_{contrôle} : absorbance du témoin.

2.5- Détermination de CI₅₀ et CI₇₅

La concentration qui inhibe la croissance de 50% des cellules (CI₅₀) est une mesure de l'efficacité d'un composé dans l'inhibition de la fonction biologique. Dans cette étude, les valeurs CI₅₀ et CI₇₅ ont été déterminées en utilisant ED₅₀ plus v1.0.

2.6- Analyses statistiques

Les résultats de l'investigation *in vitro* sont des moyennes \pm écart-type. Les différences entre les groupes ont été testées par ANOVA. Les valeurs de $p < 0,01$ sont considérées comme significatives.

3- Résultats et Discussion

L'activité antiproliférative des échantillons a été déterminée contre les cellules HeLa (carcinome de l'utérus humain), HT29 (lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain) et PC3 (lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine) en utilisant le test ELISA de prolifération cellulaire BrdU (Ceyhan et al., 2013 ; Demirtas et al., 2013 ; Karakus et al., 2013 ; Mert et al., 2013 ; Sahin Yaglioglu et al., 2013). Le 5-FU est utilisé comme témoin positif. Les activités des échantillons et standard ont été étudiées sur quatre concentrations (25, 50 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$). Les valeurs CI_{50} et CI_{75} des échantillons contre HeLa, HT29 et PC3 sont données dans le tableau 12.

Tableau 12 : Les valeurs de CI_{50} et CI_{75} de l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis des lignées cellulaires HeLa, HT29 et PC3

	HT29		HeLa		PC3	
	CI_{50}	CI_{75}	CI_{50}	CI_{75}	CI_{50}	CI_{75}
Extrait aqueux	>250	>250	205.43	>250	< 100	220.20
Huile essentielle	< 25	>250	< 25	>250	< 25	< 25

Il ressort du Tableau 12 l'effet antiprolifératif de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est important vis-à-vis des trois lignées cellulaires HeLa, HT29 et PC3 avec une $\text{CI}_{50} < 25$ $\mu\text{g/mL}$.

Selon les critères du NCI (National Cancer Institute), pour un extrait, une valeur de CI_{50} comprise entre 50 et 100 $\mu\text{g/mL}$ est considérée comme faiblement active, et modérément active s'il elle est comprise entre 10 et 49 $\mu\text{g/mL}$ (Boyd, 1997).

Ce résultat montre que l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a une activité antiproliférative intéressante. En effet, selon les normes posés par l'American National Cancer Institute (ANCI) qui estime qu'un extrait ayant démontré une activité inhibitrice de

croissance (CI_{50}) inférieure à 30 $\mu\text{g/mL}$ lors d'essais préliminaires de cytotoxicité peut être considérée comme une source potentielle de molécules cytotoxiques (Jhokadze et *al.*, 2007).

3.1- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HeLa par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Pour déterminer le pourcentage d'inhibition de la prolifération cellulaire nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle sur la prolifération de la lignée cancéreuse HeLa. La figure 38 présente les pourcentages d'inhibition de la prolifération des cellules HeLa.

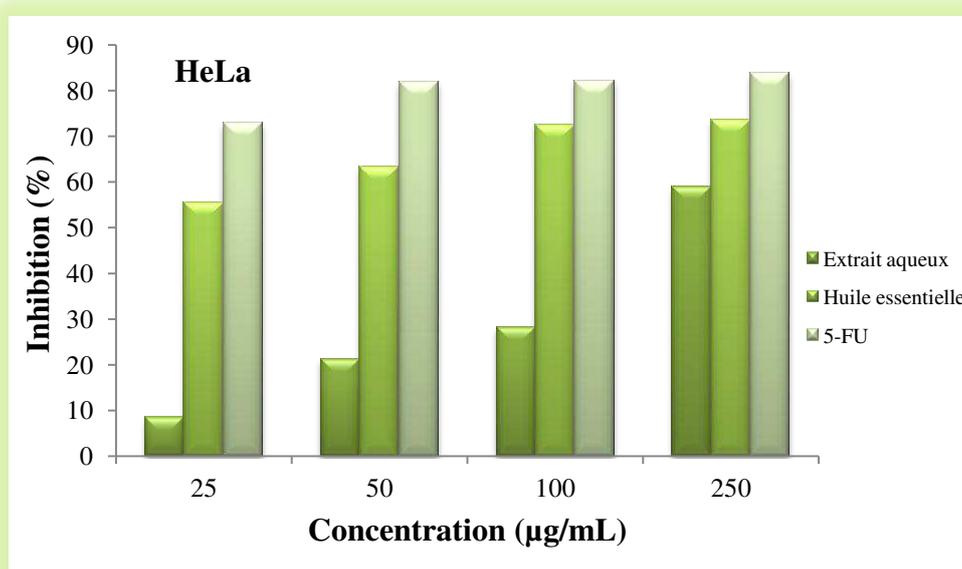


Figure 38: Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse HeLa

L'activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* montre qu'avec toutes les concentrations (25, 50, 100 et 250 $\mu\text{g/mL}$), l'extrait aqueux et l'huile essentielle présentent des pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse HeLa inférieurs à celui du témoin. L'effet antiprolifératif de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est meilleur par rapport à celui de l'extrait aqueux avec toutes les concentrations.

3.2- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée PC3 par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

Nous avons déterminé l'effet de différentes concentrations de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la prolifération de la lignée cancéreuse PC3. Les pourcentages d'inhibition de la prolifération de ces cellules cancéreuses sont présentés dans la figure 39.

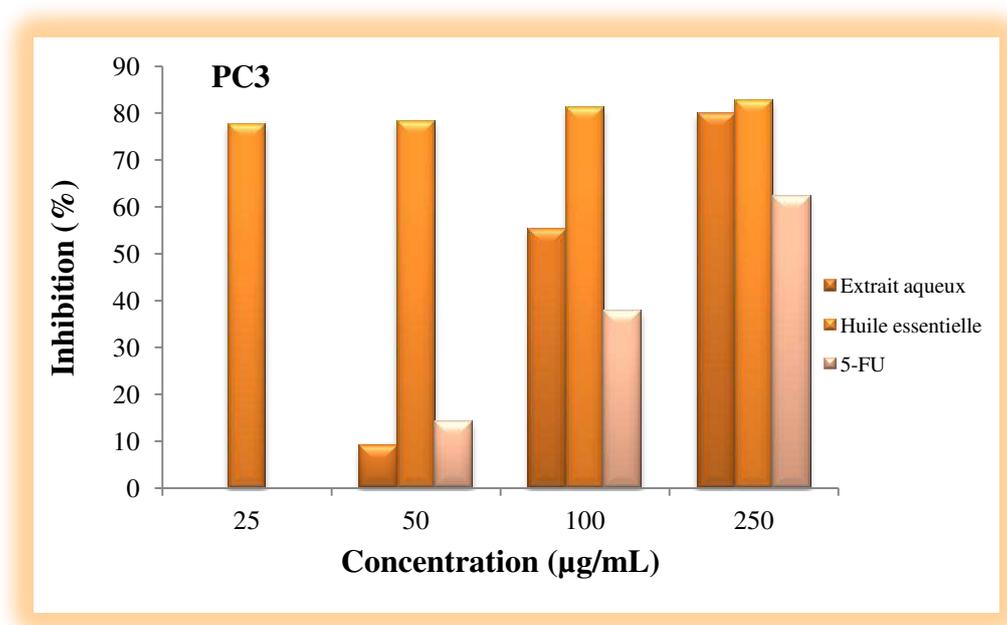


Figure 39 : Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse PC3

Cette étude montre qu'avec toutes les concentrations, l'huile essentielle de *M. rotundifolia* présente des pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse PC3 meilleurs que ceux du témoin. L'extrait aqueux, quant à lui, à la concentration 100µg/mL et 250µg/mL a présenté des pourcentages d'inhibition (55.10 et 79.90%, respectivement) de la prolifération de la lignée cancéreuse PC3 meilleurs que ceux du témoin (37.79 et 62.24%, respectivement). À la concentration finale de 250µg/mL, l'extrait aqueux (79.90%) et l'huile essentielle (82.69%) de *M. rotundifolia* présentent des pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse PC3 supérieurs à celui du témoin (62.24%).

3.3- Inhibition de la prolifération cellulaire de la lignée HT29 par l'extrait aqueux et l'huile essentielle de *M. rotundifolia*

L'effet de différentes concentrations de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été déterminé sur la lignée cancéreuse colorectale humaine HT29. Les pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse HT29 sont présentés dans la figure 40.

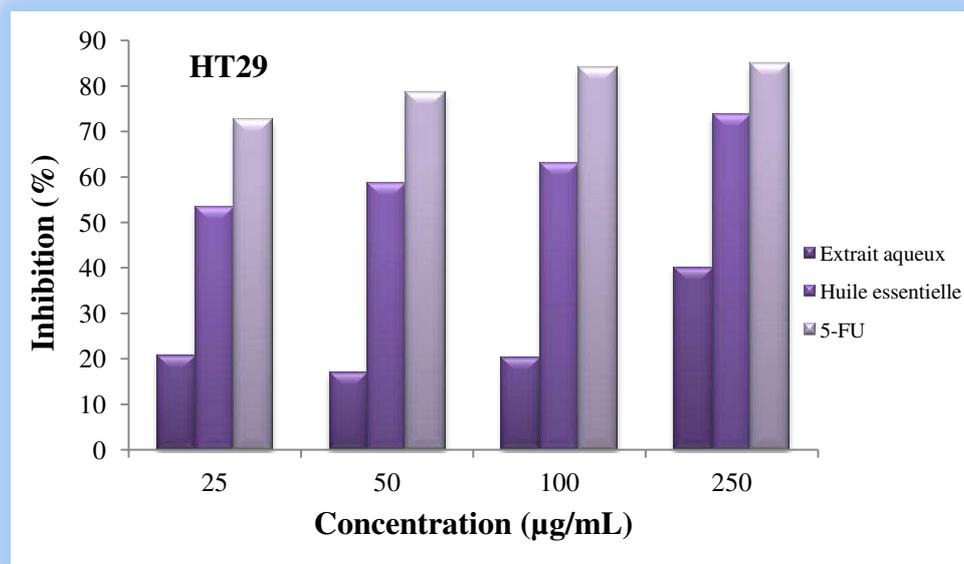


Figure 40 : Activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse HT29

Il en ressort qu'avec toutes les concentrations, l'extrait aqueux et l'huile essentielle présentent des pourcentages d'inhibition de la prolifération de la lignée cancéreuse HT29 inférieurs à celui du témoin. L'effet antiprolifératif de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* est meilleur par rapport à celui de l'extrait aqueux avec toutes les concentrations.

A notre connaissance, jusqu'à ce jour, aucune étude n'avait encore été réalisée sur l'activité antiproliférative des huiles essentielles des espèces de *Mentha* de Sétif sur les trois lignées cancéreuses étudiées. En effet, il s'agit là de première étude sur l'activité antiproliférative de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*.

L'effet antiprolifératif présenté par l'huile essentielle de *M. rotundifolia* peut être lié à sa richesse en 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- (89,09%) décelé lors de la GC/MS ou à ses composés minoritaires. L'interaction des différentes molécules

existantes dans un extrait peut influencer sur leur activité soit d'une façon synergétique soit d'une façon antagoniste (Aneb, 2017).

Selon Bayala (2014) les huiles essentielles ayant présenté des effets antiprolifératifs sont pour la plupart riches en composés terpéniques oxygénés. En effet, des études ont démontré l'activité antiproliférative et anticancéreuse des terpènes (Gould, 1997). Certains monoterpènes ont suscité un grand intérêt en raison de leurs propriétés chimiopréventives et chimiothérapeutiques (Holstein & Hohl, 2003). L'huile essentielle de *M. rotundifolia* principalement dont la IC₅₀ est inférieure à 25µg/mL sur les trois lignées cellulaires cancéreuses est donc d'une très bonne activité antiproliférative. Les sesquiterpènes et leurs dérivés constituent une classe de composés naturels très prometteuse dans la recherche de nouveaux agents anticancéreux (Piochon, 2008). De nombreux sesquiterpènes ont, en effet, démontré un potentiel comme agents thérapeutiques (Modzelewska et al., 2005) dans le traitement du cancer.

Les variations observées au niveau de l'efficacité de l'extrait et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* pourraient être attribuées à la constitution génétique des différentes lignées cellulaires utilisées. Sur la lignée cancéreuse PC3 l'huile essentielle a montré une activité antiproliférative très intéressante avec toutes les concentrations meilleure que le témoin. La cytotoxicité de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, semble être sélective vue la variabilité de ses effets antiprolifératifs sur les différentes lignées des différents types de cancer.

4- Conclusion

La synthèse des résultats de l'activité antiproliférative de l'extrait aqueux et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* sur la lignée cancéreuse HeLa (carcinome de l'utérus humain), HT29 (lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain) et PC3 (lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine), montre que l'huile essentielle présente le meilleur taux d'inhibition de la prolifération des trois lignées cancéreuses. En terme de CI₅₀, cette huile a une CI₅₀ inférieure à 25µg/mL sur les trois lignées cellulaires cancéreuses donc elle est d'une très bonne activité antiproliférative. Cette huile est majoritairement composée de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- (89,09%) décelé lors de la GC/MS. Une investigation phytochimique plus approfondie doit se poursuivre pour la séparation, la purification et l'identification de molécules antiprolifératives responsables de cette activité. Bien qu'il soit important d'évaluer la capacité antiproliférative de cette huile envers les lignées cellulaires tumorales, il est également pertinent de tester la même huile contre les cellules

normales, comme on le sait, la plupart des agents anticancéreux ne font pas la différence entre le cancer et les cellules normales, ce qui pourrait entraîner une toxicité systémique et des effets indésirables. À cet égard, d'autres recherches sont nécessaires pour déterminer la bonne concentration qui réduit l'activité de prolifération des cellules tumorales et cause le plus petit dommage aux cellules normales. Cette huile recèle de composé majoritaire dont la phytochimie et le potentiel pharmacologique n'ont encore jamais été étudiés ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.



Conclusion générale



Conclusion générale

Le screening phytochimique des extraits de *M. rotundifolia* a montré une richesse importante en métabolites secondaires prouvés d'avoir des propriétés biocides intéressantes. La séparation du composé majoritaire de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a été faite par colonne chromatographique en utilisant un gradient de solvants. L'analyse de l'huile essentielle par GC/MS a révélée l'existence de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- comme composé majoritaire avec un pourcentage de 89.09%, composé qui n'a jamais été trouvé dans l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. L'étude phytochimique des extraits et de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* a révélé l'existence de composés ayant un vaste champ d'activité biologique.

L'utilisation de l'huile essentielle et du 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- de *M. rotundifolia* par contact ou par inhalation comme bioinsecticides, peut également être efficace, sélective, biodégradable, à faible développement de résistance dans la population de *S. granarius*, charançon du blé.

L'huile essentielle de *M. rotundifolia* a montré une activité biocide intéressante sur *R. padi* et *S. avenae* pucerons des céréales. Cette huile a montré aussi un effet répulsif à l'égard des adultes de *R. padi* et *S. avenae* et appartient selon le classement de McDonald et al. (1970) à la classe répulsive V avec un taux de répulsion moyen de 85 % pour *R. padi* et à la classe IV avec un taux de répulsion moyen de 71,90% pour *S. avenae*. En raison de son activité insecticide et répulsive, cette huile essentielle pourrait être utilisée en guise de solution alternative dans les systèmes intégrés de lutte biologique contre les pucerons de céréales.

L'effet antifongique très intéressant de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* par rapport à l'effet des extraits éthanolique et méthanolique indique le potentiel de cette espèce végétale comme source de matière fongicide naturelle. La présente étude a révélé que cette menthe présente un effet antifongique contre *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*, ce qui offre une base scientifique pour l'utilisation de cette espèce comme une bonne source de composés antifongiques.

Les extraits, l'huile essentielle et le composé isolé de *M. rotundifolia* présentent des activités anti-oxydantes intéressantes. Le piégeage des radicaux libres le plus élevé est observé chez l'extrait méthanolique avec une forte corrélation entre les valeurs de

concentration en phénols dans l'extrait et l'activité antioxydante. L'activité chélatante métallique des échantillons est bien marquée par l'extrait aqueux et le composé isolé de l'huile essentielle.

L'huile essentielle présente le meilleur taux d'inhibition de la prolifération des trois lignées cancéreuses à savoir HeLa (carcinome de l'utérus humain), HT29 (lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain) et PC3 (lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine).

Pour conclure, ces résultats peuvent être exploités pour la purification des principes actifs et la préparation de formes améliorées de *M. rotundifolia*. Une identification et une caractérisation plus poussées de la (des) molécule (s) active (s) des extraits ou de l'huile essentielle de *M. rotundifolia*, sont nécessaires pour formuler un biocide potentiel contre les différents agents phytopathogènes. Ce travail préliminaire pourrait constituer une base pour la détermination des concentrations suffisantes et efficaces pour les études *in planta*, en vue de la lutte biologique par des substances actives naturelles de *M. rotundifolia* contre les agents phytopathogènes de *A. alternata* et *F. oxysporum*. Ainsi, d'autres études sont nécessaires pour étudier les activités antioxydantes *in vivo* et pour identifier tous les composés actifs présents dans *M. rotundifolia* et leurs mécanismes d'action précis. Par rapport aux huiles essentielles de *M. rotundifolia* qui poussent en Algérie et dans d'autres pays, la présence prédominante de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)- dont la phytochimie et le potentiel pharmacologique n'ont encore jamais été étudiés ce qui ouvre d'intéressantes perspectives de recherche pour les années à venir.

Au terme de ce travail nous pouvons conclure que l'espèce de *M. rotundifolia* étudiée a une activité insecticide, fongicide, antioxydante et antiproliférative très intéressante. Ceci nous mène à dire que la plante étudiée est prometteuse comme source de biocide et se prête bien à des investigations dans le domaine de la protection des végétaux.

Références bibliographiques

1. Abay G., Karakoç Ö.C., Tüfekçi A.R., Koldas S., Demirtas I., 2012. Insecticidal activity of *Hypnum cupressiforme* (Bryophyta) against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* : 51, 6-10.
2. Abay G., Altun M. , Karakoç Ö.C., Gül F. and Demirtas I., 2013. Insecticidal Activity of Fatty Acid-Rich Turkish Bryophyte Extracts Against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae), *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16, 806-816.
3. Abbott W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18, 265–267.
4. Abd El-Ghany N.M., Abd El-Aziz S.E., 2017. External Morphology of Antennae and Mouthpart Sensillae of the Granary Weevil (Coleoptera: Curculionidae). *J. Entomol. Sci.* 52(1): 29–38.
5. Abedini A., 2013. Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae), sélectionnée par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université Lille nord de France, Spécialité : Pharmacognosie, 201 p.
6. Adjou ES, Dahouenon, Ahoussi E, Soumanou MM., 2013. Investigations on the mycoflora and processing effects on the nutritional quality of peanut (*Arachis hypogaea* L. var. TS 32-1). *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2(3):1025-1039.
7. Adorjan B. & Buchbauer G., 2010. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr. J.*, 25, 407–426.
8. Agboyi L.K., Ketoh G.K., Martin T., Glitho I.A., Tamo M., 2016. Pesticide resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations from Togo and Benin. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 36(4), 204-210.
9. Aghfir, M., M. Kouhila, A. Jamali et L. Ait Mohamed. 2007. Séchage solaire convectif pour la conservation des feuilles du romarin (*Rosmarinus officinalis*). 13^{èmes} journées internationales de séchage thermique. Albi, France 28-30.
10. Ahon M.G., Akapo-Akue J.M., Kra M.A., Ackah J.B., Zirihi N.G., Djaman J.A., 2011. Antifungal activity of the aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Terminalia superba* Engl. *in vitro* on the growth of clinical isolates of pathogenic fungi. *Agric. Biol. J.N.Am.*, 2(2): 250-257.
11. Aihetasham A., Umer M., Akhtar M.S., Imran Din M., Rasib K.Z., 2015. Bioactivity of medicinal plants *Mentha arvensis* and *Peganum harmala* extracts against *Heterotermes*

- indicola* (Wasmann) (Isoptera). *International Journal of Biosciences* Vol. 7, No. 5, p. 116-126.
12. Akhtar N, Ashfaque M, Waseem, Gillani WA, Ata-ul-Mohsin, Tashfeen A, Begum I. 2010. Antibiosis resistance in national uniform wheat yield trials against *Rhopalosiphum padi* (L.). *Pakistan Journal of Agricultural Research* 23 (1-2), 59-63.
 13. Alexopoulos CJ, Mims CW., 1979. *Introductory Mycology* (3rd ed). John Wiley & Sons: New York.
 14. Al-Owaisi M, Al-Hadiwi N, Khan SA., 2014. GC-MS analysis, determination of total phenolics, flavonoid content and free radical scavenging activities of various crude extracts of *Moringa peregrine* (Forssk.) Fiori leaves. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(12): 964-70.
 15. Ameziane N., Boubaker H., Boudyach H., Msanda F., Jilal A., Ait Benaoumar A., 2007. Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. *Agro. Sustain. Dev.* 27 : 273-277.
 16. Aneb M., 2017. Caractérisation phytochimique et propriétés antiproliférative, antibactérienne et antiparasitaire de seize plantes médicinales. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V Rabat. Spécialité : Biochimie – Ethnopharmacologie, 114 p.
 17. Anjarwalla P., Belmain S., Ofori D.A., Sola P., Jamnadass R., Stevenson P.C., 2016. Handbook on pesticidal plants. Nairobi: World Agroforestry Centre (ICRAF). 63 p.
 18. Ankila O., 2007. Techniques de séchage des plantes développées par le PSE/Maroc à Marrakech. In Actes du colloque « Plantes aromatiques et médicinales et leurs huiles essentielles ». Eds. Benjillali B., Ettalibi M., Ismaili-Alaoui M. M., et Zrira S., 127-134. antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *Food Chemistry*, 80: 275 -282.
 19. Anonyme, 2012. Epidémiologie des Cancers. Présenté par Dr. Agag F. Etablissement Hospitalier Universitaire d'Oran. Service d'Epidémiologie et de Médecine Préventive.
 20. Anonyme, 2014. Plan National Cancer (2015/2019). Nouvelle vision stratégique centre sur le malade.
 21. Anonyme, 2016. Epidémiologie des cancers digestifs en Algérie. Leçons à tirer en vue des priorités de santé publique. Présenté par Abid L. Hopital Bologhine, Alger.
 22. Arab R., Bounechada M., Ramdani M., 2016. Chemical composition and insecticidal activity of *Mentha rotundifolia* L. on *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) from Algeria. *Advences in Environnemental Biology*, 10 (10) : 13-19.
 23. Arbogast R.T., 1991. Beetles: Coleoptera. Pgs. 131-176. In: J.R. Gorham (Ed). *Ecology and Management of Food-Industry Pests*. FDA Technical Bulletin 4. VA: Association of Analytical Chemists.
 24. Aslan I., Kılıç T., Goren A.C., Topçu G., 2006. Toxicity of acetone extract of *Sideritis trojana* and 7-epicandiciol, 7-epicandiciol diacetate and 18-acetylsideroxol

- against stored pests *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitophilus granarius* (L.) and *Ephestia kuehniella* (Zell.). *Industrial Crops and Products* 23 : 171–176.
25. Aslan I., Ozbek H., Kordali S., Calmasur O, Çakir A., 2004. Toxicity of essential oil vapours obtained from *Pistacia* spp. to the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera : Curculionidae). *Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz- Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 400-407.
 26. Ayaidia B., 2011. Etude comparative de trois variétés d'huiles essentielles de menthe dans la région de Ouargla. Mémoire de Master en Génie des Procédés. Université Kasdi Marbah Ouargla. Option: Génie chimique, 77 p.
 27. Aydin T., Bayrak N., Baran E. and Cakir A., 2017. Insecticidal effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) L. cones and its principal component, xanthohumol. *Bulletin of Entomological Research*, Page 1 of 7.
 28. Aydin T., Cakir A., Kazaz C., Bayrak N., Bayir Y. & Taskesenligil Y., 2014. Insecticidal metabolites from the rhizomes of *Veratrum album* against adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Chemistry & Biodiversity* 11, 1192–1204.
 29. Aziz E. E.; Abbass M. H., 2010. Chemical composition and efficiency of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*. 8 (4): 411-419.
 30. Azzouzi D., 2017. Investigation phytochimique et recherche d'activité biologique de deux espèces du genre *Centaurea* (Asteraceae). Thèse de Doctorat LMD. Université Frères Mentouri Constantine 1. Département de Chimie, 207 p.
 31. Badiaga M., 2011. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de Doctorat. Université de Bamako. Faculté des Sciences et Techniques, 137 p.
 32. Bajwa R., Shafique S., Anjum T., Shafique S., 2004. Antifungal Activity of Allelopathic Plant Extracts IV: Growth Response of *Drechslera hawaiiensis*, *Alternaria alternata* and *Fusarium moniliforme* to Aqueous Extract of *Parthenium hysterophorus*. *International Journal of Agriculture & Biology* 6:511-516.
 33. Bakkali F., Averbeck D., Idaomar M.M., 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 46: 446–475.
 34. Baptista F J., Bailey B J. et Meneses JF., 2012. Effect of nocturnal ventilation on the occurrence of *Botrytis cinerea* in Mediterranean unheated tomato greenhouses. *Crop Protection*. 32 : 144-149.
 35. Basu S., Tindall D.J., 2010. Androgen Action in Prostate Cancer. *Horm. Cancer* 1, 223–228.

36. Bayala B., 2014. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Thèse de Doctorat en Physiologie et Génétique Moléculaire. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie et Environnement. Université Blaise Pascal. 140 p.
37. Beauquesne B., Pinkas M., Torik M., Tortin F., 1980. Plantes médicinales des régions tempérées, éd. Maloine.
38. Bedini S., Flamini G., Girardi J., Cosci F. & Conti B., 2015. Not just for beer: evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. *Journal of Pest Science* 88, 583–592.
39. Beecher G.R., 2003. Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake. *Journal of Nutrition*, 133(10): p. 3248-3254.
40. Begum M., Lokesh S., & Raghavendra V. B., 2009. Role of leaf extracts of some medicinal plants in the management of seed-borne fungal diseases of Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*; 42(10): 950–955.
41. Ben Mansour A, Porter EA, Kite GC, Simmonds MS, Abdelhedi R, Bouaziz M., 2015. Phenolic profile characterization of Chemlali olive stones by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 63(7): 1990-5.
42. Benabdallah A., Rahmoune C., Boumendjel M., Aissi O., Messaoud C., 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6 (9): 760–766.
43. Benayad N., 2008. Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines: moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Projet de recherche. Rapport d'activité. Faculté des Sciences-Rabat, Maroc.
44. Ben-Bnina E., Hammami S., Daamii-remadi M., Ben-Jannet H., Mighri Z., 2010. Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian *Ruta chalepensis* L. essential oils. *J. Soc. Chim. Tunisie* 12, 1–9.
45. Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M. , Benyoucef M., Desjobert J. M., Bernardini A. F., Costa J., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum*, Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: comparison with HD. *Food Chemistry* 106(1), 132–139.
46. Bendaoud H, Bouajila J, Rhouma A, Savagnac A and Romdhane M., 2009. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. *J Sci Food Agric* 89:1292–1297.
47. Benedec D., Vlase L., Oniga I., Mot A. C., Silaghi-Dumitrescu R., Hanganu D., Tiperciuc B. & Crisan G., 2013. LC-MS analysis and antioxidant activity of phenolic compounds from two indigenous species of *Mentha*. Note I. *Farmacia*, 61(2): 262-267.

48. Benelli G., Flamini G., Canale A., Molfetta I., Cioni p.L., Conti B., 2012. Repellence of *Hyptis suaveolens* whole essential oil and major constituents against adults of the granary weevil *Sitophilus granarius*. *Bulletin of Insectology* 65 (2): 177-183.
49. Bennani H., 2007. Quel impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate? *Technol Lab* 6, 8-10.
50. Benzahi K., 2001. Contribution à l'étude des flavonoides dans la Plante *Cynodon dactylon* L, Mémoires de Magister. Université de Ouargla.
51. Bhat S., Maseshwari P., Kumar S., Kumar A.; 2002. Mentha Species: *In vitro* Regeneration And Genetic Transformation. *Mol. Biol. Today*, 3 : 11-23.
52. Bhat S.V., Nagasampigi B.A. et Sivakumar M., 2005. Chemistry of Natural Products; Ed 1: Narosa, Springer; p: 115-252.
53. Biswas N. N., Saha S. & Ali M. K., 2014. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 4(10): 792-797.
54. Bitar D., Lortholary O., Dromer F., Coignard B. & Che D., 2013. Mycoses invasives et France Métropolitaine, PMSI, incidence, létalité et tendances 2001-2010. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 109 -114.
55. Blackman R.L. & Eastop V.F., 2007. Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. Wiley, Chichester, 717 pp.
56. Blackman R.L., Eastop V.F., 2000. Aphids on the world's crop: an identification and information guide. Wiley, Chichester, p 466.
57. Blancard D., 2013. <http://ephytia.inra.fr> Consulté le 12 mai 2018.
58. Blancard D., Laterrot H., Marchoux G., Candresse T., 2012. A colour Handbook- Tomato Diseases : Identification, biology and control. Manson publishing Ltd. p 688.
59. Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
60. Bohlmann J. & Keeling C. I., 2008. "Terpenoid biomaterials." *Plant J.* 54: 656-669.
61. Boiron P., 1996. Organisation et Biologie des Champignons. Collection et éditions Nathan, 128p.
62. Bokobana E.M., Koba K., Poutouli W.P., Akantetou P.K., Nadio N.A., Laba B., Tozoou P., Raynaud C., Sanda K., 2014. Evaluation du potentiel insecticide et répulsif de l'huile essentielle de *Cymbopogon schoenanthus* (L.) Spreng. Sur *Aphis gossypii* Glover (Homoptera : Aphididae), ravageur du cotonnier au Togo. *Rev. Cames*. Vol 02. Num 02, 48-55.

63. Borneo R, Leon EA, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ., 2009. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Cordoba (Argentina) and their *in vitro* testing in model food system. *Food Chem* 112: 664-70.
64. Botton B; Breton A; Févre M. Gauthier S; Guy Ph; Larpent J-P; Reymond P; Sanglier J-J; Vayssier Y. and Veau R., 1990. Moisissures Utiles Et Nuisibles : Importance Industrielle. 2^{ème} Edition Masson, Paris. 442 p.
65. Bounechada M., Fenni M., Benia F., 2011. Survey of Insects Pest Stored and Biological Control of *Trogoderma Granarium* Everts in Setifian Region (North-East of Algeria). *Bulletin UASVM Agriculture*, 68(1), 70-74.
66. Bounihi A., 2016. Criblage phytochimique, Étude Toxicologique et Valorisation Pharmacologique de *Melissa officinalis* et de *Mentha rotundifolia* (Lamiacées). Thèse de Doctorat. Université Mohammed V. Faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat, 199 p.
67. Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine M., Chaouch A., Satrani B., 2009. Effet de séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. *Agro Solutions* Vol. 20 N° 1 ; 44-48.
68. Boussouf L., Boutennoune H., Kebieche M., Adjeroud N., Al-Qaoud K., Madani K., 2017. Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant effects of phenoli compound from Algerian *Mentha rotundifolia* L. leaves on experimental animals. *South African Journal of Botany* 113 (2017) 77–83.
69. Bowes K.M., Zheljzkov V.D., 2004. Factors affecting yields and essential oil quality of *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum basilicum* L. cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 129(6), 789-794.
70. Boyd M. R., 1997. Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. Anticancer Drug Development Guide. Teicher, B. A., Ed.; *Humana Press. Totowa, NJ*, pp. 23-42.
71. Boyle Pet Ferlay J., 2005. Cancer incidence and mortality in Europe 2004. *Ann Oncol*, 16: 481-488.
72. Brada M., Bezzina M., Marlier M., Lognay G.C., 2006. Chemical Composition of the Leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *Journal of Essential Oil Research*. 18: 663-665.
73. Brada M., Bezzina M., Marlier M., Carlier A., Lognay G., 2007. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *J. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11, 3–7.
74. Bradesi P., Bighelli A., Tomi F., Casanova J., 1996. L'analyse des mélanges complexes par RMN du carbone-13 – Partie 1., *Can. J. Appl. Spectrosc.*, 41(1), 15-24.
75. Brahmi, F., Madani, K., Stévigny, C., Chibane, M., Duez, P., 2014. Algerian mintspecies: HPTLC quantitative determination of rosmarinic acid and in

- vitroinhibitory effects on linoleic acid peroxidation. *J. Coast. Life Med.* 2 (12), 986–992.
76. Brahmi F., Hauchard D., Guendouze N., Madani K., Kiendrebeogo M., Kamagaju L., Stévigny C., Chibane M., Duez P., 2015. Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, Elsevier, 74, pp.722-730.
 77. Brahmi F., Madani K., Djerrada N., Idir S., Harfi F., Chibane M., Brada M., 2016 (a). Assessment of the chemical composition and *in vitro* antioxidant activity of *Mentha rotundifolia* (L.) Huds essential oil from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 19 (5): 1251–1260, DOI: 10.1080/0972060X.2015.1108878.
 78. Brahmi F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Porcedda S., Piras A., Falconieri, D., Yalaoui-Guellal, D., Elsebai M.F., Madani, K., Chibane, M., 2016 (b). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*. 88: 96-105.
 79. Brahmi F., Dahmoune F., Kadri N., Chibane M., Dairi S., Remini H., Oukmanou-Bensidhoum S., Mouni L., Madani K., 2017 (a). Antioxidant capacity and phenolic content of two Algerian *Mentha* species *M. rotundifolia* (L.) Huds, *M. pulegium* L., extracted with different solvents. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 1-9.
 80. Brahmi F., Khodir M., Mohamed C., Pierre D., 2017 (b). Chemical composition and biological activities of *Mentha* species. *Aromatic and Medicinal Plants - Back to Nature*. Chapitre 3 : 47-79.
 81. Bräse S., Gläser F., Kramer C.S., Lindner S., Linsenmeier A.M., Masters K.S., Meister A.C., Ruff B.M., Zhong S., 2013. The chemistry of mycotoxins. Springer, 300p.
 82. Bremnes L., 2002. Herbs. Eyewitness-Handbooks. DK Publishing, New York, USA.
 83. Brown G.E., 1988. Efficacy of guazatine and iminoctadine for control of postharvest decays of oranges. - *Plant Dis.*, 72(10), 906-908.
 84. Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^e édition revue, Paris.
 85. Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4^e édition revue, Paris.
 86. Burgess L.W., Summerell B.A., Bullock S., Gott K.P., Backhouse D., 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research 3rd ed. University of Sydney, Sydney, Australia.
 87. Bushra S., Tariq M., Naeem M. Ashfaq M., 2014. Efficacy of neem oil and turmeric powder against *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. *International Journal of Biosciences*. Vol. 5, N° 12, p. 439-448.

88. Cakir A., Ozer H., Aydin T., Kordali S., Tazegul Cavusoglu A., Akcin T., Mete E. & Akcin A., 2016. Phytotoxic and insecticidal properties of essential oils and extracts of four *Achillea* species. *Records of Natural Products* 10, 154–167.
89. Califice S., Waltregny D., Castronovo V., van den Brûle F., 2004. [Prostate carcinoma cell lines and apoptosis: a review]. *Rev. Médicale Liège* 59, 704–710.
90. Çam H., Karakoç, Ö.C., Gökçe, A., Telci, I., Demirtas, I., 2012. Farklı nane türlerine ait klonların uçucu yağlarının buğday biti [*Sitophilus granarius* L. (Coleoptera:curculionidae)]'ne fumigant etkisi. *Turk. Entomol. Derg-Tu.* 36 (2), 255–263.
91. Canabady-Rochelle L.L.S., Harscoat-Schiavo C., Kessler V., Aymes A., Fournier F., Girardet J.M., 2015. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chemistry* 183 : 129–135.
92. Carré P., 1953. Précis de technologie et de chimie industrielle. Tome 3. Ed. Ballière J.B. et Fils.Paris. France.
93. Casida J.H., 1990, Pesticide mode of action, evidence for implications of a finite number of biochemical targets. *In: Casida J.E. (ed.). Pesticides and alternatives. Innovative chemical and Biological Approaches to Pest Control.* Amsterdam: Elsevier, pp. 11-22.
94. Castillo F., Hernandez D., Gallegos G., Mendez M., Rodriguez R., Reyes A., Aguilar C.N., 2010. *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kuhn *Ind. Crop. Prod.* 2010, 32, 324-328.
95. Celimene C.C., J.A. Micales, L. Ferge & R.A. Young, 1999. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung*, 53, 491-497.
96. Ceyhan G., Köse M., Tümer M., Demirtas I., Sahin Yaglioglu A., McKee V., 2013. Structural characterization of some Schiff base compounds: Investigation of their electrochemical, photoluminescence, thermal and anticancer activity properties *Journal of Luminescence* 143, 623–634.
97. Chambers C., Exaudi-Larsen K., Price W., 1996. Aqueous extraction of solutes from oranges : a kinetic study. *Food Chemistry*, 57 (4), pp 483-486.
98. Champion R. 1997. Identifier les champignons transmis par les semences INRA, Paris, 398 p.
99. Chang C.C., Chen, W.C., Ho, T.F., Wu, H.S., Wei, Y.H., 2011. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* 111, 501–511.
100. Chang K .F., Ahmed H.U., Hwang S.F. , Gossen B.D., Strelkov S.E, Blade S.F. et Turnbull G.D., 2007. Sensitivity of field populations of *Ascochyta rabiei* to chlorothalonil, mancozeb and pyraclostrobin fungicides and effect of strobilurin

- fungicides on the progress of *Ascochyta blight* of chickpea .Can J Plant Sci ,87, 937–944.
101. Chauvergne J., Hoerni B., 2001. Abrégés de chimiothérapie anticancéreuse 4è Ed. Masson; Paris, 103p.
 102. Chaux C., Foury L., 1994. Cultures légumières et maraichères. Tome III : légumineuses potagères, légumes fruit. Tec et Doc Lavoisier, Paris ,563p.
 103. Chen F. & Tholl D., 2011. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *Plant J.* 66: 212-229.
 104. Cheurfa M., 2015. Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse de Doctorat LMD en Biologie. Université Hassiba Ben Bou Ali, Chlef. 103p.
 105. Chiasson H, Beloin N. 2007. Les huiles essentielles, des biopesticides nouveaux». Revue de littérature. *Bulletin de la société d'entomologie du Québec. Antennae*,14(1): 3-6.
 106. Chinery M., 2012. *Insectes de France et d'Europe occidentale* (Flammarion).
 107. Cisowski W., 1985. "Flavonoid compounds in *Myrrhis odorata* (L.) Scop." *Herba Polonica*, 31: 13-19.
 108. Ciulei I., 1980. Methodology for Analysis of Vegetable Drugs. Pratical Manuals on the Industrial Utilization of Medicinal and Aromatic Plants (3rd edn). *Arta Grafica: Romania*.
 109. Clemente S, Mareggiani G, Broussalis A, Martino V, Ferraro G. 2003. Insecticidal effects of Lamiaceae species against stored products insects. *Bol Sanidad Vegetl Plagas.* 29:1–8.
 110. Clevenger J.F .. 1928.- Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc ..* 17, 346-341.
 111. Collins, P.J.; Lambkin, T.M.; Bridgeman, B.W. & Pulvirenti, C., 1993. Resistance to grain protectant insecticides in coleopterous pests of stored cereals in Queensland, Australia. *Journal of Economic Entomology*, Vol. 86, No. 2, pp. 239-245.
 112. Constantin E., 1996. Spectrométrie de masse. *Lavoisier Tec & Doc*, Paris, p. 1-14.
 113. Conti B., Canale A., Cioni P.L., Flamini G., Rifici A., 2011. *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae) *J Pest Sci* 84:219–228.
 114. Corbaz R., 1990. Principe de phytopathologie et de lute contre les maladies des plantes. Edition Presse Polytechnique et Universitaire Romande, p 286.

115. Cowan M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4): 564-582.
116. Cunha, U. S., J. D. Vendramim, W. C. Rocha and P. C. Vieira. 2006. Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. *Pesquisa Agrop. Brasil*. 41:1579- 1585.
117. Damien Dorman H.J., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R., 2003. Antioxidant properties and Composition of aqueous Extracts from *Mentha* Species, Hybrids, Varieties and Cultivars. *J. Agric. Food Chem*. 51, p. 4563–4569.
118. Dastmalchi K, Damien Dormana H, Oiononena P, Darwisd Y, Laaksoa I, Hiltunen R., 2008. Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT-Food Science and Technology*; 41:391-400.
119. Decker, E. A., & Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.
120. Dedryver C. A., Le Ralec A., & Fabre F., 2010. The conflicting relationships between aphids and men: A review of aphid damage and control strategies. *Comptes Rendus - BiologiesBiologies*, 333, 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.03.009>
121. Dedryver C.A., 2006. Pucerons : des dégâts et des hommes. *BIOFUTUR* 279, pages 22-26.
122. De Lira C.S., Pontual E.V., de Albuquerque L.P., Paiva L.M., Paiva P.M.G., de Oliveira J.V., Napoleao T.H., do Amaral Ferraz Navarro D.M., 2015. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). *Crop Protection* 71: 95-100.
123. Demirtas I., Gecibesler I.H., Sahin Yaglioglu A., 2013. Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantina*. *Phytochemistry Letters* 6, (2) 209-214.
124. de Oliveira T.A., Ronchi-Teles B., da Fonseca C.R.V., da Silva S.L.R., Santos P.A. & Nunez C.V., 2012. Insecticidal activity of *Vitex cymosa* (Lamiaceae) and *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) extracts against *Sitophilus zeamais* adults (Curculionidae). *Emir. J. Food Agric*. 24 (1): 49-56.
125. De Sousa A.C, Alviano D.S, Blank AF, Alves P.B, Aliano C.S, Gattass C.R., 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharm and Pharmacology*. 56: 677-681.
126. de Sousa Barros A., de Moraes S.M., Travassos Ferreira P.A., PintoVieira I.G., Craveiro A.A., dos Santos Fontenelle R.O., Alencar de Menezes J.E.S., Ferreira da Silva F.W., Araújo de Sousa H., 2015. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*. Volume 76, 557-564.
127. Deep A, Rana P, Soni G., 2017. Iron Chelation and Iron Reducing Activity of Tissue Cultured and Tissue Culture Derived *Mentha* Spp. *J App Pharm Sci*, 7 (05): 078-083.

128. Dehghanpour-Farashah S. & Taheril P., 2016. Antifungal and antiaflatoxigenic effects of *Mentha longifolia* essential oil against *Aspergillus flavus*. *International Journal of New Technology and Research (IJNTR)*, Volume-2, Issue-9, 30-39.
129. Dellavalle P.D., Cabrera A., Alem D., Larrañaga P., Ferreira F., Rizza M.D., 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71(2):231-239.
130. Derwich E., Benziane Z., Taouil R., Senhaji O and Touzani M., 2010. Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco; *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.*, 4(1): 47-54.
131. Deschepper R., 2017. Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université d'Aix Marseille. Faculté de Pharmacie, 160 p.
132. Dewar A. M., 2007. Chemical Control. In H. F. van Emden & R. Harrington (Eds.), *Aphids*
133. Dewick P.M., 1999. The biosynthesis of C₅-C₂₅ terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 16: 97-130.
134. Dhifi W., Litaïem M., Jelali N., Hamdi N. & Mnif W., 2011. Identification of a new chemotype of the plant *Mentha aquatic* grown in Tunisia: chemical composition, antioxidant and biological activities of its essential oil. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 14(3): 320-328.
135. Diallo M.A., 2003. Contribution à l'étude de la composition en polyphénols de *Tephrosia pedicellata*. Mémoire de DEA de chimie et biochimie des produits naturels. Université Cheikh Anta Diop Dakar, Sénégal.
136. Digilio M.C., Mancini E., Voto E. and De Feo V., 2008. Insecticide activity of Mediterranean essential oils. *Journal of Plant Interactions* Vol. 3, No. 1, 17-23.
137. Dinesh D.S., Kumari S., Pandit V., Kumar J., Kumari N. , Kumar P. , Hassan F., Kumar V. & Das P., 2015. Insecticidal effect of plant extracts on *Phlebotomus argentipes* (Diptera: Psychodidae) in Bihar, India. *Indian J Med Res* 142 (Supplement), pp 95-100.
138. Di Pietro A., Madrid M.P., Caracuel Z., Delgado-Jarana J., Roncero M.I.G., 2003. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus *Molecular Plant Pathology* (4) : 315-325.
139. Djeugap FJ, Fontem DA, Tapondjou AL., 2009. Évaluation des milieux de culture pour la croissance de *Phytophthora infestans*. *Cameroon Biosciences Proceedings*, 15: 85-92.
140. Dorman H.J.D., Deans S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 (2), 308–316.

141. Dorman H.J.D., Kosar M., Kahlos K., Holm Y., Hiltunen R., 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4563–4569.
142. Dorman H. J. D., Kosar M., Baser K. H. C. & Hiltunen R., 2009. Phenolic profile and antioxidant evaluation of *Mentha×piperita* L., (Peppermint) extracts. *Nat. Prod. Commun.*, 4(4): 535---542.
143. Dudareva N., Pichersky E. and Gershenzon J., 2004. "Biochemistry of plant volatiles." Plant Physiol. American Society of Plant Biologists.
144. Duke J.A., 2002. Handbook of Medicinal Herbs, 2nd edition, *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
145. Duncan D. 1955. Multiple range and multiple F-test. *Biometrics* 11: 1-42.
146. Durand-Tardif M., Pelletier G., 2003. Apport de la biologie moléculaire et cellulaire et de la génétique à la protection des plantes. *C. R. Biologies* 326 : 23–35.
147. Ebadollahi A., 2011. Susceptibility of two *Sitophilus* species (Coleoptera : Curculionidae) to essential oils from *Foeniculum vulgare* and *Satureja hortensis*. *Ecologia Balkanica*, Vol. 3, Issue 2, pp. 1-8.
148. Ekoumou C., 2003. Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145 p.
149. El Ajjouri M., 2013. Etude de la composition chimique et de l'efficacité des huiles essentielles de quelques espèces du genre *Thymus* dans la préservation du bois contre les champignons lignivores. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V – Agdal, Rabat. Faculté des Sciences, Spécialité : Sciences du Bois, 181 p.
150. El Arch M., Satrani B., Farah A., Bennani L., Briky D., Fechtel M., Blaghen M., Talbi M., 2003. Chemical composition and antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil in *Mentha rotundifolia* from Morocco. *Acta Bot. Gallica* 150 (3), p. 267–274.
151. El Haib A., 2011. Valorisation de terpènes naturels issus de plantes marocaines par transformation catalytique. Thèse de Doctorat en chimie organique et catalyse . Université de Toulouse III-Paul Sabatier. 195 p.
152. El Kalamouni C., 2010. Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse, Institut National Polytechnique de Toulouse, 228 p.
153. Elhartiti A., Elhabchi S., Hichar A., Omar B., Ounine K., 2015. Antagonistic activity of endophytic bacteria isolated from *Mentha rotundifolia* L. *International Journal of Scientific & Technology Research*, volume 4, issue 12, 36-39.

154. Epstein W.L., Shah P., Riegelman S., 1972. Griseofulvin Levels in Stratum Corneum Study After Oral Administration in Man. *Arch Dermatol* 106 (3):344–8.
155. Fabricius J.C., 1775. *Systema entomologiae, sistens insectorvm classes, ordines, genera, species, adiectis synonymis, locis, descriptionibvs, observationibvs.* Flensbvrge, Lipsiae. (Kort), 1-832, 1-31 p.
156. Farag R.S., Daw Z.Y., Hewedi F.M. & El-Baroly G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52, 665-667.
157. Farhat A., 2010. Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse et L'Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès Marseille. Spécialité : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments, 136 p.
158. Fava A. and Burlando B., 1995. Influence of female age and grain availability on the oviposition pattern of the wheat weevil *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.* 92: 421-426.
159. Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Salgueiro L., Miguel M.G., Faleiro M.L., 2008. Portuguese Thymbra and Thymus species volatiles: chemical composition and biological activities. *Curr Pharm Design* 14:3120–40.
160. Fingleton B., 2006. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. *Front Biosci*, 11: p. 479-91.
161. Finney D.J., 1971, *Statistical Methods in Biological Assay*, 2nd edition. London: Griffin, 333 p.
162. Fourar-Belaifa R., Fleurat-Lessard F., 2015. Évaluation expérimentale de la sensibilité aux attaques du charançon du riz de variétés d'espèces céréalières cultivées en Algérie. *Cah Agric*, vol. 24, N° 5, 283-291.
163. Fraval A., 2006. Les pucerons. *Insectes*, 142(2), 3–32.
164. Gauman E., 1957. Fusaric acid as a wilt toxin. *Phytopathology* (47): 342-357.
165. Germinara, G. S., De Cristofaro, A., & Rotundo, G., 2012. Bioactivity of short-chain aliphatic ketones against adults of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.). *Pest Management Science*, 68, 371–377.
166. Giray E.S., Kirici S., Kayab D.A., Türk M., Sönmez Ö., Inan M., 2008. Comparing the effect of sub-critical water extraction with conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta* 74, 930–935.
167. Gökçe A., Isaacs R. & Whalon M.E., 2012. Dose–response relationships for the antifeedant effects of *Humulus lupulus* extracts against larvae and adults of the Colorado potato beetle. *Pest Management Science* 68, 476–481.

168. Gökçe A., Stelinski L.L., Whalon M.E., Gut L.J., 2010. Toxicity and antifeedant activity of selected plant extracts against larval oblique-banded leaf roller, *Choristoneura rosaceana* (Harris). *Open Entomol. J.* 3, 30–36.
169. Gonçalves, R.S.; Battistin, A.; Pauletti, G.; Rota, L.; Serafini, L.A., 2009. Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.11, n.4, p.372-382.
170. Gonzalez-Vallinas M., Gonzalez-Castejon M., Rodriguez-Casado A., Ramirez de Molina A., 2013. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. *Nutr Rev*, 71(9): p. 585-99.
171. Gordaliza M., 2007. Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology* 9: 767–776.
172. Gorham J.R., 1991. Insect and mite pests in food. An illustrated key. Vol. 1 and 2. US Department of Agriculture, Agriculture Handbook Washington, DC, USA, No. 655:vii + 767 pp.
173. Goucem K., 2014. Étude de l'activité insecticide des huiles essentielles et des poudres de quelques plantes à l'égard de la bruche du haricot *Acanthocelides obtectus* Say (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) et comportement de ce ravageur vis-à-vis des composés volatils de différentes variétés de la plante hôte (*Phaseolus vulgaris* L.). Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, U.M.M.T.O. 144p.
174. Gould M.N., 1997. Cancer chemoprevention and therapy by monoterpenes. *Environ. Health*
175. Griffin G.F., & Chu F.S., 1983. Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay. *Applied and Environmental Microbiology* 46:1420-1422.
176. Guérin S., Hill C., 2010. Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA. *Bull. Cancer* (Paris) 97, 47–54.
177. Gulluce M., Sahin F., Sokmen M., Ozer H., Dafaerera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. and Ozkan H., 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chem.*, 103(4): 1449-1546.
178. Hajlaoui H., Trabelsi N., Noumi E., Snoussi M., Fallah H., Ksouri R., Bakhrouf A., 2009. Biological activities of the essential oils and methanol extract of tow cultivated mint species (*Mentha longifolia* and *Mentha pulegium*) used in the Tunisian folkloric medicine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25: 2227–2238.
179. Halliwell B., 1991. The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species, in *Free Radicals and Food Additives*, ed. by Halliwell B. Taylor and Francis, London, pp. 37–57.

180. Hand S.C., 1989. The overwintering of cereal aphids on Gramineae in southern England, 1977-80. *Annals of Applied Biology*, 115, 17-29.
181. Harborne J.B., Williams C.A., 1995. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* 12, 639-657.
182. Harborne, J.B., 1986. The Flavonoids, Advances in Research, 1ère Ed: Chapman & Hall, London.
183. Harmel N., Francis F., Haubruge E., & Giordanengo P., 2008. Physiologie des interactions entre pomme de terre et pucerons : vers une nouvelle stratégie de lutte basée sur les systèmes de défense de la plante. *Cahiers Agriculture*, 17, 395–400.
184. Hendriks H., Van Os F.H.L., 1976. Essential Oils of two chemotypes of *M. suaveolens* during ontogenesis. *Phytochemistry* 15, p. 1127–1130.
185. Hille Ris Lambers D., 1939. Contribution to a monograph of the Aphididae of Europe. *Temminckia*, IV, 1-134.
186. Hogenhout S.A., Ammar E.D., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46: 327–359.
187. Holliday P., 1989. *A Dictionary of Plant Pathology*. Cambridge University Press, Cambridge, MA, 369 pp.
188. Holopainen J.K. & Gershenzon J., 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. *Trends Plant Sci.* 15(3), 176–184.
189. Holstein S.A., Hohl R.J., 2003. Monoterpene regulation of Ras and Ras-related protein expression. *J Lipid Res* ;44:1209–1215.
190. Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A., Saponins, 1991. [In] *Methods in Plant Biochemistry, Terpenoids*, Vol. 7, B.V. Charlwood, D.V. Banthorpe Editor. London: Academic Press., 435-471.
191. Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* 23, 181–199.
192. Hussain A. I., Anwar F., Nigam S. P., Ashraf M. and Gilani A. H., 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agr.*, 90(11): 1827-1836.
193. Hussain AI, Anwar F, Sherazi STH and Przybylski R., 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chem* 108:986–995.
194. Ibrahim A.R. & Abulhadj Y.J., 1990. Aromatase Inhibition by Flavonoids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2): p. 257-260.

195. Igor Passi L.B., 2002. Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxylo* des Lamiacées. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Bamako-Mali.
196. Iloki-Assanga S.B., Lewis-Lujan L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L. and Haines D.D., 2015. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes* 8:396.
197. INRA 2010. Qu'est-ce qu'un puceron? (<https://www6.inra.fr/encyclopedie-pucerons/Qu-est-ce-qu-un-puceron>)
198. IRAC 2009. All Methods_2. Susceptibility test methods series. Version 2. Method N°1. Site Web <http://www.irc-online.org>
199. Iserin P., Masson M., Restellini J.P., 1997. Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soin , Larousse-Bordas.
200. Işık M. & Görür, G., 2009. Aphidicidal activity of seven essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera: Aphididae). *Munis Entomology & Zoology*, 4 (2): 424-431.
201. Isman, M. B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Prot.* 19:603-608.
202. Isaacs J.T., 1994. Role of androgens in prostatic cancer. *Vitam. Horm.* 49, 433–502.
203. ITCMI., 2010. Fiche technique valorisée des cultures maraichères et industrielles: La culture de tomate : Institut Technique Des Cultures Maraichères et Industrielles. Staoueli- Alger.
204. Jackowski J., Hurej M., Rój E., Popłoński J., Kośny L. & Huszcza E., 2015. Antifeedant activity of xanthohumol and supercritical carbon dioxide extract of spent hops against stored product pests. *Bulletin of Entomological Research* 105, 456–461.
205. Jhokadze M., Eristavi L., Kutchukhidze J., Chariot A., Angenot L., Tits M.Jansen O., Frederich M., 2007. *In vitro* cytotoxicity of some medicinal from Georgian Amaryllidaceae. *Phytother Res*; 21: 622-624.
206. Jones J.B., Jones J.P., Stall R.E., Zitter T.A., 1991. Compendium of Tomato Diseases. Am. Phytopathological Soc. APS Press. St. Paul, MN. p. 73.
207. Jones W. P., Kinghorn A. D., 2012. Extraction of Plant Secondary Metabolites. Chapitre 13 in Satyajit D. Sarker and Lutfun Nahar (eds.), *Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology*, vol. 864, DOI 10.1007/978-1-61779-624-1_13, © Springer Science+Business Media, LLC.
208. Jouault S., 2012. La qualité des huiles essentielles et son influence sur leur efficacité et sur leur toxicité. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine, 142 p.

209. Kabran G.R.M., Ambeu N.C., Mamyrbekova-Bekro J.A. et Bekro Y. A., 2012. Phénols et flavonoïdes totaux dans les extraits organiques de dix plantes utilisées dans la tradithérapie du cancer du sein en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*. 68 (2) : 182 – 190.
210. Kalemba D., Kunicka A. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Curr Med Chem* (17) 10:813–29.
211. Kalt C., 2000. Agriculture et agroalimentaire Canada, Centre de recherches de l'Atlantique sur les éléments de l'horticulture, Kentville, N. E. B4N 1J5.
212. Kamatou G.P.P., Viljoen A.M., 2010. A review of the application and pharmacological properties of bisabolol and bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87,1–7.
213. Kamkar, A., Jebelli Javan, A., Asadi, F., Kamalinejad, M., 2010. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. *Food Chem.Toxicol.* 48, 1796–1800.
214. Kanoun K., Abbouni B., Bénine M.L. et Marouf B., 2014. Etude de l'efficacité de l'extrait éthanolique d'écorce de *Punica granatum* Linn. sur deux souches phytopathogènes : *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. Et *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *European Science Journal*.10 (12) : 301- 315.
215. Kapp K., 2015. Polyphenolic and essential oil composition of *Mentha* and their antimicrobial effect. Academic Dissertation. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki.; 90 p.
216. Karakas M., 2016. Toxic, repellent and antifeedant effects of two aromatic plant extracts on the wheat granary weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 4(5): 870-874.
217. Karakus G., Polat Z.A., Sahin Yaglioglu A., Karahan M., Yenidunya A.F., 2013. Synthesis, characterization, and assessment of cytotoxic, antiproliferative, and antiangiogenic effects of a novel procainamide hydrochloride-poly(maleic anhydride-co-styrene) conjugate *Journal of Biomaterials Science*, Polymer Edition doi: 10.1080/09205063.2012.750209.
218. Kasrati A., Alaoui Jamali C., Bekkouche K., Spooner-Hart R., Leach D. and Abbad A., 2015. Chemical Characterization and Insecticidal Properties of Essential Oils from Different Wild Populations of *Mentha suaveolens* subsp. *timija* (Briq.) Harley from Morocco. *CHEMISTRY & BIODIVERSITY* – Vol. 12, 823-831.
219. Katan T., Shlevin E., Katan J., 1997. Sporulation of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici* on stem surfaces of tomato plants and areal dissemination of inoculums. *Phytopathology* (87): 712-719.
220. Keskin S. & Ozkaya H., 2015. Effect of storage and insect infestation on the technological properties of wheat. *Journal of Food*, Vol. 13, N° 1, 134-139.

221. Ketoh, G.K., Glitho, A.I., 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, 174–182.
222. Khan M. Q., 1948. A contribution to a further knowledge of the structure and biology of the weevils, *Sitophilus oryzae* (Linn.) and *S. granarius* (Linn.) with special reference to the effects of temperature and humidity on the rate of their development. *Indian J. Entomol.* 11: 143-201.
223. Kholkhal F., 2014. Etude phytochimique et activité antioxydante des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *euciliatus*. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Option : Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques, 138 p.
224. Kihindo A.A., 2011. Etude des propriétés antiprolifératives et antiradicalaires de l'extrait méthanolique des fleurs d'*Adenium obesum* (Apocynaceae). Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Ouagadougou. UFR/SDS, 88p.
225. Kim S.I., Roh J.K., Kim D.Y., Lee H.S., Ahn Y.J., 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research.* 39: 293-303.
226. Kim S.I., Roh J.Y. and Kim D.H., 2002. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research.* Vol 39: 293-303.
227. Kim, D.H., Ahn, Y.J., 2001. Contact and fumigant activities of constituents of *Foeniculum vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Management Science* 57, 301-306.
228. Kimbaris A.C., Papachristos D.P., Michaelakis A., Martinou A.F. and Polissiou M.G., 2010. Toxicity of plant essential oil vapours to aphid pests and their coccinellid predators. *Biocontrol Science and Technology*, Vol. 20, No. 4, 411-422.
229. Klervi L.L., 2005. Connaissance chimiotaxonomique du genre *Turbinaria* et étude des composés de défense de différentes espèces de Sargassacées des îles Salmon (Pacific sud), 210 p.
230. Knowles J.R., Roller S., Murray D.B. & Naidu A.S., 2005. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 797-803.
231. Kokkini S., Papageorgiou VP., 1988. Constituents of Essential Oils from *Mentha x rotundifolia* Growing Wild in Greece. *Planta Med.* 38, p. 166–167.

232. Kordali S., Aslan, I., Calmasur O., and Cakir A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crops. Prod.* 23:162–170.
233. Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M. & Mete E., 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* 99, 8788–8795.
234. Kordali S., Kesdek M. & Cakir A., 2007. Toxicity of monoterpenes against larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Industrial Crops and Products* 26, 278–297.
235. Kordali S.; Yildirim E.; Yazici G.; Emsen B.; Kabaagac G. and Ercisli S., 2012. Fumigant Toxicity of Essential Oils of Nine Plant Species from Asteraceae and Clusiaceae against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1), 11-14.
236. Kotan R, Dadasogl F, Karagoz K, Cakir A, Ozer H, Kordalia S, *et al.*, 2013. Antibacterial activity of the essential oil and extracts of *Satureja hortensis* against plant pathogenic bacteria and their potential use as seed disinfectants. *Sci Hortic*; 153:34–41.
237. Kotan R., Kordali S., Cakir A., Kesdek M., Kaya Y., Kilic H., 2008. Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Biochemical Systematics and Ecology* 36 : 360-368.
238. Kubeczka K.H., Bartsch A. et Ullmann I., 1982. Recent studies on essential oils of Apiaceae. *Aetherische Oele, Ergeb. Int. Arbeitstag.*: 158-187.
239. Kubeczka K.H., Schultze W., Formáček V., Herres W., 1988. New developments in essential oils analysis by Fourier-Transform spectroscopy, *10th International Congress of Essential Oils, Fragrances and Flavours, Washington, 16-20 Nov., 1986*, Proceedings, Ed. Elsevier Science, 931-950.
240. Kueny-Stotz M., Chassaing S., Brouillard R., Nielsen M.P. C., Goeldner M., 2008. Flavylum salts as *in vitro* precursors of potent ligands to brain GABA-A receptors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(17): 4864-4867.
241. Kumar P., Mishra S. Malik A. and Satya S., 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products* 34: 802-817.
242. Kurkin V. A., 2003. *Chem. Nat. Compd.*, 39,123.
243. Labiod R., Aouadi S., Bouhaddouda N., 2015. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *Int J Pharm Pharm Sci*, Vol 7, Issue 7, 208-211.
244. Ladjel S., Gherraf N., Hamada D., 2011. Antimicrobial effect of essential oils from the Algerian medicinal plant *Mentha rotundifolia* L. *J. Appl. Sci. Res.* 7,1665–1667.

245. Lalou A., 1995. Mise au point d'un procédé d'extraction des hémicelluloses à partir d'un substrat végétal lingo-cellulosique : application au cas des coques de tournesol. Thèse de Doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
246. L'Ecuyer-Coelho H., 2000. Développement d'un procédé pour la culture à haut concentration de cellules végétales. Mémoire de Maitrise ès Sciences appliquées, Université de Montréal, Ecole polytechnique, Montréal, 177p.
247. Lee B.H., Annis P.C., Tumaalii F., 2003. The potential of 1, 8-cineole as a fumigant for stored wheat. In: Wright E.J., Webb M.C., Highley E. (Eds.), *Stored Grain in Australia 2003. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, 25–27 June 2003, Canberra, CSIRO Stored Grain Research Laboratory, Canberra, Australia*, pp. 230–234.
248. Lee S., Peterson C.J. and Coats J.R., 2002. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. *J. Stored Prod. Res.* 39: 349-355.
249. Lee S.E., Lee B.H., Choi W.S., Park B.S., Kim J.G., Campbell B.C., 2001. Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Science* 57, 548–553.
250. Lehabab A., 2013. Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Mentha rotundifolia* L. (Domrane) de la région de Tlemcen Composition chimique des huiles essentielles. Mémoire de Master en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 57p.
251. Leroux P., Gredet A., 1978. Document sur l'étude de l'activité des fongicides. Versailles : INRA, 26 p.
252. Leybros J., Fremeaux P., 1990. Extraction solide-liquide - Aspects théoriques. *Techniques de l'Ingénieur (Traité Génie des Procédés)*, J 2780.
253. Lin F. J., Bosquée E., Liu Y. J., Chen J. L., Yong L., & Francis F., 2016. Impact of aphid alarm pheromone release on virus transmission efficiency: When pest control strategy could induce higher virus dispersion. *Journal of Virological Methods*, 235, 34–40.
254. Lingk W., 1991. Health risk evaluation of pesticide contamination in drinking water. *Gesunde Pflanz* ;43:21–5.
255. Linnaeus C., 1758. Tomus I. *Syst. Nat.*, Ed. 10 Holmiae, Laurentii Salvii: 1-4, 1-824.
256. Longevialle P., 1981. Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson, Paris.
257. Lopes M.C., & Martins V.C., 2008. Fungal plant pathogens in Portugal: *Alternaria dauci*. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:254-256.
258. López M.D. and Pascual-Villalobos M.J., 2010. Mode of inhibition of acetylcholinesterase by monoterpenoids and implications for pest control. *Industrial Crops and Products* 31: 284-288.

259. Lopez-Malo A., Alzamora S.M. & Palou E., 2005. *Aspergillus flavus* growth in the presence of chemical preservatives and naturally occurring antimicrobial compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 99, 119-128.
260. Lorenzo D., Paz D., Dellacassa, E., Davies P., Vila R., Canigual S., 2002. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil. Technol.* 45 (4), 519–524.
261. Lu Y.H., Gao X.W., 2009. Multiple mechanisms responsible for differential susceptibilities of *Sitobion avenae* (Fabricius) and *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) to pirimicarb. *Bulletin of Entomological Research.* 99: 611-617.
262. Lu Y.H., He Y.P., and Gao X.W., 2013. Comparative studies on acetylcholinesterase characteristics between the aphids *Sitobion avenae* and *Rhopalosiphum padi*. *Journal of Insect Science* 13(9):1-9.
263. Lucchesi M.E., 2005. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Chimie. Université de la Réunion, 143 p.
264. Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E., 1998. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta* 369; 1-10.
265. Luximun-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruomai OI., 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem* 50: 5042-7.
266. Lyon W.F., 2011. Granary and Rice Weevils. Ohio State University Extension Fact Sheet. HYG-2088-97. <http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2088.html>.
267. Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, pp. 192.
268. Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K., 1996. Food antioxidants; Ed: CRC PRESS; p: 361- 460.
269. Maffei M. , Canova D., Berteà C.M., Scannerini S., 1999. UV-A effects on photomorphogenesis and essential oil composition in *Mentha piperita*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 52, 105–110.
270. Mahmoudi E, Tarzaban S, Khodaygan P, Abed A., 2013. Acyl homoserin lactone mimic compounds from plants excite quorum sensing related behaviors in *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Pectobacterium carotovorum*. *International Journal of Forest, Soil and Erosion* 3(4):141-145.

271. Malik F, Hussain S, Sadiq A, Parveen G, Wajid A, Shafat S, et al., 2012. Phytochemical analysis, anti-allergic and anti-inflammatory activity of *Mentha arvensis* in animals. *Afr J Pharm Pharmacol* ; 6: 613-9.
272. Mann C.M., Cox S.D. et Markham J.L., 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), *Letters in appl. Microbiol* 30, 294-297.
273. Manosroi J., Dhumtanom P., Manosroi A., 2006. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Lett* ; 235:114–120.
274. Marfak A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de Doctorat, Université de Limoges. Faculté de Pharmacie, Spécialité : Biophysique, 199 p.
275. Markert B., 1995. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices, *The science of the total environment*, 176: 45-61.
276. Mason A., Lee R., Abrigo M. and Lee S. H., 2017. Support Ratios and Demographic Dividends: Estimates for the World United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division Technical Paper ,47 p.
277. Masson P., 2005. Sources de variabilité dans l'analyse des végétaux par vaporisation électrothermique-spectrométrie d'émission atomique, Spectratom, Pau, France.
278. Mata A.T., Proenc C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araújo M.E.M., 2007. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*. 103: 778–786.
279. Mbarek L.A., Mouse H.A., Elabbadi N., Bensalah M., Gamouh A., Aboufatima R., Benharref A., Chait A., Kamal M., Dalal A., Ziad A., 2007. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*. 40: 839-847.
280. McDonald L.L., Guy R.H. & Speirs R.D., 1970. Preliminary evaluation of new candidate materials as toxicants, repellents and attractants against stored product insects. Marketing. Res. Rep. n° 882. Washington: Agric. Res. Service, US. Dept of Agric., 183 p.
281. McKay D.L., Blumberg J.B., 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.), *Phytotherapy Research*, 20, 519-530.
282. Mckenzie J.D., Goldman R., 2005. The Student Guide to MINITAB Release 14 Manual. *Pearson Education*, Boston, MA.
283. McLafferty F.W., Michnowicz J.A., 1992. State-of-the-art GC-MS, *Chemtech.*, 182-189.

284. Mebarkia A.K., Benkohila H.S., Hamza M. et Makhoul M., 2012. Efficacité d'une protéine entomotoxique du type A1b des graines de Légumineuses. *Agriculture N°3*
285. Mehani M., Segni L., Terzi V., Morcia C., Ghizzoni R., Goudjil M.B. & Bencheikh S.E., 2015. Antibacterial, antifungal activity and chemical composition study of essential oil of *Mentha piperita* from the south Algerian. *Der Pharma Chemica*, 7(12):382-387.
286. Meirinhos J, Silva B, Valentão P, Seabra R.M, Pereira J.A, Dias A, Andrade P.B, Ferreres F., 2005. Analysis and quantification of flavonoidic compounds from *Portuguese olive (Olea europaea L.)* leaf cultivars. *Nat. Prod. Res.*, 19: 189-195.
287. Melo J.G., Santos A.G., Amorim E.L.C., Nascimento S.C., Albuquerque U.P., 2011. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evid Based Complement Alternat Med* : 359-365.
288. Mert, S., Sahin Yaglioglu, A., Demirtas, I., Kasimogullari, R. Synthesis and antiproliferative activities of some pyrazole-sulfonamide derivatives *Medicinal Chemistry Research* doi: 10.1007/s00044-013-0721-2 2013.
289. Messiaen C.M., Blancard D., Rouxel F. et Lfon R., 1993. Les maladies des plantes maraichères. 3ème éd. INRA, Paris.
290. Miclette M., 2016. Évaluation des propriétés antiprolifératives de la tectochrysin et de la pinocembrine par des mécanismes dépendants du récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR) dans les cellules mammaires cancéreuses humaines. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en sciences expérimentales de la santé. Institut national de la recherche scientifique. Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 135 p.
291. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Mihajlovic B and Matavulj M., 2003. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Med* 69:413–419.
292. Mimica-Dukić N. & Božin B., 2008. *Mentha L.* species (*Lamiaceae*) as promising sources of bioactive secondary metabolites. *Curr. Pharm. Des.*, 14(29): 3141---3150.
293. Mkaddem M., Bouajila J., Ennajar M., Lebrihi A., Mathieu F., Romdhane M., 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of *Mentha (longifolia L. and viridis)* essential oils. *Journal of Food Science*.74: 358–363.
294. Modzelewska A.; Sur S.; Kumar K.S.; Khan S.R., 2005. Sesquiterpenes: Natural products that decrease cancer growth. *Curr. Med.Chem.- Anti-cancer Agents* 5,477-499.
295. Moghaddam M., Pourbaige M., Tabar H.K., Farhadi N. & Ahmadi Hosseini S.M., 2013. Composition and Antifungal Activity of Peppermint (*Mentha piperita*) Essential Oil from Iran. *TEOP* 16 (4) : 506 – 512.

296. Moghtader M., 2013. *In vitro* antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. *African Journal of Plant Science*, Vol 7(11): 521-527.
297. Mohandass S.M.; Arthur F.H.; Zhu K.Y. & Throne J.E., 2006. Hydroperene: Mode of action, current status in stored-product pest management, insect resistance, and future prospects. *Crop Protection*, Vol. 25, N° 9, 902–909.
298. Moldovan R.I., Oprean R., Benedec D., Hanganu D., Duma M., Oniga I., Vlase L., 2014. LC-MS analysis, antioxidant and antimicrobial activities for five species of *Mentha* cultivated in Romania. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. Vol. 9, No. 2, p. 559 – 566.
299. Molyneux P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
300. Mondédji A.D., Nyamador W.S., Amevoin K., Adéoti R., Abbévi Abbey G., Koffivi Ketoh G., Glitho I.A., 2015. Analyse de quelques aspects du système de production légumière et perception des producteurs de l'utilisation d'extraits botaniques dans la gestion des insectes ravageurs des cultures maraichères au Sud du Togo. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 9(1), 98-107.
301. Monti D., Chetoni P., Burgalassi S., Najarro M., Saetton M.F. & Boldrini E., 2002. Effect of different terpene-containing essential oils on permeation of estradiol through hairless mouse skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 237: 209-214.
302. Msaada K. , Hosni K., Ben Taarit M., Chahed T., Kchouk M. E., Marzouk B., 2007. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chemistry* 102, 1131–1134.
303. Müller F.P., 1977. Überwinterung und Fundatrix der Getreideblattlaus *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avenae*. *Arch. Phytopath. Pflanzenschutz, Berlin* 13: 347–353.
304. Murray B. I., 2000. Plant essential oils for pest and disease management, *Crop Protection*, vol. 19, 603-608.
305. N'guessan K., Kadja B., Zirihi G.N., Traoré D. & Aké-Assi L., 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* Vol. 6 N°1 : 1 – 15.
306. Nagell A., Hefendehl F.W., 1974. Composition of the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Planta Med.* 26, p. 1–8.
307. Nakagawa H., Hasumi K., Woo J.T., Nagai K., Wachi M., 2004. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*. 25 (9): 1567-74.

308. Navi S.S., Bandyopadhyay R., Hall A.J., Bramel-Cox P.J., 1999. A pictorial guide for the identification of mold fungi on Sorghum grain. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Natural Resources Institute. Bulletin N° 59, 118 p.
309. Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Tendonkeng F. & Tchouanguép F.M., 2009. Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropicultura* 27(3), 137-143.
310. Nedel F., Begnini K., Carvalho P.H.A., Lund R.G., Beira F. T. A., Del Pino F. A. B., 2012. Antiproliferative activity of flower hexane extract obtained from *Mentha spicata* associated with *Mentha rotundifolia* against the MCF7, KB, and NIH/3T3 cell lines. *J Med Food* 15 (11), 955–958.
311. Nguemtchouin M.M.G., Ngassoum M.B., Ngamo L.S.T., Gaudu X., Cretin M., 2010. Insecticidal formulation based on *Xylopiya aethiopica* essential oil and kaolinite clay for maize protection. *Crop Protection* 29, 985–991.
312. Nguyen QT, Schmitz A, Nguyen TT, Orlov NL, Bohme W, Ziegler T., 2001. Review of the genus.
313. Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M., 2008. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3): 203–209.
314. Nickavar B., Alinaghi A., Kamalinejad M., 2010. Evaluation of the antioxidant properties of five *Mentha* species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. (3): 203–209.
315. Noble M.E.M., Endicott J.A., & Johnson L.N., 2004. Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure. *Science*, 303(5665): p. 1800-1805.
316. Norambuena C., Silva G., Urbina A., Figueroa I., and Rodríguez-Maciel J.C., 2016. Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (Coleoptera Curculionidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(3): 330-336.
317. Norsati S., Hosseini S.A.E., Sarpeleh A., SoflaeiShahrbabak M. & SoflaeiShahrbabak Y., 2011. Antifungal Activity of Spearmint (*Mentha Spicata* L.) Essential oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* the causal agent of stem and crown rot of greenhouse cucumber in Yazd, Iran. *International Conference on Environmental and Agriculture Engineering*, IPCBEE vol.15 : 52-56.
318. Nowicki M., Nowakowska M., Niezgodna A., Kozik E.U., 2012. Alternaria black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. *Veg. Crop. Res. Bull.* 76, 5-19.
319. Okigbo R. et Ajalie A., 2005. Inhibition of some human pathogens with tropical plants extracts *Chromolaena odorata* and *Citrus aurantifolia* and some antibiotics. *Inter. J. Mol. Med. Adv. Sci.*, 1(1) : 34- 40.

320. Omar Y. M.; Darwish Y. A.; Hassan R. E. and Mahmoud M. A., 2012. Insecticidal activity of certain plant essential oil, plant extracts and inorganic salts against the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Linnaeus) infesting wheat crop in Egypt. *J. Plant Prot. and Path.*, Mansoura Univ., Vol. 3 (9): 897 - 903.
321. OMS, Diabète. Aide mémoire N°312 septembre 2011.
322. Ouchemoukh Amessis N., Abu-Reidah I.M., Quirantes-Piné R., Rodríguez-Pérez C., Madani K., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A., 2014. Tentative characterisation of iridoids, phenylethanoid glycosides and flavonoid derivatives from *Globularia alypum* L. (Globulariaceae) leaves by LC ESI-QTOF-MS. *Phytochem. Anal.*; 25:389-398.
323. Oumzil H., Ghouлами S., Rhajaoui M., Ildrissi A., Fkih-Tetouani S., Faid M. & Benjouad A., 2002. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* 16, 727–731.
324. Oussou K.R., 2009. Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.
325. Padua L.S., Bunyaphatsara N., Lemmens R.H.M.J., 1999. *Plant Resources of South-East Asia*, 12.
326. Pan L., Chai H., Kinghorn D., 2010. The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett* ; 3:1–8. *Perspect.* 105, 977–979.
327. Pandey DK, Chandra H, Tripathi NN., 1982. Volatile fungitoxicity activity in higher plants special reference to that of *Callistemon lanceolatus* D.C. *Phytopathology*, 105: 175-182.
328. Paolini J., 2005. Caractérisation des huiles essentielles par CPG/IR, CPG/SM-(IE et IC) et RMN du Carbone-13 de *Cistus albidus* et de deux Asteraceae endémiques de Corse : *Eupatorium cannabinum* subsp. *Corsicum* et *Doronicum corsicum*. Thèse de Doctorat en Chimie Organique et Analytique. Université de Corse Pascal Paoli. Faculté des Sciences et Techniques, 333 p.
329. Park Y.J., Baskar T.B., Yeo S.K., Arasu M.V., Al-Dhabi N.A., Lim S.S. & Park S.U., 2016. Composition of volatile compounds and in vitro antimicrobial activity of nine *Mentha* spp. *SpringerPlus* 5:1628.
330. Peixoto I. T. A, Furlanetti V. F., Anibal P. C., Duarte M. C. T. and Hofling J. F., 2009. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. *Rev. Ciênc. Farm. Basica Apl.*, 30(3): 235---239.
331. Penchev P.I., 2010. Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. Spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement, 229 p.

332. Pesewu G.A., Cutler R.R., Humber D.P., 2008. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol* 116 :102–11.
333. Petrakis E.A., Kimbaris A.C., Perdikis D.C., Lykouressis D.P., Tarantilis P.A., Polissiou M.G., 2014. Responses of *Myzus persicae* (Sulzer) to three Lamiaceae essential oils obtained by microwave-assisted and conventional hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*. 62: 272-279.
334. Petterson J. 1970. Studies on *Rhopalosiphum padi* (L.). Laboratory studies on olfactometric responses to winter host *Prunus padus* L. *Lantbrukshögskolans Annaler* 36:381–399.
335. Pickett J.A. & Griffiths D.C., 1980. Composition of aphid alarm pheromones. *Journal of Chemical Ecology* 6, 349–360.
336. Pino', J.A., Rosado, A., Fuentes, V., 1999. Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 11, 241–242.
337. Piochon M., 2008. Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Mémoire présenté à l'université du Québec à Chicoutimi comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables, 200 p .
338. Pitt J.I. & Hocking A.D., 1997. Fungi and food spoilage. First edition 1985 published by Academic Press, Sydney. Blackie Academic & Professional.
339. Plarre R., 2010. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the granary weevil, *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Eur. J. Entomol.* 107: 1–11.
340. Poehling H.M., Freier B., & Klüken A. M., 2007. IPM Case Studies: Grain. In H. F. van Emden & R. Harrington (Eds.), *Aphids as Crop Pests* (CABI, pp. 597–611).
341. Poirot R., 2007. Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale. Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Spécialité : Génie des procédés et Environnement, 129 p.
342. Polatoğlu K., Karakoç Ö.C., Gökçe A., Gören N., 2011. Insecticidal activity of *Tanacetum chiliophyllum* (Fisch. & Mey.) var. *monocephalum* Grierson extracts and a new sesquiterpene lactone. *Phytochemistry Letters* 4, 432-435.
343. Polatoğlu K., Karakoç, Ö.C., Yücel Y.Y., Gücel S., Demirci B., Başer K.H.C., Demirci F., 2016. Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. *Industrial Crops and Products* 89 : 383–389.
344. Pose G., V. Ludemann J. Segura & V. Fernández Pinto. 2004. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from tomatoes affected by Blackmold in Argentina. *Mycotoxin Research* 20:80-86.

345. Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM, Jones JB., 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Dis*;87:423–7.
346. Price D.N. & Berry M.S., 2006. Comparison of effects octopamine and insecticidal essential oils on activity in the nerve cord, foregut, and dorsal unpaired median neurons of cockroaches. *Journal of Insect Physiology* 52: 309-319.
347. Proestos C., Boziaris I.S., Nychas G.J.E., Komaitis M., 2006. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chem.* 95, 664–671.
348. Puangpronpitag D, Sittiwet C., 2009. Antimicrobial properties of *Cinnamom umverum* aqueous extract. *Asian J Biol Sci*; 2: 49-53.
349. Puttipan R, Okonogi S., 2014. Antioxidant activity of *Rafflesia kerrii* flower extract. *Drugs Discov. Ther.* ; 8:18-24.
350. Queiroz-Monici K.S., Costa G.E.A., Da-Silva N., Reis S.M.P.M. et De-Oliveira A.C., 2005. Bifidogenic effect of dietary fiber and resistant starch from leguminous on the intestinal microbiota of rats. *Nutrition*, 21: 602-609.
351. Quezel P., Santa S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2. Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris, pp : 599.
352. Rajashekar Y., Gunasekaran N., Shivanandappa T., 2010. Insecticidal activity of the root extract of *Decalepis hamiltonii* against stored-product insect pests and its application in grain protection. *J Food Sci Technol* 47(3): 310–314.
353. Rajendran, S. & Sriranjini, V., 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 44, N° 2, 126-135.
354. Ramdani B, Amakran A, Bakrim N, Vannier B, Greche H and Nhiri M., 2017. Anti-glycation and radical scavenging activities of hydro-alcohol and aqueous extracts of nine species from *Lamiaceae* family, *Journal of Medicinal Plants Studies* ; 5(1): 331-345.
355. Raya M.D.P., Utrilla M.P., Navarro M.C. and Jiminez J., 1990. CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytotherapy Res.*, 4, 232–234.
356. Reddy D.N., Al-Rajab A.J., Sharma M., Moses M.M., Reddy G.R., Albratty M., 2017. Chemical constituents, *in vitro* antibacterial and antifungal activity of *Mentha piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University–Science* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.013>
357. Remmal A., Tantaoui-Eiaraki A., Bouchikhi T., Rhayour & M. Ettayebi K., 1993. Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. *J. Ess. Oil. Res.* 5, 179-184.

358. Riachi L.G., De Maria C.A.B., 2015. Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*. 176: 72–81.
359. Riahi L., El ferchichi M., Ghazghazi H., Jebali J., Ziadi S., Aouadhi C., Chograni H., Zaouali Y., Zoghalmi N., Mliki A., 2013. Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops and Products*, 49: 883-889.
360. Ribéreau-Gayon P., 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod, Paris, 254p.
361. Richards O.W., 1947. Observations on grain weevils, Calandra (Col., Curculionidae). I. General biology and oviposition. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 117: 1-43.
362. Richter G., 1993. Métabolites des végétaux, physiologies et biochimie. Press Polytechnique et Universitaire Romandes. 317-339.
363. Robert, G. 2000. Les Sens du Parfum. Osman Eroyllles Multimedia. Paris. 224 p.
364. Roeder T., 1999. Octopamine in vertebrates. *Progres in Neurbiology*, Vol 59: 533-561.
365. Rossing W.A.H., 1991. Simulation of damage in winter wheat caused by the grain aphid *Sitobion avenae*. 3. Calculation of damage at various attainable yield levels. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 87–103.
366. Rozman V., Kalinovic I., Liska A., 2006. Insecticidal activity of some aromatic plants from Croatia against granary weevil (*Sitophilus granarius* L.) on stored wheat. *Cereal Research Communications*, Vol. 34, N° 1, 705-708.
367. Sahin Yaglioglu A., Akdulum B., Erenler R., Demirtas I., Telci I., Tekin S., 2013. Antiproliferative activity of pentadeca-(8E, 13Z) dien-11-yn-2-one and (E)-1,8-pentadecadiene from *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. Roots *Medicinal Chemistry Research* doi: 10.1007/s00044-012-0297-2, 22, 2946–2953.
368. Saljoqi A.U.R., Afridi M.K., Khan S.A. and Rehman S., 2006. Effects of six plant extracts on rice weevil *Sitophilus oryzae* l. in the stored wheat grains. *Journal of Agricultural and Biological Science*. Vol. 1, N° 4 : 1-5.
369. Sallam A.A., Volkmar C. & El-Wakeil N.E., 2009. Effectiveness of different bio-rational insecticides applied on wheat plants to control cereal aphids. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116 (6), 283–287.
370. Sari M., Biondi D.M., Kaabeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G., 2006. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. *Flavour and Fragrance Journal* 21, 890–898.

371. Sawadogo W.R., Schumacher M., Teiten M.H., Dicato M., Diederich M., 2012. Traditional West African pharmacopeia, plants and derived compounds for cancer therapy. *Biochem Pharmacol*, 84(10): p. 1225-40.
372. Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875–3883.
373. Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic L., Miller J.D., Hooker D.C., 2001. Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology* (23): 279-285.
374. Schultz J. C., 1988. Tannin-insect interactions, p. 553. In R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), *Chemistry and significance of condensed tannins*. Plenum Press, New York, N.Y.
375. Schwab W., Davidovich-Rikanati R., et al., 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 54: 712-732.
376. Schwarz D. & Roots I., 2003. *In vitro* assessment of inhibition by natural polyphenols of metabolic activation of procarcinogens by human CYP1A1. *Biochem Biophys Res Commun.*, 303(3): p. 902-7.
377. Seladji M, Belmekki N., Ekhechi C., Bendimerad N., 2014. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of *Mentha rotundifolia* L. from Algeria. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 40: 228-234.
378. Seladji M., 2015. Etude phytochimique, activités antioxydante et antimicrobienne des extraits de cinq plantes médicinales et analyses de leurs huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et Biochimie. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. Option: Produits naturels, aspects nutritionnels et activités biologiques, 157 p.
379. Sell, C.S. 2006. *The Chemistry of Fragrance. From Perfumer to Consumer*. 2nd edition. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. 329 p.
380. Sellami I.H., Wannas W.A., Bettaieb I., Berrima S., Chahed T., Marzouk B. & Limam F., 2011. Qualitative and Quantitative Changes in the Essential Oil of *Laurus nobilis* L. Leaves as Affected by Different Drying Methods, *Food Chemistry*, Vol. 126, pp. 691 – 697.
381. Semal J., 1989. *Traité de pathologie végétale*. Edition les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.I.
382. Senhaji O, Faid M, Elyachioui M, et al., 2005. Antifungal activity of different cinnamon extracts. *J Mycol Méd* 15: 220–9.
383. Shaaya E., Ravid U., Paster N., Juven B., Zisman U., Pissarev V., 1991. Fumigant toxicity of essential oils against four major stored product insects. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 499–504.

384. Shanjani P.S., Mirza M., Calagari M., Adams R.P., 2010. Effects drying and harvest season on the essential oil composition from foliage and berries of *Juniperus excelsa*. *Industrial Crops and Products* 32(2), 83–87.
385. Shayesteh N. & Ashouri S., 2010. Effect of four powdered spices as repellents against adults of *Rhyzopertha dominica* (F.), *Sitophilus granarius* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) in laboratory conditions. 10th International Working Conference on Stored Product Protection, Julius-Kühn-Archiv, 425,799-804.
386. Shinkafi S.A., 2014. Phytochemical Analysis and Chromatographic Studies of *Pergularia tomentosa* L. and *Mitracarpus scaber* Zucc. *British Microbiology Research Journal*, 4 (5) : 550-559.
387. Singleton V. & Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
388. Sofowora E.A., 1982. Medicinal plants and traditional medicine in Africa. John Wiley and Sons, Chichester, pp. 256.
389. Stejskal V., Hubert J., Aulicky R. & Kucerova Z., 2015. Overview of present and past and pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective. *Journal of Stored Products Research* 64, 122–132.
390. Stevens J.F., Miranda C.L., Buhler D.R., Deinzer M.L., 1998. Chemistry and biology of Hop Flavonoids. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 136-145.
391. Strebler G., 1989. Les médiateurs chimiques. Edition Lavoisier Tec&Doc, Paris, 246 p.
392. Strelec, I., Kučko, L., Roknić, D., Mrša, V., & Ugarčić-Hardi, Ž., 2012. Spectrofluorimetric, spectrophotometric and chemometric analysis of wheat grains infested by *Sitophilus granarius*. *Journal of Stored Products Research*, 50, 42–48.
393. Surh Y.J., 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer*, 3(10): p. 768-80.
394. Surtees G., 1965. Effect of grain size on development of the weevil *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Proc. R. Entomol. Soc. Lond. (A)* 40: 38–40.
395. Sutton J.C., 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* (195): 195-209.
396. Taalbi A., 2016. Variabilité chimique et intérêt économique des huiles essentielles de deux menthes sauvages : *Mentha pulegium* (Fliou) et *Mentha rotundifolia* (Domrane) de l'ouest algérien. Mémoire de Master en Chimie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Option: Molécules Bioactives, Synthèse et Application. 50 p.
397. Takahashi H., Aoyagi K., Nakanishi Y., Sasaki H., Yoshida T., Honda H., 2006. Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer

from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 46–52.

398. Taleb-Toudert 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 Mammeri. Département de Biologie Animale et Végétale, 160 p.
399. Tapwal A, Nisha Garg S, Gautam N, Kumar R. 2011. *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian archives of biology and Technology* 54: 1093-1098.
400. Teixeira B., Marques A., Ramos C., Batista I., Serrano C., Matos O., Neng N.R., Nogueira, J.M.F., Saraiva J.A., Nunes M.L., 2012. European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*. 36: 81–87.
401. Teixeira M.L., Cardoso M.D.G, Figueiredo A.C.S., Moraes J.C., Assis F.A., de Andrade J., Nelson D.L., Gomes M.D.S., de Souza J.A., de Albuquerque L.R.M., 2014. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 1181-1190.
402. Thangara J.H.S., Adjei O., Allen B.W. et Portaels F., 2000. *In vitro* activity of *Ciprofloxacin*, *Sparfloxacin*, *Ofloxacin*, *Amikacin* and *Rifampicin* against Ghanaian isolates of *Mycobacterium ulcerans* ; *J. Antimicrob. Agents Chemother* ; 45 (2) : 231-233.
403. Thangapazham R.L., Singh A.K., Sharma A., Warren J., Gaddipati J.P., Maheshwari R.K., 2007. Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Lett*, 2007. 245(1-2): p. 232-41.
404. Thomas A., 2016. L'utilisation des huiles essentielles chez le sportif. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine. Faculté de Pharmacie, 83 p.
405. Thormar H., 2011. Lipids and essential oils as antimicrobial agents. Wiley, 315 p.
406. Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Huang B, Wang Y., 2011. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *Int J Food Microbiol* ;145:464–70.
407. Tombes A. S., 1971. Sexual dimorphism in *Sitophilus granarius* (L.) as viewed in the scanning electron microscope. *Can. J. Zool.* 49: 579-580.
408. Tomi F., Bradesi P., Bighelli A., Casanova J., 1995. Computer-aided identification of individual components of essential oils using carbon-13 NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson. Anal.*, 1, 25-34.

409. Tozlu E., Cakir A., Kordali S., Tozlu G., Ozer H. & Aytus Akcin T., 2011. Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). *Scientia Horticulturae* 130, 9–17.
410. Trease E., Evans W.C.; 1987. Pharmacognosy Billiaire. Editions Tindali London.
411. Triantaphyllou K., Blekas G., Boskou D., 2001. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*.;52: 313–317.
412. Tripathi A.K., Prajapati V., Ahmad A., Aggarwal K.K., Khanuja S.P.S., 2004. Piperitenone oxide as Toxic, Reppellent and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). *J. Med. Entomol.* 41 (4), p. 691–698.
413. Tuley de Silva K., 1995. United Nations industrial development organization, Vienna 232 p.
414. Vanchaelen M., 1992. Taxol and related diterpenoids of *Taxus* sp: important acquisitions in the treatment of cancer. *J. Pharm. Belg.* 47(5): 417-424.
415. Vanchaelen M, Vanchaelen-Fastré R. & Pelsneer A., 1995. Quand les plantes s'attaquent au VIH. *Biofutur.* : 28-330.
416. Vasconcelos L.C.S., Sampaio M.C.C., Sampaio F.C.S., et al., 2003. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 46:192–6.
417. Viennot-Bourgin G. 1980. *Systématique des Champignons Parasites des Plantes* (5^e ed). Centre de Documentation Universitaire et SEDES réunis : Place de la Sorbonne, Paris Ve.
418. Vigers AJ, Roberts WK, Selitrenni Koff CP. 1991. A new family of antifungal proteins. *Molecular Plant Microbe Interactions* 4:315 – 323.
419. Virost S., 2004. Les petites protéines de stress et leur rôle dans la mort cellulaire. Etude de leur fonction chaperon à travers l'exemple de la mutation R1 β 0G de l' $\alpha\beta$ cristalline. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard-Lyon 1.
420. Vivas de Gaulejac N., 2001. Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox. Bordeaux : Féret.
421. Vivas de Gaulejac N., 2002. Manuel de Tonnellerie. Bordeaux : Féret.
422. Wagner H., Blatt S., Rickl V., 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co.K 2nd ed. 384 p.

423. Waheed I, Ahmed M, Syed NH, Ashraf R., 2014. Investigation of phytochemical and antioxidant properties of methanol extract and fractions of *Ballota limbata* (Lamiaceae). *Indian J Pharm Sci* 76 (3): 251-6.
424. Walker J.E.M, Saraste M.J, Runswick and N.J.Gay., 1982. Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The Embo Journal*, 1(8): 945-51.
425. Walton N.J., Brown D.E., 1999. Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: World Scientific; p: 1-14.
426. Watanabe T., 1975. Fungi isolated from the underground parts of sugarcane in relation to the poor ratooning in Taiwan, (6) Papidaspora. *Trans. Mycol. Soc. Jpn.*, 16:264–267.
427. Watanabe T., 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 2nd Edition, 486 p.
428. Weast R., & Selby S., 1966. Handbook of chemistry and physics: a ready reference book of chemical and physical data. 47th ed. CRS Publications, Cleveland, Ohio, USA.
429. West A.J, Mordue (Luntz) J., 1992. The influence of azadirachtin on the feeding behaviour of cereal aphids and slugs. *Entomol. Exper. Appl.* 62(1):75–79.
430. Wink M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64: 3–19.
431. Wong C, Li H, Cheng K, Feng CA., 2006. Systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay, *Food Chemistry*, 97, 705-711.
432. Wongkittipong R., Prat L., Damronglerd S., Gourdon C., 2004. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 4, pp 147-154.
433. Yaka P., 2007. Etude des propriétés insecticides de l'huile essentielle d'*Aoellanthus pubescens Benth* sur les chenilles de deux Lépidoptères sur *Solanum macrocarpon L.* (Gboma). Mémoire d'ingénieur agronome. Université de Lomé 57p.
434. Yamashita Y., Kawada S.Z. & Nakano H.,1990. Induction of Mammalian Topoisomerase-II Dependent DNA Cleavage by Nonintercalative Flavonoids, Genistein and Orobol. *Biochemical Pharmacology*, 39(4): p. 737-744.
435. Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H., 2000. Antioxidative and Anti-Glycation Activity of Garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 180-185.
436. Yegenoglu H., Aslim B. & Oke F., 2011. Comparison of Antioxidant Capacities of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst and *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer by Using Different *In Vitro* Methods. *Journal of Medicinal Food*, 14(5), 512-516.

437. Yildirim E., Aslan A., Emsen B., Cakir A., & Ercisli S., 2012. Insecticidal effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Agriculture and Biology*, 14, 303–306.
438. Yildirim E., Kesdek M., Kordali S., 2005. Effects of essential oils of three plant species on *Tribolium confusum* du Val and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae and Curculionidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 14, 574-578.
439. Yildirim E., Kordali, S., Yazici G., 2011. Insecticidal effects of essential oils of eleven plant species from Lamiaceae on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 16, N° 6, 6702-6709.
440. Zar J.H., 1996. Biostatistical Analysis. *Prentice Hall*, New Jersey, USA.
441. Zeb Q., Naeem M., Khan S.A. and Ahmad S., 2016. Effect of Insecticides on the Population of Aphids, Natural Enemies and Yield Components of Wheat. *Pakistan J. Zool.*, vol. 48(6), pp. 1839-1848.
442. Zekri N., Handaq N., El Caidi A., Zair T., El Belghiti M.A., 2015. Insecticidal effect of *Mentha pulegium* L. and *Mentha suaveolens* Ehrh. hydrosols against a pest of citrus, *Toxoptera aurantii* (Aphididae). *Res Chem Intermed*, DOI 10.1007/s11164-015-2108-0
443. Zettler, J.L. & Arthur, F.H., 2000. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Protection*, Vol. 19, N° 8, 577-582.
444. Zhang J.; Qu H.; Yu X.; Zhi X.; Chen H.; Xu H., 2013. Combinatorial synthesis of a series of alkyl/alkenylacyloxy derivatives at the c-28 position of toosendanin as insecticidal agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 16 (5), 394-399.
445. Zhu J, Zhang Z, Yang Z., 2001. General research methods on pathogen of potato late blight (*Phytophthora infestans*). *Journal of Agricultural Sciences*, 24: 112- 114.
446. Zirihi G.N. & Kra A.K.M., 2003. Évaluation de l'activité antifongique de *Microglossa pyrifolia* (Lam.) O. Ktze (Asteraceae) « PYMI » sur la croissance *in vitro* de *Candida albicans*. *Revue médicale et pharm. Afric.* 17 : 1 – 19.
447. Zuniga G.E., Goncalves M.P.J., Pizarro M., Contreras R., Tapia A. & Silva S. 2012. Effect of ionizing energy on extracts of *Quillaja saponaria* to be used as an antimicrobial agent on irradiated edible coating for fresh strawberries. *Radiation Physics and Chemistry*, 81: 64-69.

Chemical Composition and Insecticidal Activity of *Mentha rotundifolia* L. Essential Oil against *Sitophilus granarius*

Leblalta Amina^{1*}, Harzallah Daoud¹, Demirtas Ibrahim², Karakoç Ömer Cem³, Gül Fatih²

¹Laboratory of Applied Microbiology, Faculty of Science of Nature and Life, University of Ferhat Abbas, Setif 1, Algeria

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Turkey

³Department of Crop and Animal Protection, Yapraklı Vocational School, Çankırı Karatekin University, Çankırı, Turkey

Original Research Article

*Corresponding author

Leblalta Amina

Article History

Received: 19.01.2018

Accepted: 29.01.2018

Published: 15.02.2018

DOI:

10.21276/haya.2018.3.2.5



Abstract: In order to contribute to the development of an integrated pest management strategy for stored grains, the insecticidal activity of *Mentha rotundifolia* L. essential oil was evaluated against *Sitophilus granarius*, wheat weevil. Insects and toxicity tests were carried out under laboratory conditions at a temperature of 27 ± 2 ° C and a relative humidity of $60 \pm 5\%$, at Çankırı Karatekin University, Yapraklı Vocational School, Department of Animal and Plant Production. The essential oil was analyzed by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) to give 14 compounds in the essential oil of *M. rotundifolia*. The major component of the oil was identified as 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- (89,09%). *M. rotundifolia* essential oil has remarkable insecticidal properties. Highest contact toxicity (100%) of the oil was observed against *S. granarius* (1 μ L/insect application of 4% (v/v) oil solution in acetone, after 24 h). Highest fumigant toxicity (100%) was observed for *S. granarius* (10 μ L/10mL container application of 1% (v/v) oil solution in acetone, after 24 h). The set of knowledge elements obtained should help guide strategies for the integrated protection of the grain quality during the storage of local cereals production.

Keywords: Essential oil, *Mentha rotundifolia*, *Sitophilus granarius*, contact toxicity, fumigant toxicity, stored products.

INTRODUCTION

In Algeria, cereals have strategic importance because it is at the base of the country's food security [1]. Cereal grains have always been the main food source for humans and domestic animals.

The knowledge of the phenomena governing their conservation and the control of their storage techniques are decisive for the survival of the world's population which records growth rates barely conceivable, moving humanity from 1.5 billion people around 1850 to more than 7 billion today [2]. The storage conditions, the physiological characteristics of the grain, type of cereal and grain cereals varieties and their origins, contributed significantly in the degree of infestation, species richness and the level of presence of insects [3]. In the case of wheat, these insects can cause considerable losses, up to 50% [4, 5].

The wheat granary weevil *Sitophilus granarius* L. is one of the most widespread and destructive primary insect pests of stored cereals such as wheat, maize, rice, oat, sorghum and barley [6]. In addition to the physical damage that it causes to grain, this insect also allows the entry of pathogenic organisms, such as fungi or bacteria [7]. *S. granarius* adults can survive

unfavorable conditions in the structure of storage facilities for some time [8].

Nowadays, insect control strategy in stored-food products relies heavily upon the use of gaseous fumigants and residual insecticides, both of which pose serious hazards to warm-blooded animals and the environment [9], also generated the problem of resistance to phosphine, malathion, pyrethroids, methoprene, hydroxypropene [10-13].

In recent years, there is an increasing attention on the control of storage pests by natural products, including plant extracts, essential oils and their pure components [14]. Their use has been the subject of several research projects in the last decade and aroused a strong scientific interest reflected in the number of works dealing with the effectiveness of essential oils in the protection of grains and stored products [15-22].

The toxicity of a large number of plant extracts, essential oils and their constituents has been assessed against *S. granarius* [23-30, 9]. Large number of studies involving insecticidal activity of *Mentha* species (Repellent properties, Fumigation activity, antifeedant activity,...) against adult of storage pests were reported [31].

Since it was not done before, the aim of this work is to evaluate the insecticidal activity of *Mentha rotundifolia* essential oil against *Sitophilus granarius*, a well-known pest that causes an economically important yield loss in storage silos.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and essential oil extraction

The samples of *M. rotundifolia* used in our study were collected on June 2014 from Chouf Lakdad region (Setif, Algeria). A sample of 100 g of the air dried plant was subjected to hydrodistillation for 3h, using a Clevenger type apparatus [32] to produce essential oil. *M. rotundifolia* essential oil was preserved in an amber flask at low temperature (4°C) until further analysis.

Gas chromatography–mass spectrometry analysis (GC/MS)

The essential oil performed on Agilent Technologies GC 7890A with a built-in 5975 Triple Axis Detector MS system, equipped ionization system, HP5-ms (30 m x 250 mm x 0.25 mm) column and ionization energy (70 eV) for GC-MS detection. The helium was used a carrier gas at a flow rate (1 ml.min⁻¹). The same column temperate was achieved with GC analysis given above in our laboratory, by comparison of their mass spectral fragmentation patterns (WILLEY and NIST database/Chem Station data system) and their retention indices (determined with reference to homologue series of normal alkanes).

Insect culture

S. granarius cultures were reared in laboratory at 27±2 °C and 60±5 r.h. in a dark climate chamber in the Yapraklı Vocational School, Department of Animal and Plant Production, at Çankırı Karatekin University. The food medium used was wheat for *S. granaries* and 1-2 month-old adults were used in trials. Tests are also carried out in under the same condition and the same laboratory.

Insecticidal activity

Insecticidal contact toxicity assay of essential oil on *S. granarius*

The *M. rotundifolia* essential oil was diluted with acetone to obtain 4%, 2%, 1%, 0,75% and 0,50

(v/v) doses. The essential oil was applied at the rate of 1 µl/insect with a 50 µl Hamilton syringe [33]. Controls were determined using acetone. The essential oil was applied topically to the dorsal surface of thorax of the insects [34]. The treated insects were transferred to the 60 mm diameter Petri dishes. The Petri dishes were incubated at 25±2 °C and the number of dead insects was recorded after 24 h. For each replication, 10 insect were used and each experiment was repeated five times.

Fumigant insecticidal toxicity assay of essential oil on *S. granaries*

The *M. rotundifolia* essential oil was diluted with acetone to obtain 1%, 0,50% and 0,25 (v/v) doses. In the experiments were used glass tubes (10ml). Adults of *S. granarius* were transferred to glass tubes. The discs were cut 1 cm diameter from filter paper. The stock solutions of oils (10µl) were impregnated to these discs with micropipette. Controls were determined using acetone. The discs were left 5 min. open to evaporate the acetone. The discs were attached to the rubber caps of the test tubes with a needle and caps were closed. The glass tubes were incubated at 25±2 °C and the number of dead insects was recorded after 24 h. For each replication, 10 insect were used and each experiment was repeated three times.

Statistical analysis

The activity results obtained in the insecticidal activity assays were transformed into percent death values; which were used to obtain the arcsin values [35]. The arcsin values were subjected to variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test with P < 0.05 significance level. All of the statistical analysis were performed with Minitab Release 14 program [36].

RESULTS

The essential oil composition of *M. rotundifolia* was given in Table 1. Fourteen compounds were identified. The 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- is the major constituent of this oil with a rate of about 89.09%. The remainder consists of monoterpenes and sesquiterpenes.

The examination of Table 1 revealed the presence in *M. rotundifolia* essential oil of certain identical compounds (β-Pinene). Two minor compounds with levels not exceeding 0.5% of the total essential oil were identified: 1-Octen-3-ol, acetate (0.29%) and Borneol (0.38%).

Table-1: Chemical composition of *M. rotundifolia* essential oil

Compound number	RT (mn)	RI	%	Name
1	11.751	907	1.18	α -Pinene
2	12.951	947	0.54	β -Pinene
3	13.135	953	1.17	β -Pinene
4	13.337	959	0.68	β -Pinene
5	14.749	1001	1.74	β -Terpinyl acetate
6	17.304	1077	0.29	1-Octen-3-ol,acetate
7	19.619	1144	0.38	Borneol
8	22.873	1237	0.52	Carvone oxide
9	26.509	1346	89.09	3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-
10	27.352	1372	0.77	3-Methyl-2-pent-2-enyl-cyclopent-2-enone
11	27.548	1378	1.25	Cineralone
12	28.212	1397	0.91	Caryophyllene
13	28.867	1419	0.70	β -Farnesene
14	30.078	1458	0.79	β -Cubebene

The results in Table-2 show that the contact insecticidal activity of *M. rotundifolia* essential oil against *S. granarius* revealed a very interesting

biological activity. At 4% concentration of this oil, insect mortality is marked by 100% after 24 hours of incubation.

Table-2: Contact activity of *M. rotundifolia* essential oil against *Sitophilus granarius* after 24h of incubation

Doses %	Mortality \pm StDEV %
Control	0.00 \pm 0.00
4	100.00 \pm 0.00
2	68.46 \pm 1.46
1	62.05 \pm 0.22
0.75	29.52 \pm 1.72
0.50	0.00 \pm 0.00

(F=328,11; d.f.=5,24; P=0.000)

The analysis of Table 3 shows a very interesting fumigant insecticidal activity of *M. rotundifolia* essential oil with a rate that exceeds 80%

of mortality at 0.5% concentration and 100% of mortality at 1% concentration, after 24 hours of incubation.

Table-3: Fumigant activity of *M. rotundifolia* essential oil against *Sitophilus granarius* after 24h of incubation

Doses %	Mortality \pm StDEV %
Control	0.00 \pm 0.00
1	100.00 \pm 0.00
0,5	83.64 \pm 0.67
0,25	0.00 \pm 0.00

(F=1158,24; d.f.=3,8; P=0.000)

DISCUSSION

With the 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- as major component, the essential oil of our study does not exhibit the same chemical characteristics of the essential oils of *M. rotundifolia* of Algerian origin: as the major compound, piperitone oxide (72.87%) [37], pulegone (70.4%) [38], piperitoneone (33.06%) [39], piperitone oxide (Miliana: 31.4%, Rouina: 19.7%) and piperitenone oxide (Miliana: 27.8%; Rouina: 29.4%) representing chemo type 1[40]. For the sample from Chlef, the major components are piperitenone (54.9%) and piperitenone oxide (17.6%) representing chemo type 2. While the piperitenone oxide

was found with 38.6% in Rouina and 23.5% in Miliana [41].

Previous studies in other countries on the chemical composition of the essential oil of *M. rotundifolia* have revealed the existence of chemo types with different major components, such as β -Caryophyllene (26.67%) in Beja and pulegone (32.09%) in Bizerte [42], 2,4 (8), 6-p-menthatrien-2,3-diol in Cuba [43], linolool (35.32%) in Egypt [44], piperitol (57.6%) in Spain [45], Pulegone (85%) [46], Menthol (40.50%) [47] in Morocco. Piperitenone oxide has been reported as a characteristic constituent of volatile oils of *M.*

rotundifolia chemo types with 80.8% in Uruguay [48] and 81.5% in Germany [49].

Despite the large number of chemical types listed in the literature for essential oils of *M. rotundifolia* L., the predominant presence of 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3- (3-methyl-2-butenyl) - of our oil has never been described, which gives a certain originality to this sample.

Differences in chemical composition observed for essential oils is likely related to abiotic factors such as climate specific regions of provenance samples, geographical factors such as altitude and soil type [40].

According to [42], genetic factors should not be excluded in explaining the chemo-variation of essential oils. Moreover, chemical differences in the oil composition of plant species in relationships with harvesting season were reported [50].

For insecticidal contact activity and after application of the essential oil, we note very high mortality rates that can vary from 60 to 100% depending on the concentration (between 1 and 4%), which is probably due to the synergistic effect between the majority compound and /or the one of the elements present in the composition of this oil.

In general, the toxicity of essential oils isolated from plant samples against stored-product pests is related to their major components [26]. The insecticidal activity against *S. granarius* of the essential oil of several plants was evaluated [51-53, 25-27, 9, 29]. Indeed, the essential oil of *M. rotundifolia* contains mainly hydrocarbon monoterpenes such as α -pinene whose insecticidal properties have already been demonstrated and oxygenated monoterpenes such as borneol, cinerolone whose insecticidal properties have also already been demonstrated against several insects.

However, it would be difficult to think that the insecticidal activity of the oil is limited only to some of its major constituents; it could also be due to certain minority constituents or to a synergistic effect of several constituents [54]. The toxic effects of essential oils depend on the insects species, the time of exposure and the plant [55]. For this last point, the essential oil of *Crithmum maritimum* gave low contact activity against *S. granaries* [30].

Fumigant insecticidal activity, shows that essential oils are sources of biologically active vapors that are potentially effective insecticides [26]. Therefore, the possibility of using these natural fumigants to control insects in stored products may be worthy of further investigation [56].

Among the components of the essential oil, monoterpenoids have attracted the greatest attention for

their fumigant activity against insects of stored products [57]. Several reports indicate that monoterpenoids cause insect mortality by inhibiting the activity of acetylcholinesterase enzyme (AChE) [58]. Therefore, it is suspected that, in addition to inhibition of AChE, monoterpenes may also act on other vulnerable sites (for example monooxygenases dependent on cytochrome P450) [59].

The toxicity of the essential oils against the insects of the stored products is influenced by the chemical composition of the oil, depending on source, season and ecological conditions, extraction method, extraction time and plant part used [60].

It is well known that for fumigants, the active stages (adults and non-diapausing larvae) of insects are more susceptible than the sedentary stages (eggs and pupae) due to differences in their respiratory rate [57].

Laboratory tests with plant products in the presence of a stored product such as wheat proved less effective than in the absence of the stored product, mainly due to high sorption of the oil/components by the commodity [61].

In conclusion the essential oil obtained from *M. rotundifolia* afforded high contact and fumigant insecticidal activity against to the major stored product insects namely *S. granarius*. The rapid action of the oil in inducing as much as 100 % mortality within a 24 hour exposure period indicated that it could be a promising fumigant agent against the indicated stored product pest. Considering the results of the contact and fumigant insecticidal activity in this study, the essential oil of *M. rotundifolia* has the potential to be employed in the control of *S. granarius*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully thank Pr. Boulaacheb Nacira for the identification of studied plant. The results presented in this article was obtained through a study period -by the intervention of Pr. Akkal Salah- in the laboratory of Chemistry, Faculty of Science, Çankırı Karatekin University.

REFERENCES

1. Fourar-Belaifa R., & Fleurat-Lessard, F. (2015). Évaluation expérimentale de la sensibilité aux attaques du charançon du riz de variétés d'espèces céréalières cultivées en Algérie. *Cah Agric*, vol. 24, N° 5,283-291.
2. Mason A., Lee R., Abrigo M., & Lee S. H. (2017). Support Ratios and Demographic Dividends: Estimates for the World United Nations Department of Economic and Social Affairs Population Division Technical Paper No. 2017, 47 P.
3. Bounechada, M., Fenni M., & Benia F. (2011). Survey of Insects Pest Stored and Biological Control of *Trogoderma Granarium* Everts in Setifian

- Region (North-East of Algeria). *Bulletin UASVM Agriculture*, 68(1), 70-74.
4. Mebarkia, A. K., Benkohila H. S., Hamza, M., & Makhlouf M. (2012). Efficacité d'une protéine entomotoxique du type A1b des graines de Légumineuses. *Agriculture N°3*
 5. De Lira, C. S., Pontual E. V., De Albuquerque L. P., Paiva, L. M., Paiva, P. G., De Oliveira, J. V., Napoleao, T. H., & Navarro, D. M. A. F. (2015). Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). *Crop Protection* 71:95-100.
 6. Karakas, M. (2016). Toxic, repellent and antifeedant effects of two aromatic plant extracts on the wheat granary weevil, *Sitophilus granarius* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* 4(5): 870-874.
 7. Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food Chemistry Toxicology* 46:446-475.
 8. Strelec, I., Kučko, L., Roknić, D., Mrša, V., & Ugarčić-Hardi, Ž. (2012). Spectrofluorimetric, spectrophotometric and chemometric analysis of wheat grains infested by *Sitophilus granarius*. *Journal of Stored Products Research*, 50, 42–48.
 9. Kordali, S., Yildirim, E., Yazici G., Emsen B., Kabaagac G., & Ercisli S. (2012). Fumigant Toxicity of Essential Oils of Nine Plant Species from *Asteraceae* and *Clusiaceae* against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 22(1), 11-14.
 10. Collins, P. J., Lambkin, T. M., Bridgeman, B.W., & Pulvirenti, C. (1993). Resistance to grain protectant insecticides in coleopterous pests of stored cereals in Queensland, Australia. *Journal of Economic Entomology*, Vol. 86, No. 2, pp. 239-245.
 11. Zettler, J. L., & Arthur, F. H. (2000). Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Protection*, Vol. 19, No. 8, pp. 577-582.
 12. Mohandass, S. M., Arthur, F. H., Zhu, K. Y., & Throne, J. E. (2006). Hydroprene: Mode of action, current status in stored-product pest management, insect resistance, and future prospects. *Crop Protection*, Vol. 25, No. 9, pp. 902–909.
 13. Rajendran, S., & Sriranjini, V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 44, No. 2, pp. 126-135.
 14. Aydin, T., Bayrak, N., Baran, E., & Cakir, A. (2017). Insecticidal effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) L. cones and its principal component, *xanthohumol*. *Bulletin of Entomological Research*, 1-7.
 15. Kordali, S., Cakir, A., Ozer, H., Cakmakci, R., Kesdek, M., & Mete, E. (2008). Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* 99, 8788–8795.
 16. Tozlu, E., Cakir, A., Kordali, S., Tozlu, G., Ozer, H., & Aytus Akcin, T. (2011). Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broad bean weevil (*Bruchus dentipes*). *Scientia Horticulturae* 130, 9–17.
 17. Gokce, A., Isaacs, R., & Whalon, M. E. (2012). Dose–response relationships for the antifeedant effects of *Humulus lupulus* extracts against larvae and adults of the Colorado potato beetle. *Pest Management Science* 68, 476–481.
 18. Aydin, T., Cakir, A., Kazaz, C., Bayrak, N., Bayir, Y., & Taskesenligil, Y. (2014). Insecticidal metabolites from the rhizomes of *Veratrum album* against adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Chemistry & Biodiversity* 11, 1192–1204.
 19. Bedini, S., Flamini, G., Girardi, J., Cosci, F. & Conti, B. (2015). Not just for beer: evaluation of spent hops (*Humulus lupulus* L.) as a source of eco-friendly repellents for insect pests of stored foods. *Journal of Pest Science* 88, 583–592.
 20. Jackowski, J., Hurej, M., Rój, E., Popłoński, J., Kośny, L., & Huszcza, E. (2015). Antifeedant activity of *xanthohumol* and supercritical carbon dioxide extract of spent hops against stored product pests. *Bulletin of Entomological Research* 105, 456–461.
 21. Stejskal, V., Hubert, J., Aulicky, R., & Kucerova, Z. (2015). Overview of present and past and pest-associated risks in stored food and feed products: European perspective. *Journal of Stored Products Research* 64, 122–132.
 22. Cakir, A., Ozer, H., Aydin, T., Kordali, S., Tazegul Cavusoglu, A., Akcin, T., Mete, E., & Akcin, A. (2016). Phytotoxic and insecticidal properties of essential oils and extracts of four *Achillea* species. *Records of Natural Products* 10, 154–167.
 23. Shayesteh, N., & Ashouri, S. (2010). Effect of four powdered spices as repellents against adults of *Rhyzopertha dominica* (F.), *Sitophilus granarius* (L.) and *Tribolium castaneum* (Herbst) in laboratory conditions. 10th International Working Conference on Stored Product Protection. *Julius-Kühn-Archiv*, 425: 799-804.
 24. Conti, B., Canale, A., Luigi, P., Flamini, C. G., & Rifici, A. (2011). *Hyptis suaveolens* and *Hyptis spicigera* (Lamiaceae) essential oils: qualitative analysis, contact toxicity and repellent activity against *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Dryophthoridae). *J Pest Sci* 84:219–228.
 25. Ebadollahi, A. (2011). Susceptibility of Two *Sitophilus* species (Coleoptera: Curculionidae) to Essential Oils from *Foeniculum vulgare* and *Satureja hortensis*. *Ecologia Balkanica*, Vol 3, 1-8p.
 26. Yildirim, E., Kordali, S., & Yazici G. (2011). Insecticidal effects of essential oils of eleven plant

- species from Lamiaceae on *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Romanian Biotechnological Letters Vol. 16, N° 6*, 6702-6709.
27. Benelli, G., Flamini G., Canale A., Molfetta I., Cioni P. L., & Conti, B. (2012). Repellence of *Hyptis suaveolens* whole essential oil and major constituents against adults of the granary weevil *Sitophilus granarius*. *Bulletin of Insectology* 65 (2): 177-183.
 28. Yildirim, E., Aslan, A., Emsen, B., Cakir, A., & Ercisli, S. (2012). Insecticidal Effect of *Usnea longissima* (Parmeliaceae) Extract against *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae). *Int. J. Agric. Biol.*, 14: 303–306.
 29. Norambuena, C., Silva, G., Urbina, A., Figueroa, I., & Rodríguez-Maciél, J. C. (2016). Insecticidal activity of *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) essential oil against *Sitophilus* spp. (Coleoptera Curculionidae). *Chilean Journal of Agricultural Research* 76 (3): 330-336.
 30. Polatoğlu, K., Karakoç, Ö. C., Yücel, Y. Y., Gücel, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., & Demirci F. (2016). Insecticidal activity of edible *Crithmum maritimum* L. essential oil against Coleopteran and Lepidopteran insects. *Industrial Crops and Products* 89: 383–389.
 31. Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products* 34: 802-817.
 32. Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* 17, 346-341.
 33. Gökçe, A., Stelinski, L. L., Whalon, M. E., & Gut, L. J. (2010). Toxicity and antifeedant activity of selected plant extracts against larval oblique-banded leaf roller, *Choristoneura rosaceana* (Harris). *Open Entomol. J.* 3, 30–36.
 34. Polatoğlu, K., Karakoç, Ö. C., Gökçe, A., Gören, N. (2011). Insecticidal activity of *Tanacetum chiliophyllum* (Fisch. & Mey.) var *monocephalum* Grierson extracts and a new sesquiterpene lactone. *Phytochemistry Letters* 4, 432-435.
 35. Zar, J. H. (1996). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.
 36. Mckenzie, J. D., & Goldman, R. (2005). *The Student Guide to MINITAB Release 14 Manual*. Pearson Education, Boston, MA.
 37. Arab, R., Bounechada, M., & Ramdani, M. (2016). Chemical composition and insecticidal activity of *Mentha rotundifolia* L. on *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) from Algeria. *Advances in Environmental Biology*, 10 (10): 13-19.
 38. Brahmi, F., Adjaoud, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Falconieri, D., Yalaoui-Guellal, D., Elsebai, M. F., Madani, K., & Chibane, M. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*. 88: 96-105.
 39. Lehabab, A. (2013). Etude phytochimique et évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits de *Mentha rotundifolia* L. (Domrane) de la région de Tlemcen Composition chimique des huiles essentielles. Mémoire de Master en Biologie, Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, 57p.
 40. Brada, M., Bezzina, M., Marlier, M., Carlier, A., & Lognay, G. (2007). Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. *J. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11, 3–7.
 41. Brada, M., Bezzina, M., Marlier M., & Lognay G. C. (2006). Chemical Composition of the Leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) from Algeria. *Journal of Essential Oil Research* 18: 663-665.
 42. Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi S., Aouadhi, C., Chograni, H., Zaouali, Y., Zoghlami, N., & Mliki, A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Industrial Crops and Products* 49: 883-889.
 43. Pino, J. A., Rosado, A., & Fuentes, V. (1999). Chemical composition of the leaf oil of *Mentha rotundifolia* (L.) Hudson from Cuba. *J. Essent. Oil Res.* 11, 241–242.
 44. Aziz, E. E., & Abbass, M. H. (2010). Chemical composition and efficiency of five essential oils against the pulse beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) on *Vigna radiata* seeds. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*. 8 (4): 411-419.
 45. Raya, M. D. P., Utrilla, M. P., Navarro, M. C., & Jimenez, J. (1990). CNS activity of *Mentha rotundifolia* and *Mentha longifolia* essential oil in mice and rats. *Phytotherapy Res.* 4, 232–234.
 46. El Arch, M., Satrani, B., Farah, A., Bennani, L., Briky, D., Fechtel, M., Blaghen, M., & Talbi, M. (2003). Chemical composition and antimicrobial and insecticidal activities of the essential oil in *Mentha rotundifolia* from Morocco. *Acta Bot. Gallica* 150 (3)267–274.
 47. Derwich, E., Benziane, Z., Taouil, R., Senhaji, O., & Touzani, M. (2010). Comparative Essential oil Composition of Leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a Traditional Herbal Medicine in Morocco; *Am. Eurasian J. Sustain. Agric.*, 4(1): 47-54.
 48. Lorenzo, D., Paz, D., Dellacassa, E., Davies, P., Vila, R., & Canigueral, S. (2002). Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. *Bras. Arch. Boil. Technol.* 45 (4), 519–524.
 49. Nagell, A., & Hefendehl, F. W. (1974). Composition of the essential oil of *Mentha rotundifolia*. *Planta Med.* 26, p. 1–8.
 50. Giray, E. S., Kirici, S., Kayab, D. A., Türk, M., Sönmez, Ö., & Inan, M. (2008). Comparing the effect of sub-critical water extraction with

- conventional extraction methods on the chemical composition of *Lavandula stoechas*. *Talanta* 74, 930–935.
51. Yildirim, E., Kesdek, M., & Kordali, S. (2005). Effects of essential oils of three plant species on *Tribolium confusum* du Val and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae and Curculionidae). *Fresenius Environmental Bulletin* 14, 574-578.
 52. Kordali, S., Aslan, I., Calmasur, O., & Cakir A. (2006). Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Ind. Crops. Prod.* 23:162–170.
 53. Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A., Kesdek, M., Kaya, Y., & Kilic, H. (2008). Antimicrobial and insecticidal activities of essential oil isolated from Turkish *Salvia hydrangea* DC. Ex Benth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 360-368.
 54. Ndomo, A. F., Tapondjou, A. L., Tendonkeng, F. & Tchouanguep, F. M. (2009). Evaluation des propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae). *Tropicultura* 27(3), 137-143.
 55. Kim, S. I., Roh, J. K., Kim, D. Y., Lee, H. S., & Ahn, Y. J. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*. 39: 293-303.
 56. Shaaya, E., Ravid, U., Paster, N., Juven, B., Zisman, U., & Pissarev, V. (1991). Fumigant toxicity of essential oils against four major stored product insects. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 499–504.
 57. Rajendran, S., & Sriranjini, V. (2008). Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, Vol. 44, No. 2,126-135.
 58. Houghton, P. J., Ren, Y., & Howes, M. J. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* 23, 181–199.
 59. Ketoh, G. K., Glitho, A. I., & 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, 174–182.
 60. Lee, S. E., Lee, B. H., Choi, W. S., Park, B. S., Kim, J. G., & Campbell, B. C. (2001). Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). *Pest Management Science* 57, 548–553.
 61. Lee, B. H., Annis, P. C., Tumaalii, F., & Lee, S. (2003, June). The potential of 1, 8-cineole as a fumigant for stored wheat. In *Proceedings of the Australian Postharvest Technical conference, Canberra*.

ملخص

يشهد استخدام المبيدات الحيوية رغبة متجددة في حماية النباتات . سلطت هذه الدراسة الضوء على نشاط المبيد الحيوي للمستخلصات والزيت الأساسي لـ *Mentha rotundifolia* التي تقطعت في منطقة سطيف ، لمحاربة آفات مختلفة. كشف تحليل HPLC عن غنى المستخلصات المدروسة بـ scutellarin الذي سجل مستخلص الميثانول أعلى تركيز له (40.24 مجم / كجم). أظهر تحليل الزيت الأساسي بواسطة GC / MS وجوداً سائداً لـ 3-Cyclopenten-1-one و 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- (hydroxy-3-). أظهر تحليل الزيت الأساسي بواسطة GC / MS وجوداً سائداً لـ 3-Cyclopenten-1-one و 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-. سجل نشاط المبيد الحشري عن طريق الاتصال واستنشاق الزيوت الأساسية والمركب المعزول من هذا الزيت ضد سوسة القمح *Sitophilus granarius* ، معدل وفيات كامل تم الحصول عليه بعد 24 ساعة من الحضانة. أظهر نشاط المبيدات الحشرية من الزيت العطري لـ *M. rotundifolia* ضد *Sitobion avenae* و *Rhopalosiphum padi* ، من الحبوب ، زيادة في الوفيات اعتماداً على مدة تعرض حشرات المن للزيوت واعتماداً على التركيزات المدروسة. هذا الزيت العطري له تأثير طارد قوي ضد *R. padi* و *S. avenae*. أظهر النشاط المضاد للفطريات في المختبر ، بعد 7 أيام من الحضانة ، من المستخلص الإيثانولي والميثانولي ضد *Alternaria alternata* و *Fusarium oxysporum* ، فطريات معزولة من الطماطم ، تثبيطاً معنوياً لنمو الفطريين . كشف النشاط المضاد للفطريات من الزيت العطري عن تثبيط تام لنمو الفطريين بعد 7 أيام من الحضانة. إن الأنواع *M. rotundifolia* بتراء مستخلصاتها وزيتها الأساسي بالمستقلبات الثانوية ، مؤهلة لتكون بديلاً مثيراً للاهتمام لحماية النباتات.

الكلمات المفتاحية : *Mentha rotundifolia* ، سوسة القمح ، حشرات المن ، طارد ، تثبيط نمو الفطر ، مستقلبات ثانوية ، سطيف.

Résumé

Le recours aux biopesticides connaît un regain d'intérêt en protection des végétaux. Cette étude a mis en exergue l'activité biocide des extraits et de l'huile essentielle de *Mentha rotundifolia* récoltée dans la région de Sétif, à l'égard de différents bioagresseurs. L'analyse par CLHP a révélée la richesse majoritaire des extraits étudiés par la scutellarine dont l'extrait méthanolique a enregistré la concentration la plus élevée (40.24 mg / kg). L'analyse de l'huile essentielle par GC/MS a révélée l'existence majoritaire de 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- avec un pourcentage de 89.09%, composé qui n'a jamais été trouvé dans l'huile essentielle de *M. rotundifolia*. L'activité insecticide par contact et par inhalation de l'huile essentielle et du composé isolé de cette huile contre *Sitophilus granarius*, charançon du blé, a enregistré une mortalité totale obtenue après 24h d'incubation. L'activité insecticide de l'huile essentielle de *M. rotundifolia* vis-à-vis de *Rhopalosiphum padi* et *Sitobion avenae*, pucerons des céréales, a montré une augmentation de la mortalité en fonction de la durée d'exposition des pucerons à l'huile et en fonction des concentrations étudiées. Cette huile essentielle présente un fort pouvoir répulsif à l'égard des adultes de *R. padi* et *S. avenae*. L'activité antifongique *in vitro*, après 7 jours d'incubation, de l'extrait éthanolique et méthanolique vis-à-vis *Alternaria alternata* et *Fusarium oxysporum*, champignons isolés sur tomate, a montré une inhibition importante de la croissance mycélienne des deux espèces fongiques. L'activité antifongique de l'huile essentielle a révélée une inhibition totale de la croissance mycélienne des deux espèces, après 7 jours d'incubation. L'espèce *M. rotundifolia* par la richesse de ses extraits et de son huile essentielle en métabolites secondaires, est qualifiée d'être une alternative naturelle intéressante pour la protection des végétaux.

Mots clés : *Mentha rotundifolia*, charançon du blé, pucerons des céréales, répulsif, inhibition de la croissance mycélienne, métabolites secondaires, Sétif.

Abstract

The use of biopesticides is seeing renewed interest in plant protection. This study highlighted the biocidal activity of the extracts and the essential oil of *Mentha rotundifolia* harvested in the region of Setif, with regard to various pests. HPLC analysis revealed the majority of extracts studied by scutellarin whose methanolic extract recorded the highest concentration (40.24 mg / kg). Analysis of the essential oil by GC / MS revealed the predominant existence of 3-Cyclopenten-1-one, 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl) - with a percentage of 89.09%, compound that has never been found in the essential oil of *M. rotundifolia*. The insecticidal activity by contact and inhalation of the essential oil and the isolated compound of this oil against *Sitophilus granarius*, wheat weevil, recorded a total mortality obtained after 24 hours of incubation. The insecticidal activity of *M. rotundifolia* essential oil against *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*, cereal aphids, showed an increase in mortality depending on the duration of exposure of aphids to oil. This essential oil has a strong repellent effect against adults of *R. padi* and *S. avenae*. The antifungal activity *in vitro*, after 7 days of incubation, of the ethanolic and methanolic extract against *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*, fungi isolated on tomato, showed a significant inhibition of the mycelial growth of the two fungal species. The antifungal activity of the essential oil revealed a total inhibition of the mycelial growth of the two species after 7 days of incubation. The species *M. rotundifolia* by the richness of its extracts and its essential oil in secondary metabolites, is qualified to be an interesting natural alternative for the protection of the plants.

Key words: *Mentha rotundifolia*, wheat weevil, cereal aphids, repellent, inhibition of mycelial growth, secondary metabolites, Setif.