

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou

**Faculté des Sciences Biologiques et des
Sciences Agronomiques**

**Département de
Biochimie et Microbiologie**



**Thèse Présentée en vue de l'obtention
du diplôme de: Doctorat es Sciences
Spécialité : Biotechnologie**

THEME

**Caractérisation biochimique et activités biologiques des extraits de
l'olivier de Laperrine *Olea europaea* subsp *laperrinei*
(Batt. et Trab.) Cifferi**

Présentée par Souad LAHCENE

Devant le jury

Présidente	Mme Djamila ALI AHMED SADOUDI	Professeur à l'UMMTO
Directeur	Mr Karim HOUALI	Professeur à l'UMMTO
Co-Directrice	Mme Mebarka HARCHAOUI OUAFI	Professeur à l'USTHB
Examineurs	Mme Yasmina BENAZZOUG	Professeur à l'USTHB
	Mr Djamel BAALI-CHERIF	Professeur à l'ENSA
	Mme Adiba BENAHMED DJILALI	MCA à l'UMMTO

Année universitaire

2019-2020



REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, il m'est agréable de présenter mes plus vifs remerciements à Mme le professeur Ali Ahmed Sadoudi D. de l'UMMTO, pour me faire l'honneur de présider le jury qui va examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour m'avoir facilité la procédure administrative, étape cauchemar de tous les thésards.

J'ai toujours rêvée d'avoir Mme le professeur Benazzoug Y. dans l'un de mes jury de thèse depuis que je l'ai connue en tant qu'enseignante à l'USTHB. Aujourd'hui elle me permet de réaliser ce rêve en acceptant d'examiner ce travail. C'est avec gratitude que je l'en remercie.

Je remercie vivement et doublement Mr le professeur Baali-Cherif D. de l'ENSA d'El Harrach. D'abord pour m'avoir fait connaître l'olivier de Laperrine, en effet; c'est au cours de la soutenance de son doctorat d'état que j'ai appris à respecter et à aimer cet arbre qui nous donne l'espoir de sauver un jour l'olivier cultivé du réchauffement climatique. Ensuite de me faire l'honneur de participer à ce jury en tant qu'examineur.

Je tiens à présenter mon profond respect et mes plus vifs remerciements au Dr Benahmed Djilali A., maître de conférence à l'UMMTO de m'honorer de sa présence en tant qu'examinatrice et de me faire profiter de son expérience dans le domaine des polyphénols.

Je suis particulièrement reconnaissante envers le professeur Harchaoui-Ouafi M. de l'USTHB qui était présente pour moi, elle m'a soutenue et défendue au moment de ma transition. Je la remercie du fond du cœur de m'avoir fait l'honneur de co-diriger ce travail.

J'aimerais exprimer ma profonde gratitude à mon mentor, le professeur Houali K. de l'UMMTO. Il a ce don de faire ressortir le meilleur de toutes les personnes qui ont la chance de le connaître et de donner à ses étudiants le meilleur de lui-même. Je le remercie du privilège qu'il m'a accordé en acceptant de diriger ce travail. Il m'a fait profiter de son soutien au quotidien, de ses conseils, de ses connaissances, de sa bienveillance, de sa gentillesse et surtout de sa volonté à voir aboutir ce travail.

Il m'a donné la chance de partager l'ambiance amicale et chaleureuse de son équipe qui a comme leitmotiv le partage et l'entre-aide.

J'ai été contente voir même heureuse et très chanceuse d'avoir travaillé avec le Dr Mestar-Guechaoui N. et le Dr Aiche-Iratni G., qui m'ont beaucoup aidé à travers les discussions animées et très constructives que nous avons eu au cours de mes manipulations, elles n'ont pas hésité à partager leurs expériences avec moi ce qui m'a grandement aidé à avancer dans mon travail.

Je remercie ma chère amie Mme Ammarkhodja N. de m'avoir aidé et soutenue tout au long de mon expérimentation et qui a grandement contribué à la saisie et à l'arrangement de mes références bibliographiques. Je lui souhaite toute la réussite qu'elle mérite d'avoir.

Je suis reconnaissante envers le Dr Taibi-Boumedjel F. de l'université de Annaba de m'avoir permis de réaliser mon expérimentation sur l'aspect bio-insecticide des extraits de l'olivier de Laperrine dans son laboratoire et je remercie vivement le Dr Boumendjel M. d'avoir rendu cette manipulation possible.

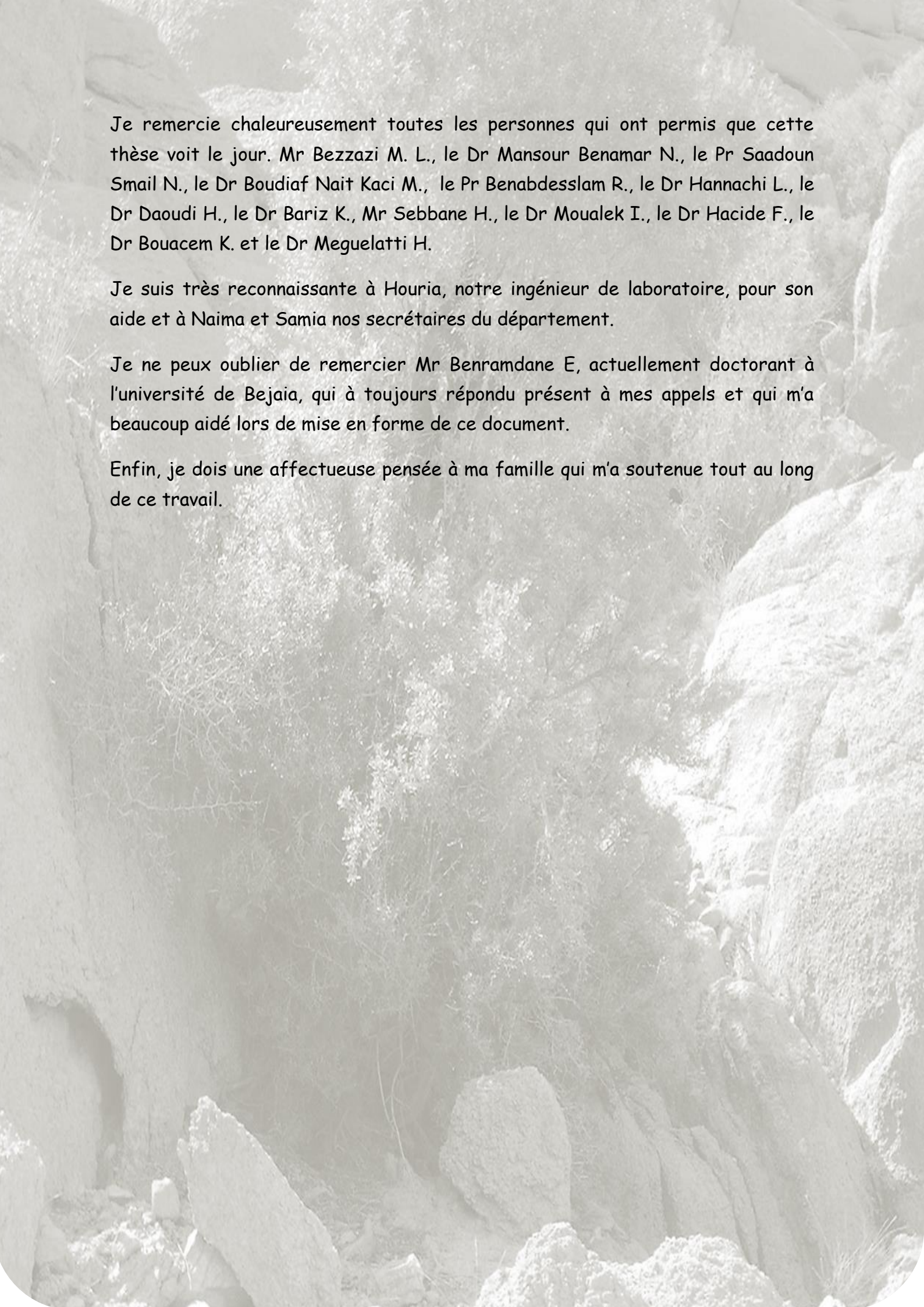
Je remercie du fond du cœur Mme Ali Ahmed S. et le Dr Liman A., pour leur aide inestimable concernant les traitements statistiques de mes données et l'interprétation des résultats.

Je tiens à remercier le Dr Bettache Z. et le Dr Benakmoune T. pour les HPLC sur les différents extraits de l'olivier de Laperrine réalisées au sein de leur laboratoire.

C'est avec une profonde gratitude que je remercie Mme le Pr GacebTerrak R. de m'avoir aidé à identifier les principaux composés chimiques des extraits de l'olivier de Laperrine.

Je tiens à remercier et à exprimer ma gratitude à Mme Sahki R. de la station de l'INRF de Tamanrasset, de m'avoir facilité la récolte du matériel végétal sur le terrain. Je la remercie pour sa présence, ses conseils, sa patience et sa bienveillance à mon égard

J'adresse un merci amical et reconnaissant à Mme Moulahoum A. et au Dr Benghanem N. pour leurs nombreuses lectures, pour leur soutien, leur extrême gentillesse, leur chaleur humaine et leur enthousiasme tellement communicatif qui m'a redonné ce courage qui me manquait parfois.



Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui ont permis que cette thèse voit le jour. Mr Bezzazi M. L., le Dr Mansour Benamar N., le Pr Saadoun Smail N., le Dr Boudiaf Nait Kaci M., le Pr Benabdesslam R., le Dr Hannachi L., le Dr Daoudi H., le Dr Bariz K., Mr Sebbane H., le Dr Moualek I., le Dr Hacide F., le Dr Bouacem K. et le Dr Meguelatti H.

Je suis très reconnaissante à Houria, notre ingénieur de laboratoire, pour son aide et à Naima et Samia nos secrétaires du département.

Je ne peux oublier de remercier Mr Benramdane E, actuellement doctorant à l'université de Bejaia, qui à toujours répondu présent à mes appels et qui m'a beaucoup aidé lors de mise en forme de ce document.

Enfin, je dois une affectueuse pensée à ma famille qui m'a soutenue tout au long de ce travail.

ملخص

شجرة زيتون اللابرين من الأنواع المستوطنة التي لوحظت في الصحراء الوسطى، الجزائر النيجر. والسودان. انه قريب من شجرة الزيتون المتوسطية ويمثل موردا وراثيا هاما. إن جودة مقاومته للجفاف ، تجعله مصدراً محتملاً لمختلف أصناف الزيتون المزروعة.

تتعلق هذه الدراسة بالتوصيف الكيميائي للمستخلصات من شجرة زيتون Laperrine وتقييم إمكاناتها المضادة للأكسدة والمبيدات الحيوية. في هذا السياق ، يتم تحديد نشاط مضادات الأكسدة في المختبر من خلال إجمالي سعة مضادات الأكسدة ، واختبارات FRAP ، DPPH ، H_2O_2 وتبييض بيتا كاروتين. سمح لنا التحليل الكيميائي باكتشاف أولوروبين ، هيدروكسي إيترزول ، لوتولين ، أبجينين ، حمض الكافيين ، روتين ، نارينجين-7-غلوكوسيد و لوتولين-7-غلوكوسيد. وقد أبرزت الجرعات الكيميائية التي طورتها الأشعة فوق البنفسجية المرئية مستويات عالية من الفينولات والفلافونويدات والعفص الكلي. يشرح ثراء مستخلصات البوليفينول الإمكانات العالية المضادة للأكسدة لشجرة زيتون اللابرين. تم اختبار تأثير المبيدات الحشرية البيولوجية للمستخلصات على *Ephestia kuehniella* ، وهي آفة ضد البقول الجافة . إن إدارتها عن طريق الاستنشاق إلى الشرائق الخارجة حديثاً تطيل مدة تطورها اليرقي وتزعج تكاثر البالغين. تم اختباره على الفراشات البالغة، حيث تسبب المستخلصات المختلفة الوفيات المبكرة.

كلمات البحث: *Olea europaea subsp. laperrinei*، HPLC ، البوليفينول ، نشاط مضاد للأكسدة ، مبيدات حشرية حيوية ، *Ephestia kuehniella* ، التكاثر

SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION.....	2
-------------------	---

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES

**1^{ERE} PARTIE: PRESENTATION DE L'OLIVIER DE LAPERRINE ET DE LA
PYRALE DE LA FARINE**

1-1	Caractéristiques générales de l'olivier de Laperrine.....	8
1-2	Présentation de la pyrale de la farine (<i>Ephesia kuehniella</i>).....	15

**2^{EME} PARTIE: ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES
DE L'OLIVIER DE LAPERRINE**

1-3	Généralités sur les radicaux libres.....	19
1-4	Généralités sur les métabolites secondaires	24
1-4-1	Les non flavonoïdes.....	26
1-4-1-1	Les acides phénols.....	26
1-4-1-2	Les tanins et les lignines.....	27
1-4-1-2-1	Les tanins.....	27
1-4-1-2-2	La lignine.....	27
1-4-2	Les flavonoïdes.....	28
1-5	Rôles et Activités biologiques des polyphénols.....	29
1-5-1	Rôles des tanins.....	30
1-5-2	Rôles des flavonoïdes.....	31
1-6	Mécanismes d'action des polyphénols.....	33
1-6-1	Transfert d'atome d'hydrogène.....	33
1-6-2	Transfert d'électron.....	33
1-6-3	Chélation des métaux de transition.....	33
1-7	Activités biologiques des l'olivier et des extraits de l'olivier.....	34

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES D'ETUDES

2-1	Matériel.....	37
2-1-1	Matériel végétal.....	37
2-1-2	Elevage de la pyrale au laboratoire.....	40
2-1-3	Prélèvements sanguins.....	40

2-2	Méthodes.....	41
2-2-1	Procédure d'extraction.....	41
2-2-1-1	Extraction aqueuse.....	41
2-2-1-2	Extraction éthanolique.....	42
2-2-1-3	Extraction acide.....	44
2-2-2	Analyse quantitative.....	45
2-2-2-1	Détermination de la teneur en phénols totaux.....	46
2-2-2-2	Détermination de la teneur en flavonoïdes totaux.....	46
2-2-2-3	Détermination de la teneur en tanins totaux.....	46
2-2-2-4	Dosage global des aglycones flavoniques.....	47
2-2-2-5	Dosage des anthocyanes.....	47
2-2-2-6	Dosage des C-glycosides.....	48
2-2-3	Analyse qualitative.....	48
2-2-3-1	Teneurs absolues des molécules biochimiques.....	48
2-2-4	Activités antioxydantes.....	49
2-2-4-1	Capacité antioxydante totale ou test du phosphomolybdate (TAC Assay).....	49
2-2-4-2	Détermination du pouvoir réducteur (FRAP Assay).....	49
2-2-4-3	Détermination de l'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH Assay).....	50
2-2-4-4	Inhibition du blanchiment du β -carotène (BCB Assay).....	51
2-2-4-5	Détermination de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	52
2-2-5	Test hémolitique.....	52
2-2-6	Activité bio-insecticide.....	52
2-2-7	Traitements des données.....	54

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1^{ERE} PARTIE: ACTIVITES ANTIOXYDANTES

3-1	Analyse quantitative.....	57
3-2	Analyse qualitative.....	60
3-3	Activités antioxydantes.....	61
3-3-1	Capacité antioxydante totale.....	61
3-3-2	Pouvoir réducteur	61
3-3-3	Activité de piégeage des radicaux libres DPPH.....	64
3-3-4	Inhibition du blanchiment du β -carotène.....	65
3-3-5	Activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	67
3-4	Test hémolitique.....	69
	Conclusion	69

2^{EME} PARTIE: ACTIVITE INSECTICIDE

3-2	Analyse quantitative.....	72
3-3	Analyse qualitative.....	73
3-4	Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur la reproduction d' <i>Ephesia kuehniella</i>	75
3-4-1	Effet des extraits bruts sur la période de développement nymphal.....	75
3-4-2	Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine, sur durée de la période de pré-oviposition.....	78
3-4-3	Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur la durée de la période d'oviposition.....	79
3-4-4	Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur la fécondité de la femelle d' <i>Ephesia kuehniella</i>	81
3-5	Effet des extraits bruts de l'Olivier de Laperrine sur la mortalité des adultes d' <i>Ephesia kuehniella</i>	83
	Conclusion.....	87
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	90
	INDEX DES TABLEAUX ET DES FIGURES	94
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	100
	ARTICLE.....	125

LISTE DES ABREVIATIONS

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié au hasard)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)
BP	Before Present (Nombre d'années avant 1950, date fixée arbitrairement comme année de référence et correspond aux premiers essais de datation par le carbone 14.)
EE	Extrait éthanolique
EA	Extrait aqueux
EF	Extrait éthéré de feuilles
BF	Extrait butanolique de feuilles
ET	Extrait éthéré de tiges
BT	Extrait butanolique de tiges
PT	Polyphénols totaux
FT	Flavonoïdes totaux
TT	Tanins totaux
EAG	Equivalent acide gallique
EQ	Equivalent quercétine
EAT	Equivalent acide tannique
EPC	Equivalent procyanidine
EO	Equivalent orientine
EAA	Equivalent acide ascorbique
EH	Equivalent hydroxytyrosol
EAC	Equivalent acide caféique
EC	Equivalent catéchine
ETR	Equivalent troxol
MS	Matière sèche
PV	Poudre végétale
RS	Résidu sec
TAC	Capacité antioxydante totale ou test du phosphomolybdate
FRAP	Pouvoir réducteur
BCB	Test d'inhibition du blanchiment du β -carotène

INTRODUCTION GENERALE

INTROCUCTION

Le Hoggar ou Ahaggar est situé au Sahara central, au Sud-est de l'Algérie. Il est limité au Sud par le Niger et à l'Est par la Lybie. Il occupe une vaste étendue entre 21° et 25° latitude Nord et 2° et 6° longitude Est, dont la superficie recouvre environ 450000 km². Il est représenté par un ensemble de montagnes dont les sommets atteignent 2000 à 3000 m d'altitude. L'extrême rigueur du climat se manifeste par des courants chauds et secs et des précipitations faibles et irrégulières (Baali-Cherif et *al.*, 2007).

Sa richesse floristique ne compte pas moins de 350 espèces végétales (Quezél, 1954). De nombreuses espèces endémiques y sont répertoriées, parmi lesquelles l'olivier de Laperrine. Ce dernier représente un élément fondamental de l'écosystème des montagnes du Hoggar (Baali-Cherif et Besnard, 2005; Baali-Cherif et *al.*, 2007; Besnard, 2009).

Cependant les conditions climatiques extrêmes associées à un très faible taux d'humidité auxquels sont soumises les populations d'olivier ont favorisé la sélection d'individus ayant développé une capacité adaptative qui leur permet de faire face à des conditions environnementales très arides. Cette stratégie adaptative se manifeste au niveau morphologique, physiologique et anatomique.

Ainsi et afin de limiter les pertes en eau par transpiration, il y'a une réduction de la surface foliaire de l'olivier. Les feuilles prennent alors une forme lancéolées-étroites (Baali-Cherif et Besnard, 2005).

Selon Baali-Cherif et *al.* (2007), les stomates sont abondants (263/mm) au niveau de la face inférieure de la feuille, moins exposée au soleil. De plus, la présence d'un grand nombre de trichomes recouvrant la face foliaire supérieure permet de les protéger en améliorant ainsi la tolérance à la sécheresse en limitant les pertes en eau par transpiration (Besnard et *al.*, 2012).

Le système racinaire de l'olivier s'adapte à la profondeur du sol en fonction de sa texture et de sa structure. Ainsi, en conditions de sécheresse, l'olivier a la capacité d'émettre des racines plus profondes à la recherche de l'humidité (Baali-Cherif, 2007).

Son adaptation à la pression pastorale se manifeste par un ralentissement marqué de la croissance, suite auquel l'arbre adopte une architecture buissonnante comprenant des rameaux épineux qui le protègent contre les herbivores (Baali-Cherif, 2007).

Exposé à l'extrême aridité du climat, l'olivier de Laperrine fructifie rarement dans son milieu naturel (Baali-Cherif et Besnard, 2005). En effet, seuls quelques individus sont capables de fleurir et produire des graines (Besnard et *al.*, 2007a). Les herbivores broutent les jeunes pousses réduisant ainsi la régénération naturelle, cette dernière est considérée comme nulle (Baali-Cherif et Besnard, 2005). En conséquence, la multiplication clonale permettant le maintien des génotypes est favorisée (Besnard et Baali-Cherif, 2009). Ainsi, sa capacité de rejeter de souche montre que ce taxon est capable de persister de très longues périodes de sécheresse par multiplication végétative. Il peut cependant revenir à une reproduction sexuée sous des conditions climatiques favorables (Besnard et *al.*, 2012).

Dans leurs travaux sur les populations d'olivier de Laperrine, Besnard et Baali-Cherif (2009), ont mis en évidence la présence de génotypes triploïdes plus vigoureux que les génotypes diploïdes et qui serraient préférentiellement sélectionnés en l'absence d'une régénération par voie sexuée.

L'étude de la diversité génétique dans les populations de l'olivier dans les massifs du Hoggar, du Tassili N'Ajjer et du Niger montrent que la richesse allélique dans le massif du Hoggar est supérieure à celle observée dans les autres massifs, suggérant que ce dernier est peut être le centre d'origine de l'olivier à partir duquel les autres massifs ont été peuplés (Besnard et al., 2007a; Besnard, 2009).

D'après Besnard et al. (2012), l'olivier de Laperrine représente une ressource génétique potentiellement intéressante pour l'olivier méditerranéen pour plusieurs raisons:

*Son adaptation à un environnement extrêmement sec en fait un bon candidat pour améliorer la tolérance à la sécheresse de l'olivier méditerranéen;

**Son fruit sucré est un trait qui pourrait être utilisé pour la diversification de l'olive cultivée.

La remarquable tolérance de l'olivier de Laperrine à son environnement se manifeste en outre, par la synthèse de substances spécifiques, ce sont les métabolites secondaires. Ces derniers sont nombreux et très diversifiés et permettent d'une part de réguler le déséquilibre généré par divers stress (Legrand, 2015) et d'autre part, ils jouent un rôle primordial dans la capacité adaptative (Caretto et al., 2015) et l'acclimatation (Di Ferdinando et al., 2014) de la plante à son milieu.

Les composés phénoliques représentent l'une des principales classes des métabolites secondaires. Leur accumulation dans les organes aériens (cuticule et cellules épidermiques des feuilles) est corrélée avec la protection des plantes contre le rayonnement solaire et la filtration des radiations UV-B qui peuvent causer des dommages au niveau des tissus photosynthétiques (Achat, 2013 ; Di Ferdinando et al., 2014).

Ces composés présentent un grand intérêt pour la santé, ils interviennent dans la prévention et le traitement de certains cancers, le traitement de maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives (Hadj Salem, 2009). Ce sont de puissants antioxydants capables de piéger les espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le fer et le cuivre (Pietta , 2000 ; Halbwirth, 2010) qui permettent de catalyser les oxydations (Guillouty, 2016).

De nombreux chercheurs (Le Tutour et Guedon, 1992 ; Tsimogiannis et al., 2007; Lee et al., 2009 ; Adjimani et Asare, 2015...) considèrent l'olivier (*Olea europaea*) comme une source d'antioxydants naturels qui peut être utilisée dans les industries agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Savarese et al., 2007). D'autres études ont mis en évidence les capacités antifongique et antimicrobienne de ses extraits de feuilles (Djenane et al., 2012). Cependant et à notre connaissance, aucun rapport portant sur l'activité antioxydante de l'olivier de Laperrine n'est disponible au jour d'aujourd'hui.

1 Les produits agricoles les plus échangés sur les marchés internationaux sont représentés
2 par les denrées stockées (Delimi et *al.*, 2013), dont les principaux ravageurs sont les insectes.
3 Ces derniers sont très nombreux et très diversifiés et les dégâts qui leurs sont liés sont
4 considérables. Selon les estimations de la FAO, 35 % des récoltes mondiales de céréales et de
5 légumineuses sont détruites par les insectes pendant leur stockage (Benayad, 2008)

6 Les denrées stockées représentent une source alimentaire et un habitat que ces insectes
7 contaminent avec leurs fèces, leurs toiles de soie, leurs cadavres et leurs mues, causant ainsi
8 des pertes quantitatives et qualitatives dans les stocks. Suite à la contamination par les
9 ravageurs des denrées stockées, ces dernières sont envahies par des champignons qui vivent
10 sur les graines infestées, en particulier les céréales (Aba Tournou, 2013). Ces champignons
11 ou moisissures appartenant entre autres, au genre *Fusarium*, secrètent des mycotoxines
12 appelées aflatoxines, qui selon Williams et *al.* (2012) ; Carrieri et *al.* (2013) sont de puissants
13 produits carcinogènes connus chez l'Homme et l'animal.

14
15 Ces insectes nuisibles appartiennent à plusieurs ordres mais les plus fréquents sont les
16 coléoptères et les lépidoptères (Delobel et Tran, 1993). L'ordre des lépidoptères regroupe les
17 pyrales ou teignes telles que la teigne du tabac et la pyrale de la farine. Ces insectes causent
18 des pertes importantes en Algérie et génèrent des coûts importants pour l'industrie
19 agroalimentaire (Hami et *al.*, 2005).

20
21 Pour lutter contre ces ravageurs, l'Homme préconise la lutte chimique par l'utilisation des
22 pesticides, moyen le plus efficace et le moins coûteux pour contrôler les insectes. Ainsi,
23 beaucoup de systèmes de stockage reposent sur l'utilisation d'insecticides de synthèse et de
24 fumigants, comme le bromure de méthyle et la phosphine pour lutter contre les ravageurs des
25 produits stockés (Kheirkhah et *al.*, 2015). Bien qu'économiques et efficaces, les pesticides
26 chimiques présentent l'inconvénient de provoquer une résistance chez les insectes traités
27 (Nayak et *al.*, 2003 ; Bilal et *al.*, 2015) et sont nocifs pour l'environnement et l'Homme (Taïbi
28 et *al.*, 2003). Pour ces raisons, les recherches s'orientent vers l'utilisation de substances
29 naturelles actives, non polluantes, pour une lutte moins nocive (Benayad, 2008), pour
30 l'environnement et pour l'Homme. De nombreuses études ont montré que les extraits de
31 plantes constituent une méthode alternative efficace de lutte contre les insectes ravageurs des
32 denrées stockées, parce qu'ils sont source de composés naturels bioactifs (Park et *al.*, 2003).
33 De plus leur utilisation en tant que bio-insecticides est de plus en plus utilisée (Cochereau,
34 1982). Ces insecticides naturels, dits insecticides de plantes, sont avantageux par la rapidité de
35 leur biodégradation (El Idrissi et *al.*, 2014 ; Aouati et Berchi (2015).

36
37 Dans l'optique de la valorisation des produits naturels, axe de recherche adopté par le
38 Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB) de la faculté de biologie de
39 l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou et dans le souci d'apporter une contribution à
40 une meilleure connaissance de notre patrimoine végétal et de le valoriser en tant que sources
41 potentielles d'antioxydants naturels et de bio-insecticide, nous nous sommes intéressés à
42 l'olivier de Laperrine, espèce emblématique des hautes montagnes Sahariennes.

43 Dans ce contexte, une évaluation des activités antioxydantes des extraits aqueux et
44 éthanolique du matériel végétal récolté est réalisée.

1 De surcroît, l'absence de travaux sur les effets bio-insecticides des extraits de l'olivier de
2 Laperrine a orienté notre recherche vers la mise en évidence de leur aptitude à jouer le rôle de
3 bio-insecticide contre *Ephestia kuehniella*, insecte ravageur des denrées stockées.

4
5 Le présent travail est structuré en trois chapitres. Une description botanique et écologique
6 de l'olivier de Laperrine et de la pyrale de la farine est présentée dans le chapitre I.

7 Dans le chapitre II, nous reprenons l'ensemble des techniques sur lesquelles se basent la
8 caractérisation quantitative et qualitative des extraits de l'olivier de Laperrine et l'évaluation
9 de leurs activités biologiques.

10 Le chapitre III traite du potentiel antioxydant et bio-insecticide sur la pyrale de la farine des
11 extraits de l'olivier de Laperrine. Enfin nous présentons une conclusion générale dans laquelle
12 nous proposons quelques perspectives.

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

PREMIERE PARTIE

**PRESENTATION
DE L'OLIVIER DE LAPERRINE
ET
DE LA PYRALE DE LA FARINE**

1-1-CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'OLIVIER DE LAPERRINE

Olea europaea subsp. *laperrinei* (Batt.et Trab.), ou olivier de Laperrine, connu aussi sous le nom de l'olivier du Sud est une sous-espèce d'olivier appartenant à la famille des *Oleaceae*. Ce taxon endémique, naturellement adapté aux zones arides est observé en Algérie uniquement dans les régions montagneuses du Sahara central depuis le sud algérien jusqu'au nord-est soudanais en passant par le Niger (Green, 2002 ; Baali-Cherif et *al.*, 2007). Proche de l'olivier du bassin méditerranéen il représente une ressource génétique importante pour la qualité de sa résistance à la sécheresse.

D'après Maire (1933) et Quez d (1978), c'est une forme relique résultant d'une ancienne population africaine (Besnard et *al.*, 2002), et selon Maley (1980), elle est originaire de la Rand Flora. Cette dernière, représente les vestiges d'une flore xérophile très ancienne répandue à travers toute l'Afrique (Monod, 1957) et adaptée au climat méditerranéen (Besnard et *al.*, 2002). Pour Quez d (1978) et Maley (1980), l'olivier de Laperrine est une espèce relique qui dérive des populations d'*Olea* ayant subsisté au Sahara au tertiaire avant l'aridification de cette région. Pour Angiolillo et *al.* (1999), l'olivier de Laperrine est le résultat d'une hybridation entre individus de l'Afrique tropicale et individus du Nord de l'Afrique.

Les conditions désertiques ont fait leur apparition au Sahara central au début du pliocène, et les oliviers ont trouvé refuge dans les massifs montagneux où les conditions étaient favorables à leur développement. L'aridification a commencé il y a 5 à 6 millions d'années, et s'est intensifiée jusqu'à la première phase pluviale du quaternaire (au pléistocène) où l'augmentation des précipitations a permis les échanges entre la région méditerranéenne et le Sahara central (Quez d, 1978).

D'après Quez d (1978) et Suc (1984) *Olea europaea* est considéré comme un élément floristique d'origine paléo-tropicale qui a colonisé le bassin méditerranéen à partir de l'Afrique tropicale. Des migrations successives entre l'Afrique centrale et le bassin méditerranéen ont pu avoir lieu durant les phases favorables du quaternaire (Besnard, 1999), et il est possible que l'olivier de Laperrine ait diffusé vers le bassin méditerranéen (Quez d, 1978; Maley, 1980).

Des études de la diversité cytoplasmique menées par Breton et *al.* (2006) et Besnard et *al.* (2007a), relèvent en effet, que les populations de l'olivier méditerranéen et de l'olivier de Laperrine ont un ancêtre maternel en commun. Le même cytotype se retrouve dans les deux populations et d'après Breton et *al.* (2006), il est probable que l'olivier méditerranéen ait hérité ce cytotype de l'olivier de Laperrine qui peut être considéré comme son ancêtre maternel.

L'olivier de Laperrine et l'olivier méditerranéen sont phylogénétiquement apparentés (Besnard et *al.*, 2007a). Ainsi, au cours de leurs investigations dans le Hoggar, Baali-Cherif et *al.* (2007), ont retrouvés les éléments d'une association végétale représentée par *Olea*

laperrinei et *Pistacia atlantica*, et qui a son équivalent dans la région méditerranéenne (Nord de l'Algérie), *Olea europaea europaea* et *Pistacia lentiscus*. Ces associations vicariantes entre le Hoggar et le Nord Algérien confirment bien la relation étroite qui existe entre l'olivier du Nord et l'olivier du Sud (Baali-Cherif, 2007).

Des flux de gènes entre les différents taxons ont pu avoir lieu pendant les périodes favorables, ce qui a contribué à l'évolution de l'olivier méditerranéen (Besnard et al., 2002).

D'après Rubio de Casas et al. (2006) et Besnard et al. (2013), la variété maghrébine "Dhokar" a une origine maternelle saharienne et résulte du mélange entre l'olivier de Laperrine et l'olivier méditerranéen. Cette variété apporte la preuve de l'implication de l'olivier de Laperrine dans la diversification de l'olivier cultivé (Besnard et al., 2013).

L'olivier appartient au complexe *Olea europaea* (Tab. I), défini par Green et Wickens (1989) sur des critères morphologiques et révisé par Green (2002). Des analyses du polymorphisme de l'ADN avec les marqueurs RAPD (Besnard et al., 2007a) et AFLP (Rubio de Casas et al., 2006), ont bien reconnu ce complexe, et ont permis de distinguer les six sous espèces comme proposé par Green (2002).

Tableau I: Sous espèces du complexe *Olea europaea* L.

Sous espèces	Localisation
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>europaea</i> - var <i>sylvestris</i> (Miller) Lehr. - var <i>europaea</i>	Oléastres du bassin méditerranéen Cultivars du bassin méditerranéen
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>Laperrinei</i> (Batt. et Trab.) Ciferri	Massifs du Sahara central
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>maroccana</i> (Greut. et Burd.).	Haut Atlas marocain
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>guanchica</i> P. Vargas et al.	Îles des Canaries
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>Cerasiformis</i> (Webb et Berth.) Kunk. et Sund.	Madère
<i>Olea europaea</i> subsp. <i>cuspidata</i> (Wall.) Ciferri	Afrique du Sud jusqu'en Chine

L'olivier (Fig.1A) est présent depuis l'Afrique du Sud jusqu'en Chine, en Méditerranée, en Macaronésie (Canaries et Madère) et dans les montagnes sahariennes.

Cette espèce correspond à la section *Olea* au niveau de laquelle les sous espèces ont des niveaux de ploïdie spécifiques. Ainsi, selon Besnard et Rubio de Casas (2016), les sous espèces *europaea*, *guanchica*, *cuspidata* sont diploïdes (2X), la sous espèce *laperrinei* est majoritairement diploïde, quelques individus triploïdes (3X) sont cependant répertoriés par Besnard et Baali-Cherif (2009). Les sous espèces *cerasiformis* et *maroccana* sont respectivement tétraploïdes (4X) et hexaploïdes (6X).

Le complexe *Olea europaea* est d'origine africaine (Besnard, 1999), et les taxons qui le composent sont sexuellement compatibles et inter-fertiles (Baali-Cherif et al., 2007). Besnard et al. (2012) rapportent à ce propos, des hybridations entre l'olivier de Laperrine et les sous-espèces *cuspidata* et *europaea*.

En Algérie, l'olivier de Laperrine est présent dans quatre massifs montagneux, ce sont le Hoggar, le Tassili n'Ajjer, le Tafedest et le Mouyedir (Fig. 1B). Au Niger, il est présent dans l'Aïr et au Soudan dans le Djebel Marra et le Gorgeil (Fig. 1B).

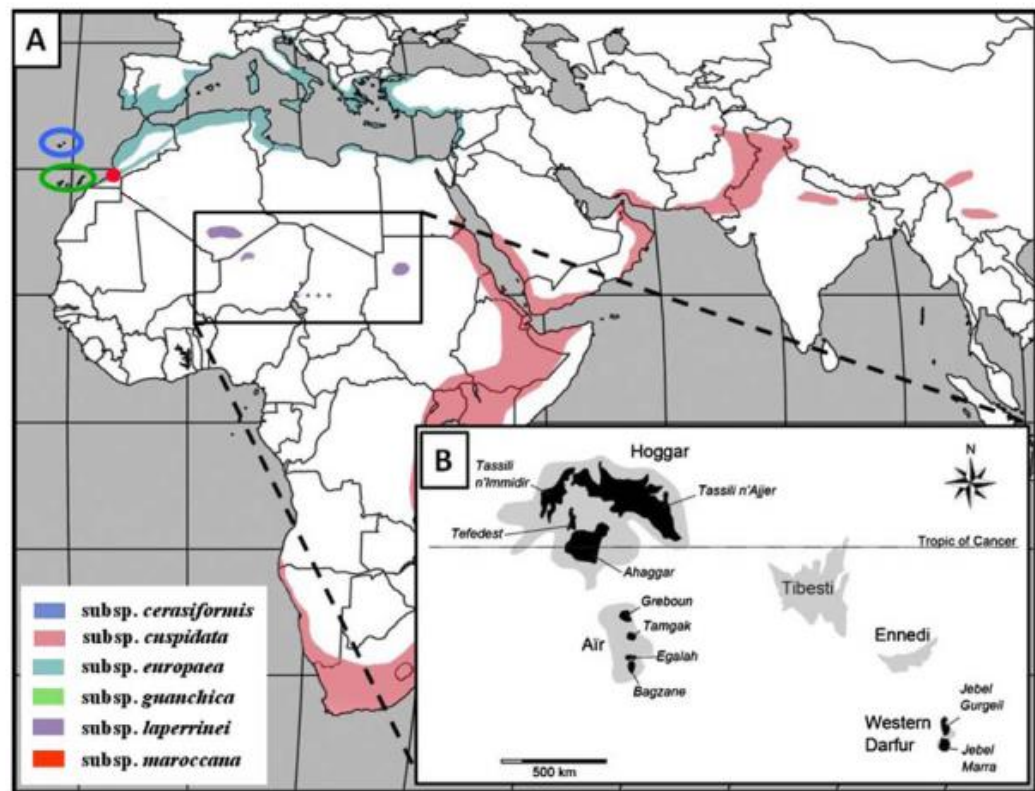


Figure 1. Distribution du complexe de l'olivier (A) et de l'olivier de Laperrine (B).

Les massifs sahariens sont indiqués en gris sur la figure 1.B. La répartition de la sous-espèce *laperrinei* dans ces montagnes est représentée en noir (Besnard et al, 2012).

Une étude réalisée par Besnard et al. (2007b) sur la diversité génétique basée sur des marqueurs nucléaires et chloroplastiques atteste que l'olivier de Laperrine présente une grande diversité dans les populations du Hoggar comparativement aux autres massifs.

Ce fait suggère que le Hoggar est un important réservoir de gènes pour le taxon et peut être son centre d'origine (Besnard, 2009). Selon Wickens (1976), l'olivier de Laperrine a été introduit au jebel Marra au Soudan par les pigeons ou par l'homme à partir des peuplements du Hoggar.

La classification proposée par Cronquist (1981), de l'olivier de Laperrine, appelé par les Touaregs Aléou est reprise dans le tableau II.

Tableau II : Position systématique de l'olivier de Laperrine

R ègne	Plantae
Sous r ègne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous classe	Asteridae
Ordre	Scrophulariales
Famille	<i>Oleaceae</i>
Genre	<i>Olea</i>
Esp èce	<i>O. europaea</i>
Sous esp èce	<i>O. e. laperrinei</i> (Batt. et Trab.) Cifferi.

L'olivier de Laperrine est une espèce xérophyte et héliophile adaptée aux conditions environnementales du Sahara central où sa distribution est très fragmentée.

Il est présent dans des massifs montagneux très isolés les uns des autres et la répartition des arbres au sein de ces massifs est également très dispersée. L'effectif rapporté par Baali-Cherif (2007), au Hoggar et au Tassili est d'environ 2 à 3 milliers d'arbres répartis sur de nombreuses stations. Le nombre d'individus par station ne dépasse généralement pas les 100 individus (Baali-Cherif et al., 2007), ce nombre est parfois inférieur à cinq (Baali-Cherif, 2007).

Cet arbre est présent en haute altitude entre 1400 et 2700 m (Besnard et al., 2007b) et peut se retrouver, d'après Baali-Cherif et Besnard (2005), jusqu'à 2800 m. Il pousse sur des roches volcaniques ou éruptives, généralement dans les lits d'oueds et les falaises (Fig.2A) où les populations sont souvent difficiles à atteindre (Baali-Cherif et Besnard, 2005).

Ce taxon est retrouvé dans des zones très sèches où les précipitations moyennes annuelles varient de 50 à 100 mm/an (Besnard et al., 2009)



Figure 2 : Localisation dans les lits d'oueds (A) et aspect buissonnant (B) de l'olivier de Laperrine (Cliché Lahcene)

Il est rare de trouver l'olivier de Laperrine sous forme de pied franc, il se présente le plus souvent sous une forme buissonnante (Fig. 2B) formée de 3 à 6 rejets (Baali-Cherif, 2007). Selon Battandier et Trabut (1911), la taille moyenne des rejets varie de 1,5 à 4 m de haut avec un diamètre de 0,4 à 0,5 cm environ (Benichou, 1962).

Les rameaux sont grêles et flexibles, portant des feuilles coriaces entières et opposées (Fig 3.A). Elles ont une forme lancéolée-linéaire de 4 à 6 cm de long en moyenne. La face supérieure ou face adaxiale est verte (Fig. 3B), alors que la face inférieure ou face abaxiale est argentée (Fig. 3C). La surface foliaire est réduite ce qui permet de limiter la perte d'eau (Baali-Cherif et Besnard, 2005).



Figure 3 : Forme lancéolée des feuilles de l'olivier de Laperrine.

(A : Rameau, B : Face adaxiale, C : Face abaxiale)

(Cliché Lahcene)

Le revêtement de la face abaxiale ou indument est constitué d'un grand nombre d'écailles peltées et chevauchantes (Besnard, 1999), ce sont les trichomes illustrés par la figure 4. Ils protègent les stomates améliorant ainsi la résistance de l'olivier à la sécheresse en limitant les pertes en eau par transpiration (Besnard et *al.*, 2012).

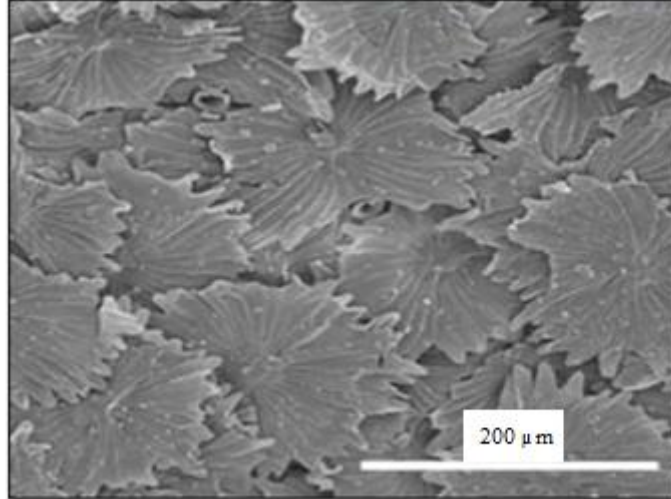


Figure 4: Face abaxiale d'une feuille d'olivier de Laperrine montrant les écailles peltées observées au microscope électronique (Besnard et *al.*, 2012).

Les événements de floraison de l'olivier de Laperrine sont rares dans le climat du Sahara central (Besnard, 2008) et la plupart des arbres ne fleurissent pas chaque année (Besnard et *al.*, 2007b).

Les inflorescences (Fig. 5A) sont constituées par des grappes flexibles comportant un axe principal avec 2 à 4 ramifications secondaires, les fleurs sont axillaires de couleur blanche de 4 à 6 mm de diamètre (Fig. 5B). L'olivier de Laperrine fructifie rarement (Baali-Cherif et Besnard, 2005) et seulement quelques arbres produisent des graines (Besnard et *al.*, 2007b). Les jeunes plants n'ont cependant jamais été observés (Baali-Cherif et *al.*, 2007).

Le fruit ou l'olive est une drupe de forme ovoïde à sphérique à peau lisse mesurant de 4 à 5 mm de diamètre et 5 à 8 mm de longueur (Médail et *al.*, 2001). L'olive d'abord de couleur vert tendre (Fig. 5C) passe à la couleur noire à maturité. Le mésocarpe est charnu et mou, il renferme un noyau à endocarpe scarifié (Fig. 5E) contenant de 1 à 2 graines (Fig. 5F).

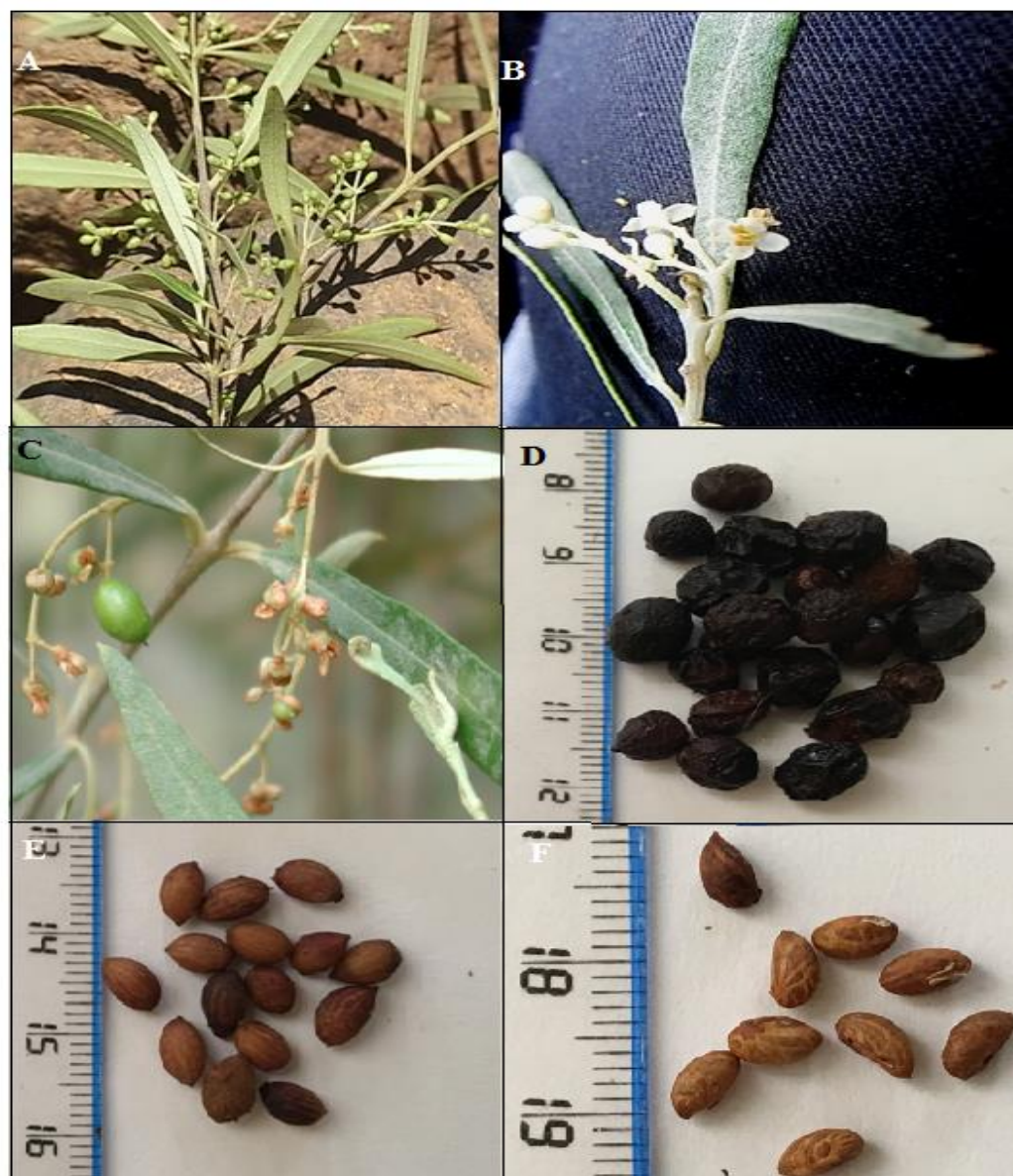


Figure 5: Quelques caractéristiques botaniques d'*O.e. laperrinei*.
 (A: Inflorescence en grappe, B: Fleur ; C: Fruit immature ; D: Fruit mature;
 E: Noyau à endocarpe dur; F: Graines).
 (Cliché Lahcene)

Le système racinaire adapté de ce taxon lui permet de capter l'eau à une grande profondeur (Baali-Cherif et Besnard, 2005).

La longévité de l'olivier est remarquable et d'après Besnard (1999), certaines souches au Hoggar sont soupçonnées de dater de l'époque des dernières phases pluviales au Sahara (6000 et 3500 BP).

L'olivier est exploité par l'homme pour son bois (Angiolillo et al., 1999; Anthelme et al., 2008). Cet arbre est une ressource fourragère pour les animaux domestiques (chèvres et

chameaux) et sauvages en voie de disparition comme le mouflon à manchette (*Ammotragus levia*) (Besnard et Baali-Cherif, 2009).

1-2 - PRESENTATION DE LA PYRALE DE LA FARINE

Plus connue sous le nom de la pyrale de la farine, *Ephestia kuehniella*, est décrite pour la première fois en 1879 par Zeller. Le tableau III, résume sa position systématique.

Tableau III: Classification d'*Ephestia kuehniella*

R ègne	Animalia
Sous r ègne	Metazoa
Embranchement	Arthropoda
Sous embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous classe	Pterygota
Ordre	Lepidoptera
Famille	<i>Pyralidae</i>
Genre	<i>Ephestia</i>
Esp èce	<i>E. kuehniella</i> Zeller

Ephestia kuehniella est une espèce redoutable qui occupe une place incontestable parmi les insectes nuisibles aux denrées stockées (Sedlacek et al., 1996). C'est une mite alimentaire qui s'attaque essentiellement aux denrées alimentaires stockées telles que la farine, les graines de céréales (riz, maïs et blé), la semoule, les pâtes alimentaires et plus exceptionnellement aux fruits séchés comme le raisin sec, les figues et les abricots. Elle réduit la qualité du produit par sa présence et cause des dommages directs pour l'alimentation (Johnson et al., 1997).

La contamination des denrées stockées par *E. kuehniella* est plus grande durant la saison chaude allant de Mai à Septembre.

Outre les dégâts causés sur les denrées stockées, la pyrale de la farine affecte la santé humaine. En effet, une étude réalisée par Morichau-Beauchant et Brisou (1962) montre que cet insecte est une source allergénique chez l'homme, de par la présence de particules de farine agglomérées par des fils de soies et mêlées d'excréments et provoque de l'asthme et des rhinites (Yetzi et Soltani-Mazouni, 2010).

Dans les conditions optimales de développement, à une température variant de 25 à 27 °C et une humidité relative de plus de 50%, le cycle vital dure environ 50 jours (Gonzalez Nicholas, 1966). Il est représenté par quatre stades morphologiques (Fig. 6), et varie, en fonction des conditions de l'alimentation, de la température et de l'humidité

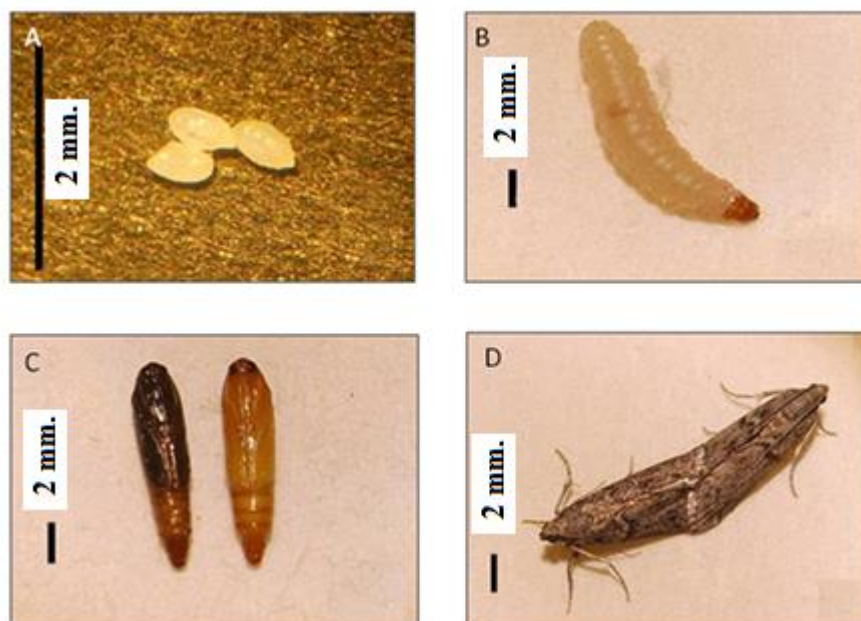


Figure 6: Différents stades de développement chez *Ephestia kuehniella* (Xu, 2010).
(A: Œuf, B: Larve au stade 6, C: Chrysalide mature (Foncé) ; immature (Brun) et D: Adulte).

L'œuf (Fig. 6A) est petit, de couleur gris blanchâtre et de forme elliptique, il mesure entre 500 et 550 μm de long sur 290 et 325 μm de large (Moreno et al., 1994) et pèse en moyenne 0,023 mg (Brindley, 1930).

La larve ou chenille (Fig. 6B), passe par six stades larvaires. C'est au stade larvaire qu'*E. kuehniella* devient l'ennemi redoutable du garde-manger, en effet, c'est à cette étape que la mite se nourrit de manière vorace. La larve du premier stade mesure de 1 à 1,5 mm de long, elle peut atteindre jusqu'à 15 à 20 mm au stade final. Dès son exuviation, la larve se nourrit directement de la farine, elle est de couleur blanche virant légèrement vers le rose.

La distinction des sexes est bien visible au stade larvaire, les larves mâles présentent deux points bruns sur la face dorsale de l'abdomen (Fig.7) correspondant aux testicules (Taibi, 2007).

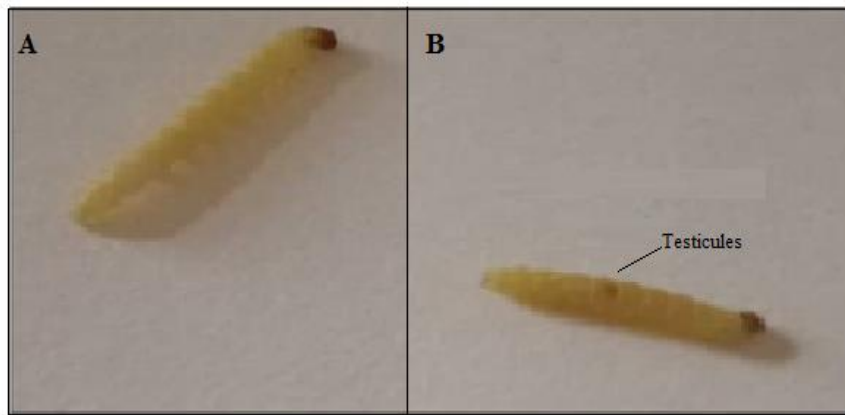


Figure 7 : Dimorphisme sexuel de la pyrale de la farine (**A:** Femelle, **B:** Mâle).
(Cliché D^r Taïbi, laboratoire de Biologie Animale Appliquée Université de Annaba)

La figure 6C représente la chrysalide appelée aussi nymphe. La larve du dernier stade subit une mue nymphale et se transforme en chrysalide. Ce stade se caractérise essentiellement par la maturation sexuelle (Cassier, 1996), qui se déroule sous le contrôle des ecdystéroïdes.

A l'exuviation adulte, les insectes des deux sexes sont sexuellement matures (Bensalem-Djidi, 2014).

La nymphe est de couleur blanchâtre et prend un aspect plus foncée avec l'âge, elle s'entoure d'un cocon de soie blanche contenant des substances nutritives. La chrysalide mue au bout de 8 à 12 jours en papillon qui représente la forme adulte de la pyrale, et mesure de 10 à 12 mm de long.

Le papillon ou imago (Fig. 6D), possède une petite tête globuleuse, des ailes antérieures grisâtres et satinées avec des points noirs et des ailes postérieures finement frangées qui sont blanchâtres. Les papillons sont plus actifs la nuit.

Chez la femelle, la ponte débute juste après l'accouplement et comprend environ 300 œufs que la femelle dépose seuls ou en petits groupes dans les denrées qui serviront de nourriture aux larves (Balachowsky, 1972).

La lutte chimique qui fait appel aux pesticides est la plus utilisée à l'heure actuelle pour faire face aux ennemis du stockage. Ces derniers causent des pertes importantes sur les denrées stockées et des coûts onéreux pour l'industrie agroalimentaire. Les pesticides sont utilisés à grande échelle aussi bien sur les sols de culture que dans les bâtiments de stockage (Taïbi et al., 2003). Cependant, ces produits sont dangereux pour l'Homme et pour l'environnement.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE L'OLIVIER DE LAPERRINE

1-3- GENERALITES SUR LES RADICAUX LIBRES

La cellule peut être soumise à des agressions physiques (traumatisme, irradiation, hyper ou hypothermie), chimiques (acidose, toxines) et métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou un facteur de croissance). Ces agressions débouchent sur un stress oxydant, dû à l'exagération d'un phénomène physiologique qui est la production de radicaux dérivés de l'oxygène ou espèces réactives à l'oxygène (ERO) (Walker *et al.*, 1982), ou la diminution de la défense antioxydante ou les deux simultanément ou encore à une inefficacité des systèmes de réparation.

Un radical libre est une espèce chimique qui se caractérise par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe. C'est une espèce caractérisée par son instabilité et /ou son pouvoir oxydant fort (Afonso *et al.*, 2007). Afin d'atteindre un état plus stable, le radical libre va soit accepter un électron qu'il arrache à une molécule voisine cible (se comportant ainsi comme un oxydant) soit transférer son électron libre (se comportant comme un réducteur) sur une autre molécule (ADN, lipide, protéine) afin de le reappairer. Cela entraîne une réaction en chaîne qui produit de nouveaux radicaux libres car la molécule agressée par le radical libre devient à son tour radicalaire (Guillouty, 2016).

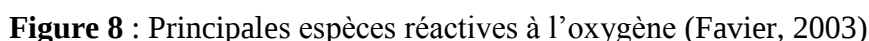
D'après Favier (2003), il existe deux types de radicaux libres (Fig. 8):

* Les radicaux primaires tels que: l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$), le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$), le radical peroxyde ($ROO^{\bullet}$) et le radical alkoxyde ($RO^{\bullet}$).

**Les radicaux secondaires tels que l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le nitroperoxyde ($ONOOH$). Ils se forment par réaction des radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule.

La formation de radicaux libres est une conséquence normale du métabolisme aérobie chez l'homme. Ils sont normalement produits en faible quantité, en conditions d'aérobie au cours du métabolisme de tout organisme (Calatayud *et al.*, 2013). Ainsi, au sein de la cellule, tous les processus utilisant de l'oxygène sont capables de produire des ERO. Cependant, c'est la mitochondrie qui en est le siège majeur. En effet, 80% de l'anion super oxyde ($O_2^{\bullet-}$) proviennent de la chaîne respiratoire (Carrière *et al.*, 2006).

La mitochondrie est un organelle intracellulaire responsable de la synthèse de l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule sous forme d'ATP. Elle possède deux membranes délimitant un espace inter-membranaire et un compartiment matriciel. La membrane externe, contient une protéine transmembranaire, la porine, qui permet le passage des ions et de petites molécules. La membrane interne est imperméable.



L'oxygène étant un accepteur d'électrons universel, il permet aux organismes aérobie d'utiliser l'énergie issue de la transformation des lipides et des protéines alimentaires. Ainsi, la majorité de l'oxygène consommé est réduit de manière tétravalente par l'enzyme cytochrome oxydase conduisant à la production d'eau ($O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$). Cependant, 2 à 6% de l'oxygène consommé échappent à la réduction complète en H_2O , et subissent une cascade de transformations qui conduisent à la formation des ERO (Carrière et al., 2006).

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre au sens propre car tous ces électrons sont appariés. Son grand pouvoir oxydant est dû à sa capacité de former en présence d'ions métalliques le radical hydroxyle ($\text{OH}^\bullet$). Ainsi, d'après Garait (2006), au cours de la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène se décompose en présence du fer ferreux pour donner un

radical hydroxyle $\text{OH}^\bullet$ et un anion OH^- selon la réaction suivante: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$. Le fer ferreux provient de la réaction entre le fer ferrique et l'anion superoxyde ($\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$).

Le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif des ERO. Selon Gutteridge (1994), il est très agressif. Il agit en arrachant soit un électron soit un atome d'hydrogène. Ses cibles biologiques sont toutes les molécules se trouvant à proximité en particulier, l'ADN, les protéines et les lipides (Fig.9). Il provoque sur son passage de multiples dommages cellulaires suite à l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

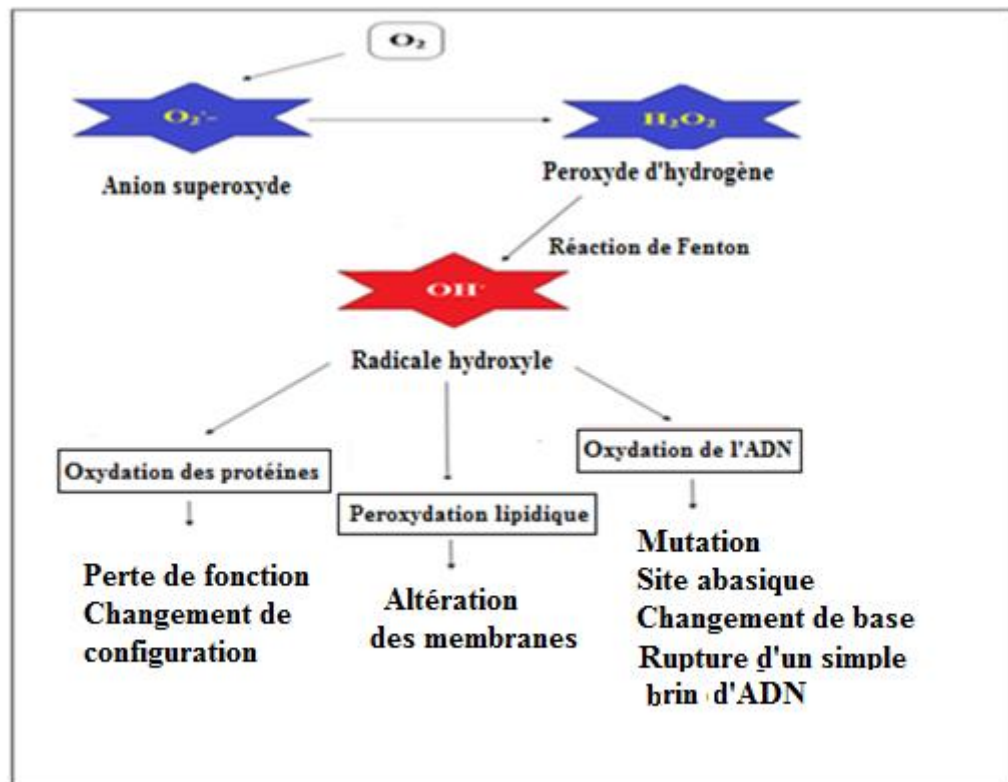


Figure 9: Schéma représentant l'effet du radical l'hydroxyle sur les molécules cibles (Garait, 2006) Modifié

La production des ERO peut être augmentée suite à un apport excessif de substrats par rapport aux réels besoins énergétiques de la cellule (Carrière et *al.*, 2006), ou sous l'effet de différents mécanismes physio-pathologiques tels que l'inflammation et l'activité physique (Garait, 2006) ou encore suite à une exposition aux facteurs environnementaux comme les rayonnements UV, la pollution, le tabac (Guillouty, 2016).

La production physiologique des ERO est régulée par différents systèmes antioxydants enzymatiques (la superoxyde dismutase, la catalase et le système glutathion-peroxydase), de protéines (transferrine, ferritine, céruloplasmine), et de molécules antioxydantes exogènes qui vont venir soutenir l'effet des antioxydants endogènes (vitamine C et E, et les polyphénols). Afonso et *al.* (2007) définissent les antioxydants comme des substances

capables de concurrencer d'autres substrats oxydables à des concentrations relativement basses et de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ces substrats.

Ainsi le système antioxydant endogène représente la première ligne de défense de l'organisme contre les ERO. D'après Gutteridge (1994), la superoxyde dismutase élimine les radicaux superoxydes par dismutation du radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Fig.10). Elle permet l'élimination des radicaux superoxydes mais provoque l'apparition du peroxyde d'hydrogène. Celui-ci peut être décomposé en H_2O par la catalase (Goudable et Favier 1997), ou par le complexe glutathion peroxydase en présence de glutathion réduit (Carrière et al., 2006). Les protéines antioxydantes maintiennent les métaux de transition dans un état inactif pour la formation des ERO (Pincemail et al., 2002).

Ainsi en se liant à la transferrine, le fer ne peut plus participer aux réactions radicalaires (Gutteridge, 1994), empêchant ainsi la réaction de Fenton d'avoir lieu. La vitamine C est un piègeur des radicaux $O_2^{\bullet-}$ et $OH^{\bullet}$ (Haleng et al., 2007).

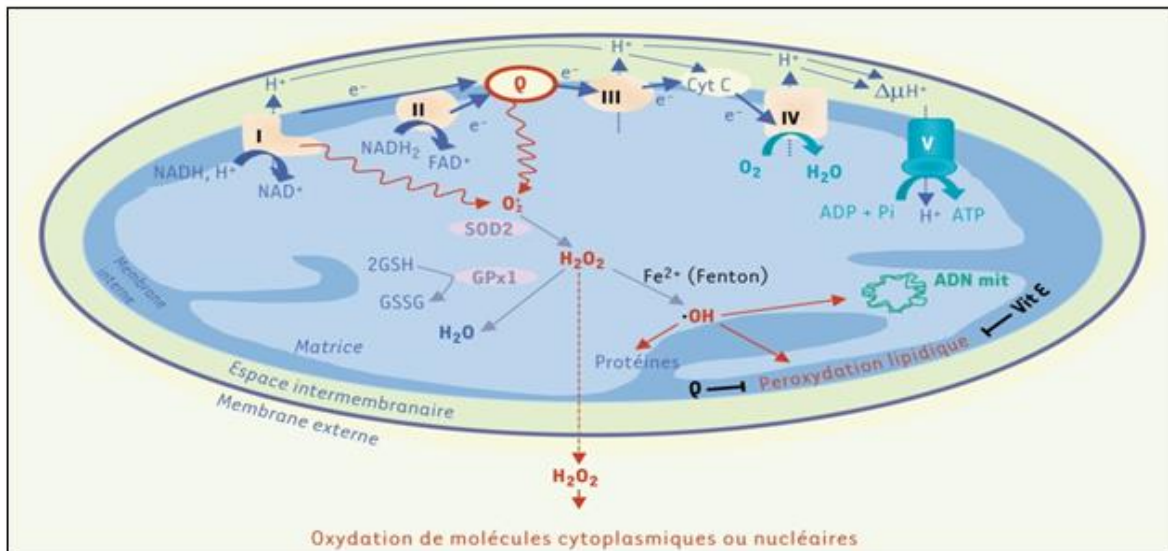


Figure 10: Régulation de la production d'ERO par les systèmes de défenses antioxydantes (Carrière et al., 2006).

Les polyphénols sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations (Hennebelle et al., 2004).

Dans les conditions normales, les antioxydants sont quantitativement plus importants que les oxydants et la balance oxydative définit l'équilibre entre les espèces réactives de l'oxygène et les espèces antioxydantes. Toutefois, quand les systèmes antioxydants sont dépassés suite à une surproduction des ERO, il y a un déséquilibre dans la balance oxydants/antioxydants en faveur des ERO. Ce dérèglement conduit au stress oxydatif pouvant entraîner des altérations moléculaires et cellulaires.

Les ERO ne sont pas spécifiques, et toutes les molécules (les protéines, les hydrates de carbone, les lipides et les acides nucléiques) peuvent être leur cible. (Deby-Dupont et *al.*, 2002). Cependant c'est l'ADN et les lipides qui y sont particulièrement sensibles (Goudable et Favier, 1997).

Les radicaux libres sont directement impliqués non seulement dans le processus de vieillissement via le raccourcissement des télomères au niveau des chromosomes (Gupta, 2015), mais également dans le développement de nombreuses pathologies telles que les cancers, l'athérosclérose, le diabète, les maladies neuro-dégénératives et rhumatismal (Pincemail et *al.*, 2002; Guillouty, 2016).

Le paradoxe des radicaux libres en biologie est qu'ils sont à l'origine de pathologies graves et mortelles pour l'Homme, tout en étant indispensables à la vie. En effet, d'après Favier (2003), ils interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques lors de la croissance ou de la défense de l'organisme. Ils participent au fonctionnement de certaines enzymes, à la défense immunitaire contre les agents pathogènes, à l'apoptose des cellules tumorales, au cycle cellulaire, au fonctionnement de certains neurones et notamment ceux de la mémoire, à la fécondation de l'ovule et à la régulation des gènes.

Favier (2003), précise que les radicaux libres constituent un système de transmission de signaux, sans doute apparu très tôt au cours de l'évolution et conservé chez les êtres évolués y compris les mammifères. Les radicaux oxygénés peuvent être considérés comme des messagers intra- et extracellulaires.

Ils permettent d'induire la réponse cellulaire à de nombreux stress (thermique, ultraviolets, xénobiotique), permettant l'expression de gènes de défense. Chez les bactéries par exemple, les gènes de défense contre le stress oxydant sont organisés en régulon, un gène exprime un premier facteur de transcription qui, après activation par un dérivé oxygéné va activer le gène d'un deuxième facteur de transcription ubiquitaire pour un ensemble de systèmes antioxydants. Ainsi, Ils exercent un rôle de médiateur de la signalisation cellulaire en régulant l'expression des enzymes impliquées dans la défense antioxydante (Ferhat, 2015).

Chez l'Homme, parmi les gènes antioxydants les plus inductibles par un stress oxydatif nous citons ceux de la superoxyde dismutase qui accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et de la catalase qui est capable de neutraliser le peroxyde d'hydrogène.

Le stress oxydatif n'est pas spécifique à l'homme, il peut également être observé chez les végétaux. Deux types de stress peuvent affecter les plantes; le stress biotique causé par des organismes vivants (les insectes, les micro-organismes...) et le stress abiotique dû à des facteurs environnementaux tels que la sécheresse, le gel, les températures extrêmes, la forte luminosité le vent. Suite à ces agressions, il y'a une augmentation de la concentration en composés phénoliques chez les végétaux. En effet, la biosynthèse des polyphénols est le

1 résultat de la réponse des plantes à certaines conditions environnementales et est sous le
2 contrôle de facteurs génétiques impliqués dans la réponse au stress incluant des changements
3 morphologiques, biochimiques et physiologiques (Calatayud et *al.*, 2013). Di Ferdinando et
4 *al.* (2012), ont mis en évidence chez les plantes une relation de causalité entre la synthèse des
5 polyphénols et certains paramètres environnementaux représentés par les fortes radiations
6 solaires et l'absence d'azote et d'eau.

7
8 Les polyphénols constituent l'un des groupes les plus répandus de composés
9 phytochimiques. Ce sont des métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans la
10 croissance et la reproduction des plantes et offrent une protection efficace contre les agents
11 pathogènes et les prédateurs (Ignat et *al.*, 2011).

12
13 Ils sont connus pour être de puissants agents antioxydants. Leur activité antioxydante est
14 attribuée à leur structure phénolique avec la présence d'un grand nombre de groupements
15 hydroxyles et leur position sur les noyaux aromatiques (Rolland, 2004), ainsi que la capacité
16 qu'ont ces derniers à supporter une délocalisation des électrons (Saffidine, 2015). Ils exercent
17 leur capacité antioxydante en stimulant ou en protégeant les systèmes antioxydants endogènes
18 (Ross et Kasum, 2002).

19 Les composés phénoliques réagissent rapidement avec les radicaux libres, notamment les
20 peroxydes en donnant un radical phénoxy, les rendant incapable de propager la réaction
21 radicalaire (Guillouty, 2016).

22 Ils provoquent l'inhibition de la peroxydation lipidique causée par les ERO dans la bi-couche
23 phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, ils peuvent interférer avec les
24 réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi leur propagation (Cillard et
25 Cillard, 2006). Certains flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques de transition
26 responsables de la formation des ERO (Pietta, 2000 ; Halbwirth, 2010) et ainsi, inhiber la
27 réaction de la lipooxygénase.

28
29 Un grand nombre de molécules antioxydantes sont isolées du monde végétal (Hennebelle
30 et *al.*, 2004).

31 32 **1-4-GENERALITES SUR LES METABOLITES SECONDAIRES**

33
34 Historiquement, les composés produits par les plantes ont été séparés en métabolites
35 primaires et métabolites secondaires. Par définition, les métabolites primaires sont des
36 molécules présentes dans toutes les cellules végétales et nécessaires à la vie de la plante. Les
37 sucres simples, les acides aminés, les protéines et les acides nucléiques sont des exemples de
38 métabolites primaires. Selon Jay et *al.* (1996), le métabolisme secondaire correspond à un
39 certain nombre de voies s'articulant sur des molécules charnières telles que l'acétate, le
40 shikimate, le mévalonate... De ces molécules naissent les trois principales classes de
41 métabolites secondaires chez les plantes à savoir les alcaloïdes, les terpénoïdes et les
42 composés phénoliques.

Ils sont caractérisés par une répartition qualitative et quantitative inégale selon les espèces végétales considérées (Macheix et *al.*, 2005) comme dans la plante elle-même. Ils sont typiquement produits à différents endroits de la cellule, dans un organe, tissu ou type cellulaire spécifique à des stades particuliers du développement (Raven et *al.*, 2007). Ils sont emmagasinés dans la vacuole, c'est le cas des composés solubles dans l'eau tels que les alcaloïdes, les hétérosides, les anthocyanes et certains tanins faiblement polymérisés, alors que les composés insolubles tels que les dérivés phénoliques et les terpènes, ils se fixent sur la paroi squelettique dont ils renforcent l'imputrescibilité (Guignard, 2000).

L'intérêt porté aux alcaloïdes repose traditionnellement sur leur action physiologique et psychologique particulièrement violente chez l'homme. Près de 10000 alcaloïdes ont été isolés et identifiés comme la morphine (qui provient du pavot, *Papaver somniferum*), la cocaïne qui provient du coca (*Erythroxylum coca*), la caféine que l'on trouve chez certaines plantes telles que le café (*Coffea arabica*), le thé (*Camellia sinensis*) et le cacao (*Theobroma cacao*), la nicotine produite par les feuilles de tabac (*Nicotina tabacum*) et l'atropine qui provient de la jusquiame d'Égypte (*Hyosciamus muticus*).

Les terpénoïdes existent chez toutes les plantes et sont composés d'unités isoprène (terpénoïde le plus simple, c'est un hydrocarbure de structure C_5H_8) et comprennent les huiles essentielles, le taxol extrait de l'écorce de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) des aiguilles de l'if d'Europe (*Taxus baccata*), le caoutchouc obtenu à partir du latex (liquide laiteux) produit par une plante tropicale nommée hévéa (*Hevea brasiliensis*) et les glycosides cardiotoniques qui, dérivés de stérol sont des poisons et peuvent provoquer des crises cardiaques.

Les digitales (*Digitalis*) sont les principales sources des glycosides cardiotoniques les plus actifs, la digitoxine et la digoxine. Les glycosides cardiotoniques synthétisés chez certaines espèces d'asclépiadacées et d'apocynacées sont un moyen de défense contre les herbivores.

Utilisés en médecine, les glycosides cardiotoniques peuvent ralentir ou stimuler les battements du cœur (Raven et *al.*, 2007).

Les composés phénoliques regroupent une vaste gamme de substances chimiques d'origine naturelle, caractérisées par la présence d'un noyau aromatique auquel est lié au moins un groupement hydroxyle (-OH). Ils sont présents dans presque toutes les plantes et ils s'accumulent dans toutes les parties de l'organisme (racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits) (Raven et *al.*, 2007).

Les composés phénoliques sont classés en deux groupes majeurs, les non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

1-4-1-LES NON FLAVONOÏDES

Ce sont essentiellement les acides phénols, les tanins et les lignines.

1-4-1-1-LES ACIDES PHENOLS

Ce groupe comprend les acides benzoïques, les acides cinnamiques et les coumarines.

Les acides benzoïques largement répandus aussi bien chez les angiospermes que chez les gymnospermes sont représentés par l'acide gentistique, l'acide salicylique, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide gallique et l'acide ellagique.

L'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide vanillique et l'acide syringique sont des constituants de la lignine dont ils sont extraits par hydrolyse alcaline. D'après Ribereau-Gayon (1968), les plantes qui ne contiennent pas de lignine ne produisent pas ces trois acides

L'acide gallique et l'acide salicylique jouent un rôle prépondérant dans la structure de certains tanins dont ils sont libérés par hydrolyse acide.

Il faut noter que l'acide ellagique est absent chez les monocotylédones, les gymnospermes et les fougères.

Les acides cinnamiques sont très largement répandus chez les végétaux, ce sont ; l'acide *p*-coumarique, l'acide caféique, l'acide ferulique et l'acide sinapique.

Selon Hopkins (2003), les coumarines constituent un groupe de lactones largement répandues. Leur nom vient de "cumaru" qui est le nom amazonien de l'arbre de Tonka (*Dipteryx odorata*) dont les fèves contiennent 1 à 3% de coumarine. Elle est présente en quantités plus faibles dans plusieurs plantes comme le mélilot, la sauge sclérée et la lavande. Nous la trouvons également dans le miel, le thym et la cannelle.

La coumarine donne au foin fraîchement coupé son odeur douceâtre caractéristique. Elle est également un composant de l'huile de bergamote, qui est utilisée pour parfumer le tabac de pipe, le thé et d'autres produits. Alors que la coumarine n'est pas toxique en soi, elle peut être convertie par les champignons, en une toxine (le dicoumarol) qui est typiquement présente dans le foin moisi. Chez le bétail, le dicoumarol provoque des hémorragies fatales en inhibant la vitamine K qui est un facteur essentiel de la coagulation du sang (Hopkins, 2003).

La découverte du dicoumarol dans les années 1940 a conduit à développer la production d'un dérivé de la coumarine, le warfarine qui est un raticide.

La scopoléine qui est la coumarine la plus fréquente chez les plantes supérieures, est souvent présente dans les enveloppes des graines. Elle serait inhibitrice de la germination qui doit être lessivée avant que la graine ne puisse germer (Hopkins, 2003).

Les coumarines interviennent dans la défense des plantes contre les herbivores.

1-4-1-2-LES TANINS ET LES LIGNINES

1-4-1-2-1-LES TANINS

Ce sont des composés phénoliques dont le poids moléculaire est compris entre 500 et 3000 Da (Ribereau-Gayon, 1968). Ils ont la propriété de précipiter les protéines et donc de les dénaturer, ce qui leur a valu leur utilisation en tannerie où ils ont la propriété de transformer les peaux animales fraîches en cuir imputrescible. En effet, les tanins dénaturent les protéines du cuir en s'y liant par des liaisons résistantes aux attaques bactériennes et fongiques assurant ainsi leur protection (Dangles et *al.*, 1992).

Les tanins sont essentiellement stockés dans les tissus épidermiques et sub-épidermiques, ils sont présents à des concentrations relativement élevées dans les feuilles mais se rencontrent aussi dans les racines, les fleurs et les fruits. Ils sont isolés dans les vacuoles, les autres composants de la cellule sont ainsi protégés (Raven et *al.*, 2007). Les tanins sont des polymères d'unités flavonoïdes reliées par des liaisons fortes C-C, selon la structure de la molécule, nous avons les tanins hydrolysables, et les tanins condensés.

Les tanins hydrosolubles sont moins fréquents que les tanins condensés, leur structure de base est un glucide, habituellement le glucose dont le radical hydroxyle forme une liaison ester avec l'acide gallique. Ils donnent par hydrolyse acide une fraction glucidique et une fraction phénolique constituée elle-même soit, par de l'acide gallique, soit par de l'acide ellagique, dimère du précédent (Ribereau-Gayon, 1968).

Les tanins condensés sont constitués par la polymérisation de molécules élémentaires qui possèdent la structure générale des flavonoïdes, ce sont les flavanes (Hopkins, 2003).

1-4-1-2-2-LA LIGNINE

La lignine correspond à la partie non glucidique de la membrane cellulaire, elle correspond à un polymère formé de trois monomères, le p-coumaryle, le coniferyle et l'alcool sinapique. Les proportions de chacun de ces monomères diffèrent significativement suivant que la lignine provient de gymnospermes, d'angiospermes ligneux ou de plantes herbacées. En outre, la composition monomérique des lignines varie beaucoup suivant les espèces, les organes, les tissus et même les fractions de paroi cellulaire (Raven et *al.*, 2007).

Contrairement aux autres composés phénoliques, la lignine n'est pas stockée dans la vacuole, mais, se dépose dans la paroi cellulaire (Raven et *al.*, 2007) et plus spécialement

1 dans les parois secondaires des éléments conducteurs contribuant à la résistance mécanique et
2 à la rigidité des tiges lignifiées (Hopkins, 2003). Bien que sa fonction soit d'ordre structural, la
3 lignine est considérée comme agent chimique intervenant dans la défense de la plante, car elle
4 n'est pas facilement digérée. Par ailleurs, le renforcement de la paroi des cellules végétales
5 par la lignine constitue une barrière protectrice contre le dessèchement et la pénétration des
6 micro-organismes (Zouiten et El Hadrami, 2001).

8 1-4-2- LES FLAVONOÏDES

10 Les flavonoïdes constituent le plus grand groupe de composés phénoliques chez les plantes,
11 en effet, nous en comptons plus de 8000. Ce sont des pigments solubles dans l'eau, répandus
12 dans les feuilles, les fleurs et les fruits. Ils sont largement distribués dans le règne végétal. Ils
13 sont fréquents chez les bryophytes (mousses), les ptéridophytes (fougères), les gymnospermes
14 (conifères), mais c'est chez les angiospermes qu'ils manifestent la plus grande diversité

16 Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste qu'ils quittent pour s'accumuler
17 dans la vacuole (Guignard, 2000; Mierziak et al., 2014). Ils sont composés d'un squelette à
18 quinze carbone comportant deux anneaux phényle (anneaux A et B) reliés par un pont à trois
19 carbone représenté par l'anneau C (Iwashina, 2000). Ils sont regroupés en une douzaine de
20 classes (Bruneton, 1993), qui peuvent être subdivisés d'après Hopkins (2003), en trois
21 principaux groupes, représentés par les flavones, les flavonols et les anthocyanes (Fig. 11).

23 La plupart des flavones et flavonols sont des pigments jaunâtres ou ivoire, certains sont
24 incolores. Les flavones et les flavonols incolores peuvent modifier la couleur d'une plante en
25 formant des complexes avec les anthocyanes et des ions métalliques. Ce phénomène appelé
26 copigmentation, est responsable de la couleur bleue intense des fleurs (Raven et al., 2007).

27 Les flavones et les flavonols sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal.
28 Parmi eux, nous citons, l'apigénine et la lutéoline dans le cas des flavones, la quercétine, la
29 kaempférol et la myricétine représentent les flavonols (Ghedira, 2005).

31 La gamme de couleurs des anthocyanes va du rouge au pourpre et au bleu. Selon Ribereau-
32 Gayon, (1968), cette coloration varie en fonction de l'acidité, rouges en milieu acide, bleues
33 en milieu neutre ou alcalin. Les anthocyanes sont répandus dans les fleurs et les fruits.

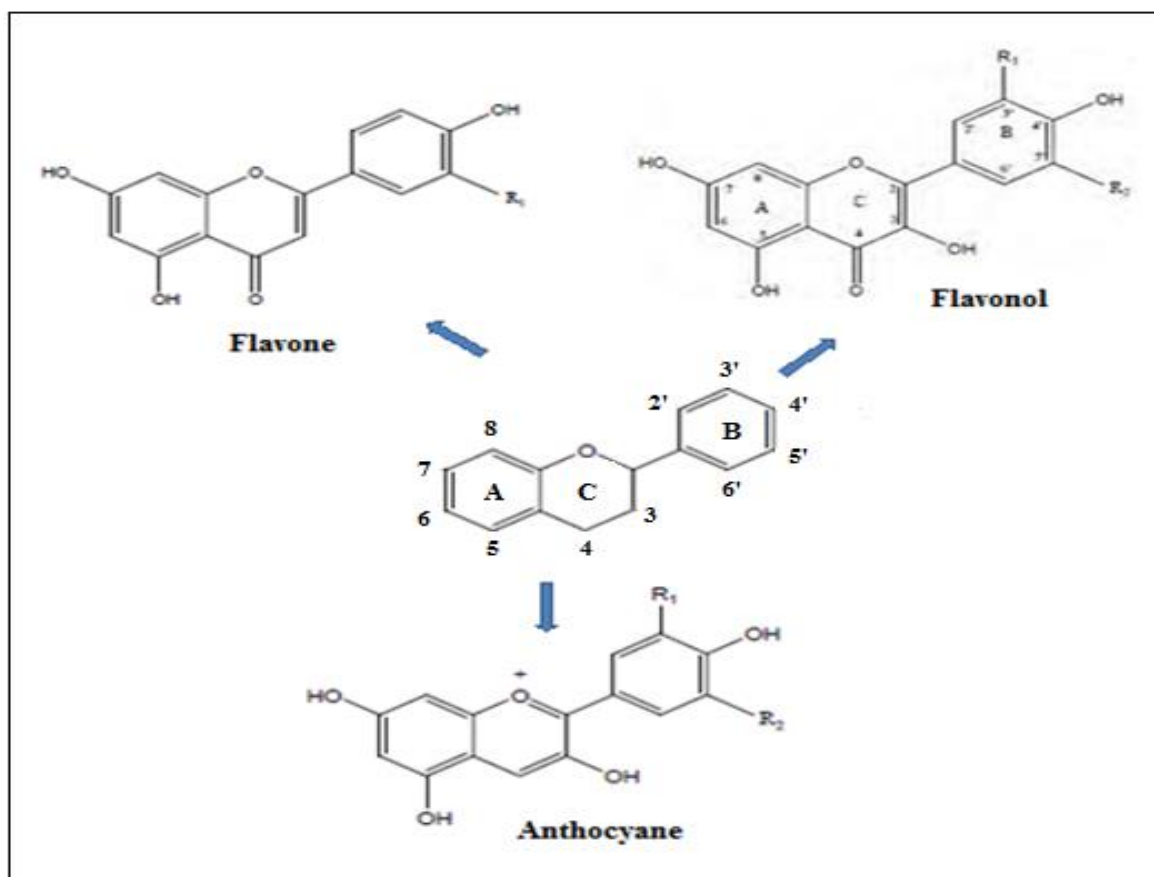


Figure 11: Structures de base des trois principaux groupes de flavonoïdes
(Guillouty, 2016). Modifié

1-5-ROLES ET ACTIVITES BIOLOGIQUES DES POLYPHENOLS

Pour faire face aux différents stress qu'ils subissent, les végétaux, ont développé diverses stratégies adaptatives. Parmi ces nombreuses stratégies, la plante a orienté sa physiologie et son métabolisme cellulaires vers la synthèse de substances spécifiques. Ce sont les métabolites secondaires qui ont des fonctions très importantes pour la survie et la propagation des végétaux qui les produisent. Beaucoup fonctionnent comme signaux chimiques permettant à la plante de répondre aux contraintes de l'environnement, certains assurent une protection contre les radiations solaires et d'autres encore facilitent la dispersion du pollen et des graines

Ainsi selon Tattini et *al.* (2006), la synthèse des polyphénols est nettement augmentée suite à un stress provoqué par un ensoleillement intense. D'après Bennick (2002), la synthèse des tanins est augmentée en réponse à un stress environnemental quel que soit son origine, tel qu'un stress hydrique, un sol peu fertile, un ensoleillement trop fort ou un stress engendré par l'agression des végétaux par les herbivores (Woodward et Coppock, 1995), et par les pathogènes.

Les métabolites secondaires, représentent donc des barrières phytochimiques contre le stress biotique et abiotique auxquels sont exposées les plantes en permanence.

L'intérêt porté aux composés phénoliques est attribué aux principes actifs qui les caractérisent. Ainsi, leur utilisation par l'homme dans de nombreuses préparations en médecine traditionnelle et dans le domaine culinaire comme colorants et arômes est très largement répandue. Dans le domaine agricole, ce sont de bons candidats en tant qu'herbicides et bio-insecticides. Ils représentent en effet, une potentielle source d'insecticides naturels (Chaieb, 2011), qui ont l'avantage d'être rapidement biodégradables, réduisant ainsi les risques pour l'homme et pour l'environnement (El Idrissi et *al.*, 2014).

Les polyphénols végétaux possèdent en outre des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisés à des fins thérapeutiques (Krief, 2003). Ils sont reconnus (Fig.12) pour leurs effets antibactériens, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, antioxydants (Harborne, 1998; Bruneton, 1999), antimutagène (Yen et *al* 2002) anti-athérogéniques, anti-thrombotiques, anti-cancéreuses (Guillouty 2016).

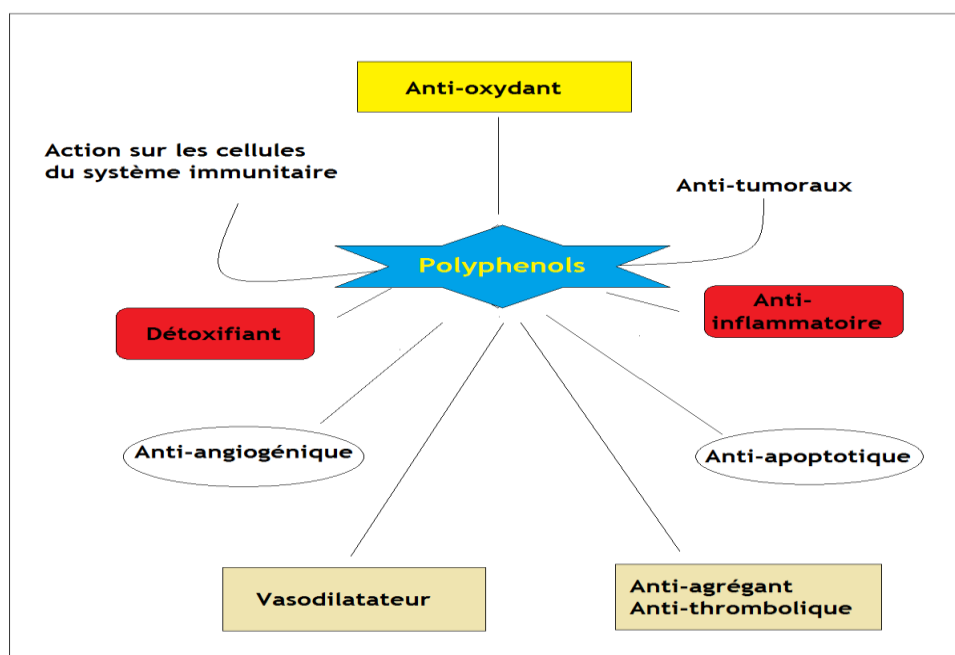


Figure 12: Activités biologiques des polyphénols
(Martin et Andriantsitohaina, 2002).

1-5-1-ROLES DES TANINS

Les tanins précipitent les glycoprotéines de la salive des consommateurs, le goût astringent qui en résulte dissuade les herbivores de les consommer. Cette propriété provoque une baisse d'appétence. En effet l'astringence et la sensation de sécheresse ressentie dans la bouche, est considérée comme désagréable et répulsive pour les consommateurs (Krief, 2003). Cette stratégie permet de dissuader les animaux de consommer les plantes.

Berenbaum (1983) a mis en évidence dans ses travaux l'effet toxique des tanins sur certaines espèces d'insectes. D'après Feeny (1976) ; Hagerman et Butler (1989) les tanins influencent la croissance, le développement et la fécondité des insectes ravageurs. Meric (2005), note que l'exposition aux tanins affecte la survie et la santé des insectes, cela se traduit par une croissance réduite des insectes (plus petite taille par rapport à la normale) et par un plus faible nombre d'œufs.

De plus, les travaux de Banso et Adeyemo (2007), portant sur les extraits obtenus à partir de *Dichrostachys cinerea* et testés contre *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont mis en évidence l'implication des tanins dans l'activité anti-microbienne.

Du point de vue thérapeutique les tanins ont un effet anti-inflammatoire, anti-diarrhéique, et antiseptique. Par ailleurs, ils interviennent dans la régénération des tissus résultant de blessure superficielle ou de brûlure (Krief, 2003; Sereme et al., 2008),

Les tanins sont reconnus pour avoir des propriétés antioxydantes remarquables. Ce sont en effet, des donneurs de protons aux radicaux libres produits au cours de l'oxydation (Palici, 2016).

1-5-2-ROLES DES FLAVONOÏDES

Pour Hopkins (2003), les flavonoïdes ont un rôle physiologique important dans les plantes, en effet, le kaempférol et la quercétine sont impliqués dans la croissance de la tige de plantules de pois qui est régulée par la lumière. Le kaempférol inhibe la croissance en stimulant l'oxydation de l'acide indole acétique (AIA), cet effet étant contrecarré par la quercétine.

D'après Raven et al. (2007), ils favorisent un partenariat de type coopération entre la plante qui les élaborent et les autres organismes vivants. Ainsi, les pigments floraux responsables des couleurs vives et variées ont un effet attracteur pour les pollinisateurs, ils agissent comme des signaux visuels pour attirer les oiseaux, les abeilles et les petits mammifères qui facilitent la dispersion du pollen et des graines. La synthèse des pigments floraux est en relation avec les pollinisateurs (Jay et al., 1996).

Ces métabolites secondaires interviennent, dans les interactions entre plantes et autres organismes tels que les bactéries fixatrices d'azote vivant dans les racines de plantes, c'est le cas par exemple de la spécificité de la symbiose "Rhizobium- légumineuses" (Hopkins, 2003).

Un grand nombre de flavonoïdes est sécrété par les racines des plantes, ils stimulent la nodulation (Hopkins, 2003) et agissent comme des signaux d'induction de la transcription

bactériens nommés nodD pour nodulation. Ils favorisent également l'interaction symbiotique entre plantes et champignons mycorrhiziens (Shirley, 1996).

Ils interviennent pour défendre leur producteur contre les herbivores, les pathogènes ou les compétiteurs. En effet, entre plantes, la lutte passe par des empoisonnements à distance ou tétéoxie, ainsi, par exemple, les feuilles de noyer contiennent un glucoside du trihydronaphtalène qui, entraîné par les pluies, s'hydrolyse au niveau du sol en juglone toxique pour la plupart des plantes (Guignard, 2000).

Les isoflavonoïdes sont des phytoalexines, synthétisés par les plantes en réponse à des attaques microbiennes (Vanetten et al., 1994 ; Ardi et al., 1998), qui présentent une activité antibactérienne et antifongique; ils sont généralement présents en faibles concentrations ou complètement absents, mais sont rapidement synthétisés par la plante lors d'une infection bactérienne ou fongique (Hopkins, 2003). Guignard (2000), note que chez la luzerne et le haricot soumis à une infection fongique, le taux d'isoflavonoïdes est multiplié par cent en l'espace de quelques heures.

Ces composés présentent également des propriétés antivirales et pesticides (Costa-Arbulu et al., 2001). La production de phytoalexines paraît ainsi constituer un mécanisme de défense chez les plantes. En effet, selon Jay et al. (1996), la synthèse des phytoalexines est en relation avec les pathogènes.

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la protection contre les UV. En les absorbant ils protègent les tissus foliaires sous-jacents contre les dommages provoqués par les radiations UV (Raven et al, 2007).

Les flavonoïdes sont spécifiques de l'espèce. Cette caractéristique en fait de bons marqueurs utilisés en chimiotaxonomie (Gallet et Pellissier, 2002; Harchaoui-Ouafi, 2007). En effet, dans le monde végétal ces marqueurs métaboliques peuvent être utilisés comme descripteurs pour étudier la diversité des populations naturelles (Jay et al, 1996).

De nombreuses études ont montré qu'une alimentation riche en flavonoïdes est bénéfique pour la santé humaine. En effet, d'après Guillouty (2016), un régime riche en fruits et légumes permet de prévenir l'apparition de nombreuses pathologies, notamment les cancers, les maladies cardio-vasculaires et le diabète. Ce mécanisme protecteur est dû à la richesse en antioxydants naturels des fruits et légumes. Par ailleurs, Anderson et al. (1995), ont montré que les flavonoïdes et spécifiquement les isoflavones contenus dans le soja réduisent le taux de cholestérol.

Enfin Leopoldini et al. (2011), s'accordent à dire que les flavonoïdes ont un effet antiprolifératif et induisent l'apoptose dans différentes lignées de cellules cancéreuses.

1-6-MECANISMES D’ACTION DES POLYPHENOLS

L’activité antioxydante des polyphénols peut s’expliquer par trois mécanismes d’action, ce sont, le transfert d’atome d’hydrogène, le transfert d’électrons et la chélation des métaux de transition.

1-6-1-TRANSFERT D’ATOME D’HYDROGENE

L’antioxydant phénolique (ArOH) réagit avec le radical libre ($\text{R}^\bullet$) en lui transférant un atome d’hydrogène suite à la rupture de la liaison O-H, ($\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArO}^\bullet + \text{RH}$). A la fin de cette réaction nous obtenons la forme réduite du radical libre (RH), et la forme oxydée de l’antioxydant phénolique, représentée par le radical $\text{ArO}^\bullet$. Ce dernier est moins réactif que radical libre $\text{R}^\bullet$ (leopldilni et *al.*, 2011).

1-6-2-TRANSFERT D’ELECTRON

Au cours de ce mécanisme, l’antioxydant phénolique cède un électron qui est transféré au radical libre $\text{R}^\bullet$ selon la réaction suivante: $\text{ArOH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{ArOH}^{+\bullet} + \text{R}^-$. Les produits résultants sont l’anion R^- et le cation radical $\text{ArOH}^{+\bullet}$, ce sont des espèces chimiques stables (Bouguerne, 2012).

1-6-3- CHELATION DES METAUX DE TRANSITION

Le fer (Fe^{2+}) et le cuivre (Cu^+), interviennent dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ils entrent notamment dans la composition des cofacteurs de la superoxyde dismutase (Cu^+) et de la catalase (Fe^{2+}). Ils peuvent également être à l’origine du radical hydroxyle $\text{OH}^\bullet$ suite à la réduction du peroxyde d’hydrogène au cours de la réaction de Fenton. La chélation des métaux de transition par les polyphénols (Fig.13) inhibe la formation des radicaux libres dans les milieux biologiques en bloquant la réaction de Fenton (Pietta, 2000; Bouguerne, 2012)

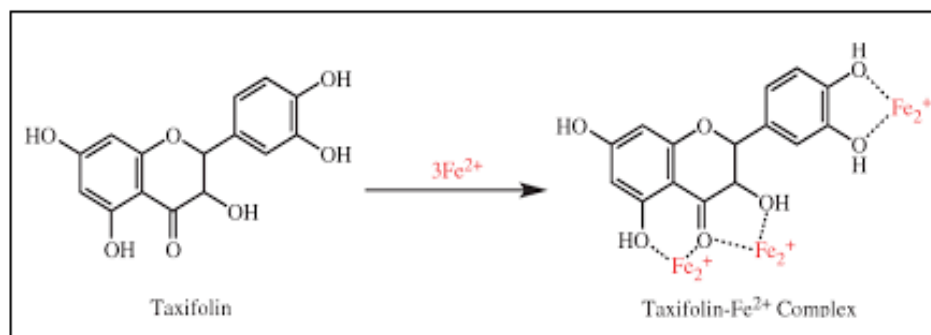


Figure 13 : Chélation des métaux de transition par les polyphénols (Pietta, 2000)

1-7-ACTIVITES BIOLOGIQUES DE L'OLIVIER ET DES EXTRAITS DE L'OLIVIER

Les feuilles d'olivier sont largement utilisées en médecine traditionnelle, elle sont diurétiques et préconisées dans l'hypertension artérielle. En infusion, elles sont fréquemment prises comme remède contre la fièvre, certaines maladies tropicales comme la malaria (Lee et al., 2009) et le paludisme (Ferreira et al., 2007). Par ailleurs, c'est une source de fourrage pour les chèvres et les moutons (Martin-Garcia et al., 2003) et d'après Botsoglou et al. (2010), leur incorporation dans l'alimentation des dindes améliore la qualité de stockage des viandes en retardant l'oxydation des lipides. Les feuilles sont également utilisées en cosmétiques.

Les travaux de Boudhrioua et al. (2009) montrent que les feuilles de l'olivier sont particulièrement riches en carbohydrates (37,1 - 42,5 g/100g de masse fraîche). La matière organique est constituée de protéines (5 - 7,6 g/100g de masse fraîche), de lipides (1 - 1,3 g/100g de masse fraîche), de monomères et polymères phénoliques tels que les tanins hydrosolubles et condensés avec les proportions respectives de 0,3 et 1 g/100g de masse sèche (Fegeros et al., 1995), de polysaccharides tels que la cellulose et l'hémicelluloses pour lesquelles Garcia-Gomez et al. (2003) avancent les valeurs respectives de 19,3 et 25,4 g/100g de masse sèche. Il faut cependant préciser que cette composition varie en fonction des conditions climatiques, de la saison de prélèvement, de l'âge du peuplement et de la variété étudiée (Nefzaoui, 1995).

Les extraits de feuilles d'olivier sont riches en composés phénoliques (De Nino et al., 1997). L'analyse chimique des extraits foliaires révèle la présence de 14 composés chimiques, ce sont: l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, le verbascoside (c'est un glucoside conjugué d'hydroxytyrosol et d'acide caféique), la lutéoline-7-glucoside, l'apigénine-7-glucoside, la diosmétine-7-glucoside, la catéchine, la vanilline, la rutine, l'acide vanillique, l'acide caféique, le tyrosol, la lutéoline et la diosmétine (Benavente-Garcia et al., 2000). L'oleuropéine représente le biophénol majeur des feuilles d'olivier et peut atteindre des concentrations allant de 60 à 90 mg/g de matière sèche (Ryan et al., 2002 ; Goldsmith et al., 2018). D'après Ghedira (2008), les feuilles d'olivier sont riches en triterpènes.

La concentration des composés phénoliques varie en fonction de la physiologie de la plante, des conditions du milieu, des éléments disponibles dans le sol et de l'âge du végétal (Perrinjaquet-Moccetti et al., 2008).

De nombreux chercheurs s'accordent à dire que les feuilles d'*Olea europaea* L. représentent une source naturelle de composés bioactifs, en particulier, les composés phénoliques dont un grand nombre présentent un large éventail d'activités biologiques.

Les feuilles d'olivier possèdent un pouvoir antimicrobien (Pereira et al., 2007) et antiviral. En effet, Micol et al. (2005); Lee et Lee (2010) rapportent leurs effets bénéfiques dans le traitement des affections causées par ou associées à un virus, une bactérie ou un protozoaire.

Dekanski et *al.* (2009) notent leur activité gastro-protectrice. D'après Lee et Lee (2010), l'extrait de feuilles d'olivier est efficace dans la protection du cœur lors d'une occlusion coronaire, en effet, il protège les vaisseaux sanguins et améliore la circulation sanguine.

Les activités antifongique, antidiabétique, hypoglycémiant et hypotensive et anticancéreuse sont relevées dans les travaux de Benavente-Garcia et *al.* (2000) ; Micol et *al.* (2005) et Goldsmith et *al.* (2015). En outre, Goldsmith et *al.* (2018) précisent que l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol ont montré une cytotoxicité envers les cellules cancéreuses sans affecter les cellules non tumorigènes dans les cancers du sein et de la prostate.

De nombreuses études ont montré le pouvoir antioxydant des principes actifs extraits des feuilles de l'olivier et leur grande capacité à piéger les radicaux libres (Tab. IV). Ainsi, selon Goldsmith et *al.* (2018), l'oleuropéine et l'hydroxytyrosol possèdent un puissant pouvoir antioxydant.

Tableau IV: Activités des polyphénols des feuilles de l'olivier

Composés chimiques	Activités	Références
Hydroxytyrosol	*Forte activité BCB *Activité antioxydante	Tsimogiannis et <i>al.</i> (2007) Bouaziz et Sayadi (2005) Visioli et Galli (2002)
Tyrosol	*Activité antioxydante	Visioli et Galli (2002)
Acide caféique	*Activité de piégeage des radicaux libres *Activité antioxydante	Adjimani et Asare (2015) Caturla et <i>al.</i> (2005)
Rutine	*Activité antioxydante *Piégeage de radicaux libres	Caturla et <i>al.</i> (2005) Sharififar et <i>al.</i> (2009)
Glucose-7-Lutéoline	*Activité antioxydante	Le Tutour et Guedon (1992)
Oleuropeine	*Activité antioxydante *Forte activité BCB	Le Tutour et Guedon (1992) ; Lee et <i>al.</i> (2009) Tsimogiannis et <i>al.</i> (2007)
Naringenine-7-glucose		
Lutéoline	*Forte activité antioxydante sur la peroxydation de l'acide linoléique *Forte activité BCB	Duh et <i>al.</i> (1992) Tsimogiannis et <i>al.</i> (2007)
Apigénine	*DPPH et BCB	Sharififar et <i>al.</i> (2009)

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

2-1- MATERIEL

2-1-1- MATERIEL VEGETAL

La récolte des tiges feuillées de l'olivier de Laperrine utilisées au cours de notre expérimentation, est réalisée sur des pieds mère adultes de la station de Oued Hanghassi Ouan Tighert ($23^{\circ}14'50.1''N$, $5^{\circ}29'13.7''E$) de la région de Tamanrasset en mai 2015 (Fig.14A et Fig.14B).



Figure 14A: Localisation de la zone d'étude.
Sur la feuille d'Assekrem. Echelle : 1/200 000

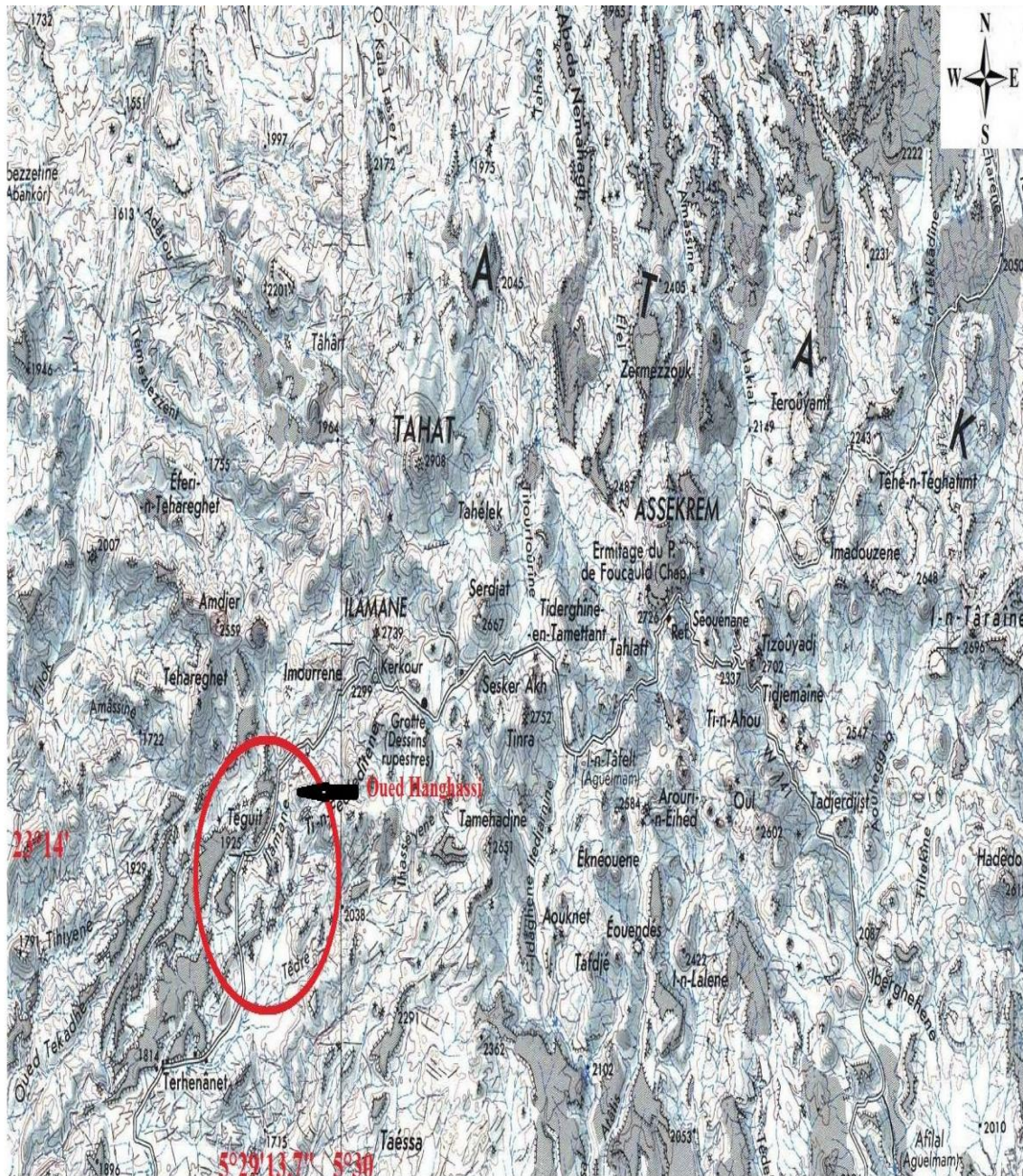


Figure 14 B: Localisation de la zone d'étude

Agrandissement à partir de la feuille d'Assekrem

La station de Oued Hanghassi Ouan Tighert, est localisée dans la région naturelle de l'Atakor, sur le côté Nord-Ouest. Elle se situe à environ 2100 mètres d'altitude au Nord-Ouest de la ville de Tamanrasset à environ 85 km., et appartient à l'étage bioclimatique saharien à hiver chaud. Selon données météorologiques recueillies au niveau de la station de Tamanrasset sur la période allant de 2000 à 2013 (NOAA, 2013), les températures moyennes maximales sont enregistrées durant le mois de juillet (30,4 °C) et les températures moyennes minimales en janvier (13 °C).

L'Oued Hanghassi Ouan Tighert est en exposition Nord Est. La superficie de notre station d'étude correspond à une quarantaine de km² et compte 30 pieds d'olivier de Laperrine, tous

échantillonn é (Echantillonnage syst ématique). Les arbres échantillonn é sont des pieds francs de 4 à 6 mètres de haut de distant l'un de l'autre d'environ 8 mètres
Le substrat où les échantillons sont récolt é est de nature rocailleuse granitique avec présence de sables grossiers. Nous rencontrons dans cette station de l'eau qui coule en surface d'où le nom de Tighert.

Comme esp èce présente nous citons *Rhus tripartitus*, *Periploca laevigata*, un pied de *Myrtus nivellei*, quelques touffes d'*Atriplex halimus*, quelques pieds en aval de l'Oued de *Nerium oleander* et *Tamarix gallica* (Fig. 15).



Figure 15 : Diff érentes esp èces v ég éales rencontr ées dans la station d'étude
(A :*Rhus tripartitus*, B : *Periploca laevigata*, C : *Myrtus nivellei*, D : *Atriplex halimus*, E : *Nerium oleander* et F : *Tamarix gallica*)

Clich és fournis par M^{me} Sahki et M^r Abdellaoui Station INRF Tamanrasset

L'olivier de Laperrine est identifi é gr âce à ses caract éristiques par l'utilisation de la flore d'Ozenda (2004). L'authentification de l'esp èce est confirm ée par Mr Abdellah Sahki, chef de la station de Tamanrasset de l'Institut national de la recherche foresti ère (INRF).

Une fois au laboratoire, les feuilles et les tiges récoltées et triées sont séchées à l'air libre, à l'ombre et à l'abri de l'humidité. Elles sont par la suite broyées séparément (diamètre des particules compris entre 0,5 et 1 mm.) et conservées à l'obscurité et à température ambiante.

La poudre obtenue servira pour les différentes extractions.

2-1-2-ELEVAGE DE LA PYRALE AU LABORATOIRE

Ephestia kuehniella provient des moulins Seybousse de la ville d'Annaba (Nord-Est Algérie). L'élevage est conduit au laboratoire dans une étuve sous des conditions optimales de développement, caractérisés par l'obscurité avec une température de 27 °C et une humidité relative d'environ 70% (Soltani-Mazouni et al., 2012; Delimi et al., 2017).

Les adultes sont déposés dans des bocaux en verre de 20 cm de long avec un diamètre de 10 cm., ils contiennent de la farine et sont recouverts d'un tulle fixé par un élastique. Du coton imbibé d'eau sucrée est déposé sur chaque bocal dans le but d'activer la croissance de l'insecte (Fig.16).



Figure 16: Elevage de masse de la pyrale de la farine

Le suivi de l'élevage nous a permis de déterminer le sexe et de prélever des larves mâles ou femelles dans des boîtes de Pétri contenant de la farine et du papier plissé permettant aux larves de passer au stade de nymphe (Delimi et al., 2013). La datation des nymphes se fait en jour après l'exuviation nymphale (Taibi et al., 2003).

2-1-3-PRELEVEMENTS SANGUINS

Un prélèvement de sang veineux est effectué au niveau du pli du coude sur des volontaires sains (n= 10), non-fumeurs et ne suivant aucun traitement. Le sang est récupéré dans des tubes héparinés et conservé à 4 °C, pendant une période ne dépassant pas 48 h.

2-2-METHODES

Les différentes extractions et les divers protocoles visant à évaluer le potentiel antioxydant des extraits de l'olivier de Laperrine ont été réalisés au niveau du laboratoire de recherche en biochimie analytique et biotechnologie (LABAB) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

L'expérimentation menée sur l'effet des extraits de l'olivier de Laperrine sur la pyrale de la farine (*Ephestia kuehniella*) a été réalisée au sein du laboratoire de Biologie Animale Appliquée à l'Université d'Annaba.

2-2-1- PROCEDURE D'EXTRACTION

Il n'y a pas de techniques d'extraction universelle à tous les végétaux, la grande diversité structurale des polyphénols implique une grande variabilité de leur propriétés physicochimiques et par conséquent nécessite différentes techniques d'extraction et de solvants (Vercautern, 1996).

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des feuilles de l'olivier de Laperrine, nous avons réalisé une extraction aqueuse et une extraction éthanolique. Ces dernières considèrent l'extrait végétal dans sa globalité. En effet, d'après Dai et Mumper (2010), l'évaluation de l'activité antioxydante est plus efficace en considérant l'ensemble de l'extrait végétal plutôt que de séparer chaque fraction et l'étudier individuellement.

Selon de nombreux auteurs (Zouiten et El Hadrami 2001 ; Salunké et al., 2005 ; Meftah et al., 2011), les flavonoïdes présentent une forte activité insecticide. Ainsi et dans le but de tester le potentiel effet insecticide des extraits obtenus à partir de l'olivier de Laperrine sur la pyrale de la farine, nous avons réalisé une extraction acide. Cette dernière est selon Harchoui-Ouafi (2007) et Gaceb-Terrak (2010), préconisée pour l'extraction des flavonoïdes.

2-2-1-1-EXTRACTION AQUEUSE

Nous avons procédé à la dissolution de 20 grammes de poudre de feuilles dans 200 ml d'eau distillée. Après une macération pendant 24h à l'obscurité sous agitation (100 rpm) à température ambiante, la phase aqueuse du macérât est filtrée sur papier Wattman n°1 (Aiche- Iratni et al., 2015 ; Moualek et al., 2016).

D'après Abascal et al. (2005), la lyophilisation ou la déshydratation à froid assure une meilleure extraction des composés phénoliques. Dai et Mumper (2010), précisent que cette méthode permet en outre de mieux préserver le matériel végétal.

Ainsi, le filtrat résultant de l'extraction est lyophilisé (lyophilisateur christ alpha 1-2). Les poudres végétales ainsi obtenues sont conservées à l'obscurité à 4 °C dans des flacons, hermétiquement fermés en vue de leurs utilisations ultérieures.

2-2-1-2-EXTRACTION ETHANOLIQUE

Nous procédons de la même manière que pour l'extraction aqueuse. En effet, 20g de poudre de feuilles sont mis à macérer dans 200 ml d'éthanol-eau (70:30, v/v). Le filtrat éthanolique obtenu est mis à évaporer à l'obscurité et à l'abri de l'humidité. Le résidu sec résultant est repris dans de l'eau distillée avant d'être lyophilisé

Les différentes étapes des extractions aqueuse et éthanolique sont résumées dans la figure 17.

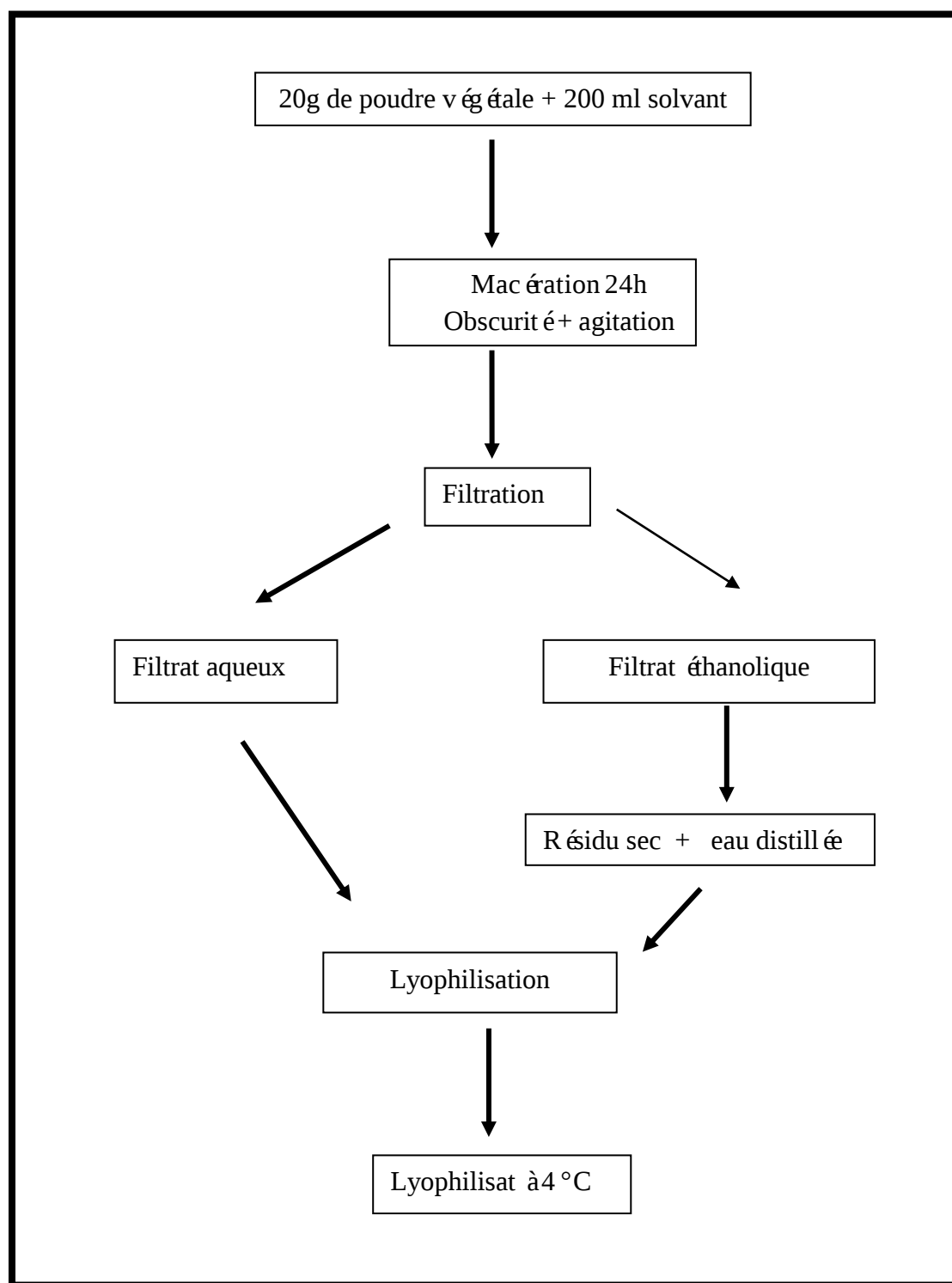


Figure 17 : Sch éma illustrant les diff érentes é tapes d' extraction

La pesée des résidus secs obtenus après lyophilisation nous permet de déterminer le rendement R de l'extraction obtenu pour chaque type extrait selon la formule suivante

$$R \% = (PS/PV) \times 100$$

Avec :

R=Pourcentage du rendement;

PS=Poids sec des résidus secs;

PV=Poids de la poudre de feuilles.

2-2-1-3-EXTRACTION ACIDE

Les poudres de feuilles et de tiges subissent une hydrolyse acide selon le protocole analytique mis au point par Lebreton et *al.* (1967) et Jay et *al.* (1975) modifié par Laracine en 1984. L'extraction consiste en une hydrolyse acide à chaud, de la poudre végétale au bain marie. Une insufflation d'air est réalisée toutes les 10 mn, elle a pour but de faciliter l'oxydation des proanthocyanes en anthocyanes correspondantes et la libération des aglycones flavoniques à partir de leur O-glycosyl-flavonoïdes. Ainsi, dans un erlenmeyer de 500 ml, nous introduisons g de poudre végétale et 160 ml d'acide chlorhydrique deux fois normal (HCl 2N).

Le mélange est porté au bain marie à 40 °C pendant 40 minutes. L'extraction des flavonoïdes, après hydrolyse et refroidissement est conduite en ampoule à décanter. Trois bains successifs d'éther éthylique (60 ml - 60 ml - 40 ml) sont réalisés, ce qui permet de recueillir les flavonoïdes représentés par les flavones, les flavonoles et les acides phénols dans l'épiphase éthérée. Les trois extraits éthérés sont réunis pour évaporation spontanée à sec, sous hotte ventilée. Nous récupérons flavonoïdes à l'aide de 5ml de méthanol pur.

L'hypophase acide résiduelle contient les anthocyanidines qui sont dosés par spectrophotométrie à 540 nm et les C-glycosyl-flavonoïdes.

Cette même phase est par la suite reprise par deux bain (40 ml – 40 ml) de n-butanol pour l'extraction des C-glycosyl-flavonoïdes, l'extrait butanolique est évaporé sous hotte ventilée.

Le résidu sec obtenu après évaporation est repris dans 5 ml de méthanol pur.

Les différentes étapes de cette extraction sont représentées dans la figure 18.

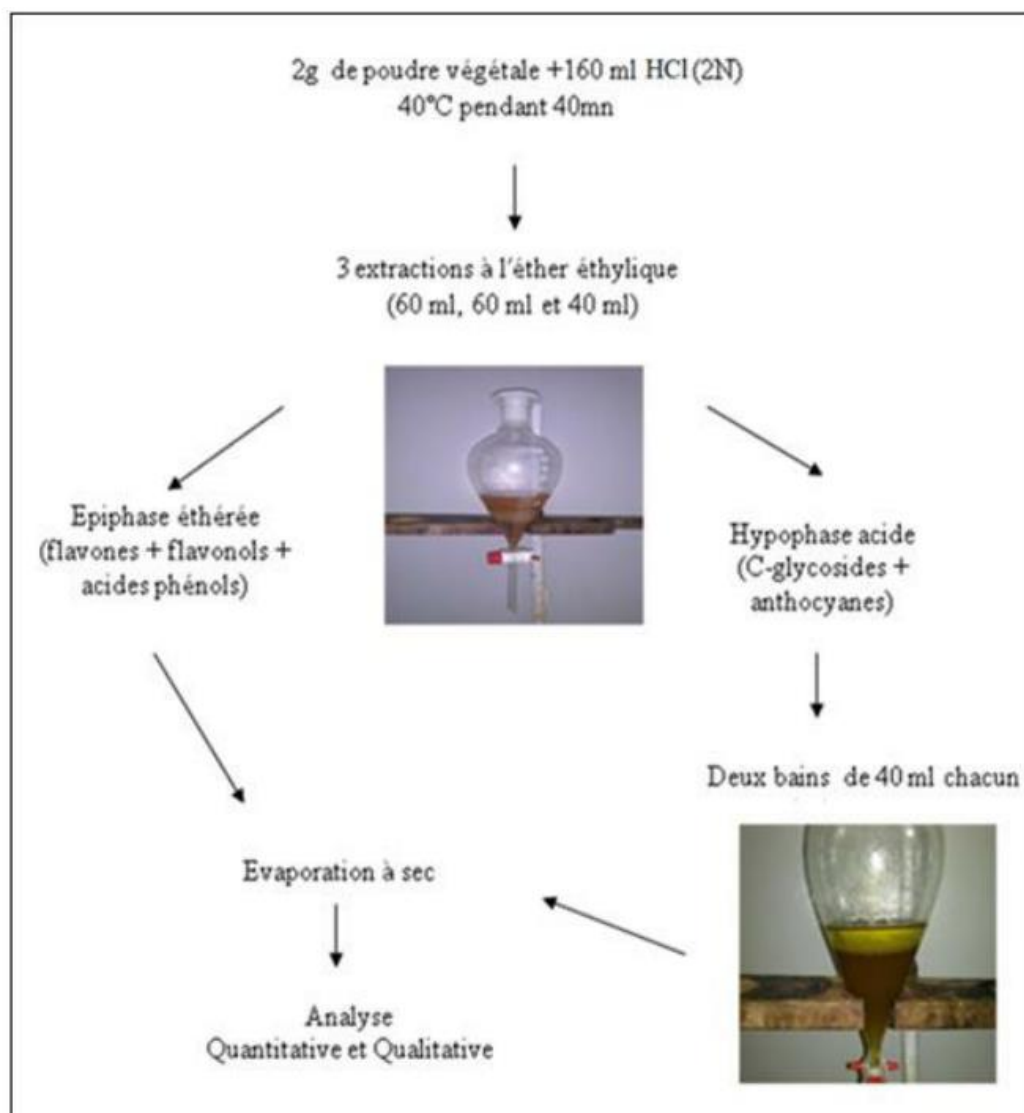


Figure 18: Protocole analytique d'extraction acide (Lebreton et *al.*, 1967)

Les extraits bruts résultants de l'hydrolyse acide sont représentés par une phase étherée issue de feuilles (EF) ou de tiges (ET) et une phase butanolique obtenue à partir de feuilles (BF) ou de tiges (BT).

Suite aux étapes d'extraction, les extraits sont soumis à deux techniques d'analyse, techniques spectrophotométriques et chromatographiques.

2-2-2- ANALYSE QUANTITATIVE

L'analyse quantitative est menée par une série de dosages spectrophotométriques UV-visible.

2-2-2-1-DETERMINATION DE LA TENEUR EN PHENOLS TOTAUX

Les phénols totaux sont estimés par la méthode au Folin-ciocalteu décrite par Singleton et Rossi (1965).

Les phénols présents dans les différents extraits subissent une réaction d'oxydation en présence du réactif de Folin-ciocalteu (RFC) aboutissant à une coloration bleue proportionnelle à la quantité de polyphénols contenus dans les extraits de feuilles d'olivier.

La teneur en polyphénols totaux est déterminée par extrapolation sur la courbe étalon, établie à partir d'une série de dilutions (10 -100 µg/ml) d'une solution mère (100 µg/ml) d'acide gallique servant de référence. Dans chaque tube à essai sont ajoutés 0,25 ml de l'échantillon à doser, 1,25 ml du réactif RFC (1/10) et 1 ml de carbonate de sodium (75 g/l). Les différentes solutions sont incubées à 40 °C pendant 30 minutes. L'absorbance est par la suite mesurée à 765 nm. par un spectrophotomètre Meline MD 2000. La teneur en totaux est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de poudre végétale (mg EAG/g PV).

2-2-2-2- DETERMINATION DE LA TENEUR EN FLAVONOÏDES TOTAUX

La méthode utilisée est celle décrite par Chang et *al.* (2002). Elle est basée sur l'utilisation du chlorure d'aluminium donnant une coloration jaunâtre par chélation des flavonoïdes. Ainsi, à 0,5 ml de la solution de chaque extrait, sont ajoutés 1,5 ml de méthanol, 0,1 ml de chlorure d'aluminium (10%), 0,1 ml d'acétate de potassium (1M) et 2,8 ml d'eau distillée.

Le mélange est incubé pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 415 nm. La courbe étalon est réalisée avec la quercétine (100 µg/ml), et l'équation de régression linéaire, permet de calculer la teneur totale en flavonoïdes exprimée en milligramme équivalent quercétine par gramme de poudre végétale (mg EQ/g PV).

2-2-2-3- DETERMINATION DE LA TENEUR EN TANINS TOTAUX

Le dosage des tanins est réalisé selon le protocole mis au point par Hagerman et Butler (1978). Son principe consiste à précipiter l'albumine de sérum bovin (BSA) par les tanins conduisant ainsi à la formation d'un complexe protéines-tanins dont la teneur est mesurée par spectrophotométrie à 510 nm. 1ml de la solution de BSA (1mg/ml), est mélangé à 500µl de la solution de l'extrait ; après une incubation de 24 h à 4 °C, le précipité est récupéré par centrifugation à 750 g à 4 °C pendant 15 minutes puis dissout dans 2 ml de sodium dodécylsulfate (SDS)/ triethanolamine (TEA) (1%/5%) additionné de 500 µl du réactif FeCl₃.

Une incubation de 15 minutes est suivie par la lecture de l'absorbance.

La teneur totale en tanins exprimée en milligramme équivalent acide tannique par gramme de poudre végétale (mg EAT/g PV), est déterminée par l'utilisation de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide tannique.

2-2-2-4- DOSAGE GLOBAL DES AGLYCONES FLAVONIQUES

Le dosage différentiel des aglycones flavoniques totaux fait intervenir les propriétés chélatantes des ions Al^{3+} sur les flavonoïdes. La hauteur du pic différentiel, proportionnelle à la concentration des aglycones flavoniques présents dans l'extrait est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde 430 nm.

La teneur globale des aglycones flavoniques est exprimée en mg d'équivalent quercétine /g de poudre végétale (mg EQ/g PV) par la formule suivante (Lebreton et *al.*, 1967) :

$$T \text{ (mg/g)} = (\Delta DO/\epsilon) M V (d/p) = 1,3 \cdot 10^{-2} \Delta DO V (d/p)$$

Avec:

ΔDO = Densité optique du pic différentiel;

M = Masse molaire de la quercétine (302);

V = Volume de la solution méthanolique d'aglycones-flavoniques;

d = Facteur de dilution;

p = Poids du matériel végétal sec hydrolysé

ϵ = Coefficient d'absorption molaire de la quercétine dans le chlorure d'aluminium ($230000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Selon Idrissi-Hassani (1985), ce dosage présente un taux de variation de 5%.

2-2-2-5-DOSAGE DES ANTHOCYANES

Les anthocyanes hydrosolubles sont dosés par spectrophotométrie aux longueurs d'ondes d'absorption maximale des anthocyanes comprises entre 520 et 540 nm.

Selon Lebreton et *al.* (1967), la teneur en proanthocyanes totaux est exprimée en mg d'équivalent procyanidine/g de poudre végétale (mg EPC/g PV), par la formule suivante :

$$T \text{ (mg/g)} = \eta DO/\epsilon M V (d/p) = 5,2 \cdot 10^{-2} DO V d/p$$

Avec:

DO = Densité optique à 520 nm;

M = Masse molaire de la cyanidine (306);

V = Volume de la phase butanolique;

d = Facteur de dilution;

p = Poids du matériel végétal sec hydrolysé

ϵ = Coefficient d'absorption molaire de la cyanidine ($34700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

d = Facteur de dilution;

η = Facteur de correction du rendement de l'oxydation des proanthocyanes en anthocyanes

Cette méthode présente un risque d'erreur de 5% (Idrissi-Hassani, 1985).

2-2-2-6- DOSAGE DES C-GLYCOSIDES

La présence des C-glycosides est déterminée par l'apparition de l'orientine. Celle-ci est dosée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 340 nm.

La teneur en C-glycosides totaux est exprimée en mg d'équivalent orientine/g de poudre végétale (mg EO/g PV) par la formule suivante (Lauranson, 1989):

$$T \text{ (mg/g)} = DO/\varepsilon MV \text{ (d/p)} = 2,5 \cdot 10^{-2} DO V \text{ (d/p)}$$

Avec:

DO = Densité optique ;

M = Masse molaire de l'orientine (448);

V = Volume de la phase méthanolique;

d = Facteur de dilution;

p = Poids du matériel végétal sec hydrolysé

ε = Coefficient d'absorption molaire de l'orientine ($18850 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2-2-3- ANALYSE QUALITATIVE

Composition chimique des différents extraits est obtenue par la technique de chromatographie en phase liquide sous les conditions opératoires suivantes.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un chromatographe en phase liquide de marque AGILENT série 1100, équipé d'un détecteur à barrette de diodes (DAD) avec plusieurs longueurs d'ondes choisies en fonction des absorbances maximales des molécules recherchées, d'une pompe quaternaire, dégazeur on-line et injecteur automatique. Le chromatographe est muni d'une colonne Hypersil BDS-C18, 5 μm , 250X4,6 à température de 30 °C.

L'élution est réalisée par une phase mobile composée d'un gradient de solvant allant de 95% d'eau acidifiée à 0,2% par l'acide acétique (pH 3,1) jusqu'à 100% d'acétonitrile pendant 30 minutes. Le volume injecté est de 5 μl de l'extrait solubilisé dans du méthanol à raison de 0,3g/ml. Le débit d'écoulement est de 1,5 ml/min.

La concentration de chaque composé phénolique de l'extrait est exprimée en pourcentage à partir des aires des pics obtenus. Leur identification est réalisée par comparaison des temps de rétention des différents standards analysés selon le même mode opératoire et dans les mêmes conditions et par leur spectre UV.

2-2-3-1- TENEURS ABSOLUES DES MOLECULES BIOCHIMIQUES

La teneur absolue des molécules biochimiques est déterminée à partir des profils obtenus suite à la caractérisation chimique des différents extraits par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Elle est calculée selon la formule suivante :

Teneur absolue ($[mAU^*]/g$ PV) = Aire du pic occupée par la molécule considérée x Volume de récupération du résidu sec/Volume d'injection

2-2-4- ACTIVITES ANTIOXYDANTES

Le stress oxydant impliqué dans le vieillissement cellulaire et dans de nombreuses pathologies (coronariennes, cardiovasculaires, inflammatoires et dans certains cancers) peut être atténué par les polyphénols contenus dans les végétaux grâce à leur important pouvoir antioxydant.

Les principaux effets antioxydants des polyphénols se traduisent d'une part, par les réactions d'oxydo-réductions évaluées dans notre étude par les tests de la réduction du phosphomolybdate et la réaction du fer. D'autre part, le pouvoir antioxydant des polyphénols se manifeste par leur capacité à neutraliser les espèces réactives à l'oxygène qui est évaluée par le test de neutralisation des radicaux DPPH, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Ce sont des méthodes spectro-photométriques le plus souvent utilisées pour l'évaluation des activités antioxydantes des extraits de végétaux.

Tous les tests sont répétés trois fois.

2-2-4-1- CAPACITE ANTIOXYDANTE TOTALE OU TEST DU PHOSPHOMOLYBDATE (TAC ASSAY)

Le test du phosphomolybdate permet d'évaluer la capacité antioxydante totale des extraits végétaux. Il est basé sur la réduction des ions molybdate $Mo(VI)$ en molybdène $Mo(V)$. Les antioxydants rompent la chaîne des radicaux libres en libérant un atome d'hydrogène (Gordon, 1990), entraînant ainsi la formation d'un complexe vert (phosphate/ Mo à pH acide).

L'intensité du complexe formé est proportionnelle au pouvoir réducteur des extraits testés.

La capacité antioxydante totale est estimée par le dosage du phosphomolybdène selon le protocole mis au point par Prieto *et al.* (1999). Le test consiste à mélanger 0,1 ml de l'extrait végétal à différentes concentrations (100 à 700 $\mu g/ml$) avec 1 ml du réactif de molybdate composé de 0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM NaH_2PO_4 et 4 mM molybdate d'ammonium.

Après une incubation de 90 minutes à 95 °C et refroidissement du mélange à température ambiante, l'absorbance est lue à 695 nm. La courbe étalon est établie avec l'acide ascorbique (20 - 200 $\mu g/ml$), la droite de régression permet de calculer la teneur totale de la TAC. Cette dernière est exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/g d'extrait).

2-2-4-2-DETERMINATION DU POUVOIR REDUCTEUR (FRAP ASSAY)

Le pouvoir réducteur des extraits est évalué selon la méthode d'Oyaizu (1986). Elle est basée sur la réduction des ions ferriques (Fe^{+3}) présents dans le ferricyanure de potassium, $K_3Fe(CN)_6$ à

1 1% (m/V) en ions ferreux (Fe^{+2}) en présence d'un antioxydant qui a le pouvoir de céder des
2 électrons. Cette réaction conduit à la formation d'un complexe bleu dont l'intensité indique une
3 augmentation de la réduction du fer.

4 Ce test est un indicateur de l'activité donatrice d'électrons qui caractérise le pouvoir antioxydant
5 des polyphénols.

7 Différentes concentrations d'extrait de feuilles d'olivier de Laperrine (40 à 300 $\mu\text{g/ml}$) sont
8 préparées dans de l'eau distillée et mélangées avec 2,5 ml de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6) et
9 2,5 ml de ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) (1% m/v). Le mélange est incubé à 50 °C
10 pendant 20 minutes, puis 2,5 ml d'acide trichloracétique (10%) sont ajoutés. Le mélange est ensuite
11 centrifugé à 750 g pendant 10 minutes.

13 Nous prenons 5 ml du surnageant que nous mélangeons à 5 ml d'eau distillée et 1 ml de FeCl_3
14 (0,1%). Enfin, l'absorbance est mesurée à 700 nm.

16 L'augmentation de l'absorbance du mélange réactionnel indique une augmentation du pouvoir
17 réducteur. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif dans les mêmes conditions
18 expérimentales.

20 La teneur totale de la FRAP, exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par
21 gramme d'extrait (mg EAA/g d'extrait), est déterminée par l'utilisation de l'équation de
22 régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique.

24 2-2-4-3-DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE PIEGEAGE DES RADICAUX LIBRES (DPPH 25 ASSAY)

27 Le radical DPPH• est généralement l'un des composés les plus utilisés pour l'évaluation rapide
28 et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité sous forme radicale et la simplicité de
29 l'analyse (Bozin et al., 2008).

31 L'effet des extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) ainsi que l'acide ascorbique sur le
32 piégeage des radicaux DPPH• est estimé selon la procédure décrite par Sharma et Bhat (2009) ;
33 Santos et al. (2010). Un volume de 3,75 ml de chaque extrait solubilisé dans du méthanol dont
34 les concentrations varient de 2,5 à 20 $\mu\text{g/ml}$, sont mélangés à 0,25 ml de DPPH (0,8 mM). Après
35 une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance est
36 mesurée à 517 nm.

38 Le pourcentage de piégeage des radicaux libres est calculé selon la formule:

$$\text{Ac-As/Ac} \times 100 ;$$

41 Avec :

42 Ac = Absorbance du contrôle;

43 As= Absorbance de l'échantillon.

L'activité antiradicalaire est définie par deux paramètres:

*La concentration efficace (EC50), définie comme la quantité d'antioxydants nécessaire pour diminuer la concentration initiale du radical DPPH• de 50%. Cette valeur est calculée à partir de l'équation de régression qui est représentée par le pourcentage de piégeage en fonction des concentrations de l'extrait végétal. Plus cette valeur est basse, plus la capacité de piégeage des radicaux libres est élevée.

**L'indice de l'activité antioxydante (IAA), correspond selon Scherer et Godoy (2009), à la concentration finale du DPPH (µg/ml)/EC50 (µg/ml). Les extraits peuvent présenter une activité antioxydante faible (IAA < 0,5), modérée (IAA comprise entre 0,5 et 1,0), forte (IAA comprise entre 1,0 et 2,0) et très forte (IAA > 2,0).

2-2-4-4- INHIBITION DU BLANCHIMENT DU β-CAROTÈNE (BCB ASSAY)

L'activité antioxydante des extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) est mesurée selon le protocole mis au point par Tepe et al. (2006). La méthode de blanchiment du β-carotène repose sur la perte de la couleur orange, due à sa réaction avec les radicaux peroxydes libres résultants de l'oxydation de l'acide linoléique dans une émulsion. Ainsi, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux libres peroxydes (ROO•), formés lors de l'extraction d'un atome d'hydrogène et l'un des groupements méthylène diallylique attaque les molécules de β-carotène hautement insaturées, le β-carotène est ainsi oxydé et partiellement dégradé. Par la suite le système perd le chromophore et sa couleur orange caractéristique devient incolore (Jayaprakasha et al., 2001).

Le taux de blanchiment du β-carotène, peut être ralenti en présence des antioxydants contenus dans les extraits végétaux, qui donnent un atome d'hydrogène pour inhiber les radicaux peroxydes libres, la réaction est la suivante: $ROO\bullet + AH \rightarrow ROOH + A\bullet$.

Ainsi, 2 mg de β-carotène sont dissous dans 1 ml de chloroforme, ce mélange est introduit dans une fiole contenant 25 µl d'acide linoléique pur et 200 mg de tween 40. Nous procédons à une évaporation du chloroforme à 40 °C à l'aide d'un rotavapor sous vide. Par la suite, 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés et le mélange obtenu est agité vigoureusement. 2,5 ml de ce mélange sont additionnés à 350 µl de différentes concentrations (100 à 1800 µg/ml) des extraits végétaux testés et au BHT témoin positif. Après une incubation à 50 °C pendant 120 min, l'absorbance est lue à 470 nm.

Le pourcentage d'inhibition (I%), est calculé par l'équation:

$$(E_{120}-C_{120}/C_0-C_{120}) \times 100$$

Avec :

E_{120} = Absorbance de l'échantillon à t_{120} min;

C_{120} = Absorbance du contrôle à t_{120} min;

C_0 = Absorbance du contrôle à t_0 min.

2-2-4-5-DETERMINATION DE L'ACTIVITE DE PIEGEAGE DU PEROXYDE D'HYDROGENE

La capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine est déterminée selon la méthode décrite par Ruch et *al.* (1989). Une solution de peroxyde d'hydrogène (40 mM) est préparée dans un tampon phosphate (pH 7,4). Une aliquote de 3,4 ml de l'échantillon à différentes concentrations (130 à 510 µg/ml) est ajoutée à 0,6 ml de la solution de H₂O₂. Après 10 minutes d'incubation, l'absorbance du mélange réactionnel est lue à 230 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme témoin positif.

La capacité de piéger le H₂O₂ des extraits et du référent est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de piégeage} = (1 - \text{Absorbance de l'extrait} / \text{Absorbance du témoin}) \times 100.$$

2-2-5-TEST HEMOLYTIQUE

La toxicité des feuilles de l'olivier de Laperrine sur les globules rouges est évaluée selon le protocole mis au point par Kumar et *al.* (2013). Les globules rouges sont séparés du plasma par centrifugation de 3 ml de sang à 200 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le culot obtenu est lavé trois fois avec 3 ml de tampon phosphate (pH 7,4 ; NaCl 0,9%). 1 ml de la solution d'érythrocytes (2%) est incubé dans un volume égal d'extrait EA et EE à différentes concentrations (62,5 à 2000 µg/ml), dissous dans du PBS. L'eau distillée est utilisée comme témoin positif et le PBS comme témoin négatif. Après une incubation à 37 °C pendant 30 minutes sous agitation modérée (20 rpm), le mélange est centrifugé à 200 g à 4 °C pendant 10 minutes.

L'absorbance du surnageant contenant l'hémoglobine est lue à 540 nm. Le pourcentage d'hémolyse est calculé selon la formule:

$$(\text{Absorbance}_{\text{extrait}} - \text{Absorbance}_{\text{témoin négatif}} / \text{Absorbance}_{\text{témoin positif}} - \text{Absorbance}_{\text{témoin négatif}}) \times 100$$

2-2-6- ACTIVITE BIO-INSECTICIDE

Cette expérimentation est menée dans le but d'évaluer l'effet bio-insecticide des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur les paramètres de la reproduction d'*Ephesia kuehniella* et sur la mortalité des adultes.

Dans un premier temps, nous avons testé l'extrait aqueux obtenu à partir des feuilles de l'olivier sur la pyrale de la farine. Cependant les résultats obtenus n'étaient pas suffisamment concluant pour être exploités. Ceci serait peut être dû à la forte teneur en impuretés de l'extrait aqueux (Rafiee et *al.*, 2011).

Suite à cela, nous avons concentré nos efforts sur les différentes fractions obtenues après l'extraction des flavonoïdes, ces derniers sont connus pour leur effet insecticide. Ainsi, nous tentons d'évaluer le résultat de l'exposition de la pyrale de la farine aux extraits EF (extrait éthéré de feuilles), ET (extrait éthéré de tiges), BF (extrait butanolique de feuilles) et BT (extrait butanolique de tiges).

Ces derniers sont administrés à des chrysalides et à des adultes nouvellement exuvies de la pyrale de la farine, par inhalation (saturation de leur environnement) (Delimi et al., 2013). Les différents extraits sont répandus uniformément sur le papier filtre déposé dans des boîtes de Pétri (Fig. 19A) ou dans des flacons (Fig.19B), contenant l'insecte ravageur (Ndomo et al., 2009).

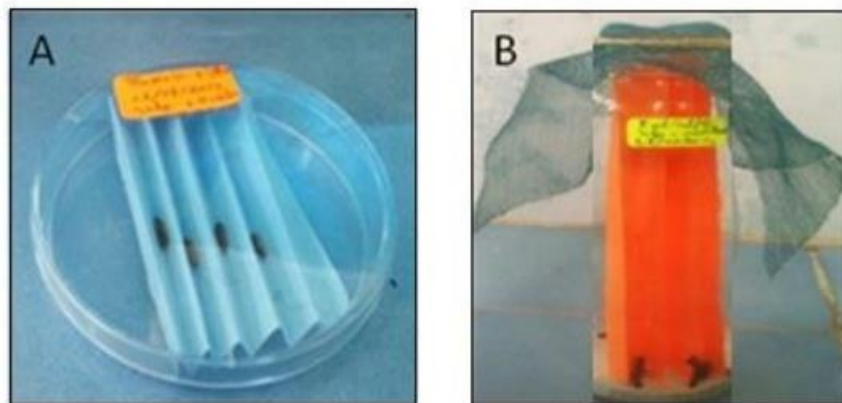


Figure 19: Application des extraits de l'olivier de Laperrine de la pyrale de la farine.

A: Dans des boîtes de Pétri, **B:** Dans des flacons

Dans le cas des chrysalides et dans des boîtes de Pétri, les extraits bruts, EF, ET, BF et BT sont pulvérisés sur du papier plissé sur lequel sont déposées quatre nymphes femelles par boîte de Pétri, immédiatement après leur exuviation nymphale. Ce stade représente le début du développement des ovaires chez les lépidoptères, (Delimi et al., 2017).

L'administration des extraits bruts à ce stade du cycle de vie, a pour objectif de tester la maturation des ovaires des femelles et le pourcentage d'œufs pondus. Sept répétitions sont réalisées pour chaque traitement, les boîtes témoins sont traitées par le méthanol, solvant de solubilisation.

Dans le cas des adultes, dès leur exuviation, un couple de papillon est déposé dans chaque flacon, ce dernier contient 30 g de farine. Les extraits bruts sont pulvérisés sur le papier plissé introduit dans les flacons.

Sept répétitions sont réalisées par traitement et les flacons témoins sont traités au méthanol.

La concentration des extraits bruts testés est de 0,2 g/ml et leur effet sur la reproduction d'*Ephestia kuehniella*, a pour but l'évaluation des paramètres suivants:

- *La durée du développement nymphal* correspondant au temps exprimé en jours, qui sépare l'exuviation nymphale de l'exuviation adulte;
- *La durée de la période de pré-oviposition*, représentée par le nombre de jours séparant l'émergence adulte et le début de la ponte des œufs;
- *La durée de la période d'oviposition* est estimée par le nombre de jours de ponte ;

- *La fécondité des femelles*, qui correspond au nombre d'œufs déposés durant toute la durée d'oviposition.

Par la suite, nous introduisons dix adultes, mâles et femelles, dans un flacon contenant 30 g de farine. Le traitement se fait par pulvérisation du papier plissé se trouvant dans le flacon par les extraits de l'olivier. Les flacons témoins sont traités au méthanol.

Les essais de toxicité des différents extraits, portent sur le comptage de la mortalité des insectes traités après une période de 21 jours, depuis le début de l'expérience (Chaieb, 2011). Notre but est d'estimer la longévité des insectes soumis aux extraits bruts de l'olivier. Cette dernière est déterminée par le taux de mortalité des insectes témoins et traités qui est calculé à partir de la formule suivante:

$$\text{Mortalité observée} = (\text{Nombre d'individus morts} / \text{Nombre total d'individus}) \times 100.$$

2-2-7-TRAITEMENTS DES DONNEES

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne affectée de son écart-type au risque de 5%. Le test *t* de Student est utilisé pour analyser le niveau de signification statistique entre les séries des moyennes traitées deux à deux dans le cas des dosages réalisés.

L'influence des différents extraits sur le pouvoir antioxydant ainsi que leur influence sur les paramètres de la reproduction de la pyrale font l'objet d'une analyse de la variance à un facteur. La normalité des données est au préalable vérifiée par le test de Pearson. L'analyse statistique est réalisée au risque de 5% avec le logiciel STATBOX 6. Dans le cas de différence significative, nous appliquons le test de Newman-Keuls pour définir les groupes homogènes.

Une analyse en composantes principales (ACP) est effectuée au risque de 5% avec le logiciel XLSTAT.

Cette ACP a pour objectif de traiter plusieurs variables à la fois afin d'établir des corrélations entre elles.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

ACTIVITES ANTIOXYDANTES

3-1- PREMIERE PARTIE: ACTIVITES ANTIOXYDANTES

3-1-1-ANALYSE QUANTITATIVE

Nos résultats montrent que le rendement d'extraction par rapport à la masse initiale du matériel végétal est respectivement de $17,29 \pm 1,42\%$ pour l'extrait aqueux (EA) et de $15,98 \pm 1,38\%$ pour l'extrait éthanolique (EE).

Selon Luis *et al.* (2012), le rendement d'extraction varie en fonction du solvant utilisé.

En effet, suite à une série d'extractions réalisées sur les parties aériennes d'*Olea europaea* utilisant l'éthanol, le méthanol et l'acétone comme solvants d'extraction, ils obtiennent des rendements différents. Cette observation ne semble pas s'appliquer dans le cas des feuilles de l'olivier de Laperrine puisque la comparaison statistique des moyennes montre qu'il n'y a aucune différence significative ($p = 0,16$) entre les deux extraits.

Les rendements d'extraction calculés au cours de notre expérimentation sont plus élevés que celui noté par Ahmed *et al.* (2014), à partir d'une extraction éthanolique sur des feuilles d'*Olea europaea*, où ils obtiennent une valeur de 11%.

Dans le but de caractériser les extraits EA et EE de l'olivier de Laperrine, une étude quantitative par les méthodes colorimétriques (Folin ciocalteu, trichlorure d'aluminium et formation du complexe protéines-tanins) est réalisée. Elle a pour objectif de comparer l'effet du solvant d'extraction sur la teneur en phénols, en flavonoïdes et en tanins totaux.

Les teneurs totales en composés phénoliques sont déterminées par référence aux courbes étalons respectives (Tab.V). Les résultats obtenus révèlent une variabilité apparente dans les teneurs calculées.

Tableau V: Rendements d'extraction et résultats des dosages

	Rendement d'extraction (%)	Phénols totaux (mg EAG/g PV)	Flavonoïdes totaux (mg EQ/g PV)	Tanins totaux (mg EAT/g PV)
Equation de régression		$Y=0,0077X+0,125$ $R^2=0,96$	$Y=0,0017X+0,0287$ $R^2= 0,98$	$Y=0,0002X-0,1037$ $R^2= 0,91$
EA	$17,29 \pm 1,42$	$118,85 \pm 4,99$	$17,50 \pm 2,16$	$32,90 \pm 3,12$
EE	$15,98 \pm 1,38$	$134,72 \pm 9,25$	$26,08 \pm 1,57$	$29,67 \pm 1,70$
p	0,16	0,03	$2,5510^{-3}$	0,10

En effet, l'analyse statistique des données montre que la différence entre les moyennes est significative dans le cas des phénols totaux ($P = 0,03$), nous enregistrons une valeur de $118,85 \pm 4,99$ mg EAG/g PV pour EA et de $134,72 \pm 9,25$ mg EAG/g PV pour EE, et des flavonoïdes totaux ($p = 2,5510^{-3}$), avec une moyenne calculée de $17,50 \pm 2,16$ mg EQ/g PV pour EA et de

26,08 $\pm$ 1,57 mg EQ/g PV pour EE. Dans le cas des tanins totaux, le test de Student ne montre aucune différence significative ($p = 0,1$) entre les deux extraits testés.

Une étude réalisée par Katanilic et al. (2006), classant 70 plantes médicinales en fonction de leur richesse en phénols totaux quantifiée à partir d'un extrait aqueux (0,6 mg EAC/g extrait sec à 145,87 mg EAC/g extrait sec), suggère que les feuilles de l'olivier de Laperrine sont très riches en polyphénols. En effet, la comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la littérature montre, que la teneur en polyphénols est importante dans les feuilles de l'olivier de Laperrine (Tab. VI). A notre avis, cette richesse serait due aux conditions environnementales très arides dans lesquelles se développe l'olivier du Sud. Les polyphénols étant connus pour être synthétisés en grande quantité en période de stress hydrique.

Tableau VI: Comparaison de la teneur en phénols totaux des feuilles d'*O.e. laperrinei* avec celle des feuilles d'*Olea europaea* L.

Type d'extrait	Teneurs en polyphénols totaux	Références bibliographiques
Extrait éthanolique	134,72 $\pm$ 9,25 mg EAG/g PV	Nos résultats
Extrait aqueux	118,85 $\pm$ 4,99 mg EAG/ g PV	
Extrait aqueux	16,52 $\pm$ 0,62 mg EAG /g poids sec (Chétoui)	Abaza et al. (2011)
Extrait éthanolique	197,8 $\pm$ 11,3 μ g EAG/g extrait sec	Dekanski et al. (2009)
	24,36 $\pm$ 0,85 mg EAG/g poids sec (Chétoui)	Abaza et al. (2011)
	245,2 $\pm$ 0,65 mg EAG/g résidu Se	Xie et al. (2015)
Extrait méthanolique	464,27 mg EH*/100g poids sec (Chemlal)	Brahmi et al. (2013)
	270,53 mg EH*/100g poids sec (Neb jmel)	
	90,48 $\pm$ 0,16 mg EAG/g résidu sec	Nashwa et al. (2014)

*Hydroxytyrosol

Les travaux réalisés sur les composés phénoliques montrent qu'ils sont sensibles aux facteurs environnementaux, physiologiques et génétiques qui influencent leur biodisponibilité au sein d'une espèce donnée. Ainsi leur concentration varie en fonction des saisons (Tomar et al., 2015), de l'effet station (Fahmi et al., 2013), et du stade de maturation de la plante (Irondi et al., 2013). Tattini et al. (2006), précisent que la synthèse des polyphénols est nettement augmentée suite à un stress provoqué par un rayonnement solaire intense.

La teneur en flavonoïdes totaux des feuilles de l'olivier de Laperrine est plus élevée que celle calculée par Abaza et al. (2011), à partir de feuilles d'*Olea europaea* de la variété Chétoui, ils enregistrent une valeur de $6,23 \pm 0,62$ mg EC/g poids sec pour un extrait aqueux et $15,83 \pm 1,26$ mg EC/g poids sec pour un extrait éthanolique. Pour Botsoglou et al. (2012), la teneur calculée à partir d'un extrait éthanolique correspond à $12,46 \pm 0,58$ mg EC/g feuilles sèches d'*Olea europaea* L.

Les travaux consultés montrent que la teneur en tanins totaux est plus élevée dans les feuilles de l'olivier de Laperrine comparativement à celle des feuilles d'*Olea europaea* L., qui selon Brahmi et al. (2013), correspond à une valeur de 79,70 mg EC/100g poids sec pour la variété Chemlal et à une valeur de 73,05 mg EC/100g poids sec pour la variété Neb jmel. Cependant la teneur en tanins d'*Olea laperrinei* se rapproche de 22,79 g EAT/kg MS, valeur obtenue par Mebirouk-Boudechiche et al. (2014), à partir des feuilles d'*Olea europaea*.

Notre expérimentation montre que la teneur totale des tanins est plus élevée que celle des flavonoïdes totaux, ce qui s'expliquerait par le fait que l'olivier de Laperrine est une espèce sclérophylite du Sahara central vivant dans un environnement sec avec peu d'eau disponible et xérophytique et sur sol superficiel, de plus elle subit une grande pression pastorale. Selon Bennick (2002), la synthèse des tanins est généralement augmentée suite à un stress environnemental quel que soit son origine, tel qu'un stress hydrique, un appauvrissement du sol, un ensoleillement trop fort ou un stress engendré par l'agression des végétaux par les herbivores (Woodward et Coppock, 1995). Raven et al. (2007), rapportent que les tanins sont présents à des concentrations relativement élevées dans les feuilles des plantes ligneuses.

La sélection d'un bon solvant d'extraction affecte le taux de polyphénols obtenus (Xu et Chang, 2007), le choix est donc basé sur un équilibre entre la polarité et le rendement d'extraction des polyphénols (Franco et al., 2008). Ainsi, les solvants polaires, tel que l'eau, sont de bons solvants d'extraction (Mailloa et al., 2013) puisqu'ils fournissent une concentration élevée en polyphénols dans l'extrait végétal (Štankovit, 2011), mais présente l'inconvénient d'avoir un extrait avec une teneur élevée en impuretés tels que les acides organiques, les sucres et les protéines solubles (Rafiee et al., 2011).

Pour Mailloa et al. (2013), la meilleure extraction est celle obtenue à partir du mélange d'un solvant organique avec l'eau. En effet les polyphénols sont plus solubles dans l'éthanol que dans l'eau (Fernando et Soysa, 2014), et d'après Alothman et al. (2009), le mélange éthanol-eau dissout une large gamme de phénols. Ces observations sont en accord avec nos résultats. Il ressort, en effet, de notre expérimentation que le mélange éthanol-eau est un meilleur solvant d'extraction comparativement à l'eau utilisée seule, puisque les teneurs en composés phénoliques calculées sont plus élevées dans l'extrait EE.

Nos résultats confirment les travaux de Trabelsi et *al.* (2010); Mohammedi et Atik (2011); Bourgou et *al.* (2016) pour lesquels, l'éthanol-eau donne une teneur en phénols totaux plus élevée que celle obtenue avec l'eau.

De plus, Shi et *al.* (2005); Alothman et *al.* (2009), notent que l'éthanol est sans danger pour la santé humaine, et qu'il représente un solvant non polluant (Dai et Mumper, 2010) et faiblement toxique (Franco et *al.*, 2008).

3-1-2- ANALYSE QUALITATIVE

La composition chimique des extraits EA et EE est réalisée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Nous avons identifié 11 molécules chimiques, dont 10 dans l'extrait EE et seulement 7 dans l'extrait EA (Tab. VII).

Tableau VII: Principaux composés chimiques identifiés dans les extraits de l'olivier de Laperrine

Composés chimiques	Extrait Aqueux		Extrait Ethanolique	
	Temps de rétention (Min)	Aire (%)	Temps de rétention (Min)	Aire (%)
Hydroxytyrosol	4,842	2,14	4,843	2,10
Acide caféique	7,085	2,39	7,084	1,8
Vanilline	8,583	2,79	-	-
Rutine	-	-	8,760	25,19
Acide n hydroxycinnamique	-	-	8,813	2,25
Lutéoline-7-glucoside	9,202	6,76	9,222	6,89
Oleuropéine	10,083	5,97	10,094	6,20
Naringénine-7-glucoside	-	-	10,362	8,31
Lutéoline	12,826	3,87	12,749	3,08
Apigénine	-	-	14,450	1,92
Hespéridine	15,554	1,72	15,560	1,05

-: Absence

Nos résultats indiquent la présence dans les extraits, de l'hydroxytyrosol et de l'oleuropéine, composés typiquement caractéristiques d'*Olea europaea*. De plus, nous retrouvons, la rutine, l'acide caféique, la lutéoline, la vanilline et l'apigénine, l'ensemble de ces composés se retrouvent également dans les feuilles d'*Olea europaea* (Caturla et *al.*, 2005; Lee et *al.*, 2009; Khelif et *al.*, 2015).

3-1-3-ACTIVITES ANTIOXYDANTES

L'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait végétal est le plus souvent réalisée par le test du pouvoir réducteur (FRAP), le test du piégeage du radical libre DPPH et le test du blanchiment du β -carotène (Hayes et al., 2011).

3-1-3-1-CAPACITE ANTIOXYDANTE TOTALE (TAC ASSAY)

Les résultats obtenus au cours de notre expérimentation montrent que les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine possèdent une capacité antioxydante totale élevée.

Le test de Student met en évidence une différence significative entre l'extrait EA et l'extrait EE ($p = 0,007$). La TAC est calculée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ($Y = 0,0048X + 0,02$, $R^2 = 0,99$).

Bien que la capacité antioxydante globale de EA ($267,26 \pm 2,67$ mg EAA /g d'extrait), soit moins importante que celle de EE ($345,41 \pm 3,31$ mg EAA /g d'extrait), elles sont toutes deux nettement plus élevées que celle rapportée par Khelif et al. (2015) à partir d'un extrait méthanol-eau de feuilles d'*Olea europaea* varié Chétoui, qui est de $73,94 \pm 1,98$ mg Equ vitamine E/g d'extrait).

D'après Jayaprakasha et al. (2003), l'activité antioxydante des extraits végétaux dépend de la présence des polyphénols, qui agissent comme des réducteurs. Cette observation est en accord avec la corrélation linéaire que nous avons établie entre la TAC des extraits testés et la teneur en phénols totaux. Elle est fortement significative avec des coefficients respectifs de 0,99 pour l'extrait EA et de 0,89 pour l'extrait EE. Ces résultats suggèrent donc que les polyphénols présents dans les extraits de l'olivier de Laperrine seraient responsables de l'activité antioxydante et sont en accord avec ceux rapportés par Kchaou et al. (2013), Jan et al. (2013), Haddouchi et al. (2014) et Amessis-Ouchemoukh et al. (2014), qui montrent que la teneur élevée en phénols totaux explique les propriétés antioxydantes des plantes.

3-1-3-2- POUVOIR REDUCTEUR (FRAP ASSAY)

Le pouvoir réducteur des extraits de feuilles de l'olivier est basé sur leur capacité à réduire le fer ferrique en fer ferreux. Selon Kumaran et Karunakaran, (2007), la réduction des ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}) est utilisée comme un indicateur de l'activité donneuse d'électron, qui représente un mécanisme important de l'activité antioxydante des polyphénols. La valeur de la FRAP est déterminée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique ($Y = 0,0143X + 0,0062$, $R^2 = 0,99$). L'extrait EE présente une plus grande puissance réductrice que l'extrait EA ($p = 0,0019$) avec des valeurs calculées de $258,76 \pm 6,69$ mg EAA/ g d'extrait pour EE et de $153,72 \pm 2,70$ mg EAA/g d'extrait pour EA.

La comparaison de nos résultats à ceux de la littérature (Tab.VIII), montre que les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine présentent un potentiel réducteur élevé. Ils pourraient servir de donneur d'électron ou de proton H^+ . En effet, le pouvoir réducteur d'un extrait végétal est associé à la présence de réducteurs qui exercent une activité antioxydante en faisant don d'électron stabilisateur (Chang *et al.*, 2002) ou d'un atome d'hydrogène (Nabavi *et al.*, 2009), et en rompant la chaîne des radicaux libres.

Tableau VIII: Comparaison des résultats du test FRAP avec ceux des feuilles d'*Olea europaea* L.

Type d'extrait	FRAP	Références bibliographiques
Extrait aqueux	153,72±2,70 mg EAA/ g d'extrait	Nos résultats
Extrait éthanolique	258,76± 6,69 mg EAA/ g d'extrait	
Extrait m éthanolique	30,1±0,1 mg ETR*/100g de poids sec (var : Corregiola)	Hayes <i>et al.</i> (2011)
Extrait aqueux	22,55±19,17 mg ETR/ g résidu	Goldsmith <i>et al.</i> (2015)
Extrait éthanolique	sec 232,12±4,89 mg ETR/ g résidu sec	

*Equivalent trolox

Les profils de la puissance de réduction des extraits EA et EE (Fig.20), montrent qu'ils possèdent une activité dose-dépendante, ainsi, parallèlement à l'augmentation de la concentration des extraits, l'activité antioxydante augmente. D'après Alam *et al.* (2013), il y'a une proportionnalité entre l'absorbance et l'activité antioxydante.

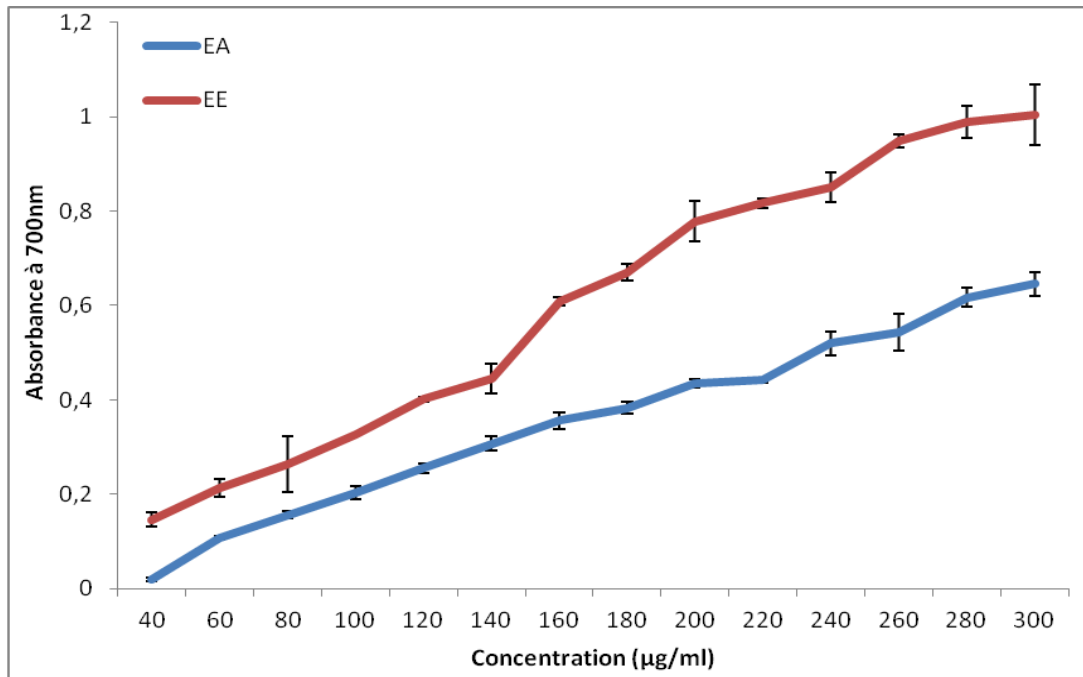


Figure 20: Capacité de réduction du fer par les extraits de feuilles d'*O.e. laperrinei*

L'analyse statistique révèle une différence significative ($p = 0$), entre les extraits EA et EE. Ce dernier est en effet, plus actif que l'extrait EA. Nous enregistrons les IC₅₀ de $140,52 \pm 2,13$ µg/ml pour EE et de $234,91 \pm 7,69$ µg/ml pour EA. Nous calculons une valeur de $34,44 \pm 0,66$ µg/ml dans le cas de l'acide ascorbique.

Le pouvoir réducteur des extraits de feuilles d'*Olea laperrinei* est plus élevé que celui des extraits de feuilles d'*Olea europaea* L. En effet, Ferreira et al. (2007), notent une IC₅₀ de $1,1710^3$ µg/ml obtenue à partir d'un extrait méthanolique, et Xie et al. (2015) obtiennent une valeur de $1,5510^3$ µg/ml pour un extrait éthanolique. Ces valeurs confirment que nos extraits possèdent bien un pouvoir réducteur élevé puisque, selon Touaibia et Chaouch (2015), plus la valeur de la IC₅₀ est petite, plus grande est la puissance de réduction de l'extrait végétal.

Ebrahimzadeh et al. (2010), relèvent que les teneurs élevées en composés phénoliques et en flavonoïdes conduisent à un pouvoir réducteur plus élevé des extraits de plantes. Ceci est en accord avec nos résultats, nous avons en effet, établi, une corrélation positive entre la puissance de réduction des extraits testés et les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux ($R^2 > 0,9$).

3-1-3-3- ACTIVITE DE PIEGEAGE DES RADICAUX LIBRES DPPH•

L'activité antiradicalaire des extraits végétaux, augmente parallèlement à l'augmentation de la concentration des échantillons (Fig.21).

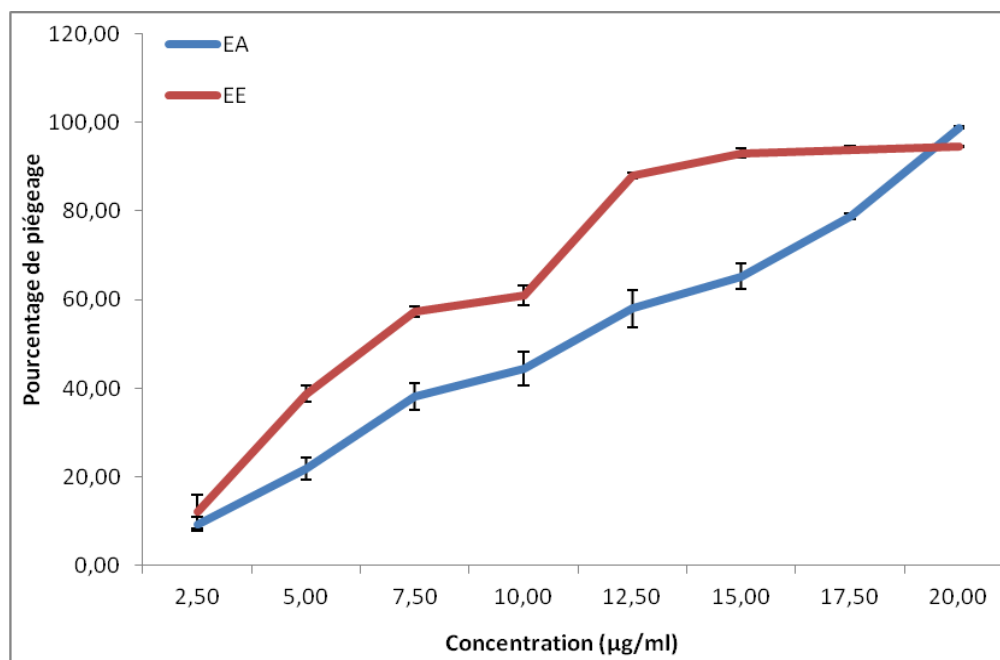


Figure 21: Capacité de piégeage des radicaux DPPH• par les extraits de feuilles d'*O.e. laperrinei*

L'extrait EE possède un potentiel de piégeage significativement plus élevé ($p = 0$), que celui de l'extrait EA. Ainsi, une dose de $7,48 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ pour EE et de $10,88 \pm 0,22 \mu\text{g/ml}$ pour EA est suffisante pour réduire de 50% la concentration initiale de DPPH•. Pour l'acide ascorbique, nous obtenons une EC50 de $2,52 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$.

Les résultats expérimentaux montrent que les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine expriment une meilleure activité antiradicalaire que celle exprimée par les extraits des feuilles d'*Olea europaea* L. (Tab.IX).

Tableau IX: Comparaisons des résultats du test DPPH des feuilles d'*Olea europaea* L. à ceux obtenus dans notre expérimentation

Nature de l'extrait	EC50	Références bibliographiques
Extrait aqueux	10,88 ± 0,22 µg/ml	Nos résultats
Extrait éthanolique	7,48 ± 0,39 µg/ml	
Extrait m éthanolique Var Sylvestris	0,2910 ³ µg/ml	Arab et al. (2013)
Extrait m éthanolique Var Chetoui	0,01410 ³ µg/ml	Khelif et al. (2015)
Extrait éthanolique Var Chemlal	(86,88 ± 3,22) 10 ³ µg/ml	Mkaouar et al. (2018)

Ce résultat est confirmé par le calcul de l'indice de l'activité antioxydante qui place l'extrait EE (IAA=2,67) dans la même classe que l'acide ascorbique (IAA=7,93), représentant une activité antioxydante très forte (IAA>2), alors que l'extrait EA (IAA=1,84) possède une activité antioxydante forte (IAA<2). De plus, le pourcentage maximal d'inhibition du radical DPPH• est obtenu à la concentration de 20 µg/ml pour l'EA (98,84 ± 0,25%), il est de 93,85 ± 1,16% pour l'extrait EE à la dose de 17,5 µg/ml.

Les données bibliographiques rapportent pour un extrait éthanol-eau obtenu à partir de feuilles d'*Olea europaea* L. un taux maximal de piégeage des radicaux DPPH• de 82% à la concentration de 0,3 mg/ml (Fares et al., 2011), et de 99,5% pour une concentration de 0,8 mg/ml (Xie et al., 2015), quant à Saiah et al. (2016), ils obtiennent un taux de 97,24 ± 2,89 % à 4 mg/ml.

Le DPPH• est un radical stable centré sur l'azote dont la couleur vire du violet au jaune lors de sa réduction par le processus de don d'hydrogène ou d'électron. La substance capable d'effectuer cette réaction est considérée comme antioxydante et donc piègeur de radicaux libres (Brand-Williams et al., 1995). Ainsi, les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine seraient des donneurs d'hydrogène.

3-1-3-4- INHIBITION DU BLANCHIMENT DU β-CAROTENE

La figure 22 montre que l'acide linoléique est efficacement inhibé par les deux extraits testés et que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à leurs concentrations.

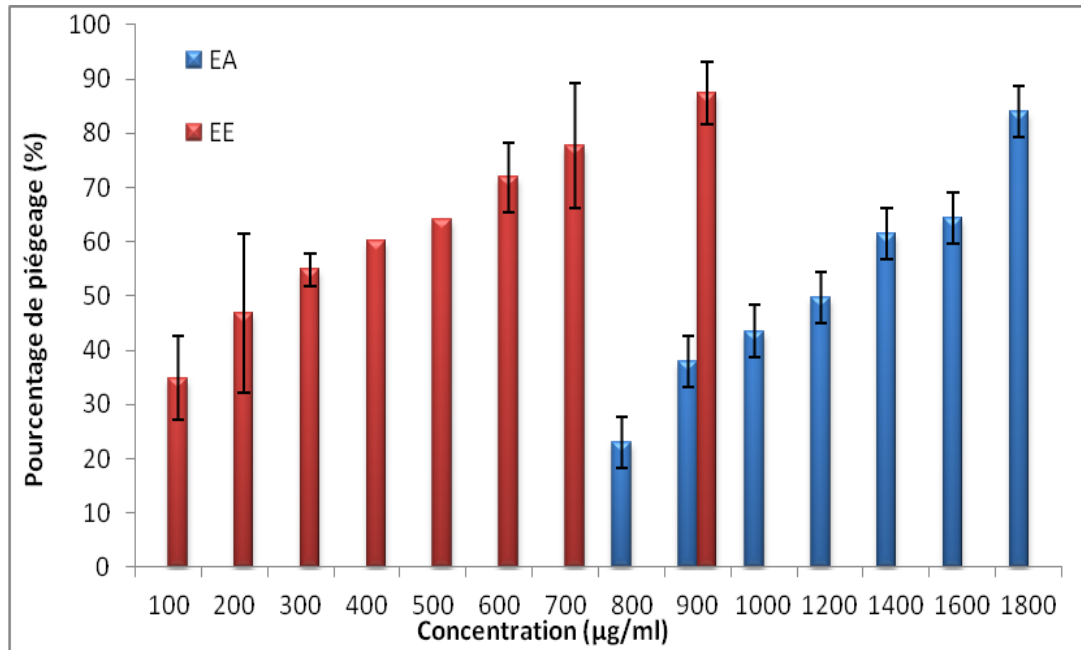


Figure 22 : Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits de feuilles d'*O.e. laperrinei*

Cependant l'extrait EE présente une capacité inhibitrice significativement plus élevée que celle de l'extrait EA avec $p < 0,001$. En effet, le pourcentage maximal d'inhibition est de $87,41 \pm 5,76\%$ à la dose de $900 \mu\text{g/ml}$ pour EE, de $83,91 \pm 0\%$ à la dose de $1800 \mu\text{g/ml}$ pour EA et de $83,39 \pm 6,82\%$ à $100 \mu\text{g/ml}$ de BHT.

La comparaison de nos résultats à ceux publiés dans la littérature scientifique (Tab. X), montre bien que les pourcentages d'inhibition de l'acide linoléique les plus élevés sont ceux enregistrés dans notre étude.

Tableau X: Comparaison des résultats du test BCB avec ceux des feuilles d'*Olea europaea* L

Type d'extrait	BCB (% d'inhibition)	Concentration (µg/ml)	Références bibliographiques
Extrait aqueux	$83,91 \pm 0$	1800	Nos résultats
Extrait éthanolique	$87,41 \pm 5,76$	900	
Extrait méthanolique	16	110^3	Hayes et al. (2011)
Extrait méthanolique	$71,76 \pm 3,28$	410^3	Saiah et al. (2016)

La concentration des extraits fournissant 50% d'inhibition est calculée à partir du traçage graphique du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits et permet de comparer l'efficacité des extraits EA et EE de l'olivier de Laperrine.

Nos résultats montrent que c'est l'extrait EE, pour lequel nous calculons une IC₅₀ de $185,63 \pm 3,84 \mu\text{g/ml}$, qui est significativement ($p = 0$) plus actif que l'extrait EA pour lequel nous avons une valeur de $1187,99 \pm 93,23 \mu\text{g/ml}$. Cette différence pourrait s'expliquer par la solubilité des antioxydants dans les émulsions d'acide linoléique (Frankel et *al.*, 1994 ; Frankel et Meyer, 2000).

La décoloration rapide en absence d'antioxydant est due à l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β -carotène. La présence des antioxydants dans les extraits retarde l'oxydation, en effet kubola et Siriamornpun (2008), ont montré que les antioxydants présents dans les extraits végétaux neutralisent les radicaux libres formés dans le système β -carotène/acide linoléique.

3-1-3-5- ACTIVITE DE PIEGEAGE DU PEROXYDE D'HYDROGENE

Le peroxyde d'hydrogène n'est pas très réactif, mais il est capable de pénétrer les membranes biologiques (Duh et *al.*, 1999), devenir toxique et endommager la cellule une fois convertie en radical hydroxyle, ce dernier peut déclencher la peroxydation des lipides et des mutations de l'ADN (Jan et *al.*, 2013).

La récupération du peroxyde d'hydrogène par les extraits végétaux est attribuée à leurs composés phénoliques qui donnent des électrons au H_2O_2 le convertissant en H_2O , et empêchant ainsi, la formation des radicaux libres $\text{OH}^\bullet$ (Ebrahimzadeh et *al.*, 2010).

Nos résultats montrent que la capacité des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine à éliminer le peroxyde d'hydrogène se fait de manière dose-dépendante, ceci est illustré par la figure 23, qui révèle la capacité de piégeage du radical H_2O_2 par les extraits EE et EA. Effectivement nous calculons un effet de récupération du H_2O_2 à $85,96 \pm 3,91\%$ à la dose de $470 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait EA et $83,70 \pm 6,26 \%$ à la dose de $270 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait EE, quant à l'acide ascorbique, nous enregistrons une valeur de $84,78 \pm 2,37\%$ à la concentration de $80 \mu\text{g/ml}$.

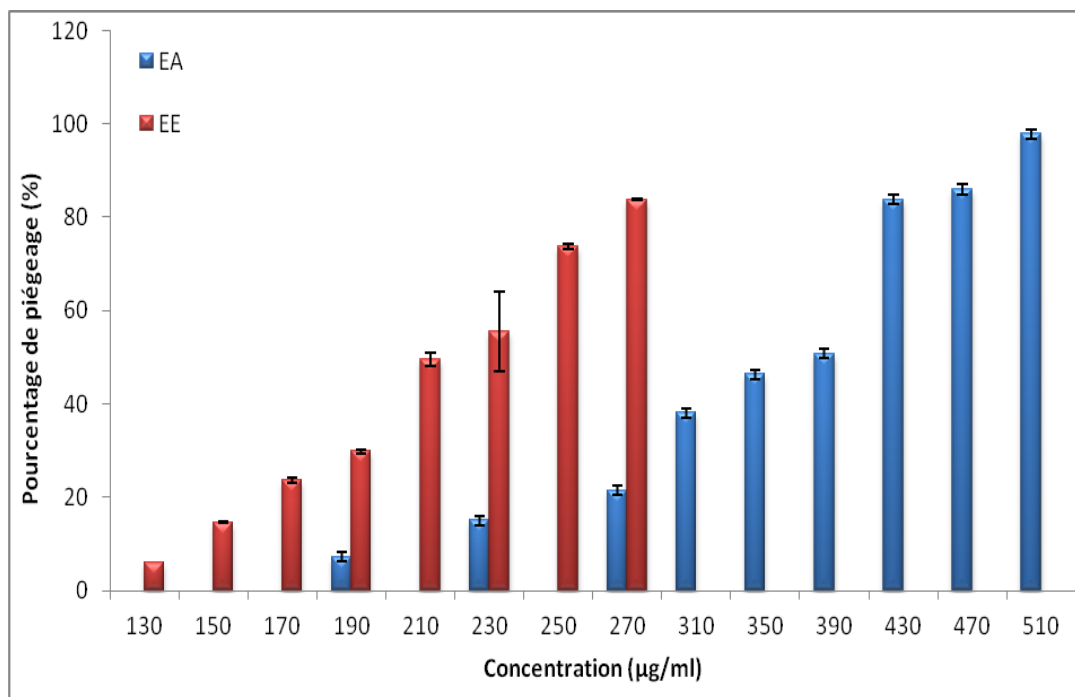


Figure 23: Capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de feuilles d'*O.e.laperrinei*

Ainsi, les extraits testés possèdent un potentiel de piégeage du peroxyde d'hydrogène supérieur à celui de l'extrait aqueux obtenu à partir des feuilles d'*Olea europaea* L. varié Mamecik, qui neutralise 62,27% de H_2O_2 à la concentration de 500 µg/ml (Orak et al., 2012).

La comparaison des moyennes obtenues après le calcul de la concentration nécessaire à réduire de 50% la quantité de H_2O_2 , montre une différence significative ($p = 0$) entre les extraits testés, ainsi, l'extrait EE ($IC_{50} = 214,04 \pm 2,89$ µg/ml), possède une capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène plus importante que l'extrait EA ($IC_{50} = 351,30 \pm 5,30$ µg/ml).

Ces résultats sont dus, à notre avis, à la forte teneur en phénols et en flavonoïdes totaux des feuilles de l'olivier de Laperrine. En effet, Orak et al. (2012), Amessis-Ouchemokh et al. (2014), ont démontré une corrélation positive entre l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène et la teneur totale en phénols et en flavonoïdes. Cette observation est en accord avec nos résultats, puisque le coefficient de corrélation calculé dans notre étude est supérieur à 0.9 pour les deux extraits testés. Selon Sroka et Cisowski (2003), cette corrélation serait due à la présence des groupements hydroxyles caractérisant les composés phénoliques qui assurent la double fonction de donneur d'électron et de donneur de proton H^+ .

3-1-4-TEST HEMOLYTIQUE

L'activité hémolytique permet d'estimer la toxicité des extraits végétaux vis-à-vis des érythrocytes. Ainsi, les globules rouges traités par les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine à des doses croissantes de 62,5 µg/ml à 2000 µg/ml, présentent un pourcentage d'hémolyse décroissant de $2,94 \pm 0,22\%$ à $1,20 \pm 0,17\%$ pour l'extrait EA et de $2,23 \pm 0,09\%$ à $0,60 \pm 0,52\%$ dans le cas de l'extrait EE. Nous enregistrons 100% d'hémolyse pour le témoin positif (Eau distillée).

L'effet hémolytique des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine proche de celui du témoin négatif, suggère la non toxicité de ces derniers dans la gamme des concentrations testées. Cette non toxicité est confirmée par nombreux travaux qui considèrent qu'une hémolyse de 14% (Gangwar et al., 2014) et variant de 5,05 à 8,32 % (Aiche-Iratni et al., 2015) induite par un extrait végétal comme étant non hémolytique.

CONCLUSION

La capacité antioxydante de l'acide ascorbique et du BHT, référents utilisés comme témoins dans notre expérimentation est plus élevée que celle des extraits végétaux testés. Ce résultat est dû à leur degré de pureté en comparaison avec les extraits qui sont le résultat d'un mélange de composés chimiques qui peuvent interagir les uns avec les autres en terme de synergie ou d'antagonisme. De plus, dans ce mélange, les éléments actifs sont peut-être en très faible concentration.

Les résultats obtenus montrent clairement que les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine exercent une puissante activité antioxydante dans les différents systèmes testés *in vitro*. Cela s'explique par leur forte teneur en composés phénoliques et en tanins. En effet, selon Duh et al. (1999), les composés phénoliques contenus dans les végétaux contribuent directement à l'activité antioxydante, alors que les tanins sont considérés comme des piègeurs de radicaux libres (Maestri et al., 2006).

Le potentiel antioxydant de l'extrait EE est nettement plus élevé que celui de l'extrait EA. Cette différence serait due au contenu phénolique plus riche de l'extrait EE. La capacité antioxydant de l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, l'acide caféique, la rutine, la lutéoline-7-glucoside, la naringénine-7-glucoside, la lutéoline et l'apigénine a été démontrée par de nombreux auteurs (Duh et al., 1992; Le Tutour et Guedon, 1992; Visioli et Galli, 2002; Tsimogiannis et al., 2007; Lee et al., 2009; Sharififar et al., 2009; Adjimani et Asare, 2015).

C'est donc la présence combinée de ces molécules chimiques qui confèrent à l'extrait EE un effet antioxydant, nettement plus élevé. De plus, selon Kareem, (2012), les activités antioxydantes observées chez les végétaux sont attribuées aux différents mécanismes exercés par les différents composés phénoliques et à leur synergie.

1 L'effet antioxydant plus réduit de l'extrait EA s'explique d'une part par la présence de la
2 vanilline qui, selon Brand-Williams et *al.* (1995) possède une faible activité antioxydante et
3 d'autre part par le nombre plus réduit des composés phénoliques. Ainsi, la présence de la
4 vanilline dans EA suggère une action antagoniste marquée puisque même en présence de
5 l'oleuropéine, polyphénol reconnu comme étant un antioxydant puissant (Lee et *al.*, 2009),
6 l'extrait EA présente une activité antioxydante moindre. De plus, nous ne pouvons exclure la
7 possibilité que les composés phénoliques non identifiés peuvent également avoir un effet
8 antagoniste.

9
10 La FRAP est habituellement corrélée avec la TAC, il y'a donc une relation de
11 proportionnalité entre ces deux variables. Cette observation émise par Gul et *al.* (2011), est en
12 accord avec nos résultats, puisque nous obtenons un coefficient de corrélation de 0,99 pour
13 l'extrait EE, pris comme référence pour le calcul des coefficients de corrélations. La FRAP
14 indique que les extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine contiennent des antioxydants
15 donateurs d'électrons ou de protons H^+ qui réagissent avec les radicaux libres et les
16 convertissent en composés stables, rompant ainsi, la réaction radicalaire en chaîne. Nous
17 avons, en effet établi une corrélation positive entre les activités DPPH, H_2O_2 et BCB avec la
18 FRAP ($R^2 = 0,9$), ainsi donc le pouvoir réducteur élevé des extraits de feuilles de l'olivier de
19 Laperrine indique leur puissante capacité antioxydante et antiradicalaire.

DEUXIEME PARTIE

ACTIVITE INSECTICIDE

3-2- DEUXIEME PARTIE: ACTIVITE INSECTICIDE

3-2-1- ANALYSE QUANTITATIVE

L'analyse quantitative par la méthode de spectrophotométrie UV-visible des extraits phénoliques obtenus à partir des feuilles (PF) et des tiges (PT) d'*Olea europaea* subsp. *laperrinei*, nous a permis de calculer les teneurs en aglycones flavoniques, en anthocyanes, et en C-glycosides. La figure 24, récapitule les résultats obtenus.

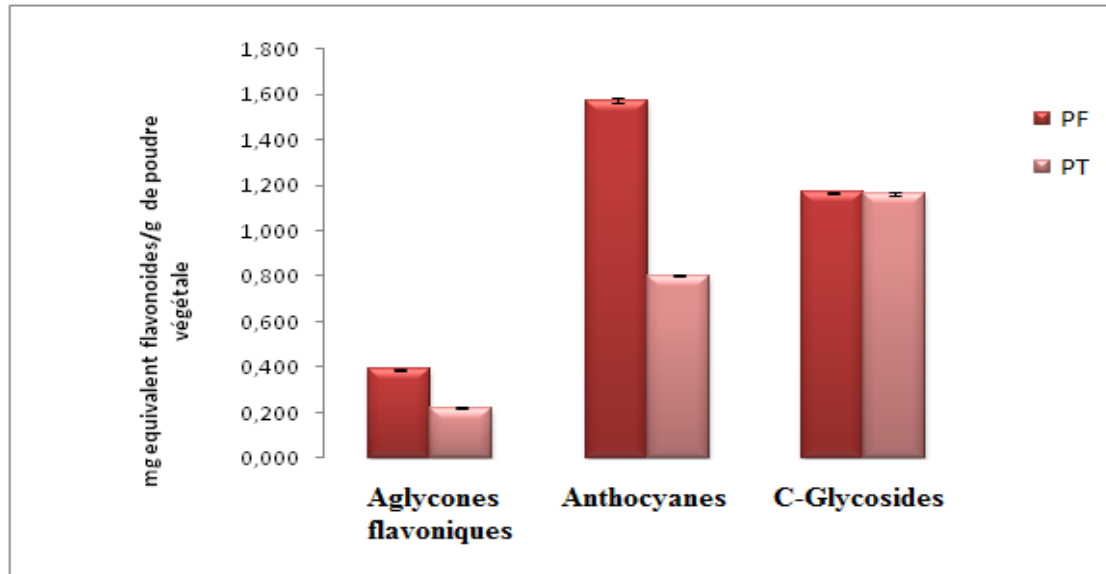


Figure 24 : Teneur en composés flavoniques de différents extraits obtenus à partir de la poudre de feuilles (PF) et de la poudre de tiges (PT) de l'olivier de Laperrine

L'analyse statistique des données témoigne d'une différence significative ($p=0$) des teneurs absolues en aglycones flavoniques et en anthocyanes pour les feuilles et les tiges. En effet, nous enregistrons respectivement dans le cas de la poudre de feuilles, une teneur moyenne de $0,389 \pm 0,004$ mg EQ/g PV et $1,573 \pm 0,012$ mg EPC/g PV, alors que dans le cas de la poudre de tiges, nous enregistrons $0,221 \pm 0,006$ mg EQ/g PV et $0,803 \pm 0,006$ EPC mg/g PV.

Pour les C-glycosides le test de Student fait ressortir une différence significative ($p=4,2510^{-3}$) avec une moyenne de $1,167 \pm 0,002$ mg EO/g de poudre de feuilles et $1,161 \pm 0,001$ mg EO/g de poudre de tiges.

Ces teneurs révèlent clairement que ce sont les feuilles de l'olivier de Laperrine, qui sont plus riches en composés phénoliques que les tiges.

Une recherche bibliographique approfondie n'a signalé au jour d'aujourd'hui aucun rapport, portant sur l'extraction des polyphénols de l'olivier de Laperrine. Raison pour laquelle notre référence de comparaison est représentée par des espèces végétales partageant les mêmes conditions environnementales que celles de *O.e.laperrinei*.

Ainsi, la comparaison de nos résultats à ceux de la bibliographie, montre que la teneur en aglycones flavoniques des feuilles et des tiges de l'olivier de Laperrine est plus élevée que celle rapportée par Hamdouch et al. (2018) à partir de poudre de feuilles de *Vitex agnus calus*, ils enregistrent $0,118 \pm 0,032$ mg équivalent quercétine/g de poids sec.

Les travaux de Bentradi et al. (2017), enregistrent une teneur en C-glycosides de $2,67 \pm 0,34$ mg équivalent orientine/g de poids sec à partir des graines du palmier dattier. Enfin, Chebli et al. (2001), notent une teneur de 1,04 mg équivalent leucocyanidine/g de poids sec chez les graines de *Ononis matrix*.

3-2-2- ANALYSE QUALITATIVE

L'analyse du contenu chimique des différents extraits est réalisée par une chromatographie liquide à haute performance. 21 composés sont révélés et identifiés, ils sont représentés dans le tableau XI.

L'analyse chimique indique la présence dans l'ensemble des extraits, de l'hydroxytyrosol, de tyrosol et de l'oleuropéine qui selon Ortega-Garcia et Peragon (2010), sont caractéristiques de *Olea europaea* L.

Nos résultats sont également en accord avec les travaux de Nashwa et al. (2014) qui identifient la quercétine, l'apigénine, l'oleuropéine et l'hespéridine dans l'extrait de feuilles de *Olea europaea* L. et des travaux de Pereira et al. (2007) ; Dekanski et al. (2009), qui mettent en évidence la présence de l'acide caféique, la quercétine, la lutéoline, l'apigénine et l'oleuropéine dans les feuilles de l'olivier. Quant à Mestar et al. (2018), ils identifient l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'oleuropéine, l'acide caféique, la quercétine, la lutéoline, l'apigénine, l'acide 3 hydroxy 4 méthoxycinnamique, et la naringénine dans les feuilles d'*Olea europaea* L.

Ainsi donc, la composante chimique de l'olivier de Laperrine semble similaire à celle de l'olivier du nord.

Tableau XI : Principaux composés chimiques identifiés dans les extraits de l'olivier de Laperrine

Composés chimiques	Extrait éthéré de feuilles (EF)		Extrait éthéré de tiges (ET)		Extrait butanolique de feuilles (BF)		Extrait butanolique de tiges (BT)	
	Temps de Rétention (Min)	Aire (%)	Temps de Rétention (Min)	Aire (%)	Temps de Rétention (Min)	Aire (%)	Temps de Rétention (Min)	Aire (%)
Hydroxytyrosol	4,838	30,45	4,853	18,78	4,830	5,32	4,850	8,47
Tyrosol	5,898	0,45	-	-	5,852	0,43	5,887	0,69
Caféine	-	-	6,467	0,49	6,453	0,75	6,479	0,74
Acide Aesculein	-	-	-	-	-	-	7,002	1,36
Acide caféique	7,062	0,61	-	-	7,046	0,84	-	-
Vanilline	8,673	2,12	8,656	1,06	-	-	-	-
Acide férulique	9,257	5,40	9,233	0,95	9,234	6,65	9,239	17,77
Acide p coumarique	-	-	-	-	-	-	9,672	2,03
Acide 3 hydroxy 4 méthoxycinnamique	-	-	-	-	9,773	0,79	9,799	0,79
Oleuropéine	10,119	4,13	10,198	32,76	10,103	4,86	10,222	13,21
Naringénine 7 oglucoside	-	-	10,456	2,38	-	-	10,490	2,86
Acide 3,4,5 triméthoxybenzoïque	-	-	10,817	4,99	-	-	10,814	4,25
Acide m-anisic	-	-	-	-	11,938	1,75	-	-
Lutéoline	12,491	1,31	-	-	-	-	-	-
Quercétine	12,865	29,18	12,901	11,43	12,787	22,31	12,866	31,57
Acide cinnamique	13,897	1,35	-	-	-	-	-	-
Apigénine	-	-	-	-	14,379	3,31	14,367	1,90
Hespéridine	15,028	6,90	15,056	5,63	15,061	2,54	15,006	4,28
Orientine	-	-	-	-	17,729	2,75	17,741	0,49
Vitexine	-	-	-	-	18,192	1,96	18,177	1,34
Isovitexine	-	-	-	-	18,495	1,24	18,468	1,07

3-2-3- EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE L'OLIVIER DE LAPERRINE SUR LA REPRODUCTION D'*EPHESTIA KUEHNIELLA*

Un grand nombre d'études a montré que les flavonoïdes sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes contre l'attaque des insectes. Cette propriété s'applique dans les conditions *in vitro* ; en effet, selon Teixeira da Silva (2004); Bouchetla et al. (2005); Golawska et al. (2008) et Meftah et al. (2011), les flavonoïdes ont un effet insecticide démontré

D'après Koudounas et al., (2015), l'oleuropéine, joue un rôle prédominant dans la défense chimique de *Olea europaea* L contre le stress biotique.

3-2-3-1- EFFET DES EXTRAITS BRUTS SUR LA PERIODE DE DEVELOPPEMENT NYMPHAL

Les extraits bruts appliqués au stade chrysalide d'*Ephestia kuehniella*, donnent des résultats positifs. Leur efficacité se traduit par une prolongation significative ($p=0$) de la durée de développement nymphal, par rapport au témoin, pour lequel nous enregistrons une valeur de $7,14 \pm 0,24$ jours.

L'analyse de la variance, effectuée entre les extraits, laisse apparaître une différence significative ($p = 0$) et fait ressortir l'extrait BF qui présente l'effet le plus marqué sur le cycle de l'insecte. La figure 25 montre que c'est bien ce dernier qui retarde le plus longtemps l'apparition des adultes, puisqu'il est classé dans le groupe homogène a, pour lequel nous enregistrons une moyenne de $38,29 \pm 0,41$ j. Ainsi, l'émergence des adultes se fait environ un mois plus tard par rapport au témoin.

La bibliographie consultée, montre les effets des huiles essentielles sur la durée de la période de développement nymphal des ravageurs des denrées stockées et appuie nos résultats obtenus sur *Ephestia kuehniella*. Cependant le résultat obtenu avec les extraits de l'olivier de Laperrine est nettement plus élevé que celui obtenu par Delimi et al. (2013), qui teste l'effet de l'huile essentielle extraite à partir de l'armoise blanche, sur la période de développement nymphal d'*Ephestia kuehniella* et obtient une moyenne de $13,66 \pm 0,57$ j.

Par ailleurs, une étude menée par Ben Hamouda et al. (2011) a montré qu'une alimentation à base de farine de feuilles d'olivier, inhibe le développement des adultes du criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*). Ils obtiennent en effet 100% de criquets de couleur rouge brique et lisse, caractères indiquant un état juvénile persistant.

L'exuviation des nymphes se fait au bout de $14,29 \pm 0,41$ jours pour ET, $11,00 \pm 0,57$ jours pour EF et $9,57 \pm 1,63$ jours dans le cas de BT. Ces extraits présentent un effet non nul mais relativement peu marqué sur le développement nymphal de la pyrale puisque comparé à l'extrait BF, ils retardent l'apparition de l'adulte de respectivement 7,15; 3,86 et 2,43 jours

par rapport au témoin pour lequel l'exuviation nymphale se fait au bout de $7,14 \pm 0,24$ jours. (Fig. 25).

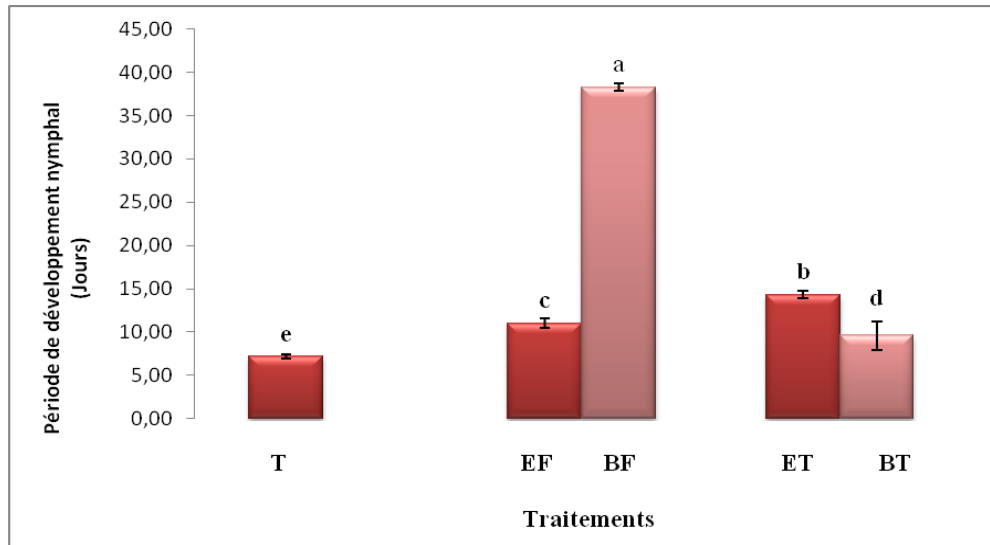


Figure 25: Période de développement nymphal en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)

Dans le but d'expliquer l'effet des différents extraits sur la durée de la période de développement nymphal de la pyrale, nous avons intégré leur composition chimique pour interpréter les résultats et tenter d'établir des corrélations entre les différentes variables. Les données sont ainsi soumises à une analyse en composantes principales (ACP).

Selon l'axe F1, nous constatons que l'extrait BF influence particulièrement le développement nymphal en prolongeant sa durée. Il apparaît un mélange de dix molécules corrélées à cet ensemble et qui expliqueraient l'effet particulier de l'extrait BF sur cette phase de développement de l'insecte (Fig. 26).

Ces molécules sont l'oleuropéine (Ole), la vitexine (Vit), la quercétine (Que), l'acide férulique (Acf), l'hespéridine (Hes), l'apigénine (Api), l'orientine (Ori), l'acide m anisic (Avm) et l'acide caféique (Acc), l'acide 3 hydroxy 4 méthoxycinnamique (Ac3).

En considérant les résultats de la HPLC pour les quatre extraits et leur effet sur le développement nymphal, nous obtenons la matrice de données représentée par le tableau XII suivant:

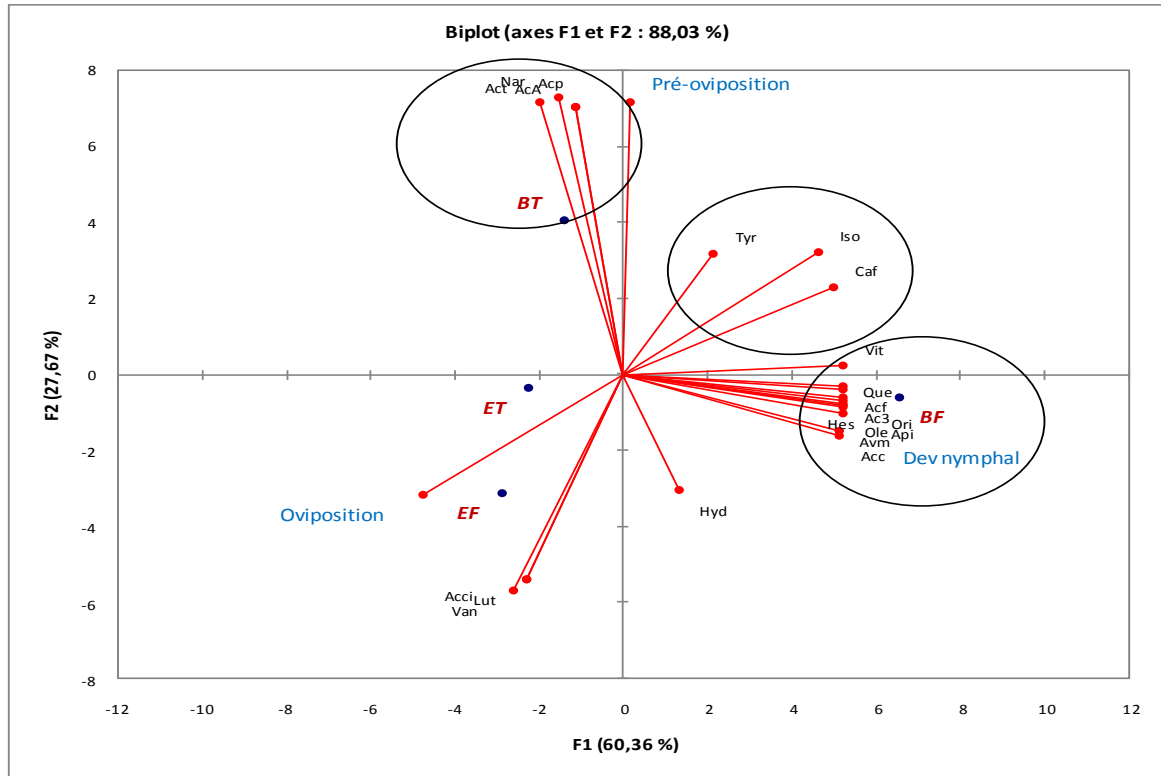


Figure 26: Analyse factorielle des correspondances, plan factoriel axes F1 et F2 (Variables x Extraits)

Tableau XII: Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) des molécules biochimiques contenues dans les extraits de l'olivier de Laperrine

Extraits	Vit	Acf	Que	Ac3	Hes	Ori	Avm	Api	Acc	Ole
EF	0	1159,5	5367,5	0	790	0	0	0	210,5	1448
ET	0	79,5	1301	0	365,5	0	0	0	0	5710
BF	3013,50	27955,5	54643,5	5208	3516,5	6285,5	23450,5	10181	2196,5	68028,5
BT	530	3871	9522	332	3,69	953,5	0	306	0	4167,5

*Unit é universelle

Nous constatons que BF est le seul extrait à contenir l'ensemble des molécules qui sont fortement corrélées au développement nymphal.

Etant donné que les trois autres extraits ont des effets non nuls sur le développement nymphal, nous pourrions dire que les molécules communes aux quatre extraits à savoir l'oleuropéine

(Ole) l'acide férulique (Acf), la quercétine (Que) et l'héspéridine (Hes), sont celles qui seraient principalement responsables de l'allongement de la durée du développement nymphal.

Cependant, l'efficacité de BF par rapport aux trois autres extraits pourrait s'expliquer d'une part par la présence de ses plus grandes concentrations en ces molécules clés et d'autre part, par sa teneur exclusive en acide m-anisic (Avm) qui pourrait jouer un rôle synergique amplificateur de l'effet étudié.

Ainsi, le retard dans la transformation de la nymphe en adulte serait dû à la présence combinée de l'oleuropéine, l'acide férulique, la quercétine, l'héspéridine et l'acide m-anisic qui peut être perturbent la physiologie de la nymphe de la pyrale de la farine en agissant sur son équilibre hormonal.

3-2-3-2- EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE L'OLIVIER DE LAPERRINE, SUR LA DUREE DE LA PERIODE DE PRE-OVIPOSITION

Dans les conditions optimales du cycle de l'insecte, la femelle d'*Ephestia kuehniella*, commence la ponte des œufs un (01) jour après son exuviation.

L'examen comparatif des résultats obtenus après l'application des extraits sur des adultes nouvellement exuvies, montre une différence significative ($p=0,00337$).

Ainsi, l'extrait BT appartenant au groupe homogène a donne des résultats positifs sur la durée de la période de pré-oviposition avec une valeur moyenne de $1,57 \pm 0,49$ jours. Quant à l'extrait BF, il prolonge la durée de la période de pré-oviposition ($1,14 \pm 0,14$ jours) mais sans différence significative puisqu'il appartient au groupe homogène b qui correspond aux extraits EF et ET (Tab. XIII). Ces derniers semblent n'avoir aucun effet sur la durée de la période de pré-oviposition.

Tableau XIII : Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur la période de pré-oviposition chez *Ephestia kuehniella*.

	Pré-oviposition (jours)	Groupes homogènes
Témoïn	$1,00 \pm 0$	b
Extrait butanolique de tiges (BT)	$1,57 \pm 0,49$	a
Extrait butanolique de feuilles (BF)	$1,14 \pm 0,24$	b
Extrait éthéré de feuilles (EF)	$1,00 \pm 0$	b
Extrait éthéré de tiges (ET)	$1,00 \pm 0$	b

La comparaison de nos données à celles résultants de traitements par des insecticides chimiques, montre que l'extrait BT serait aussi efficace que ces derniers. En effet, Bouzeraa et Soltani-Mazouni (2012), indiquent que l'application des insecticides chimiques RH-2485 (Méthoxyfénoxyde) et RH-5992 (Thiophénylpyridine) prolongent la durée de la période de pré-oviposition chez d'*E.kuehniella* de respectivement $1,1 \pm 0,3$ j et $1,7 \pm 0,3$ j. Pour Taïbi (2007),

l'exposition de la pyrale de la farine à l'insecticide RH-0345 (Holofénozide) est sans effet sur la durée de la période de pré-oviposition de l'insecte.

Selon l'ACP (Fig. 26), et selon l'axe F2, BT est effectivement l'extrait le plus efficace dans l'augmentation de la durée de la période de pré-oviposition. Les composants clés qui semblent être impliqués dans cet effet sont: l'acide 3, 4, 5, triméthoxybenzoïque (Act), la naringénine (Nar), l'acide aesculein (AcA) et l'acide p coumarique (Acp).

A partir de la sous matrice représentée par le tableau XIV, nous constatons que l'absence des quatre molécules ou la présence exclusive de l'acide 3, 4, 5, triméthoxybenzoïque et de la naringénine ne fait pas varier significativement la période de pré-oviposition. Mais il suffit d'ajouter l'acide aesculein et l'acide p coumarique pour obtenir une prolongation de cette durée. Cela pourrait confirmer l'effet synergique des quatre molécules comme explication de l'efficacité de l'extrait BT dans l'effet étudié.

Tableau XIV: Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) de quatre molécules biochimiques contenues dans les extraits végétaux

Extraits	Act	Nar	AcA	Acp
EF	0	0	0	0
ET	3942,5	2174,5	0	0
BF	0	0	0	0
BT	9432,5	11102	9158,5	4211,5

*Unité universelle

L'effet insecticide de l'extrait BT semble être dû à la présence de l'acide 3,4,5, triméthoxybenzoïque, la naringénine, l'acide aesculein et l'acide p coumarique qui influenceraient la maturation sexuelle chez la femelle d'*Ephesia kuehniella* en retardant le développement des ovaires. En effet, les travaux d'Idrissi Hassani et Hermas (2008) ont montré que les polyphénols contenus dans les feuilles de *Pegalum harmala* peuvent provoquer un blocage du développement ovarien chez les femelles du criquet pèlerin.

3-2-3-3- EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE L'OLIVIER DE LAPERRINE SUR LA DUREE DE LA PERIODE D'OVIPOSITION

Un jour après l'accouplement, la femelle témoins d'*Ephesia kuehniella* commence sa ponte des œufs qui dure en moyenne $4,29 \pm 0,41$ jours.

Les extraits bruts appliqués sur la femelle de la pyrale pendant la période d'oviposition réduisent de manière significative ($p=0,00002$), le nombre de jours de ponte comparativement aux femelles témoins.

Ainsi, l'application de l'extrait BF sur les insectes femelles réduit en moyenne de moitié la durée de la période d'oviposition comparativement au témoin, nous enregistrons une valeur

de $2,43 \pm 0,49$ jours. L'analyse de la variance réalisée entre les extraits montre une différence significative ($p=0,004$) et nous comptons $3,00 \pm 0,57$ pour l'extrait BT et respectivement $3,29 \pm 0,41$ jours et $3,71 \pm 0,41$ jours pour les extraits ET et EF.

Nous relevons donc, que ce sont les extraits BF suivis de BT qui sont les plus efficaces sur la réduction de la durée de la période d'oviposition de la femelle d'*Ephesia kuehniella*. Ils font en effet, partie du même groupe homogène, le groupe c (Fig. 27).

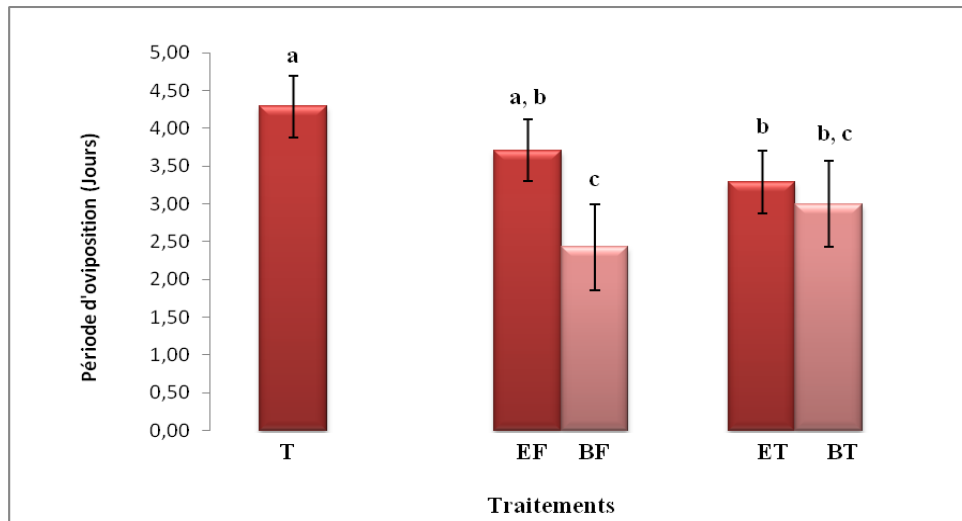


Figure 27: Durée de la période d'oviposition en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)

Selon Taibi (2007), le RH-0345 réduit la durée de la période d'oviposition de la femelle de la pyrale de la farine à $3,16 \pm 0,4$ jours et le RH-5992 réduit cette durée à $2,3 \pm 0,4$ jours (Bouzerra et Soltani-Mazouni, 2012). Ces valeurs montrent bien que les extraits BF et BT de l'olivier de Laperrine ont une efficacité similaire à celle obtenue par les insecticides chimiques.

Il faut cependant noter que c'est l'extrait BF qui présente l'effet le plus marqué par rapport à l'extrait BT. Selon l'axe F1 de l'ACP (Fig. 26), nous constatons que la durée de la période d'oviposition est réduite par trois principales molécules: le tyrosol (Tyr), l'isovitexine (Iso) et la caféine (Caf). Ces molécules sont présentes principalement dans les extraits BF et BT (Tab. XV). Mais quant à l'isovitexine ils en contiennent exclusivement, avec cependant une plus grande concentration dans l'extrait BF.

Tableau XV: Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) de trois molécules biochimiques contenues dans les extraits de l'olivier de Laperrine

Extraits	Tyr	Iso	Caf
EF	5641,5	0	0
ET	0	0	583
BF	7728	3762	2563,5
BT	9039	2223,5	1141

*Unit éuniverselle

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'isovitexine serait peut-être une molécule clé impliquée directement ou indirectement (effet synergique) dans la réduction du nombre de jours de ponte.

De plus et selon Simmonds (2001), la quercétine dont la teneur absolue est la plus élevée dans l'extrait BF (Tab. XII), bloque l'oviposition chez les insectes.

3-2-3-4-EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE L'OLIVIER DE LAPERRINE SUR LA FECONDITE DE LA FEMELLE D'*EPHESTIA KUEHNIELLA*

Durant la période d'oviposition, le nombre d'œufs déposés par les femelles témoins de la pyrale est en moyenne de $190,71 \pm 10,04$ œufs.

L'application des extraits bruts aux femelles se traduit par une diminution de la fécondité de ces dernières. En effet, ils réduisent en moyenne à 1/4 le nombre d'œufs déposés pendant la durée de la période d'oviposition par rapport au témoin.

L'analyse de la variance, entre les extraits et le témoin montre une différence significative ($p=0$) avec une valeur moyenne de $40,57 \pm 7,35$ œufs pour EF, $41,86 \pm 13,02$ œufs pour ET et respectivement $56,71 \pm 10,04$ œufs et $51,86 \pm 21,31$ œufs dans le cas de BF et de BT (Fig. 28).

La comparaison des extraits entre eux ne montre pas de différence ($p=0,27$), et ils sont classés dans le même groupe homogène, le groupe b (Fig. 28). Ils ont le même effet sur la fécondité de la femelle de la pyrale.

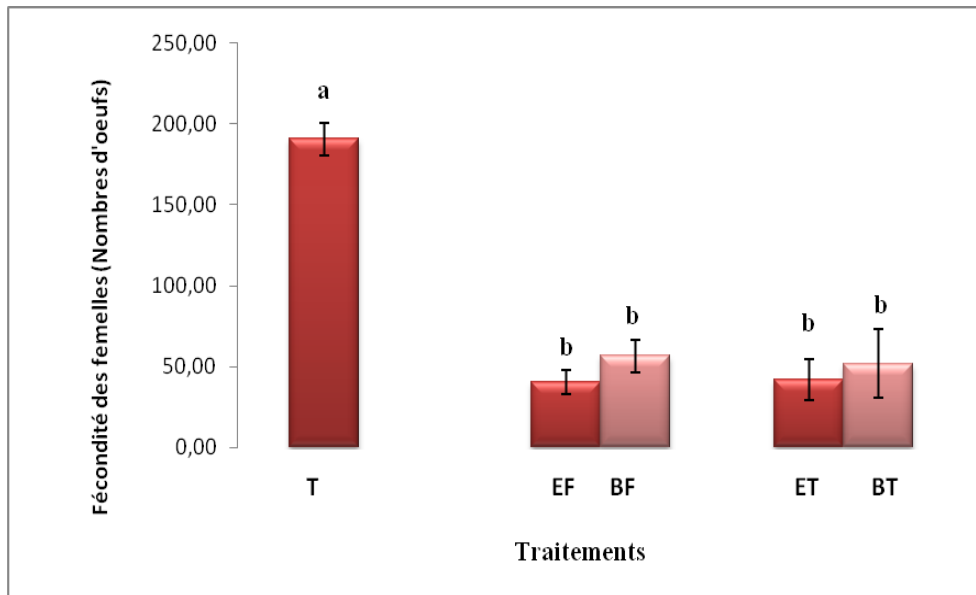


Figure 28: Fécondité des femelles en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)

Ainsi, toutes les fractions obtenues à partir de la poudre de feuilles et de la poudre de tiges de l'olivier de Laperrine, perturbent la fécondité des femelles en réduisant considérablement le nombre d'œufs déposés.

A notre avis, l'effet des extraits de l'olivier de Laperrine sur la fécondité de la femelle d'*E.kuehniella* serait dû à la présence de molécules biochimiques communes aux quatre extraits, en l'occurrence, l'hydroxytyrosol, l'oleuropéine, la quercétine et l'héspéridine. Selon Zouiten et El Hadrami (2001), le tyrosol, l'oleuropéine et l'acide caféique diminuent le potentiel de reproduction des femelles du psylle.

Ces molécules influencent peut-être l'équilibre hormonal de l'insecte, ce qui perturberait le cycle de ce dernier en diminuant le potentiel de reproduction de la femelle d'*Ephestia kuehniella*. Il est intéressant de mentionner que Ben Hamouda et al. (2015), ont montré que l'oleuropéine contenue dans les extraits de feuilles d'olivier, inhibe la ponte des œufs de *Phthorimaea operculata* (Teigne de la pomme de terre).

Comparés aux insecticides chimiques, les extraits testés dans notre étude, semblent posséder un effet plus marqué sur la fécondité de la femelle la pyrale de la farine ($40,57 \pm 7,35$ œufs à $56,71 \pm 10,04$ œufs). En effet, Taibi (2007), obtient $151,0 \pm 31,3$ œufs, après avoir exposé les femelles au RH-0345, alors que Bouzerra et Soltani-Mazouni (2012), comptent $73,8 \pm 29,2$ œufs après traitement des femelles par le RH-5992.

Des résultats similaires sont obtenus suite à l'application de l'huile essentielle extraite à partir de *Artemisia herba alba*. Elle réduit la fécondité de la femelle d'*E.kuehniella* à $81 \pm 6,56$ œufs, à la dose de 1 µl/ml (Delimi et al., 2017).

Des résultats obtenus par Kellouche et Soltani (2004) montrent que la poudre d'*Olea europaea* a un effet limité sur le nombre d'œufs déposés par la bruche du niébé.

D'après Johnson et al. (2006), l'efficacité des extraits de plantes est meilleure que celle des poudres végétales.

Une étude testant l'effet bio-insecticide de *Ziziphora clinopodioides* montre que la fécondité de la femelle diminue de 89,89 % quand la concentration de l'huile essentielle augmente (Kheirkhah et al., 2015). L'exposition à l'huile essentielle extraite de *Pistacia lentiscus* (Bachrouch et al., 2010) et d'*Origanum vulgare* (Taïbi et al., 2018) réduit la fécondité de la femelle et le taux d'éclosion des œufs d'*E.kuehniella*.

3-2-4- EFFET DES EXTRAITS BRUTS DE L'OLIVIER DE LAPERRINE SUR LA MORTALITÉ DES ADULTES D'*EPHESTIA KUEHNIELLA*

Les extraits bruts de l'olivier de Laperrine sont administrés au ravageur *Ephestia kuehniella*, par inhalation, dans le but d'estimer leur activité insecticide sur la mortalité des adultes.

Un lot d'insectes est placé dans un tube contenant du papier plissé pulvérisé par l'extrait brut. Un dénombrement quotidien des adultes morts est effectué jusqu'à atteindre les 100% de mortalité.

Le taux de mortalité est significativement marqué pour chaque jour de l'expérimentation. Les adultes témoins vivent en moyenne 20 jours à l'issue desquels, nous comptons 100% de mortalité. Le dernier adulte témoin meurt au 21^{ème} jour de l'expérimentation, notre objectif dans cette manipulation étant de comparer le taux de mortalité en présence et en l'absence des extraits, il nous a paru pertinent d'arrêter l'expérimentation au jour j 21. Les résultats illustrés par la figure 29, montrent la toxicité des extraits de l'olivier de Laperrine vis-à-vis des adultes d'*E. kuehniella*.

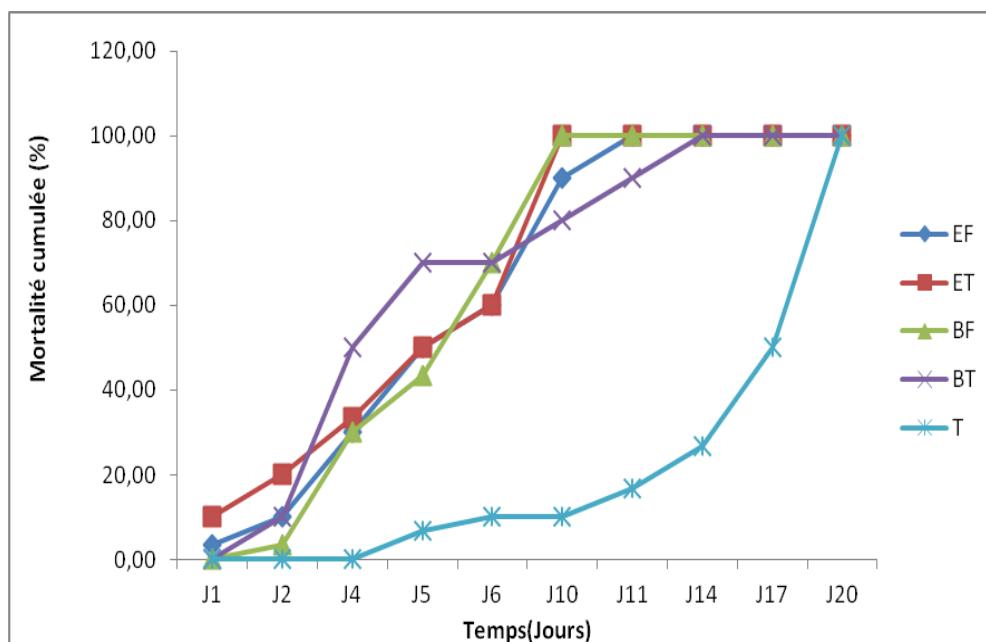


Figure 29: Cinétique de mortalité des adultes après administration par inhalation des extraits EF, ET, BF et BT

Dans les conditions optimales de développement, la mortalité chez les adultes témoins commence sensiblement au 5^{ème} jour d'élevage. En effet, nous enregistrons une valeur moyenne de $6,67 \pm 4,44$ %. Après application des extraits EF et ET sur les adultes, des effets immédiats se sont manifestés. Ces effets se traduisent par un taux moyen de mortalité calculé 24h après le début de l'expérimentation, de $3,33 \pm 4,44$ % pour EF et $10,00 \pm 6,67$ % pour ET.

Chez les adultes traités par BF et BT, nous notons un début de mortalité au 2^{ème} jour du traitement avec des valeurs moyennes respectives de $3,33 \pm 4,44$ % et $10,00 \pm 6,67$ %.

Une létalité de 50 % est enregistrée au 4^{ème} jour du traitement avec BT et au jour j5 pour les traitements EF et ET. Cette valeur n'est atteinte qu'entre le 5^{ème} et le 6^{ème} jour de l'exposition au traitement BF, et seulement au jour j17 dans le cas des témoins.

D'après les résultats obtenus, il apparaît que la totalité des insectes meurent après 10 jours d'exposition aux extraits ET et BF, après 11 jours de traitement avec EF et dans le cas BT, c'est au 14^{ème} jour de son application que tous les adultes meurent.

Aucun rapport n'est disponible concernant l'activité insecticide de l'olivier de Laperrine, et à notre connaissance aucun essai de l'évaluation de l'effet insecticide d'extraits de plantes n'a encore été réalisé sur *Ephestia kuehniella*. Cependant de nombreuses huiles essentielles extraites de différentes espèces végétales sont testées pour leur effet insecticide sur la pyrale de la farine, et appuient nos résultats quant à l'efficacité des extraits de l'olivier de Laperrine.

Ainsi, l'application de l'huile essentielle extraite de *Laurus nobilis* (Mediouni-Ben Jemâ et al., 2013) est toxique sur les adultes de *E.kuehniella* et entraîne, à la concentration de 45,64 µl/l d'air, 90% à 100% de mortalité au bout de 24h d'exposition. Un travail similaire indique que l'exposition aux vapeurs d'huile essentielle de *Zataria multiflora* présente une plus grande toxicité quand les adultes d'*E.kuehniella* y sont exposés comparativement aux larves qui sont plus tolérantes (Emamjomeh et al., 2014).

Les travaux de Delimi et al. (2013), ont montré que l'huile essentielle de l'Armoise blanche (*Artemisia herba alba*), présente une activité insecticide sur *E.kuehniella*, et que la durée de vie des adultes diminue de manière significative au bout du 3^{ème} jour d'exposition à la dose de 3µl/ml.

Une étude menée sur les huiles essentielles de *Ocimum basilicum*, *Capsicum annum*, *Mentha piperita* et *Rosmarinus officinalis*, met en évidence l'effet insecticide de ces espèces végétales contre les adultes, les larves et l'éclosion des œufs d'*E.kuehniella* (Pandir et Baş, 2016).

Bien que l'effet de l'huile essentielle de *Prangos ferulacea* varie en fonction des différents stades de développement d'*E. kuehniella* elle est plus toxique sur les adultes (Sümer et al., 2013).

Une étude menée par Kellouche et Soltani (2004), montre que la poudre de feuilles d'*Olea europaea* réduit significativement la longévité des adultes de la bruche du niébé.

Les travaux de Ben Hamouda et al. (2015) ont montré l'effet insecticide et toxique de l'extrait de feuilles d'*Olea europaea*, en effet ce dernier provoque une mortalité de 100% sur les adultes de *Myzus persicae* et réduit la pénétration des larves de *Phthorimaea operculella* dans les tubercules de pomme de terre de 71,7%.

Les travaux de Mohammed (2013), ont également rapporté que l'extrait de feuilles de l'olivier, provoque une mortalité de 98,7% des larves et de 80,9% des adultes de *Tribolium confusum*.

Selon Ouguas et al. (2010), le traitement des rameaux infectés par le psylle (*Euphyllura olivina* Costa), avec les composés phénoliques extraits de l'olivier, provoque sur les adultes une mortalité moyenne allant de 63,5% à 71,7% selon la variété infectée.

Pour une meilleure explication de l'action bio-insecticide des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur les adultes de la pyrale de la farine une courbe de tendance est établie pour chacun d'eux. Le nuage de points appliqués aux variables jours et mortalité pour chaque extrait donne les graphiques suivants (Fig. 30).

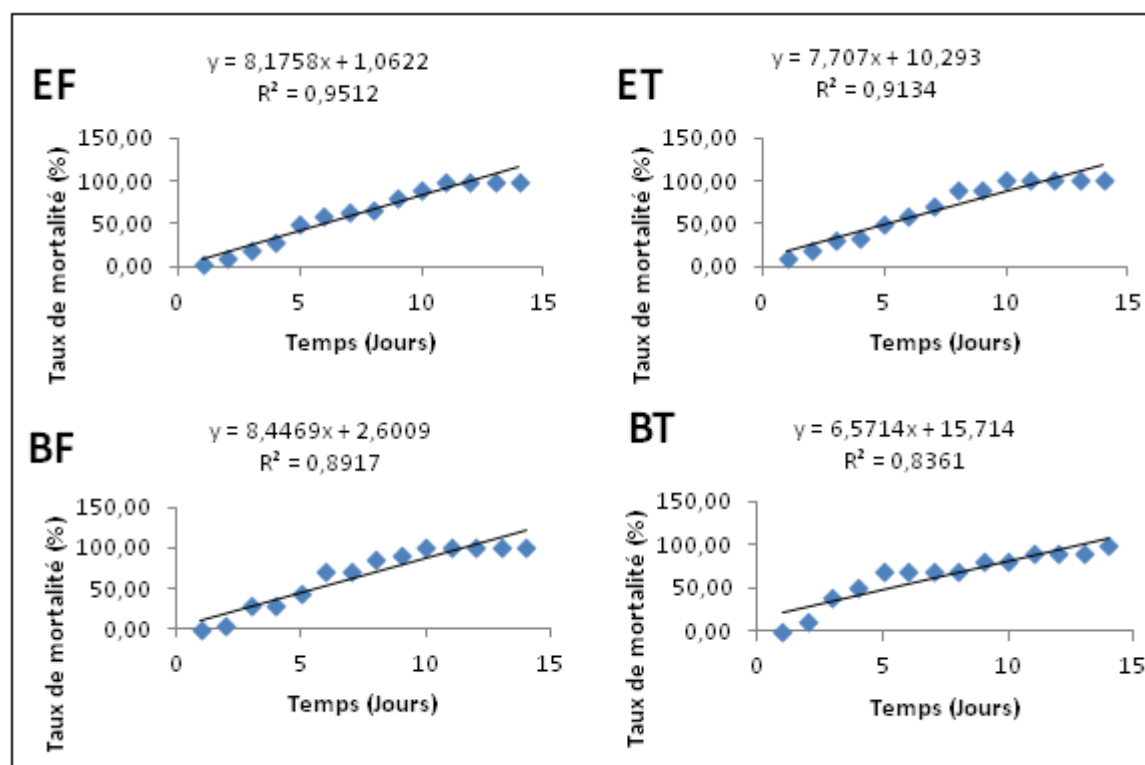


Figure 30: Coefficients d'ajustement linéaires des extraits de l'olivier de Laperrine

Les courbes de tendance appliquées à ces graphiques montrent un coefficient d'ajustement linéaire très élevé pour EF, il est de 0,95. Autrement dit, la mortalité enregistrée dans la période de temps considérée serait à plus de 95% expliquée par l'effet de l'extrait EF. Nous considérons donc que ce dernier est vraisemblablement le plus efficace des quatre extraits quant à éliminer l'espèce étudiée. Cet effet insecticide serait dû à notre avis, à la présence du tyrosol, de l'acide caféique, de l'oleuropéine, de l'acide férulique, de la vanilline, de la lutéoline et de la quercétine. Cependant la présence exclusive de la lutéoline et de l'acide cinnamique dans l'extrait EF semble jouer un rôle amplificateur sur la mortalité des adultes de la pyrale de la farine,

En effet, selon Zouiten et El Hadrami (2001), le tyrosol, l'acide caféique et l'oleuropéine augmentent la mortalité chez le psylle de l'olivier. La lutéoline, l'acide caféique, l'acide férulique, la vanilline (Diouf et *al.*, 2016), ainsi que la quercétine (Golawska et *al.*, 2008), interviennent dans la mortalité des différentes espèces d'insectes. Regnault-Roger et *al.* (2004) précisent que cette dernière molécule provoque une perturbation de la motricité chez les insectes. D'après Bastide et *al.* (1988), l'acide férulique est impliqué dans la résistance du pècher contre le puceron vert.

Pour Ben Hamouda et *al.* (2015), l'oleuropéine joue un rôle fondamental dans l'activité bio-insecticide.

CONCLUSION

Les processus de développement et de reproduction chez les insectes sont contrôlés par deux principales hormones : l'hormone de mue (ecdystéroïdes), et l'hormone juvénile. Les ecdystéroïdes jouent un rôle majeur et sont présents à tous les stades de la vie des insectes (Bensalem-Djidi, 2014). Cependant leur taux varie en fonction des différents stades de développement des insectes (El Ouar et *al.*, 2010).

Un grand nombre d'études ont montré l'implication des ecdystéroïdes et principalement de la 20-hydroxyecdysone (20E) dans de nombreux processus physiologiques comme la reproduction (Gilbert et *al.*, 1997), le développement ovarien, la vitélogénèse (Swever et Latrou, 1999), le développement embryonnaire et post embryonnaire (Kozlova et Thummel, 2000).

Les ecdystéroïdes sont formés à partir des stérols alimentaires qui seront transformés après ingestion en cholestérol (Bensalem-Djidi, 2014). L'oxydation et l'hydroxylation de ce dernier permet de fournir l'ecdysone qui est par la suite convertie en l'hormone 20E grâce à l'intervention de l'ecdysone-20-monooxygénase (Feyereisen et Durst, 1978; Smith et *al.*, 1979).

Par ailleurs, de nombreux auteurs ont montré que les composés chimiques contenus dans les extraits de plantes ont un effet anti-appétant (Ehrlich et Raven, 1964; Abassi et *al.*, 2003; Ould el Hadj et *al.*, 2006; Idrissi Hassani et Hermas, 2008) et qu'ils perturbent l'alimentation chez les insectes (Meftah et *al.*, 2014), en diminuant fortement ou en inhibant la consommation de nourriture (Meftah et *al.*, 2011). Les insectes ont, en effet, la capacité de rejeter une plante comme source alimentaire parce qu'ils possèdent des récepteurs spécifiques qui leurs permettent de détecter ces substances secondaires (Schroeder et Hiker, 2008).

Konno et *al.* (1999), soulignent que l'oleuropéine joue le rôle d'un puissant dénaturant protéique qui présente des activités de réticulation des protéines et de diminution de la lysine entraînant ainsi la diminution de la valeur nutritive des protéines alimentaires. Ce qui se traduit par une inhibition de la prise alimentaire par les insectes. Ce fait a été démontré par les travaux de Ben Hamouda et *al.* (2015), ils ont mis en évidence "un effet anti-alimentaire" de l'oleuropéine contenue dans les extraits de feuilles d'*Olea europaea* L sur *Phtorimaea operculella*.

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que certaines molécules chimiques dont l'oleuropéine, contenues dans les extraits de l'olivier de Laperrine inhibent la prise alimentaire des adultes d'*E. kuehniella*, ce qui affecterait la synthèse des hormones nécessaires à une reproduction normale provoquant ainsi la perturbation des paramètres de cette dernière.

Des résultats similaires sont enregistrés par plusieurs études, selon Zouiten (2002) in Meftah et *al.* (2014), l'oleuropéine exerce un grand effet sur les paramètres de reproduction du psylle de l'olivier en diminuant le potentiel de reproduction des femelles (Zouiten et El

1 Hadrami, 2001). Quant à Abbassi et *al.* (2003), ils soulignent que les extraits de feuilles de
2 *Pegalum harmala* entraînent des perturbations de la fonction de reproduction sur les femelles
3 du criquet pèlerin.

4
5 Les résultats de notre étude suggèrent que les extraits de l'olivier de Laperrine, possèdent
6 un double effet insecticide puisqu'ils interviennent à la fois sur les paramètres de la
7 reproduction d'*Ephestia kuehniella* et sur la longévité des adultes.

8 Les extraits bruts affectent les différentes phases du cycle de reproduction de l'insecte; ils
9 prolongent de manière significative la durée du développement nymphal et la durée de la
10 période de préoviposition et réduisent la durée de la période d'oviposition ainsi que le
11 nombre d'œufs déposés par la femelle.

12 Administrés aux adultes, les extraits bruts de l'olivier de Laperrine provoquent un taux de
13 mortalité de 100% entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de la vie d'*Ephestia kuehniella*.

**CONCLUSION GENERALES
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude préliminaire se propose d'approfondir nos connaissances et de valoriser l'olivier de Laperrine (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), espèce endémique des Hautes Montagnes Sahariennes caractérisée par sa grande résistance aux conditions environnementales très arides et aux facteurs de dégradations dus à l'homme et aux animaux.

Face à des conditions de milieu hostiles, les végétaux réagissent en activant la biosynthèse des métabolites secondaires. Cette stratégie adaptative leur permet de renforcer leur système de défense par des barrières chimiques. Nous nous sommes intéressés à la quantification du contenu phénolique des extraits de *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, compte tenu des conditions du milieu extrême dans lequel il évolue. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers l'extraction des polyphénols à partir des tiges feuillées, dans le but de les identifier, d'évaluer les activités biologiques pouvant leur être associées et de comparer ces dernières avec celles de l'olivier du Nord (*Olea europaea* L.). D'autant que de nombreux travaux ont mis l'accent sur la richesse en composés phénoliques, en particulier l'oleuropéine dans les feuilles de l'olivier aussi bien sauvage que cultivé. Ces composés phénoliques en font de puissants agents antioxydants contribuant aux nombreuses vertus thérapeutiques qui leurs sont attribuées.

Le premier objectif de ce travail consiste en la caractérisation biochimique des extraits de l'olivier de Laperrine. Ainsi, la composition chimique des différents extraits analysés par HPLC, révèle la présence de nombreuses molécules biochimiques caractérisées par des pics exprimant des temps de rétention spécifiques. Nous relevons la présence de nombreux composés caractéristiques de l'olivier, ce sont l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol et le tyrosol ainsi que la quercétine, l'apigénine, l'hespéridine et la lutéoline.

La comparaison quantitative des résultats obtenus par HPLC réalisée sur les extraits de feuilles et de tiges suite à une hydrolyse acide, montre que les teneurs en flavonoïdes sont plus élevées au niveau des feuilles. Ce résultat confirme bien la richesse en flavonoïdes attribuée aux feuilles par de nombreux chercheurs.

L'analyse phytochimique réalisée sur les extraits aqueux (EA) et éthanolique (EE) révèle la présence de deux fractions importantes dans les composés phénoliques, à savoir les flavonoïdes et les tanins dont les teneurs sont particulièrement élevées. Cette richesse semble être une réponse de l'espèce aux conditions de son milieu et montre clairement l'étroit rapport entre la biosynthèse des métabolismes secondaires et les conditions environnementales extrêmes auxquelles est exposé l'olivier de Laperrine. Il faut cependant relever que comparativement à l'extrait EA, les teneurs en phénols et en flavonoïdes totaux sont nettement plus élevées dans l'extrait EE. Ce résultat confirme bien que le mélange éthanol-eau est un meilleur solvant d'extraction comparativement à l'eau utilisée seule. Ceci étant dû à la plus grande solubilisation des polyphénols dans le mélange.

Par ailleurs, la comparaison des profils chromatographiques foliaires résultants des différentes extractions, montre que le nombre de composés chimiques est plus élevé dans le cas de l'extraction acide par rapport aux extractions aqueuse et éthanolique. Ceci s'expliquerait à notre avis par le fait que l'hydrolyse acide cible essentiellement l'extraction des flavonoïdes.

Le deuxième objectif de notre étude consiste à évaluer le potentiel antioxydant des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine. Pour soutenir cette idée, nous avons commencé par déterminer la capacité antioxydante globale (TAC) et la capacité à fournir des électrons stabilisateurs ou réducteurs (FRAP) des extraits étudiés. Ces deux tests préliminaires, très fortement corrélés ($R_2 = 0,99$) ont mis en évidence le pouvoir oxydant élevé des extraits de feuilles de l'olivier de Laperrine.

Les résultats obtenus montrent que les molécules phytochimiques contenues dans les extraits EA et EE exercent un effet antioxydant non négligeable. Leur efficacité est liée à leur aptitude à piéger les radicaux libres. Cette dernière se traduit par le don d'un atome d'hydrogène ou d'un électron au radical libre qui prend ainsi la forme réduite. Cet état réduit l'empêche d'atteindre sa cible biologique (ADN, protéines ou lipides) et de provoquer des altérations pouvant conduire à de graves pathologies.

Les effets antioxydants relevés *in vitro* sont en relation directe avec le contenu phénolique des extraits étudiés et dépendent des différentes interactions (synergie ou antagonisme) qui les régissent. Ainsi, le potentiel antioxydant est en faveur de l'extrait EE dont le contenu phénolique est plus riche que celui de l'extrait EA. Il relève en effet, une puissante capacité à neutraliser les radicaux libres comme le DPPH• et le H_2O_2 et à inhiber fortement le blanchiment du β -carotène. De plus, le calcul de l'indice de l'activité antioxydante ($IAA > 2$) le définit bien comme ayant une activité antioxydante très forte et avec une puissance similaire à celle de l'acide ascorbique.

Enfin, une évaluation du potentiel insecticide des extraits de feuilles et de tiges est réalisée sur les paramètres de la reproduction de la pyrale de la farine (*Ephestia kuehniella*), ainsi que sur la mortalité des adultes. Ainsi l'inhalation, des extraits bruts par des chrysalides prolonge leur durée de développement nymphal et perturbe la reproduction des adultes.

Sur les quatre extraits testés, seul l'extrait BT, prolonge de manière significative la période de préoviposition. Nous notons, qu'après l'accouplement, la période d'oviposition est significativement réduite après l'exposition des femelles aux extraits bruts testés, c'est cependant, la fraction BF qui perturbe le plus la reproduction des adultes. Toutes les fractions obtenues à partir de la poudre de l'olivier de Laperrine, perturbent la fécondité des femelles adultes en réduisant le nombre d'œufs déposés.

L'extrait EF est vraisemblablement le plus efficace des quatre extraits quant à éliminer l'espèce étudiée. Cet effet insecticide serait dû à notre avis, à la présence du tyrosol, de l'acide

caféique, de l'oleuropéine, de l'acide férulique, de la vanilline, de la lutéoline et de la quercétine.

Les données acquises au cours de notre expérimentation mettent en exergue le remarquable pouvoir antioxydant et insecticide des extraits de l'olivier de Laperrine.

Ainsi, cette espèce pourrait d'une part, servir de source potentielle d'antioxydants naturels, d'autant que les extraits de feuilles se sont révélés non toxiques pour les cellules. En outre, elle offrirait la perspective d'une utilisation en thérapeutique humaine, en prévenant les différentes pathologies qui peuvent survenir suite à une situation de stress oxydatif par le renforcement du système de défense de l'organisme. Cependant une purification de ses molécules bioactives et une évaluation de leur activité est nécessaire.

D'autre part l'olivier de Laperrine pourrait représenter une alternative aux substances chimiques nocives et être potentiellement utilisé comme source de biomolécules à effet insecticide. Il faut cependant préciser que dans ce contexte, ce travail se situe à une échelle expérimentale et avant d'envisager une utilisation sur le terrain, il *serait important de procéder à d'autres tests*, visant par exemple:

* A déterminer un éventuel effet larvicide des extraits de l'olivier;

** A réaliser un test de répulsivité

*** A isoler et tester séparément ou en association, les molécules chimiques identifiées comme ayant un effet sur les paramètres de la reproduction d'*Ephesia kuehniella* afin d'établir leur mode d'action sur la physiologie de sa reproduction.

Si les résultats obtenus sont intéressants et ouvrent des futures perspectives, ce travail reste néanmoins à enrichir. Ainsi, il serait intéressant de réfléchir à des méthodes permettant leur utilisation comme pesticide naturel contre les ravageurs infestés à l'olivier du nord et d'évaluer leur capacité à inhiber la croissance fongique et microbienne.

Notre travail a révélé la richesse des feuilles de l'olivier de Laperrine en substances bioactives dont les effets bénéfiques pour la santé ne sont plus à démontrer. Il serait intéressant de vérifier si cette richesse est spécifique aux feuilles ou est caractéristique de la plante. Ainsi réaliser une étude phytochimique comparative des différents extraits issus de toutes les parties de la plante (fleurs, fruit, tronc, racines...) pourrait s'avérer instructive quant à ce questionnement.

De plus, comprendre et maîtriser sa réponse vis à vis du stress biotique et abiotique est une étape importante. Elle nous permettrait éventuellement d'établir des corrélations entre les conditions de l'environnement et la biosynthèse des polyphénols et de définir ainsi la saison où la teneur en composés phénoliques est à son maximum et d'ajuster la période de prélèvement du matériel végétal.

Enfin, il nous paraît intéressant d'envisager la production des composés phénoliques dans des conditions *in vitro* à partir de cals, de cultures cellulaires ou de vitro-plants par exemple. Ce qui aurait l'avantage de produire des principes actifs à volonté, dans des espaces réduits et dans des conditions contrôlées.

1 L'olivier de Laperrine constitue un patrimoine génétique exceptionnel et sa valorisation en
2 tant que ressource génétique pour l'olivier cultivé est indispensable. C'est une essence à
3 tempérament robuste qui s'accommode au climat sec et aux sols déshérités et présente une
4 grande résistance face aux facteurs de destruction. Cette résistance se matérialise par sa
5 capacité de rejeter de souche qui lui a, non seulement permis de s'adapter et de se maintenir
6 dans un environnement hostile pendant de longues périodes mais a aussi favorisé les
7 génotypes triplo  ides plus vigoureux que leur analogues diplo  ides. Ces derniers pourraient
8 faire partie de programme d'amélioration. En effet l'inter fertilité démontrée entre les sous
9 espèces du complexe *Olea* nous autorise à envisager et à réfléchir à des plans d'hybridation
10 entre l'olivier de Laperrine et l'olivier cultivé. Ces croisements aboutiraient peut être à des
11 individus dont la vigueur hybride serait supérieur à celle de leurs géniteurs.

12
13 La valorisation des extraits végétaux revêt un intérêt considérable sur le plan économique,
14 puisque que le coût de reviens des extractions à partir de poudre végétale est très compétitif
15 par rapport à celui de l'extraction des huiles essentielles. De plus les extraits que nous avons
16 testés au cours de notre expérimentation ont démontrés leur efficacité durant nos tests, et
17 exprimés un effet comparable et parfois même supérieur à celui des huiles essentielles.
18 Cependant, cette comparaison ayant été abordée très succinctement, nous nous garderons de
19 toute conclusion h  t  ive en cette matière. Il nous paraît toutefois important d'envisager une
20 expérimentation détaillée dans ce domaine et comparer l'effet des extraits végétaux et des
21 huiles essentielles issus de la même plante en utilisant les mêmes tests *in vitro* et *in vivo*.

INDEX TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

N °	Titre	Page
I	Sous esp èces du complexe <i>Olea europaea</i> L.	9
II	Position systématique de l'olivier de Laperrine	11
III	Classification d' <i>Ephestia kuehniella</i>	15
IV	Activit és des polyph énoles des feuilles de l'olivier	33
V	Rendements d'extraction et résultats des dosages	57
VI	Comparaison de la teneur en phénols totaux des feuilles d' <i>Olea laperrinei</i> avec celle des feuilles d' <i>Olea europaea</i>	58
VII	Principaux compos és chimiques identifi és dans les extraits de l'olivier de Laperrine	60
VIII	Comparaison des résultats du test FRAP avec ceux des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L.	62
IX	Comparaisons des résultats du test DPPH des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L. à ceux obtenus dans notre exp érimentation	65
X	Comparaison des résultats du test BCB avec ceux des feuilles d' <i>Olea europaea</i> L.	66
XI	Principaux compos és chimiques identifi és dans les extraits de l'olivier de Laperrine	74
XII	Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) des mol écules biochimiques contenues dans les extraits de l'olivier de Laperrine	77
XIII	Effet des extraits bruts de l'olivier de Laperrine sur la p ériode de pr éoviposition chez <i>Ephestia kuehniella</i>	78
XIV	Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) de quatre mol écules biochimiques contenues dans les extraits v ég éaux	79
XV	Teneurs absolues ([mAU*]/g PV) de trois mol écules biochimiques contenues dans les extraits de l'olivier de Laperrine	81

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
1	Distribution du complexe de l'olivier (A) et de l'olivier de Laperrine (B). Les massifs sahariens sont indiqués en gris sur la figure 1.B. La répartition de la sous-espèce <i>laperrinei</i> dans ces montagnes est représentée en noir (Besnard et al, 2012)	10
2	Olivier de Laperrine. (A : dans les lits d'oueds ; B : Aspect buissonnant)	12
3	Forme lancéolée des feuilles de l'olivier de Laperrine. (A : Rameau, B : Face supérieure C : face inférieure)	12
4	Face abaxiale d'une feuille d'olivier de Laperrine montrant les écailles peltées observées au microscope électronique. L'échelle représente 200 µm. (Besnard et al., 2012)	13
5	Quelques caractéristiques botaniques d' <i>Olea laperrinei</i> . (A: Inflorescence en grappe, B: Fleur, C: Fruit immature, D: Fruit mature; E: Noyau à endocarpe dur; F: Graines)	14
6	Différents stades de développement chez <i>Ephestia kuehniella</i> (Xu, 2010). (A: Œuf, B: Larve du stade 6, C: Chrysalide et D: Adulte)	16
7	Dimorphisme sexuel de la pyrale de la farine (A: Femelle, B: Mâle)	17
8	Principales espèces réactives à l'oxygène (Favier, 2003)	20
9	Schéma représentant l'effet du radical l'hydroxyle sur les molécules cibles (Garait, 2006) Modifié	21
10	Régulation de la production d'ERO par les systèmes de défenses antioxydantes (Carrière et al., 2006)	22
11	Structures de base des trois principaux groupes de flavonoïdes (Guillouty, 2016). Modifié	29
12	Activités biologiques des polyphénols (Martin et Andriantsitohaina, 2002)	30
13	Chélation des métaux de transition par les polyphénols (Pietta, 2000)	33
14	Localisation de la zone d'étude. Echelle : 1/200 000 A : Sur la feuille d'Assekrem (+), B : Agrandissement à partir de la feuille d'Assekrem	37 38

15	Différentes espèces végétales rencontrées dans la station d'étude (A : <i>Rhus tripartitus</i> , B : <i>Periploca laevigata</i> , C : <i>Myrtus nivellei</i> , D : <i>Atriplex halimus</i> , E : <i>Nerium oleander</i> et F : <i>Tamarix gallica</i>).	39
16	Elevage de masse de la pyrale de la farine	40
17	Schéma illustrant les différentes étapes d'extraction	43
18	Protocole analytique d'extraction acide (Lebreton et <i>al.</i> , 1967)	45
19	Application des extraits de l'olivier de Laperrine sur la pyrale de la farine. A : Dans des boîtes de Pétri, B : Dans des tubes	53
20	Capacité de réduction du fer par les extraits de feuilles d' <i>Olea laperrinei</i>	63
21	Capacité de piégeage des radicaux DPPH $\cdot$ par les extraits de feuilles d' <i>Olea laperrinei</i>	64
22	Pourcentage d'inhibition du blanchiment du β -carotène par les extraits de feuilles d' <i>Olea laperrinei</i>	66
23	Capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène par les extraits de feuilles d' <i>Olea laperrinei</i>	68
24	Teneur en composés flavoniques de différents extraits obtenus à partir de la poudre de feuilles (PF) et de la poudre de tiges (PT) de l'olivier de Laperrine	72
25	Période de développement nymphal en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)	76
26	Analyse factorielle des correspondances, plan factoriel axes F1 et F2 (Variables x Extraits)	77
27	Durée de la période d'oviposition en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)	80
28	Fécondité des femelles en fonction des traitements appliqués (EF: Extrait éthéré de feuilles, BF: Extrait butanolique de feuilles, ET: Extrait éthéré de tiges, BT: Extrait butanolique de tiges et T: Témoin)	82

29	Cinétique de mortalité des adultes après administration par inhalation des extraits EF, ET, BF et BT	84
30	Coefficients d'ajustement linéaires des extraits de l'olivier de Laperrine	86

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aba Toumnou L. (2013).** Gestion intégrée des principaux insectes ravageurs des céréales par l'utilisation des métabolites secondaires des plantes indigènes du Sénégal et du Centrafrique. Thèse de doctorat en Biologie, Physiologie et Pathologie végétales, discipline : Production et Protection des végétaux. Université Cheikh Anta diop de Dakar. 163p.
- Abbassi K., Atay-Kadiri Z., Ghaout S. (2003).** Biological effects of alkaloids extracted from three plants of Moroccan arid areas on the desert locust. *Physiological Entomology*, 28(3): 232-236.
- Abascal K., Ganora L., Yarnell E. (2005).** The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 19(8): 655-660.
- Abaza L., Ben Youcef N., Manai H., Mahjoub Haddada F., Methenni K., Zarrouk M. (2011).** Chetoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grsas Y Aceites*, 62(1): 96-104.
- Achat S. (2013).** Polyphénols de l'alimentation : extraction, pouvoir antioxydant et interaction avec des ions métalliques. Thèse en co-tutelle de doctorat en Sciences filière : Biologie, option : Sciences Alimentaires. Université A. MIRA-Bejaia et Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse– Avignon. 211p.
- Adjimani J.P., Asare P. (2015).** Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology Reports*, 2: 721-728.
- Afonso V., Champy, R., Mitrovic D., Collin P., Lomri A. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7): 636-643.
- Ahmed A.M., Rabii N.S., Garbaj A.M., Abolghait S.K. (2014).** Antibacterial effect of olive (*Olea europaea* L.) leaves extract in raw peeled undeveined shrimp (*Penaeus semisulcatus*). *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1): 53-56.
- Aiche-Iratni G., Moualek I., Mestar-Guechaoui N., Mezaache-Aichour S., Zerroug M.M., Houali K. (2015).** *In vitro* evaluation of biological activities of *Pistacia lentiscus* aqueous extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(11): 133-139
- Alam M.N., Bristi N.J., Rafiquzzaman M. (2013).** Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2): 143-152.

- 1 **Allothman M., Bhat R., Karim A.A. (2009).** Antioxidant capacity and phenolic content of
2 selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. Food chemistry,
3 115(3): 785-788.
4
- 5 **Amessis-Ouchemoukh N., Abou- Reidah I. M., Quirantes-Pin é R., Madani K., Segura-
6 Carretero A. (2014).** Phytochemical profiling, *in vitro* evaluation of total phenolic contents
7 and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in
8 Algeria. Industrial Crops and Products. 61:120-129.
9
- 10 **Anderson J.W., Johnstone B.M., Cook-Newell M. E. (1995).** Meta-Analysis of the Effects
11 of Soy Protein Intake on Serum Lipids. New England Journal of Medicine, 333(5) : 276–282.
12
- 13 **Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L. (1999).** Olive genetic diversity assessed using
14 amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 98(3-4): 411-
15 421.
16
- 17 **Anthelme F., Abdoukader A.Besnard G. (2008).** Distribution, shape and clonal growth of
18 the rare endemic tree *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) in the Saharan mountains of
19 Niger. Plant Ecology, 198(1): 73-87.
20
- 21 **Aouati A., Berchi S. (2015).** Larvicidal effect of *Marrubium vulgare* on *Culex pipiens* in
22 eastern Algeria. Energy Procedia, 7: 1026 – 1031.
23
- 24 **Arab K., Bouchenak O., Karima Yahiaoui K. (2013).** Évaluation de l'activité biologique
25 des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. Afrique Science, 09(3): 159 – 166.
26
- 27 **Ardi R., Kobiler I., Jacoby B., Keen N.T., Prusky D. (1998).** Involvement of epicatechin
28 biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruit to
29 *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53: 269–285.
30
- 31 **Bastide P., Massonie G., Macheix J.J. (1988).** Influence *in vitro* des composés phénoliques
32 des jeunes feuilles du pêcher, *Prunus persica* (L.) Batsch, sur le puceron vert du pêcher,
33 *Myzus persicae* Sulzer. Agronomie, 8(9): 787-792.
34
- 35 **Baali-Cherif D., Besnard G. (2005).** High genetic diversity and clonal growth in relict
36 populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. Annals of
37 Botany, 96 (5): 823-830.
38
- 39 **Baali-Cherif D. (2007).** Etude des populations d'olivier de Laperrine (*Olea europaea* ssp.
40 *laperrinei*) du Sahara Central Algérien (Hoggar et Tassili): aspects biologiques et
41 caractérisation moléculaire. Thèse de Doctorat d'Etat en Science de la Nature, spécialité :
42 Biologie végétale. Université des Sciences et de la Technologie HOUARI Boumediane (UST
43 HB) Alger.102p.
44

- 1 **Baali-Cherif D., Bouguedoura N., Besnard G., Bouhired L. (2007).** Etude des populations
2 de l'olivier de Laperrine (*Olea europaea subsp. laperrinei* Batt. et Trab.) du Sahara Central
3 alg é r i e n (Hoggar et Tassili) : aspects biologiques et caract é r i s a t i o n m o l é c u l a i r e . Annales de
4 l'Institut National Agronomique El Harrach, 28(1-2): 35-73.
5
- 6 **Bachrouch O., Mediouni-Ben Jem â a J., Wissem A.W., Talou T., Marzouk B.,
7 Abderraba M. (2010).** Composition and insecticide activity of essential oil from *Pistacia*
8 *lentiscus* L. against *Ectomyelois ceratoniae* Zeller and *Ephestia kuehniella* Zeller
9 (Lepidoptera : Pyralidae). Journal of Stored Products Research, 46(4): 242-247.
10
- 11 **Balachowsky. (1972).** Blood sucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and
12 animals. Mix. Publ. Entomological Society American. 8: 161-376.
13
- 14 **Banso A., Adeyemo S.O. (2007).** Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated
15 from *Dichrostachys cinerea*. African Journal of Biotechnology, 6(15): 1785-1787.
16
- 17 **Battandier M.J.A., Trabut L. (1911).** Contribution à la flore du pays des Touaregs. Bulletin
18 de la Soci é t é Botanique de France, 58(6): 623-629.
19
- 20 **Benavente-Garcia O., Castillo J., Lorente J., Ortu ñ o A., Del Rio J.A. (2000).** Antioxydant
21 activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. Food Food Chemistry, 68(4):
22 457-462.
23
- 24 **Benayad N. (2008).** Les huiles essentielles extraites des plantes m é d i c i n a l e s m a r o c a i n e s :
25 moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denr é e s a l i m e n t a i r e s s t o c k é e s (Projet de
26 recherche). Universit é Mohammed V - Agdal, Maroc. 63p.
27
- 28 **Bensalem-Djidi F. (2014).** Effet de deux hypotenseurs le lisinopril et l'enalapril sur quelques
29 param è t r e s d e l a r e p r o d u c t i o n d ' u n r a v a g e u r d e s d e n r é e s s t o c k é e s *Ephestia kuehniella*
30 (L é p i d o p t è r e , P y r a l i d é). Th è s e d e D o c t o r a t d e 3 è m e c y c l e , S p é c i a l i t é B i o l o g i e A n i m a l e
31 Environnementale, Option Reproduction et Développement. Universit é badji Mokhtar,
32 Annaba. 58p.
33
- 34 **Ben Hamouda A., Ammar M., Ben Hamouda M.H. (2011).** Effect of *Olea europea* and
35 *Cestrum parquii* leaves on the cuticle and brain of the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*
36 Forsk.(Orthoptera: Acrididae). Pest technology, 5(1): 55-58.
37
- 38 **Ben Hamouda A., Boussadia O., Khaoula B., Laarif A., Braham M. (2015).** Studies on
39 insecticidal and deterrent effects of olive leaf extracts on *Myzus persicae* and *Phthorimaea*
40 *operculella*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 3(6): 294-297.
41
- 42 **Benichou A. (1962).** Recherches critiques sur l'Olivier de Laperrine. Botanique Saharienne.
43 Bulletin N ° 6 de l'IRS, Universit é d'Alger, 6:1-55.
44

- 1 **Bentrad N., Gaceb-Terrak R., Benmalek Y., Rahmania F. (2017).** Studies on chemical
2 composition and antimicrobial activities of bioactive molecules from date palm (*Phoenix*
3 *dactylifera* L.) pollens and seed. African Journal of Traditional, Complementary and
4 Alternative Medicines, 14(3): 242-256.
5
- 6 **Berenbaum M.R. (1983).** Effects of tannins on growth and digestion in two species of
7 papilionids. Entomologia Experimentalis et Applicata, 34(3): 245-250.
8
- 9 **Bennick A. (2002).** Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. Critical Reviews
10 in Oral Biology & Medicine, 13(2): 184-196.
11
- 12 **Besnard G. (1999).** Etude de la diversité génétique de l'olivier cultivé et des formes sauvages
13 apparentées à l'aide de marqueurs moléculaires : applications pour l'identification variétale et
14 pour la gestion des ressources génétiques. Thèse de doctorat : Biologie des populations et
15 écologie. Université des Sciences et Techniques de Montpellier II. 210 p.
16
- 17 **Besnard G., Green P.S., Bervill é A. (2002).** The genus Olea: molecular approaches of its
18 structure and relationships to other Oleaceae. Acta Botanica Gallica, 149(1): 49-66.
19
- 20 **Besnard G., Christin P.A., Baali-Cherif D., Bouguedoura N., Anthelme F. (2007a).**
21 Spatial genetic structure in the Laperrine's olive (*Olea europaea* subsp. *laperrinei*), a long-
22 living tree from the central Saharan mountains. Heredity, 99(6): 649- 657.
23
- 24 **Besnard G., Rubio de Casas R., Vargas P. (2007b).** Plastid and nuclear DNA polymorphism
25 reveals historical processes of isolation and reticulation in the olive tree complex (*Olea*
26 *europaea*). Journal of Biogeography 34, 736–752
27
- 28 **Besnard G. (2008).** Chloroplast DNA in mediterranean olive. The Journal of Horticultural
29 Science and Biotechnology, 83(1): 51-54.
30
- 31 **Besnard G., Baali-Cherif D. (2009).** Coexistence of diploids and triploids in a Saharan relict
32 olive: evidence from nuclear microsatellite and flow cytometry analyses. Comptes Rendus
33 Biologies, 332(12): 1115-1120.
34
- 35 **Besnard G. (2009).** Génétique et évolution des plantes en milieux méditerranéen et tropical.
36 Thèse de doctorat, habilitation à diriger des Recherches. Université des Sciences et
37 Technologies de Lille 1. France. 45p.
38
- 39 **Besnard G., Anthelme F., Baali-Cherif D. (2012).** The Laperrine's olive tree (Oleaceae). a
40 wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the
41 biogeography of the Saharan Mountains. Acta Botanica Gallica – Botany Letters, 159(3):
42 319-328.
43

- 1 **Besnard G., El Bakkali A., Haouane H., Baali-Cherif D., Moukhli A., Khadari B. (2013).**
2 Population genetics of Mediterranean and Saharan olives: geographic patterns of
3 differentiation and evidence for early generations of admixture. *Annals of botany*, 112(7):
4 1293-1302.
- 5
- 6 **Besnard G., Rubio de Casas R. (2016).** Single vs multiple independent bolive
7 domestications: the jury is (still) out. *New Phytologist* 209: 466–470
- 8
- 9 **Bilal H., AkramW., Ali Hassan S., Zia A., Bhatti A.R. Mastoi M.I., Aslam S. (2015).**
10 Insecticidal and Repellent Potential of Citrus Essential Oils Against *Tribolium castaneum*
11 Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) *Pakistan Journal of Zoology*, 47(4): 997-1002.
- 12
- 13 **Botsoglou E., Govaris A., Christaki E., Botsoglou N. (2010).** Effect of dietary olive leaves
14 and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of
15 turkey breast fillets during refrigerated storage *Food Chemistry* 121:17–22.
- 16
- 17 **Botsoglou E., Govaris A., Ambrosiadis I., Fletouris D. (2012).** Lipid and protein oxidation
18 of α -linolenic acid-enriched pork during refrigerated storage as influenced by diet
19 supplementation with olive leaves (*Olea europea* L.) or α -tocopheryl acetate. *Meat Science*,
20 92 (4): 525-532.
- 21
- 22 **Bouaziz M., Sayadi S. (2005).** Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a
23 Tunisian cultivar olive tree. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 107(7 - 8):
24 497-504.
- 25
- 26 **Bouchetla A., Boughdad A., Blenzar A. (2005).** Effet biocides des alcaloïdes, des saponines
27 et des flavonoïdes extraits de *Capsium frutescens* L. (Solanaceae) sur *Bemisia tabaci*
28 (Gennadius) (Homoptera : Aeyrodidae). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 9 (4): 259-269.
- 29
- 30 **Boudhrioua N., Bahloul N., Ben Slimen I., Kechaou N. (2009).** Comparison on the total
31 phenol contentsand the color of fresh and infrared dried oliveleaves. *industrial crops and*
32 *products*, 29: 412– 419.
- 33
- 34 **Bouguerne B. (2012).** Conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement
35 fonctionnalisés et études de leurs propriétés biologiques vis-à-vis des maladies
36 cardiovasculaires (athérosclérose). Thèse de doctorat, Sciences de la matière. Université de
37 Toulouse III-Paul Sabatier, France. 256p.
- 38
- 39 **Bouzeraa H., Soltani-Mazouni N. (2012).** Effets du méthoxyfénoside sur le développement
40 et quelques paramètres de la reproduction d'*Ephestia kuehniella* après traitement des mâles et
41 des femelles. *Bulletin de la Société zoologique de France*, 137(1-4) : 157-167.
- 42
- 43

- 1 **Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F., Ksouri R. (2016).** Effet du solvant et de la m é t h o d e
2 d'extrac-tion sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes
3 d'*Euphorbia helioscopia*. Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology,
4 28(12):1649-1655
5
- 6 **Bozin B., Mimica-Dukic N., Samojiki I., Goran A., Igic R. (2008).** Phenolics as
7 antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), Food Chemistry, 111: 925-929
8
- 9 **Brahmi F., Mechri B., Dhibi M., Hammami, M. (2013).** Variations in phenolic compounds
10 and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in
11 two different seasons. Industrial crops and products, 49(1): 256-264.
12
- 13 **Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. (1995).** Use of a free radical method to
14 evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie/Food Science and
15 Technology, 28(1): 25-30.
16
- 17 **Breton C., M é d a i l F., Pinatel F., Bervill é A. (2006).** De l'olivier à l'oléastre : origine et
18 domestication de l'*Olea europaea* L. dans le Bassin m é d i t e r r a n é e n . Cahiers Agricultures, 15
19 (4): 329-336.
20
- 21 **Brindley T.A. (1930).** The Growth and Development of *Ephestia kuehniella* Zeller
22 (Lepidoptera) and *Tri-Bolium Confusum* Duval (Coleoptera) under Controlled Conditions of
23 Temperature and Relative Humidity. Annals of the Entomological Society of America, 23(4):
24 741-757.
25
- 26 **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie, plantes m é d i c i n a l e s . Ed Tec et Doc.
27 Lavoisier. Paris.278- 279.
28
- 29 **Bruneton J. (1999).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes m é d i c i n a l e s . Ed Tec et Doc, 3^{è m e}
30 é d i t i o n . 783- 785.
31
- 32 **Calatayud P.A., Garrec, J.P., Nicole M. (2013).** Adaptation des plantes aux stress
33 environnementaux. Interactions insectes- plantes, Chapter 14, Publisher: IRD & Quae. 229-
34 245.
35
- 36 **Caretto S., Linsalata V., Colella G., Mita G., Lattanzio V. (2015).** Carbon fluxes between
37 primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. International journal
38 of molecular sciences, 16(11): 26378-26394.
39
- 40 **Carrière A., Galinier A., Fernandez Y., Carmona M.C., P é n i c a u d L., Casteilla L. (2006).**
41 Les espèces actives de l'oxygène: le yin et le yang de la mitochondrie. m é d e c i n e /
42 sciences, 22(1): 47-53.
43
44

- 1 **Carrieri F., Raimo F., Pentangelo A., Lahoz E. (2013).** *Fusarium proliferatum* and
2 *Fusarium tricinctum* as causal agents of pink rot of onion bulbs and the effect of soil
3 solarization combined with compost amendment in controlling their infections in field. Crop
4 Protection, 43: 31-37.
- 5
- 6 **Caturla N., Perez-Fons L., Estepa A., Micol V. (2005).** Differential effects of oleuropein,
7 abiophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes.
8 Chem Phys Lipids, 137: 2-17
- 9
- 10 **Cassier P. (1996).** L'expression de deux milieux : le passage de la vie imaginaire chez les
11 insectes. Le contrôle endocrine. Bulletin de la Société entomologique de France, 121(2): 187-197.
- 12
- 13 **Chaieb I. (2011).** Research on insecticidal plants in Tunisia: review and discussion of
14 methodological approaches. Tunisian Journal of Plant Protection, 6(2): 109-25.
- 15
- 16 **Chang C.C., Yang M.H., Wen H.M., Chern J.C. (2002).** Estimation of total flavonoid
17 content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug
18 analysis, 10(3): 178-182.
- 19
- 20 **Chebli B. Idrissi Hassani L.M., Hmamouchi M. (2001).** Acides gras et polyphénols des
21 graines d'*Ononis natrix* L. (Fabaceae) de la région d'Agadir, Maroc. Acta Botanica Gallica,
22 148(4): 333-340.
- 23
- 24 **Cillard J., Cillard P. (2006).** Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations.
25 Oleagineux, corps gras, lipides, 13(1): 24-29.
- 26
- 27 **Cochereau P. (1982).** Les conditions de la lutte contre les insectes ravageurs des cultures
28 vivrières africaines. *Entomophaga*, (numéro Hors série), 27(1): 5-10.
- 29
- 30 **Costa-Arbulu C., Ganoli E., Gonzalez W.L., Niemeyer H.M. (2001).** Feeding by the aphid
31 *Sipha flava* produces a reddish spot on leaves of *Sorghum halepense*: An induced response?
32 Journal of Chemical Ecology, 27: 271-281.
- 33
- 34 **Cronquist A. (1981).** An integrated system of classification plant. Columbia University.
35 Press. New York. 1262p.
- 36
- 37 **Dai J., Mumper R.J. (2010).** Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and
38 anticancer properties. Molecules, 15(10): 7313-7352.
- 39
- 40 **Dangles O., Stoeckel C., Wigand M.C., Brouillard R. (1992).** Two very distinct types
41 of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. Tetrahedron letters, 33(36):
42 5227-5230.
- 43

- 1 **Deby-Dupont G., Deby C., Lamy M. (2002).** Données actuelles sur la toxicité de
2 l'oxygène. *R é a n i m a t i o n*, 11(1): 28-39.
- 3
- 4 **Dekanski D., Janićijević-Hudomal S., Tadić V., Marković G., Arsić I., Mitrović D.M.**
5 **(2009).** Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *Journal*
6 *of the Serbian Chemical Society*, 74(4): 367-377.
- 7
- 8 **Delimi A., Taibi F., Fissah A., Gherib S., Bouhkari M., Cheffrou A. (2013).** Bio-activité
9 des huiles essentielles de l'Armoise blanche *Artemessia herba alba*: effet sur la reproduction
10 et la mortalité des adultes d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella*
11 (Lepidoptera). *Afrique Science: Revue Internationale des Sciences et Technologie*, 9(3): 82-
12 90.
- 13
- 14 **Delimi A., Taibi F., Bouchelaghem S., Boumendjel M.E., Hennouni-Siakhène N.,**
15 **Cheffrou A. (2017).** Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of
16 *Artemisia herba alba* (Asteraceae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae).
17 *International Journal of Biosciences*, 10(2): 130-137.
- 18
- 19 **Delobel A., Tran M. (1993).** Les Coléoptères des denrées alimentaires entreposées dans les
20 régions chaudes. *Faune Tropicale XXXII*. ORSTOM/ CTA Eds, Paris. 424p.
- 21
- 22 **De Nino A., Lombardo N., Perri E., Procopio A., Raffaelli A., Sindona G. (1997).** Direct
23 identification of phenolic glucosides from olive leaf extracts by atmospheric pressure
24 ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 32(5): 533-541.
- 25
- 26 **Di Ferdinando M., Brunetti C., Fini A., Tattini M. (2012).** Flavonoids as Antioxidants in
27 Plants under Abiotic Stresses. In : Ahmad P., Prasad M.N.V (Eds). *Abiotic Stress Responses*
28 *in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*, Springer Science+Business Media,
29 LLC 159-179. XV.
- 30
- 31 **Di Ferdinando, M., Brunetti, C., Agati, G., Tattini, M. (2014).** Multiple functions of
32 polyphenols in plants inhabiting unfavorable Mediterranean areas. *Environmental and*
33 *Experimental Botany*, 103: 107-116.
- 34
- 35 **Diouf E.H.G., Diop M., Sène A., Samb A., Gueye S.(2016).** Comparison of the Insecticidal
36 Activities of Three Plants against Two Devastating Insects: *Callosobruchus maculatus* and
37 *Sitophilus zeamais*. *Open Access Library Journal*, 3(12): 1-13.
- 38
- 39 **Djenane D., Yangüela J., Derriche F., Bouarab L., Roncales P. (2012).** Utilisation des
40 composés de feuilles d'olivier comme agents antimicrobiens ; application pour la
41 conservation de la viande fraîche de dinde. *Nature et Technologie*, (07): 53-61.
- 42
- 43

- 1 **Duh, P. D., Yeh, D. B., Yen, G. C. (1992).** Extraction and identification of an antioxidative
2 component from peanut hulls. J. Am. Oil Chem. SOC,69, 814-818.
- 3
- 4 **Duh P.D., Tu Y.Y., Yen G.C. (1999).** Antioxidant activity of water extract of Harnng Jyur
5 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). LWT-Food Science and Technology, 32(5): 269-277.
- 6
- 7 **Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.M., Nabavi S.F. Eslami B. et Ehsanifar S. (2009).**
8 Antioxidant activity of *Hyoscyamus squarrosus* fruits. Pharmacologyonline, 2: 644-650.
- 9
- 10 **Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.M., Nabavi S.F., Eslami B. (2010).** Antioxidant activity of
11 the bulb and aerial parts of *Ornithogalum sintenisii* L. (*Liliaceae*) at flowering stage. Tropical
12 Journal of Pharmaceutical Research, 9 (2): 141-148.
- 13
- 14 **Ehrlich P.R., Raven P.H. (1964).** Butterflies and plants: A study in coevolution. Evolution,
15 18 (4): 586-608.
- 16
- 17 **El Ouar I., Aribi N., Soltani-Mazouni N. (2010).** Dosage des ecdystéroïdes chez *Ephesia*
18 *kuehniella*. O. Himmi (Ed.). Actes de la CIFE VI, Travaux de l'Institut Scientifique, Série
19 Zoologie, Rabat, (47), Tome I, 137-140.
- 20
- 21 **El Idrissi M., Elhourri M., Amechrouq A., Boughdad A. (2014).** Etude de l'activité
22 insecticide de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) sur
23 *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) [Study of the insecticidal activity of the
24 essential oil of *Dysphania ambrosioides* L. (*Chenopodiaceae*) on *Sitophilus oryzae*
25 (Coleoptera: Curculionidae)]. J. Mater. Environ. Sci. 5 (4) : 989-994.
- 26
- 27 **Emamjomeh L., Imani S., Talebi K., Moharramipour S., Larijani K. (2014).** Chemical
28 composition and insecticidal activity of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss (*Lamiaceae*)
29 against *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera : *Pyrallidae*). European Journal of Experimental
30 Biology, 4(3): 253-257.
- 31
- 32 **Fahmi F., Tahrouch S., Hatimi A. (2013).** Geoclimatic influences on flavonoids contents
33 of the leaves of the argan treeInfluences géoclimatiques sur la composition en flavonoïdes des
34 feuilles de l'arganier *Argania spinosa*. Journal of Materials and Environmental Science, 4(6):
35 881-886.
- 36
- 37 **Fares R., Bazzi S., Baydoun S.E., Abdel-Massih R.M. (2011).** The antioxidant and anti-
38 proliferative activity of the Lebanese *Olea europaea* extract. Plant Foods for Human
39 Nutrition, 66(1): 58-63.
- 40
- 41 **Farhat F. (2015).** Fonction mitochondriale et espèces réactives dérivées de l'oxygène: effets
42 du genre et de l'entraînement en endurance chez le rat Wistar et l'anguille européenne. Thèse
43 de doctorat, Biologie cellulaire. Université Bretagne occidentale - Brest, France. 137p.
- 44

- 1 **Favier A. (2003).** Le stress oxydant : Int é r ê t conceptuel et exp é r i m e n t a l d a n s l a
- 2 c o m p r é h e n s i o n d e s m é c a n i s m e s d e s m a l a d i e s e t p o t e n t i e l t h é r a p e u t i q u e . L ' a c t u a l i t é
- 3 c h i m i q u e , n o v e m b r e - d é c e m b r e 108-115.
- 4
- 5 **Feeny P. (1976).** Plant apparency and chemical defense. In: Wallace, J.W., Mansell, R.L.
- 6 (Eds.), Biochemical Interactions between Plants and Insects. Recent Advances in
- 7 Phytochemistry, Plenum, NY. 10: 1–40p.
- 8
- 9 **Fegeros K., Zervas G., Apso kardos F., Vastardis J., Apostolaki E. (1995).** Nutritive
- 10 evaluation of ammonia treated olive tree leaves for lactating sheep. Small Ruminant Research,
- 11 17 : 9-15.
- 12
- 13 **Fernando C.D., Soysa P. (2014).** Total phenolic, flavonoid contents, in-vitro antioxidant
- 14 activities and hepatoprotective effect of aqueous leaf extract of *Atalantia ceylanica*. BMC
- 15 Complementary and Alternative Medicine, 14(1): 395- 402.
- 16
- 17 **Ferreira I.C.F.R., Barros L., Soares M.E., Bastos M.L., Pereira J.A. (2007).** Antioxidant
- 18 activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper
- 19 formulations. Food Chemistry, 103(1): 188-195.
- 20
- 21 **Feyereisen R., Durst F. (1978).** Ecdysterone biosynthesis : A Microsomal Cytochrome-P-
- 22 450-Linked Ecdysone 20-Monooxygenase from Tissues of the African Migratory Locust.
- 23 European Journal of Biochemistry. 88(1): 37-47.
- 24
- 25 **Franco D., Sineiro J., Rubilar M., Sánchez M., Jerez M. Pinelo M., Costoya N., Núñez**
- 26 **M.J. (2008).** Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power.
- 27 Electronic Journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry, 7(8): 3210-3216.
- 28
- 29 **Frankel E.N., Huang S.W., Kanner J., German J.B. (1994).** Interfacial phenomena in the
- 30 evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. Journal of agricultural and food
- 31 chemistry, 42(5): 1054-1059.
- 32
- 33 **Frankel E.N., Meyer A.S. (2000).** The problems of using one - dimensional methods to
- 34 evaluate multifunctional food and biological antioxidants. Journal of the Science of Food and
- 35 Agriculture, 80(13): 1925-1941.
- 36
- 37 **Gaceb-Terrak R. (2010).** Contribution à la connaissance des interactions palmier dattier
- 38 (*Phoenix dactylifera* L.)-agent causal du bayoud (*Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*) par
- 39 analyse phytochimiques des lipides et des phénylpropanoïdes. Thèse de Doctorat d'État,
- 40 spécialité Biologie végétale, option phytochimie-phytopathologie. Université des Sciences et
- 41 de la Technologie Houari Boumediene (USTHB), Alger. 198p.
- 42
- 43

- 1 **Gallet C., Pellissier F. (2002).** Interactions all éopathiques en milieu forestier. La v é g é t a t i o n
2 foresti è r e : g e s t i o n , e n j e u e t é v o l u t i o n . R e v u e F o r e s t i è r e F r a n ç a i s e , 5 4 (6) : 5 6 7 - 5 7 6
3
- 4 **Gangwar M., Gautam M.K., Sharma A.K., Tripathi Y.B., Goel R.K., Nath G. (2014).**
5 Antioxidant capacity and radical scavenging effect of polyphenol rich *Mallotus philippenensis*
6 fruit extract on human erythrocytes: an *in vitro* study. The Scientific World Journal, 1:1-9.
7
- 8 **Garait B. (2006).** Le stress oxydant induit par voie m étabolique (r é g i m e s a l i m e n t a i r e s) o u p a r
9 voie g a z e u s e (h y p e r o x i e) e t e f f e t d e l a G l i S O D i n ® . T h è s e d e d o c t o r a t , d i s c i p l i n e : B i o l o g i e
10 Cellulaire u n i v e r s i t é J o s e p h F o u r n i e r , G r e n o b l e I , F r a n c e . 1 8 9 p .
11
- 12 **Garcia-Gomez A., Roig A., Bernal M.P. (2003).** Composting of the solid fraction of olive
13 mill wastewater with olive leaves: organic matter degradation and biological activity.
14 Bioresource Technology, 86: 59-64.
15
- 16 **Ghedira K. (2005).** Les flavono ïdes: structure, propri é t é s b i o l o g i q u e s , r ô l e p r o p h y l a c t i q u e e t
17 e m p l o i s e n t h é r a p e u t i q u e . P h y t o t h é r a p i e , 3 (4) : 1 6 2 - 1 6 9 .
18
- 19 **Ghedira K. (2008).** L'olivier. Phytothérapie. 6, 83-89.
20
- 21 **Gilbert L.I., Song Q., Rybczynski R. (1997).** Control of ecdysteroidogenesis: Activation
22 and inhibition of prothoracic gland activity. Invertebrate Neuroscience, 3(2-3): 205-216.
23
- 24 **Golawska S., Kapusta I., Lukasik I., Wojcicka A. (2008).** Effect of phenolics on the pea
25 aphid, *Acyrtosiphon pisum* [Harris] population on *Pisum sativum* L.
26 [Fabaceae]. Pestycydy/Pesticides, (3-4): 71-77.
27
- 28 **Goldsmith C.D., Vuong Q.V., Sadeqzadeh E., Stathopoulos C. E., Roach P.D., Scarlett
29 C.J. (2015).** Phytochemical properties and anti-proliferative activity of *Olea europaea* L. leaf
30 extracts against pancreatic cancer cells. Molecules, 20(7): 12992-13004.
31
- 32 **Goldsmith C.D., Bond D.R., Jankowski H., Weidenhofer J., Stathopoulos C. E. , Roach
33 P. D., Scarlett C.J. (2018).** The Olive Biophenols Oleuropein and Hydroxytyrosol
34 Selectively Reduce Proliferation, Influence the Cell Cycle, and Induce Apoptosis in
35 Pancreatic Cancer Cells. International Journal of Molecular Sciences, 19: 1-17.
36
- 37 **Gordon M.H. (1990).** The mechanism of the antioxidant action *in vitro*. Chapitre 1. In:
38 HUDSON, B. J. F. (Ed.), Food Antioxidants. London: Elsevier Applied Science. 1 - 18 p.
39
- 40 **Goudable J., Favier A. (1997).** Radicaux libres oxyg é n é s e t a n t i o x y d a n t s . N u t r i t i o n C l i n i q u e
41 e t M é t a b o l i s m e , 1 1 (2) : 1 1 5 - 1 2 0 .
42
- 43 **Green P.S., Wickens G.E. (1989).** The *olea europaea* complex. The Davis and Hedge
44 Festschrift, ed. K Edimburg University press. 287-299p.

- 1 **Green P.S. (2002).** A revision of *Olea* L. (Oleaceae). Kew Bulletin, 57: 91-140.
- 2
- 3 **Gul M.Z., Bhakshu L.M., Ahmad F., Kondapi A.K., Qureshi I.A., Ghazi I.A. (2011).**
- 4 Evaluation of *Abelmoschus moschatus* extracts for antioxidant, free radical scavenging,
- 5 antimicrobial and antiproliferative activities using *in vitro* assays. BMC Complementary and
- 6 Alternative Medicine, 11(1): 64-75.
- 7
- 8 **Guignard J. L. (2000).** Biochimie v é g é t a l e . 2 ^è m e Ed Dunod. Paris. 274p.
- 9
- 10 **Guillouty A. (2016).** Plantes m é d i c i n a l e s e t a n t i o x y d a n t s . Th è s e d e d o c t o r a t e n P h a r m a c i e .
- 11 Universit é III Paul Sabatier Toulouse, France. 94 p.
- 12
- 13 **Gupta D. (2015).** Methods for determination of antioxidant capacity: a review. International
- 14 Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 6(2): 546-566.
- 15
- 16 **Gutteridge, J. M. (1994).** Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant
- 17 protection. Chemico-Biological Interactions, 91(2-3): 133-140.
- 18
- 19 **Haddouchi F., Chaouche T.M., Ksouri R., Medini F., Sekkal F.Z., Benmansour A.**
- 20 **(2014).** Antioxidant activity profiling by spectrophotometric methods of aqueous methanolic
- 21 extracts of *Helichrysum stoechas* susp. *rupestre* and *Phagnalon saxatile* subsp. *saxatile*.
- 22 Chinese Journal of Natural Medicines, 12 (6): 415-422.
- 23
- 24 **Hadj Salem J. (2009).** Extraction, identification, caract é r i s a t i o n d e s a c t i v i t é s b i o l o g i q u e s d e
- 25 flavono ï d e s d e *Nitraria retusa* e t s y n t h è s e d é r i v é s a c y l é s d e c e s m o l é c u l e s p a r v o i e
- 26 enzymatique. Doctorat de l'Institut national polytechnique de Lorraine. France. 251 p.
- 27
- 28 **Hagerman A.E., Butler L.G. (1978).** Protein precipitation method for the quantitative
- 29 determination of tannins. Journal of Agricultural and Food chemistry, 26(4): 809-812.
- 30
- 31 **Hagerman A.E., Butler L.G. (1989).** Choosing appropriate methods and standards for
- 32 assaying tannin. Journal of Chemical Ecology, 15 (6):1795-1809
- 33
- 34 **Halbwirth H. (2010).** The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation
- 35 patterns in the flavonoid pathway. International Journal of Molecular Sciences, 11:595–621.
- 36
- 37 **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P. (2007).** Le stress
- 38 oxydant. Revue m é d i c a l e d e L i è g e , 62(10): 628-38.
- 39
- 40 **Hamdouch A., Asdadi A., Chebli B., Idrissi Hassani L.M. (2018).** Phytochemical
- 41 screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Vitex agnus castus* L. (*Lamiaceae*)
- 42 from South-East of Morocco. Arabian Journal of Medicinal & Aromatic Plants, 4(1): 9-18.
- 43

- 1 **Hami, M., Ta bi, F. Smagge G., Soltani-Mazouni,N. (2005).** Comparative toxicity of three
2 ecdysone agonist insecticides agonist the Mediterranean flour moth. Comm. Appl. Biol. Sci,
3 Ghent University, 70 (4) :767-773.
4
- 5 **Harchaoui-Ouafi M.S. (2007).** Contribution à l' étude biochimique du palmier dattier
6 (*Phoenix dactylifera* L.). Analyse des polyphénols des folioles de cultivars dans un but
7 chimiotaxinomique. Thèse de doctorat en Sciences de la Nature, spécialité: Biologie végétale.
8 Universités Sciences et de la Technologie Houari Boumediene d'Alger. (USTHB). 125p.
9
- 10 **Harborne J.B. (1998).** Phytochemical Methods, A guide to modern techniques of plant
11 analysis. 3^{ème} édition. London ; New York : Chapman and Hall. 295p.
12
- 13 **Hayes J.E., Allen P., Brunton N., O'grady M.N., Kerry J.P. (2011).** Phenolic composition
14 and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf
15 extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. Food Chemistry, 126(3): 948-955.
16
- 17 **Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004).** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et
18 potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. Phytothérapie, 2(1): 3-6.
19
- 20 **Hopkins W.G. (2003).** Physiologie végétale. 2^{ème} Ed De Boeck. 514p.
21
- 22 **Idrissi Hassani M. (1985).** Etude de la variabilité flavonique chez deux conifères
23 méditerranéennes : Le pin maritime *Pinus Pinaster* Ait. et le Genévrier *thurifère Juniperus*
24 *thurifera* L. Thèse Doctorat 3^e cycle, Université Claude Bernard - Lyon I, Villeurbanne. 171p.
25
- 26 **Idrissi Hassani M., Hermas J. (2008).** Effects of *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*)
27 feeding on the digestive track of the migratory locust *Schistocerca gregaria* Forsk.
28 (Orthoptera, Acrididae). Zoology baetica, 19: 71-84.
29
- 30 **Ignat I., Volf I., Popa V.I. (2011).** A critical review of methods for characterization of
31 polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126(4):1821 – 1835.
32
- 33 **Iwashina T. (2000).** The structure and distribution of the flavonoids in plants. Journal of
34 Plant Research, 113: 287-299.
35
- 36 **Irondi A.E., Anokam K.K., Chukwuma P.C. (2013).** Phenological variation in the
37 antioxidant properties and α -amylase inhibitory of *Tetrapleura tetraptera* Pod. International
38 Journal of Pharmaceutical Sciences and Drugs Research, 5(3): 108-112
39
- 40 **Jan S., Khan M.R., Rashid U., Bokhari, J. (2013).** Assessment of antioxidant potential,
41 total phenolics and flavonoids of different solvent fractions of *Monothea buxifolia*
42 fruit. Osong public health and research perspectives, 4(5): 246-254.
43

- 1 **Jay M., Gonnet J.F., Wollenweber E., Voirin B. (1975).** Sur l'analyse qualitative des
2 aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. *Phytochemistry*, 14(7): 1605-
3 1612.
- 4
- 5 **Jay M., Reynaud J., Raymond O., Grossi C. (1996).** Les composés phénoliques et la
6 caractérisation des niveaux taxonomiques inférieurs du monde végétal. *Acta Botanica Gallica*.
7 143 (6) : 481-491.
- 8
- 9 **Jayaprakasha G.H., Singh R.P., Sakariah K.K. (2001).** Antioxidant activity of grape seed
10 (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. *Food chemistry*, 73(3): 285-290.
- 11
- 12 **Jayaprakasha G.K., Selvi T., Sakariah K.K. (2003).** Antibacterial and antioxidant activities
13 of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food research international*, 36(2): 117-122.
- 14
- 15 **Johnson J.A., Valero K.A., Hannel M.M. (1997).** Effect of low temperature storage on
16 survival and reproduction of Indianmeal moth (Lepidoptera: *Pyralidae*). *Crop*
17 *Protection*, 16(6): 519-523.
- 18
- 19 **Johnson F., Seri-Kouassi B., Aboua L. R. N., Foua-Bi K. (2006).** Utilisation de poudres et
20 d'extraits totaux issus de plantes locales des genres *Ocimum sp.* Et *Mentha sp.* Comme bio-
21 pesticides dans la lutte contre *Callosobruchus maculatus* FAB. *Agronomie Africaine* 18 (3) :
22 221-233
- 23
- 24 **Kareem Z.M. (2012).** Antioxidant activity of flavonoid extract from *Olea europaea* L.
25 leaves. *Journal of Thi-Qar Science*, 3(3): 67-75.
- 26
- 27 **Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (2006).** Screening of 70 medicinal plant
28 extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food chemistry*, 94(4): 550-557.
- 29
- 30 **Kchaou W., Abbes F., Blecker C., Attia H., Besbes S. (2013).** Effects of extraction solvents
31 on phenolic contents and antioxidant activities of Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera*
32 L.). *Industrial Crops and Products*, 45: 262-269.
- 33
- 34 **Kellouche A., Soltani N. (2004).** Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile
35 essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* (F.). *International Journal of*
36 *Tropical Insect Science*, 24(2): 184-191.
- 37
- 38 **Kheirkhah M., Ghasemi V., Yazdi A.K., Rahban S. (2015).** Chemical composition and
39 insecticidal activity of essential oil from *Ziziphora clinopodioides* Lam. used against the
40 Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *Journal of plant protection research*
41 55(3): 260-265.
- 42

- 1 **Khlif I., Jellali K., Michel T., Halabalaki M., Skaltsounis A.L., Allouche N. (2015).**
2 Characteristics, phytochemical analysis and biological activities of extracts from Tunisian
3 Chetoui *Olea europaea* Variety. Journal of Chemistry, 2015: 1-11.
4
- 5 **Konno K., Hirayama C., Yasui H., Nakamura M. (1999).** Enzymatic activation of
6 oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. Proceedings of
7 the National Academy of Sciences, 96(16): 9159-9164.
8
- 9 **Koudounas K., Banilas G., Michaelidis Ch., Demoliou C., Rigas S., Hatzopoulos P.**
10 **(2015).** A defense-related *Olea europaea* β -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein
11 into a potent protein cross-linking agent. Journal of Experimental Botany, 66 (7): 2093- 2106.
12
- 13 **Kozlova T., Thummel C.S. (2000).** Steroid Regulation of Postembryonic Development and
14 Reproduction in Drosophila. Trends in Endocrinology & Metabolism, 11(7): 276-280.
15
- 16 **Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance
17 sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en
18 Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat,
19 discipline : Écologie et Chimie des Substances Naturelles. Museum National d'Histoire
20 Naturelle-MNHN, Paris. 343p.
21
- 22 **Kubola J., Siriamornpun S. (2008).** Phenolic contents and antioxidant activities of bitter
23 gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. Food
24 chemistry, 110(4): 881-890.
25
- 26 **Kumar G., Kokati-Karthik L., Bhaskara-Rao K.V. (2013).** Phytochemical composition
27 and *in vitro* antioxidant activity of aqueous extract of *Aerva lanata* (L.) Juss. ex Schult. Stem
28 (Amaranthaceae). Asian Pacific journal of tropical medicine, 6(3): 180-187.
29
- 30 **Kumaran A., Karunakaran R.J. (2007).** *In Vitro* antioxidant activities of methanol extracts
31 of five *Phyllanthus* species from India. LWT, Food Science and Technology, 40 (2): 344-352.
32
- 33 **Laracine C. (1984).** Etude de la variabilité flavonique intraspécifique chez deux conifères. :
34 le Pin sylvestre et le Genévrier commun. Thèse Doctorat 3^e cycle, Université Lyon. 193p.
35
- 36 **Lauranson J. (1989).** Exploration de la diversité biochimique chez les conifères: contribution
37 à l'étude de l'hybridation *Pinus uncinata* Ram. X *Pinus sylvestris* L., et à la connaissance du
38 complexe spécifique *Pinus nigra* Arn. Thèse d'Etat, Université Claude Bernard-Lyon 1. 207p.
39
- 40 **Lebreton Ph., Jay M., Voirin B., Bouchez M. P. (1967).** Sur l'analyse qualitative et
41 quantitative des flavonoïdes. Chimie analytique, 49(7): 375-383
42

- 1 **Lee O.H., Lee B.Y., Lee J., Lee H.B., Son J.Y., Park C.S., Shetty K., Kim Y.C. (2009).**
2 Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant
3 activities. *Bioresource Technology*, 100(23): 6107-6113.
4
- 5 **Lee O.H., Lee B.Y. (2010).** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and
6 combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*, 101(10): 3751-
7 3754.
8
- 9 **Legrand G. (2015).** Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides
10 chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire. Thèse de doctorat en
11 Sciences, discipline : Ingénierie des fonctions biologiques. Université de Lille 1 Sciences et
12 Technologies. 166p.
13
- 14 **Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011).** The molecular basis of working mechanism
15 of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*. 125: 288-306.
16
- 17 **Le Tutour B., Guedon D. (1992).** Antioxidative activities of *Olea europaea* related phenolic
18 compounds. *Phytochemistry*, 31(4): 1173-1178.
19
- 20 **Luis A., Gil N., Amaral M.E., Duarte A. P. (2012).** Antioxidant activities of extracts from
21 *Acacia melanoxylon*, *Acacia dealbata* and *Olea europaea* and alkaloids
22 estimation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(1): 225-231.
23
- 24 **Maestri D.M., Nepote V., Lamarque A.L., Zygodlo J.A. (2006).** Natural products as
25 antioxidants. In: *Phytochemistry: Advances in Research* (edited by Imperato). 37(661): 105-
26 135. Kerala, India.
27
- 28 **Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005).** Les composés phénoliques des
29 végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses
30 polytechniques. 192p.
31
- 32 **Mailoa M.N., Mahendradatta M., Laga A., Djide N. (2013).** Tannin extract of guava leaves
33 (*Psidium guajava* L) variation with concentration organic solvents. *International Journal of*
34 *Scientific & Technology Research*, 2(9): 106-110.
35
- 36 **Maire R. (1933).** Études sur la flore et la végétation du Sahara central. Mémoires de la
37 Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord N° 3, Mission du Hoggar II.166–168.
38
- 39 **Maley J. (1980).** Les changements climatiques de la fin du Tertiaire en Afrique: leur
40 conséquence sur l'apparition du Sahara et de sa végétation. *The Sahara and the Nile*, 63-86.
41
- 42 **Martin S., Andriantsitohaina R. (2002).** Mécanismes de la protection cardiaque et
43 vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Ann. Cardiol. Angéol.* 51 : 304-315.
44

- 1 **Martin-Garcia A.I., Moumen A., Y áñez Ruiz D.R., Molina Alcaide E., (2003).** Chemical
2 composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive
3 leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 107: 61-74.
- 4
- 5 **Mebirouk-Boudechiche L., Cherif M., Boudechiche L., Sammar F. (2014).** Teneurs en
6 compos és primaires et secondaires des feuilles d'arbustes fourragers de la région humide
7 d'Algérie. *Revue de Médecine V é é r i n a i r e*, 165(11-12): 344-352.
- 8
- 9 **Medail F., Quezel P., Besnard G., Khadari B. (2001).** Systematics, ecology and
10 phylogeographic significance of *Olea europaea* L. ssp. *maroccana* (Greuter & Burdet) P.
11 Vargas et al., a relictual olive tree in south-west Morocco. *Botanical Journal of the Linnean*
12 *Society*, 137(3): 249-266.
- 13
- 14 **Mediouni-Ben Jem â J., Tersim N., Boushah E., Taleb-Toudert K., Khouja M.L. (2013).**
15 Fumigant Control of the Mediterranean Flour Moth *Ephestia kuehniella* with the Noble
16 Laurel *Laurus nobilis* essential Oils .*Tunisian Journal of Plant Protection*, 8(1): 33- 44
- 17
- 18 **Meftah H., Boughdad A., Bouchetla A. (2011).** Effet biocide des extraits aqueux bruts de
19 *Capsicum frutescens*, *Melia azedarach* et *Peganum harmala* sur *Euphyllura olivina* Costa
20 (Homoptera, Psyllidae) en verger. *Cahiers Agricultures*, 20(6) : 463-467.
- 21
- 22 **Meftah H., Boughdad A., Bouchetla A. (2014).** Comparaison des param ères
23 biologiques et démographiques d'*Euphyllura olivina* Costa (Homoptera, Psyllidae) sur quatre
24 variétés d'olivier. *Journal Officiel Du Conseil Ol école International OLIVAE I*, (120): 3-17.
- 25
- 26 **Meric K. (2005).** Etude sur les compos és polyph énoles en relation avec l'alimentation de
27 la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.). Th èse de doctorat
28 en sciences foresti ères. Université Laval. Québec. 176p.
- 29
- 30 **Mestar N.G., Boudiaf M.N., Lahcene S., Abbaci H., Aiche G.I., Metna B., Saadoun N.S.,**
31 **Taibi F., Houali K. (2018).** Bio-insecticidal effects of Oleaster leaves aqueous extracts
32 against Psylla larvae (*Euphyllura olivina* (Costa)), a primary pest of *Olea europaea* L.
33 *Cellular and Molecular Biology*, 64 (15).
- 34
- 35 **Micol V., Caturla N., Pérez-Fons L., Más V., Pérez L., Estepa A. (2005).** The olive leaf
36 extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV).
37 *Antiviral Research*, 66(2-3): 129-136.
- 38
- 39 **Mierziak J., Kostyn K., Kulma A. (2014).** Flavonoids as important molecules of plant
40 interactions with the environment. *Molecules*, 19(10): 16240-16265.
- 41
- 42 **Mkaouar S., Krichen F., Bahloul N., Allaf K., Kechaou N. (2018).** Enhancement of
43 Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract
44 by Instant Controlled Pressure Drop. *Food and Bioprocess Technology*, 1-8.

- 1 **NOAA. (2013).** National Oceanic and Atmospheric Administration.
- 2
- 3 **Mohammed H.H. (2013).** Repellency of ethalonic extract of some indigenous plants against
- 4 *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Agriculture and Veterinary
- 5 Science, 2(6): 27-31.
- 6
- 7 **Mohammedi Z., Atik F. (2011).** Impact of solvent extraction type on total polyphenols
- 8 content and biological activity from *Tamarix aphylla* (L.) karst. International Journal of
- 9 Pharmacology and Biological Sciences, 2 (1): 609-615.
- 10
- 11 **Monod T. (1957).** Les grandes divisions chorologiques de l'Afrique. CCTA/CSA, Publ. (24).
- 12 Londres. 147 p.
- 13
- 14 **Moreno J., Barry P., Jimenez R. (1994).** Morphological changes on the egg surface of
- 15 *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) after parasitization by *Phanerotoma*
- 16 (*Phanerotoma*) *ocularis* Kohl (Hymenoptera: Braconidae). Journal Applied Entomology And
- 17 Zoology, 29(2): 282-284.
- 18
- 19 **Morichau-Beauchant G., Brisou J. (1962).** Le rôle d'un lépidoptère en allergie respiratoire
- 20 (*Éphestia kuhniella* Zell). Revue Française d'Allergie, 2(2): 84-91.
- 21
- 22 **Moualek I., Iratni Aiche G., Mestar Guechaoui N., Lahcene S., Houali K. (2016).**
- 23 Antioxidant and anti-inflammatory activities of Arbutus unedo aqueous extract. Asian Pacific
- 24 Journal of Tropical Biomedicine, 6(11): 937–944.
- 25
- 26 **Nabavi S.M., Ebrahimzadeh M.A., Nabavi S.F., Fazelian M., Eslami B. (2009).** In vitro
- 27 antioxidant and free radical scavenging activity of *Diospyros lotus* and *Pyrus boissieriana*
- 28 growing in Iran. Pharmacognosy magazine, 5(18): 122 -126.
- 29
- 30 **Nashwa, Morsy F.S., Abdel-aziz M.E. (2014).** Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf
- 31 extract as antioxidant and anticancer agents Journal of Agroalimentary Processes and
- 32 Technologies, 20(1): 46-53
- 33
- 34 **Nayak M.K., Collins P.J., Kopittke R.A. (2003).** Residual toxicities and persistence of
- 35 organophosphorus insecticides mixed with carbaryl as structural treatments against three
- 36 liposcelidid psocid species (*Psocoptera: Liposcelididae*) infesting stored grain. Journal of
- 37 Stored Products Research, 39(4): 343-353
- 38
- 39 **Nefzaoui A. (1995).** Feeding value of Mediterranean ruminant feed resources. Advanced
- 40 course. Syria 12-23 March.
- 41
- 42 **Ndomo A.F., Tapondjou A.L., Tendonkeng F., Tchouanguép F.M. (2009).** Evaluation des
- 43 propriétés insecticides des feuilles de *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) contre les adultes
- 44 d'*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera ; Bruchidae). Tropicultura 27(3): 137-143

- 1 **Orak H.H., Isbilir S.S., Yagar H. (2012).** Determination of antioxidant properties of
2 lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars. Food Science and
3 Biotechnology, 21(4): 1065-1074.
- 4
- 5 **Ortega-García F., Peragón J. (2010).** HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and
6 tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. Journal of the
7 Science of Food and Agriculture, 90(13): 2295-2300.
- 8
- 9 **Ouguas Y., Hilal A., Elhadram I. (2010).** Effet biocide des extraits phénoliques oléocoles
10 sur les adultes du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* costa (Homoptera: Psyllidae) sur deux
11 variétés d'oliviers Menara et Arbequine au Maroc. Revue Ezzaitouna, 11(1): 1-15.
- 12
- 13 **Ould El Hadj M.D., Tankari Dan-Badjo A., Halouane F., Doumandji S. (2006).** Toxicité
14 comparée des extraits de trois plantes acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les
15 adultes de *Schistocerca gregaria* Forsk., 1775 (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae). Secheresse,
16 17(3) :407-414.
- 17
- 18 **Oyaizu M. (1986).** Studies on products of browning reaction. Antioxidative Activities of
19 Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. The Japanese journal of nutrition
20 and dietetics, 44(6): 307-315.
- 21
- 22 **Ozenda P. (2004).** Flore et végétation du Sahara. 3ème ed. CNRS, Paris 662 pages.
- 23
- 24 **Palici I.F. (2016).** Valorisation des activités biologiques de certaines espèces végétales
25 sahariennes nord-africaines. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques, Biotechnologies
26 Agroalimentaires Université de Bordeaux. France. 150p.
- 27
- 28 **Pandir D., Baş H. (2016).** Compositional analysis and toxicity of four plant essential oils to
29 different stages of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera:
30 Pyralidae). Türkiye Entomoloji Dergisi, 40(2): 185-195.
- 31
- 32 **Park I.K., Lee S.G., Choi D.H., Park J.D., Ahn Y.J. (2003).** Insecticidal activities of
33 constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against
34 *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). Journal of Stored Products
35 Research, 39(4): 375-384.
- 36
- 37 **Perrinjaquet-Moccetti T., Busjahn A., Schmidlin C., Schmidt A., Bradl B., Aydogan C.**
38 **(2008).** Food supplementation with an olive (*Olea europaea* L.) leaf extract reduces blood
39 pressure in borderline hypertensive monozygotic twins. Phytotherapy Research, 22(9): 1239-
40 1242.
- 41
- 42 **Pietta P.G. (2000).** Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7): 1035-
43 1042.
- 44

- 1 **Pincemail J., Bonjean K., Cayeux K., Defraigne J.O. (2002).** Mécanismes physiologiques
2 de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4): 233-239.
- 3
- 4 **Pereira A., Ferreira I., Marcelino F., Valentão P., Andrade P., Seabra R., Pereira J.**
5 **(2007).** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv.
6 Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5): 1153-1162.
- 7
- 8 **Prieto P., Pineda M., Aguilar M. (1999).** Spectrophotometric quantitation of antioxidant
9 capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the
10 determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2): 337-341.
- 11
- 12 **Quezã P. (1978).** Analysis of the Flora of Mediterranean and Saharan Africa. *Annals of the*
13 *Missouri Botanical Garden*, 65(2): 479-534p.
- 14
- 15 **Quezã P. (1954).** Contribution à la flore de l'Afrique du Nord. Contribution à la flore du
16 Hoggar. *Bulletin de la société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord*, 45 (1-2) :55-67.
- 17
- 18 **Rafiee Z., Jafari S.M., Alami M., Khomeiri M. (2011).** Microwave-assisted extraction of
19 phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *Journal of Animal &*
20 *Plant Sciences*, 21(4): 738-745.
- 21
- 22 **Raven P., Evert R.F., Eichhorn S.E. (2007).** *Biologie végétale*. 2ème édition, De Boeck
23 Supérieur. 733 p.
- 24
- 25 **Regnault-Roger C., Ribodeau M., Hamraoui A., Bateau I., Blanchard P., Gil-Munoz**
26 **M.I., Barberan F.T. (2004).** Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and
27 investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored*
28 *Products Research*, 40(4): 395-408.
- 29
- 30 **Ribéreau-Gayon P. (1968).** *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunod Paris,
31 254 p.
- 32
- 33 **Rolland Y. (2004).** Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux, Corps gras, Lipides, 11(6):
34 419-424.
- 35
- 36 **Ross J.A., Kasum C.M. (2002).** Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and
37 safety. *Annual Review of Nutrition*, 22(1): 19-34.
- 38
- 39 **Rubio de Casas R., Besnard, G., Schönswetter P., Balaguer L., Vargas P. (2006).**
40 Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea*
41 L. *Theoretical and Applied Genetics*, 113(4): 575-583.
- 42

- 1 **Ruch R.J., Cheng S.J., Klaunig J.E. (1989).** Prevention of cytotoxicity and inhibition of
2 intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea.
3 *Carcinogenesis*, 10(6): 1003-1008.
- 4
- 5 **Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. (2002).** Biotransformations of
6 phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2): 147-176.
- 7
- 8 **Schröder R., Hilker M. (2008).** The Relevance of Background Odor in Resource Location
9 by Insects: A Behavioral Approach. *BioScience*, 58 (4) : 308-316.
- 10
- 11 **Saffidine K. (2015).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus*
12 *caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Thèse de doctorat en Sciences Filière: Biologie
13 Spécialité microbiologie. Université Ferhat Abbas 1, Sétif. 132 p.
- 14
- 15 **Saiah H., Allem R., El Kebir F.Z. (2016).** Antioxidant and antibacterial activities of six
16 Algerian medicinal plants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical*
17 *Sciences*, 8(1): 367-74.
- 18
- 19 **Salunke B.K., Kotkar H.M., Mendki P.S., Upasani S.M., Maheshwari V.L. (2005).**
20 Efficacy of flavonoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.)(Coleoptera: Bruchidae), a
21 post-harvest pest of grain legumes. *Crop Protection*, 24(10): 888-893.
- 22
- 23 **Santos S.A., Pinto P.C., Silvestre A.J., Neto C.P. (2010).** Chemical composition and
24 antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and*
25 *Products*, 31(3): 521-526.
- 26
- 27 **Savarese T.M., Strohsnitter W.C., Low H.P., Liu Q., Baik I., Okulicz W., Chelmow D.P.,**
28 **Lagiou P., Quesenberry P.J., Noller K.L., Hsieh C.C. (2007).** Correlation of umbilical cord
29 blood hormones and growth factors with stem cell potential: implications for the prenatal
30 origin of breast cancer hypothesis. *Breast Cancer Research*, 9(3), R29.
- 31
- 32 **Scherer R., Godoy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-
33 picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3): 654-658.
- 34
- 35 **Sedlacek J.D., Weston P.A., Barney R.J. (1996).** Lepidoptera and Psocoptera. In:
36 «Integrated Management of Insects in Stored Products (B. Subramanyam. et D.W. Hagstrum.
37 Eds). Marcel Dekker, Inc., New York. 41–70.
- 38
- 39 **Sereme A., Millogo-Rasolodimby J., Guinko S., Nacro M. (2008).** Propriétés
40 thérapeutiques des plantes à tanins du Burkina Faso. *Pharmacopée et Médecine traditionnelle*
41 *Africaines*, 15 : 41-49.
- 42
- 43

- 1 **Sharififar F., Dehghn-Nudeh G., Mirtajaldini M. (2009).** Major flavonoids with
2 antioxidant activity from *Teucrium polium* L. Food Chemistry, 112(4): 885-888.
3
- 4 **Sharma O.P., Bhat T.K. (2009).** DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry, 113(4):
5 1202-1205.
6
- 7 **Simmonds M.S.J. (2001).** Importance of flavonoids in insect-plant interaction: Feeding and
8 oviposition. Phytochemistry. 56: 245-252.
9
- 10 **Shirley B.W. (1996).** Flavonoid biosynthesis: new functions for old pathway. Plant Science. 1:
11 377-382.
12
- 13 **Shi J., Nawaz H., Pohorly J., Mittal G., Kakuda Y., Jiang Y. (2005).** Extraction of
14 polyphenolics from plant material for functional foods-Engineering and technology. Food
15 reviews international, 21(1): 139-166.
16
- 17 **Singleton V. L., Rossi J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
18 phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3): 144-158.
19
- 20 **Smith S.L., Bollenbacher W.E., Cooper D.Y., Schleyer H., Wielgus J.J., Gilbert L.I.**
21 **(1979).** Ecdysone 20-Monooxygenase: Characterization of an insect cytochrome P-450
22 dependent steroid hydroxylase . Molecular and Cellular Endocrinology, 15(3): 111-133.
23
- 24 **Soltani-Mazouni N., Hami M., Gramdi H. (2012).** Sublethal effects of methoxyfenozide on
25 reproduction of the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. Invertebrate
26 reproduction & development, 56(2): 157-163.
27
- 28 **Sroka Z., Cisowski W. (2003).** Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical
29 activity of some phenolic acids. Food and Chemical Toxicology, 41(6): 753-758.
30
- 31 **Stanković M.S. (2011).** Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant
32 activity of *Marrubium peregrium* L. extracts. Kragujevac Journal of Science, 33: 63-72.
33
- 34 **Suc J.P. (1984).** Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in
35 Europe. Nature, 307(5950): 429 - 432.
36
- 37 **Sümer F., Baş H., Koç M., Durak D., Öztemiz S. (2013).** Insecticidal activity of essential
38 oil of *Prangos ferulacea* (Umbelliferae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)
39 and *Trichogramma embryophagum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Turkish Journal of
40 Agriculture and Forestry, 37(6): 719-725.
41

- 1 **Swevers L., Latrou K. (1999).** The ecdysone agonist tebufenozide (RH-5992) blocks the
2 progression into the ecdysteroid-induced regulatory cascade and arrests silkworm oogenesis at
3 mid-vitellogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29 (11) : 955-963.
- 4
- 5 **Taibi F., Smagghe G., Amrani L. et Soltani-Mazouni N. (2003).** Effect of ecdysone
6 agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comparative Biochemistry*
7 *and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 135(3): 257-267.
- 8
- 9 **Taibi F. (2007).** Etude compar é e du d é veloppement et de la reproduction chez deux ravageurs
10 des denr é es stock é es *Ephestia kuehniella* et *Tenebrio molitor*: Aspect endocrinien en rapport
11 avec l'impact d'un mimétique de l'hormone de mue RH-0345. Th è se de Doctorat en Biologie
12 et Physiologie animale. Université d'Annaba, Algérie. 280 p.
- 13
- 14 **Taibi F., Boumendjel M., Zaafour M., Sekiou O., Khaldi T., Delimi A., Abdessmad S.,**
15 **Rebani H., Chnoug H., Siakhene N., Boumendjel A, Messarah M. (2018).** Conservation
16 of stored food using plant's extracts. Effect of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil on
17 the reproduction and development of flour moth (*Ephestia kuehniella*). *Cellular and*
18 *Molecular Biology* 64(10): 05-11.
- 19
- 20 **Tattini M., Remorini D., Pinelli P., Agati G., Saracini E., Traversi M.L., Massai R.**
21 **(2006).** Morpho- anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root
22 zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus*
23 *communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist*, 170(4): 779-794.
- 24
- 25 **Teixeira da Silva J.A. (2004).** Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal*
26 *of biotechnology*, 3(12): 706-720.
- 27
- 28 **Tepe B., Sokmen M., Akpulat H.A., Sokmen A. (2006).** Screening of the antioxidant
29 potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*, 95(2): 200-204.
- 30
- 31 **Tomar N.S., Sharma M., Agarwal R.M. (2015).** Phytochimic alanalysis of *Jatropha curcas*
32 L.during different seasons and development of wheat (*Triticum aestivum* L) are affected by
33 extracts /leachts of *Jatropha curcas* L. *Physiol Mol Bio Plant* 21(1) : 43-50.
- 34
- 35 **Touaibia M., Chaouch F.Z. (2015).** Propri é t é s antioxydantes et antimicrobiennes des
36 extraits de *Myrtus nivellei* Batt et Trab. Obtenus *in situ* et *in vitro*. *Phytoth é rapie*, 15(1): 16-22.
- 37
- 38 **Trabelsi N., Megdiche W., Ksouri R., Falleh H., Oueslati S., Bourgou S., Hajlaoui H.,**
39 **Abdelly C. (2010).** Solvent effects on phenolic contents and biological activities of the
40 halophyte *Limoniastrum monopetalum* leaves. *Food Sci Tech* 43: 632-639.
- 41
- 42 **Tsimogiannis D., Samiotaki M., Panayotou G., Oreopoulou V. (2007).** Characterization of
43 flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, 12(3): 593-606.

- 1 **Vanetten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E. (1994).** Two Classes of Plant
2 Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoant icipins”. *The Plant Cell*, 1191-1192.
- 3
- 4 **Vercautern J. (1996).** Polyph é nols 96. 18th Internationnal conference on polyphenols. Ed.
5 INRA, Bordeaux, Paris. 31-43.
- 6
- 7 **Visioli F., Galli C. (2002).** Biological properties of olive oil phytochemicals. Critical reviews
8 in food science and nutrition, 42(3): 209-221.
- 9
- 10 **Walker J.E., Saraste, M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982).** Distantly relatad sequences in
11 the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring
12 enzymes and a common nucleotide binding fold. *The Journal of the European Molecular*
13 *Biology Organization*, 1(8): 945-951.
- 14
- 15 **Wickens GE. (1976).** The flora of Jebel Marra (Sudan) and its geographical affinities. *Kew*
16 *Bull. Add. Ser.* 5: 1-368
- 17
- 18 **Williams P.J., Geladi P., Britz T.J., Manley M. (2012).** Investigation of fungal
19 development in maize kernels using NIR hyperspectral imaging and multivariate data analysis.
20 *Journal of Cereal Science*, 55(3): 272–278.
- 21
- 22 **Woodward A., Coppock D.L. (1995).** Role of plant defense in the utilization of native
23 browse in southern Ethiopia. *Agroforestry systems*, 32(2): 147-161.
- 24
- 25 **Xie P.J., Huang L.X., Zhang C.H., Zhang Y.L. (2015).** Phenolic compositions, and
26 antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their
27 structure–activity relationships. *Journal of Functional Foods*, 16: 460-471.
- 28
- 29 **Xu B.J., Chang S.K.C. (2007).** A comparative study on phenolic profiles and antioxidant
30 activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of food science*, 72(2): S159-
31 S166.
- 32
- 33 **Xu J. (2010).** Reproduction behavior of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptea: Pyralidae).
34 Degree of doctor of philosophy in entomology. Massey university Palmerson North New
35 Zealand p 161
- 36
- 37 **Yen G.C., Duh P.D., Tsai H.L. (2002).** Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic
38 acid and gallic acid. *Food Chemistry*, 79(3): 307-313.
- 39
- 40 **Yezli-Touiker S., Soltani-Mazouni N. (2010).** Profil des ecdyst é r o ï l e s durant la
41 m é t a m o r p h o s e e t r a p p o r t a v e c l e c y c l e c u t i c u l a i r e c h e z *Ephestia kuehniella* (Insecta,
42 Lepidoptera, Pyralidae). *Synth è s e : Revue des Sciences et de la Technologie*, (22): 44-50.
- 43

Zeller P.C. (1879). Lepidopterologische Bemerkungen. Entomologische Zeitung
herausgegeben von dem entomologischen vereine zu Stettin, 40: 462-473.
[<http://biodiversitylibrary.org/page/8989278>]

Zouiten N., El Hadrami I. (2001). Le psylle de l'olivier : Etat des connaissances et
perspectives de lutte. Cahiers d'Etudes et de Recherches Francophones/Agricultures, 10(4) :
225-320.

ARTICLE

Original Research

Insecticidal effects of the *Olea europaea* subsp. *laperrinei* extracts on the flour Pyralid *Ephestia kuehniella*

Souad Lahcene¹, Faiza Taibi², Nadjat Mestar¹, Samira Ali Ahmed¹, Mahieddine Boumendjel², Saida Ouafi³, Karim Houali^{1*}

¹ Laboratory of analytic biochemistry research and biotechnology (LABAB). Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biological Sciences and Agronomic Sciences. Mouloud Mammeri University, Tizi-Ouzou, Algeria

² Research Laboratory on the Biochemistry and the Environmental Toxicology. Department of biochemistry. Science faculty. Badji Mokhtar Annaba University. Algeria

³ Research laboratory of arid zones (LRZA). Department of Population and Organism Biology. Faculty of Biologies Sciences. Sciences and Technologies Houari Boumediene University Bab Ezzouar (USTHB) Algeria

Correspondence to: houlitizi@yahoo.fr

Received May 14, 2018; Accepted August 2, 2018; Published August 30, 2018

Doi: <http://dx.doi.org/10.14715/cmb/2018.64.11.2>

Copyright: © 2018 by the C.M.B. Association. All rights reserved.

Abstract: In the present study, the aerial parts of the Laperrine olive (*Olea europaea* subsp. *Laperrinei*) are subjected to acid extraction and the chemical composition of the extracts is determined by HPLC-DAD. The main compounds found in all of extracts are: hydroxytyrosol (30.45%), tyrosol (0.69%), oleuropein (32.76%), ferrulic acid (17.77%), quercetin (31.57%) and hesperetin (6.90%). The extracts obtained from the leafy stems of Laperrine olive tree are tested on the moth *Ephestia kuehniella* flour. Their administration by inhalation of newly exuviated chrysalises extends the duration of nymphalid development and disturbs the exuviated adults reproduction, by reducing the period in which the eggs are being laid. Thus, compared to the control insects, the number of eggs laid by treated females is significantly reduced after the treatment by extracts. Besides, the administration of different extracts of adult butterflies has a premature mortality effect.

Key words: *Olea europaea* subsp. *Laperrinei*; Polyphenols; Bio-insecticides; *Ephestia kuehniella*; HPLC.

Introduction

The Laperrine olive-tree or southern olive tree is under-species of the olive-tree belonging to the Oleaceae's family. According to Besnard et al. (1), this endemic species occurs in sub-arid to arid habitats and is observed in Algeria only in Central Sahara (Ahaggar, Taessa, Abeleheg, Hoggar, Tefedest, Tassili and Mouyedir), essentially in mountainous regions which altitude reaches 2800 m, with low precipitation under 100 mm (2). This olive-tree is now known as an under-species of the complex taxonomic *Olea europaea* (3). The Laperrine olive-tree which real scientific name is *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Batt. and Trab.) is now a taxon close to the Mediterranean rim olive-tree.

This is an important genetic resource for its drought resistance quality which can be used as a rootstock of different olive-tree varieties cultivated in arid regions (2).

Many storage systems rely on the use of synthetic insecticides and fumigants, such as methyl bromide and phosphine to control pests of stored products (4). Chemical pesticides are economical and effective, but have the disadvantage of causing resistance in treated insects and are harmful to the environment and to humans (5, 6). Plants produce many molecules against parasites. One of the research strategies is to study the plant and its extracts in order to identify some compounds that can be used as natural insecticides (7). Many studies

have shown that plant extracts are an alternative method of controlling insect pests of stored commodities because they are a source of bioactive natural compounds (8). These natural insecticides, called plant insecticides, have a great advantage over synthetic compounds because they are rapidly biodegradable (9).

The Laperrine olive-tree was not yet studied to evaluate its potential bio-insecticide activity; the literature lacks the quantitative or qualitative study of its phenolic compounds. Moreover, no evaluation study of insecticidal effect of olive leaves against *Ephestia kuehniella* was found. The present work is a preliminary study, which is a contribution to a better understanding of Laperrine olive tree and gives a way to value this plant as a bio-insecticide. Therefore, our aim in this study is to investigate the polyphenol content of Laperrine olive-tree leaves extract and the insecticidal effects against *Ephestia kuehniella*.

The flour moth *Ephestia kuehniella* Zeller is a food moth which damages are exclusively caused by caterpillars. Its larvae mainly attack stocked food such as flour, cereals grains (rice, corn and wheat), semolina, pastas, and rarely dried fruit such as raisins, figs and apricots. They reduce the quality of product by their presence and cause direct damages in food because of chemicals produced by mandible glands (10).

Materials and Methods

Laperrine olive collection

The leaves and stems of *O. europaea* subsp *laperrinei* were gathered from Ouled Hanghassi in Tamanrasset's region (23°14'50.1"N, 5°29'13.7"E) on May 2015. Identification of the species was carried out according to the keys of the Ozenda flora manual (11). Authentication of the species is confirmed by Mr. Abdellah Salhi, Chief of the National Institute of Forestry Research Tamanrasset (INRF), Algeria. A reference specimen has been deposited at Mouloud Mammeri University (OLE1-2015 Tam, FSBSA / TO). The collected leaved stems are selected and dried in the open air, in the shade and protected from humidity.

Insect material

The moths were brought from Seybousse Mills in Annaba city (North-East of Algeria). The breeding is brought to the laboratory in a sterilizer under optimum development conditions, characterized by a temperature of 27 °C, a relative humidity nearing 70% and darkness (12, 13). The adults are laid down in glass jars with a volume of 1.5 l, 20 cm high and 10 cm diameter, containing flour and covered by a piece of tulle fabric fixed by an elastic band. A piece of cotton soaked with sugared water is laid on each jar in order to activate the growth of the pest insect. A daily follow-up allows to sex and to remove the male and female larvae in Petri dishes containing flour and pleated paper allowing larvae to enter the pupal stage (14). The distinction of the sexes is quite easy at the larval stage, where the male larvae have two brown spots on their posterior part corresponding to the testicles. Their dating is expressed in days after the nymph exuviations (15).

Plant extraction and bio-insecticide evaluation

The dried leaves and stems are grounded in an electro mechanical grinder. The achieved powders undergo an acid hydrolysis following the analytical protocol conceived by Lebreton *et al.* (16) and Jay *et al.* (17).

To two grams of vegetable powder we add 160 ml of 2N hydrochloric acid. The mixture is heated in a water bath at 40 °C. for 40 minutes, with air being blown up every 10 minutes. The aqueous phase is extracted three times with diethyl ether (60 ml - 60 ml and 40 ml).

This extraction makes it possible to collect the aglycones in the ethereal epiphase. The ether extracts are combined for spontaneous evaporation to dryness, under ventilated hood. The dry residue is recovered in 5 ml of methanol and stored at 4 °C.

The residual aqueous phase is taken up for the extraction of the C-glycosides with n-butanol (40 ml n-butanol: 40 ml). The butanol extract is evaporated to dryness, under a ventilated hood. The dry residue is recovered in 5 ml of methanol and stored at 4 °C. The raw extracts resulting from the hydrolysis are represented by the ether layer stemming from the leaves (LE) or from the stems (SE) and from a butanol phase obtained from the leaves (LB) or from the stems (SB). They are tested on the flour moth.

Dosages

Determination of flavones-aglycones content

The ethereal dry extract is recovered by methanol and adjusted in graduated flasks of 10 cm³. The differential dosage of total flavones-aglycones makes the Al⁺⁺ ions chelating properties infer on flavonoids. The height of the differential peak, proportionally to the concentration of flavones-flavonols which are present in the extract is determined by spectrometry on wavelength 430 nm. The total content of flavones-aglycones is expressed in mg of an equivalence quercetin/g of vegetable powder (mg EQ/g) using the following formula, Lebreton *et al.* (16):

$T \text{ flavones-aglycones} = (\Delta A / \epsilon) \times M \times V \times (d/w) = 1.3 \times 10^{-2} \times \Delta A \times V \times (d/w)$, where ΔA is the differential absorbance peak; ϵ is the molar absorption coefficient of quercetin in aluminium chloride (=23000); M is the quercetin molar mass (= 302); V is the volume of flavones-aglycones methanol solution; d is the dilution factor and w is the dry weight of hydrolyzed plant material.

Determination of Anthocyanins content

The water-soluble anthocyanins is dosed by spectrophotometry at anthocyanins maximal wavelength between 500 and 560 nm. According to Lebreton *et al.* (16), the content of total proanthocyanins is expressed in mg of an equivalent procyanidin/g of vegetable powder (mg EPC/g), using the following formula: $T \text{ anthocyanins} = \eta \times (A / \epsilon) \times M \times V \times (d/w) = 5.2 \times 10^{-2} \times A \times V \times (d/w)$. η is correction factor of oxidation yield of pro-anthocyanins into anthocyanins (estimated to 17%); A is the absorbance at the maximum absorption wavelength; ϵ is the molar absorption coefficient of cyanidin (=34 700); M is cyanidin Molar Mass (=306); V is the volume of butanol phase; d is the dilution factor; w is the weight of dry matter of the hydrolysed vegetable material.

Determination of C. Glycosides content

The butanol dry extract is recovered in 10 cm³ of methanol and dosed by spectrophotometry at a wavelength of 340nm. The content in total C-glucosides is expressed in mg equivalent orientin/g of vegetable powder (mg EO/g) with the following formula:

$T \text{ C. glycosides} = (A / \epsilon \times M \times V \times (d/w) = 2.5 \times 10^{-2} \times A \times V \times (d/w)$. A is the absorbance at the maximum absorption wavelength; ϵ is the molar absorption coefficient of orientin (=18850); M is the orientin molar mass (= 448); V is the volume of the methanol solution; d is the dilution factor and w is the dry weight of hydrolyzed plant material.

Chemical composition

Chemical analysis of different extracts is obtained by DAD liquid chromatography (Agilent Serial 1100) under the following conditions: the mobile phase corresponds to acidified water at 0.2% with acetic acid at pH 3.1 and with acetonitrile by linear elution gradient during 30 minutes at 1.5ml/min, starting with 95% of water and with 100% of acetonitrile. The injected volume corresponds to 5µl of extract diluted in methanol. The identification of different compounds is made by comparing

different time standards under the same conditions (18).

Treatment by inhalation

In order to estimate the insecticidal effect of the olive-tree raw extracts, they are administered to chrysalises and to newly exuviated adults by inhalation (saturation of their environment) (14). The different extracts are sprayed on filter paper and deposited into Petri dish or into the insect tubes.

As for the chrysalises, in a Petri dish, the raw extract is sprayed on a pleated paper on which are laid four newly exuviated female pupae immediately after the nymph exuviations which represents the early development of lepidopterous ovaries (13). This administration at the stage of the life cycle is a test for the fertility of females and the percentage of eggs lay. Seven repetitions are carried out for each treatment; the control plates are treated with solubilisation solvent, represented by methanol.

In the case of adults, from their exuviation, a couple is displayed in a tube containing 30 g of flour. The crude extract is sprayed on a pleated paper introduced in the tube. Seven repetitions are handled by treatment, the control boxes are treated with methanol.

The effect of raw extracts on *Ephestia kuehniella* reproduction is assessed based on the following parameters:

- The nymph development duration which corresponds to the time expressed in days, which separates the nymph exuviations from the adult exuviations;
- The pre-oviposition period represented by the number of days separating the adult emergence from the beginning of the egg laying;
- The period of oviposition is estimated by the number of egg laying days;
- The female fertility, which corresponds to the number of eggs, lay during the whole oviposition duration.

Then, ten newly exuviated male and female adults are introduced in a tube of 15 cm length and 3 cm diameter, containing 30 g of flour. The treatment is done by a raw extract atomization of pleated paper which is in the tube. The action is repeated thrice. The control tubes are treated with methanol. The toxicity tests of the various extracts are made on the daily count of the dead treated insects over a period of 21 days, corresponding to a 100% control mortality rate (7). We aim to estimate the insects longevity submitted to the olive-tree raw extracts. The longevity is estimated through the mortality rate of the treated control insects which is calculated by the following formula:

Observed mortality = (Number of dead individuals/ Number of total individuals) x100. The experiment lasts 21 days.

Statistical analysis

The results are expressed under an average form affected by its standard deviation. The t-Student test is used to analyze the level of statistical significance between the series of averages treated by pairs in the case of the conducted dosages.

The influence of the different extracts on the moth reproduction parameters is subject to an ANOVA to a factor. The normality of the data is specified at first by the Pearson test. The statistical analysis is realized with

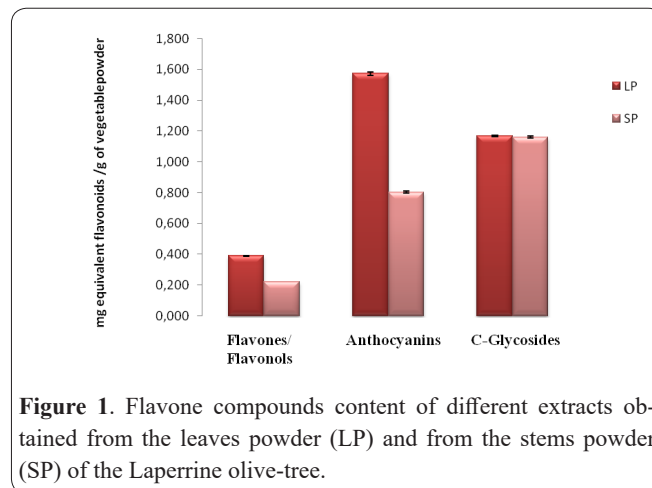


Figure 1. Flavone compounds content of different extracts obtained from the leaves powder (LP) and from the stems powder (SP) of the Laperrine olive-tree.

the software program Statbox 6. In the case of a significant difference, we use the Newman-Keuls test to define the homogeneous groups.

Results

Dosages

Figure 1 recaps the calculation results of phenolic compounds contents extracted from the Laperrine olive-tree leaved stems. The data statistical analysis shows a significant difference ($P < 0.001$), of the flavones-flavonols and anthocyanins absolute content. Indeed, we can notice in the case of leaves powder, an average content of 0.389 ± 0.004 mg equivalent quercetin /g of vegetable powder and 1.573 ± 0.012 mg equivalent procyanidin /g of vegetable powder, whereas in the case of stems powder, we can record 0.21 ± 0.06 mg equivalent quercetin /g of vegetable powder and 0.803 ± 0.006 mg equivalent procyanidin /g of vegetable powder. As for the C-glycosides the Student test enhances a significant difference with an average of 1.167 ± 0.002 mg equivalent orientin/g of vegetable powder for LP (Leaves Powder) and 1.161 ± 0.001 mg equivalent orientin /g of vegetable powder for SP (Stems Powder).

The results of dosages realized in both phases produced by the leaves powder and the stems powder show a very significant difference in favor of the leaves extracts.

Chemical composition

The chemical composition of different extracts is carried out by liquid chromatography. 21 compounds are identified " Table 1". Our results show the presence, in all extracts, of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein specific to *Olea europaea* (19).

Laperrine olive-tree raw extracts effect on *Ephestia kuehniella* reproduction

Raw extracts effect on the nymphal development period

The raw extracts applied at a chrysalis stage of the *Ephestia kuehniella*, all extend the duration of pupal development compared to the control insects, for which we record a value of 7.14 ± 0.24 days.

The applied statistical test brings out a significant effect ($P < 0.001$), we obtain an average of 38.29 ± 0.41 days for LB. The pupae exuviation is done after 14.29

Table 1. Main chemical compounds identified in olive tree *Laperrine* extracts.

Chemical compounds	Ethereal Leaves extract		Ethereal Stems extract		Butanol Leaves extract		Butanol Stems extract	
	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)	Retention time (min)	Area (%)
Hydroxytyrosol	4.838	30.45	4.853	18.78	4.830	5.32	4.850	8.47
Tyrosol	5.898	0.45	-	-	5.852	0.43	5.887	0.69
Caffein	-	-	6.467	0.49	6.453	0.75	4.483	0.71
Aesculein Acid	-	-	-	-	-	-	7.002	1.36
Caffeic Acid	7.062	0.61	-	-	7.046	0.84	-	-
Vanillin	8.673	2.12	8.656	1.06	-	-	-	-
Ferrulic acid	9.257	5.40	9.233	0.95	9.234	6.65	9.239	17.77
P coumarique acid	-	-	-	-	-	-	9.672	2.03
3 hydroxy 4 methoxycinamic Acid	-	-	-	-	9.773	0.79	9.799	0.79
Oleuropein	10.119	4.13	10.198	32.76	10.103	4.86	10.222	13.21
Naringenine 7 oglucoside	-	-	10.456	2.38	-	-	10.490	2.86
3,4,5 trimethoxybenzoic acid	-	-	10.817	4.99	-	-	10.814	4.25
m-anisic acid	-	-	-	-	11.938	1.75	-	-
Luteolin	12.491	1.31	-	-	-	-	-	-
Quercetin	12.865	29.18	12.901	11.43	12.787	22.31	12.866	31.57
cinamic acid	13.897	1.35	-	-	-	-	-	-
Apigenin	-	-	-	-	14.379	3.31	14.367	1.90
Hesperetin	15.028	6.90	15.056	5.63	15.061	2.54	15.006	4.28
Orientin	-	-	-	-	17.729	2.75	17.741	0.49
Vitexin	-	-	-	-	18.192	1.96	18.177	1.34
Isovitexin	-	-	-	-	18.495	1.24	18.468	1.07

- : Absence.

± 0.41 days for SE, 11.00 ± 0.57 days pour LE and 9.57 ± 1.63 days in the case of SB.

Thus, the most interesting insecticide effect seems to be the effect corresponding to the butanol extract from the leaves 'powder for which the pupae exuviation is effective only from the 38th day and to the effect of ethereal extract obtained from the stems powder with a pupae development which lasts till the 14th day "Figure 2".

Laperrine olive-tree raw extracts effect on the pre-oviposition period

The comparative examination of the after-treatment results shows a significant difference ($P < 0.01$) between SB, corresponding to the homogeneous group a, for which the pre-oviposition period is on average of 1.57

± 0.49 days and the control which presents an average value of 1.00 ± 0 days.

In comparison with the control, the treatments left do not present any significant difference "Table 2", as the statistical performed test class them all in the same homogeneous group. Group b which presents an average pre-oviposition period of 1.00 ± 0 days.

Laperrine olive-tree raw extracts effect on the oviposition period

One day after the mating, the *Ephestia kuehniella* control female starts its egg laying which lasts on average 4.29 ± 0.41 days.

Figure 3 shows that when the LB extract is applied, the number of days of the female egg laying diminishes in a significant way ($P < 0.001$); Indeed, the oviposition period is reduced by half with an average value of 2.43 ± 0.49 days, we can count 3.00 ± 0.57 for SB, 3.29 ± 0.41 days for SE and 3.71 ± 0.41 days for LE.

Laperrine olive-tree raw extracts effect on the Ephestia kuehniella female fecundity

The application of raw extracts on the female para-
Table 2. The *Laperrine olive-tree* raw extracts effect on the *Ephestia kuehniella* pre-oviposition period.

	Control	Leaves powder	Stems powder
Ether extract	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
Butanol extract		1.14 ± 0.24	1.57 ± 0.49

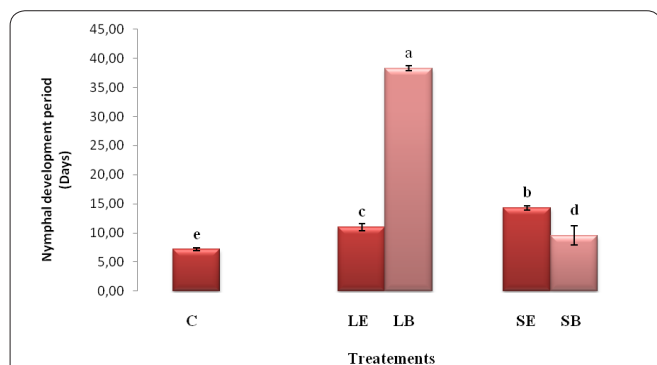


Figure 2. The period of nymphal development related to the applied treatment (LE: Ethereal Leaves extract, LB: Butanol Leaves Extract, SE: Ethereal Stems extract, SB: Butanol Stems extract, C: Control and a, b, c, d, e : Homogeneous groups).

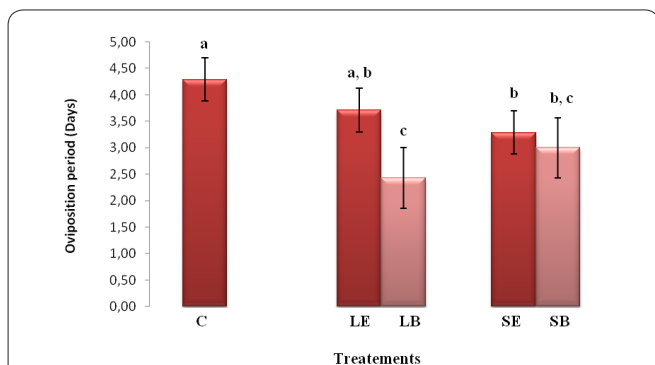


Figure 3. Oviposition period depending on its extracts origin and depending on the applied treatments (LE: Ethereal Leaves extract, LB: Butanol Leaves extract, SE: Ethereal Stems extract, SB: Butanol Stems extract, C: Control and a, b, c: Homogeneous groups).

site reduces on average of 1/4 the number of laid eggs during the oviposition duration in comparison with the control, which counts an average of 190.71 ± 10.04 eggs. The ANOVA presents a significant effect ($P < 0.001$) with an average value of 40.57 ± 7.35 eggs for LE, 41.86 ± 13.02 eggs for SE and respectively 56.71 ± 10.04 eggs and 51.86 ± 21.31 eggs in the case of LB and of SB "Figure 4".

Thus, all the tested extracts seem to have the same effect on the *Ephestia kuehniella* female, as the Newman-Keuls test class them all in the same homogeneous group, the b group.

Laperrine olive-tree raw extracts effect on the Ephestia kuehniella adults mortality

The Laperrine olive-tree raw extracts are administered on the *Ephestia kuehniella* pest by inhalation, in order to estimate their insecticide activity on the adults mortality.

From the adult exuviation, many insects are placed in a tube containing pleated paper sprayed with the raw extract. A daily counting of dead adults is done until it reaches 100% mortality.

The illustrating results in Figure 5 show that the applied treatment has an efficient insecticide effect on the pest insects.

In the optimum development conditions, the control adults mortality significantly starts on day 5 of the breeding. Indeed, we can record an average value of 6.67 ± 4.44 %. After the application of the LE and SE extracts on adults, immediate effects arise. Those effects may result in an average mortality rate 24 h after the

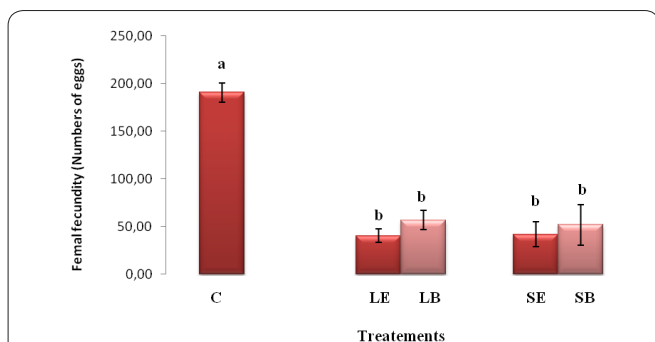


Figure 4. Female fecundity according to the applied treatments (LE: Ethereal Leaves extract, LB: Butanol Leaves extract, SE: Ethereal Stems extract, SB: Butanol Stems extract, C: Control and a, b : Homogeneous groups).

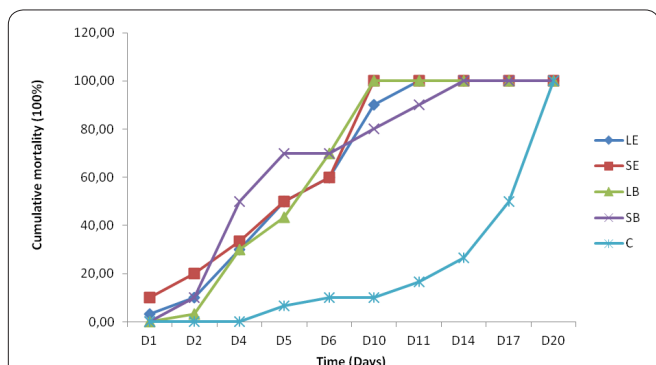


Figure 5. Adults mortality kinetics after the administration by inhalation of the extracts. LE: Ethereal Leaves extract, LB: Butanol Leaves extract, SE: Ethereal Stems extract, SB: Butanol Stems extract and C: Control.

beginning of the experiment, 3.33 ± 4.44 % for LE and 10.00 ± 6.67 % for SE.

As for the adults treated by LB and SB, we can notice a starting mortality in day 2 of the treatment with respective average values of 3.33 ± 4.44 % and 10.00 ± 6.67 %.

A lethality of 50% is recorded in day 4 of the treatment with SB (50 ± 6.67 %), and in day 5 for the LE treatments (50 ± 6.67 %) and SE (50 ± 0 %). That value is not reached until the 5th and 6th day of the LB treatment exposure, and only in day 17 in the case of the control insects (50 ± 0 %).

The mortality rate is significantly marked for each day of the experiment. The control adults insects live on average 20 days after which, we can count 100% mortality.

In relationship with the obtained results, it seems that the whole insects die after 10 days exposure to the SE and LB extracts, after an eleven-day-treatment with LE, and a fourteen-day-treatment with SB to have all the adult insects dead.

Discussion

The quantitative analysis by the UV-visible spectrophotometry method, of the phenolic extracts of *Olea europaea* subsp. *Laperrinei*, allowed us to assess their average amount of flavones-flavonols, which correspond to the average value of 0.389 ± 0.004 mg/g for the leaves powder and 0.221 ± 0.006 mg/g for the stems powder, in anthocyanin, we have 1.573 ± 0.012 mg/g in the case of leaves powder and 0.803 ± 0.006 mg/g for the stems powder. As for the C-glycosides, we calculate an average amount of 1.167 ± 0.002 mg/g, in the case of leaves powder and 1.161 ± 0.001 mg/g for the stems powder. Those amounts clearly reveal that the Laperrine olive-tree leaves contain more phenolic compounds than the stems.

The results of chemical analysis of various extracts show that the levels and types of identified compounds vary according to the nature of extract. Our results are relevant to the work of Nashwa *et al.* (20), who identifies quercetin, apigenin, oleuropein and hesperetin in leaf extracts *Olea europaea* L, according to Pereira *et al.* (21) and Dekanski *et al.* (22), who found the presence of caffeic acid, quercetin, luteolin, apigenin and oleuropein in the same extract.

Great deals of studies have shown that flavonoids

are implied in the mechanisms of plants defense against insects attacks. That property seems to apply *in vitro* conditions, as according to Teixeira da Silva (23) and Golawska *et al.* (24), flavonoids have an insecticide effect. This observation supports our experiment. Our study reveals an insecticide effect of flavone extracts obtained from the leaves powder and from the stems powder of the Laperrine olive-tree on *Ephestia kuehniella*. The inhalation of raw extracts by the chrysalis extends their pupal development duration and disturbs the adults reproduction. Out of the four tested extracts, only SB seems to extend the pre-oviposition period in a significant way.

We can notice that after the mating the oviposition period is significantly reduced after the females exposure to the tested raw extracts; nevertheless, the LB fraction mostly disturbs the adults reproduction, as it reduces the egg-laying period to 2.43 days in comparison to 4.29 days, observed in control in the optimum conditions of the moth reproduction.

All the obtained fractions from the Laperrine olive-tree's powder disturb the adults fecundation by reducing on average of 2/3 the number of laid eggs.

The results obtained suggest that Laperrine olive extracts have an insecticidal effect against *E. kuehniella*. This effect is probably due to the presence of oleuropein, quercetin and apigenin which can play a fundamental role in bio-insecticidal activity (24, 25).

The different articles consulted show the effects of essential oils on the fecundity of stored food pests and supports our results obtained on *Ephestia kuehniella*. Thus, work on the essential oil extracted from the *Artemisia herba alba* white shows a disturbance of the reproduction of the pyral by lengthening the duration of the pre-oviposition and of the nymphal development and reducing the period of laying (14). Even if the female is able to lay eggs, the number of eggs is reduced because of the reduction of oviposition period.

Similar results have been obtained with *Tagetes minuta*, *Hyptis suaveolens*, *Ocimum canum*, *Ocimum basilicum* and *Piper guineense* (26). Kellouche *et al.* (27) have recorded no egg-laying with the *Callosobruchus maculatus* females after the administration of *Mentha x piperita* (Peppermint) essential oil with a dose of 20 µl /50 g. *Olea europaea* leaf powder has a limited effect on the number of eggs laid by the cowpea weevil.

The raw extracts interfere with a double mechanism on the insects reproduction and on their longevity. When administered to adults, the Laperrine olive-tree raw extracts provoke a significant mortality rate in comparison to the control insects.

Indeed, we observe to start mortality from 24 hours after the experiment (3.33% -10.00%), between the 4th and the 6th day of the experiment, 50% of the adult insects die whereas the whole pests die between the 10th and the 14th day after the administration of our extracts.

Delimi *et al.* (14), have observed that the white wormwood essential oil is efficient against the pest *E. kuehniella*. The adults lifetime progressively diminishes with the increasing of the applied dose.

We can also notice that the Goosefoot (*Chenopodium*) and the Gum-trees (*Eucalyptus*) essential oils and the *Chenopodium ambrosioides* powder have a great insecticide activity.

They have been tested on six stored food pests *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* (Cowpea weevil), *Acanthoscelides obtectus*, *Sitophilus granarius*, *S. zeamais* and *Prostephanus truncatus*. A concentration of 0.4% provoke a mortality of 60% of the Cowpea weevil after a two-day-treatment (28, 29).

According to Kellouche *et al.* (30), leaf powder of *Olea europaea* significantly reduces adult longevity of cowpea weevil. The acetone extract of leaf powder of *Olea europaea* variety Chamlali causes a 100% mortality in the adults of *Myzus persicae* and reduces the penetration of the *Phthorimaea operculella* larvae in potato tubers at 71.7% and the percentage of spawning of the female at 93.3% (25). In addition, fed on olive-leaf meal, adults of the Desert Locust (*Schistocerca gregaria*), remain brick red color and smooth, character indicating a persistent of juvenile state, which makes the olive tree a potential tool for preventive fight against desert locust (31). The work of Mohammed (32), on the ethanolic extract of the olive tree shows that it induces a mortality of 98.7% of the larvae and 80.9% of adults of *Tribolium confusum*. The treatment of twigs infected with psylla (*Euphyllura olivina* costa), with phenolic compounds extracted from the olive tree causes in adults an average mortality ranging from 63.5% to 71.7% depending on the variety infected (33).

The plants resources constitute a great bioactive molecules reservoir which can constitute solutions to the environmental issues of sustainable development. Those molecules naturally synthesized by plants play a role in retro-regulation of insects population by plants, a kind of natural regulator of the stored food products pests. Those molecules could be used as a substitute for synthetic chemicals which bad effects on ecosystems and on human health are clearly evident.

The Laperrine olive-tree plant extracts, an under-species of Algerian Central Sahara have shown an insecticide double effect on the *Ephestia kuehniella* pest by extending in a significant way the pupal development duration and by affecting in a limited way the pre-oviposition period and reducing the oviposition period and the number of eggs laid by the female. A significant mortality rate is also observed depending on the administered extracts to the flour moth. Those results constitute a new run to explore in order to understand the mechanisms of molecular action of those extracts.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

We express our gratitude to Pr. Yasmina Benazzoug (USTHB) for her stimulating discussions and to Pr. Nadia Bouguedoura for the acid hydrolysis at the LRZA (USTHB).

We present our special thanks to Dr. Zhor Bettache and Dr. Tahar Benakmoun of the central laboratory of the scientific police for the HPLC analysis.

References

1. Besnard G, Anthelme F, Baali-Cherif D. The Laperrine's olive tree (Oleaceae): a wild genetic resource of the cultivated olive and a model-species for studying the biogeography of the Saharan Moun-

tains. *Acta Bot Gallica*. 2012; 159(3):319-328.

2. Baali-Cherif D, Besnard G. High genetic diversity and clonal growth in relict populations of *Olea europaea* subsp. *laperrinei* (Oleaceae) from Hoggar, Algeria. *Ann Bot*. 2005; 96 (5): 823-830.

3. Green PS. A revision of *Olea* L. (Oleaceae). *Kew Bull*. 2002; 57: 91-140.

4. Kheirkhah M, Ghasemi V, Yazdi AK, Rahban S. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from *Ziziphora clinopodioides* Lam. used against the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller. *J Plant Prot Res*. 2015; 55(3): 260-265.

5. Nayak MK, Collins PJ, Kopittke RA. Residual toxicities and persistence of organophosphorus

insecticides mixed with carbaryl as structural treatments against three liposcelidid psocid species (Psocoptera: Liposcelididae) infesting stored grain. *J Stored Prod Res*. 2003; 39: 343-353.

6. Bilal H, Akram W, Ali Hassan S, Zia A, Bhatti AR, Mastoi MI, Aslam S. Insecticidal and Repellent Potential of Citrus Essential Oils Against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Pakistan J. Zool*. 2015; 47(4): 997-1002.

7. Chaib I. Research on insecticidal plants in Tunisia: Review and discussion of methodological approaches. *Tunisian J Plant Prot*. 2011; 6: 109-125.

8. Park IK, Lee SG, Choi DH, Park JD, Ahn YJ. Insecticidal activities of constituents identified in the essential oil from leaves of *Chamaecyparis obtusa* against *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Sitophilus oryzae* (L.). *J Stored Prod Res*. 2003; 39: 375-384.

9. El idrissi M, Elhourri M, Amechrouq A, Boughdad A. Étude de l'activité insecticide de l'huile essentielle de *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) sur *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) [Study of the insecticidal activity of the essential oil of *Dysphania ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) on *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae)]. *J. Mater. Environ. Sci*. 2014; 5 (4) :989-994.

10. Johnson JA, Valero KA, Hnnal MM. Effect of low temperature storage on survival and reproduction of india meal moth (Lipodiptea : Pyralidae). *Crop Prot*. 1997; 16:519-523.

11. Ozenda P. Flore et végétation du Sahara. 3ème ed. CNRS, Paris, 2004.

12. Soltani-Mazouzi N, Hami M, Gramdi H. Sublethal effects of methoxyfenozide on reproduction of the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Invertebr Reprod Dev*. 2012; 56(2):157-163.

13. Delimi A, Taibi F, Bouchelaghem S, Boumendjel ME, Hennouni-Siakhène N, Cheffrou A. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil of *Artemisia herba alba* (Asteraceae) against *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Int J Biosci*. 2017 ; 10(2) :130-137.

14. Delimi A, Taibi F, Fissah A, Gherib S, Bouhkari M, Cheffrou A. Bio-activité des huiles essentielles de l'Armoise blanche *Artemisia herba alba* : effet sur la reproduction et la mortalité des adultes d'un ravageur des denrées stockées *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Afr Sci*. 2013; 9(3): 82-90.

15. Taibi F, Smagghe G, Amrani L, Soltani-Mazouzi N. Effect of ecdysone agonist RH-0345 on reproduction of mealworm, *Tenebrio molitor*. *Comp Biochem Physiol*. 2003; 135(3):257-267.

16. Lebreton Ph, Jay M, Voirin B, Bouchez MP. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes. *Chimie analytique*. 1967 ; 49(7):375-383.

17. Jay M, Gonnet JF, Wollenweber F, Voirin B. Sur l'analyse qua-

litative et quantitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. *Phytochem*. 1975; 14 (7): 605-1612.

18. Ouafi S, Bounaga N. Phenolic compounds as markers for Algerian cultivars of the date palm *Phoenix dactylifera* L. *Acta Hortic*. 2010; 882:321-327.

19. Ortega-Garcia F, Peragon J. HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv Picual during ripening. *J sci food Agric*. 2010; 20 (13): 2295-2300.

20. Nashwa, Morsy FS, Abdel-Aziz ME. Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *J Agroalimnt Processes Technol*. 2014; 20(1): 46-53.

21. Pereira AP, Ferreira ICFR, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*. 2007; 12: 1153-1162.

22. Dekanski D, Janicijevic-Hudomal S, Tadic V, Markovic G, Arsic I, Mitrovic DM. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *J Serb Chem Soc*. 2009; 74 (4):367-377.

23. Teixeira da Silva JA. Mining the essential oils of the Anthemidae. *Afr J Biothechnol*. 2004; 3(12): 706-720.

24. Golawska S, Kapusta I, Lukasik I, Wojcicka A. Effect of phenolics on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* (Harris) population *Pisum sativum* L. (Fabaceae). *Pestycydy/ Pesticides*. 2008; 3-4: 71-77.

25. Ben Hamouda A, Boussadia O, Khaoula B, Laarif A, Braham M. Studies on insecticidal and deterrent effect of olive leaf on *Muzus persicae* and *Phthorimaea operculella*. *J Entomol Zool Studies*. 2015; 3(6):294-297.

26. Keita SM, Vincent C, Schmit JP, Ramaswamy S, Bélanger A. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*. 2000; 36 (4):355-364.

27. Kellouche A, Ait-Aider F, Labdaoui K, Moula D, Ouendi K, Hamadi N, Ouramdane A, Frerot B, Mellouk M. Biological activity of ten essential oils against cowpea beetle, *Callosobruchus maculatus* Fabricius (Coleoptera : Bruchidae). *Int J Integ Biol*. 2010; 10(2): 86-89.

28. Taponjoui LA, Adle C, Bouda H, Fontem DA. Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post harvest grain protectant against six-stored product beetles. *J Stored Prod Res*. 2002; 38: 395-402.

29. Kosma P, Roméo B, Bouba D, Bouba-Armand A, Goudoum A. Bioefficacy of the powder of *Melia azedarach* seeds and leaves against *Callosobruchus maculatus*, on cowpea seeds (*Vigna unguiculata*) in storage. *E3. J Agric Res Dev*. 2014 ; 5 (4) : 072-078.

30. Kellouche A, Soltani N. Activité biologique des poudres de cinq plantes et de l'huile essentielle d'une d'entre elles sur *Callosobruchus maculatus* (F.). *Int J Tropical insect sci*. 2004; 24 (1):184-191.

31. Ben Hamouda A, Ammar M, Ben Hamouda MH. Effect of *Olea europaea* and *Cestrum parqui* leaves on the cuticle and brain of the desert locust, *Schistocerca gregaria* Forsk. (Orthoptera : Acrididae). *Pest Technol*. 2011; 5(1):55-58.

32. Mohammed HH. Repellency of ethalonic extract of some indigenous plants against *Tribolium confusum* (Coleoptera :Tenebrionidae). *J Agric Vet Sci*. 2013; 2(6): 27-31.

33. Ouguas Y, Hilal A, Elhadram I. Effet biocide des extraits phénoliques oléicoles sur les adultes du psylle de l'olivier *Euphyllura olivina* costa (Homoptera : Psyllidae) sur deux variétés d'olivier Menara et Arbequine au Maroc. *Rev. Ezzaitouna*. 2010; 11(1):1-15.

RESUME

L'olivier de Laperrine est une espèce endémique observée en Algérie uniquement au Sahara Central, au Niger et au Soudan. Elle est proche de l'olivier méditerranéen et représente une ressource génétique importante. La qualité de sa résistance à la sécheresse, ferait d'elle un potentiel porte-greffe pour les différentes variétés d'olivier cultivées.

Cette étude porte sur la caractérisation chimique des extraits de l'olivier de Laperrine et l'évaluation de leur potentiel antioxydant et bio-insecticide. Dans ce contexte, l'activité antioxydante *in vitro* est déterminée par la capacité antioxydante totale, les tests FRAP, DPPH, H₂O₂ et l'inhibition du blanchiment du β -carotène. L'analyse chimique nous a permis de détecter l'oleuropéine, l'hydroxytyrosol, la lutéoline, l'apigénine, l'acide caféique, la rutine, la naringénine-7-glucoside et la lutéoline-7-glucoside. Les dosages chimiques par spectrométrie UV-visibles ont mis en évidence de fortes teneurs en phénols, en flavonoïdes et en tanins totaux. La richesse des extraits en polyphénols explique le potentiel antioxydant élevé de l'olivier de Laperrine. L'effet bio-insecticide des extraits a été testé sur *Ephestia kuehniella*, insecte nuisible des denrées stockées. Leur administration par inhalation à des chrysalides nouvellement exuvies, prolonge leur durée de développement nymphal et perturbe la reproduction des adultes. Testés sur des papillons adultes, les différents extraits provoquent une mortalité précoce.

Mots-clés : Hoggar, *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, Polyphénols, HPLC, Activité antioxydante, Bio-insecticide, *Ephestia kuehniella*, Reproduction.

ABSTRACT

The *Laperrine* olive tree is endemic specie observed in Algeria only in the Central Sahara, in Niger and in Sudan. It is close to the Mediterranean olive tree and represents an important genetic resource. The quality of its resistance to drought would make it a potential rootstock for the different varieties of olive cultivated.

This study concerns the chemical characterization of extracts from the Laperrine olive tree and the evaluation of their antioxidant and bio-insecticidal potential. In this context, the antioxidant activity *in vitro* is determined by the total antioxidant capacity, the FRAP, DPPH, H₂O₂ tests and the inhibition of β -carotene bleaching. The chemical analysis allowed us to detect oleuropein, hydroxytyrosol, luteolin, apigenin, caffeic acid, rutin, naringenin-7-glucoside and luteolin-7-glucoside. Chemical dosages by UV-visible spectrometry have shown high levels of phenols, flavonoids and total tannins. The richness of the polyphenol extracts explains the high antioxidant potential of the Laperrine olive tree. The bio-insecticidal effect of the extracts has been tested on *Ephestia kuehniella*, a pest of stored food. Their administration by inhalation to newly exuviated pupae prolongs their duration of nymphal development and disturbs the reproduction of adults. Tested on adult butterflies, the different extracts cause early mortality.

Keywords: Hoggar, *Olea europaea* subsp. *laperrinei*, Polyphenols, CHLP, Antioxidant activity, Bio-insecticide, *Ephestia kuehniella*, Reproduction.
