



**HAL**  
open science

## Investigation phytochimique, évaluation des activités larvicide et anti-acétylcholinestérase de différents extraits de *Mercurialis annua* L.

Rania Ben Nasr

► **To cite this version:**

Rania Ben Nasr. Investigation phytochimique, évaluation des activités larvicide et anti-acétylcholinestérase de différents extraits de *Mercurialis annua* L.. Chimie. Université de Lorraine; Université de Carthage (Tunisie), 2021. Français. NNT : 2021LORR0155 . tel-03423273

**HAL Id: tel-03423273**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03423273>**

Submitted on 29 Apr 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**THESE DE DOCTORAT EN COTUTELLE**  
**UNIVERSITE DE LORRAINE (FRANCE) ET UNIVERSITE DE CARTHAGE**  
**(TUNISIE)**

**Présentée par**

**Rania BEN NASR**

**Pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE ET DE L'UNIVERSITE DE**  
**CARTHAGE**

**Domaine : CHIMIE / BIOLOGIE**

**Investigation phytochimique, évaluation des activités  
larvicide et anti-acétylcholinestérase de différents extraits  
de *Mercurialis annua* L.**

**Rabiaa HAOUALA**, Professeur (l'Institut supérieur agronomique de Chott Meriem)

Rapporteur

**Hounnankpon YEDOMONHAN**, Professeur (Université d'Abomey-Calvi)

Rapporteur

**Asma SAKKA HLAILI**, Professeur (Faculté des Sciences Bizerte) (président de jury)

Examineur

**Jaouad BOUAYED** Maître de conférences-HDR- (Université de Lorraine)

Examineur

**Héla EL FERCHICHI OUARDA**, Maître de conférences (Faculté des Sciences Bizerte)

Co-directrice

**Amadou DICKO**, Professeur (Université de Lorraine)

Co-directeur

*Je dédie cette thèse*

***A MON TRÈS CHÈRE PÈRE** De tous les pères, tu es le meilleur. Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines, ta persévérance et perfectionnisme. En témoignage de brut d'années de sacrifices, de sollicitudes, d'encouragement et de prières. Pourriez-vous trouver dans ce travail le fruit de toutes vos peines et tous de vos efforts. En ce jour, j'espère réaliser l'un de tes rêves. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, ma reconnaissance et mon profond amour. Puisse Dieu vous préserver et vous procurer santé et bonheur.*

***A MA TRÈS CHÈRE MÈRE** Source inépuisable de tendresse, de patience et de sacrifice. Ta prière et ta Bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Quoique je puisse dire et écrire, je ne pourrais exprimer ma grande affection et ma profonde reconnaissance. J'espère ne jamais te décevoir, ni trahir ta confiance et tes sacrifices. Puisse Dieu tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et Bonheur.*

***A MON FRÈRE OUSSEMA** Tu as été à mes côtés pendant toutes les étapes de ce travail, je t'en suis très reconnaissante. Aucune dédicace ne peut exprimer la profondeur des sentiments fraternels et d'amour, d'attachement que j'éprouve à ton égard. Je te dédie ce travail en*



*témoignage de ma profonde affection en souvenirs de notre  
indéfectible union qui s'est tissée au fil des jours. Puisse dieu te  
protéger, garder et renforcer notre fraternité*

***A MON ONCLE ABDELKADER ET MA TANTE MONIA*** Je ne saurai  
*traduire sur du papier l'affection que j'ai pour vous, je n'oublierai  
jamais ce que vous avez fait pour moi dès mon premier jour en France  
j'implore Allah de vous réserver je vous aime*

***A MES SŒURS IKRAM ABIR ET AMÂLE*** des sœurs comme on ne  
*peut trouver nulle part ailleurs, Puisse Allah vous protéger, garder et  
renforcer notre relation. Je n'oublierai jamais ces merveilleux  
moments passés ensemble Je vous souhaite tout le bonheur du monde*

***A TOUTE MA FAMILLE et MES AMIES EN TUNISIE ET EN  
FRANCE*** je vous aime beaucoup

***A LA MEMOIRE DE MA GRAND MERE*** je n'arrive pas à t'oublier  
*ma chère Que vous reposiez dans le paradis du seigneur.*

## *Remerciements*

Je tiens avant tout à exprimer ma reconnaissance à madame **Hela ELFERCHICHI OUARDA**, ma directrice de thèse pour avoir accepté de m'encadrer dans cette étude. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre encadrement efficace. Merci pour votre compréhension, votre grande gentillesse et pour la confiance que vous m'avez témoigné tout au long de cette étude. Malgré vos importantes obligations, vous avez toujours été présente pour recadrer mes recherches dans la bonne direction et ceci été fondamental dans la bonne réalisation de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde gratitude.

J'exprime mes sincères remerciements à monsieur **Amadou DICKO**, co-directeur de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et avoir accepté de diriger ce travail. Sa rigueur, sa disponibilité et ses qualités humaines m'ont profondément touché.

Madame **Rabiaa HAOUALA** Professeur de Biologie Végétale à l'Institut supérieur agronomique de Chott Meriem, relevant de l'Université de Sousse et monsieur **Hounnankpon YEDOMONHAN**, Professeur de Botanique à l'Université d'Abomey-Calavi. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Veuillez accepter l'expression de mon profond respect et ma reconnaissance.

Madame **Asma SAKKA HLAILI**, Professeur en Biologie Végétale & Phytoplanktonologie de la Faculté des Sciences de Bizerte (Université de Carthage) et monsieur **Jaouad BOUAYED**, Maître de conférences à l'Université de Lorraine ; C'est avec amabilité et spontanéité que vous avez accepté de juger ce travail. Qu'il me soit permis à travers ce travail de vous témoigner mon estime et ma redevance.

## ***RESUME***

Ce travail rapporte le lien entre l'activité larvicide et la composition chimique des différents extraits des pieds mâles et femelles de *Mercurialis annua* L., une *Euphorbiaceae* souvent utilisée dans la médecine traditionnelle. Le matériel végétal est collecté dans quatre régions de la Tunisie situées dans des étages bioclimatiques différents : Bizerte, Jandouba, Nabeul et Beja. Cette étude comprend dans la première partie une synthèse bibliographique et dans la deuxième partie les méthodes utilisées et dans la dernière partie les résultats obtenus.

L'activité larvicide des différents extraits aqueux de *M. annua* contre les larves de *Tribolium confusum* Jaquelin Du Val ont montré que la mortalité atteint 100% après 48 heures d'exposition pour les extraits de Bizerte.

L'activité anti-oxydante des différents extraits a été évaluée à l'aide d'essais DPPH. Les composés phénoliques ont été identifiés et quantifiés par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et à la spectrométrie de masse (LC-UV-ESI / MS). Les résultats ont montré que les extraits méthanoliques de plantes mâles ont une activité anti-oxydante (AAO) plus élevée que celle détectée dans les extraits de plantes femelles. Les extraits de plantes mâles et de plantes femelles de Bizerte ont affiché le taux d'AAO le plus élevé.

Certains composés phénoliques tels que : la narcissine, la gallocatéchine, la rutine, l'épigallocatéchine et l'épicatéchine ont été identifiés et quantifiés par LC-MS.

Par ailleurs, l'activité inhibitrice de l'AChE des extraits est supérieure à celle de la galantamine utilisée comme contrôle positif dans le cadre de la lutte contre la maladie d'Alzheimer.

**Mots clés : *Mercurialis annua* L., activité anti-oxydante DPPH, polyphénols, flavonoïdes, activité larvicide et anti-acétylcholinestérase**

## *ABSTRACT*

This work reports the link between the larvicidal activity and the chemical composition of the different extracts from the male and female feet of *Mercurialis annua* L., a *Euphorbiaceae* often used in traditional medicine. The plant material is collected in four regions of Tunisia located in different bioclimatic stages: Bizerte, Jandouba, Nabeul and Beja. This study includes in the first part a bibliographical summary and in the second part the methods used and in the last part the results obtained.

The larvicidal activity of the various aqueous extracts of *M. annua* against the larvae of *Tribolium confusum* Jaquelin Du Val showed that the mortality reached 100% after 48 hours of exposure for the extracts of Bizerte.

The antioxidant activity of the different extracts was evaluated using DPPH tests. The phenolic compounds were identified and quantified by liquid chromatography coupled with a UV detector and mass spectrometry (LC-UV-ESI / MS). The results showed that the methanolic extracts from male plants have higher antioxidant activity (AOA) than that detected in extracts from female plants. Male and female plant extracts from Bizerte showed the highest AOA levels.

Certain phenolic compounds such as: narcissin, gallocatechin, rutin, epigallocatechin and epicatechin have been identified and quantified by LC-MS.

In addition, the AChE inhibitory activity of the extracts is greater than that of galantamine used as a positive control in the fight against Alzheimer's disease.

**Key words:** *Mercurialis annua* L., DPPH antioxidant activity, polyphenols, flavonoids, larvicidal and anti-acetylcholinesterase activity

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b> .....	5
<b>I. Généralités sur <i>Mercurialis annua</i> L.</b> .....	6
<b>I.1. Taxonomie et description botanique de <i>Mercurialis annua</i> L.</b> .....	6
<b>I.1.2. Répartition géographique et écologie de <i>M. annua</i></b> .....	8
<b>I.1.3. Toxicité de <i>M. annua</i></b> .....	9
<b>I.3. Activités biologiques de quelques espèces d'<i>Euphorbeacea</i></b> .....	10
<b>I.3.1. Activité larvicide</b> .....	10
<b>I.3.2. Activité insecticide</b> .....	11
<b>I.3.3. Activité molluscicide</b> .....	11
<b>I.3.4. Activité antimicrobienne</b> .....	12
<b>I.3.5. Activité antifongique</b> .....	12
<b>II. Composés phénoliques et quelques activités dépendantes</b> .....	13
<b>II.1. Composés phénoliques</b> .....	13
<b>II.2. Effets biologiques des polyphénols</b> .....	16
<b>II.3. Activité anti-oxydante des polyphénols</b> .....	17
<b>II.4. Activités enzymatiques des polyphénols</b> .....	18
<b>II.4.1. Activité anti-acétylcholinestérase</b> .....	20
<b>II.4.1.1. Maladie d'Alzheimer</b> .....	20
<b>II.4.1.2. Principe du test d'Ellman</b> .....	21
<b>II.4.1.3. Modélisation</b> .....	22
<b>III. Généralité sur <i>Tribolium confusum</i> (Du Val)</b> .....	24
<b>III.1. Méthodes de lutte contre le <i>Tribolium confusum</i> (Du Val)</b> .....	25
<b>III.1.1. Lutte préventive et curative</b> .....	25
<b>III.1.2. Lutte par actions physique</b> .....	26
<b>III.1.3. Lutte par produits de synthèses</b> .....	26
<b>III.1.4. Lutte par produits naturels</b> .....	26

III.1.5. Lutte biologique.....	28
<b>Chapitre II : Matériels et Méthodes</b> .....	29
<b>I. Echantillonnage</b> .....	30
<b>I.1. Matériel</b> .....	31
<b>I.1.1. Les feuilles</b> .....	31
<b>I.1.2. Les tiges et les racines</b> .....	32
<b>I.1.3. Les graines</b> .....	32
<b>I.2. Préparation des extraits</b> .....	32
<b>II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité anti-oxydante</b> .....	33
<b>II.1. Méthodes d'analyse</b> .....	33
<b>II.2. Quantification du contenu phénolique total (PPT)</b> .....	34
<b>II.3. Quantification du contenu total des flavonoïdes (FVT)</b> .....	36
<b>II.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante</b> .....	37
<b>III. Analyses par chromatographie</b> .....	39
<b>III.1. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)</b> .....	39
<b>IV. Activité larvicide</b> .....	44
<b>IV.1. Matériel animal</b> .....	44
<b>IV.2. Tests de toxicité</b> .....	45
<b>V. Activité anti-Acétylcholinestérase</b> .....	47
<b>V.1. Démarche expérimentale</b> .....	47
<b>V.2. Calcul de la moitié de la concentration inhibitrice maximale (IC<sub>50</sub>)</b> .....	48
<b>VI. Calculs statistiques</b> .....	48
<b>Chapitre III : Résultats et Discussions</b> .....	50
<b>Résultats</b> .....	51
<b>I. Dosage des composés phénoliques des différents organes de <i>M. annua</i></b> .....	51
<b>I.1. Dosage des polyphénols totaux des différents organes</b> .....	51
<b>I.2. Variation des teneurs en flavonoïdes totaux des organes</b> .....	53

<b>I.3. Variation des activités anti-oxydantes des organes et leurs relations avec les teneurs en composés phénoliques</b> .....	56
<b>I.3.1. Dosage des activités anti-oxydantes des organes</b> .....	56
<b>I.3.2. Estimation de la corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités anti-oxydantes (AAO)</b> .....	58
<b>I.3.2.1. Relations entre teneurs en composés phénoliques et les AAO</b> .....	59
<b>I.4. Nature chimique et estimation des concentrations des composés phénoliques par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)</b> .....	62
<b>I.4.1. Analyse des extraits des feuilles</b> .....	63
<b>I.4.2. Analyses des extraits des graines</b> .....	72
<b>I.4.3. Analyses des extraits des Tiges</b> .....	74
<b>I.4.4. Analyses des extraits des Racines</b> .....	77
<b>II. Evaluation d'une activité larvicide des extraits aqueux des feuilles et des graines contre <i>T. confusium</i></b> .....	79
<b>II.1. Activité larvicide des extraits des feuilles</b> .....	79
<b>II.2. Activité larvicide des extraits des graines</b> .....	81
<b>II.3. Relation entre les activités anti-oxydantes et l'activité larvicide</b> .....	84
<b>III. Evaluation de l'activité anti-Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques de <i>M. annua</i></b> .....	85
<b>III.1. Calcul de la moitié de la concentration inhibitrice maximale (IC<sub>50</sub>)</b> .....	85
<b>III.2. Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et la teneur en polyphénols totaux</b> .....	89
<b>Discussion</b> .....	92
<b>Conclusion</b> .....	98
<b>Références bibliographiques</b> .....	102
<b>Annexes</b> .....	126

## **Listes des abréviations**

APG : Angiosperm Phylogeny Group

AAO : Activité anti-oxydante

AChE : Acetylcholinestérase

CP : Composés phénoliques

DPPH : 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyle

EC/g Ms : Equivalant catéchine par gramme de matière sèche

EAG/g Ms : Equivalent acide gallique par gramme de matière sèche

ET/g MS : Equivalent Trolox par gramme de matière sèche

FVT : Flavonoïdes totaux

LC- MS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectrophotomètre de masse

PPT : Polyphénols totaux

TR : Temps de rétention



## Listes des Tableaux

Tableau 1: Les principales classes de composés phénoliques (Harborne, 2000; Macheix et al., 1990).....	14
Tableau 2 : Données sur les sites d'échantillonnage du M. annua.....	30
Tableau 3: Analyse quantitative des extraits des feuilles de quatre populations M. annua.....	64
Tableau 4: Analyse quantitative et qualitative des extraits des graines de quatre provenances de M. annua. ....	72
Tableau 5: Analyse quantitative et qualitative des extraits des tiges de quatre provenances de M. annua. ....	76
Tableau 6: Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de quatre provenances de M. annua. ....	78
Tableau 7 : Activité larvicide des extraits des feuilles et des graines de M. annua.....	83
Tableau 8: Activités anti-AChE des différents extraits testés de quatre populations de M. annua. ....	86

## Listes des Figures

Figure 1 : Pied femelle (Le Driant, 2010) et Pied mâle de <i>M. annua</i> (Silberfeld, 2013) .....	7
Figure 2 : a) : Détail d'un épi de fleurs mâles et b) : Détail d'une fleur femelle montrant les 2 stigmates velus surmontant l'ovaire de Mercuriale de jardins (Silberfeld , 2013). .....	8
Figure 3: Graine de <i>Mercurialis annua</i> L. (Cliché personnel) .....	8
Figure 4: a) : Caractéristiques climatiques (a) et édaphiques de <i>M. annua</i> (b) (Julve , 1998) ...	9
Figure 5 : Structure d'un alcaloïde (la nicotine) (Muniz, 2006) .....	10
Figure 6 : Structure d'un terpénoïde (la buteline) (Rosine, 2009) et d'un tanin condensé ( Guignard, 1996). .....	12
Figure 7 Classification des composés phénoliques .....	15
Figure 8: Effets biologiques des polyphénols (Martin and Andriantsitohaina, 2002). .....	17
Figure 9: Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique. (Urbain, 2007).....	21
Figure 10: mécanisme de dosage de l'activité AChE en utilisant le DTNB et le thionitrobenzoate Réaction colorimétrique d'Ellman .....	22
Figure 11: différents stades de développement de <i>T. confusum</i> (Duval.) A : l'oeuf (Rebecca et Thomas, 2003) ; B : larve, C : nymphe, D : adulte (Walter, 2002).....	25
Figure 12: localisation des sites de collecte de <i>M. annua</i> en Tunisie. ....	31
Figure 13: courbe d'étalonnage d'Acide Galique .....	35
Figure 14: courbe d'étalonnage de Catéchine .....	37
Figure 15: Réaction entre le DPPH et un antioxydant donneur de H (AH) Trolox. ....	38

Figure 16: courbe d'étalonnage de Trolox .....	39
Figure 17: appareillage Shimadzu LC-MS 2020.....	40
Figure 18: schéma de principe de la source électrospray d'ionisation (ESI) (Tang et Kebarle, 1991).....	41
Figure 19: image illustrant la séparation ayant lieu dans le champ magnétique du spectromètre (Bristol university).....	42
Figure 20: Elevage de <i>Tribolium confusum</i> (Du Val) au laboratoire (photo originale). .....	45
Figure 21 : Boîte de pétrie contenant 20ml de l'extrait aqueux et 15 larves (3 répétitions) (photo originale).....	46
Figure 22: un Rotavapor .....	46
Figure 23: Concentration des PPT des pieds mâles et femelles de <i>M. annua</i> . Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines .....	52
Figure 24: Concentration des FVT des pieds mâles et femelles de <i>M. annua</i> . Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines .....	54
Figure 25: Activité anti-oxydante (DPPH) des pieds mâles et femelles de <i>M. annua</i> . Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines .....	57

Figure 26: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des feuilles des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de <i>M. annua</i> .....	59
Figure 27: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des graines de <i>M. annua</i> .....	60
Figure 28: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des tiges des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de <i>M. annua</i> .....	61
Figure 29: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des racines des pieds mâles de <i>M. annua</i> .....	62
Figure 30: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).....	65
Figure 31 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	65
Figure 32:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (rutine). .....	66
Figure 33:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (épicatechine). .....	66
Figure 34: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).....	66

Figure 35:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	67
Figure 36:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (rutine). .....	67
Figure 37: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (épicatechine). .....	67
Figure 38: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).....	68
Figure 39: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).....	68
Figure 40: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2). .....	69
Figure 41: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2). .....	70
Figure 42: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant Nabeul de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).....	71

Figure 43: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de <i>M. annua</i> , chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2) .....	71
Figure 44: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine). .....	73
Figure 45: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine). .....	73
Figure 46: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine). .....	74
Figure 47: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de <i>M. annua</i> , chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine). .....	74
Figure 48: (%) de mortalité après 6h de <i>T. confusum</i> soumis aux différentes concentrations de l'extrait aqueux des feuilles des pieds femelles et mâles de quatre provenances de <i>M. annua</i> .	80
Figure 49: (%) de mortalité de <i>T. confusum</i> soumis aux différentes concentrations de l'extrait aqueux des graines de quatre provenances de <i>M. annua</i> . .....	82
Figure 50: Relation entre les activités larvicides et les activités anti-oxydantes des extraits de feuilles hydro-méthanoliques des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de <i>M. annua</i> .....	84
Figure 51: Relation entre les activités larvicides et les activités anti-oxydantes des extraits de feuilles hydro-méthanoliques des graines de <i>M. annua</i> .....	85
Figure 52: Relation entre activité anti-AChE (IC <sub>50</sub> ) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des feuilles des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de <i>M. annua</i> .....	89

Figure 53: Relation entre activité anti-AChE (IC <sub>50</sub> ) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro- .....	90
Figure 54: Relation entre activité anti-AChE (IC <sub>50</sub> ) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des tiges des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de <i>M. annua</i> ..	90
Figure 55: Relation entre activité anti-AChE (IC <sub>50</sub> ) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des racines des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de <i>M. annua</i> . .....	91
Figure 56:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). .....	144
Figure 57 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Beja sde <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	144
Figure 58:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine). .....	144
Figure 59:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). .....	145
Figure 60 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	145

Figure 61:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine). .....	145
Figure 62:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). .....	146
Figure 63: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	146
Figure 64:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine). .....	146
Figure 65:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). .....	147
Figure 66: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). .....	147
Figure 67:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine). .....	147
Figure 68:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). .....	148



Figure 69: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2).....	148
Figure 70:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatechine).....	148
Figure 71:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine). ....	149
Figure 72: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2). ....	149
Figure 73:Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de <i>Mercurialis annua</i> L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatechine).....	149

# **Introduction**

L'histoire de la phytothérapie remonte à l'aube de l'humanité, ainsi le premier écrit sur l'utilisation des plantes à des fins médicales a été gravé sur une plaque d'argile écrite en cunéiforme par les Sumériens il y a 3000 ans av. J.-C (Partner, 2013).

Par conséquent, les humains ont entrepris de développer des ressources naturelles pour répondre à leurs besoins médicaux et alimentaires, cosmétiques, vêtements et autres. Les civilisations anciennes ont largement développé des méthodes d'utilisation des plantes médicinales (Rhattas et al., 2016).

De nombreuses plantes entrent déjà dans la composition de 70% de nos médicaments. Environ 170 000 molécules bioactives ont été extraites et identifiées à partir de plantes. Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs différentes activités biologiques (Chaabi, 2008). Sur le plan phytochimique et biologique, plusieurs espèces d'*Euphorbiaceae* ont été largement ignorées et constituent donc un groupe taxonomique particulièrement vierge et intéressant pour entreprendre de telles études. On citera l'exemple de *Mercurialis annua* L., une *Euphorbiaceae* répandue dans tout le pays et dans la région Euro-méditerranéenne. Cette espèce est connue par sa toxicité et aussi utilisée dans la pharmacopée traditionnelle. Mais la composition chimique et les propriétés larvicides des différentes parties de cette plante restent à explorer. *Mercurialis annua* L. était utilisée en médecine traditionnelle (Oran et Eisawi, 2014), elle possède une vertu laxative ; en traitant les pathologies du système digestif tout en augmentant le transit intestinal et en facilitant l'évacuation des sels, avec des activités purgatives, en aidant à évacuer le contenu des intestins. En plus, la plante était utilisée pour traiter la constipation obstinée, l'inflammation circonscrite dans les intestins et l'estomac. Elle est utile contre la rétention d'eau et les pathologies de la vessie (Blanco-Salas et al., 2019). Elle a également des propriétés diurétiques, en augmentant la production d'urine et aidant ainsi à améliorer le fonctionnement du système urinaire.

*Mercurialis annua* L. est une plante émétique qui provoque des vomissements. En dehors du système digestif et urinaire, la plante a montré son efficacité pour traiter les maladies gynécologiques telles que la molimina menstruelle (Aldouri et Shakya, 2018), et elle possède des propriétés anti-laiteuses qui stop la sécrétion de lait chez les femmes qui veulent arrêter l'allaitement. Des travaux de recherche au Maroc, indiquent que l'extrait aqueux des parties aériennes de *Mercurialis annua* L. a une action anxiolytique (Doukkali et Kamal, 2016). La plante possède également une activité antimicrobienne notable (Al-Bakri et Afifi, 2007).

Des études récentes ont indiqué que des extraits méthanoliques de *Mercurialis annua* L. se sont avérés avoir une activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses stimulant les cellules du système immunitaire à libérer des cytokines. Ces résultats montrent clairement que l'extrait de feuilles de *Mercurialis annua* L. présente un effet cytotoxique sur deux lignées cellulaires, à savoir le cancer colorectal (HRT-18) et le cancer du sein (T47D) (Bustanji et al., 2012). Des études antérieures révèlent aussi que les extraits méthanoliques de *Mercurialis annua* L. contiennent de nombreux flavonoïdes et plusieurs alcaloïdes de type pyridinone ou hermidine (Aquino et al., 1987). Plus récemment, certains chercheurs ont révélé un potentiel insecticide et larvicide chez *Mercurialis perennis* L. puis chez *Mercurialis annua* L. (Aldouri et Shakya, 2018).

Cependant, la littérature ne rapporte que peu d'études sur le lien entre le profil polyphénolique des différents extraits de *Mercurialis annua* L. et l'activité larvicide. D'autre part, les stocks de denrées alimentaires et surtout les céréales qui occupent une place stratégique dans l'alimentation des Tunisiens ont été toujours sensibles aux attaques par les insectes et plus précisément par *Tribolium confusum* Jaquelin Du Val, ce qui a causé une perte quantitative et qualitative de la denrée stockée. Ceci impose la protection de ces aliments. En effet, parmi les techniques les plus utilisées, figure la lutte chimique par le biais des insecticides, une méthode rapide et influente.

Cependant ses inconvénients sont multiples ; on citera à titre d'exemple, les conséquences sinistres pour la santé humaine due à l'accumulation de ces substances chimiques dans nos aliments. Il apparaît de nécessaire d'explorer des pistes pouvant contribuant à la lutte biologique contre ce ravageur des denrées de stockage. Dans ce contexte, nous avons exploré différents extraits de *M. annua* contre les larves de *T. confusum* en vue d'une meilleure protection des denrées stockées. Par ailleurs certaines *Euphorbiaceae* telles que le ricin et le jatropha se trouvent dotées d'un pouvoir anti -acétylcholinestérase qui peut être utilisé contre la maladie d'Alzheimer (Wafa et al., 2014).

Ces activités intéressantes permettraient d'envisager une valorisation semi-industrielle de cette plante endémique.

Le présent manuscrit est structuré en trois parties précédées d'une introduction générale et suivies d'une conclusion générale et des perspectives. La première partie a porté sur une revue bibliographique qui a pris en compte les monographies sur l'espèce *M. annua* et les larves de *T. confusum* et l'importance des composés phénoliques, leur classification, leurs activités biologiques et leur intérêt comme inhibiteurs enzymatiques.

La deuxième partie a décrit le matériel végétal et animal utilisés ainsi que la méthodologie d'identification et de quantification des polyphénols et l'évaluation de leur activité anti-oxydante, et la caractérisation par LC-MS des différents composés actifs.

La troisième partie a présenté les résultats liés à l'identification et la quantification des polyphénols, l'évaluation de leur activité, anti-oxydante. La caractérisation par LC-MS des différents composés actifs, l'activité larvicides des différents extraits de la plante contre le *T. confusum* (et) l'activité enzymatique en mesurant leur pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase des extraits. Cette troisième partie a aussi présenté la discussion des résultats.

# **Chapitre I : Synthèse bibliographique**

## I. Généralités sur *Mercurialis annua* L.

### I.1. Taxonomie et description botanique de *Mercurialis annua* L.

D'après APG IV (2016), *M. annua* est une espèce du règne des *Plantae*, sous-règne des *Tracheobionta*, de l'embranchement des *Mesangiospermae*, de la classe des *Magnoliopsida*, de l'ordre des *Malpighiales* et de la famille des *Euphorbiaceae* qui compte environ entre 5 000 et 8 000 espèces réparties en 250 genres dont les graines appréciées les insectes sont facilement disséminées dans la nature (Remy, 2017). Le genre *Mercurialis* (*Euphorbiaceae*) comprend 10 espèces principalement réparties dans les régions du bassin méditerranéen occidental. à savoir *M. annua* L. (mercuriale annuelle), *M. ambigua* qui est parfois regroupée avec *M. annua* (Tutin, et al., 1968), *M. perennis* (mercuriale vivace) et *M. tomentosa* L., *M. ovata* Sternb. et Hoppe, et *M. leiocarpa* Sieb. et Zucc., *M. corsica* Cosson, *M. elliptica* Lam., et *M. reverchonii* Rouy. (Krähenbühl et al., 2002).

Appelée mercuriale des jardins en français, annual mercury en anglais (INRA, 2000), harrigua melsa en Arabe (Lahsissene et al., 2009), *M. annua* est une plante annuelle strictement diploïde ( $2n = 16$ ) par opposition aux autres espèces du genre *Mercurialis* qui sont polyploïdes (Shafiei et al., 2006). Cette petite plante annuelle a un cycle de vie court qui dure environ 6 semaines de la graine à la graine. Avant la floraison, les plantes femelles et mâles de *M. annua* sont indiscernables et peuvent être identifiées par des marqueurs moléculaires spécifiques (Yang et al., 1998; Khadka et al., 2002). Il s'agit donc d'une plante dioïque (Figure 1), herbacée caractérisée par une hauteur allant de 10 à 60 cm, (Britton et Millspaugh, 1920; Bencivenga et al., 1979; Hanf, 1983), glabrescente, à racine pivotante, rameuse dressée, aux nœuds bien marqués, est feuillue et densément ramifiée dès la base. Les feuilles sont pétiolées, ovales, lâchement crénelées-dentées, ordinairement arrondies à la base, à pétiole court dégageant une odeur désagréable (Silberfeld, 2013).



Figure 1 : Pied femelle (Le Driant, 2010) et Pied mâle de *M. annua* (Silberfeld, 2013)

Les fleurs mâles verdâtres de petite taille montrent 8 à 15 étamines jaunâtres et sont organisées en épis axillaires (Figure 2). Les fleurs femelles verdâtres (Figure 2), ont une taille de 3 à 4 mm, peu nombreuses, en petites inflorescences axillaires (Lelong, 2008). Cependant, on peut trouver des fleurs mâles et des fleurs femelles sur le même pied : monœcie (Stichmann, 2000) et des fleurs qui disposent chacune des organes mâles et femelles : hermaphrodisme (Gillot, 1924). *M. annua* fleurit entre mai et décembre. Le fruit est une capsule large de 3 à 4 mm formée de deux coques qui contiennent deux graines, de couleur grise, chaque graine est pourvue d'une expansion charnue appelée élaïosome, qui produit une huile dont raffolent les fourmis. Cette capsule est hispide capable de s'accrocher au pelage d'un animal de passage ou aux vêtements du jardinier, participant ainsi à la dissémination de la plante (Ait-Ali et Allison, 1993). Bien que ce soit une annuelle, Mercurial a une très longue période de floraison du début du printemps au début de l'hiver. *M. annua* est anémophile (Lisci et al., 1996). La période de floraison et de maturité des graines dépend de la situation géographique. En Europe centrale et dans le nord de l'Italie, elle s'étend de mi-mars à mi-septembre, tandis que dans les pays méditerranéens du centre et du sud de l'Italie, les plantes fleurissent et produisent plus ou moins de graines toute au long l'année. (Charpin et al., 1974). Les graines sont activement collectées par les fourmis et amenées au nid, ne germant que lorsque le labour du sol détruit le nid (Pacini, 1990).





Figure 2 : a) : Détail d'un épi de fleurs mâles et b) : Détail d'une fleur femelle montrant les 2 stigmates velus surmontant l'ovaire de Mercuriale de jardins (Silberfeld, 2013).

La semence de couleur gris à brun clair est petite (1.2 - 1.8 x 2 - 2.5 mm), ovoïde et caronculée par une paroi lisse réticulée rugueuse (Ait-Ali et Allison, 1993 ; Gasquez et Lonchamp, 2013) (Figure 3).

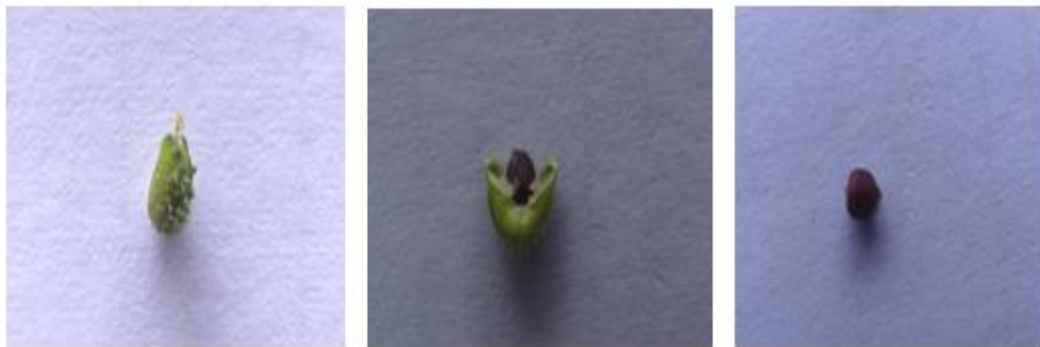


Figure 3: Graine de *Mercurialis annua* L. (Cliché personnel)

### I.1.2. Répartition géographique et écologie de *M. annua*

La mercuriale est très répandue en Europe, en Asie occidentale et en Afrique septentrionale (Layens Georges et Bonnier Gaston, 1894). C'est une espèce commune partout en France, elle est fréquente en cultures de printemps et d'été (Programme CASDAR Désherbage mécanique, 2012).

En Tunisie la *Mercurialis annua* L. est courante dans le nord, moins présente au centre du pays mais absente au Sud (Pottier-Alapetite, 1979).

Généralement les mercuriales préfèrent les milieux qui présentent une faible humidité atmosphérique voir un peu sec. De plus, ce genre de plante existe près des milieux marins où la lumière est un facteur très important pour leur développement et leur croissance (Figure 4a). D'autre part, les caractéristiques du sol ont une grande valeur pour la survie des mercuriales. En effet, elles sont mésophiles et nitrophiles et poussent mieux sur un sol à texture argileuse (Figure 4b) (Julve, 1998).

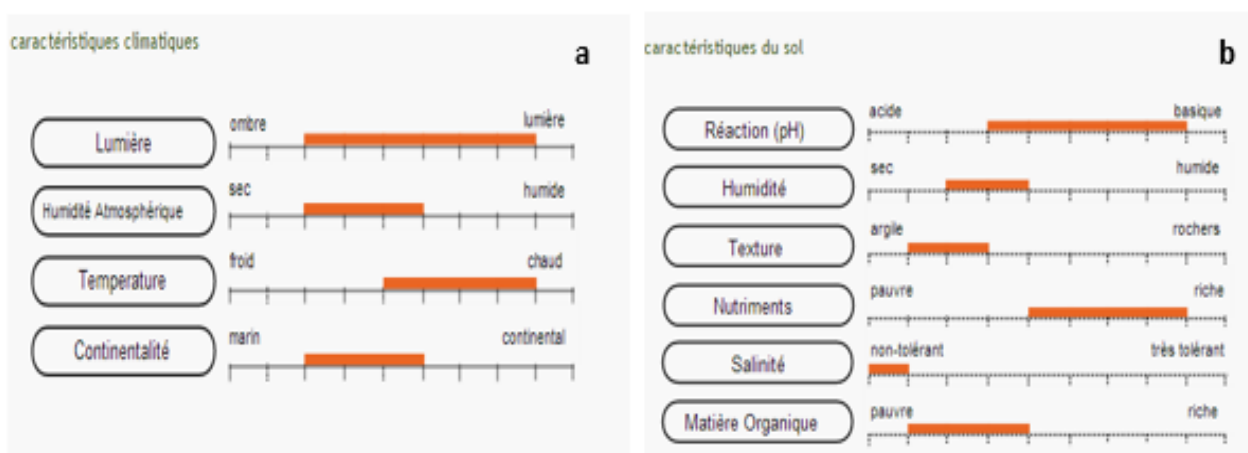


Figure 4: a) : Caractéristiques climatiques (a) et édaphiques de *M. annua* (b) (Julve , 1998)

### I.1.3. Toxicité de *M. annua*

Toute la plante femelle est toxique avec une toxicité maximale de la floraison à la formation des graines (Lelong, 2008). Cette toxicité n'est que partiellement diminuée lors de la dessiccation de la plante après coupe et séchage ( Lebeau, 2002).

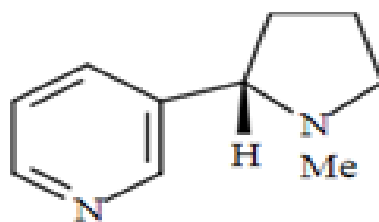
L'intoxication affecte principalement les bovins ( Lebeau, 2002). Elle attaque leur foie en provoquant une hémolyse (Pearson, 1991). Les animaux s'intoxiquent en consommant la plante fraîche ou des fourrages ou des ensilages fortement contaminés par la mercuriale (Institut de l'élevage, 2008 ; Le point vétérinaire, 1998).

En effet, les vétérinaires témoignent que *M. annua* est une source d'intoxications chez les ovins et les bovins qui deviennent atones et anorexiques, souffrant de diarrhée et d'une anémie hémolytique.

### I.3. Activités biologiques de quelques espèces d'*Euphorbeacea*

#### I.3.1. Activité larvicide

Les Euphorbiacées se caractérisent par l'activité larvicide. En effet, le latex et l'écorce de tige d'*Euphorbia tirucalli* L. montrent une efficacité contre les larves de moustiques *Culex quinquefasciatus* L. (Yadav et al., 2002). Ainsi que les extraits d'écorce et des feuilles de *Jatropha curcas* L. causent une mortalité d'*Anophélesae gyptie* et de *Culex quinquefasciatus* L. (Rahuman et al., 2008). De même, d'autres recherches ont montré que les extraits de *Jatropha curcas* L. et *Azadirachta indica* sont des larvicides prometteurs qui attaquent et luttent contre les moustiques (Agbizounon, 2010). Li et al., (2012), ont confirmé que ce sont les métabolites secondaires qui sont à l'origine de cette activité larvicide. En effet, les alcaloïdes comme la nicotine (Figure 5) empêchent la croissance des larves de tabac (Herbert et al., 1998).



Nicotine  
(*Nicotiana Tabacum*)

Figure 5 : Structure d'un alcaloïde (la nicotine) (Muniz, 2006)

### **I.3.2. Activité insecticide**

L'activité insecticide est bien connue chez la famille des Euphorbiacées ce qui la rend intéressante comme espèce insecticide. En effet, bien que *Jatropha* soit victime des insectes ravageurs, la richesse de ses graines en huiles lui permet d'être efficace contre ces insectes tels que *Callosobruchus chinensis* L. (Abdoul Habou et al., 2013).

Les travaux menés par Ratnadass et al., (1997) ont attesté l'activité insecticide d'extrait de *Jatropha curcas* L. contre *Busseolafusca*. Les extraits aqueux des différentes parties notamment les feuilles fraîches de *Jatropha* ont affiché aussi une potentialité insecticide contre les insectes *Colletotrichum gloeosporioides* et contre les maladies qu'ils causent (Ogbebor et al., 2007). Cette activité est due aux métabolites secondaires (Zobel et Brown, 1990; Li et al., 2012) telle que les alcaloïdes comme la nicotine (Herbert et al., 1998) et l'anabisine (Khodjanliyazov et al., 2012). Les flavonoïdes sont aussi des phytoalexines qui sont caractérisés par leur efficacité contre les insectes (Zobel et Brown, 1990; Maillard et al., 1996).

### **I.3.3. Activité molluscicide**

Beaucoup de recherches ont été menées sur l'effet des extraits des plantes et particulièrement des Euphorbiacées contre les mollusques. Nous pouvons citer la potentialité des extraits aqueux de latex de *Euphorbia tirucalli* L. contre les escargots d'eau douce comme *Lymnaea cuminita*, *Lymnaea natalensis*, *Biomphalaria glabrata* et *Bulinus guernei* (Yadav et al., 2002). Ces types d'extraits ont causé une mortalité totale après 7 jours d'exposition avec des concentrations, d'extraits aqueux des feuilles et des graines, qui varient entre 0.1 et 0.3 g/L (Vassiliades, 1984).

### I.3.4. Activité antimicrobienne

Cette propriété est aussi un sujet d'étude par les chercheurs. En effet, l'espèce d'*Euphorbia tirucalli* L. et grâce à ses extraits implique une activité antimicrobienne in vitro sur des bactéries Gram négatives et Gram positives ainsi que sur le virus Herpès simplex (Yadav et al., 2002). De façon générale, les métabolites secondaires se considèrent comme la clé voûte du système d'interactions entre les plantes et leur environnement (Zobel et Brown, 1990).

En effet, les terpénoïdes (exemple : la buteline) (Rosine, 2009) (Figure 6), les alcaloïdes (Lazar, 2005) et les flavonoïdes (Maillard et al., 1996), présentent des potentialités antiseptiques (Heim et al., 2002) contre les bactéries ( Zobel et Brown, 1990) et les virus (Allinger, 1977; Nkhili, 2009). Les tanins (surtout les tanins condensés) possèdent des activités antibactérienne et antiviral (Fukai et al., 1991; Romani et al., 2006).

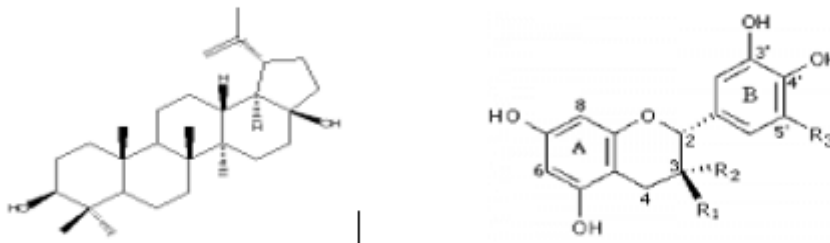


Figure 6 : Structure d'un terpénoïde (la buteline) (Rosine, 2009) et d'un tanin condensé ( Guignard, 1996).

### I.3.5. Activité antifongique

L'activité antifongique a fait l'objet de plusieurs recherches (Hmiri et al., 2011; Mohammedi, 2013; Stojković et al., 2013) afin d'améliorer les conditions de conservation des denrées alimentaires.

Les huiles essentielles de *Drypetes gossweileri* montrent une efficacité à l'égard des champignons de *Trichophyton rubrum* et leur utilisation est connue depuis longtemps (Ndoye Foe et al., 2016). De plus, Banzouzi et al., (2002) ont prouvé que l'espèce d'*Alchornea cordifolia* affiche une activité anti-fongique sur *Microsporium canis* et *Trichophyton mentagrophytes*. Les métabolites secondaires qui sont considérés comme phytoalexines sont impliqués dans la défense contre les champignons (Zobel et Brown, 1990). Les flavonoïdes (Maillard et al., 1996), les terpénoïdes et les polyphénols sont bien connus par cette propriété antifongique (Rosine, 2009).

## **II. Composés phénoliques et quelques activités dépendantes**

Selon l'affiliation chimique, il existe plus de 200000 types de métabolites secondaires, terpènes, alcaloïdes, composés acétyléniques, cires et composés phénoliques (Vermerris et Nicholson, 2006).

### **II.1. Composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires et constituent l'un des groupes les plus représentatifs du règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques.

Ils constituent un groupe de substances diverses et omniprésentes. Ceux-ci incluent les flavonoïdes, les tanins, les dérivés de phénylpropanoïdes (lignanes, esters et amides d'acide hydroxybenzoïque), stilbénes, la coumarine, l'acide hydroxybenzoïque et de nouveaux composés sont constamment découverts (Marouf et Vallaade, 2000; Hopkins, 2015; Georgé et al., 2005). Bien qu'ils soient très divers, ils partagent tous un ou plusieurs cycles benzéniques avec une ou plusieurs fonctions hydroxyle.

Ils sont divisés en plusieurs catégories : les acides phénoliques, les flavonoïdes, les tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes, les lignanes avec les isoflavones sont nommés phyto-oestrogènes (SFA, 2005).

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette basique. Ces structures peuvent être sous forme libre ou liées à des esters ou hétérosides (Bruneton, 1999). Ils peuvent être divisés en plusieurs classes (Tableau 1, Figure 7), et leurs squelettes de base varient en complexité allant des simples phénols C<sub>6</sub> aux flavonoïdes C<sub>15</sub> et aux molécules proches. Puis en modifiant le degré de la chaîne principale (degré d'oxydation, degré d'hydroxylation et degré de méthylation, etc.). Enfin, ces molécules basiques peuvent être associées à d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc) (Beta *et al.*, 2005; Herbert Baxter *et al.*, 1998; Macheix *et al.*, 2005).

**Tableau 1: Les principales classes de composés phénoliques (Harborne, 2000; Macheix *et al.*, 1990)**

Squelette carboné	Classe	Exemple	origine
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Catéchol	
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	<i>p</i> -Hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acides hydroxycinnamiques Coumarines	Acides caféique, férulique Scopolétine, esculétine	Citrus Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> <li>• Flavonols</li> <li>• Anthocyanes</li> <li>• Flavanols</li> <li>• Flavanones</li> </ul> Isoflavonoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Déidzéine	Fruits, légumes, fleurs Fleure, fruits rouges Pomme, raisin Citrus Soja, pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lingnanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyau des fruits
(C <sub>15</sub> ) <sub>n</sub>	Tannins		Raisin rouge, Kaki

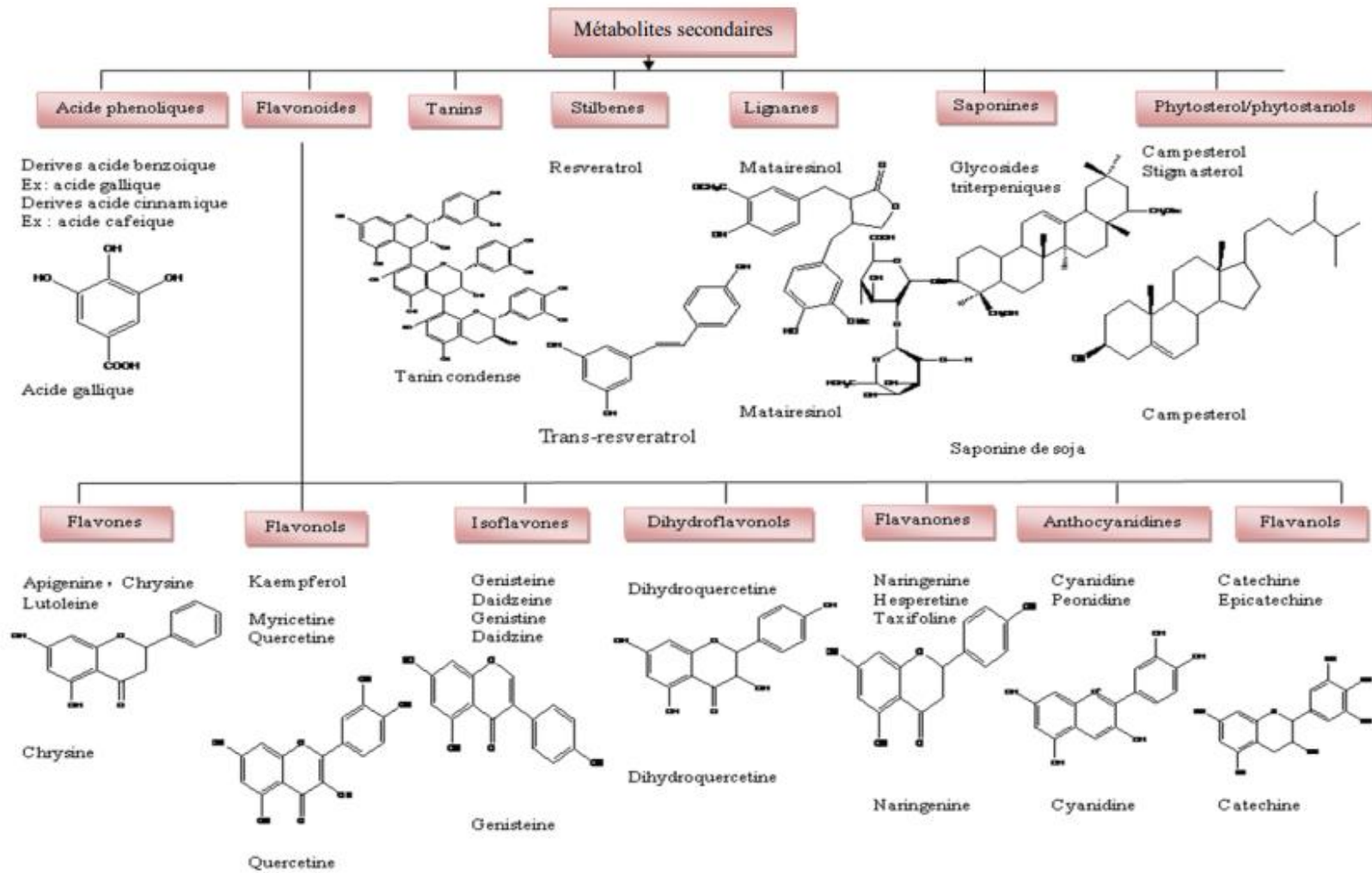


Figure 7 Classification des composés phénoliques



## II.2. Effets biologiques des polyphénols

Les polyphénols ont une variété d'activités biologiques (Figure 8), en fonction de leur structure chimique. Ils constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes, contenant plus de 6000 molécules. Ils sont différents des antioxydants synthétiques, tels que butylhydroxyanisole (BHA) et butylhydroxytoluène (BHT). Les polyphénols sont inoffensifs pour la santé humaine (Bounatirou *et al.*, 2008). Ces composés ont des effets anticancéreux, anti-inflammatoires, anti-athéroscléreux, anti-thrombotiques, analgésiques, antibactériens, antiviraux et anticancéreux (Ali *et al.*, 2007), anti-allergènes et vasodilatateurs (Falleh *et al.*, 2008) et des antioxydants (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

En effet, ils sont de plus en plus utilisés en thérapie (Crozier *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré que les polyphénols sont impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Manach *et al.*, 2005).

Les polyphénols agissent, aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire, qui est impliquée dans le phénomène de thrombose, qui entraîne une occlusion artérielle (Manach *et al.*, 2005). Ils sont classés comme des veinotoniques et des vasculo-protecteurs (Ghosh et Scheepens, 2009). Certains polyphénols font également l'objet d'études cliniques comme des antiagrégants plaquettaires, ou hypotenseurs sans résultats probants (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

Les polyphénols peuvent également contrôler la croissance et le développement des plantes en interagissant avec diverses hormones de croissance des plantes. Ils permettent aux plantes de résister aux rayons ultraviolets. Certains d'entre eux agissent comme des phytoalexines, comme l'alcool isoflavone, pour lutter contre les infections causées par des champignons ou des bactéries (Makoi et Ndakidemi, 2007). Les pigments non azotés sont impliqués dans le processus de pollinisation : ils attirent l'attention des insectes pollinisateurs ou, au contraire, ils sont utilisés pour dessiner des formes pour résister aux prédateurs.

D'autres sont des inhibiteurs enzymatiques, impliqués dans la protection des humains contre certaines maladies (Bruneton, 1999). Les polyphénols sont également utilisés comme additifs, pigments, arômes ou conservateurs dans l'industrie alimentaire (Bruneton, 1999).

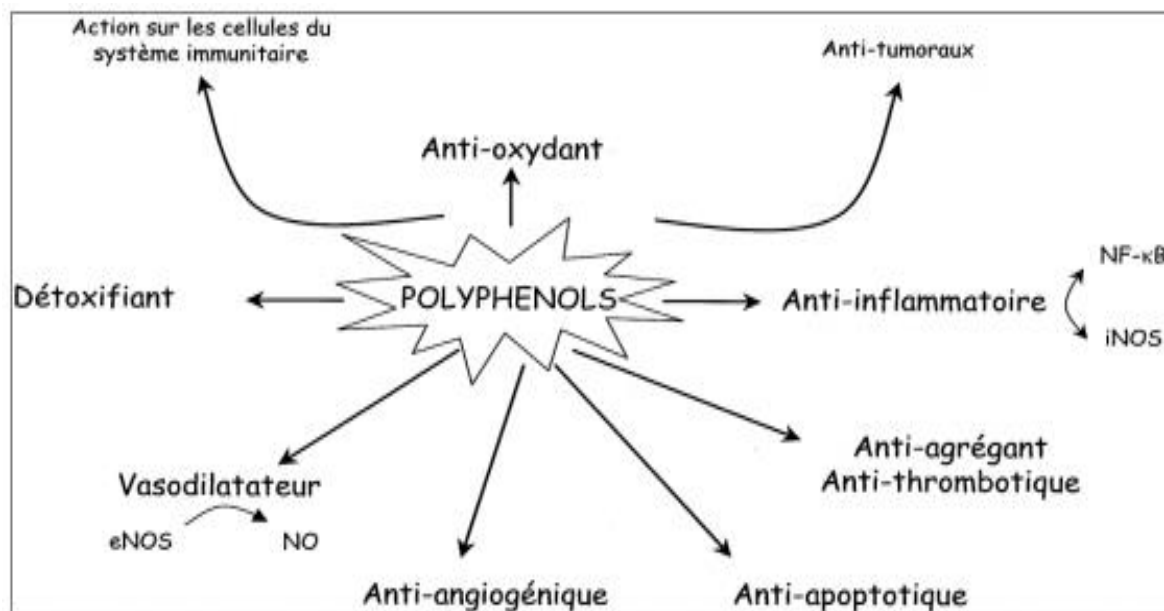


Figure 8: Effets biologiques des polyphénols (Martin and Andriantsitohaina, 2002).

### II.3. Activité anti-oxydante des polyphénols

Les antioxydants biologiques ont été définis comme des composés qui protègent les systèmes biologiques contre les effets potentiellement nocifs des processus ou des réactions susceptibles de provoquer une oxydation excessive. Notre corps est riche en antioxydants endogènes et des antioxydants exogènes peuvent être trouvés dans la nature (Retter et al., 1996). Les réactions biochimiques dans le corps humain produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des radicaux libres. Ces radicaux libres peuvent oxyder et endommager l'ADN et les protéines, entraînant certaines maladies. Les effets destructeurs des radicaux libres peuvent être évités par des antioxydants, qui peuvent neutraliser les radicaux libres et éliminer leurs effets destructeurs sur les composants cellulaires.

Les flavonoïdes sont des composés ayant une activité anti-oxydante évidente (Hodek et *al.*, 2002). Les flavonoïdes expriment des propriétés anti-oxydantes majoritairement de la manière suivante : capturent directement les ERO, suppriment leur formation en inhibant certaines enzymes pro-oxydantes ou en agissant comme des chélateurs d'ions métalliques, (Boudiaf, 2018).

#### **II.4. Activités enzymatiques des polyphénols**

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs d'une variété d'enzymes impliquées dans divers mécanismes biologiques. A titre exemple, l'histidine inhibe la décarboxylase, l'élastase, la hyaluronidase et la phosphodiesterase de l'AMPC. Ils peuvent également prévenir ou au moins réduire le diabète en inhibant l'aldose réductase (Chaudhry et *al.*, 1983).

Certains flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires importantes qui leur permettent d'inhiber la biosynthèse des prostaglandines par l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans leur biosynthèse (lipoxygénase, phospholipase, cyclooxygénase).

De nombreux agents peuvent inhiber la réplication du rétrovirus du SIDA en inhibant la transcriptase inverse. Les flavonoïdes se sont avérés être de bons inhibiteurs de cette enzyme (Spedding et *al.*, 1989). Les flavonoïdes, *in vitro*, sont des inhibiteurs d'enzymes, tels que l'élastase et la collagénase qui sont des inhibiteurs efficaces de la 5-lipoxygénase. De même la lutéoline et l'apigénol inhibent la cyclooxygénase et donc la biosynthèse des prostaglandines. Cela peut expliquer l'activité anti-inflammatoire des flavonoïdes (Bruneton, 1999). Cet effet est attribué à l'inhibition de certaines enzymes impliquées dans leur biosynthèse (lipoxygénase, phospholipase, cyclooxygénase) (Potapovich et *al.*, 2011). L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes, telles que la quercétine, est attribuée à leurs efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (Hodek et *al.*, 2002).

Les flavanols (catéchines et procyanidines) peuvent modifier l'expression de nombreux gènes régulés par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Hodgson et Croft, 2010; Potapovich *et al.*, 2011). Les flavonoïdes possèdent une vaste gamme d'activité inhibitrice. De nombreuses enzymes de mécanismes catalytiques différents sont effectivement inhibées par ces molécules. Il s'agit d'hydrolases, d'oxydoréductases, d'ADN synthétases, d'ARN polymérases, des phosphatases, des protéines kinases, d'oxygénases, d'acide aminé oxydases Isomérases, Ligases et Lyases (Havsteen, 2002).

D'après Joukoff, (2016) un inhibiteur enzymatique est une substance qui se lie à une enzyme et qui en diminue son activité, soit en rendant l'enzyme inactive soit en empêchant les substrats de créer des liaisons sur son site de fixation.

En effet, certains inhibiteurs s'associent de manière réversible à l'enzyme en interagissant de manière non covalente :

Elle correspond à une liaison non covalente et peu stable entre l'enzyme et son inhibiteur ; l'enzyme n'est donc pas totalement inhibée. Il existe plusieurs types d'inhibiteurs : compétitifs, incompétitifs, non-compétitifs et mixtes (Wienkers et Heath, 2005; Pelkonen *et al.*, 2008).

D'autres se fixent de manière irréversible et sont souvent utilisés pour déterminer les groupes actifs du site catalytique. En effet l'enzyme reconnaît l'inhibiteur comme son substrat et va entamer son action catalytique. L'inhibiteur est dit inhibiteur suicide et inactive l'enzyme de façon permanente. Ce type d'inhibition est appelée « mechanism-based inhibition » (MBI) (Riley *et al.*, 2007).

Le design d'inhibiteur repose actuellement sur le postulat de Pauling (1946) qui suggère que les enzymes sont des molécules dont la structure est complémentaire de celle des complexes activés des réactions qu'ils catalysent, c'est-à-dire de la configuration moléculaire intermédiaire entre celles des substrats et celles des produits de réactions des processus catalysés.

Cette théorie, reprise par Jencks en 1983, propose l'existence d'inhibiteur d'enzyme fonctionnant comme anti-AChE

#### **II.4.1. Activité anti-acétylcholinestérase**

##### **II.4.1.1. Maladie d'Alzheimer**

Dès 1906, le médecin allemand Alois Alzheimer découvrit la maladie d'Alzheimer. Il s'agit d'une maladie neurodégénérative (perte progressive de neurones) du tissu cérébral, entraînant une perte progressive et irréversible de la fonction mentale et de la mémoire. C'est la forme la plus courante de démence chez l'Homme.

À ce jour, la maladie d'Alzheimer est toujours incurable. Cependant, afin de ralentir la progression de cette maladie, il est possible d'augmenter le taux d'acétylcholine dans le cerveau grâce aux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. En effet, les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer ont des taux d'acétylcholine particulièrement bas, ce qui peut expliquer les troubles cognitifs observés. L'acétylcholine est un neurotransmetteur présent dans les synapses. Il peut dépolariser la membrane et transmettre des impulsions à la jonction neuromusculaire. L'enzyme qui provoque l'équilibre nerveux est l'acétylcholinestérase. Ce dernier assure la libération de la fente synaptique en dégradant l'acétylcholine résiduelle sur le récepteur post-synaptique pour une nouvelle propagation (Figure 9). Ensuite, la solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique est de réduire sa dégradation en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton et al., 2006a). Des recherches récentes convergent vers cet objectif afin de trouver des composés qui peuvent remplacer l'acétylcholine et inhiber l'activité enzymatique. Les médicaments disponibles sur le marché agissent sur cette activité cholinergique en inhibant la décomposition de l'acétylcholine.

Jusqu'à présent, la Food and Drug Administration des États-Unis a approuvé quatre inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, la tacrine, le donepezil, la rivastigmine et la galantamine.

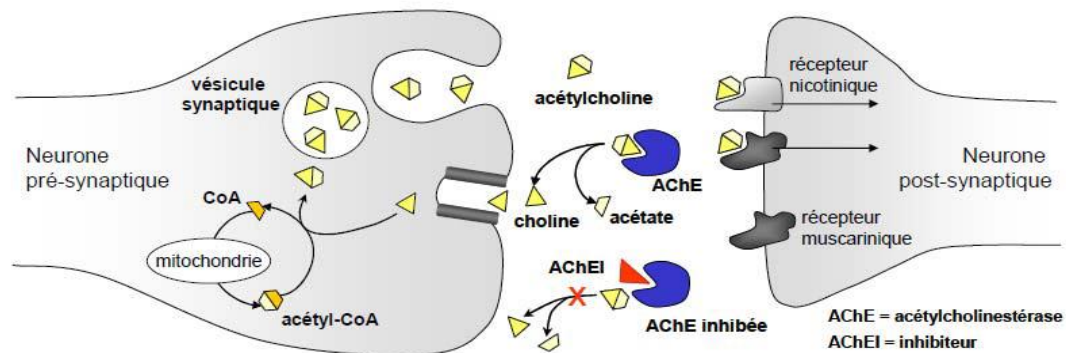


Figure 9: Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique. (Urbain, 2007)

Il est nécessaire de développer de nouveaux réactifs qui inhibent l'acétylcholinestérase. Dans la pratique traditionnelle, de nombreuses herbes ont été utilisées pour traiter les maladies cognitives, y compris les maladies neurodégénératives et diverses maladies neuropharmacologiques. La capacité de certaines herbes et de leurs composés phytochimiques à inhiber l'acétylcholinestérase a été étudiée.

L'étude de l'activité inhibitrice de l'AChE évaluée à l'aide du test d'Ellman a prouvé pour la première fois que l'acide chlorogénique et les catéchines sont des inhibiteurs efficaces de l'acétylcholinestérase. De plus, la galantamine est un alcaloïde isolé à partir de plantes de la famille des Amaryllidaceae qui est souvent utilisée pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (Ouattara et al., 2013).

#### II.4.1.2. Principe du test d'Ellman

Le test d'Ellman a évalué la capacité du composé à inhiber l'AChE. Il s'agit d'un protocole standard qui permet la détermination des mercaptans libres (Figure 9). Le test d'Ellman est basé sur le clivage de l'AChE l'acétylcholine pour produire de la thiocholine.

Ce dernier réagira avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former un anion jaune. Cette réaction est illustrée à la figure 10.

En présence d'inhibiteurs enzymatiques, la réaction permet d'étudier les paramètres cinétiques puis de quantifier l'inhibition exprimée par sa CI50 (la concentration réduit de moitié l'activité enzymatique) (Ellman *et al.*, 1961).

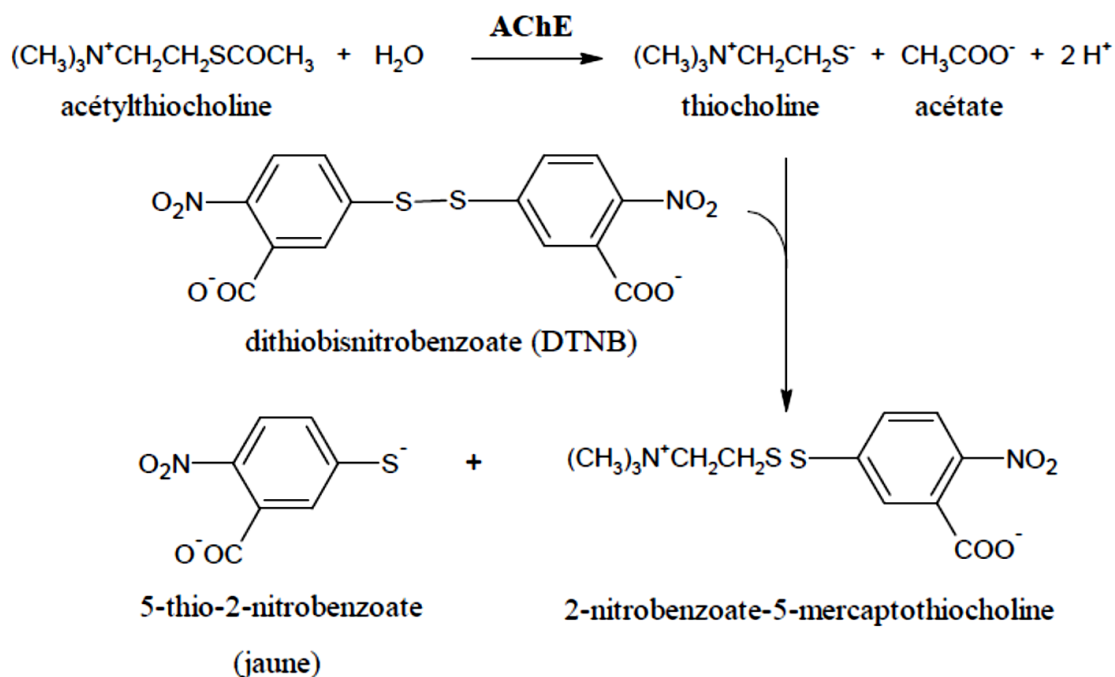


Figure 10: mécanisme de dosage de l'activité AChE en utilisant le DTNB et le thionitrobenzoate Réaction colorimétrique d'Ellman

### II.4.1.3. Modélisation

Le criblage virtuel (docking) est une méthode utilisée avec des logiciels spéciaux, qui constitue un ensemble de programmes informatiques mathématiques spécifiquement conçus pour la chimie pharmaceutique. Cette suite est basée sur une collection de type cible protéique (enzyme) et de famille d'inhibiteurs ou d'activateurs (ligand). Dans la plupart des cas, il est nécessaire d'appliquer différentes procédures pour optimiser les résultats et mener une étude complète pour observer l'interaction entre le ligand et l'enzyme (Sólyom *et al.*, 2014).

Généralement, le criblage virtuel est une méthode d'évaluation biologique du criblage réel, qui permet de vérifier le mode de liaison et la position d'un nombre illimité et variable de molécules dans le site actif d'une enzyme. Cela rend cette méthode très utile et essentielle en chimie médicinale, et peut en effet être utilisée comme indicateur de composés qui interagissent avec les protéines (Sólyom et *al.*, 2014). Par conséquent, le docking vise à évaluer deux structures chimiques différentes, un ligand et un récepteur, et à étudier leur adéquation. De plus, nous avons l'opportunité d'étudier l'environnement des acides aminés auquel le ligand peut s'adapter. D'autre part, comme tout autre programme, le docking a ses inconvénients. Il ignore toute déformation sur l'enzyme lors du processus de cristallisation ou sur la protéine lors de la liaison du ligand (Arrault, 2007). Mais nous pouvons résoudre ce problème en utilisant des logiciels spécifiques pour minimiser l'énergie de la protéine.



### **III. Généralité sur *Tribolium confusum* (Du Val)**

Le *Tribolium* rouge de la farine (*T. confusum*) appartient à la famille des *Tenebrionidae*. C'est un coléoptère de taille qui varie entre 2 et 80 mm de long, de forme très variée, à téguments le plus souvent rigides, épais, noir mat ou luisant, de teinte sombre, coloré ou « métallique » par interférence, avec des yeux généralement grands, ovales ou ronds. Les antennes de 11 articles, avec nervation alaire du type primitif (Balachowsky, 1962).

*Tribolium confusum* est d'origine Indo-Australienne (Smith et Whitman, 1992) et/est trouvé dans des zones tempérées, mais survivra l'hiver dans les endroits protégés, particulièrement où il y a de la chaleur (Tripathi et al., 2003). En Afrique, le *Tribolium* a une distribution différente par rapport à celle des climats les plus frais (Smith et Whitman, 1992).

Selon Majka et al., (2008), cette espèce a la position systématique suivante :

**Régne : *Animal***

**Embranchement : *Arthropode***

**Classe : *Insectes***

**Ordre : *Coleoptera***

**Sous Ordre : *Polyphaga***

**Superfamille : *Tenebrionoidea***

**Famille : *Tenebrionidae***

**Tribu : *Triboliini***

**Genre : *Tribolium***

**Espèce : *Tribolium confusum* (Du Val)**

Le cycle de vie de *T. confusum* comporte quatre phases qui sont l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago (l'adulte) (Figure 11). La durée du cycle de développement varie de 24 à 26 jours (Lepesme, 1944).

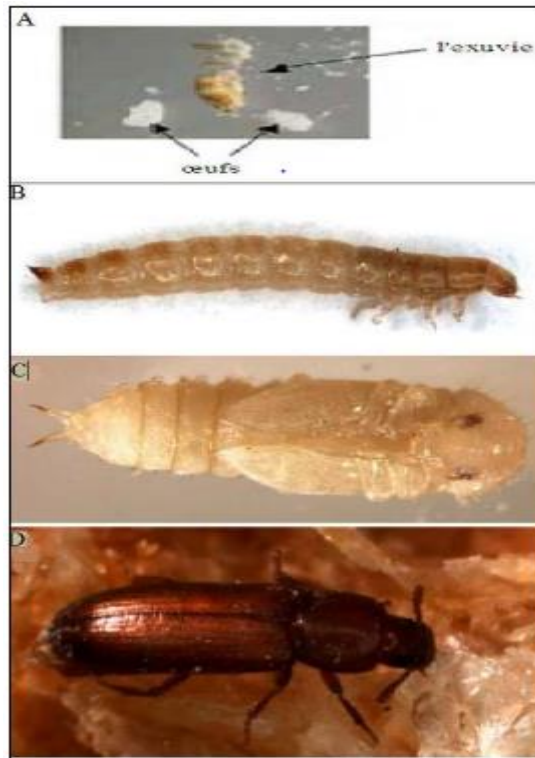


Figure 11: différents stades de développement de *T. confusum* (Duval.) A : l'oeuf (Rebecca et Thomas, 2003) ; B : larve, C : nympe, D : adulte (Walter, 2002)

D'après Scotti, (1978), *T. confusum* est un ravageur polyphage et cléthrophage secondaire, car les larves et les adultes se nourrissent surtout de la farine des céréales. Ils attaquent les grains endommagés et escortent souvent les charançons ou parachèvent leurs dégâts.

### III.1. Méthodes de lutte contre le *Tribolium confusum* (Du Val)

#### III.1.1. Lutte préventive et curative

La lutte préventive comprend l'hygiène rigoureuse des moyens de transport, des locaux de stockage, des installations de manutention et des machines de récolte. Il est très important d'isoler les nouvelles récoltes des anciennes cultures dans l'entrepôt (Kellouche, 2005) .

La lutte curative, quant à elle, son but est de prévenir le développement de ravageurs et de maladies dans le stockage des aliments lors de l'infestation et avant d'atteindre un stade irréversible plus complexe.

### **III.1.2. Lutte par actions physique**

La lutte physique est une méthode qui utilise des agents physiques (mouvement, chaleur, lumière, froid, eau, électricité, radiation...) pour réduire au maximum l'activité biologique des ravageurs des semences. Selon Labeyrie (1962), maintenir un entrepôt de stockage à une température de -1 ° C pendant un mois peut entraîner la mort d'adultes. L'exposition des graines aux radiations ultra-violettes de longueur d'onde inférieure à 3126 Å° peut provoquer la mort des œufs et des larves de premier stade, et produire des individus anormaux après l'émergence (Labeyrie, 1962).

### **III.1.3. Lutte par produits de synthèses**

Pour la lutte chimique, Hall, (1970), Haubruge et *al.*, (1988) et Redlinger et *al.*, (1988), montrent que le moyen de protection le plus efficace est l'utilisation de pesticides de synthèse. Ainsi, les phosphates organiques, les pyréthrinoïdes de synthèse et les produits à base de principes actifs appartenant à ces deux familles sont souvent utilisés comme pesticides (Gwinner et *al.*, 1996). Le traitement généralement employé est le traitement par contact qui consiste à recouvrir les grains, l'emballage ainsi que les locaux de stockage d'une pellicule de produit insecticide qui agit par contact sur les prédateurs dont l'effet est plus ou moins rapide avec une persistance d'action plus longue (Cruz et *al.*, 1988) tel que les pyréthrinoïdes de synthèse en provoquant souvent effet de choc sur les insectes comme *Tribolium castaneum*.

### **III.1.4. Lutte par produits naturels**

Les produits naturels d'origine végétale comme des poudres minérales des huiles végétales et des huiles essentielles issues du phénomène de la phytothérapie (Padin et *al.*, 1997).

À l'heure actuelle, en raison de ses avantages environnementaux économiques et agricoles, la lutte biologique est la méthode la plus favorisée dans les programmes de recherche et ceci pour son maintien de l'équilibre bioécologique.

Les huiles essentielles extraites des feuilles des plantes présentent également des propriétés insecticides très intéressantes, qui permettent de lutter contre divers insectes nuisibles pour les stocks des denrées alimentaires (Kellouche, 2005; Tapondjou et *al.*, 2003). Plusieurs huiles essentielles, poudres et autres extraits de plantes ont été évalués pour leur activité insecticide contre divers ravageurs des céréales et des légumes, exemple l'application des extraits de quelques plantes aromatiques et leurs huiles essentielles pour lutter contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) (Bouchikhi, 2014).

Aussi Boukhalfa et Rouabah, en 2020 ont utilisé différents extraits et huiles essentiels de la famille de *Lamiaceae*, de *Myrtaceae*, de *Poaceae* et de *Astéracées* pour lutter contre quelques coléoptères (*Sitophilus granarius*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium Confusum* et *Tribolium castaneum* Herbst ) et lépidoptères (*Ephestia cautella* (Walker), *Plodia interpunctella* et *Sitotroga cerealella* (Olivier))

Ce type d'activité biologique des huiles essentielles sur les insectes phytophages s'exerce à plusieurs niveaux et réduit le renouvellement des générations. Différents extraits des plantes comme le Romarin utilisé à une dose de 8 g/ml s'est montrée efficace contre le *Tribolium confusum*. Après 15 jours d'exposition au traitement, le taux de mortalité dépassait les 40%. De même, l'eucalyptus a présenté un taux de mortalité de plus de 50% après avoir été exposé au traitement pendant 15 jours, pour une dose de 8 g /ml. Pour le *Marrubium vulgare* le taux de mortalité dépassait les 80% pour les mêmes doses (Regnault-Roger et *al.*, 2008).

### **III.1.5. Lutte biologique**

La base de la lutte biologique est d'utiliser des organismes vivants pour réduire le nombre d'agents pathogènes, réduisant ainsi les dommages aux cultures. Les champignons, les nématodes, les bactéries, les insectes, tous les êtres vivants sont des prédateurs potentiels de parasites et de ravageurs (Anonyme, 1981).

Cette méthode s'inscrit dans le cadre du développement durable et de la protection des écosystèmes. Son objectif est de réduire la population de ravageurs en utilisant des ennemis naturels (prédateurs, parasites ou pathogènes),

# **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

## I. Echantillonnage

Les travaux se sont déroulés en deux temps avec une phase de terrain et une phase au laboratoire. Concernant la phase de terrain, elle a consisté à la collecte des feuilles, des graines, des tiges et des racines des deux pieds mâles et femelles de l'espèce étudiée *M. annua*. Nos expérimentations ont été conduites au Laboratoire de Chimie et Physique Approche Multi-échelles des Milieux Complexes (LCP-A2MC) à l'Université de Lorraine (France) et à la Faculté des Sciences de Bizerte (Tunisie). L'identification des pieds mâles et des pieds femelles de l'espèce végétale et de l'insecte étudiés a été réalisée au sein du Laboratoire de Toxicologie Végétale et Microbiologie Environnementale à l'Institut Nationale des Recherches de Tunis (INRAT).

Les pieds mâles et femelles de *M. annua* ont été récoltés entre décembre 2015 et février 2016 dans quatre régions tunisiennes différentes : du nord-est au nord-ouest du pays et appartenant à différents étages bioclimatiques allant du subhumide au semi-aride. Ces provenances sont Bizerte (B), Béja (Be), Jendouba (J), Nabeul (N). (Figure39). Ensuite, les feuilles, les graines, les tiges et les racines des plantes ont été séchées à température ambiante à l'abri de la lumière et ont été réduites en poudre (Tableau 2).

Tableau 2 : Données sur les sites d'échantillonnage du *M. annua*

Localisation	Nom du site	Coordonnées géographiques	Altitude (m)	Etage bioclimatique
Nord	Bizerte	Latitude 37°16' "N Longitude 9°52' " E	33	Subhumide
Nord-Ouest	Beja	Latitude 36°43'31''N Longitude 9°11'31''E	212	Subhumide
Nord-Ouest	Jendouba	Latitude 36° 30' 02''N Longitude 8° 46' 51'' E	141	Subhumide
Nord -Est	Nabeul	Latitude 36°27'15''N Longitude 10°44'05''E	12	Semi-aride

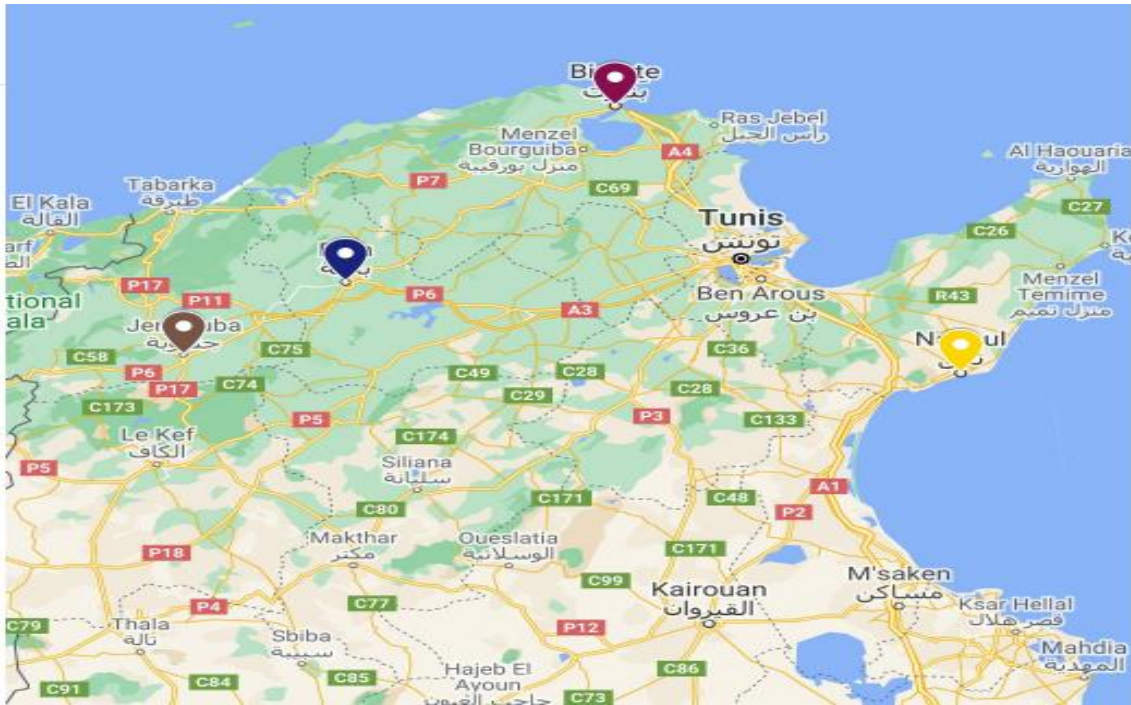


Figure 12: localisation des sites de collecte de *M. annua* en Tunisie.

## I.1. Matériel

### Préparation de la poudre

Le matériel végétal a été séché à température ambiante à l'abri de la lumière et a été réduit en poudre par un broyeur ultracentrifuge de modèle Retsch ZM 200 (Haan, Allemagne), d'une capacité de 900 ml avec un tamis annulaire de 1 mm et une vitesse de broyage variable. L'ultracentrifuge ZM 200 est un broyeur à rotor à grande vitesse de haute performance.

#### I.1.1. Les feuilles

Après la récolte, les feuilles de l'espèce étudiée ont été lavées avec de l'eau distillée et séchées à l'obscurité pour éviter la perte de substances actives. Le séchage doit être fait dans un endroit protégé pour éviter la contamination causée par la poussière, les insectes ou les rongeurs. Les feuilles sont étalées finement pour optimiser le séchage et éviter la moisissure.



Après séchage, Ces dernières ont été broyées dans un broyeur à marteaux. Les 500 grammes de poudre obtenus par chaque région sont stockés dans de petits sacs en plastique, étiquetés en fonction de leur source, puis conservés dans un endroit frais.

### **I.1.2. Les tiges et les racines**

Après la récolte, On a immédiatement retiré la saleté des tiges et des racines avec de l'eau du robinet, puis on les a lavés avec de l'eau distillée. Ils seront ensuite séchés dans une chambre aérée.

Une fois les racines sèches, on les a coupées en petits morceaux et on les a écrasées. On conserve 500 grammes de poudre provenant de chaque région, après les avoir étiquetés en fonction de leur source et les stocker dans un endroit frais jusqu'à utilisation

### **I.1.3. Les graines**

Les graines du *Mercurialis annua* L. sont de très petite taille, elles ont été séchées à l'abri puis elles ont été broyées jusqu'à l'obtention de 200 grammes de poudres sous forme de pâte.

## **I.2. Préparation des extraits**

Les extractions hydro-méthanoliques de tous les échantillons de poudre ont été réalisées sous agitation, 2 g de chaque fraction ont été macérés dans 20 ml de méthanol/eau (70/30) pendant 24 h à température ambiante sous agitation.

L'agitation joue un rôle important dans l'extraction, par le solvant, des composés actifs car elle augmente le contact entre le substrat végétal et le solvant, ce qui contribue à détruire le substrat et les cellules contenant les produits actifs. D'après Čujić et al., (2016), la macération est une méthode d'extraction douce et efficace.

L'avantage de la macération est généralement la protection de la plante ou, au contraire, sa décomposition. Elle consiste à laisser tremper un végétal dans l'eau froide (quelquefois salée) pendant plusieurs heures, jours, ou alors semaines.

Ensuite, les extraits hydro-méthanoliques ont été centrifugés à 4000 tr / min pendant 30 min. Le surnageant a été recueilli, filtré à travers des filtres en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 45 µm et stockés dans des Vials en verre fumé à -4°C jusqu'à l'analyse (Roby et al., 2013).

## **II. Dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes totaux et évaluation de l'activité anti-oxydante**

### **II.1. Méthodes d'analyse**

La spectroscopie UV-Visible peut obtenir des informations qualitatives sur la nature des liaisons dans un échantillon et peut déterminer quantitativement la concentration de substances absorbantes dans la gamme spectrale. Ce type de spectre est non destructif et rapide, et a été largement utilisé dans le travail chimique réel et l'analyse chimique ou biochimique (Antoine, 2012). En effet, cette méthode sera utilisée pour doser les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et les tanins totaux, et peut également être utilisée pour évaluer l'activité anti-oxydante.

Le spectrophotomètre est un instrument largement utilisé en biologie, chimie, recherche clinique et environnementale. Il peut mesurer les propriétés de la lumière dans une partie spécifique du spectre électromagnétique et est généralement utilisé dans l'analyse spectrale pour identifier les matériaux (Butler et Laqua, 1995).

La spectrophotométrie est utilisée pour mesurer l'absorbance dans la gamme UV / visible. La spectrophotométrie d'absorption ultraviolette-visible peut être utilisée pour une mesure quantitative.

L'absorbance du composé est analysée quantitativement en appliquant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \text{Log} (I_0/I) = \varepsilon \cdot L \cdot C$$

- A : Absorbance exprimé en unité arbitraire (u.a.),
- $I_0$  : Intensité lumineuse incidente,
- I : Intensité lumineuse transmise par l'échantillon,
- $\varepsilon$  : Coefficient d'extinction molaire,
- L : Largeur de la cuve,
- C : Concentration de la solution.

## **II.2. Quantification du contenu phénolique total (PPT)**

Les teneurs phénoliques totaux (PPT) ont été déterminées selon la méthode de Mousavi *et al.*, (2019) en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu

La méthode des réactifs de Folin-Ciocalteu pour la détermination des polyphénols totaux a été décrite dès 1965 (Singleton et Rossi.). Depuis lors, son utilisation a été largement utilisée pour caractériser des extraits de plantes provenant de diverses sources (Boizot et Charpentier, 2006). Ce réactif est également connu sous le nom de réactif phénolique de Folin ou réactif de Folin-Denis, également appelé équivalent d'acide gallique (GAE), qui est utilisé pour la détermination colorimétrique *in vitro* d'un mélange d'antioxydants phénol et polyphénol.

C'est un acide jaune constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il peut être réduit par les polyphénols pour former un complexe molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) -tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). Bleu fixe. L'absorption maximale de la couleur produite est comprise entre 725 et 750 nm, ce qui est proportionnel à la teneur en polyphénols des extraits végétaux.

Le composé de référence utilisé dans cette méthode est l'acide gallique. La coloration de la solution à 760 nm est proportionnelle à la quantité d'acide gallique ou de polyphénols présents dans l'extrait en standard.

Brièvement, 500 µl de réactif Folin – Ciocalteu (1 N) ont été ajoutés à 100 µl de chaque extrait, qui ont été dilués avec 5 ml d'eau distillée. Après 5 minutes, 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7%) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à température ambiante. Après 60 min, l'absorbance a été mesurée à 725 nm par rapport au blanc (méthanol).

Le composé de référence utilisé dans cette méthode est l'acide gallique. La coloration de la solution à 760 nm est proportionnelle à la quantité d'acide gallique ou de polyphénols présents dans l'extrait en standard.

Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant différentes solutions méthanoliques d'acide gallique comme étalon (0,75, 1,5, 2,56, 3,01, 3,77 et 4,5 mg / ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg GAE / g MS).

(Figure 13).

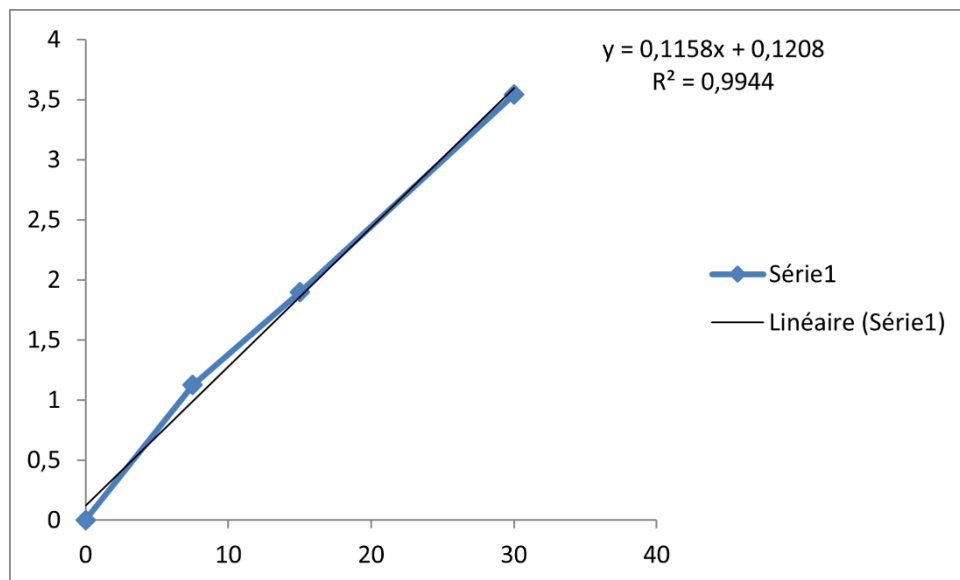


Figure 13: courbe d'étalonnage d'Acide Gallique

### II.3. Quantification du contenu total des flavonoïdes (FVT)

Les flavonoïdes totaux (FVT) ont été estimés par des dosages colorimétriques décrits par Chen et Chen, 2011 avec une légère modification. La concentration de flavonoïdes totaux a été mesurée par la méthode colorimétrique du chlorite d'aluminium. Brièvement, 100 µl d'extraits ont été ajoutés dans un ballon contenant 6 ml d'eau distillée. Ensuite, 300 µl de NaNO<sub>2</sub> à 5% ont été ajoutés au ballon. Après 5 min, 300 µl d'AlCl<sub>3</sub> à 10% ont été ajoutés. Finalement, après 6 minutes, 2 ml de NaOH 1 M ont été ajoutés. La solution a été bien agitée et l'absorbance a été mesurée à 510 nm avec un spectrophotomètre spectrophotomètre UV-visible Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, Californie, USA).

Le mécanisme de la coloration de la réaction est expliqué par (Zhu et al., 2010).

Le réactif est une solution incolore de nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>, 5%) et de chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>, 10%). La réaction d'oxydation des flavonoïdes conduit à la formation de complexes absorbant à 510 nm. Ce test compare la D.O observée avec la D.O obtenue par des étalons de catéchine de concentration connue, de sorte que la teneur totale en flavonoïdes peut être évaluée.

Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant différentes solutions méthanoliques de catéchine comme étalon (0,46, 0,63, 0,83, 1,3, 2,05 et 2,24 mg / ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents catéchine par gramme de matière sèche (mg CE / g MS). (Figure 14).

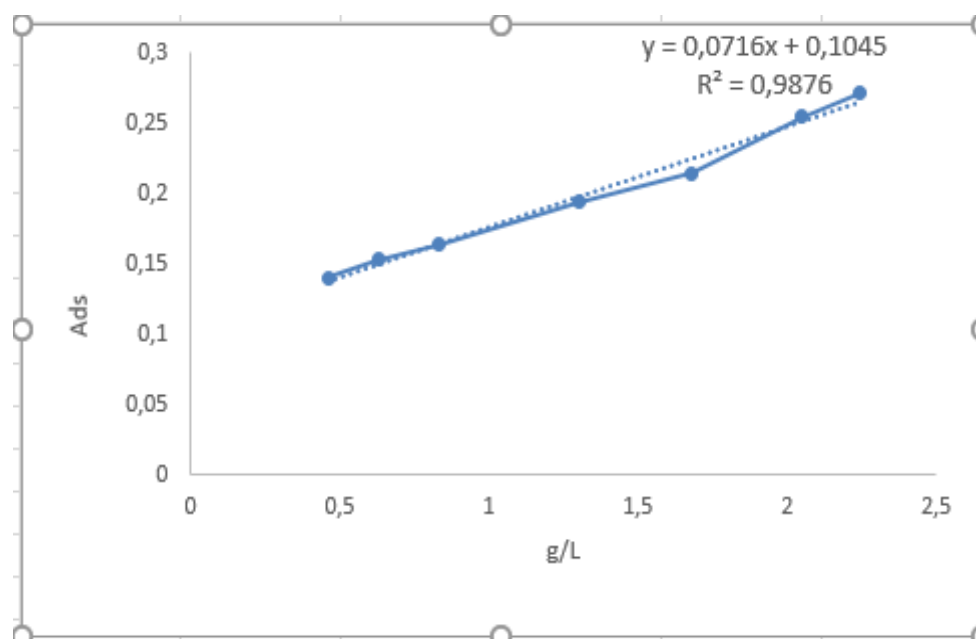
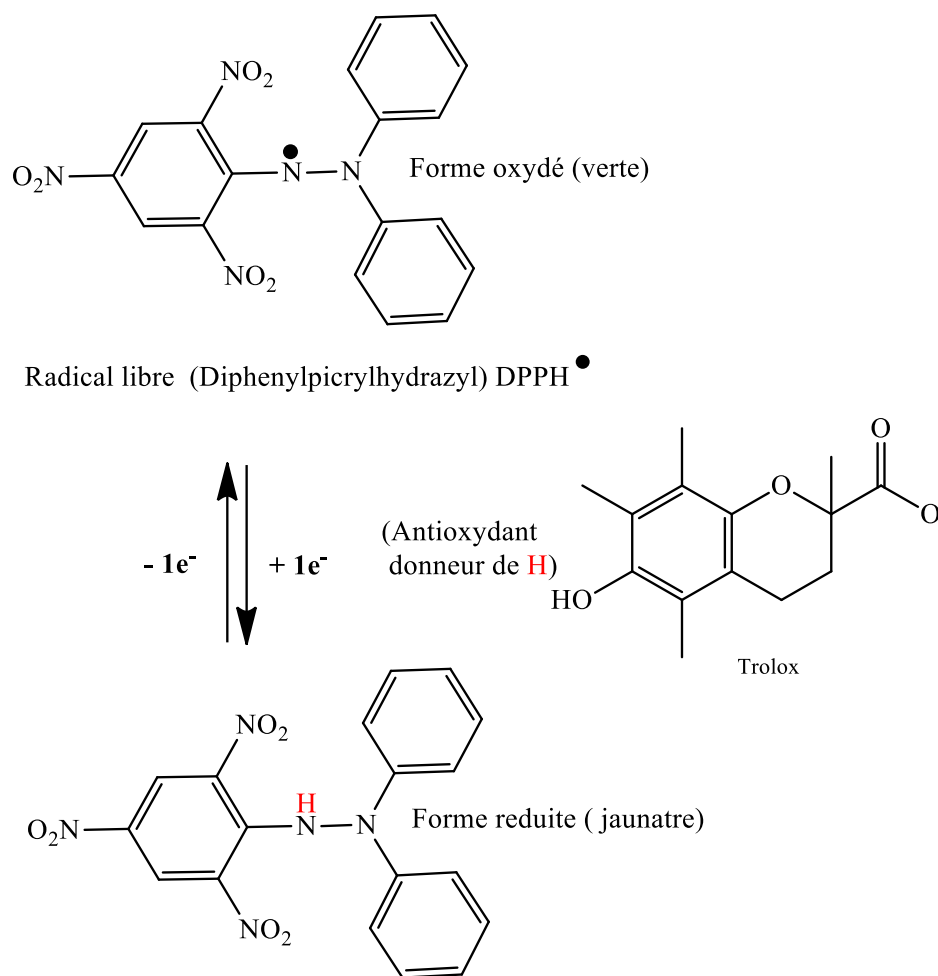


Figure 14: courbe d'étalonnage de Catéchine

#### II.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante

Cette méthode est basée sur la dégradation des radicaux DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) représentée par la figure 15. L'antioxydant réagira avec le DPPH<sup>•</sup>, lui transférant ainsi des électrons singulets. La solution de radical DPPH pourpre sera réduite en DPPH jaune-vert. En mesurant la diminution du violet en fonction du temps, il sera possible de déterminer l'IC<sub>50</sub>, qui correspond au temps après la disparition de 50% de la couleur, c'est-à-dire que la moitié de l'antioxydant réagit avec (DPP<sup>•</sup>)

Une autre façon d'exprimer les résultats consiste à utiliser l'acide 3,4-dihydro-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthyl-2H-1-benzopyran-2-carboxylique, ou Trolox pour construire une plage standard, puis à rapporter l'absorbance de l'échantillon sur la courbe standard. De cette manière, le résultat peut être exprimé en équivalents milligrammes par gramme de matière sèche. Cette méthode a été développée par Brand-Williams et *al.*, en 1995. et utilisé pour évaluer l'activité anti-oxydante.



III. Non radical (Diphenylpicrylhydrazine) DPPH<sup>H</sup>

Figure 15: Réaction entre le DPPH et un antioxydant donneur de H (AH) Trolox.

Dans notre expérimentation, nous avons utilisé le protocole expérimental développé par (Mousavi et *al.*, 2019) avec des modifications mineures. Une solution de 200  $\mu\text{M}$  de DPPH a été préparée dans du méthanol et gardée à l'abri de la lumière

Afin d'étudier l'activité anti-radicalaire de différents extraits, le DPPH est un radical libre violet, qui est réduit en composé jaune par des composés radicalaires. L'intensité de couleur mesurée avec un spectrophotomètre est inversement proportionnelle à l'activité anti-radicalaire du composé dont on souhaite déterminer son activité.

Brièvement, dans des tubes, on introduit 100 µl de chaque extrait et 3 ml de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg / 100 ml), après agitation, les tubes sont placés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée en mesurant l'absorbance à 517 nm. Le blanc était une solution méthanolique de DPPH.

Les conditions expérimentales ont été réalisées en trois répétitions.



Une courbe d'étalonnage a été préparée en utilisant différentes solutions méthanoliques de Trolox comme étalon (0,1, 0,3, 0,7, 1, 1,3, 1,7 et 2 mg / ml). Les résultats ont été exprimés en milligrammes d'équivalents Trolox par gramme de matière sèche (mg TE / g MS). (Figure16).

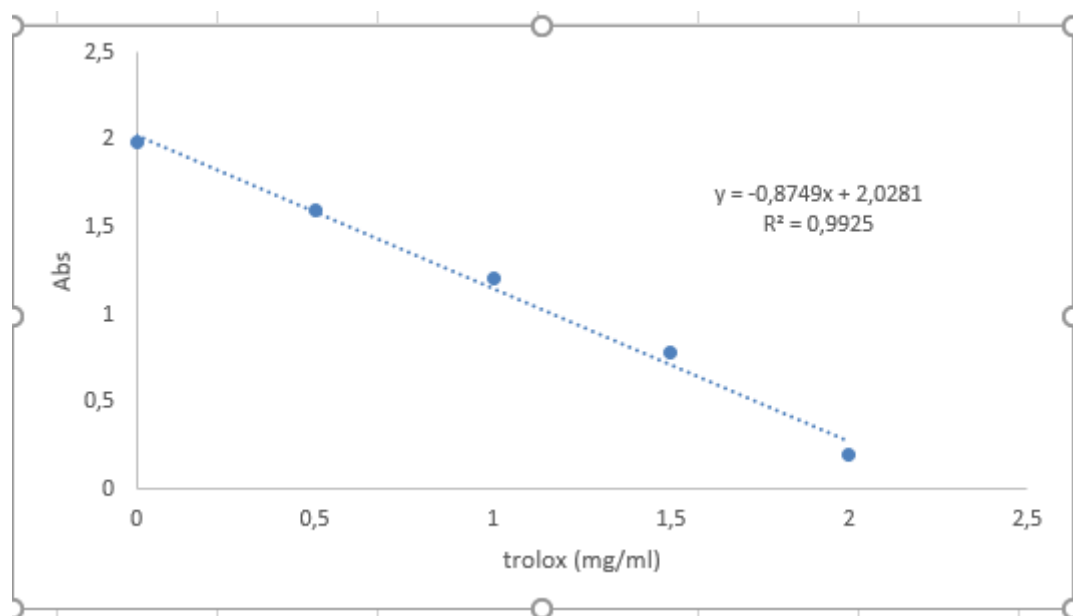


Figure 16: courbe d'étalonnage de Trolox

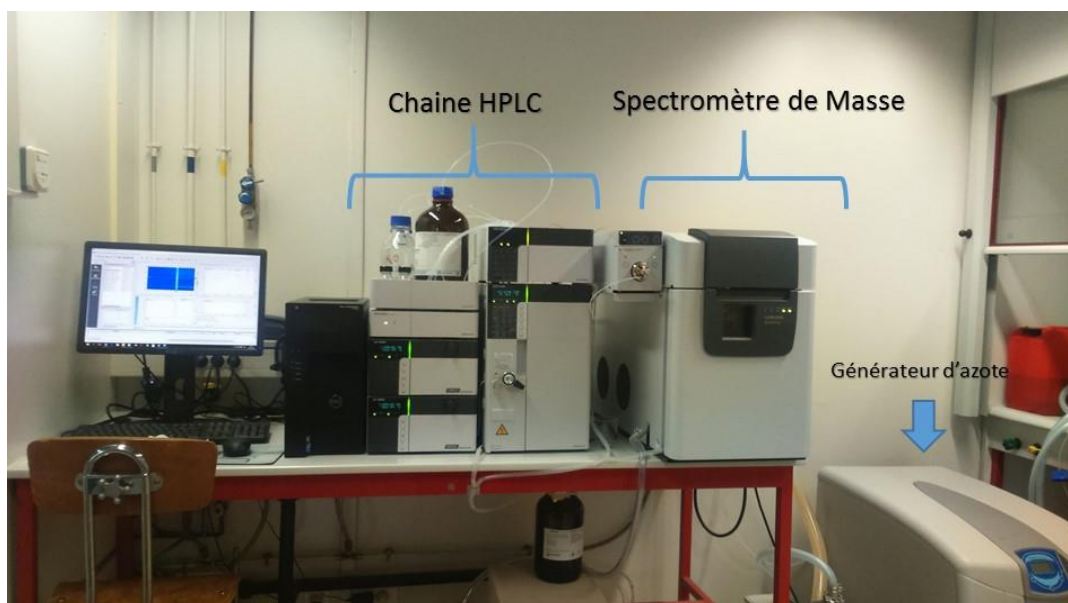
### III. Analyses par chromatographie

#### III.1. Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

La LC-MS est une méthode d'analyse qui permet de combiner les qualités de séparation de la chromatographie liquide avec les capacités de détection de la spectrométrie de masse. Ceci permet de faciliter l'identification et/ou la quantification de nombreuses substances.



Le détecteur peut résoudre le phénomène de co-élution en identifiant des composés de qualités différentes et de structures similaires. LC-MS peut analyser une variété d'espèces chimiques. C'est une technique puissante avec une sensibilité élevée. Son application est de séparer, détecter et identifier des produits chimiques dans des mélanges complexes. Cette technique convient pour identifier les métabolites inconnus (Zaiter, 2017) (Figure 17).



**Figure 17: appareillage Shimadzu LC-MS 2020.**

Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse est courant en chimie analytique. Les analytes sont ensuite ionisés dans une source d'ionisation (Figure 18). L'ionisation par électronébulisation ou électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont les deux techniques le plus couramment utilisées en LC-MS. En effet, ces techniques sont adaptées pour les échantillons sous forme liquide. Notre appareillage étant équipé d'une source par électronébulisation, seule cette technique sera décrite.

Les trois étapes du processus d'ionisation électronébulisation sont décrites comme suit : la formation de gouttelettes chargées, qui explosent en gouttelettes plus petites puis forment des ions en phase gazeuse (Figure 18). La formation de gouttelettes est obtenue en appliquant un potentiel élevé à l'électrode du capillaire, et l'analyte et la phase mobile atteignent le capillaire.

L'accélération de l'entrée de gouttelettes chargées vers le spectromètre de masse est fournie par la différence de potentiel (dizaines de volts) appliquée entre le cône d'extraction de la contre électrode et le cône de l'électrode d'échantillonnage. Lorsque la solution quitte le capillaire, elle est polarisée par le champ électrique créé par la différence de potentiel entre le capillaire d'introduction et la contre-électrode (l'entrée du spectromètre de masse). Le diamètre du fluide diminue et entraîne la formation de ce que l'on appelle des "cônes de Taylor". Lorsque le champ électrostatique est suffisamment fort, en fonction de la polarité de l'ion à analyser, le cône va s'étirer et provoquer la formation de gouttelettes chargées positivement ou négativement à sa surface. Pour faciliter ce processus, un flux d'azote est appliqué parallèlement à l'axe du capillaire d'infusion. Au fur et à mesure que l'aérosol progresse, l'évaporation du solvant fait diminuer la taille des gouttelettes. Lorsque le rapport charge / surface d'une gouttelette devient trop élevé (limite de Raleigh), elle se brise en gouttelettes plus petites. Grâce à l'évaporation du solvant et aux explosions "coulombiennes" successives, le diamètre des gouttelettes est considérablement réduit. Ensuite, les gouttelettes résultantes contiennent un ion en moyenne. Les ions formés dans la phase gazeuse après évaporation du solvant résiduel transfèrent alors leur charge à l'analyte (Zaiter, 2017).

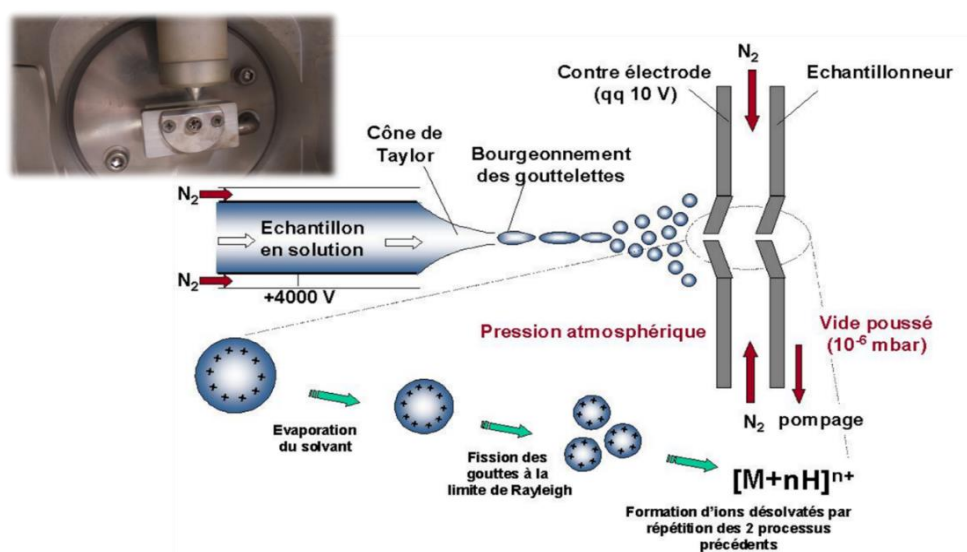


Figure 18: schéma de principe de la source électrospray d'ionisation (ESI) (Tang et Kebarle, 1991).

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse permettant de détecter selon la mesure de leur masse. On peut qualifier cette technique de balance moléculaire qui donne accès à la masse moléculaire de la forme ionisée de l'analyte, sous la forme d'un rapport ( $m/z$ ). L'ionisation peut être réalisée soit en détection négative (détection d'anions), soit en détection positive (détection de cations). Dans le cas d'un analyseur de type quadripôle, la séparation a lieu dans un champ magnétique sous haute tension au sein du QIA (Quadripole Ion Analyzer) avant leur détection qui transforme le signal des ions en signal électrique. L'intensité du signal augmente proportionnellement avec le nombre d'ions (figure 19).

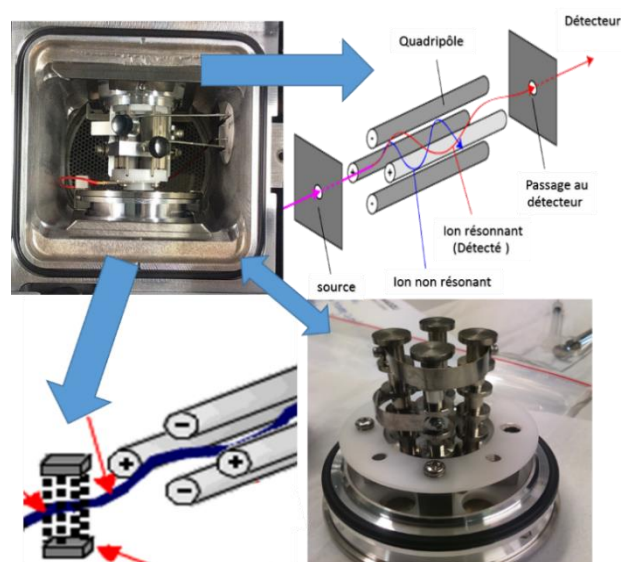


Figure 19: image illustrant la séparation ayant lieu dans le champ magnétique du spectromètre (Bristol university).

Pour les différentes parties des pieds mâles et femelle du *M. annua* la séparation des composés est basée sur un gradient d'élution adapté à chaque échantillon. La séparation a été effectuée sur une colonne chromatographique Gemini C18 avec une taille de particule de  $3 \mu\text{l}$ , une longueur de 150 mm et un diamètre intérieur de 4,6 mm. La phase mobile est un mélange d'acide formique à 0,5% en solution aqueuse (A) et d'acétonitrile (B). Le volume d'injection est de  $20 \mu\text{L}$  et le débit de la pompe est réglé à  $0,6 \text{ ml / min}$ . La colonne est thermostatée à  $30^\circ \text{C}$  dans un four.

Le gradient d'élution suivant est utilisé :

- De 0 à 5 min : gradient linéaire de 90 :10 (A : B) ;
- De 5 à 7 min de gradient linéaire de 90 :10 à 86 :14 ;
- De 7 à 17 min : élution à 86 :14 ;
- De 17 à 19 min : gradient linéaire de 86 :14 à 75 :25 ;
- De 19 à 24 min : élution à 75 :25 ;
- De 24 à 25 min : gradient linéaire de 75 :25 à 10 :90 ;
- De 25 à 31 min : élution à 10h90 ;
- De 31 à 32 min : gradient linéaire de 10h90 à 90h10 ;
- De 32 à 40 min : élution à 75 :25 (étape de rééquilibrage).

Le gradient convient à chaque échantillon pour optimiser la séparation du composé cible pour obtenir le meilleur effet de séparation. Plusieurs gradients ont été testés pour établir des caractéristiques d'extrait qui expriment une bonne résolution. Pour détecter les composés dans les extraits de plantes, des détecteurs UV PDA (détecteurs à barrette de photodiodes) et des spectromètres de masse sont utilisés.

Les paramètres du spectrophotomètre de masse sont les mêmes pour tous les échantillons. La source fonctionne en mode négatif, le débit de gaz d'atomisation est réglé à 1,5 L / min et le débit de gaz de séchage est réglé à 15 L / min. La température du module source est réglée à 350 ° C et la ligne de désolvatation est réglée à 250 ° C. La tension électrospray est de -4000V. Afin d'éviter les sources de pollution, des extraits de plantes ont été dilués.

L'identification et la caractérisation des composés actifs dans les extraits végétaux sont basées sur l'analyse des standards respectifs, comparant le temps de rétention (tR) et le rapport m/ z [M-H] des ions- (dans la plupart des cas, en mode négatif).

Afin d'effectuer la quantification, une courbe d'étalonnage à cinq niveaux est générée après des injections d'étalons avec des concentrations connues (3 répétitions). Ces courbes d'étalonnage ont été établies pour tous les principes actifs du marché.

La sensibilité de cette méthode est évaluée en déterminant la limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ), qui sont respectivement définies comme 3 fois et 10 fois la valeur du bruit de fond.

Les formules utilisées pour le calcul sont les suivantes :  $LOD=3\sigma/a$  et  $LOQ=10\sigma/a$

Avec : 
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(Y-Y_i)^2}{n-1}};$$

- a : pente de la courbe de calibration des aires en fonction de la concentration ;
- Y : aire moyenne ;
- $Y_i$  : aire moyenne recalculée avec les coefficients de la droite de la régression ;
- n : est le nombre des dilutions réalisés.

On note que comme chaque usine utilise des méthodes d'analyse, ces calculs sont effectués automatiquement et l'analyse est répétée trois fois.

## **IV. Activité larvicide**

### **IV.1. Matériel animal**

Le *Tribolium* rouge de la farine, objet de nos essais de toxicité, a été élevé au Laboratoire de Biotechnologie Appliquée à l'Agriculture, Section Entomologie de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunis (INRAT). L'élevage est effectué dans des boîtes en plastique (Figure 20) sous les conditions suivantes : une température variante entre 20 et 25°C, une photopériode de 12 heures lumière/12 heures obscurité et une humidité de 40 à 45%. L'insecte est maintenu sur différents substrats d'élevage : maïs, blé, semoule, farine. Seules les larves de 5mm de long et de couleur jaune pâle ont été utilisées (Benoît et al., 1998).



Figure 20: Elevage de *Tribolium confusum* (Du Val) au laboratoire (photo originale).

#### IV.2. Tests de toxicité

Les extraits aqueux ont été obtenus à partir des graines et des feuilles des plantes mâles et femelles selon la méthode de Aouinty et *al.*, (2006) et Soha et *al.*, (2019) avec une légère modification. Dans notre étude, la macération des poudres dans l'eau distillée a été réalisée au laboratoire à raison de 10 g de poudres / 100 ml pendant 24 heures, puis filtrés à l'aide d'un papier filtre Whatman (3 mm). Le filtrat résultant représente une solution mère initiale à 10%. Pour donner plus de signification aux quantités de matière végétale soluble dans les extraits aqueux, ces dernières ont été concentrées par évaporation sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur rotatif (Figure 22). Les résidus obtenus ont été utilisés dans les tests d'activité larvicide avec différentes concentrations (0,01 g / ml, 0,005 g / ml, 0,002 g / ml et 0,001 g / ml). La toxicité a été évaluée en plaçant 15 larves de *T. confusum* dans un bêcher en verre contenant 20 ml de chaque concentration de chaque extrait. Le groupe témoin contient 20 ml d'eau distillée et 15 larves (Figure 21). La mortalité a été enregistrée après 6, 12, 24 et 48 h d'exposition et le pourcentage de mortalité a été rapporté à partir de la moyenne de trois répétitions.



Figure 21 : Boîte de pétrie contenant 20ml de l'extrait aqueux et 15 larves (3 répétitions) (photo originale)



Figure 22: un Rotavapor

### Détermination des concentrations létales (CL<sub>50</sub>)

La concentration létale (CL<sub>50</sub>) est définie comme la concentration qui cause 50% de mortalité dans la population de larves étudiées, pendant un temps donné. (Mohapatra et Rengarajan, 1995). Les estimations de CL<sub>50</sub> ont été obtenues après 24 et 48h, en utilisant une analyse de régression probit à l'aide de SPSS version 25. Les valeurs CL<sub>50</sub> (avec des limites de confiance à 95%) ont été calculées. Les différences entre les résultats ont été considérées comme statistiquement significatif lorsque la valeur  $P < 0,05$ .



## Longévité des individus

Les mortalités mesurées dans les boîtes traitées ont été exprimées, selon la formule d'Abbott, (1925) en mortalité corrigée (TR) en considérant la mortalité naturelle dans les boîtes témoins.

$$TR = [(C-T) / (100-T)] * 100$$

Où TR : taux de mortalité corrigé

C : nombre d'individus vivants chez le témoin

T : nombre d'individus vivants chez les traités

## V. Activité anti-Acétylcholinestérase

### V.1. Démarche expérimentale

L'acétylcholinestérase (AChE) est une enzyme spécifique des tissus nerveux et des jonctions neuromusculaires. Elle hydrolyse rapidement l'acétylcholine (neurotransmetteur) en choline inerte et en acétate.

L'étude de l'activité anti-AChE est menée selon la méthode développée par Ferreira *et al.* (2006) puis plus récemment par Ouchemoukh *et al.*, (2014) avec quelques modifications. Ainsi, on place successivement, dans des tubes Eppendorf, 650 µl d'une solution tampon de Tris-HCl (50 mM d'hydroxyméthyl aminométhane à pH = 8), 50 µl de l'extrait méthanolique de la plante à différentes concentrations et 5 µl de la solution enzymatique contenant 0,26 unités/ml et préparée dans une solution tampon de Tris-HCl à pH = 7,5. Les tubes sont incubés pendant 15 minutes à 25°C. La réaction est déclenchée par l'addition de 75 µl de la solution ATCI (15mM d'acétylthiocholine iodide) et de 250 µl de réactif d'Ellman DTNB (3mM de 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoate). Après 10 minutes, l'absorbance du mélange est mesurée à 405 nm. Le contrôle négatif est préparé de la même manière avec du méthanol au lieu de l'extrait de la plante. Quant à la galantamine hydrobromide de l'espèce *Lycoris sp.* est utilisée comme un contrôle positif.



Les pourcentages d'inhibition (I) sont calculés selon l'équation suivante :

$$I (\%) = 100 - \frac{(A \text{ extrait } 405 \text{ nm})}{(A \text{ controle } 405 \text{ nm})} \times 100$$

## V.2. Calcul de la moitié de la concentration inhibitrice maximale (IC<sub>50</sub>)

La concentration qui produit 50% d'inhibition a été obtenue à partir de la courbe, qui montre le pourcentage d'inhibition par rapport aux différentes concentrations de l'échantillon étudié.

Les résultats obtenus présentent les moyennes avec les écarts types de trois répétitions, en utilisant une analyse de régression probit à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 25. Les différences entre les résultats ont été considérées comme statistiquement significatif lorsque la valeur  $P < 0,05$

## VI. Calculs statistiques

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA unidirectionnel pour comparer les effets des différents paramètres (concentration, temps, provenance et sexe) étudiés. Une ANOVA bidirectionnelle a été utilisée pour estimer la signification de l'interaction des effets du sexe et des provenances.

Le test de Bonferroni a été utilisé pour étudier les différences entre les dosages des plantes mâles et femelles et pour comparer les provenances de *M. annua*. Tous les tests ont été répétés trois fois et les résultats ont été exprimés en moyenne  $\pm$  écarts types. La corrélation entre le PPT, le FVT et l'activité anti-oxydante et la corrélation entre AChE et PPT est présentée par le coefficient de corrélation de Pearson, qui est l'un des indices statistiques les plus utilisés pour exprimer l'intensité et le sens (positif ou négatif) de la relation linéaire entre deux variables quantitatives.

Ce coefficient varie entre -1 et +1. La relation linéaire sera donc d'autant plus forte que la valeur du coefficient est proche de +1 (corrélé positivement) ou de -1 (corrélé négativement), et d'autant plus faible qu'elle est proche de 0.

Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $P < 0,05$ . Les processus statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics 25.0.

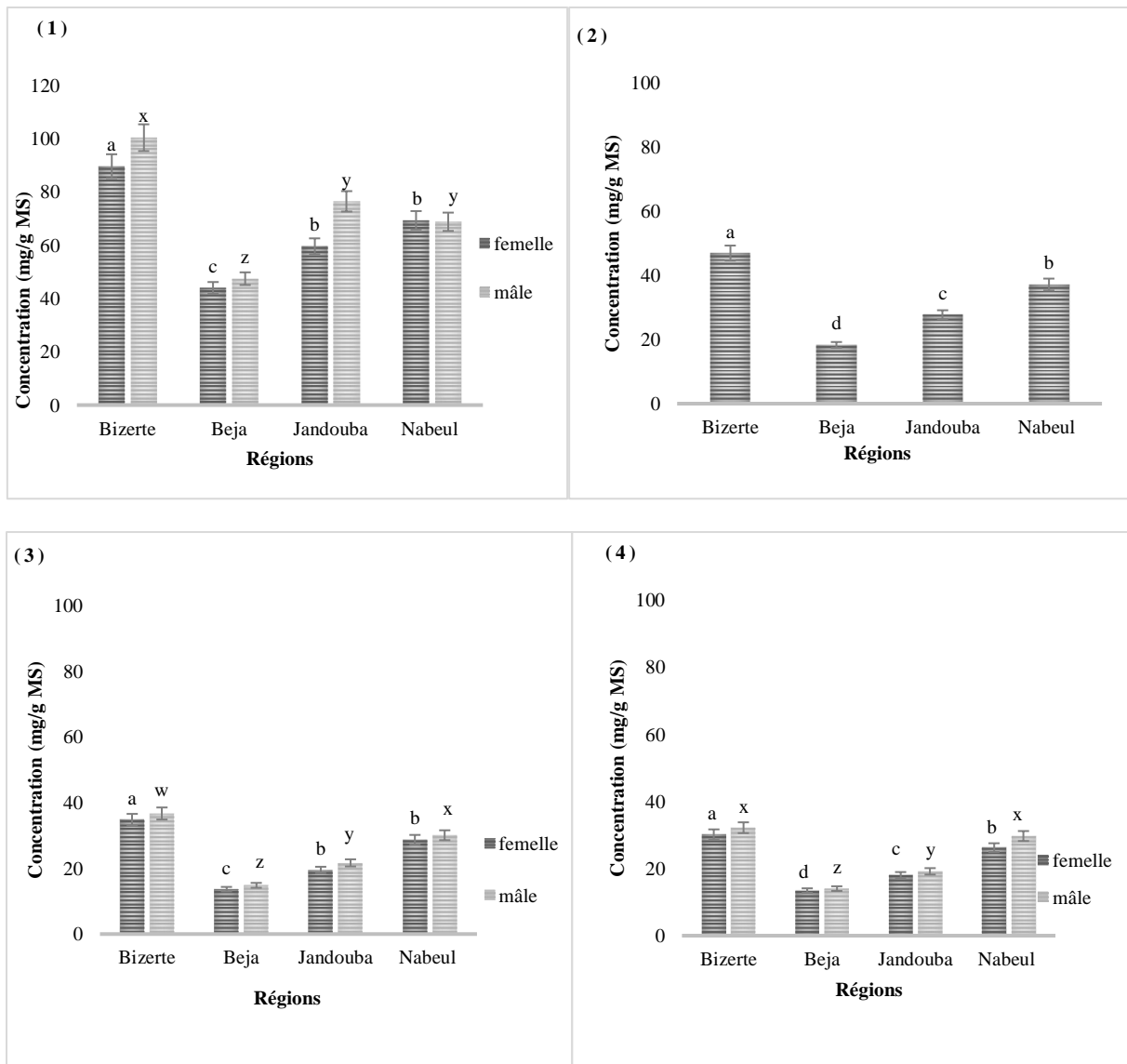
# **Chapitre III : Résultats et Discussions**

## Résultats

### I. Dosage des composés phénoliques des différents organes de *M. annua*

#### I.1. Dosage des polyphénols totaux des différents organes

Le dosage des polyphénols totaux (PPT) des extraits hydro-méthanoliques des feuilles, tiges, racines et graines de *M. annua* a été réalisé en utilisant l'appareil spectrophotométrique UV-visible. Les résultats rapportés sur la figure 23 montrent que la distribution du PPT varie selon la région et le sexe. En effet, les extraits des feuilles de Bizerte sont les plus riches en polyphénols totaux avec plus de 100,41 mg EAG/g MS pour les extraits des pieds mâles et 89,7 mg EAG/g MS pour les extraits des pieds femelles. Alors que les extraits de la région de Beja possèdent les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux avec une concentration de 44 mg EAG/g MS pour les pieds femelles et 47,49 mg EAG/g MS pour les pieds mâles. D'autre part, l'analyse quantitative des PPT des extraits des graines des quatre provenances de *M. annua* dévoile la richesse de ces dernières en PPT. La figure 23 montre que la provenance de Bizerte présente la quantité la plus importante en PPT avec une moyenne de 46.93 mg EAG/g MS, suivi de la région de Nabeul avec une moyenne de 37,12 EAG/g MS et de la région de Jandouba avec une concentration moyenne de 27.73 EAG/g MS, alors que les graines de la région de Béja sont les moins concentrés en PPT avec une moyenne de 18.29 mg EAG/g MS.



**Figure 23: Concentration des PPT des pieds mâles et femelles de *M. annua*. Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à  $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à  $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines**

Concernant, la teneur en PPT des différents extraits des tiges, celle-ci varie entre 36. 66 et 14. 81 mg EAG/ g MS pour les pieds mâles et entre 34. 80 et 13. 65 mg EAG/ g MS pour les pieds femelles. La concentration des PPT la plus faible a été enregistrée dans les extraits des tiges de la région de Béja, avec un taux de 14. 81 mg EAG/ g MS pour les pieds mâles et 13,65 mg EAG/ g MS pour les pieds femelles. Les extraits des tiges de la région de Bizerte affichent les doses les plus élevées où on a enregistré 36. 33 mg EAG/ g MS dans les pieds mâles et 34. 80 mg EAG/ g MS dans les pieds femelles.

Le dosage des PPT des racines dévoile que les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Bizerte étalent les teneurs les plus élevées avec 32.17 mg EAG/g MS pour les pieds mâles et 30.16 mg EAG/g MS pour les pieds femelles, suivi par les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Nabeul avec 29.69 mg EAG/g MS pour les pieds mâles et 26.23 mg EAG/g MS pour les pieds femelles. Quant aux teneurs des extraits de la provenance de Beja, nous avons enregistré les valeurs les plus faibles avec 14.02 mg EAG/g MS pour les pieds mâles et 13.43 mg EAG/g MS pour les pieds femelles. Le test ANOVA à un seul facteur confirme une différence significative concernant les concentrations de PPT des différents organes, entre les différentes régions, et entre les plantes mâles et les plantes femelles ( $p < 0,05$ ). Alors que le test ANOVA à deux facteurs ne témoigne pas une interaction entre les deux facteurs régions et sexes.

### **I.2. Variation des teneurs en flavonoïdes totaux des organes**

Le dosage des flavonoïdes totaux (FVT) des extraits hydro-méthanolique des feuilles, tiges, racines et graines de *M. annua* a été réalisé en utilisant l'appareil spectrophotométrique UV-visible. Les résultats rapportés sur la figure 24 montrent que la distribution du FVT varie selon la région et le sexe. En effet, les extraits des feuilles de Bizerte sont les plus riches en FVT avec plus de 39,94 EC mg / g MS pour les extraits des pieds mâles et 22,5 EC mg / g MS pour les extraits des pieds femelles. Alors que les extraits de la région de Beja possèdent les teneurs les plus faibles en polyphénols totaux avec une concentration de 14,27 mg EC / g MS pour les pieds mâles et 14,16 mg EC / g MS pour les pieds femelles

D'autre part, l'analyse quantitative des FVT des extraits des graines des quatre provenances de *M. annua* dévoile la richesse de ces dernières en FVT. La figure 24 montre que la provenance de Bizerte présente la quantité la plus importante en FVT avec une moyenne de 19.05 mg EC/g MS, suivi de la région de Jandouba avec une moyenne de 17.76 mg EC/g MS et de la région de

Beja avec une concentration moyenne de 14.05 mg EC/g MS, alors que les graines de la région de Nabeul sont les moins concentrés en FVT avec une moyenne de 14.05 mg EC/g MS.

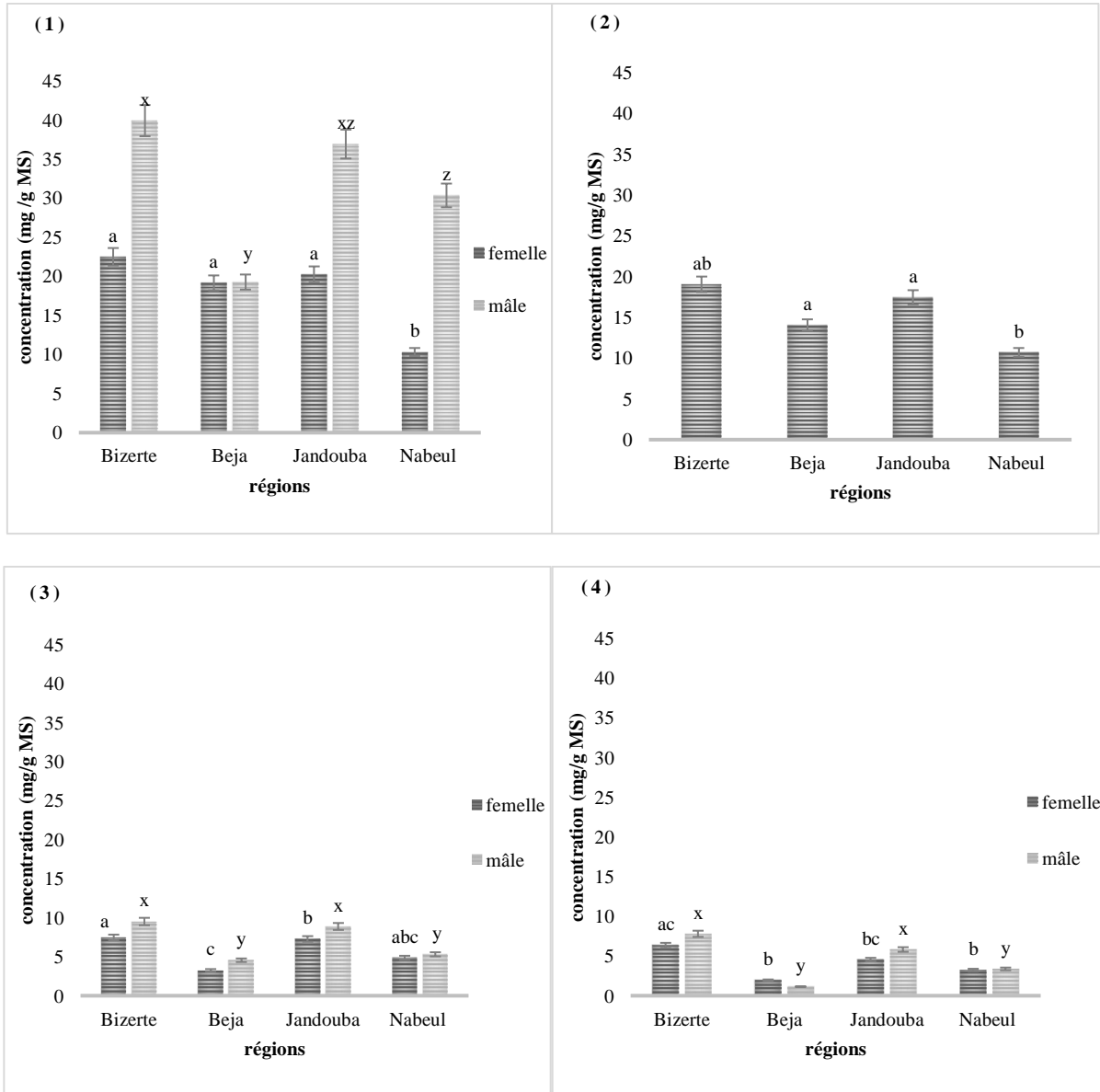


Figure 24: Concentration des FVT des pieds mâles et femelles de *M. annua*. Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à  $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à  $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines

Concernant, la teneur de flavonoïde totale des différents extraits des tiges, celle-ci varie entre 9.51 et 4.55 mg EC/g MS pour les pieds mâles et entre 7.46 et 3.25 mg EC/g MS pour les pieds femelles.

La concentration des FVT la plus faible a été enregistrée dans les extraits des tiges de la région de Béja, avec un taux de 4.55 mg EC/g ES pour les pieds mâles et 3.25 mg EC/ g MS pour les pieds femelles. Les extraits des tiges de la région de Bizerte affichent les doses les plus élevées où on a enregistré 9. 51 mg EC/ g MS dans les pieds mâles et 7. 46 mg EC/ g MS dans les pieds femelles.

Le dosage de FVT des racines dévoile que les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Bizerte étalent les teneurs les plus élevées avec 7.80 mg EC/g MS pour les pieds mâles et 6.34 mg EC/g MS pour les pieds femelles, suivi par les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Jandouba avec 5.82 mg EC/g MS mg EAG/g MS pour les pieds mâles et 4.55 mg EC/g MS pour les pieds femelles. Quant aux teneurs des extraits de la provenance de Beja, nous avons enregistré des valeurs les plus trop faibles avec 1.14 mg EC/g MS pour les pieds mâles et 1.95 mg EC/g MS pour les pieds femelles. L'analyse statistique confirme une différence significative concernant les concentrations de FVT des différents organes, entre les différentes régions, et entre les plantes mâles et les plantes femelles ( $p < 0,05$ ).

Alors, l'interaction entre les deux facteurs régions et sexes n'est pas significative.



### **I.3. Variation des activités anti-oxydantes des organes et leurs relations avec les teneurs en composés phénoliques**

#### **I.3.1. Dosage des activités anti-oxydantes des organes**

Le dosage des activités anti-oxydantes en utilisant le test DPPH des extraits hydro-méthanolique des feuilles, des graines, des tiges et des racines de *M. annua* a été opéré en utilisant l'appareil spectrophotométrique UV-visible.

Les résultats de la figure 25 révèlent que, par rapport aux trois autres régions, les extraits des feuilles provenant de Bizerte ont les valeurs les plus élevées pour les deux sexes avec: 22,78 mg ET/ g MS pour les extraits des pieds mâles et 22,04 mg ET/ g MS pour les extraits des pieds femelles, suivi par les extraits des feuilles de Jendouba : 22,02 mg ET / g MS pour les pieds mâles et 20,45 mg ET/ g MS pour les pieds femelles, et les extraits des feuilles de Nabeul : 20,83 mg/ g MS pour les pieds mâles et 20,45 mg ET / g MS pour les pieds femelles. Les extraits des feuilles de Beja ont montré l'activité anti-oxydante la plus faible avec 19,71 mg ET / g MS pour les pieds mâles et 19,67 mg ET / g MS pour les pieds femelles. Comme le montre la figure 25, les extraits des graines de *M. annua* ont étalé une activité anti-oxydante élevée variant entre 22.98 mg ET/g MS et 17.32 mg ET/g MS. Les extraits de la provenance de Bizerte ont exprimé l'activité anti-oxydante la plus élevée alors que la région de Beja a montré l'activité anti-oxydante la plus faible. La région de Nabeul a étalé une valeur égale à 19.50 mg ET/g MS et Jendouba une valeur égale à 18.84 mg ET/ g MS.

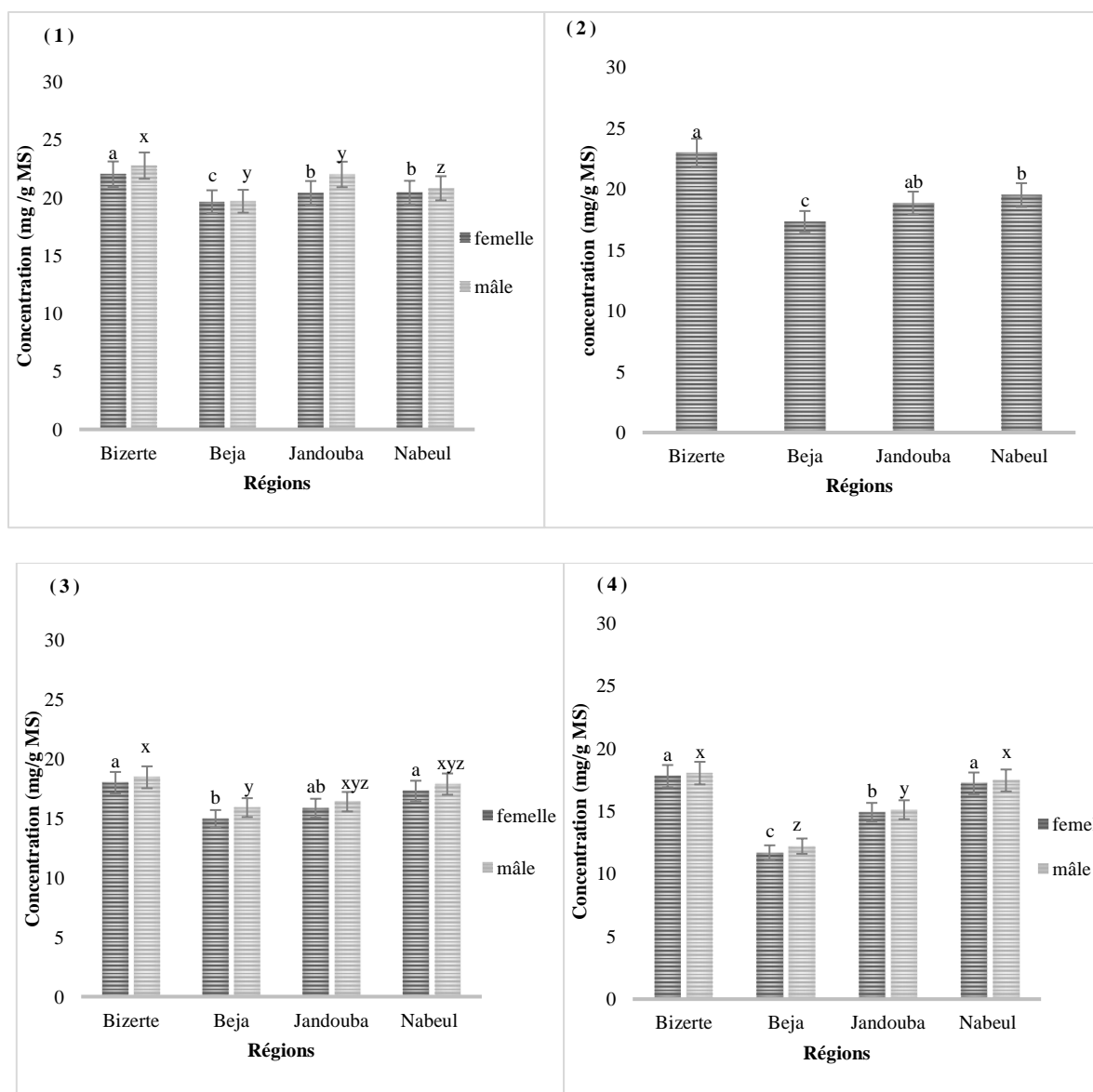


Figure 25: Activité anti-oxydante (DPPH) des pieds mâles et femelles de *M. annua*. Les résultats du test de Bonferroni sont significativement différents à  $P < 0,05$ . Les colonnes marquées la même lettre sont significativement différentes à  $P < 0,05$ . (1) feuilles, (2) graines, (3) tiges, (4) racines

Concernant, l'activité anti-oxydante des différents extraits des tiges, celle-ci varie entre 18.46 et 15.91 mg ET/ g MS pour les pieds mâles et entre 18.01 et 14.96 mg ET/ g MS pour les pieds femelles. L'activité anti-oxydante la plus faible a été enregistrée dans les extraits des tiges de la région de Béja, avec un taux de 15.91 mg ET/ g MS pour les pieds mâles et 14.96 mg ET/ g MS pour les pieds femelles. Les extraits des tiges de la région de Bizerte affichent les doses les plus élevées où on a enregistré 18.46 mg ET / g MS dans les pieds mâles et 18.01 mg ET / g MS dans les pieds femelles.

L'activité anti-oxydante des racines dévoile que les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Bizerte étalent les teneurs les plus élevées avec 18.02 mg ET/g MS pour les pieds mâles et 17.78 mg ET/ g MS pour les pieds femelles, suivi par les extraits des pieds mâles et femelles de la région de Nabeul avec 17.44 mg ET/g MS pour les pieds mâles et 17.21 mg ET/g MS pour les pieds femelles. Quant aux teneurs des extraits de la provenance de Beja, nous avons enregistré les valeurs les plus faibles avec 12.20 mg ET/g MS pour les pieds mâles et 11.68 mg ET/ g MS pour les pieds femelles. Les analyses statistiques montrent une différence significative de l'activité anti-oxydante des différents organes, entre les différentes régions, et entre les plantes mâles et les plantes femelles ( $p < 0,05$ ). Alors il n'y a pas d'interaction entre les deux facteurs régions et sexes.

### **I.3.2. Estimation de la corrélation entre les teneurs en composés phénoliques et les activités anti-oxydantes (AAO)**

Les antioxydants naturels ont fait l'objet de nombreuses études car ils ont été utilisés comme conservateurs dans les aliments en remplaçant les antioxydants synthétiques, et ont été impliqués dans le traitement de nombreuses maladies. A travers ce travail, nous nous intéressons à l'étude d'une éventuelle relation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-oxydante, des extraits étudiés.

### I.3.2.1. Relations entre teneurs en composés phénoliques et les AAO

#### ➤ Extraits des feuilles

La relation entre les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes totaux et l'activité anti-oxydante a été illustrée par les figures 26.

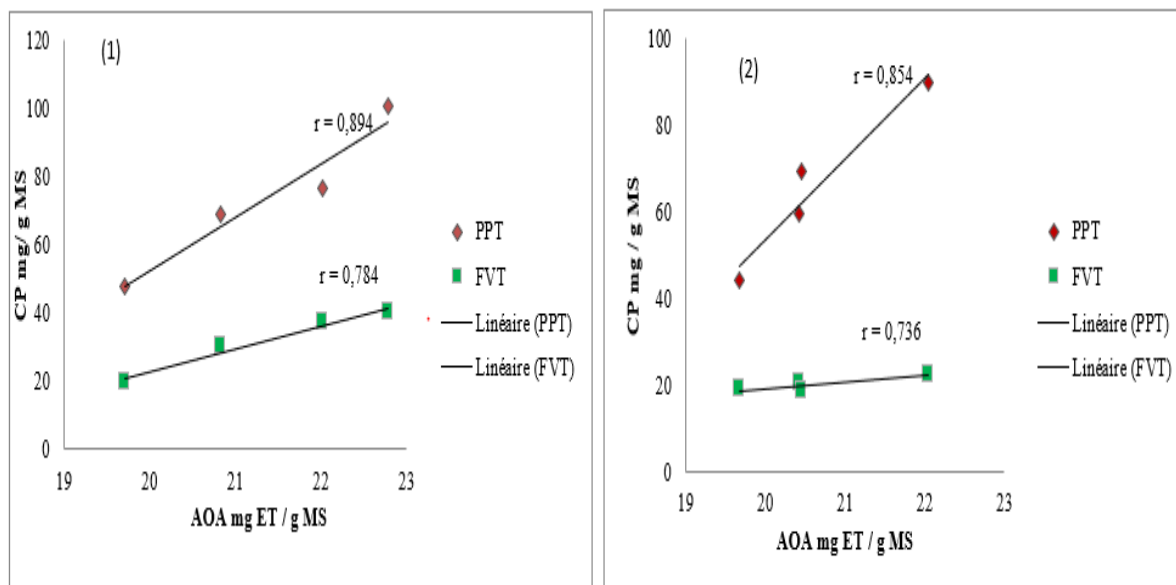


Figure 26: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des feuilles des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de *M. annua*

La figure 26 indique une forte corrélation positive entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  de Pearson atteignant 0,894 pour les PPT et 0,784 pour les FVT et ceci pour les extraits des feuilles des pieds mâles.

D'autre part, la figure montre aussi une corrélation positive importante entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  atteignant 0,854 pour les PPT et 0,736 pour les FVT et ceci pour les extraits de feuilles des pieds femelles.

➤ **Extraits des graines**

La relation entre PPT, FVT et AAO a été illustrée par la figure 27.

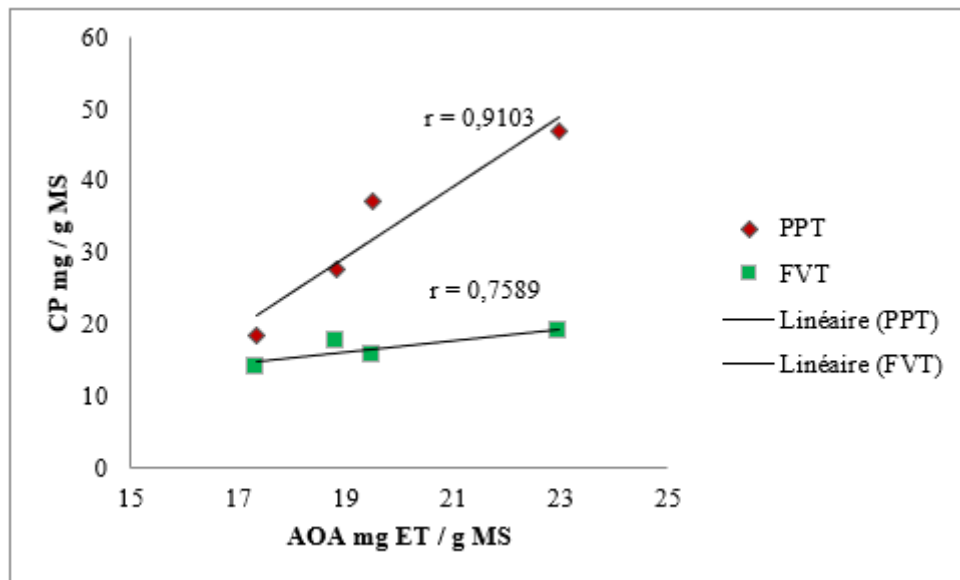
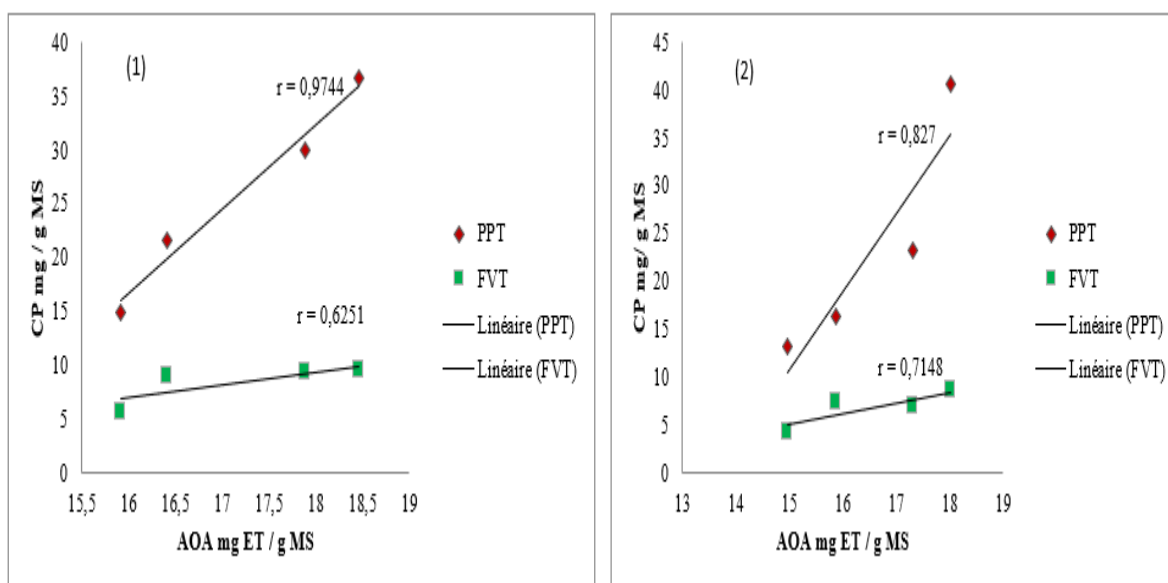


Figure 27: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des graines de *M. annua*

La figure 27 indique une forte corrélation positive entre les composés phénoliques totaux et AOA avec un coefficient de corrélation  $r$  de Pearson atteignant 0,910 pour les PPT et ,758 pour les FVT et ceci pour les extraits des graines.

## ➤ Extraits des tiges

La relation entre PPT, FVT et AAO a été illustrée par les figures 28.



**Figure 28: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des tiges des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de *M. annua***

La figure 28 indique une forte corrélation positive entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  de Pearson atteignant 0,974 pour les PPT et 0,625 pour les FVT et ceci pour les extraits des tiges des pieds mâles.

D'autre part, la figure montre aussi une corrélation positive importante entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  atteignant respectivement 0,827 pour les PPT et 0,7148 pour les FVT et ceci pour les extraits de tiges des pieds femelles.

## ➤ Extraits des racines

La relation entre PPT, FVT et AAO a été illustrée par les figures 29.

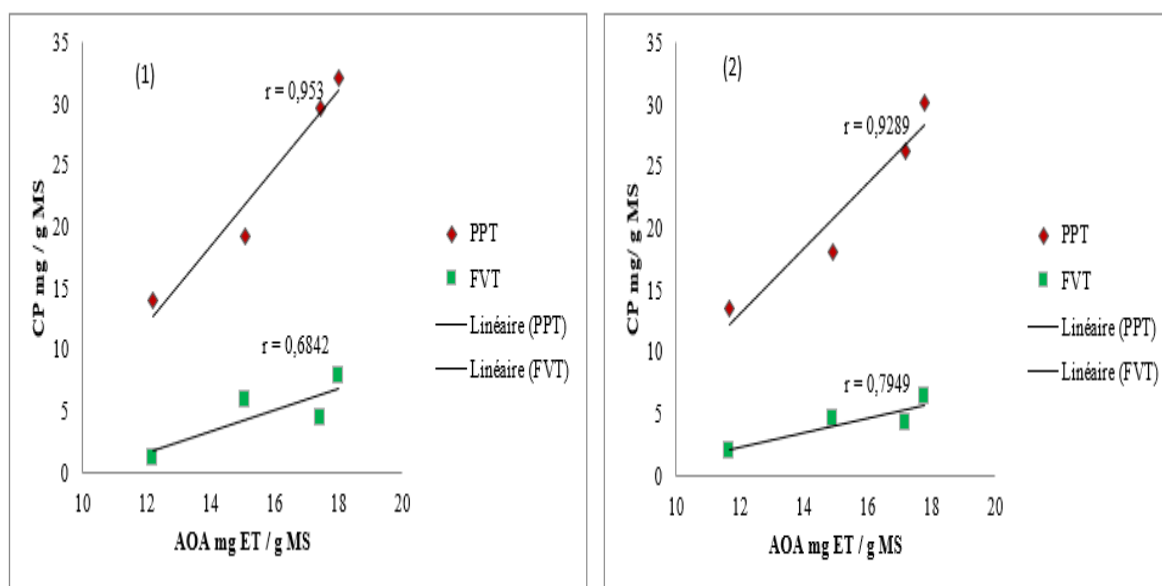


Figure 29: Relation entre les teneurs en PPT, FVT et l'activité anti-oxydante des extraits hydro-méthanoliques des racines des pieds mâles de *M. annua*

La figure 29 indique une forte corrélation positive entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  de Pearson atteignant 0,953 pour les PPT et 0,684 pour les FVT et ceci pour les extraits des racines des pieds mâles.

D'autre part, la figure montre aussi une corrélation positive importante entre les composés phénoliques totaux et AAO avec un coefficient de corrélation  $r$  atteignant respectivement 0,928 pour les PPT et 0,794 pour les FVT et ceci pour les extraits de racines des pieds femelles.

Les analyses statistiques avec SPSS montrent une corrélation positivement forte et significative ( $p \leq 0,01$ )

### I.4. Nature chimique et estimation des concentrations des composés phénoliques par Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse des extraits des différentes parties des pieds mâles et des pieds femelles de *M. annua* a montré leur richesse en flavonoïdes tel que la narcissine, la rutine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine.

La comparaison à une narcissine standard (isorhamnetine-3-o-rutinoside) des profils chromatographiques des extraits des feuilles de *M. annua* des quatre régions Bizerte, Beja, Jandouba et Nabeul, sous PDA à 350 nm et ESI/MS, a prouvé que la narcissine était le principal flavonoïde dans les extraits étudiés. La quantification des différents composés a été déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage de chaque étalon.

#### **I.4.1. Analyse des extraits des feuilles**

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3 indiquant les quantités des différents flavonoïdes dans les extraits des feuilles des pieds mâles et femelles. En effet, les extraits des feuilles de *M. annua* sont riches en narcissine, les feuilles provenant de la région de Bizerte ont affiché la quantité la plus élevée en ce flavonoïde : 885,4 µg / g MS pour les pieds mâles et 732,78 µg / g MS pour les pieds femelles suivi de celles de Jendouba : 728,49 µg / g MS (pieds mâles) et 501,38 µg / g MS (pieds femelles), les feuilles de Beja ont étalé la plus faible quantité de narcissine : 320,74 µg / g MS (pieds mâles) et 95,02 µg / g MS (pieds femelles).

Les extraits des feuilles de *M. annua* étaient également riches en rutine : 44,18 µg / g MS dans les pieds mâles de Bizerte suivi de Jendouba : 24µg / g MS (pieds mâles), puis la région de Nabeul avec 10,82µg / g MS dans les extraits des feuilles des pieds mâles. Les extraits foliaires des plantes mâles de Beja ont exposé la plus faible quantité de rutine : 8,11 µg / g MS.

Le tableau 3 montre aussi que la concentration de gallocatéchine est importante dans les extraits des feuilles avec 205,69 µg / g MS pour les pieds mâles de Bizerte et 155,37 µg / g MS pour les pieds femelles de la même région, alors que Beja a affiché la plus faible quantité en gallocatéchine égale à 57,1 µg / g MS (plante mâles) et 42,67 µg / g MS (pieds femelles). *M. annua* est également riche en épicatechine et en épigallocatéchine.



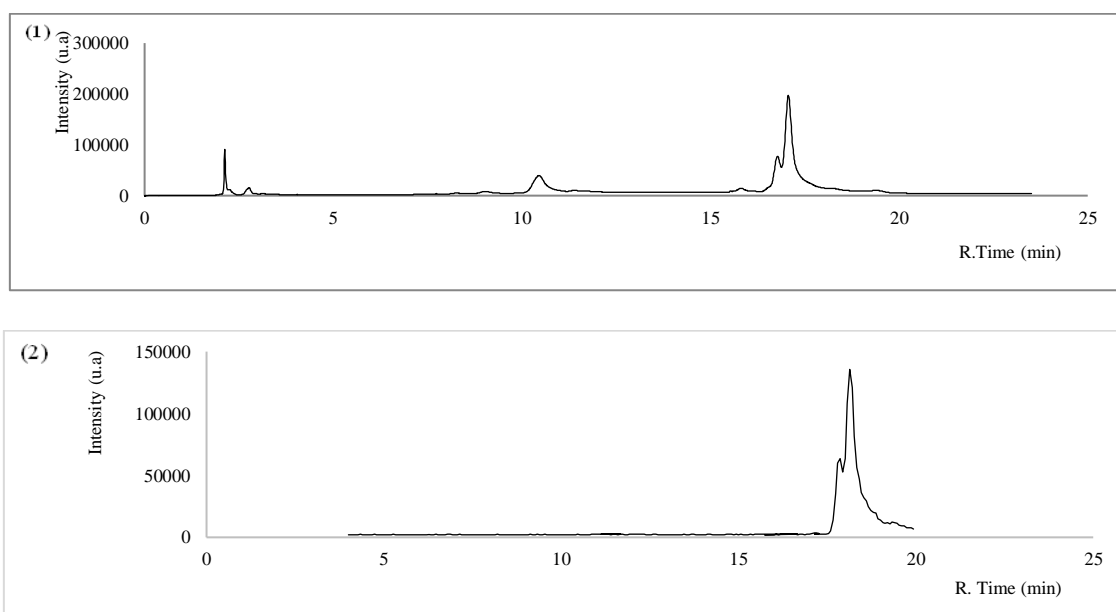
**Tableau 3: Analyse quantitative des extraits des feuilles de quatre populations *M. annua***

	TR(min)	Quantité de flavonol en µg / g MS							
		Pieds mâle				Pieds femelle			
		Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul	Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul
<b>Narcissine</b>	17.5 ± 0.3	885.4±0.001	320.73±0.018	728.48±0.04	521.31±0.038	732.78±0.38	95.02± 0.1	501.38± 0.73	354.29±0.32
<b>Gallocatechine</b>	7.3± 0.2	205.68±0.005	57.1±0.043	181.36±0.004	61.89±0.02	155.37± 0.001	42.67± 0.005	150.45	59.06± 0.02
<b>Rutine</b>	15.4 ± 0,3	44.18±0.016	8.11±0.0002	23.98±0.005	10.82±0.061	18.38± 0.004	1.4±0.0003	11.57± 0.001	7.4±0.102
<b>Epigallocatechine</b>	9.07±0.2	35.37±0.0007	12.78±0.082	23.68±0,004	20.68± 0.006	34.57±0.0008	10.11± 0.0012	17.29±0.005	14.63±0.164
<b>Epicatechine</b>	15.3±0.2	27.46±0.04	12.35± 0.001	24.57±0.003	18.4±0.0009	21.02± 0.003	8.16±0.0006	13.16±0.001	11.01±0.001

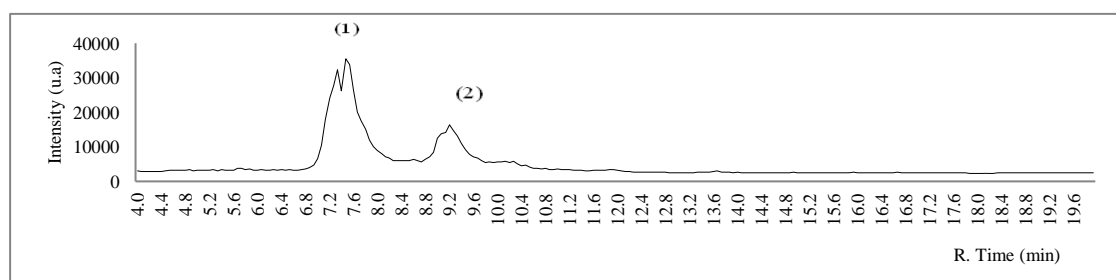
## ❖ Feuilles de Bizerte

La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydro-alcooliques des feuilles de *M. annua* provenant de la région de Bizerte sont exposés sur les figures (30,31,32,33,34,35,36,37) sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés.

### ➤ Feuilles mâles



**Figure 30: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistré à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).**



**Figure 31 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigallocatéchine (2).**

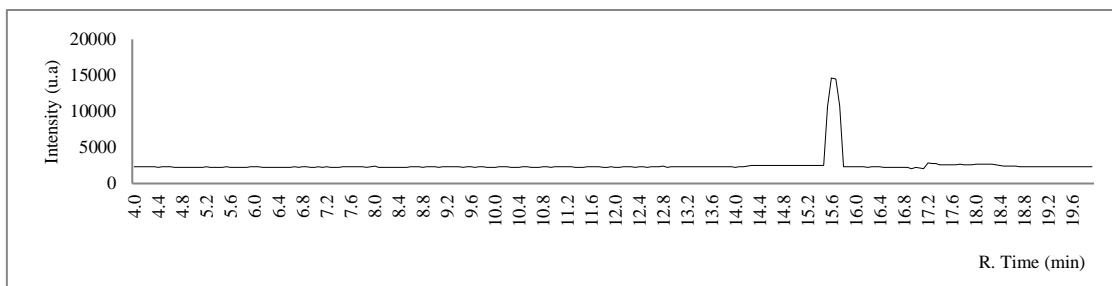


Figure 32: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (rutine).

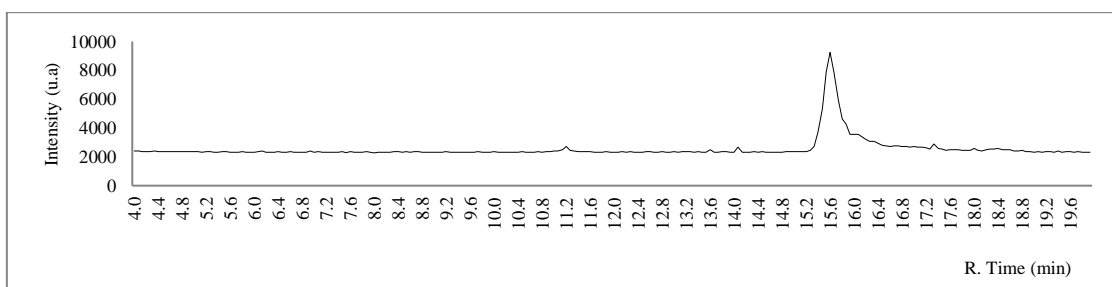


Figure 33: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (épicatechine).

➤ Feuilles femelles

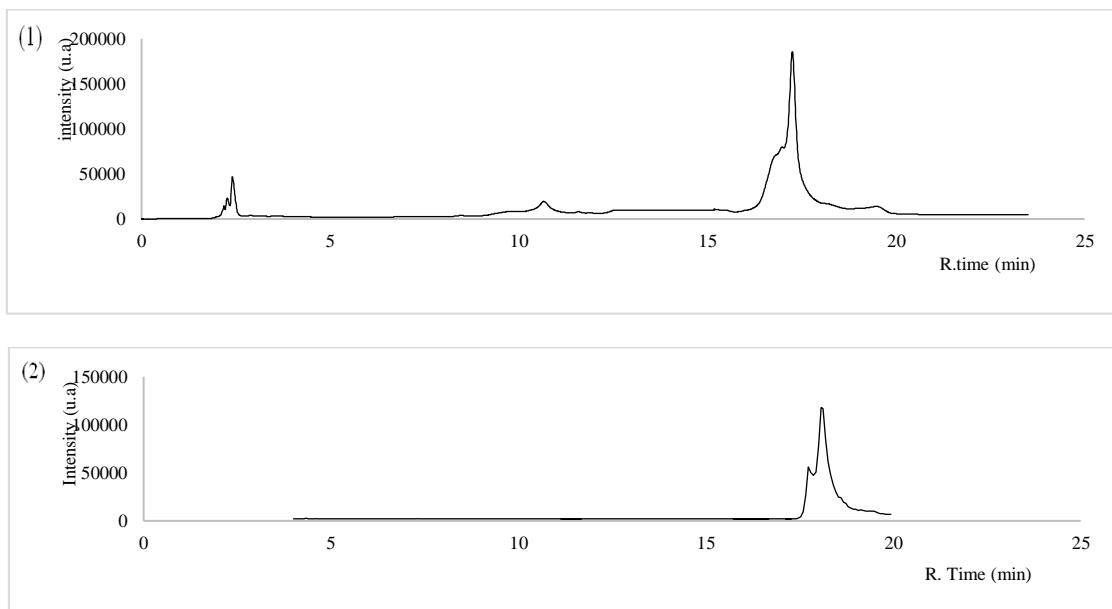
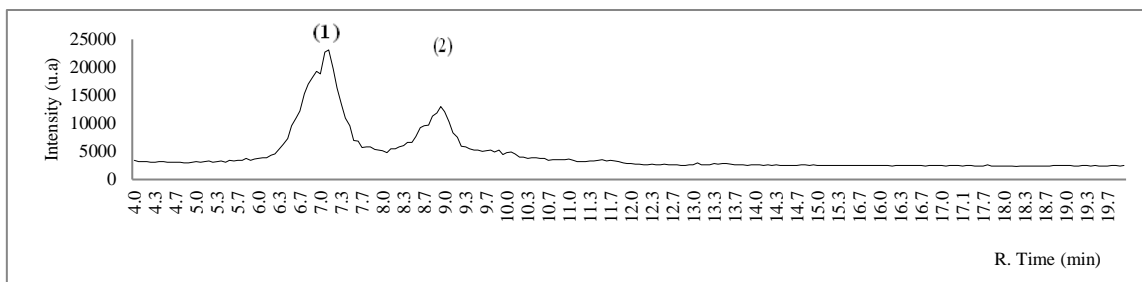
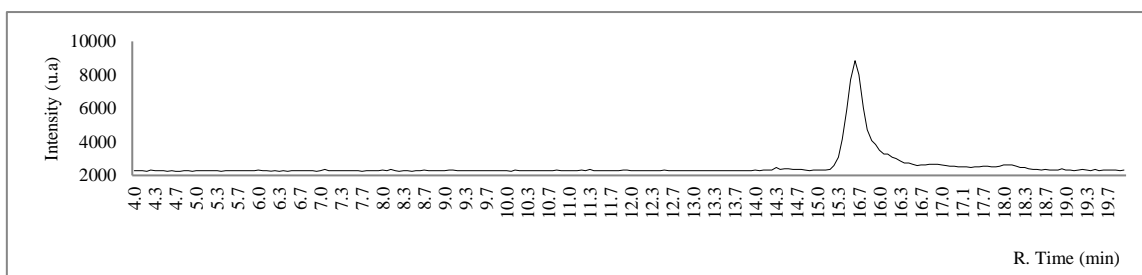


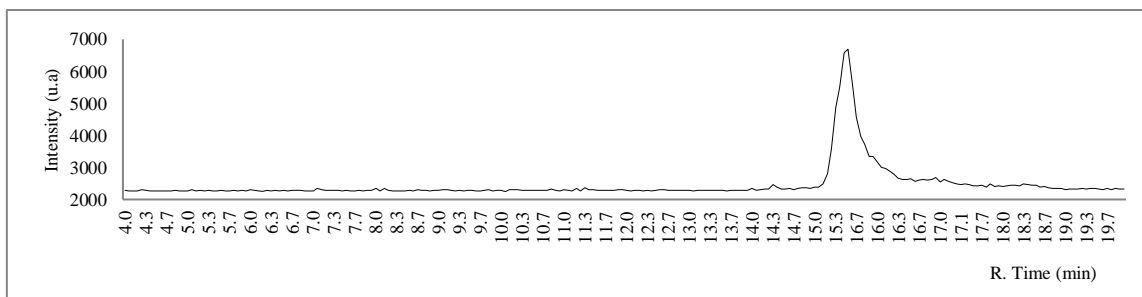
Figure 34: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).



**Figure 35:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2).



**Figure 36:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (rutine).



**Figure 37:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Bizerte de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (épicatéchine).

### ❖ Feuilles de Beja

La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydroalcooliques des feuilles de *M. annua* provenant de la région de Beja sont exposés sur les figures (38,39) sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés.

### ➤ Feuilles mâles

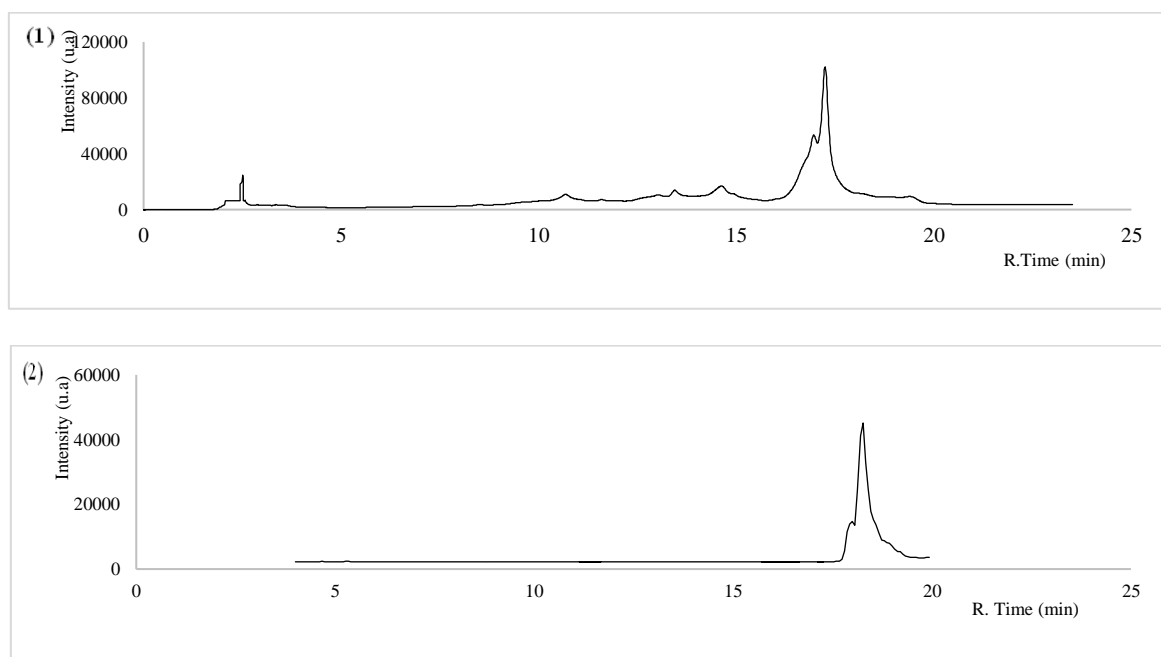


Figure 38: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistré à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).

### ➤ Feuilles femelles

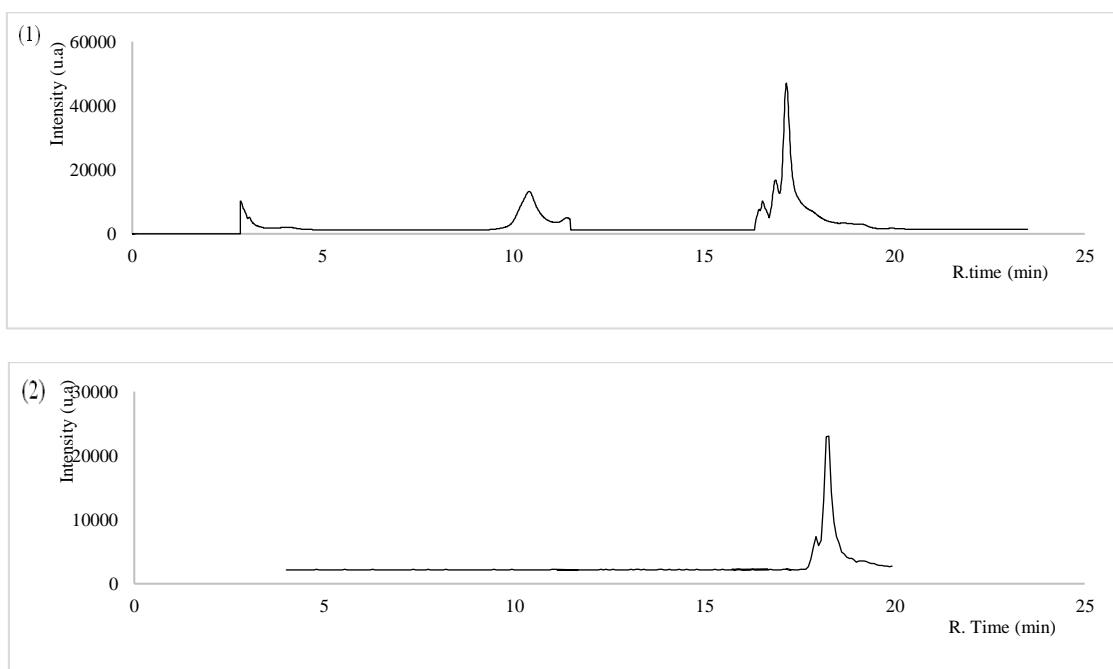
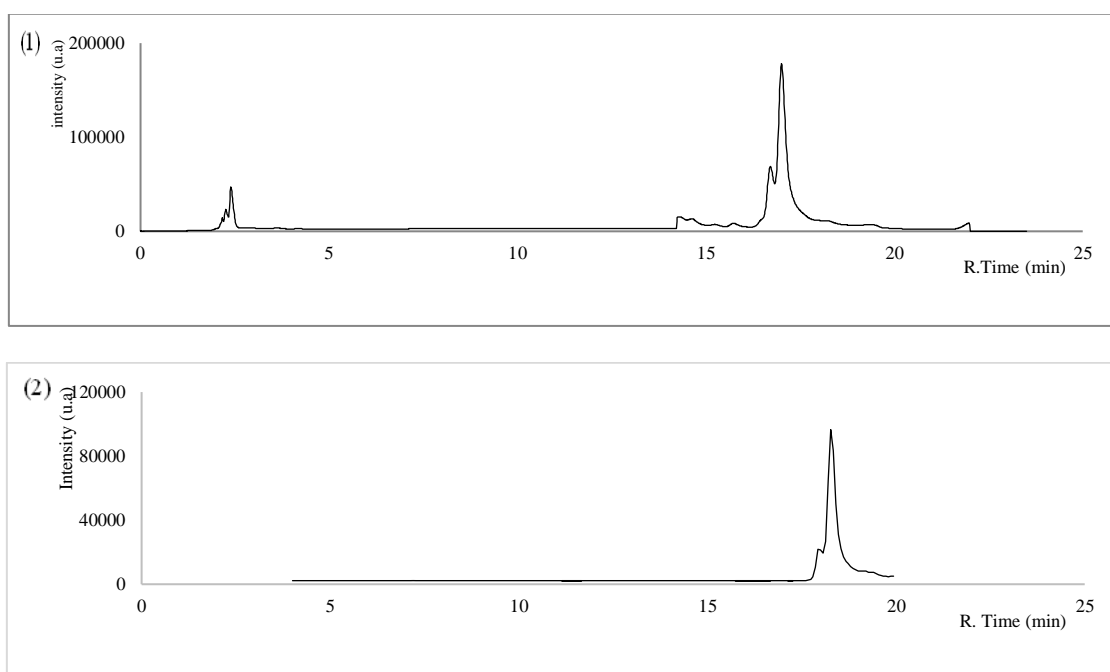


Figure 39: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistré à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).

### ❖ Feuilles de Jandouba

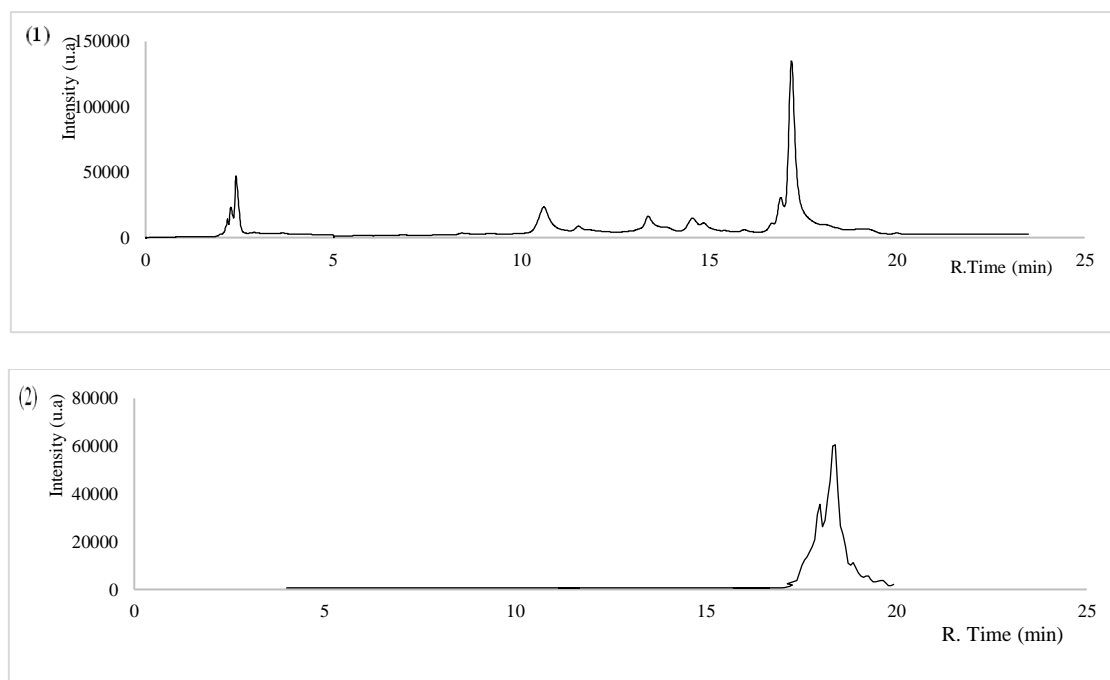
La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydro-alcooliques des feuilles de *M. annua* provenant de la région de Jandouba sont exposés sur les figures (40,41) sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés.

### ➤ Feuilles mâles



**Figure 40: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).**

### ➤ Feuilles femelles

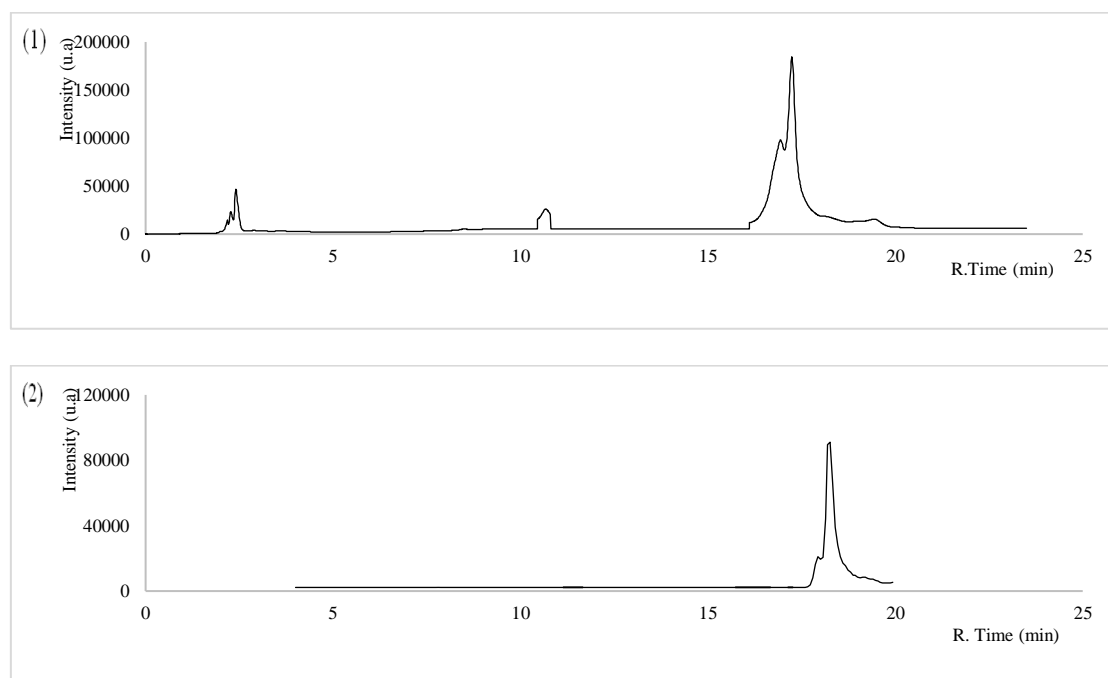


**Figure 41: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).**

### ❖ Feuilles de Nabeul

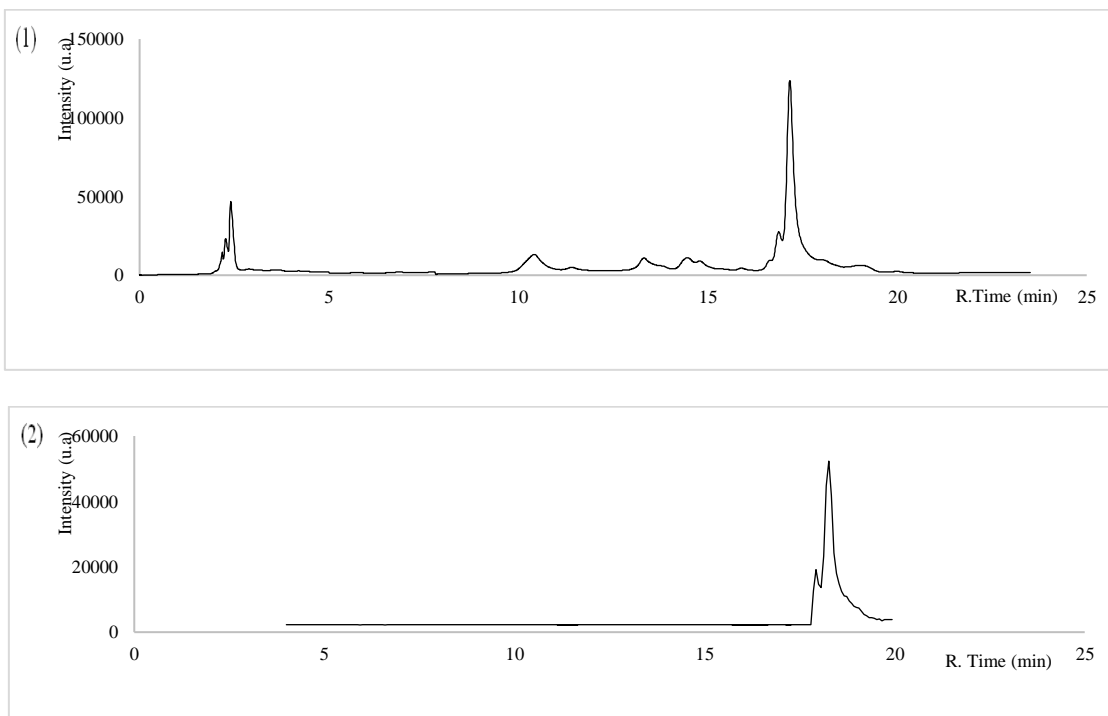
La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydroalcooliques des feuilles de *M. annua* provenant de la région de Bizerte sont exposés sur les figures (42,43) sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés.

➤ **Feuilles mâles**



**Figure 42:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant Nabeul de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2).

➤ **Feuilles femelles**



**Figure 43:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de *M. annua*, chromatogramme UV 264 enregistrés à 350 nm (1) et chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine) (2)



#### I.4.2. Analyses des extraits des graines

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4 indiquant les quantités des différents flavonoïdes dans les extraits des graines. En effet, les extraits des graines de *M. annua* contiennent le narcissine, les graines provenant de la région de Bizerte ont affiché la quantité la plus élevée en ce flavonoïde : 0.107 µg / g suivi de celles de Nabeul : 0.032 µg / g MS, les graines de Jandouba ont étalé la plus faible quantité de narcissine : 0,007 µg / g MS

Les extraits des graines de *M. annua* contiennent également la gallocatéchine : 0 ;04 µg / g MS dans les extraits des graines de Bizerte suivi de Jendouba : 0,014µg / g MS puis la région de Nabeul et Beja avec 0,012 µg / g MS.

Concernant l'épicatéchine et l'épigallocatechine, l'analyse montre de très faible concentration présente dans les extraits de graines étudiées.

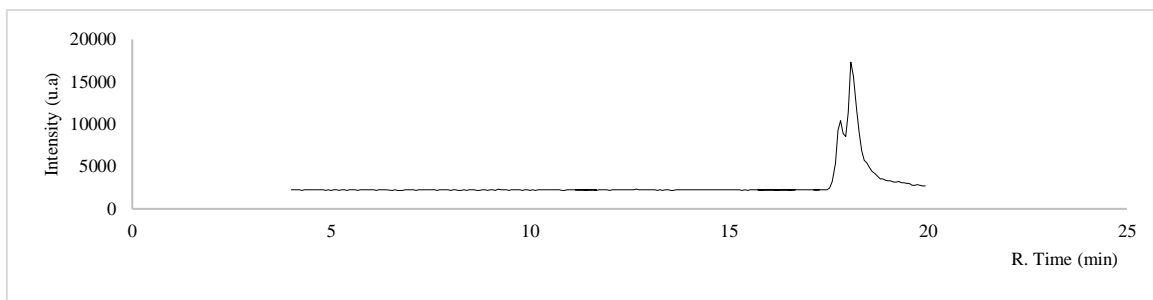
Les extraits des graines sont dépourvus de la rutine sauf les extraites de la région de Bizerte avec de très faible quantité 0.002 µg / g MS.

Tableau 4: Analyse quantitative et qualitative des extraits des graines de quatre provenances de *M. annua*.

	TR (min)	Quantité de flavonol en µg / gMS			
		Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul
<b>Narcissine</b>	17,5 ± 0,3	0,107± 0,004	0,014± 0,003	0,007	0,032± 0,002
<b>Gallocatechine</b>	7,3± 0,2	0,04± 0,01	0,012± 0,001	0,014	0,012
<b>Rutine</b>	15,4 ± 0,3	0,002	0	0	0
<b>Epigallocatechine</b>	9,07±0,2	0,008± 0,001	0,002	0,002	0,002
<b>Epicatechine</b>	15,3±0,2	0,008± 0,01	0	0,006± 0,003	0,003

#### ❖ Graines de Bizerte

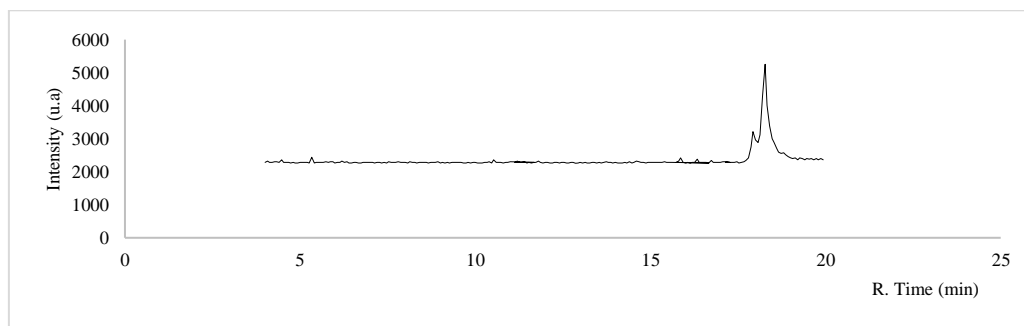
La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydro-alcooliques des graines de *M. annua* provenant de la région de Bizerte sont exposés sur la figure 44 sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés.



**Figure 44:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de  $m/z$  623 (narcissine).

#### ❖ Graines de Beja

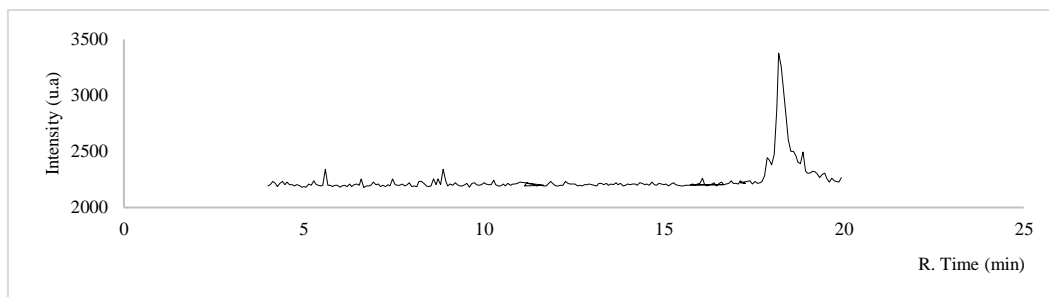
La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydroalcooliques des graines de *M. annua* provenant de la région de Beja sont exposés sur la figure 45 sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés



**Figure 45:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de  $m/z$  623 (narcissine).

#### ❖ Graines de Jendouba

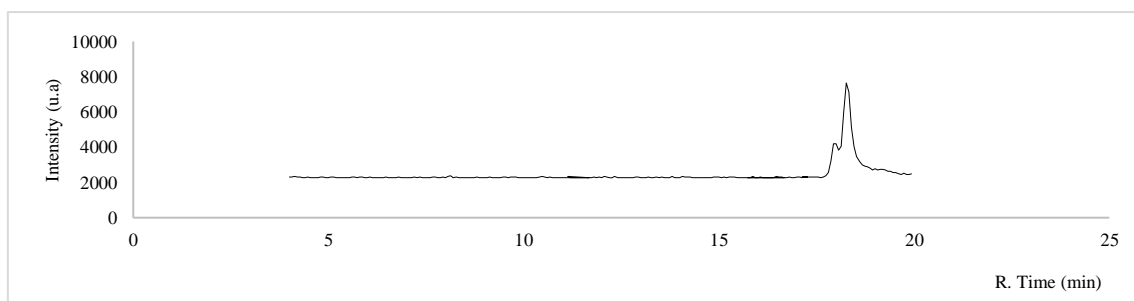
La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydroalcooliques des graines de *M. annua* provenant de la région de Jendouba sont exposés sur la figure 46 sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés



**Figure 46: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine).**

#### ❖ Graines de Nabeul

La comparaison à des étalons standard des profils chromatogrammes des extraits hydroalcooliques des graines de *M. annua* provenant de la région de Nabeul sont exposés sur la figure 47 sous PDA à 350 nm et ESI / MS confirme que la narcissine est le principal flavonoïde dans les extraits étudiés



**Figure 47: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait des graines hydroalcooliques de *M. annua*, chromatogrammes d'ions extraits de m / z 623 (narcissine).**

#### I.4.3. Analyses des extraits des Tiges

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5 indiquant les quantités des différents flavonoïdes dans les extraits des tiges. En effet, les extraits des tiges de *M. annua* contiennent le narcissine, les tiges provenant de la région de Bizerte ont affiché la quantité la plus élevée en ce flavonoïde : 0,163  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  pour les pieds mâles et 0,070  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  pour les pieds femelles suivi de celles de Jendouba : 0,46  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  (pieds mâles) et 0,36  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  (pieds femelles).

Les extraits des tiges de *M. annua* contiennent également du gallocatéchine : 0,23 µg / g MS dans les pieds mâles de Bizerte suivi de Nabeul : 0,18 µg / g MS (pieds mâles), puis la région de Jandouba avec 0,13 µg / g MS dans les extraits des feuilles des pieds mâles.

Le tableau 3 montre aussi l'existence d'épigallocatéchine et d'épicatéchine à faible concentration dans les extraits des tiges.

La concentration en flavonoïdes des extraits des tiges provenant de Beja sont presque nulles.

Tableau 5: Analyse quantitative et qualitative des extraits des tiges de quatre provenances de *M. annua*.

	TR (min)	Quantité de flavonol en µg / gMS							
		Pieds mâle				Pieds femelle			
		Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul	Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul
<b>Narcissine</b>	17,5 ± 0,3	0,163±0,02	0	0,046±0,004	0,021	0,070	0	0,036	0,015±0,003
<b>Galocatechine</b>	7,3± 0,2	0,023±0,003	0	0,013	0,018±0,002	0,03±0,002	0	0,008	0,021±0,001
<b>Rutine</b>	15,4 ± 0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Epigallocatechine</b>	9,07±0,2	0,003	0	0,003	0,003	0,004	0	0,002	0,004
<b>Epicatechine</b>	15,3±0,2	0,016±0,001	0	0,012	0,015±0,001	0,016±0,002	0	0,01±0,001	0,014

#### **I.4.4. Analyses des extraits des Racines**

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6 indiquant les quantités des différents flavonoïdes dans les extraits des racines. En effet, la quantité des flavonoïdes dans les extraits des racines sont presque nulles. Les tiges provenant de la région de Bizerte ont affiché une faible quantité du narcissine : : 0,004  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  pour les pieds mâles et 0,017  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  pour les pieds femelles suivi de celles de Nabeul : 0,002  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  pour les pieds mâles également pour les pieds femelles.

Les extraits des tiges provenant de Bizerte contiennent des faibles quantités en épicatechine : 0,004  $\mu\text{g} / \text{g MS}$  dans les pieds mâles de Bizerte suivi de Nabeul : 0,002 $\mu\text{g} / \text{g MS}$  (pieds mâles), Le tableau 3 montre aussi l'existence d'épigallocatechine à faible concentration dans les extraits racines, aussi la concentration en flavonoïdes des extraits des racines provenant de Beja et Jandouba sont presque nulles.

Tableau 6: Analyse quantitative et qualitative des extraits des racines de quatre provenances de *M. annua*.

	TR (min)	Quantité de flavonol en µg / gMS							
		Pieds mâle				Pieds femelle			
		Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul	Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul
<b>Narcissine</b>	17,5 ± 0,3	0,004	0	0	0,002	0,014±0,02	0	0	0,002
<b>Gallocatechine</b>	7,3± 0,2	0,009±0,001	0	0	0,006	0,006	0	0	0,005
<b>Rutine</b>	15,4 ± 0,3	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Epigallocatechine</b>	9,07±0,2	0,001	0	0	0,002	0,001	0	0	0,002
<b>Epicatechine</b>	15,3±0,2	0,004	0	0	0,002	0,003	0	0	0,002

## **II. Evaluation d'une activité larvicide des extraits aqueux des feuilles et des graines contre *T. confusum***

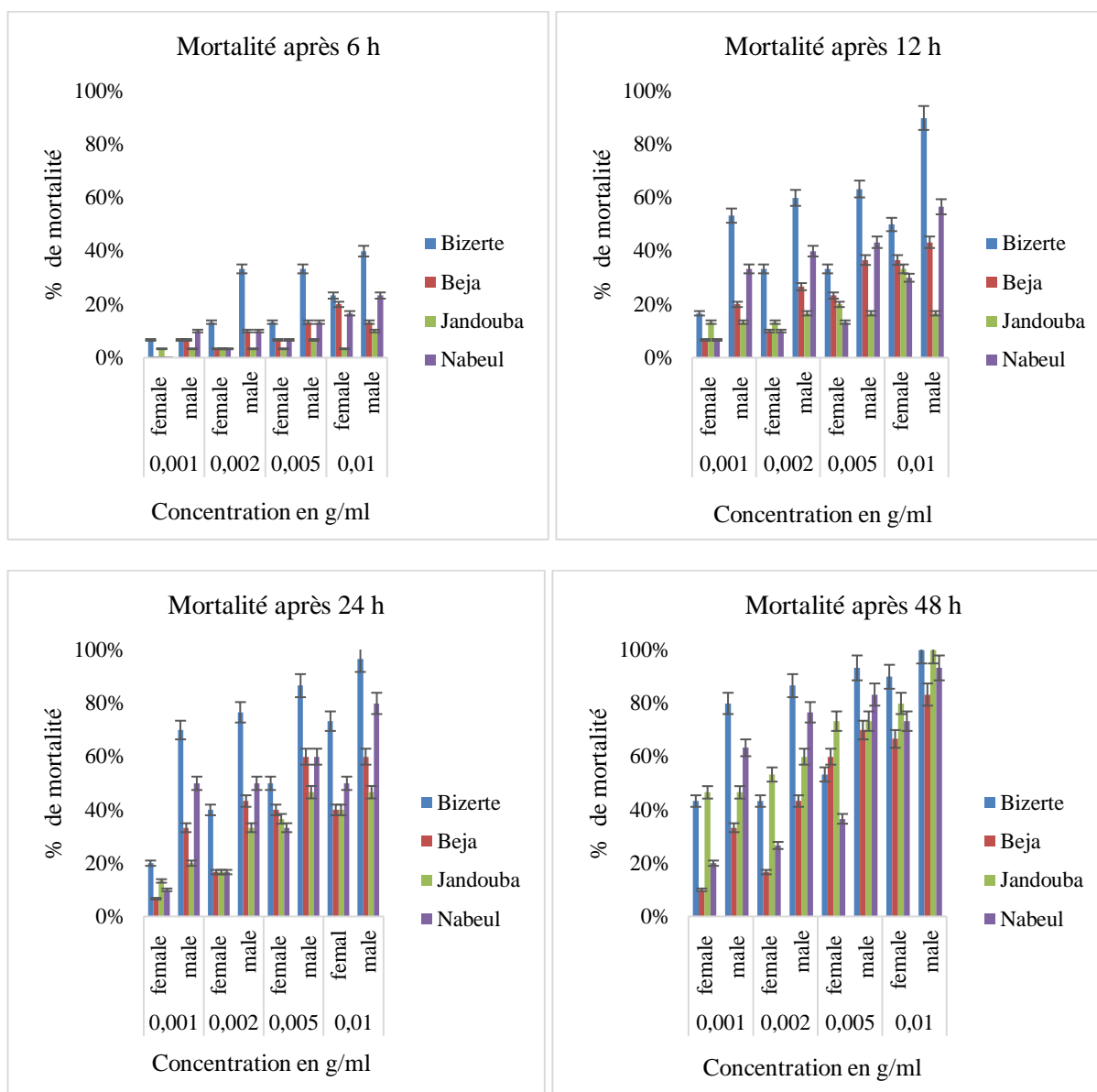
Après avoir exposé des larves de l'espèce *T. confusum* à différentes concentrations (0,001g/ml ; 0,002g/ml ; 0,005g/ml et 0,01g/ml) des extraits aqueux des feuilles des pieds mâles et des pieds femelles et des graines pendant 48 h, le taux de mortalité a été calculé. En effet, nous avons constaté que la mortalité dépend principalement des concentrations, de la provenance et du sexe, ce sont les principaux facteurs influençant les variations de l'activités larvicide étudiée.

### **II.1. Activité larvicide des extraits des feuilles**

Les résultats de l'activité larvicide des extraits de *M. annua* sont présentés dans la figure 48. L'effet larvicide des extraits aqueux des feuilles des plantes mâles et des plantes femelles a été observé après 6h, 12h, 24h et 48h, montrant une intoxication croissante des larves de *T. confusum* en fonction du temps ( $P = 0,0001$ ) et de la concentration ( $P = 0,001$ ).

Les valeurs de  $CL_{50}$  obtenues avec les extraits des feuilles des pieds mâles de la région de Bizerte à 0,01 g / ml sont relativement basses. En effet, après 24 h d'exposition la  $CL_{50} = 0,0039$  g / ml et après 48 h elle est de 0,0026 g / ml. Ce qui respectivement, se manifeste par une mortalité de 97% et de 100%.





**Figure 48:** (%) de mortalité après 6h de *T. confusum* soumis aux différentes concentrations de l'extrait aqueux des feuilles des pieds femelles et mâles de quatre provenances de *M. annua*.

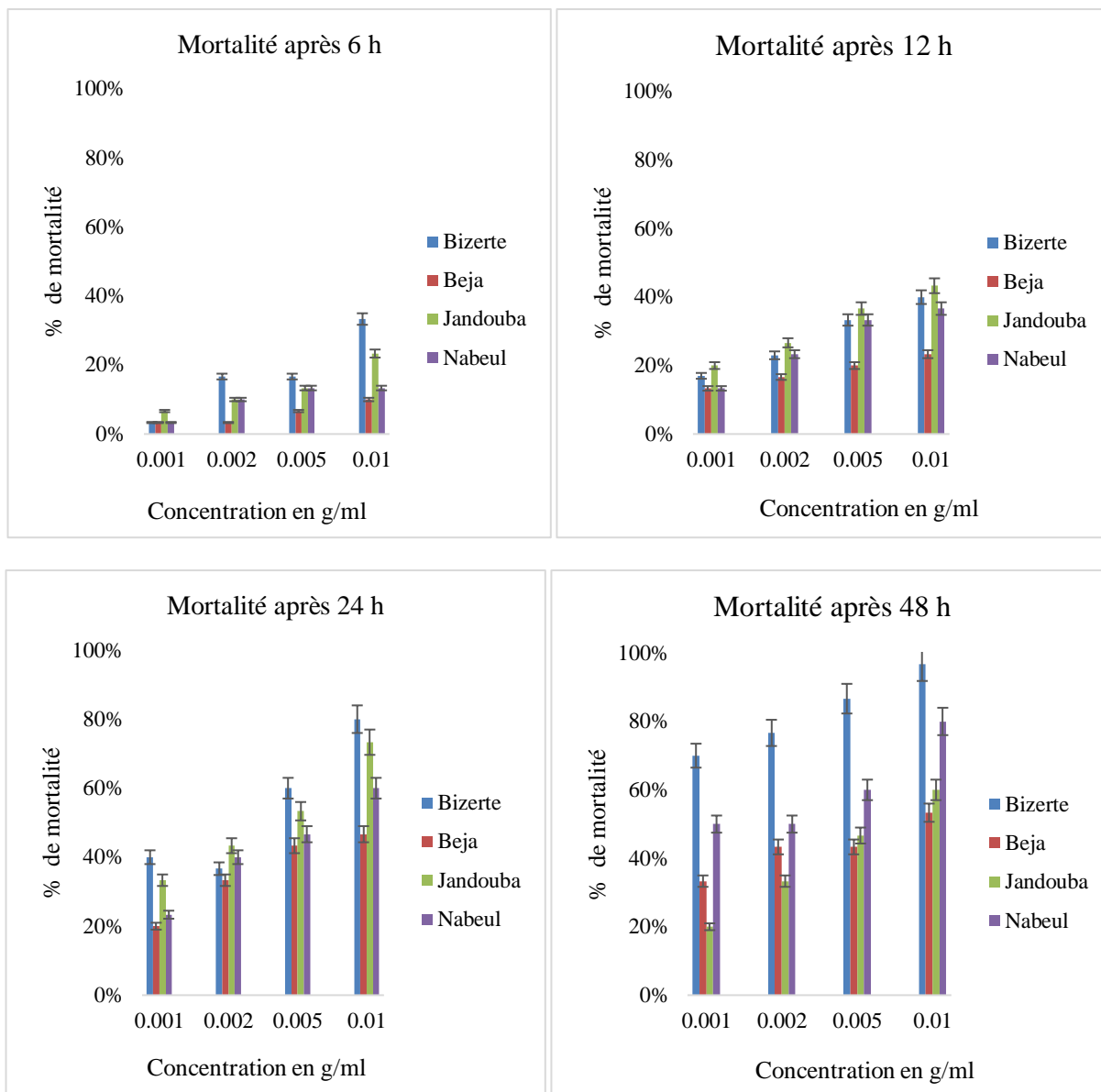
En revanche, les feuilles des plantes femelles de la région de Bizerte ont montré une toxicité plus élevée que celle évaluée dans les trois autres régions (Tableau 7).

Comme détaillé dans la figure 48 l'extrait des feuilles de la provenance de Beja ont exhibé la plus faible toxicité contre les larves de *T. confusum* avec des valeurs de  $CL_{50}$  pour les feuilles de plantes mâles égale à 0,00924 g / ml et pour les femelles des plantes femelles égale à 0,0157 g / ml respectivement.

Nous avons constaté que les extraits de feuilles de plantes mâles testés sur *T. confusum* étaient plus efficaces que les extraits de feuilles de plantes femelles. L'influence des paramètres de genre est très significative ( $P = 0,001$ ). Nos résultats soulignent également l'influence significative de la source de matière végétale ( $P = 0,002$ ). Nous n'avons pas enregistré de mortalité pour le test de contrôle.

## **II.2. Activité larvicide des extraits des graines**

Les résultats de l'activité larvicide des extraits de *M. annua* sont présentés par les figures 49. En effet, l'effet larvicide des extraits aqueux des graines des plantes mâles et femelles a été observé après 6h, 12h, 24h et 48h, montrant une intoxication croissante des larves de *T. confusum* avec l'augmentation du temps ( $P = 0,003$ ) et de la concentration ( $P = 0,005$ ). Les extraits des graines de la région de Bizerte à 0,01 g / ml ont affiché un pourcentage de mortalité élevé (80%) après 24 h d'exposition, 97% de mortalité est atteinte après 48 h. Cette toxicité élevée a été confirmée par la valeur la plus basse de  $CL_{50} = 0,002$  g / ml après 24 h d'exposition et  $CL_{50} = 0,00039$  g / ml après 48 h.



**Figure 49:** (%) de mortalité de *T. confusum* soumis aux différentes concentrations de l'extrait aqueux des graines de quatre provenances de *M. annua*.

En revanche, les graines de la région de Bizerte ont montré une toxicité plus élevée que celle évaluée dans les trois autres régions (Tableau 7).

Comme détaillé dans les figures 49 l'extrait des graines de la provenance de Beja ont exhibé la plus faible toxicité contre les larves de *T. confusum* avec des valeurs de  $CL_{50}$  égale à 0,1 g / ml après 24h et égale à 0,008g / ml après 48h. En effet nos résultats soulignent donc l'influence significative de la source de matière végétale ( $P = 0,003$ ). Nous n'avons pas enregistré de mortalité pour le test de contrôle.

**Tableau 7 : Activité larvicide des extraits des feuilles et des graines de *M. annua***

Provenance	Organe	Temps (h)	CL <sub>50</sub> g/mL± SE	χ <sup>2</sup>	95% Limite de confiance Inf	95% Limite de confiance Sup
Bizerte	F. femelle	24	0.0038 ± 0.172	2.969	0.00312	0.00498
	F. mâle	24	0.00039 ± 0.217	2.237	0.000126	0.00069
	Graines	24	0.002 ± 0.174	7.415	-	-
	F. femelle	48	0.0020 ± 0.178	20.439	-	-
	F. mâle	48	0.00026 ± 0.282	3.406	0.00006	0.0005
	Graines	48	0.00039 ± 0.217	2.285	0.000128	0.01
Nabeul	F. femelle	24	0.0022 ± 0.134	0.126	-	-
	F. mâle	24	0.0014 ± 0.172	5.472	0.00066	0.0022
	Graines	24	0.005 ± 0.172	1.562	0.004	0.009
	F. femelle	48	0.0049 ± 0.196	10.69	-	-
	F. mâle	48	0.00046 ± 0.201	1.21	0.00024	0.00099
	Graines	48	0.001 ± 0.172	5.2	0.0007	0.002
Jandouba	F. femelle	24	0.012 ± 0.196	5.045	0.0085	0.0022
	F. mâle	24	0.0034 ± 0.162	1.711	0.00059	0.024
	Graines	24	0.003 ± 0.172	1.894	0.002	0.004
	F. femelle	48	0.00135 ± 0.176	0.795	0.00096	0.0042
	F. mâle	48	0.00132 ± 0.207	16.234	-	-
	Graines	48	0.006 ± 0.175	0.272	0.004	0.009
Béja	F. femelle	24	0.0157 ± 0.186	1.985	0.0096	0.042
	F. mâle	24	0.0092 ± 0.173	2.49	0.00013	0.069
	Graines	24	0.1 ± 0.173	1.566	0.006	0.0032
	F. femelle	48	0.0052 ± 0.181	6.859	0.00023	0.034
	F. mâle	48	0.0022 ± 0.181	0.99	0.0018	0.0028
	Graines	48	0.008 ± 0.167	1.139	0.004	0.121

Comme le montre le tableau 7, La CL<sub>50</sub> à 24H et à 48H confirme que les extraits de feuilles et des graines de Bizerte sont intéressants en termes de toxicité en les comparant aux autres régions.

Le test ANOVA utilisé pour comparer l'activité larvicide a montré, qu'il existe des différences significatives entre les régions (P=0.001 pour les extraits des feuilles et P=0.003 pour les extraits des graines) et entre des plantes mâles et des plantes femelles (P = 0.002) En outre, ces différences peuvent être dues aux facteurs climatiques entre ces régions, et à la teneur des différents flavonoïdes contenus dans les échantillons quel que soit le genre des pieds étudiés.

### II.3. Relation entre les activités anti-oxydantes et l'activité larvicide

La forte toxicité des différents extraits des feuilles des pieds mâles et femelles et des graines est en relation avec l'activité anti-oxydante de ces extraits. En effet la figure 50 rapporte une bonne corrélation négative entre AAO (mg / g MS) et CL<sub>50</sub> ces résultats sont confirmés par les coefficients de corrélation de Pearson,  $r = -0,9507$ ,  $P = 0,005$  pour les extraits des feuilles des pieds mâles et  $r = -0,760$ ,  $P = 0,03$  pour les extraits des feuilles des pieds femelles. En outre, une bonne corrélation négative a été observée entre l'AAO et l'effet larvicide des extraits des graines avec  $r = -0,838$ ,  $P = 0,001$  (figure 51).

#### ➤ Extrait des feuilles

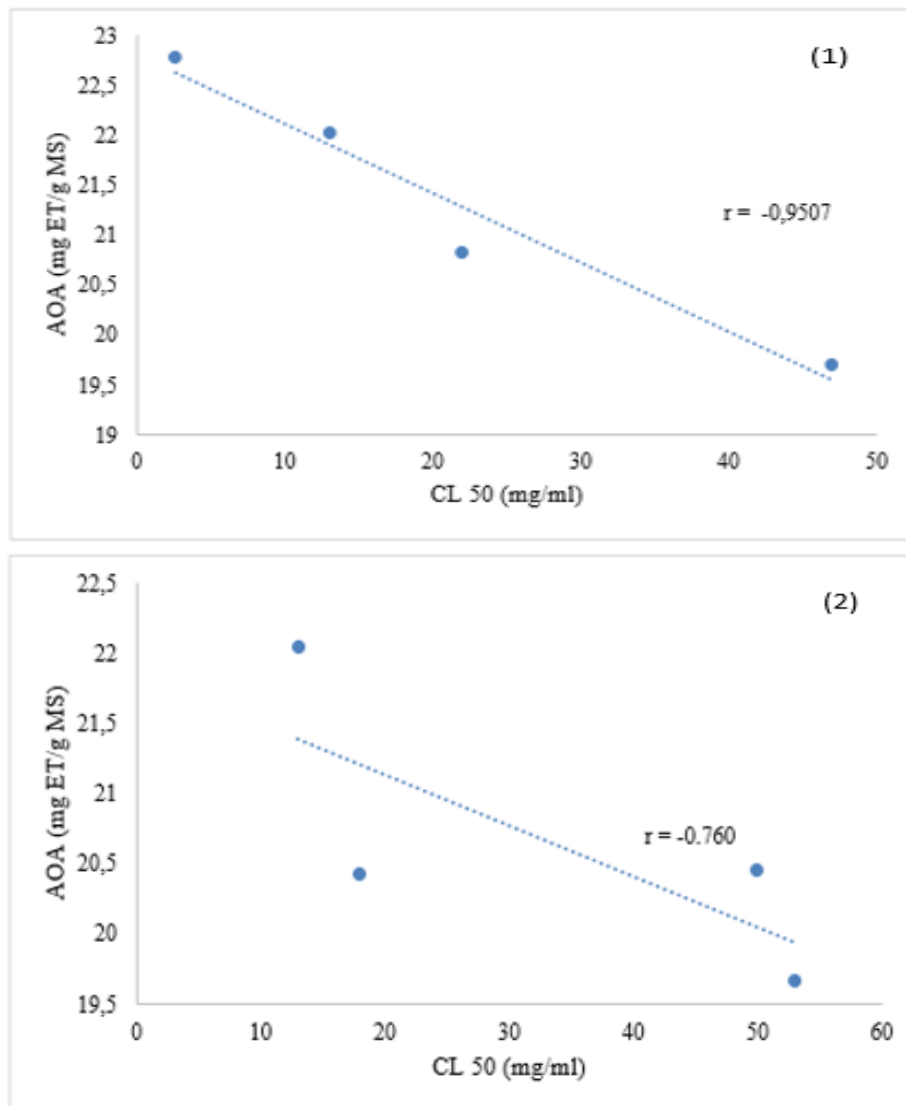


Figure 50: Relation entre les activités larvicides et les activités anti-oxydantes des extraits de feuilles hydro-méthanoliques des pieds mâles (1) et des pieds femelles (2) de *M. annua*.

## ➤ Graine

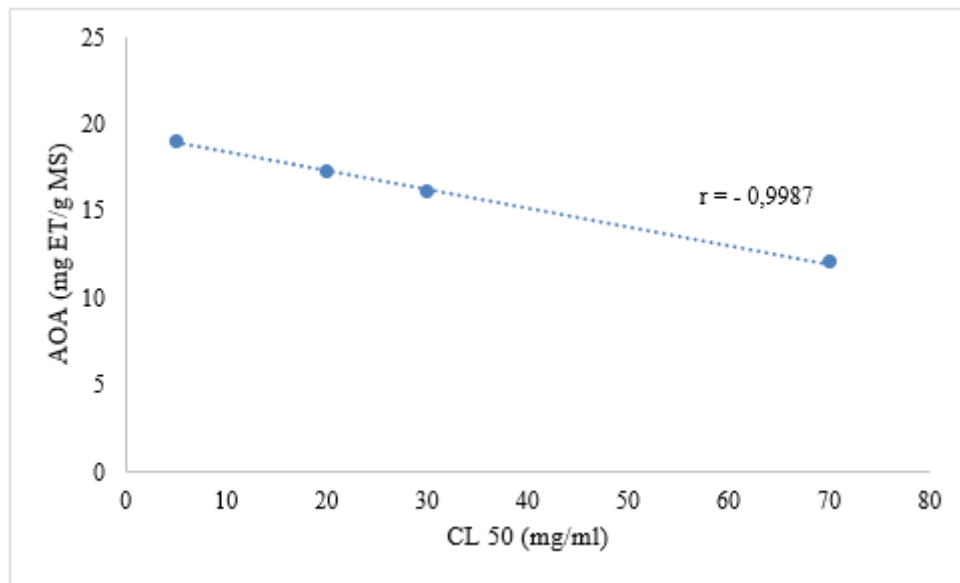


Figure 51: Relation entre les activités larviques et les activités anti-oxydantes des extraits de feuilles hydro-méthanoliques des graines de *M. annua*.

### III. Evaluation de l'activité anti-Acétylcholinestérase des extraits méthanoliques de *M. annua*.

#### III.1. Calcul de la moitié de la concentration inhibitrice maximale (IC<sub>50</sub>)

La concentration qui produit 50% d'inhibition est obtenue à partir de la courbe, qui montre le pourcentage d'inhibition par rapport aux différentes concentrations de l'échantillon étudié. Les résultats obtenus fournissent la moyenne avec l'écart type de trois répétitions.

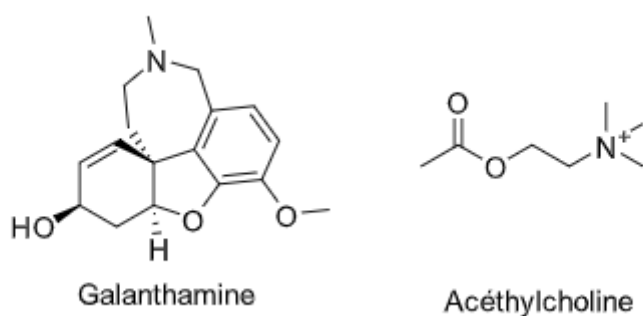
L'étude de l'activité anti-AChE des différents extraits de quatre populations de la mercuriale a montré que tous les extraits méthanoliques des pieds mâles et femelles des feuilles ainsi que les extraits méthanoliques des graines sont des inhibiteurs puissants de l'enzyme AChE. Tous les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8: Activités anti-AChE des différents extraits testés de quatre populations de *M. annua*.

population	sexe	extrairt	IC50(g/ml)
Bizerte	femelle	feuilles	0,045±0,005
		graines	0,052±0,004
		tiges	0,091±0,008
		racines	0,13±0,012
	mâle	feuilles	0,037±0,003
		tiges	0,083±0,007
racines		0,1±0,015	
Beja	femelle	feuilles	0,065±0,002
		graines	0,066±0,009
		tiges	0,14±0,02
		racines	0,21±0,025
	mâle	feuilles	0,064±0,004
		tiges	0,093±0,02
racines		0,19±0,031	
Jandouba	femelle	feuilles	0,059±0,005
		graines	0,060±0,003
		tiges	0,12±0,02
		racines	0,17±0,014
	mâle	feuilles	0,057±0,009
		tiges	0,086±0,001
racines		0,16±0,06	
Nabeul	femelle	feuilles	0,058±0,002
		graines	0,057±0,01
		tiges	0,1±0,002
		racines	0,15±0,04
	mâle	feuilles	0,054±0,007
		tiges	0,083±0,004
racines		0,14±0,09	
galantamine			0,066±0,008

Comparé aux différents extraits testés, les résultats montrent que les extraits méthanoliques des feuilles provenant de Bizerte sont les inhibiteurs les plus puissants de l'AChE.

Cette bonne activité est confirmée par les valeurs les plus faibles d'IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>= 0,037 g/ml pour les extraits des pieds mâles et IC<sub>50</sub> = 0,045 g/ml pour les extraits des pieds femelles) qui sont, également, inférieures à celle de la galanthamine hydrobromide (0,66 g/ml) utilisée comme contrôle positif. En effet, cette dernière est un alcaloïde qui est déjà utilisé contre la maladie d'Alzheimer. La galanthamine est connue pour sa capacité à augmenter le taux d'acétylcholine et à diminuer sa dégradation en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton et *al.*, 2006b). Cependant, il est à noter que la galanthamine peut provoquer des réactions cutanées graves, des troubles cardiaques et des convulsions (crises épileptiques) (Moreau, 2008), raison pour laquelle des études sont toujours en cours pour trouver des produits capables de se substituer à la galanthamine.



Les IC<sub>50</sub> des extraits hydro-méthanoliques des feuilles mâles varient entre 0,037 g/ml (provenance de Bizerte) et 0.064 g/ml (provenance de Beja),

Pour les extraits hydro-méthanoliques des feuilles femelles, elles sont entre 0,045 g/ml (provenance de Bizerte) et 0.065 g/ml (provenance de Beja).



En outre les extraits hydro-méthanoliques des feuilles provenant de Jendouba ont un pouvoir inhibiteur de l'AChE avec  $IC_{50} = 0,057$  g/ml pour le sexe mâle et 0,059g/ml, pour le sexe femelle, pareil pour la région de Nabeul avec  $IC_{50} = 0.054$  g/ml pour les feuilles des pieds mâles et  $IC_{50} = 0.058$  g/ml pour les feuilles des pieds femelles.

Les extraits hydro-méthanoliques des graines ont montré des valeurs très significatives de point de vue pouvoir inhibiteur de l'AChE et toujours les extrait provenant de Bizerte ont le pouvoir le plus élevé avec  $IC_{50} 0.052$  g/ml.

La région de Beja a la plus faible avec  $IC_{50} 0.066$  g/m. pareil pour Nabeul et Jendouba qui ont montré un pouvoir inhibiteur de l'AChE avec un  $IC_{50}$  respectivement 0.057 g/ml et 0.060 g/ml.

Bien que leurs  $IC_{50}$  soient supérieures à celle de la galantamine, les extraits hydro-méthanoliques des tiges et des racines ont montré des valeurs d'activité inhibitrice proches de celle de la galantamine.

La valeur D' $IC_{50}$  des tiges ne dépasse pas les 0.0.93 g/ml pour les extraits des pieds mâles et 0.14 g/ml pour les extraits des pieds femelles. Celles des racines est de l'ordre 0.19 g/ml pour les extraits des pieds mâles et 0.21 g/ml pour les extraits des pieds femelles.

En conclusion, les extraits provenant de Beja ont le pouvoir inhibiteur de l'AChE le plus faible et les extraits provenant de Bizerte ont celui qui est le plus élevé.

Les analyses statistiques ont révélé la présence de différences significatives entre les régions et entre les activités larvicides des plantes mâles et des plantes femelles au seuil de 5% .

### III.2. Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et la teneur en polyphénols totaux

Les figures 52, 53, 4 et 55 indiquent que les composés phénoliques sont de bons inhibiteurs de l'acétylcholinestérase. Ces résultats sont confirmés par la forte corrélation négative entre la teneur en polyphénols totaux et l'IC<sub>50</sub> de l'activité anti-AChE avec des coefficients de corrélation de Pearson pour les extraits des feuilles des pieds mâles  $r = - 0.8921$  et pour les extraits des feuilles des pieds femelles  $r = - 0.9466$ , on remarque aussi une forte corrélation négative pour les extraits des graines avec un coefficient de corrélation  $r = - 0.9855$ .

Nous avons étudié aussi la relation entre l'activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et la teneur en polyphénols totaux des extraits de racines et de tiges et les résultats ont montré qu'il existe une bonne corrélation entre ces 2 paramètres pour les tiges avec des corrélations de Pearson  $r = -0.8091$  pour les pieds mâles et  $r = -0.7656$  pour les pieds femelles.

Les corrélations enregistrées pour les racines sont  $r = -0,7292$  pour les racines des pieds mâles et  $r = -0,9373$  pour les racines des pieds femelles.

#### ➤ Extraits des feuilles

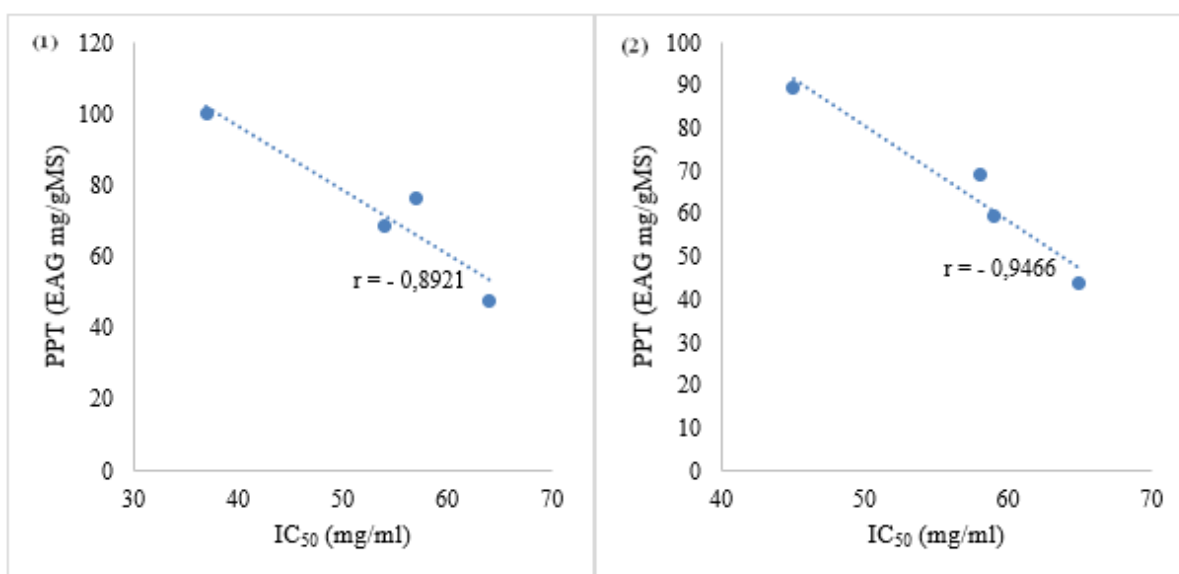


Figure 52: Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des feuilles des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de *M. annua*

➤ **Extraits des Graines**

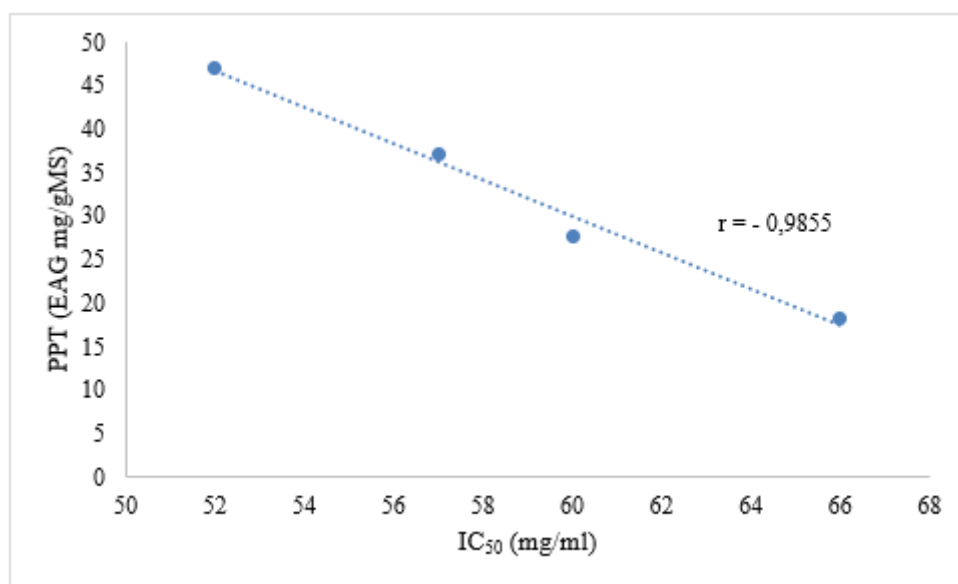


Figure 53: Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des graines de *M. annua*.

➤ **Extraits des Tiges**

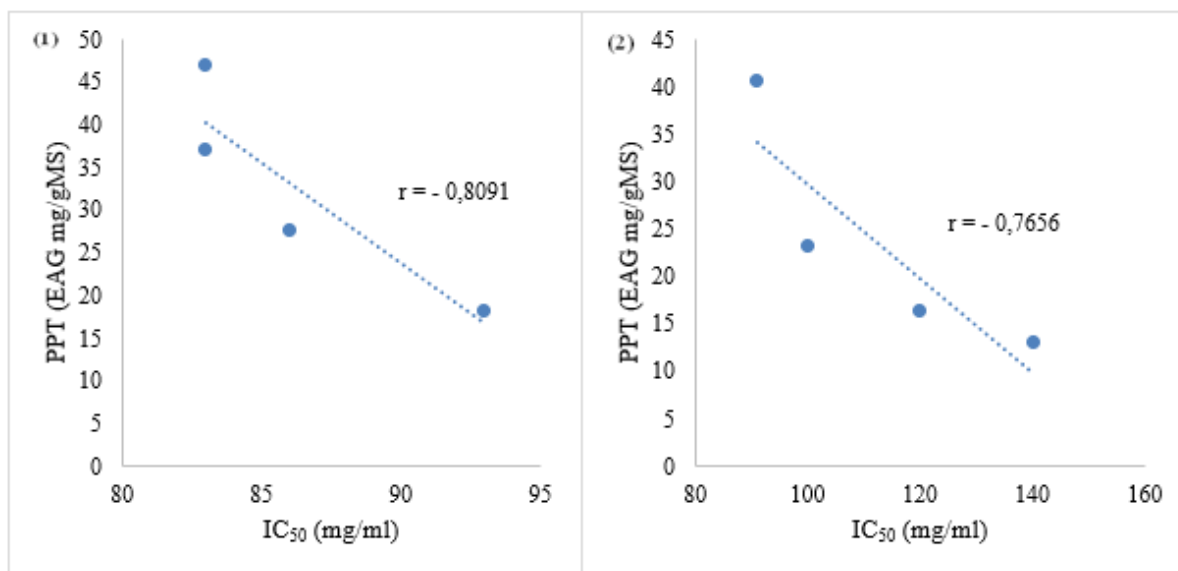
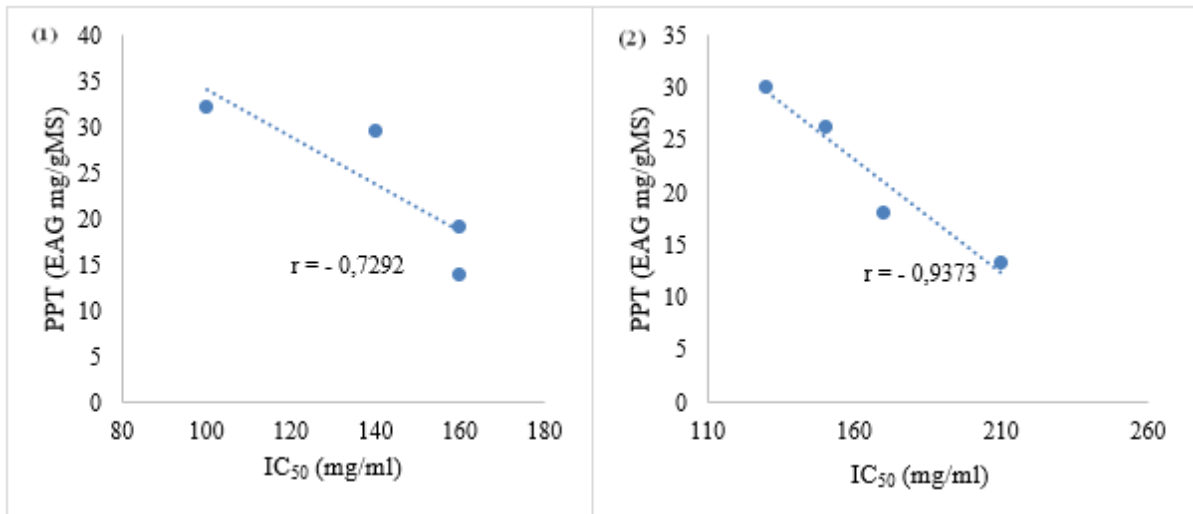


Figure 54: Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des tiges des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de *M. annua*.

➤ **Extraits des Racines**



**Figure 55: Relation entre activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et le teneur en polyphénols totaux des extraits hydro-méthanoliques des racines des pieds mâle (1) et pieds femelle (2) de *M. annua*.**

## Discussion

Les dosages, effectués à l'aide du spectrophotomètre UV-visible, ont montré que les extraits des feuilles des populations de *M. annua* étudiées sont plus riches en composés phénoliques (PPT, FVT) que les extraits des graines, des tiges et des racines. La richesse en CP dans les parties aériennes des plantes a été précédemment rapportée par Caridade *et al.*, (2018). Sur des plantes de la même famille d'*Euphorbiaceae* que *M. annua.*, les travaux de Wafa *et al.*, (2014) réalisés sur les extraits méthanoliques de ricin et jatropha, ainsi que les travaux de Evenamede *et al.*, (2017) sur les extraits éthanoliques de la *Cassia sieberiana* ont montré que, comparé aux autres organes des plantes respectivement étudiées, les feuilles ont un taux très élevé en flavonoïdes. Cette répartition inégale des CP peut s'expliquer par le fait que les feuilles sont plus exposées à la lumière du soleil que les autres organes végétaux. En effet, les flavonoïdes peuvent garantir la protection des tissus végétaux contre les effets néfastes du rayonnement solaire (Gehin *et al.*, 2006).

Nos résultats ont dévoilé que les teneurs en composés phénoliques des différents extraits issus des pieds mâles et des pieds femelles de *M. annua*, de la région de Bizerte sont toujours plus importantes que celles des trois autres régions. Plusieurs facteurs interviennent pour influencer la teneur en composés phénoliques. En effet, plusieurs études antérieures ont montré que les facteurs externes, comme les facteurs géographiques, climatiques, les facteurs génétiques et la maturité des plantes ont une influence importante sur la teneur en composés phénoliques (Aganga et Mosase, 2001; Bouzid *et al.*, 2010; Hazzat *et al.*, 2015; Merouane *et al.*, 2014).

De plus, les teneurs en composés phénoliques, dans le cas de *M. annua*, dépendent du genre. En effet, les analyses ont prouvé que les taux en CP sont plus élevés chez les pieds mâles que les pieds femelles quel que soit leur provenance.

L'étude phytochimique par LCMS des extraits méthanoliques des feuilles, des graines, des tiges et des racines de l'espèce étudiée confirme que les extraits des feuilles présentent plus de composés phénoliques identifiés et quantifiés comparativement aux autres parties de la plante et que les pieds mâles sont plus riches aussi en composés phénoliques que les pieds femelles. Ainsi, ces extraits méthanoliques sont caractérisés essentiellement par des quantités importantes de isorhamnetin-3-O-rutinoside (narcissine). Par ailleurs, [Aquino et al., \(1987\)](#) ont rapporté que les principaux composés phénoliques de *M. annua* étaient la narcissine et la rutine. Ces résultats sont approuvés par [Blanco-Salas et al., \(2019\)](#) qui a montré que la *M. annua* contient isorhamnetin-3-O-rutinoside (narcissine) qui est responsable de l'action antihypertensive de cette plante ([Chen et al., 2011](#)). Nos résultats, pour la première fois, ont identifié la présence en quantités importantes d'autres flavonols tels que l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épigallocatéchine. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature concernant les feuilles de ricin. En effet, [Wafa et al., \(2014\)](#) ont identifié de l'épicatéchine et de la rutine en abondance dans les parties aériennes de certaines provenances tunisiennes de *Ricinus communis* L.

L'étude des activités anti-oxydantes des extraits méthanoliques des différentes parties de la plante a montré que ces extraits sont actifs en termes de piégeage des ERO. l'activité anti-oxydante était plus élevée dans les extraits des feuilles que les autres parties de la plante, elle était plus élevée dans les extraits des feuilles de la région de Bizerte que dans les autres régions pour les deux sexes et aussi elle était la plus élevée chez les pieds mâles que chez les pieds femelles ainsi les analyses statistiques montrent une différence significative entre les régions, ces résultats confirment ceux de [Wafa et al., \(2014\)](#) qui ont montré que l'activité AAO dépendait de la région étudiée et aussi, que les extraits des feuilles sont plus actifs que ceux des autres parties de la plante.

Singh et *al.*, (2016) ont confirmé que les plantes produisant une grande quantité de composés phénoliques possédant une activité anti-oxydante élevée.

Afin de découvrir cette relation, nous avons déterminé le facteur de corrélation de Pearson ( $r$ ) qui lie la teneur en polyphénols et flavonoïdes de l'extrait de *M. annua* et leur activité anti-oxydante.

L'activité anti-oxydante de l'extrait de *M. annua* peut-être principalement liée à la teneur en polyphénols et en flavonoïdes. La valeur du coefficient de corrélation de Pearson  $r$  déterminée dans cette étude varie de 0,63 à 0,97.

Le coefficient de corrélation entre la teneur en composés phénoliques et l'activité anti-oxydante dans l'extrait de *M. annua* est significatif, indiquant ainsi que la capacité anti-oxydante élevée de l'extrait est due à la présence de composés phénoliques. La teneur totale en phénol de l'extrait de *M. annua* est significativement liée à son activité antiradicalaire. Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par d'autres auteurs, qui ont démontré une corrélation positive entre la teneur totale en composés phénoliques et l'activité anti-oxydante (Djeridane et *al.*, 2006; Turkmen et *al.*, 2007; Wojdyło et *al.*, 2007; Wong et *al.*, 2006).

Dans la littérature, de nombreuses études ont montré qu'il existe une relation linéaire entre les composés phénoliques et l'AAO d'autres plantes médicinales (Berg et *al.*, 2000; Kim et *al.*, 2003). Par conséquent, les recherches menées par Djeridane et *al.*, (2006) a confirmé que 79% de la capacité anti-oxydante des plantes médicinales algériennes comme *Anthemis arvensis*, *Artemisia campestris*, *Globularia alypum*, *Thymelaea hirsuta* est due à l'apport de polyphénols et de flavonoïdes.

Le degré de corrélation entre la teneur en phénol et l'activité anti-oxydante est un aspect qui ne peut être ignoré, même si on doit considérer que les composés phénoliques répondent différemment, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composés phénoliques totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydants qui peuvent être présents dans un extrait (Souad et *al.*, 2010).

Tel que rapporté par Beatovic et *al.*, (2015), la capacité anti-oxydante des différents extraits de plante est étroitement liée à leurs composés phénoliques les plus abondants. En effet, la narcissine est un glycoside de flavonol naturel connu pour son activité anti-oxydante (Huang et *al.*, 2007). Petruk et *al.*, (2017) ont identifié la narcissine dans des cladodes immatures d'*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. et ils ont montré qu'il était responsable de la protection contre le stress oxydant induit par une exposition aux rayonnements UVA sur les kératinocytes humains.

Pour la première fois, notre étude des différents extraits de *M. annua* montre une corrélation positive entre les composés phénoliques et l'activité anti-oxydante pour les différentes régions indépendamment du sexe.

Selon Kumar et Pandey, (2013), l'activité anti-oxydante est reliée à plusieurs activités biologiques dont l'activité larvicide pourrait faire partie.

Nos résultats montrent que la gallocatéchine occupe la deuxième place après la narcissine et la rutine en termes d'abondance dans les extraits hydro-méthanoliques de *M. annua*. Une étude précédente a démontré que la rutine bloquait de manière significative la croissance et la prolifération des larves d'*Aedes aegypti* L. (Dubey et *al.*, 2013). Nos résultats sont confortés par d'autres recherches menées récemment par Bachchu et *al.*, (2017) sur l'efficacité larvicide d'extraits de plantes indigènes dont le ricin contre les larves de *Tribolium castaneum* (Herbest). Aouinty et *al.*, (2006) a mis en évidence le pouvoir toxique de l'extrait aqueux de feuilles de *Ricinus communis* L. (*Euphorbiaceae*) contre les moustiques.



Dans le même contexte, plusieurs études ont montré que les extraits végétaux de certaines espèces, et à des doses bien définies, sont capables de jouer un rôle influent en tant que bio-larvicide et ainsi réduire l'utilisation de produits chimiques nocifs pour l'environnement et santé humaine. (An et *al.*, 2020 ; da Silva et *al.*, 2011).

Par ailleurs, Sogan et *al.*, (2018) ont rapporté que l'activité biologique pourrait être due à un effet synergique entre les différents composés phénoliques.

Pour la première fois notre étude a apporté une analyse de l'activité larvicide des extraits des feuilles et des graines des pieds mâles et des pieds femelles de *M. annua* provenant de différentes régions Tunisiennes. Ces résultats révèlent pour la première fois, qu'il existe une bonne corrélation entre l'activité larvicide des différents extraits méthanoliques du *M. annua* et leur activité anti-oxydante.

Selon les travaux de Zaiter, (2017) certains polyphénols sont des inhibiteurs de l'enzyme AChE comme la catéchine et la salicyline qui empêchent l'acétylcholine de se fixer dans le site catalytique CAS. De même, Salazar et *al.*, (2017) rapporte que le polyphénols épigallocatechine-3-gallate et resvératrol possèdent un potentiel anti-AChE.

L'étude des activités anti-AChE des extraits méthanoliques des différents organes des pieds mâles et des pieds femelles de la plante étudiée a montré que ces extraits sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. En effet, l'analyse des IC<sub>50</sub> enregistrés indiquent que les extraits des feuilles et ceux des graines sont plus actifs que les extraits des racines et des tiges et, que les extraits des pieds mâles sont plus inhibiteurs que ceux des pieds femelles. Cette étude a montré que la plupart des extraits sont plus actifs que la galantamine utilisée comme contrôle positif pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

D'après la littérature, nos résultats sont en accord avec l'étude de Cardoso-Lopes et *al.* (2009) et celle de Pratap et Singh, (2013) qui ont confirmé que les *Euphorbiaceae* tels que *Acalypha diversifolia*, *Acalypha macrostachya*, *Alchornea grandiflora* et *Pera glabrata* sont de bons inhibiteurs de l'activité de l'AChE. En outre, les extraits des fleurs d'*Acacia cyanophylla* (Ghribia et *al.*, 2014) et les extraits des feuilles de *Salix nigra* (Ahmed et *al.*, 2014) sont toutes des extraits riches en composés phénoliques et qui ont un pouvoir inhibiteur de l'activité de l'AChE.

Une forte corrélation a également été remarqué entre l'activité anti-AChE (IC<sub>50</sub>) et la teneur en polyphénols totaux avec un coefficient de Pearson r qui varie de -7.5 à -9.99. En effet, une augmentation de la teneur en polyphénols entraîne une inhibition de l'activité AChE.

# Conclusion

Notre travail de recherche est focalisé sur la valorisation d'une *Euphorbiaceae* : *Mercurialis annua* L. espèce autochtone connu par sa toxicité et aussi par son intérêt thérapeutique d'où son utilisation dans la pharmacopée traditionnelle.

Nous proposons une étude originale qui s'intéresse à l'activité larvicide du *M. annua* d'origine tunisienne. Ce travail porte une attention particulière à la composition chimique des extraits des différentes parties des pieds mâles et des pieds femelles de *M. annua* et évalue leur effet antioxydant. Cette étude montre clairement le pouvoir larvicide de *M. annua* et l'impact des composés phénoliques sur les propriétés antioxydantes.

L'étude toxicologique a montré que, comparé aux autres régions, les extraits aqueux des graines ainsi que ceux des feuilles de pieds mâles et de pieds femelles provenant de Bizerte étaient les plus toxiques contre le *T. confusum*.

L'étude phytochimique a montré que les extraits hydro-méthanoliques des feuilles et des graines de *M. annua* contiennent essentiellement de la narcissine, de la rutine, de l'épicatéchine, de la gallocatéchine et de l'épigallocatéchine. Cette analyse chimique a pu mettre en évidence la richesse de la région de Bizerte en ces composés phénoliques comparé à la région de Béja qui a montré des teneurs faibles en ces mêmes composés.

L'étude phytochimique de *M. annua* de quatre régions tunisiennes a révélé que, quelle que soit la provenance, le PPT, le FVT étaient plus élevés dans les feuilles mâles que dans les graines, les racines et les tiges. D'autre part, la région de Bizerte a étalé la quantité la plus élevée alors que la région de Beja a montré la teneur la plus faible.

En ce qui concerne la capacité anti-oxydante des extraits de *M. annua*, les résultats enregistrés indiquent que, comparés aux autres régions étudiées, les extraits de Bizerte possèdent un effet anti-oxydant le plus élevé. La provenance de Beja a montré une faible activité anti-oxydante. Les différents extraits des feuilles, graines, tiges et racines des pieds mâles ont exposé une activité anti-oxydante plus élevée que les extraits des pieds femelles. Les feuilles ont un effet anti-oxydant le plus élevé.

Par ailleurs, l'utilisation des molécules anti-oxydantes d'origine synthétique est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels qu'elles peuvent provoquées. C'est pour cela que de nouvelles sources d'antioxydants naturels sont activement recherchées (Suhaj, 2006; Tadhani et al., 2007). Les regards se tournent alors, de plus en plus, vers les plantes médicinales pourvoyeuses de substances bioactives.

L'étude des activités antioxydantes des différents extraits de *M. annua* a montré que les AAO présentent une bonne corrélation avec les teneurs en PPT, à un degré moins avec les teneurs en FVT.

Compte tenu des études précédentes des activités anti-AChE de quelques Euphorbiacées, nous nous sommes demandé si la *M. annua* qui appartient à la même famille possède également cette activité sur l'AChE.

Cette activité particulièrement intéressante permettrait de valoriser une exploitation médicinale de *M. annua*.

L'étude des activités anti-AChE des extraits des feuilles, des graines, des tiges et des racines de l'espèce étudiée a arboré que ces extraits sont des inhibiteurs puissants de l'AChE. Cela est confirmé par des IC<sub>50</sub> très faibles en comparaison avec la galantamine qui est utilisée comme référence. L'étude a confirmé que les extraits des feuilles et des graines sont plus actifs que les extraits des tiges et des racines, et les extraits provenant des pieds mâles de Bizerte sont les plus actifs.

Ce travail est la première étude à porter une attention particulière aux composés phénoliques contenus dans les extraits des différentes parties des pieds mâles et des pieds femelles de *M. annua* d'origine tunisienne et à évaluer leurs activités larvicides et leur effet anti-oxydant. Cette étude montre clairement l'impact des composés phénoliques sur les propriétés anti-oxydantes et le pouvoir larvicide de *M. annua*.

### **Perspectives :**

En perspectives il serait intéressant d'exploiter la *M. annua* pour :

- Son activité larvicide à plus grande échelle dans le cadre de la protection des stocks alimentaires sans utiliser des pesticides de synthèse.
- Identifier les molécules responsables de cette activité larvicide et leur impact environnemental
- L'élimination des ERO en raison de sa richesse en composés phénoliques et plus particulièrement par la présence de catéchines. Ces dernières pouvant jouer un rôle important dans la lutte contre la maladie d'Alzheimer.
- D'autres activités enzymatiques de cette plante telles que : l'alpha amylase, qui entre dans le traitement des troubles digestifs, et la collagénase, qui peut être utilisée dans le cadre de l'industrie cosmétique.
- La production et la commercialisation comme source de narcissine naturelle issue des différentes parties de la plante.

# **Références bibliographiques**

- Abbas Banj Shafiei, Moslem Akbarinia, Seyyed Gholamali Jalali, Pirouz Azizi, Seyyed Mohsen Hosseini, 2006. Effect of Fire on Herbal Layer Biodiversity in a Temperate Forest of Northern Iran [WWW Document]. Science Alert. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2006.2273.2277>
- Abdoul Habou, Z., Haubruge, É., Adam, T., J. Verheggen, F., 2013. Insectes ravageurs et propriétés biocides de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) : synthèse bibliographique. Biotechnol. Agron. Soc. Environ.
- Aganga, A.A., Mosase, K.W., 2001. Tannin content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus capassa*, *Zizyphus mucronata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. Animal Feed Science and Technology, Tannins: Analysis and Biological Effects in Ruminant Feeds 91, 107–113. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00235-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00235-8)
- Agbizounon A., 2010. Tests d'efficacité d'extraits d'huiles végétales sur *Anopheles gambiae* Giles et *Culex quinquefasciatus* Say résistants aux pyréthrinoides - Aimé AGBIZOUNON [WWW Document]. Memoire Online. URL <https://www.memoireonline.com/01/14/8667/Tests-d-efficacite-d-extraits-d-huiles-vegetales-sur-Anopheles-gambiae-Giles-et-Culex-quinquefasc.html> (accessed 4.19.21).
- Ahmed, W., Mushtaq, A., Mushtaq, N., 2014. Phytochemistry and anti-acetyl cholinesterase activity of *Salix nigra*. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research 6, 942–944.
- Ait-Ali T., Allison L, 1993. Expression génétique dans les organes reproducteurs femelles chez *Mercurialis annua* (2n=16). L'épissage différentiel caractérise-t-il aussi le sexe des végétaux ? p. 701- 701 - Départ./Région : , Acta Botanica Gallica, 1, Tome



140 - Fascicule 6. Tela Botanica. URL <https://www.tela-botanica.org/eflore/> (accessed 4.19.21).

- Al-Bakri, A.G., Afifi, F.U., 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *Journal of Microbiological Methods* 68, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.05.013>
- Aldouri, N., Shakya, A., 2018. Fatty Acids Analysis and Antioxidant Activity of a Lipid Extract obtained from *Mercurialis annua* L. grown wildly in Jordan. *Acta poloniae pharmaceutica* 75. <https://doi.org/10.32383/appdr/97344>
- Ali, M.B., Hahn, E.-J., Paek, K.-Y., 2007. Methyl Jasmonate and Salicylic Acid Induced Oxidative Stress and Accumulation of Phenolics in *Panax ginseng* Bioreactor Root Suspension Cultures. *Molecules* 12, 607–621. <https://doi.org/10.3390/12030607>
- Alicja M. Zobel, Stewart A. Brown, 1990. Seasonal changes of furanocoumarin concentrations in leaves of *Heracleum lanatum*. *J Chem Ecol* 16, 1623–1634 (1990). <https://doi.org/10.1007/BF01014095> [WWW Document]. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01014095> (accessed 4.19.21).
- Allinger, N.L., 1977. Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *J. Am. Chem. Soc.* 99, 8127–8134. <https://doi.org/10.1021/ja00467a001>
- An, N.T.G., Huong, L.T., Satyal, P., Tai, T.A., Dai, D.N., Hung, N.H., Ngoc, N.T.B., Setzer, W.N., 2020. Mosquito Larvicidal Activity, Antimicrobial Activity, and Chemical Compositions of Essential Oils from Four Species of Myrtaceae from Central Vietnam. *Plants* 9, 544. <https://doi.org/10.3390/plants9040544>
- Anonyme, 1981. Post Harvest Problems, GTZ, Eschbom 258.
- Antoine, E., 2012. Introduction à la spectroscopie UV-Visible. 1. Présentation. 2. Principe de la spectroscopie UV - Visible.

- Aouinty, B., Oufara, S., Mellouki, F., Mahari, S., 2006. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*
- Aquino, R., Behar, I., D'agostino, M., De. Simone, F., Schettino, O., Pizza, C., 1987. Phytochemical investigation on *Mercurialis annua*. *Biochemical Systematics and Ecology* 15, 667–669. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(87\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0305-1978(87)90042-1)
- Arrault, A., 2007. Stratégies de docking-scoring assistées par analyse de données. <br />Application au criblage virtuel des cibles thérapeutiques COX-2 et PPAR gamma (phdthesis). Université d'Orléans.
- Aurélie Urbain, 2007. Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de “*Gentianella campestris*” (L.) Börner et “*Gentianella amarella*” (L.) Börner ssp. “*acuta*” (Michx.) J.M. Gillett (Gentianaceae), et “*Peucedanum ostruthium*” (L.) Koch (Apiaceae). Université de Genève.
- Bachchu, M.A.A., Ara, K., Uddin, M.N., Ara, R., 2017. Larvicidal Efficacies of Four Indigenous Plant Extracts Against Red Flour Beetle, *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of the Asiatic Society of Bangladesh, Science* 43, 223–232. <https://doi.org/10.3329/jasbs.v43i2.46519>
- Balachowsky A. S., 1962. *Entomologie appliquée à l'agriculture*. Ed. Masson et cie, paris, Tome I.
- Banzouzi, J.-T., Prado, R., Menan, H., Valentin, A., Roumestan, C., Mallie, M., Pelissier, Y., Blache, Y., 2002. In vitro antiplasmodial activity of extracts of *Alchornea cordifolia* and identification of an active constituent: ellagic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 399–401. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(02\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00121-6)

- Beatovic, D., Krstic-Milosevic, D., Trifunović, S.S., Siljegovic, J., Glamočlija, J., Ristic, M., Jelacic, S., 2015. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Twelve *Ocimum basilicum* L. Cultivars Grown in Serbia. *Records of Natural Products* 9, 62–75.
- Bencivenga, M., Pagiotti, R., Rota, P. (Perugia U. (Italy) I.P.I. di B., 1979. [Biology of *Mercurialis annua* L.]. *Annali della Facolta di Agraria, Universita degli Studi, Perugia (Italy)*.
- Benoît, H.P., McCauley, E., Post, J.R., 1998. Testing the Demographic Consequences of Cannibalism in *Tribolium Confusum*. *Ecology* 79, 2839–2851. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[2839:TTDCOC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[2839:TTDCOC]2.0.CO;2)
- Berg, R., Haenen, G., Berg, H.M., Vijgh, W., Bast, A., 2000. The predictive value of antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food Chemistry* 70, 391–395. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00092-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00092-3)
- Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., 2005. Phenolic Content and Antioxidant Activity of Pearled Wheat and Roller-Milled Fractions. *Cereal Chemistry* 82, 390–393. <https://doi.org/10.1094/CC-82-0390>
- Blaizot, D., 2021. Les euphorbes — II. Emploi médical [WWW Document]. Gloubik Sciences. URL <https://sciences.gloubik.info/spip.php?article988> (accessed 4.19.21).
- Blanco-Salas, J., Vazquez, F.M., Hortigón-Vinagre, M.P., Ruiz-Tellez, T., 2019. Bioactive Phytochemicals from *Mercurialis* spp. Used in Traditional Spanish Medicine. *Plants* 8, 193. <https://doi.org/10.3390/plants8070193>
- Boizot, N., Charpentier, J.-P., 2006. Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Cahier des Techniques de l'INRA* 79.

- BOUCHIKHI TANI Zoheir, 2014. Lutte contre la bruche du haricot *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera, Bruchidae) et la mite *Tineola bisselliella* (Lepidoptera, Tineidae) par des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles.
- Boudiaf, K., 2018. Etude des propriétés anti-inflammatoires de la thymoquinone et de ses mécanismes d'inhibition des fonctions du neutrophile humain (Thesis).
- Bounatirou, S., Smiti, S., Miguel, M.G., Rejeb, M.N., Neffati, M., Costa, M.M., Faleiro, L., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2008. THYMUS CAPITATUS GROWN IN TUNISIA: ANTIOXIDANT ABILITY OF THE ESSENTIAL OILS ON LINOLEIC ACID EVALUATED BY DIFFERENT METHODS. *Acta Hortic.* 315–324. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.765.42>
- Bouzid W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane MC., Ayachi A., 2010. EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE L'AUBEPINE MONOGYNE -. *Lebanese Science Journal* 12(1), 59–69.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Britton, N.L., Millspaugh, C.F., 1920. *The Bahama flora*. The authors, New York., <https://doi.org/10.5962/bhl.title.1494>
- Bustanji, Y., AlDouri, N., Issa, A., Mashallah, S., Assaf, A., Aburjai, T., Mohammad, M., 2012. Cytotoxic effect of *Mercurialis annua* L. methanolic extract on six human solid cancer cell lines. *SRE* 7, 3218–3222. <https://doi.org/10.5897/SRE12.545>
- Butler, L.R.P., Laqua, K., 1995. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-IX. Instrumentation for the spectral dispersion and isolation

- of optical radiation (IUPAC Recommendations 1995). *Pure Appl. Chem.* 67, 1725–1744. <https://doi.org/10.1351/pac199567101725>
- Cardoso-Lopes, E.M., Paula, D.M.B. de, Barbo, F.E., Souza, A. de, Blatt, C.T.T., Torres, L.M.B., Young, M.C.M., 2009. Chemical composition, acetylcholinesterase inhibitory and antifungal activities of *Pera glabrata* (Schott) Baill. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Botany* 32, 819–825. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000400019>
  - Caridade, T.N.S., Araújo, R.D., Oliveira, A.N.A., Souza, T.S.A., Ferreira, N.C.F., Avelar, D.S., Teles, Y.C.F., Silveira, E.R., Araújo, R.M., 2018. Chemical composition of four different species of the *Waltheria* genus. *Biochemical Systematics and Ecology* 80, 81–83. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2018.07.003>
  - Catherine Regnault-Roger, Bernard JR Philogène, Charles Vincent, 2008. *Biopesticides d'origine végétale (2<sup>e</sup> éd.)*. Actu-environnement.
  - Chaabi, M., 2008. *Étude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) (These de doctorat). Université Louis Pasteur (Strasbourg) (1971-2008).
  - CHARPIN J., SURINYACH R., FRANKLAND A.W., 1974. *ATLAS EUROPEEN DES POLLENS ALLERGISANTS / ATLAS OF EUROPEAN ALLERGENIC POLLENS*. by CHARPIN J. / SURINYACH R. / FRANKLAND A.W.: bon Couverture rigide (1974) | Le-Livre [WWW Document]. URL <https://www.abebooks.com/ATLAS-EUROPEEN-POLLENS-ALLERGISANTS-EUROPEAN-ALLERGENIC/13245800772/bd> (accessed 4.19.21).

- Chaudhry, P.S., Cabrera, J., Juliani, H.R., Varma, S.D., 1983. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol* 32, 1995–1998. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(83\)90417-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(83)90417-3)
- Chen, G., Chen, H., 2011. Extraction and deglycosylation of flavonoids from sumac fruits using steam explosion. *Food Chem* 126, 1934–1938. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.025>
- Chen, Y., Rai, R., Zhou, Z.-R., Kanoh, J., Ribeyre, C., Yang, Y., Zheng, H., Damay, P., Wang, F., Tsujii, H., Hiraoka, Y., Shore, D., Hu, H.-Y., Chang, S., Lei, M., 2011. A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 213–221. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1974>
- Crozier, A., Del Rio, D., Clifford, M.N., 2010. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine, Phytochemicals and Cardiovascular Protection* 31, 446–467. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.007>
- Cruz J.F, Troude F., Griffon D., Hébert J.P., 1988. Conservation des grains en régions chaudes - 2. ed.. - «Techniques rurales en Afrique» - PDF Free Download.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibrić, S., 2016. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem* 194, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.008>
- da Silva, J.K.R., Andrade, E.H.A., Kato, M.J., Carreira, L.M.M., Guimarães, E.F., Maia, J.G.S., 2011. Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. *Nat Prod Commun* 6, 1361–1366.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic

- compounds. Food Chemistry 97, 654–660.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Doukkali, Z., Kamal, R., 2016. Anti-Anxiety Effects of *Mercurialis annua* Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. *Journal of Pharmacological Reports*.
  - Dubey, S., Ganeshpurkar, A., Bansal, D., Dubey, N., 2013. Experimental studies on bioactive potential of rutin. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.115556>
  - Elise, L., 2002. Toxicologie végétale des ruminants .Glands et mercuriale : des intoxications d'automne - Le Point Vétérinaire n° 229 du 01/10/2002 [WWW Document]. Le Point Vétérinaire.fr. URL <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/le-point-veterinaire/article/n-229/glands-et-mercuriale-des-intoxications-d-automne.html> (accessed 4.19.21).
  - Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
  - Evenamede, K.S., Kpegba, K., Simalou, O., Boyode, P., Agbonon, A., Gbeassor, M., 2017. Etude comparative des activités anti-oxydantes d'extraits éthanoliques de feuilles, d'écorces et de racines de *Cassia sieberiana*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 11, 2924–2935. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v11i6.29>
  - Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.02.008>
  - Figaro Partner, 2013. La phytothérapie à travers les siècles [WWW Document]. URL <https://sante.lefigaro.fr/actualite/2013/04/15/20347-phytotherapie-travers-siecles> (accessed 6.28.21).

- Fukai, K., Ishigami, T., Hara, Y., 1991. Antibacterial Activity of Tea Polyphenols against Phytopathogenic Bacteria. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1895–1897. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870886>
- Gehin, A., Guyon, C., Nicod, L., 2006. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environ Toxicol Pharmacol* 22, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.11.003>
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem* 53, 1370–1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>
- Ghosh, D., Scheepens, A., 2009. Vascular action of polyphenols. *Mol Nutr Food Res* 53, 322–331. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800182>
- Ghribia, L., Ghouilaa, H., Omrib, A., Besbesb, M., Janneta, H.B., 2014. Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of extracts and secondary metabolites from *Acacia cyanophylla*. *Asian Pac J Trop Biomed* 4, S417–S423. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1038>
- Gillot Paul, 1924. Observations sur le polymorphisme floral de *Mercurialis annua* L.. p. 684- 692 - Départ. /Région : , *Bulletin de la Société Botanique de France*, 4, Tome 71 - Fascicule 3. Tela Botanica. URL <https://www.tela-botanica.org/eflore/> (accessed 4.19.21).
- Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41, 1220–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.03.002>



- H, L., A, K., M. & T., S, H., 2009. CATALOGUE DES PLANTES MEDICINALES UTILISÉES DANS LA RÉGION DE ZAËR (MAROC OCCIDENTAL). lejeunia.
- Hall, D.W., 1970. Handling and storage of food grains in tropical and subtropical areas. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Hanane, B., Ilhem, R., 2020. L'utilisation des huiles essentielles dans la lutte contre les insectes des denrées stockées (Recherche bibliographique) (Thesis).
- Hanf, M., 1983. The arable weeds of Europe with their seedlings and seeds. The arable weeds of Europe with their seedlings and seeds.
- Harborne, J.B., 2000. Arsenal for Survival: Secondary Plant Products. *Taxon* 49, 435–449. <https://doi.org/10.2307/1224343>
- Haubruge, E., Schiffers, B., Gabriel, E., Verstraeten, C., 1988. Etude de la relation Dose-Efficacité de six insecticides à l'égard de *Sitophilus granarius* L., *S. oryzae* L. et *S. zeamais* Mots. (Coleoptera, Curculionidae).
- Havsteen, B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96, 67–202. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00298-x](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00298-x)
- Hazzat, N.E., Iraqi, R., Bouseta, A., 2015. Identification par GC-MS et GC-FID-O des composés volatils des olives vertes de la variété « Picholine marocaine » : effet de l'origine géographique. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 9, 2219–2233. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v9i4.40>
- Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D., 2002. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* 13, 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)
- Herbert Baxter, J.B. Harborne, Gerald P. Moss, 1998. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants, Second Edition* [WWW Document].

Routledge & CRC Press. URL <https://www.routledge.com/Phytochemical-Dictionary-A-Handbook-of-Bioactive-Compounds-from-Plants/Baxter-Harborne-Moss/p/book/9780748406203> (accessed 4.19.21).

- Herbert, R.B., 1981. *The Biosynthesis of Secondary Metabolites*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5833-3>
- Hmiri, S., Amrani, N., Rahouti, M., 2011. Détermination in vitro de l'activité antifongique des vapeurs d'eugénol et d'huiles essentielles de *Mentha pulegium* L. et de *Tanacetum annuum* L. vis-à-vis de trois champignons responsables de la pourriture des pommes en post-récolte. *Acta Botanica Gallica* 158, 609–616. <https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516298>
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M., 2002. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem Biol Interact* 139, 1–21. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(01\)00285-x](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00285-x)
- Hodgson, J.M., Croft, K.D., 2010. Tea flavonoids and cardiovascular health. *Mol Aspects Med* 31, 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.004>
- HOPKINS, W.G., 2015. *Physiologie végétale*. DE BOECK SUP.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.-J., 2006a. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 23, 181–199. <https://doi.org/10.1039/b508966m>
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.-J., 2006b. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat Prod Rep* 23, 181–199. <https://doi.org/10.1039/b508966m>
- Huang, J.-L., Fu, S.-T., Jiang, Y.-Y., Cao, Y.-B., Guo, M.-L., Wang, Y., Xu, Z., 2007. Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. *Pharmacol Biochem Behav* 86, 741–748. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.03.003>

- INRA, 2000. *Mercurialis annua* [WWW Document]. URL [https://www2.dijon.inrae.fr/hyppa/hyppa-f/meran\\_fh.htm](https://www2.dijon.inrae.fr/hyppa/hyppa-f/meran_fh.htm) (accessed 4.19.21).
- J Gwinner, Rüdiger Harnisch, O Mück, 1996. Manuel sur la manutention et la conservation des grains après récolte. GTZ, Eschborn :
- Jean Bruneton, 1999. Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales - Jean Bruneton - 9782743021658 - Livre - Le Moniteur des pharmacies.fr [WWW Document]. Le Moniteur des pharmacie.fr. URL <https://www.lemoniteurdespharmacies.fr/boutique/livres/pharmacognosie.html> (accessed 4.19.21).
- Jean-Louis Guignard, 1996. Biochimie végétale - Jean-Louis Guignard - 2<sup>ème</sup> édition - Librairie Eyrolles.
- Jencks, W.P., 1983. What is a Coupled Vectorial Process?, in: Bronner, F., Kleinzeller, A. (Eds.), Current Topics in Membranes and Transport, Structure, Mechanism, and Function of the Na/K Pump. Academic Press, pp. 1–19. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60549-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60549-3)
- Joukoff, S., 2016. Nouvelles recommandations sur les études pharmacocinétiques d’interactions médicamenteuses (exercice). Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Julve Ph., 1998. - Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. [WWW Document]. URL <http://biodiversite.wallonie.be/fr/julve-ph-1998-baseflor-index-botanique-ecologique-et-chorologique-de-la-flore-de-France-version-31-decembre-2002-http-pe.html?IDD=167772196&IDC=3046> (accessed 4.19.21).
- Krähenbühl, M., Yuan, Y.-M., Küpfer, P., 2002. Chromosome and breeding system evolution of the genus *Mercurialis* (Euphorbiaceae): implications of ITS molecular phylogeny. *Plant Syst. Evol.* 234, 155–169. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0208-y>.

- Kellouche, A., 2005. Etude de la bruche du poi-chiche, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera : bruchidae) : Biologie, physiologie, reproduction et lutte. Thèse. Doc d'état. Univ. Tizi-Ouzou, Algérie. P 154.
- Khadka, D.K., Nejjidat, A., Tal, M., Golan-Goldhirsh, A., 2002. DNA markers for sex: Molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L. *Molecular Breeding* 9, 251–257. <https://doi.org/10.1023/A:1020361424758>
- Khodjanizayov, K.U., Mukarramov, N.I., Khidirova, N.K., Khakimov, M.M., Urakov, B.A., Brodsky, E.S., Shakhidoyatov, K.M., 2012. Degradation and Detoxification of Persistent Organic Pollutants in Soils by Plant Alkaloid Anabasine. *Journal of Environmental Protection* 3, 97–106. <https://doi.org/10.4236/jep.2012.31012>
- Kim, D.-O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.-Y., Lee, C.Y., 2003. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51, 6509–6515. <https://doi.org/10.1021/jf0343074>
- Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal* 2013, e162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- LABEYRIE, V., 1962. Les Acanthoscelides. *Entomologie appliquee a l'agriculture I* 4343–4442.
- Layens Georges de, Bonnier Gaston, 1894. *La Végétation de la France . 1 . Tableaux synoptiques des plantes vasculaires de la flore de la France [Texte imprimé] / par Gaston Bonnier,... et Georges de Layens,... 5289 figures représentant les caractères de toutes les espèces, qui sont décrites sans mots techniques et une carte des régions de France . I, <<La >>Végétation de la France. Paul Dupont, Paris.*
- Lazar, T., 2005. *Chemistry of Natural Products. By S. V. Bhat, B. A. Nagasampagi and M. Sivakumar. ChemBioChem* 6, 1127–1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500134>

- Lelong F., 2008. “Les belles et les bêtes : précis illustré de toxicologie botanique à usage vétérinaire.” Thèse de Doctorat Vétérinaire, Faculté de Médecine de Nantes. [WWW Document]. URL <http://toxivet.free.fr/afficherToxique.php?id=56&rubrique=references> (accessed 4.19.21).
- Lepesme, P., 1944. Les Coléoptères des denrées alimentaires et des produits industriels entreposés . Le chevalier, Paris.
- Li, X., Bai, S., Cass, B.N., 2012. Accord insertion in the 5' flanking region of CYP6G1 confers nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*. *Gene*. 502, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.04.031>
- Lisci, M., Cardinali, G., Pacini, E., 1996. Pollen dispersal and role of pollenkitt in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Flora* 191, 385–391. [https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30746-6](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30746-6)
- Macheix Jean-Jacques, 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique / Jean-Jacques Macheix, Annie Fleuriet, Christian Jay-Allemand, Collection biologie. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.
- Macheix, J.J., Fleuriet, A., Billot, J., 1990. Fruit phenolics. *Fruit phenolics*.
- Maillard, M.N., Soum, M.H., Boivin, P., Berset, C., 1996. Antioxidant Activity of Barley and Malt: Relationship with Phenolic Content. *Lwt - Food Science and Technology* 29, 238–244. <https://doi.org/10.1006/fstl.1996.0035>
- Majka, C.G., Bouchard, P., Bousquet, Y., 2008. Tenebrionidae (Coleoptera) of the Maritime Provinces of Canada. *The Canadian Entomologist* 140, 690–713. <https://doi.org/10.4039/n08-047>

- Makoi, J., Ndakidemi, P.A., 2007. Biological, ecological and agronomic significance of plant phenolic compounds in rhizosphere of the symbiotic legumes. *African Journal of Biotechnology* 6. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i12.57520>
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A., 2005. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Current Opinion in Lipidology* 16, 77–84.
- Marouf, A., Vallaade, J., 2000. *Dictionnaire de botanique : Les Phanérogames*. Dunod, Paris.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R., 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie* 51, 304–315. [https://doi.org/10.1016/s0003-3928\(02\)00138-5](https://doi.org/10.1016/s0003-3928(02)00138-5)
- Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Ali, K.N.B., Saadi, A., 2014. Activité anti-oxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 8, 1865–1870. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v8i4.45>
- Mohammedi, Z., 2013. *Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie (Thesis)*.
- Mohapatra, B.C., Rengarajan, K., 1995. *Manual on bioassays in the laboratory and their techniques*. CMFRI Special Publication 64, 1–75.
- Moreau, A., 2008. *Les effets indésirables des traitements médicamenteux spécifiques des troubles cognitifs de la démence de type Alzheimer : étude rétrospective d'une série de 391 patients d'une consultation mémoire (other)*. UHP - Université Henri Poincaré.
- Mousavi, M., Zaiter, A., Modarressi, A., Baudelaire, E., Dicko, A., 2019. The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders. *Microchemical Journal* 149, 103962. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103962>

- Muniz, M.N., 2006. Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine (phdthesis). Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Ndoye Foe, F.M.-C., Tchingang, T.F.K., Nyegue, A.M., Abdou, J.-P., Yaya, A.J.G., Tchinda, A.T., Essame, J.-L.O., Etoa, F.-X., 2016. Chemical composition, in vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16, 117. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1096-y>
- Nkhili, E., 2009. Polyphénols de l'alimentation : extraction, interactions avec les ions du fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant (These de doctorat). Avignon.
- O, P., M, T., J, Hakkola, P, H., J, Hukkanen, H, R., 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* 82, 667–715. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0332-8>
- Ogbemor, N.O., Adekunle, A.T., Enobakhare, D.A., 2007. Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sac. causal organism of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) leaf spot using plant extracts. *African Journal of Biotechnology* 6. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i3.56139>
- Oran, S.A., Eisawi, D.M.A.-, 2014. Medicinal plants in the high mountains of northern Jordan. *IJBC* 6, 436–443. <https://doi.org/10.5897/IJBC2014.0713>
- Ouattara, N., Meda, R.N.-T., Hilou, A., Guenné, S., Konaté, K., Coulibaly, A.Y., Kiendrébeogo, M., Millogo, J.F., Nacoulma, O.G., 2013. Anti-acetylcholinesterase and antioxidant activities and HPLC-MS analysis of polyphenol from extracts of *Nelsonia canescens* (Lam.) Spreng. *Asian Pac J Trop Dis* 3, 382–388. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60088-2](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60088-2)
- Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P., Serralheiro, M.L., Araújo, M.E., 2014. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and

their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products* 53, 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.008>

- Pacini, E., 1990. *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae) seed interactions with the ant *Messor structor* (Latr.), hymenoptera: Formicidae. *Acta Botanica Neerlandica* 39, 253–262. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1990.tb01395.x>
- Padin, S.B., Dal Bello, G.M., Vasicek, A.L., 1997. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* for adults of *Tribolium castaneum* (Col.: Tenebrionidae) in stored grains. *Entomophaga* 42, 569–574. <https://doi.org/10.1007/BF02769816>
- PAULING, L., 1946. Molecular Architecture and Biological Reactions. *Chem. Eng. News Archive* 24, 1375–1377. <https://doi.org/10.1021/cen-v024n010.p1375>
- Pearson, E.G., 1991. Liver failure attributable to pyrrolizidine alkaloid toxicosis and associated with inspiratory dyspnea in ponies: three cases (1982-1988). *J Am Vet Med Assoc* 198, 1651–1654.
- Petruk, G., Di Lorenzo, F., Imbimbo, P., Silipo, A., Bonina, A., Rizza, L., Piccoli, R., Monti, D.M., Lanzetta, R., 2017. Protective effect of *Opuntia ficus-indica* L. cladodes against UVA-induced oxidative stress in normal human keratinocytes. *Bioorg Med Chem Lett* 27, 5485–5489. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.043>
- Polunin O., Huxley A., 1965. *Flowers of the Mediterranean* by Polunin, O. & Huxley, A.: Good (1965) | Anybook Ltd. [WWW Document]. URL <https://www.abebooks.co.uk/Flowers-Mediterranean-Polunin-O-Huxley-A/30240087620/bd> (accessed 4.19.21).
- Potapovich, A.I., Lulli, D., Fidanza, P., Kostyuk, V.A., De Luca, C., Pastore, S., Korkina, L.G., 2011. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFκB and



- AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 255, 138–149.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.007>
- Pottier-Alapetite, G.A., 1979. Flore de la Tunisie : Angiospermes-dicotylédones. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture. [Tunis].
  - Pratap, B., Singh, A., 2013. Piscicidal and Anti AChE Activity of Medicinal Plant *Jatropha gossypifolia* (Family-Euphorbiaceae) 5, 367–372.  
<https://doi.org/10.5829/idosi.wjfms.2013.05.04.73218>
  - Programme CASDAR Désherbage mécanique, 2012. ITAB [WWW Document]. URL <http://itab.asso.fr/programmes/desherbage.php> (accessed 4.19.21).
  - Rahuman, A.A., Gopalakrishnan, G., Venkatesan, P., Geetha, K., 2008. Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102, 867–873.  
<https://doi.org/10.1007/s00436-007-0839-6>
  - Ratnadass, A., Cissé, B., Diarra, D., Mengual, L., Taneja, S.L., Thiéro, C.A.T., 1997. Perspectives de Gestion Biointensive des Foreurs des Tiges de Sorgho en Afrique de l'ouest. *Int J Trop Insect Sci* 17, 227–233. <https://doi.org/10.1017/S1742758400016416>
  - Rebecca Baldwin, Thomas R. Fasulo, 2003. Confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) and Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Insecta: Coleoptera: Tenebrionidae) [WWW Document]. URL <https://edis.ifas.ufl.edu/in566> (accessed 4.20.21).
  - Redlinger, L.M., Zettler, L.J., Davis, R., Simonaitis, R.A., 1988. Evaluation of Pirimiphos-Methyl as a Protectant for Export Grain<sup>1</sup>. *Journal of Economic Entomology* 81, 718–721. <https://doi.org/10.1093/jee/81.2.718>

- Remy, S., 2017. Les diterpènes d'euphorbiaceae : origine biosynthétique et intérêts pharmaceutiques : étude de *sandwithia guyanensis* (other). Université de Lorraine.
- Retter, R.J., Pablos, M.L., Agapito, T.T., Guerrero, J.M., 1996. Melatonin in the Context of the Free Radical Theory of Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 786, 362–378. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb39077.x>
- Rhattas, M., Douira, A., Zidane, L., 2016. Étude ethnobotanique des plantes médicinales dans le Parc National de Talassemtane (Rif occidental du Maroc). *Journal of Applied Biosciences* 97, 9187–9211. <https://doi.org/10.4314/jab.v97i1.5>
- Riley, R.J., Grime, K., Weaver, R., 2007. Time-dependent CYP inhibition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3, 51–66. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.1.51>
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.-H., Khalel, K.I., 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial crops and products*.
- Romani, A., Pinelli, P., Cantini, C., Cimato, A., Heimler, D., 2006. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chemistry* 95, 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.013>
- Rosine Clémence Momo Dongmo, 2009. France Online - Evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'*acalyphamanniana* (euphorbiacées) et *tristemma hirtum* (mélastomatacées) [WWW Document]. *Memoire Online*. URL [https://www.memoireonline.com/03/12/5526/m\\_Evaluation-de-l-activite-antidermatophytique-des-extraits-au-methanol-et-fractions-d-acalyphamanni.html](https://www.memoireonline.com/03/12/5526/m_Evaluation-de-l-activite-antidermatophytique-des-extraits-au-methanol-et-fractions-d-acalyphamanni.html) (accessed 4.19.21).
- S. A. S. Soha, T.V.D., O. F. Ohouko, S.J.A., T. J. Dougnon, A.K.I.Y., S. Farougou and T. T. M. Kpodekon., 2019. LARVAL CYTOTOXICITY AND ACUTE ORAL TOXICITY OF AQUEOUS EXTRACTS OF *ELAEIS GUINEENSIS* LEAVES AND

KHAYA SENEGALENSIS STEM BARK IN WISTAR RATS.

<https://doi.org/10.5281/zenodo.3476068>

- Salazar, P.B., Collado, A. de A.M., Canal-Martínez, V., Minahk, C.J., 2017. Differential inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by polyphenols epigallocatechin-3-gallate and resveratrol. Relevance of the membrane-bound form. *BioFactors* 43, 73–81. <https://doi.org/10.1002/biof.1322>
- Scotti, G., 1978. Les insectes et les acariens des cereales stockees Paris (France) AFNOR/ITCF 1–62.
- SFA, 2005. les Polyphénols et leurs Applications dans les Industries Agro-alimentaires, Pharmaceutiques et Cosmétiques | Société Française des Antioxydants [WWW Document]. URL <https://www.sfa-site.com/?q=node/64> (accessed 4.19.21).
- Silberfeld T., 2013. La mercuriale des jardins [WWW Document]. [studylibfr.com](http://studylibfr.com). URL <https://studylibfr.com/doc/818812/la-mercuriale-des-jardins> (accessed 4.19.21).
- Singh, P.A., Brindavanam, N.B., Kimothi, G.P., Aeri, V., 2016. Evaluation of in vivo anti-inflammatory and analgesic activity of *Dillenia indica* f. *elongata* (Miq.) Miq. and *Shorea robusta* stem bark extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6, 75–81. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(15\)60988-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(15)60988-4)
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents | *American Journal of Enology and Viticulture*.
- Smith, E.H., Whitman, R.C., 1992. *Field Guide to Structural Pests*. National Pest Management Association, Dunn Loring, VA. New York. NPCA, Dunn Loring, Va.
- Sogan, N., Kapoor, N., Singh, H., Kala, S., Nayak, A., Nagpal, B.N., 2018. Larvicidal activity of *Ricinus communis* extract against mosquitoes. *Journal of Vector Borne Diseases* 55, 282. <https://doi.org/10.4103/0972-9062.256563>

- Solyom, K., Solá, R., Cocero, M.J., Mato, R.B., 2014. Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry* 159, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.021>
- Souad, A., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Souad, K., 2010. Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. *Lebanese Science Journal* 11, 69–81.
- Spedding, G., Ratty, A., Middleton, E., 1989. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res* 12, 99–110. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(89\)90073-9](https://doi.org/10.1016/0166-3542(89)90073-9)
- Stojković, D., Petrović, J., Soković, M., Glamočlija, J., Kukić-Marković, J., Petrović, S., 2013. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 3205–3208. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6156>
- Suhaj, M., 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *Journal of Food Composition and Analysis, Biodiversity and nutrition: a common path* 19, 531–537. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.11.005>
- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R., 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis, The essential balance: Risks and benefits in food safety and quality* 20, 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.08.004>
- Tang, Liang., Kebarle, Paul., 1991. Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution | *Analytical Chemistry* 1991, 63, 23, 2709-2715. <https://doi.org/10.1021/ac00023a009>
- Tapondjou, L.A., Adler, C., Bouda, H., Fontem, D.A., 2003. Bioefficacité des poudres et des huiles essentielles des feuilles de “*Chenopodium ambrosioides*” et “*Eucalyptus*


- saligna” à l’égard de la bruche du niébé, “*Callosobruchus maculatus*” Fab. (Coleoptera, Bruchidae). Cahiers Agricultures 12, 401-407 (1).
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Kumar, S., 2003. Bioactivities of l-Carvone, d-Carvone, and Dihydrocarvone Toward Three Stored Product Beetles. Journal of Economic Entomology 96, 1594–1601. <https://doi.org/10.1093/jee/96.5.1594>
  - Turkmen, N., Velioglu, Y.S., Sari, F., Polat, G., 2007. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. Molecules 12, 484–496. <https://doi.org/10.3390/12030484>
  - Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Moore, Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb, Webb D. A., 1968. Flora Europaea vol. 2. Cambridge University Press, Cambridge.
  - Ursula, S.-M., Wilfried Stichmann, 2000. Guide Vigot de la flore d’Europe.
  - Vassiliades, G., 1984. Note sur les propriétés molluscicides de deux Euphorbiacées : *Euphorbia tirucalli* et *Jatropha curcas*. Essais en laboratoire Sénégal. undefined.
  - Vermerris, W., Nicholson, R., 2006. Phenolic Compound Biochemistry. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7>
  - Wafa, G., Amadou, D., Larbi, K.M., Héla, E.F.O., 2014. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. Industrial Crops and Products 56, 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.036>
  - Walter Ebeling, 2002. To the PEST CONTROL OPERATOR, in Recognition of His Contributions to Health, Comfort, and Quality of Life in the Urban Community [WWW Document]. URL <https://entomology.ucr.edu/ebeling> (accessed 4.20.21).
  - Wienkers, L.C., Heath, T.G., 2005. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. Nat Rev Drug Discov 4, 825–833. <https://doi.org/10.1038/nrd1851>

- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 105, 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.038>
- Wong, C.-C., Li, H.-B., Cheng, K.-W., Chen, F., 2006. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry* 97, 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.049>
- Yadav, R., Srivastava, V.K., Chandra, R., Singh, A., 2002. Larvicidal activity of latex and stem bark of *Euphorbia tirucalli* plant on the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Commun Dis* 34, 264–269.
- Yang, Z., El Aidi, J., Ait-Ali, T., Augur, C., Teller, G., Schoentgen, F., Durand, R., Durand, B., 1998. Sex-specific marker and trans-zeatin ribosidase in femâle annual *Mercuria*. *Plant Science* 139, 93–103. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00146-0)
- Zaiter, A., 2017. Étude de la phytochimie de 12 plantes de la région Lorraine en fonction de la granulométrie de poudres super fines (These de doctorat). Université de Lorraine.
- Zhu, H., Wang, Y., Liu, Y., Xia, Y., Tang, T., 2010. Analysis of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by UV–Vis Spectrophotometry with Comparative Study on Different Extraction Technologies. *Food Analytical Methods* 3. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9091-2>

# **Annexes**

Article

## Phytochemicals, Antioxidant Attributes and Larvicidal Activity of *Mercurialis annua* L. (*Euphorbiaceae*) Leaf Extracts against *Tribolium confusum* (Du Val) Larvae (*Coleoptera*; *Tenebrionidae*)

Rania Ben Nasr <sup>1,2,\*</sup>, Elie Djantou Baudelaire <sup>3</sup>, Amadou Dicko <sup>1</sup> and Hela El Ferchichi Ouarda <sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Laboratoire de Chimie et de Physique—Approches Multi-échelles des Milieux Complexes (LCP-A2MC)1, Boulevard Arago, CEDEX 03, 57078 Metz, France; amadou.dicko@univ-lorraine.fr

<sup>2</sup> Laboratory of Plant Toxicology & Environmental Microbiology, Faculty of Science of Bizerte, University of Carthage, Zarzouna 7021, Tunisia; helaelferchichi.ouarda@gmail.com

<sup>3</sup> AGRITECH, 4, Rue Piroux, 54000 Nancy, France; elie.baudelaire@agritech-france.fr

\* Correspondence: rania.ben-nasr@univ-lorraine.fr



**Citation:** Ben Nasr, R.; Baudelaire, E.D.; Dicko, A.; El Ferchichi Ouarda, H. Phytochemicals, Antioxidant Attributes and Larvicidal Activity of *Mercurialis annua* L. (*Euphorbiaceae*) Leaf Extracts against *Tribolium confusum* (Du Val) Larvae (*Coleoptera*; *Tenebrionidae*). *Biology* **2021**, *10*, 344. <https://doi.org/10.3390/biology10040344>

Academic Editor:  
Alessandra Durazzo

Received: 2 March 2021  
Accepted: 13 April 2021  
Published: 20 April 2021

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



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

**Simple Summary:** *Mercurialis annua* L. is a *Euphorbiaceae* widespread in the Euro-Mediterranean region. This species is known for its toxicity and is used in traditional pharmacopoeia. However, the chemical composition of the aerial parts of this taxon and their larvicidal impact remain to be explored. However, the literature reports only a few studies on the relationship between the polyphenolic profile of the different extracts of *Mercurialis annua* L. and the larvicidal activity; therefore, we tested different extracts of *M. annua* against the larvae of *Tribolium confusum* (Du Val) for better protection of stored foodstuffs attacked by this pest. On the other hand, green chemistry as a distinct discipline has developed in recent years, which allowed us to identify different active compounds by LC-MS, and study the relationship between larvicidal activity and the chemical composition of extracts from male and female leaves of *Mercurialis annua* L.

**Abstract:** This study reports the link between larvicidal activity and the phytochemical composition of male and female leaf extracts of *Mercurialis annua* L. (*M. annua*) from four Tunisian regions: Bizerte, Jandouba, Nabeul and Beja. Their antioxidant activity was evaluated using DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assays. Phenolic compounds were identified and quantified using liquid chromatography coupled with a UV detector and mass spectrometry (LC-UV-ESI/MS). Higher antioxidant activity (AOA) was found in the leaves of male plant extracts than of female ones. The leaves of male and female plant extracts from Bizerte exhibited the highest AOA: 22.04 and 22.78 mg Trolox equivalent/g dry matter (mg TE/g DM), respectively. For both sexes, plant extracts from Beja had the lowest AOA with 19.71 and 19.67 mg TE/g DM for male and female plants, respectively. Some phenolic compounds such as narcissin, gallic catechin, rutin, epigallocatechin and epicatechin were identified and quantified using LC-MS, which highlighted the abundance of narcissin and rutin in the male leaves of *M. annua*. We noted that the interaction between the sex of plants and the provenance had a significant effect on TFC ( $F = 6.63$ ;  $p = 0.004$ ) and AOA ( $F = 6.53$ ;  $p = 0.004$ ) assays, but there was no interaction between sex and origins for TPC ( $F = 1.76$ ;  $p = 0.19$ ). The larvicidal activity of aqueous leaf extracts of *M. annua* against *Tribolium confusum* (Du Val) (*T. confusum*), an insect pest of flour and cereal seeds, showed that the mortality could reach 100% after 48 h of exposure in the Bizerte region. The  $LC_{50}$  values for the leaf extract were low in Bizerte, with 0.003 and 0.009 g/mL for male and female plants, respectively, succeeded by Jandouba, which displayed 0.006 and 0.024 g/mL for male and female plants, respectively. Nabeul showed 0.025 g/mL for male plants and 0.046 g/mL for female plants and Beja showed 0.037 and 0.072 g/mL for male and female plants, respectively. This is the first time that a study has revealed a negative correlation between the antioxidant activity and the larvicidal activity of the leaf extracts of *M. annua* with the following correlation coefficients of Pearson:  $r = -0.975$  and  $r = -0.760$  for male and female plants, respectively.

**Keywords:** *Mercurialis annua* L.; antioxidant activity; LC-MS; larvicidal activity



## 1. Introduction

*Mercurialis annua* L. (*M. annua*) is an annual herbaceous and dioecious species of the family *Euphorbiaceae*. It has been reported that it is a mesophilic and wind-pollinated plant, especially found in disturbed and roadside habitats throughout Central and Western Europe and in North Africa, as well as around the Mediterranean Basin [1]. The so-called Mercuriale of gardens was widely used in traditional medicine to control many diseases [2]. *M. annua* has laxative properties; it was used to treat pathologies of the digestive system while increasing intestinal transit and facilitating the evacuation of salts, with purgative activities. In addition, the plant was used to treat obstinate constipation and circumscribed inflammation in the intestines and stomach. It is useful against water retention and bladder infections [3]. It has diuretic properties, which increase urine production. *M. annua* is an emetic plant that causes vomiting, and it is useful to reduce gynecological diseases, such as menstrual symptoms like fatigue and headaches occurring during the menstrual cycle [4]. Research carried out in Morocco indicated that the aqueous extracts of the aerial parts of *M. annua* have an anxiolytic action [5]. The plant also possesses noticeable antimicrobial activities [6]. Recent studies indicated that methanolic extracts of *M. annua* were found to have a cytotoxic activity against cancer cells, stimulating the immune system cells to release cytokines in vitro as well as in vivo. These results clearly show that leaf extracts of *M. annua* display a cytotoxic effect on two cell lines, namely colorectal (HRT-18) and breast cancer (T47D) [7]. Therewith, Ostrozhenkova et al. (2007) [8] were able to isolate in *M. annua* the pyridinone-type chromogen, hermidine, and NMR spectroscopy also allowed them to isolate alanine. Biological activities research revealed an insecticide and larvicide robust potential in *Mercurialis perennis* L. and subsequently in *M. annua* [4]. Blanco-Salas et al. (2019) [3] stated that the genus *Mercurialis* possesses antidiabetic and antihypertensive attributes due to the affluence of its aerial parts in flavonoids rutin and narcissin. Furthermore, this species was used in traditional pharmacopoeia against hair loss in Tunisia. However, studies on the polyphenolic profile and larvicidal activity in relation to antioxidant potential of *M. annua* leaf extracts from male and female plants are scarce. Moreover, in the accessible literature, there is no report about the Tunisian origins and the natural extracts of *M. annua* to limit *Tribolium confusum* (Du Val) (*T. confusum*) amplification. On the other hand, our stocks of foodstuffs and especially cereals which occupy a strategic place in the diet of Tunisians have always been sensitive to attacks by *T. confusum*, causing a quantitative and qualitative loss of the stored food. The utilization of chemicals against this pest are a conventional method of control, but its disadvantages are numerous, citing as an example the sinister consequences for human health due to the accumulation of these chemicals in our food. According to Ghnimi et al. (2014) [9], several species of the *Euphorbiaceae* family have a detrimental effect against insect pests. For all these reasons, we planned to test different extracts of *M. annua* against *T. confusum* larvae and assess their antioxidant power, with a view to better protect stored food.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Plant Material

*M. annua* was identified by Pottier-Alapetite (1979) [10] as a dioecious species and our samples were compared to the authentic specimen from the herbarium of the Faculty of Science of Bizerte. In fact, leaves of male and female plants of *M. annua* were randomly collected between December and February from four different regions of Tunisia, belonging to different bioclimatic stages, from sub-humid to semi-arid. These provenances were Bizerte (37°16'27" N; 9°52'26" E; 33 m), Béja (36°43'31" N; 9°11'31" E; 212 m), Jandouba (36°30'02" N; 8°46'51" E; 141 m) and Nabeul (36°27'15" N; 10°44'05" E; 12 m). Then, leaves were dried at room temperature (27 °C ± 2 °C) and were reduced to powder with an electrical blender and conserved at −4 °C until use.

## 2.2. Insect Larvae

The larvicidal activity was carried out on 5 mm-long and pale-yellow larvae of *T. confusum*, which coincides with the pre-pupal stage [11]. The animal material was maintained at ambient rearing conditions in the entomology laboratory at the National Institute of Agronomic Research of Tunisia. All tests were conducted at room temperature ( $27 \pm 2$  °C).

## 2.3. Chemicals Used

Folin–Ciocalteu reagent was obtained from VWR International (Metz, France). Gallic acid, rutin, catechin, gallic acid, epigallocatechin, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, epicatechin, narcissin, verbacoside, naringin, Trolox and sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ), were obtained from Sigma-Aldrich (Paris, France). Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), aluminum chloride ( $\text{AlCl}_3$ ), and sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) from Acros Organics (Brussels, Belgium).

## 2.4. Preparation of Extracts

The hydro-methanolic extracts of male and female leaves powder of *M. annua* were processed according to the experimental method used by Zaiter et al. (2017) [12] with some modifications. A total of 2 g of each powder was macerated in 20 mL of 70% methanol and 30% water for 24 h at room temperature with stirring. Then, extracts were centrifuged at 4000 rpm for 30 min. The supernatant was collected, filtered through 45  $\mu\text{m}$  polytetrafluoroethylene (PTFE) filters and stored in a sealed dark bottle at  $-4$  °C until analysis.

### 2.4.1. Quantification of Total Phenolic Contents

Total phenolic contents (TPC) were determined following the method by Mousavi et al. (2019) [13], which was slightly modified. Briefly, 500  $\mu\text{L}$  of Folin–Ciocalteu reagent (1 N) was added to 100  $\mu\text{L}$  of each extract, which was diluted with 5 mL distilled water. After 5 min, 2 mL of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7%) was added and the mixture was incubated at room temperature. After 60 min, the absorbance was measured at 725 nm against the blank (methanol). A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of gallic acid as a standard (0.75, 1.5, 2.56, 3.01, 3.77 and 4.5 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of gallic acid equivalents per gram of dry matter (mg GAE/g DM).

### 2.4.2. Quantification of Total Flavonoids Contents

Total flavonoid compounds (TFC) were dosed by colorimetric assays described by Chen et al. (2011) [14], with slight modifications. Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of extract was added to a flask containing 6 mL of distilled water. Then, 300  $\mu\text{L}$  of 5%  $\text{NaNO}_2$  was added to the flask. After 5 min, 300  $\mu\text{L}$  of 10%  $\text{AlCl}_3$  was added. Finally, after 6 min, 2 mL of 1 M  $\text{NaOH}$  was added. The solution was well shaken, and the absorbance was measured at 510 nm with a UV-Visible spectrophotometer Cary 50 Scan (Agilent, Santa Clara, CA, USA). A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of catechin as a standard (0.46, 0.63, 0.83, 1.3, 2.05 and 2.24 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of catechin equivalents per gram of dry matter (mg CE/g DM).

### 2.4.3. Evaluation of Antioxidant Activity

To evaluate the Antioxidant Activity (AOA) of *M. annua*, the DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) test was used according to the protocol described by Velazquez et al. (2003) [15] and Molyneux et al. (2004) [16], with some modifications. Briefly, into tubes were introduced 100  $\mu\text{L}$  of each extract and 3 mL of the methanolic solution of DPPH (2.4 mg/100 mL). After shaking, the tubes were placed in the dark at room temperature for 30 min. Reading was performed by measuring the absorbance at 517 nm. The blank was a DPPH methanolic solution. A calibration curve was prepared using different methanolic solutions of Trolox as a standard (0.1, 0.3, 0.7, 1, 1.3, 1.7 and 2 mg/mL). The results were expressed in terms of milligrams of Trolox equivalents per gram of dry matter (mg TE/g DM) [13].

### 2.5. LC-MS Analysis

LC-MS analyses were performed on a LC-MS 2020 system (Shimadzu, Tokyo, Japan) associated with an electrospray ionization source (ESI). Separation was carried out on a  $150 \times 4.6 \text{ m}^2$  i.d. C18 reverse phase Gemini column (Phenomenex, Torrance, CA, USA) with a particle size of  $3 \mu\text{m}$  and pore size of  $130 \text{ \AA}$ . The column oven was fixed at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . The mobile phase consisted of (A) 0.5% formic acid in water and (B) acetonitrile. The injection volume was  $20 \mu\text{L}$  and the flow rate was  $0.6 \text{ mL/n min}$ . The 40 min gradient used was as follows: 0–5 min, 90:10 (A:B); 5–7 min from 90:10 to 86:14 (linear gradient); 7–17 min held at 86:14; 17–19 min from 86:14 to 75:25 (linear gradient); 19–24 min held at 75:25; 24–25 min from 75:25 to 10:90 (linear gradient); 25–31 min held at 10:90; 31–32 min from 10:90 to 90:10; and 32–40 min held at 90:10 (re-equilibration step). The electrospray ionization source was operated in negative mode. The nebulization gas flow was set to  $1.5 \text{ L/min}$  and drying gas flow at  $20 \text{ L/min}$ . The heat block temperature was fixed at  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ , and the desolvation line (DL) temperature at  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . The probe voltage was set to  $-4500 \text{ V}$ . Phenolic standards used in this study were gallic acid, rutin, catechin, gallic acid, epigallocatechin, chlorogenic acid, vanillic acid, caffeic acid, epicatechin, narcissin, verbacoside and naringin.

### 2.6. Evaluation of Larvicidal Activity

#### 2.6.1. Toxicity Tests

Extraction was carried out according to Aouinty et al. (2006) [17] and Soha et al. (2019) [18], with slight modifications. Indeed, the aqueous extracts were obtained from the leaves of the male and female plants of *M. annua*, and 10 g of each powder was macerated in 100 mL of distilled water for 24 h, then filtered using a Whatman filter paper (3 mm). The resulting filtrate represents an initial stock solution of 10%. To give more signification to the quantities of the plant material, they were concentrated by evaporation under reduced pressure using a rotary evaporator. The residues obtained were used in the larvicidal activity tests with different concentrations (0.01, 0.005, 0.002 and  $0.001 \text{ g/mL}$ ). The toxicity was evaluated by placing 15 *T. confusum* larvae in a glass beaker containing 20 mL of each concentration of each extract. The control group contained 20 mL of distilled water and 15 larvae. Mortality was registered after 6, 12, 24 and 48 h of exposure and the mortality percentage was reported from an average of three replicates.

#### 2.6.2. Statistical Analysis

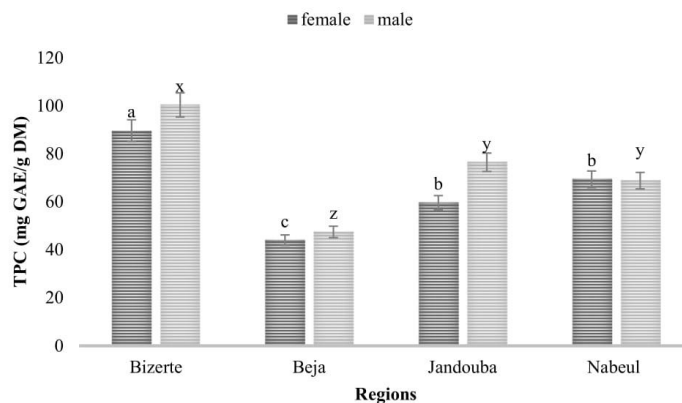
The lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) was defined as the concentration that caused 50% mortality in the population of larvae studied, for a given time [19]. The estimates of  $\text{LC}_{50}$  were obtained after 24 h and after 48 h, using probit analysis. Statistical analysis was completed using the one-way ANOVA test to compare the effects of the different parameters (concentration, time, provenance and sex) studied. Two-way ANOVA was used to estimate the interaction significance of the effects of sex and provenance. The Bonferroni test was used to investigate the differences between male and female plant assays and to compare *M. annua* provenances. All tests were carried out in triplicate and the results are expressed as means  $\pm$  standard deviations. The correlation between TPC, TFC and antioxidant activity is presented by Pearson correlation coefficient. Results were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical processes were achieved using SPSS version 25.0 software.

## 3. Results and Discussion

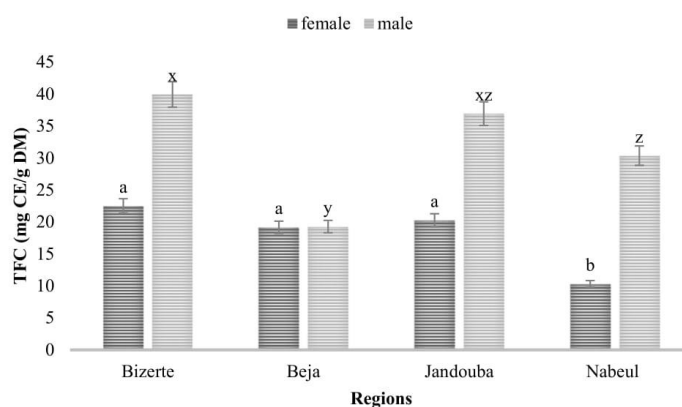
### 3.1. Quantification of TPC and TFC

The results reported in Figures 1 and 2 show that the distribution of TPC and TFC varied according to the region ( $p < 0.05$ ) and sex ( $p < 0.005$ ). The TPC in leaf extracts from Bizerte was the highest, with more than  $100.41$  and  $89.7 \text{ mg GAE/g DM}$  for male and female plant extracts, respectively, while leaf extracts from Beja exhibited the lowest values:  $44 \text{ mg GAE/g DM}$  for female plants and  $47.49 \text{ mg GAE/g DM}$  for male plants (Figure 1).





**Figure 1.** Total phenolic contents (TPC) of leaves of male and female plants of *M. annua* from Bizerte, Beja, Jandouba and Nabeul provenances. Results of the Bonferroni test are significantly different at  $p < 0.05$ . Marked columns not linked by the same letter are significantly different at  $p < 0.05$ , and each data point is represented by the average of three repetitions  $\pm$  SD.



**Figure 2.** Total flavonoid contents (TFC) of leaves of male and female plants of *M. annua* from Bizerte, Beja, Jandouba and Nabeul provenances. Results of the Bonferroni test are significantly different at  $p < 0.05$ . Marked columns not linked by the same letter are significantly different at  $p < 0.05$ , and each data point is represented by the average of three repetitions  $\pm$  SD.

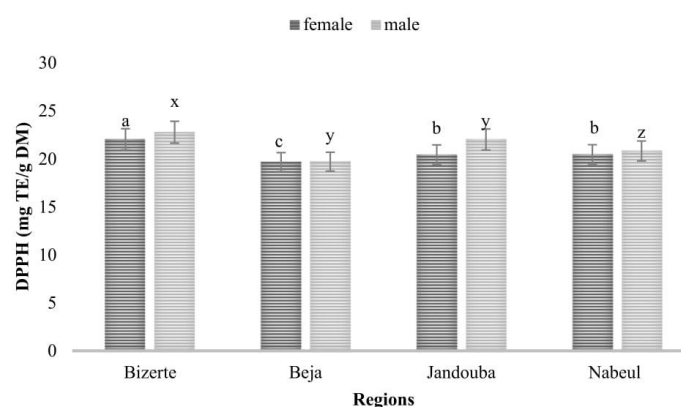
The TFC in leaf extracts from Bizerte showed the highest concentration for both sexes: 22.5 CE mg/g DM in female plants and 39.94 CE mg/g DM in male plants. This was followed by Jandouba, with 36.94 CE mg/g DM in male plants, and Nabeul, also with 30.35 CE mg/g DM in male plants, while the provenance of Beja displayed for both male (4.27 CE mg/g DM) and female (4.16 CE mg/g DM) leaves the lowest doses (Figure 2). Richness in TFC in aerial parts of plants was previously reported by Caridade et al. (2018) [20]. This affluence in phenolic compounds is probably the cause of the use of *M. annua* against hair loss in Tunisia. Blanco-Salas et al. (2019) [3] clarified the effectiveness of several species of the genus *Mercurialis* as a refuge in traditional Spanish medicine.

The TPC and TFC of the leaf extracts were higher in the Bizerte region for both sexes, and they were the highest in the male plant for the provenances tested. The ANOVA test showed that there was a highly significant difference between different regions ( $F = 48.079$ ) and between male and female plants ( $F = 6.881$ ;  $p = 0.018$ ) for TPC. The interaction between

the sex of plants and the provenance had a significant effect on TFC ( $F = 6.63$ ;  $p = 0.004$ ) but there was no interaction between the sex of plants and their origins for TPC ( $F = 1.76$ ;  $p = 0.19$ ).

### 3.2. Antioxidant Activity (AOA)

The results in Figure 3 reveal that, compared to the three other regions, the leaf extract from Bizerte displayed the highest values of TPC and TFC, with 22.04 and 22.78 mg ET/g DM for female and male plant extracts, respectively, followed by Jandouba leaf extracts, with 20.45 mg ET/g DM for female plants and 22.02 mg ET/g DM for male plants, and then Nabeul leaf extracts showed 20.45 and 20.83 mg ET/g DM for female and male plant extracts, respectively. Beja leaf extracts were the lowest, with 19.67 mg ET/g DM for female plants and 19.71 mg ET/g DM for male plants.



**Figure 3.** Antioxidant activity (DPPH) of leaves of male and female plants of *M. annua* from Bizerte, Beja, Jandouba and Nabeul provenances. Results of the Bonferroni test are significantly different at  $p < 0.05$ . Marked columns not linked by the same letter are significantly different at  $p < 0.05$ , and each data point is represented by the average of three repetitions  $\pm$  SD.

These results show that the antioxidant activity was higher in the Bizerte leaf extracts than in other provenances for both sexes, and it was highest in the male plants as opposed to female ( $p < 0.05$ ). The ANOVA test confirmed that the interaction between the sex of plants and the provenance had a significant effect on AOA ( $F = 6.53$ ;  $p = 0.004$ ) assays. Singh et al. (2016) [21] confirmed that plants which produced a high amount of phenolic compounds possessed high antioxidant activity. These results indicate that the different extracts have significant antioxidant activity which might be responsible for the larvicidal activity studied [22].

### 3.3. Relationship between TPC, TFC and AOA

The correlation between TPC and TFC versus AOA was studied. A positively strong and significant ( $p \leq 0.01$ ) correlation was observed between TPC, TFC and AOA for the leaf extracts of female plants, with  $r = 0.854$  for TPC and AOA and  $r = 0.736$  for TFC and AOA.

A similar relationship was observed for the leaf extracts of male plants, and our results also established a positive correlation between TPC, TFC and AOA with a Pearson correlation coefficient of  $r = 0.894$  and  $r = 0.784$ , respectively.

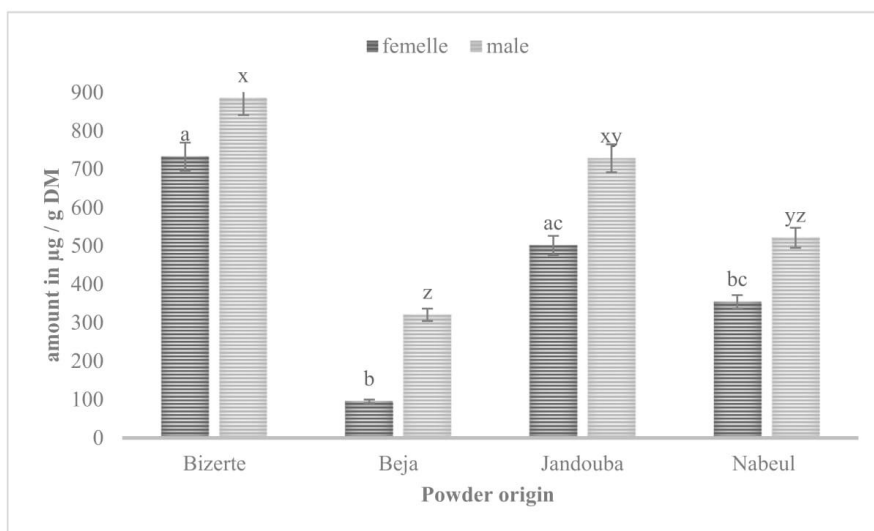
A positively strong and significant correlation ( $p \leq 0.01$ ) can be observed between TPC, TFC and AOA. This suggests that phenolic and flavonoid compounds may be responsible for their antioxidant activity.

These results are in agreement with Ghnimi et al. (2014) [9], whose study of the leaf extracts of castor showed a good correlation between phenolic compounds, flavonoid compounds and antioxidant activity.

For the first time, our study on the leaf extracts of *M. annua* revealed a positive correlation between phenolics (TPC and TFC) and antioxidant activity for different provenances, whatever the sex.

#### 3.4. LC-MS

The extracts of the male and female *M. annua* leaves contained flavonoids (narcissin, rutin, epicatechin, gallothechin and epigallocatechin). The comparison to a standard narcissin (isorhamnetin-3-o-rutinoside) of the chromatogram profiles of *Mercurialis* leaf extracts from four Tunisian regions, Bizerte, Beja, Jandouba and Nabeul, under PDA at 350 nm and ESI/MS, proved that narcissin was the main flavonoid in the studied extracts. Our results corroborate with what was advanced by Blanco-Salas et al. (2019) [3], who confirmed the copiousness of the aerial parts of the genus *Mercurialis* in narcissin. The quantification of the different compounds was determined using a calibration curve of each standard (Figure 4 and Table 1).



**Figure 4.** Amount of narcissin in µg/g DM in Bizerte, Jandouba, Beja and Nabeul provenances, for male and female plants. Results of the Bonferroni test are significantly different at  $p < 0.05$ . Marked columns not linked by the same letter are significantly different at  $p < 0.05$ , and each data point is represented by the average of three repetitions  $\pm$  SD.

**Table 1.** Concentration (µg/g DM) of flavanol compounds identified in the *M. annua* leaves for male and female plants of four Tunisian provenances.

RT (min)	Amount of Flavanol in µg/g DM								
	Male Plant				Female Plant				
	Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul	Bizerte	Beja	Jandouba	Nabeul	
Narcissin	17.5 ± 0.3	885.4 ± 0.001	320.73 ± 0.018	728.48 ± 0.04	521.31 ± 0.038	732.78 ± 0.38	95.02 ± 0.1	501.38 ± 0.73	354.29 ± 0.32
Gallocatechin	7.3 ± 0.2	205.68 ± 0.005	57.1 ± 0.043	181.36 ± 0.004	61.89 ± 0.02	155.37 ± 0.001	42.67 ± 0.005	150.45	59.06 ± 0.02
Rutin	15.4 ± 0.3	44.18 ± 0.016	8.11 ± 0.0002	23.98 ± 0.005	10.82 ± 0.061	18.38 ± 0.004	1.4 ± 0.0003	11.57 ± 0.001	7.4 ± 0.102
Epigallocatechin	9.07 ± 0.2	35.37 ± 0.0007	12.78 ± 0.082	23.68 ± 0.004	20.68 ± 0.006	34.57 ± 0.0008	10.11 ± 0.0012	17.29 ± 0.005	14.63 ± 0.164
Epicatechin	15.3 ± 0.2	27.46 ± 0.04	12.35 ± 0.001	24.57 ± 0.003	18.4 ± 0.0009	21.02 ± 0.003	8.16 ± 0.0006	13.16 ± 0.001	11.01 ± 0.001

Values shown are mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

The plant extracts were rich in narcissin, and those of Bizerte revealed the highest amount, with 885.4  $\mu\text{g/g}$  DM for male plants and 732.78  $\mu\text{g/g}$  DM for female plants, followed by those of Jandouba, with 728.49  $\mu\text{g/g}$  DM (male plants) and 501.38  $\mu\text{g/g}$  DM (female plants), and those of Beja, which displayed the lowest quantity of 320.74  $\mu\text{g/g}$  DM (male plants). The plant extracts were also rich in rutin: 44.18  $\mu\text{g/g}$  DM for Bizerte (male plants), followed by 24  $\mu\text{g/g}$  DM for Jandouba (male plants), then 10.82  $\mu\text{g/g}$  DM for Nabeul (male plants). Beja male plant extracts always had the lowest quantity: 8.11  $\mu\text{g/g}$  DM. The concentration of galocatechin was important in leaf extractions compared to the other flavonol, with 205.69 and 155.37  $\mu\text{g/g}$  DM in Bizerte male and female plants, respectively. Beja displayed the lowest doses with 57.1 and 42.67  $\mu\text{g/g}$  DM in male and female plants, respectively. This species was also rich in epicatechin and epigallocatechin. Our results were in agreement with those reported in the literature concerning castor leaves belonging to the same *Euphorbeaceae* family. Indeed, Ghnimi et al. (2014) [9] identified epicatechin and rutin in abundance in the aerial parts of some Tunisian provenances of *Ricinus communis* L. Moreover, Aquino et al. (1987) [23], reported that the major phenolic compounds in *M. annua* were narcissin and rutin. These results also revealed the presence in significant quantities of other flavonols such as epicatechin, galocatechin and epigallocatechin, which are not yet identified in the recent literature for *M. annua*. The leaf extract analyses showed that the male plants contained more phenolic compounds than the female plants, and that the leaf extracts from Bizerte abounded in phenolic contents compared to other provenances. LC-MS statistical analysis showed that there was a significant difference between regions ( $F = 13.83$  and  $p = 0.002$ ) for the amount of flavonol and between male and female plants ( $F = 8.149$  and  $p = 0.021$ ).

#### 4. Larvicidal Activity

The larvicidal effect of the aqueous extracts of the leaves of male and female plants was observed at 6, 12, 24 and 48 h, showing an increasing intoxication of *T. confusum* larvae as time ( $p = 0.0001$ ) and concentration ( $p = 0.001$ ) increased (Figure 5). The 0.01 g/mL extract of powder of male plants from the Bizerte region exhibited a high percentage of mortality after 24 h (97%), and 100% mortality was reached after 48 h. This high toxicity was confirmed by the lowest value of  $\text{LC}_{50}$ ;  $\text{LC}_{50} = 0.0039$  g/mL after 24 h and  $\text{LC}_{50} = 0.0026$  g/mL after 48 h. On the other hand, the leaves of the female plants from the Bizerte region showed a higher toxicity than that assessed in the other three regions (Table 2). As detailed in Figure 5, the leaf extract of the Beja provenance displayed the lowest toxicity against larvae, with  $\text{LC}_{50}$  values for the leaves of male and female plants of 0.00924 g/mL and 0.0157 g/mL, respectively. The leaf extracts of male plants tested on *T. confusum* were found more effective as compared to the leaf extracts of female plants. The impact of the sex parameter was highly significant ( $p = 0.001$ ). Our results also underline the highly significant effect of the origin ( $p = 0.002$ ) of the plant material. There was no mortality for the control test.

This study is the first to elucidate the larvicidal activity of the leaves of male and female plants of *M. annua* from different regions of Tunisia against *T. confusum*. These results corroborate with other research carried out by Al Bachchu et al. (2017) [24] on the larvicidal efficacy of indigenous plant extracts against *Tribolium castaneum* (Herbst) larvae. Aouinty et al. (2006) [17] highlighted the toxic power of aqueous leaf extract of *Ricinus communis* L. (*Euphorbiaceae*) on mosquito larvae. In the same context, several studies [25–27] have shown that plant extracts of some species, and at well-defined doses, are able to play an influential role as a bio-larvicide and thus reduce the use of chemicals noxious to the environment and human health.



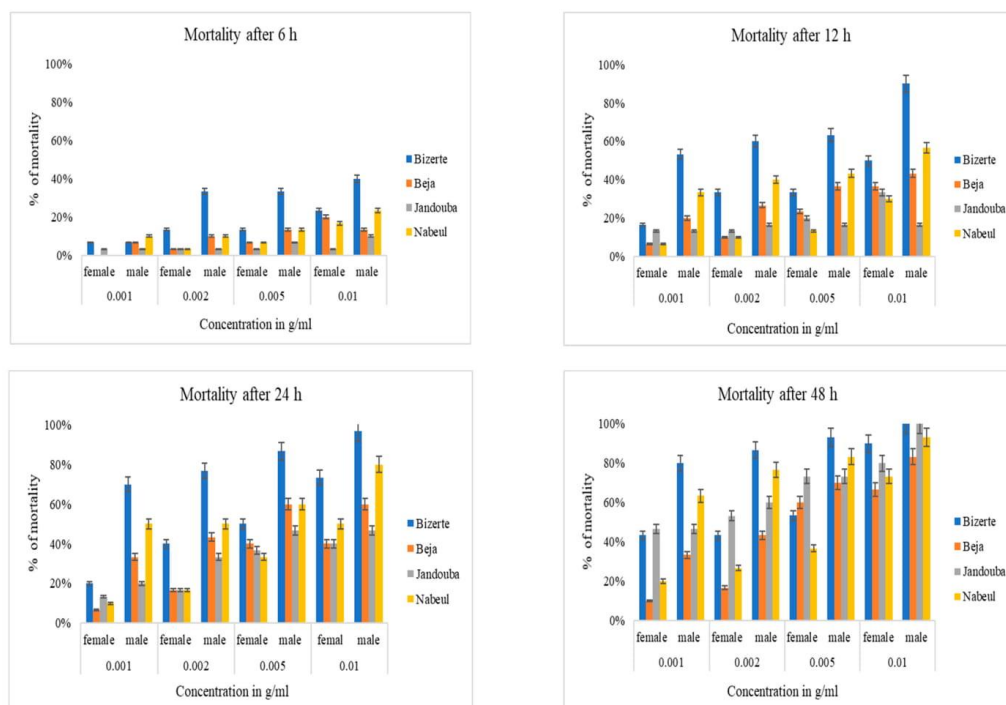


Figure 5. Mortality (%) after 6, 12, 24 and 48 h of *T. confusum* subjected to the different concentrations of the aqueous extract of the leaf powders of the female and male plants of *M. annua* from four provenances.

Table 2. Larvicidal activity of *M. annua* leaf extract against *T. confusum*.

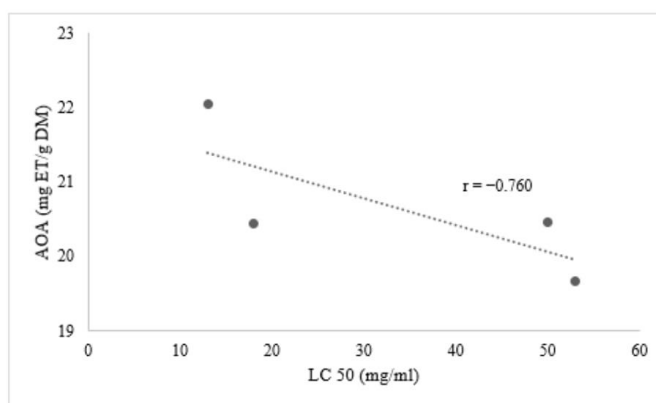
Provenance	Plant Material	Time (h)	LC <sub>50</sub> g/mL ± SE	χ <sup>2</sup>	95% Lower Confidence	95% Upper Confidence
Bizerte	LFP	24	0.0038 ± 0.172	2.969	0.00312	0.00498
	LMP	24	0.00039 ± 0.217	2.237	0.000126	0.00069
	LFP	48	0.0020 ± 0.178	20.439	-	-
	LMP	48	0.00026 ± 0.282	3.406	0.00006	0.0005
Nabeul	LFP	24	0.0022 ± 0.134	0.126	-	-
	LMP	24	0.0014 ± 0.172	5.472	0.00066	0.0022
	LFP	48	0.0049 ± 0.196	10.69	-	-
	LMP	48	0.00046 ± 0.201	1.21	0.00024	0.00099
Jandouba	LFP	24	0.012 ± 0.196	5.045	0.0085	0.0022
	LMP	24	0.0034 ± 0.162	1.711	0.00059	0.024
	LFP	48	0.00135 ± 0.176	0.795	0.00096	0.0042
	LMP	48	0.00132 ± 0.207	16.234	-	-
Béja	LFP	24	0.0157 ± 0.186	1.985	0.0096	0.042
	LMP	24	0.0092 ± 0.173	2.49	0.00013	0.069
	LFP	48	0.0052 ± 0.181	6.859	0.00023	0.034
	LMP	48	0.0022 ± 0.181	0.99	0.0018	0.0028

-: The LC could not be calculated. Heterogeneity factor was used. SE: standard error; LFP: leaves from female plants; LMP: leaves from male plants.

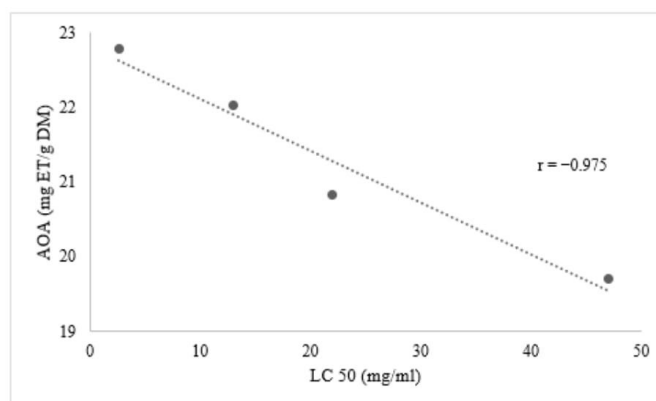


#### Relation between Phenolic Compounds and Larvicidal Activity

Our results reveal for the first time a good negative correlation between the larvicidal activity of aqueous leaf extracts of male and female plants of *M. annua* and the antioxidant activity of methanolic leaf extracts, with a coefficient of correlation of Pearson  $r = -0.975$  for male plants and  $r = -0.760$  for female plants (Figures 6 and 7). As reported by Beatović et al. (2015) [28], the antioxidant capacity of different plant extracts is closely related to their most abundant components. Indeed, narcissin is a natural flavonol glycoside known for its antioxidant activity [29]. Petruk et al. (2017) [30] identified narcissin in immature cladodes of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. and showed that it was responsible for the anti-oxidative stress on human keratinocytes. In addition, in our extracts, galocatechin occupied a second position after narcissin in terms of abundance, followed by rutin. A previous study demonstrated that rutin significantly blocked the growth and proliferation of larvae of *Aedes aegypti* L. [31]. On the other hand, Sogan et al. (2018) [32] proposed that biological activity could be due to a synergistic effect between the different phenolic compounds.



**Figure 6.** Relationship between antioxidant activity of methanolic leaf extracts and the larvicidal activity of aqueous leaf extracts of female plants of *M. annua*.



**Figure 7.** Relationship between antioxidant activity of methanolic leaf extracts and the larvicidal activity of aqueous leaf extracts of male plants of *M. annua*.

This study is in agreement with many other studies supporting a negative correlation between the antioxidant activity and biological activity of plant materials [33,34].

## 5. Conclusions

The present phytochemical analysis of leaves of *Mercurialis annua* L. of four Tunisian provenances revealed that, whatever the region, the TPC, the TFC and the antioxidant activity were higher in the extracts of leaves of male plants than in the extracts of leaves of female plants, and also highlighted the abundance of narcissin and rutin in male plants. This result could be used to explain the strong larvicidal activity detected in male leaves against *Tribolium confusum* (Du Val), an insect pest of flour and cereal seeds. This is the first study to focus on the chemical composition of leaf extracts of *Mercurialis annua* L. from Tunisian origins and to evaluate their larvicidal activity on *Tribolium confusum* (Du Val). Indeed, this study clearly showed the importance of aqueous extracts of the leaves of *M. annua* as biopesticides against *T. confusum*. However, the use of this natural resource must be scientifically approved for sustainable use. In addition, LC-MS analyses revealed the presence of biologically active phenolic compounds responsible for the mortality of *T. confusum*. However, more analyses are necessary to purify and identify the molecules responsible for this larvicidal activity and their environmental impact.

**Author Contributions:** H.E.F.O. and A.D.: conceptualization, methodology, software, validation, formal analysis, investigation, resources, visualization, writing—review and editing. R.B.N.: methodology, software, data curation, investigation, resources, writing—original draft preparation. E.D.B.: software. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** No new data were created or analyzed in this study. Data sharing is not applicable to this article.

**Acknowledgments:** This study was carried out with the support of Jouda Mediouni Ben Jemaa from the National Institute of Agronomic Research of Tunis (INRAT), who provided us the animal material.

**Conflicts of Interest:** The authors declared that they have no conflict of interest.

## References

- Shafiei, B.; Akbarinia, M.; Jalali, S.G.; Hosseini, S.M.; Azizi, P. Effect of Fire on Herbal Layer Biodiversity in a Temperate Forest of Northern Iran. *Pak. J. Biol. Sci.* **2006**, *9*, 2273–2277. [[CrossRef](#)]
- Oran, S.A.; Al Eisawi, D.M. Check-list of medicinal plants in Jordan. *Dirasat* **1998**, *25*, 84–112.
- Blanco-Salas, J.; Vazquez, F.M.; Hortigón-Vinagre, M.P.; Ruiz-Tellez, T. Bioactive Phytochemicals from *Mercurialis* spp. Used in Traditional Spanish Medicine. *Plants* **2019**, *8*, 193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Aldouri, N.; Shakya, A. Fatty Acids Analysis and Antioxidant Activity of a Lipid Extract obtained from *Mercurialis annua* L. grown wildly in Jordan. *Acta Pol. Pharm.* **2018**, *75*. [[CrossRef](#)]
- Doukkali, Z.; Kamal, R. Anti-Anxiety Effects of *Mercurialis annua* Aqueous Extract in the Elevated Plus Maze Test. *J. Pharmacol. Rep.* **2016**, *1*, 1–5.
- Al-Bakri, G.; Afifi, F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. *J. Microbiol. Methods* **2007**, *68*, 19–25. [[CrossRef](#)]
- Bustanji, Y.; AlDouri, N.; Issa, A.; Mashallah, S.; Assaf, A.; Aburjai, T.; Mohammad, M. Cytotoxic effect of *Mercurialis annua* L. methanolic extract on six human solid cancer cell lines. *SRE* **2012**, *7*, 3218–3222. [[CrossRef](#)]
- Ostrozhenkova, E.; Eylert, E.; Schramek, N.; Golan-Goldhirsh, A.; Bacher, A.; Eisenreich, W. Biosynthesis of the chromogen hermidin from *Mercurialis annua* L. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2816–2824. [[CrossRef](#)]
- Wafa, G.; Amadou, D.; Larbi, K.M.; Héla, E.F.O. Larvicidal activity, phytochemical composition, and antioxidant properties of different parts of five populations of *Ricinus communis* L. *Ind. Crop. Prod.* **2014**, *56*, 43–51. [[CrossRef](#)]
- Pottier-Alapetite, G. *Flore de la Tunisie. Angiospermes-dicotyledones . . . Apétales-Dialypétales*; Première Partie; Imprimerie Officielle de la République Tunisienne; Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique et le Ministère de l'Agriculture: Tunis, Tunisia, 1979; p. 466.

11. Benoit, H.P.; McCauley, E.; Post, J.R. Testing the Demographic Consequences of Cannibalism in *Tribolium confusum*. *Ecology* **1998**, *79*, 2839–2851. [[CrossRef](#)]
12. Zaiter, A.; Becker, L.; Petit, J.; Zimmer, D.; Karam, M.C.; Baudelaire, É.; Scher, J.; Dicko, A. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders. *Powder Technol.* **2016**, *301*, 649–656. [[CrossRef](#)]
13. Mousavi, M.; Zaiter, A.; Modarressi, A.; Baudelaire, E.; Dicko, A. The positive impact of a new parting process on antioxidant activity, malic acid and phenolic content of *Prunus avium* L., *Prunus persica* L. and *Prunus domestica* subsp. *Insititia* L. powders. *Microchem. J.* **2019**, *149*, 103962. [[CrossRef](#)]
14. Chen, Y.; Rai, R.; Zhou, Z.R.; Kanoh, J.; Ribeyre, C.; Yang, Y.; Zheng, H.; Damay, P.; Wang, F.; Lei, M.; et al. A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, *18*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Velázquez, E.; Tournier, H.A.; Mordujovich de Buschiazzo, P.; Saavedra, G.; Schinella, G.R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* **2003**, *74*, 91–97. [[CrossRef](#)]
16. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. *Songklanakarin J. Sci. Technol. (SJT)* **2004**, *26*, 211–219.
17. Aouinty, B.; Oufara, S.; Mellouki, F.; Mahari, S. Evaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés: *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2006**, *10*. Available online: <https://doi.org/article/64680bf90616411192fd766d5898df91> (accessed on 2 February 2021).
18. Soha, S.A.S.; Dougnon, T.V.; Ohouko, O.F.; Asouko, S.J.; Dougnon, T.J.; Youssao, A.K.; Farougou, S.; Kpodekon, T.T.M. Larval cytotoxicity and acute oral toxicity of aqueous extracts of elaeis guineensis leaves and khaya senegalensis stem bark in wistar rats. *Int. J. Adv. Res.* **2019**. [[CrossRef](#)]
19. Mohapatra, C.; Rengarajan, K. Manual on bioassays in the laboratory and their techniques. *Cmfri Spec. Publ.* **1995**, *64*, 1–75.
20. Caridade, T.N.S.; Araújo, R.D.; Oliveira, A.N.A.; Souza, T.S.A.; Ferreira, N.C.F.; Avelar, D.S.; Teles, Y.C.F.; Silvera, E.R.; Araújo, R.M. Chemical composition of four different species of the *Waltheria* genus. *Biochem. Syst. Ecol.* **2018**, *80*, 81–83. [[CrossRef](#)]
21. Singh, P.A.; Brindavanam, N.B.; Kimothi, G.P.; Aeri, V. Evaluation of in vivo anti-inflammatory and analgesic activity of *Dillenia indica* f. *elongata* (Miq.) Miq. and *Shorea robusta* stem bark extracts. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* **2016**, *6*, 75–81. [[CrossRef](#)]
22. Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, e162750. [[CrossRef](#)]
23. Aquino, R.; Behar, I.; D'agostino, M.; De Simone, F.; Schettino, O.; Pizza, C. Phytochemical investigation on *Mercurialis annua*. *Biochem. Syst. Ecol.* **1987**, *15*, 667–669. [[CrossRef](#)]
24. Bachchu, M.A.A.; Ara, K.; Uddin, M.N.; Ara, R. Larvicidal Efficacies of Four Indigenous Plant Extracts Against Red Flour Beetle, *Tribolium Castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J. Asiat. Soc. Bangladesh Sci.* **2017**, *43*, 2. [[CrossRef](#)]
25. An, N.T.G.; Huang, L.T.; Satyal, P.; Tai, T.A.; Dai, D.N.; Hung, N.H.; Ngoc, N.T.B.; Setzer, W.N. Mosquito Larvicidal Activity, Antimicrobial Activity, and Chemical Compositions of Essential Oils from Four Species of *Myrtaceae* from Central Vietnam. *Plants* **2020**, *9*, 544. [[CrossRef](#)]
26. Swargiary, A.; Daimari, M.; Roy, M.; Haloi, D.; Ramchiary, B. Evaluation of phytochemical properties and larvicidal activities of *Cynodon dactylon*, *Clerodendrum viscosum*, *Spilanthes acmella* and *Terminalia chebula* against *Aedes aegypti*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2019**, *12*, 224. [[CrossRef](#)]
27. Da Silva, J.K.R.; Andrade, E.H.A.; Kato, M.J.; Carreira, L.M.M.; Guimarães, E.F.; Maia, J.G.S. Antioxidant capacity and larvicidal and antifungal activities of essential oils and extracts from *Piper krukoffii*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1361–1366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Beatovic, D.; Krstic-Milosevic, D.; Trifunovic, S.; Siljegovic, J.; Glamoclija, J.; Ristic, M.; Jelacic, S. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Twelve *Ocimum basilicum* L. Cultivars Grown in Serbia. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 62–75.
29. Huang, J.L.; Fu, S.T.; Jiang, Y.Y.; Cao, Y.B.; Guo, M.L.; Wang, Y.; Xu, Z. Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2007**, *86*, 741–748. [[CrossRef](#)]
30. Petruk, G.; Di Lorenzo, F.; Imbimbo, P.; Silipo, A.; Bonina, A.; Rizza, L.; Piccoli, R.; Monti, D.M.; Lanzetta, R. Protective effect of *Opuntia ficus-indica* L. cladodes against UVA-induced oxidative stress in normal human keratinocytes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5485–5489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dubey, S.; Ganeshpurkar, A.; Bansal, D.; Dubey, N. Experimental studies on bioactive potential of rutin. *Chron. Young Sci.* **2013**. [[CrossRef](#)]
32. Sogan, N.; Kapoor, N.; Singh, H.; Kala, S.; Nayak, A.; Nagpal, B.N. Larvicidal activity of *Ricinus communis* extract against mosquitoes. *J. Vector Borne Dis.* **2018**, *55*, 282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Edziri, H.; Jaziri, R.; Chehab, H.; Verschaeve, L.; Flamini, G.; Boujnah, D.; Hammami, M.; Aouni, M.; Mastouri, M. A comparative study on chemical composition, antibiofilm and biological activities of leaves extracts of four Tunisian olive cultivars. *Heliyon* **2019**, *5*, e01604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Muanda, N.F.; Dicko, A.; Soulimani, R. Chemical composition and biological activities of *Ficus capensis* leaves extracts. *Undefined* **2010**, *3*, 147–160.

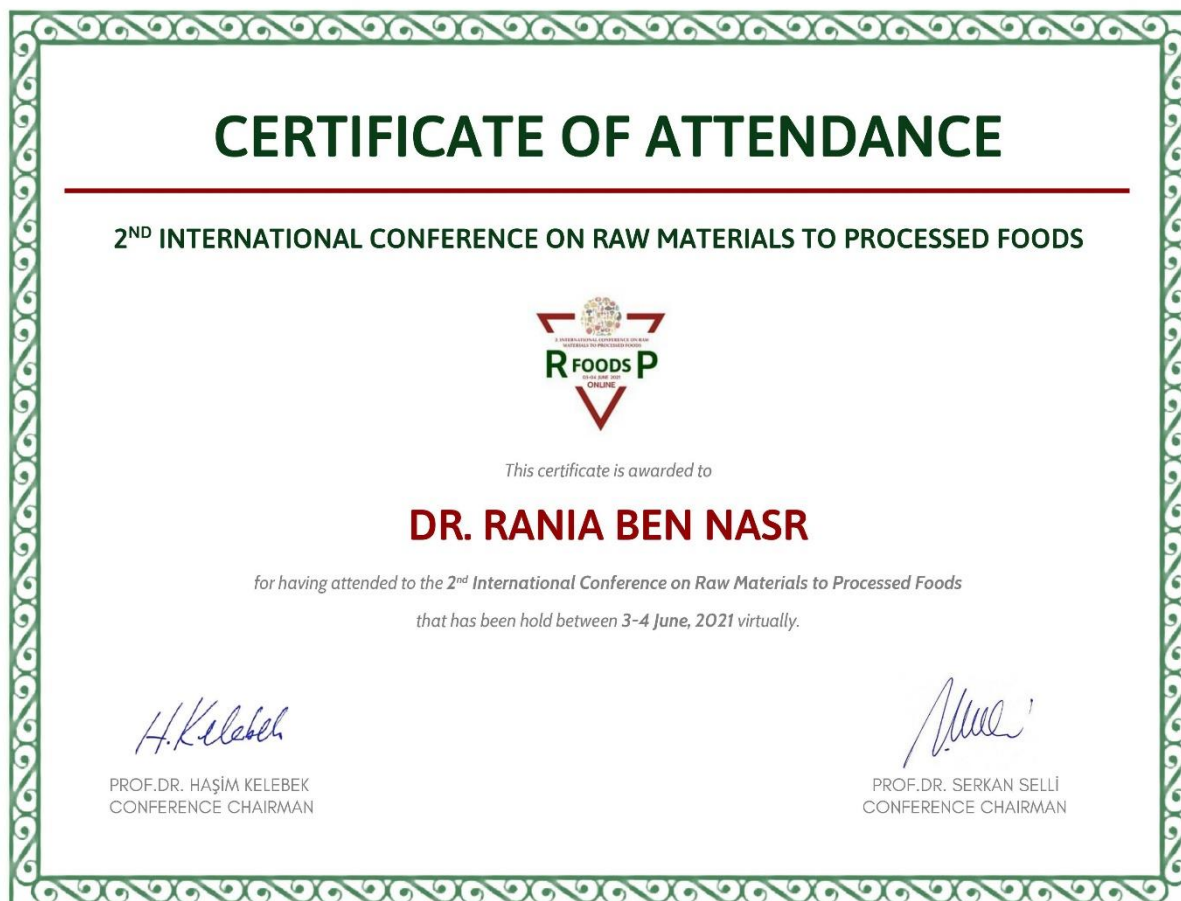
### **Abstract**

This study reports the link between larvicidal activity and the phytochemical composition of male and female leaf extracts of *Mercurialis annua* L. (*M. annua*) from four Tunisian regions: Bizerte, Jandouba, Nabeul and Beja. Their antioxidant activity was evaluated using DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assays. Phenolic compounds were identified and quantified using liquid chromatography coupled with a UV detector and mass spectrometry (LC-UV-ESI/MS). Higher antioxidant activity (AOA) was found in the leaves of male plant extracts than of female ones. The leaves of male and female plant extracts from Bizerte exhibited the highest AOA: 22.04 and 22.78 mg Trolox equivalent/g dry matter (mg TE/g DM), respectively. For both sexes, plant extracts from Beja had the lowest AOA with 19.71 and 19.67 mg TE/g DM for male and female plants, respectively. Some phenolic compounds such as narcissin, gallic acid, rutin, epigallocatechin and epicatechin were identified and quantified using LC-MS, which highlighted the abundance of narcissin and rutin in the male leaves of *M. annua*. We noted that the interaction between the sex of plants and the provenance had a significant effect on TFC ( $F = 6.63$ ;  $p = 0.004$ ) and AOA ( $F = 6.53$ ;  $p = 0.004$ ) assays, but there was no interaction between sex and origins for TPC ( $F = 1.76$ ;  $p = 0.19$ ). The larvicidal activity of aqueous leaf extracts of *M. annua* against *Tribolium confusum* (Du Val) (*T. confusum*), an insect pest of flour and cereal seeds, showed that the mortality could reach 100% after 48 h of exposure in the Bizerte region. The  $LC_{50}$  values for the leaf extract were low in Bizerte, with 0.003 and 0.009 g/mL for male and female plants, respectively, succeeded by Jandouba, which displayed 0.006 and 0.024 g/mL for male and female plants, respectively. Nabeul showed 0.025 g/mL for male plants and 0.046 g/mL for female plants and Beja showed 0.037 and 0.072 g/mL for male and female plants, respectively. This is the first time that a study has revealed a negative correlation between the antioxidant activity and the larvicidal activity of the leaf



extracts of *M. annua* with the following correlation coefficients of Perason:  $r = -0.975$  and  $r = -0.760$  for male and female plants, respectively.

*Keywords:* *Mercurialis annua* L.; antioxidant activity; LC-MS; larvicidal activity

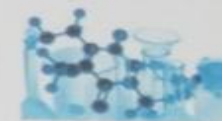


## Résumé :

Cette étude rapporte le lien entre l'activité larvicide et la composition phytochimique d'extraits de feuilles mâles et femelles de *Mercurialis annua* L. (*M. annua*) de quatre régions tunisiennes : Bizerte, Jandouba, Nabeul et Beja. Leur activité antioxydante a été évaluée à l'aide de dosages de DPPH (2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl). Les composés phénoliques ont été identifiés et quantifiés par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV et spectrométrie de masse (LC-UV-ESI/MS). Une activité antioxydante (AAO) plus élevée a été trouvée dans les feuilles des extraits de plantes mâles que celles des femelles. Les feuilles des extraits de plantes mâles et femelles de Bizerte présentaient les AAO les plus élevées : 22,04 et 22,78 mg équivalent Trolox/g matière sèche (mg ET/g MS), respectivement. Pour les deux sexes, les extraits de plantes de Beja avaient le plus faible AOA avec 19,71 et 19,67 mg ET/g MS pour les plantes mâles et femelles, respectivement. Certains composés phénoliques tels que la narcissine, la gallocatéchine, la rutine, l'épigallocatechine et l'épicatéchine ont été identifiés et quantifiés par LC-MS, ce qui a mis en évidence l'abondance de narcissine et de rutine dans les feuilles mâles de *M. annua*. Nous avons noté que l'interaction entre le sexe et la provenance avait un effet significatif sur les tests FVT ( $F = 6,63$  ;  $p = 0,004$ ) et AAO ( $F = 6,53$  ;  $p = 0,004$ ), mais il n'y avait pas d'interaction entre le sexe et les origines pour PPT ( $F = 1,76$  ;  $p = 0,19$ ). L'activité larvicide d'extraits aqueux de feuilles de *M. annua* contre *Tribolium confusum* (Du Val) (*T. confusum*), un insecte ravageur de la farine et des graines de céréales, a montré que la mortalité pouvait atteindre 100% après 48 h d'exposition dans la région de Bizerte. Les valeurs de CL50 pour l'extrait de feuilles étaient faibles à Bizerte, avec 0,003 et 0,009 g/mL pour les plantes mâles et femelles, respectivement, suivies par Jandouba, qui affichait 0,006 et 0,024 g/mL pour les plantes mâles et femelles, respectivement. Nabeul a montré 0,025 g/mL pour les plantes mâles et 0,046 g/mL pour les plantes femelles et Beja a montré 0,037 et 0,072 g/mL pour les plantes mâles et femelles, respectivement. C'est la première fois qu'une étude révèle une

corrélation négative entre l'activité antioxydante et l'activité larvicide des extraits de feuilles de *M. annua* avec les coefficients de corrélation de Pearson suivants :  $r = -0,975$  et  $r = -0,760$  pour mâle et femelle plantes, respectivement.

Mots-clés : *Mercurialis annua* L. ; activité ant-ioxydante ; LC-MS ; activité larvicide



UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Quatrièmes Journées Internationales de Chimie Organique de Annaba - JICOA'18  
1, 2 et 3 décembre 2018


**ATTESTATION DE PARTICIPATION**

Le Président des Quatrièmes Journées Internationales de Chimie Organique de Annaba, atteste que Madame  
Rania BEN NASR, a présenté une communication sous forme Poster intitulée :

INVESTIGATION PHYTOCHIMIQUE DE DIFFÉRENTS EXTRAITS DE MERCURIALIS ANNUA L. ET MISE EN  
ÉVIDENCE D'UNE CORRÉLATION POSITIVE ENTRE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE ET L'ACTIVITÉ LARVICIDE

Co-auteurs : Amadou DICKO, Hela EL FERCHICHI OUARDA

Le Président de séance

  
الأستاذ الدكتور  
جيلانو صلاح الدين

Le Président des JICOA'18



  
Pr. JOUF Nour Eddine



### Annexe 3

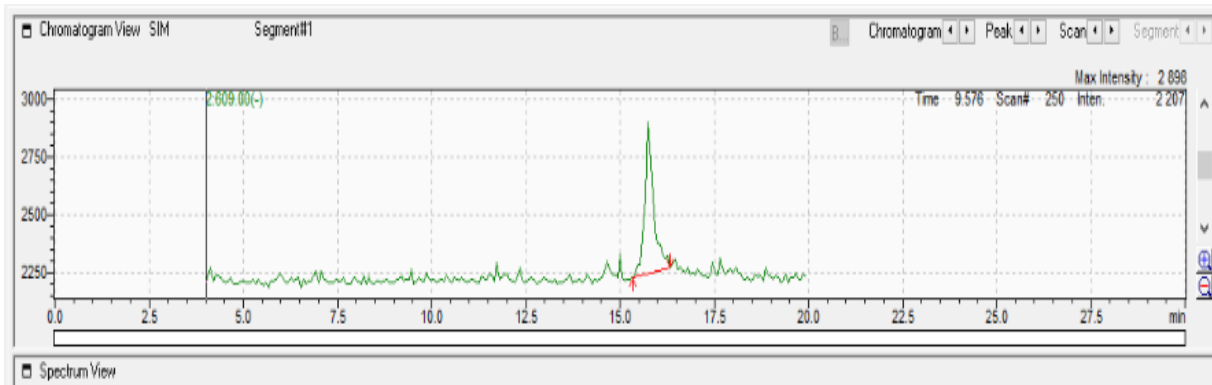


Figure 56: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).

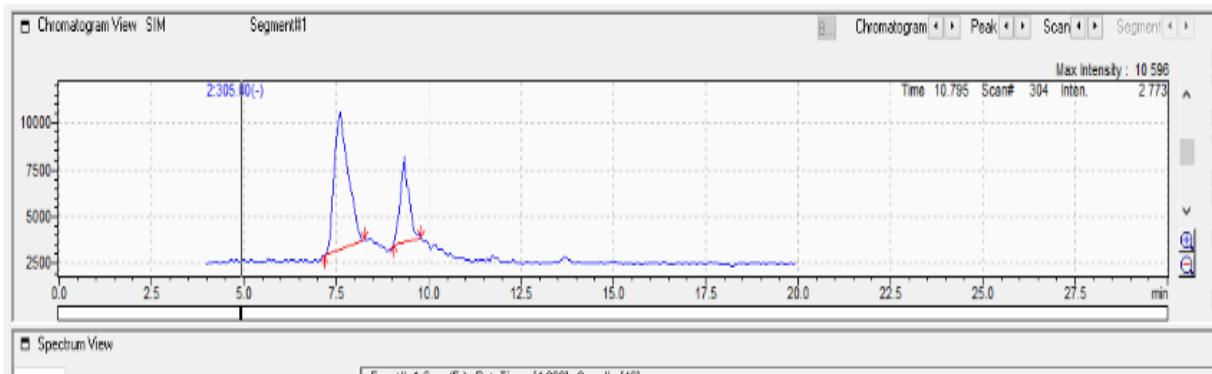


Figure 57 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigallocatéchine (2).

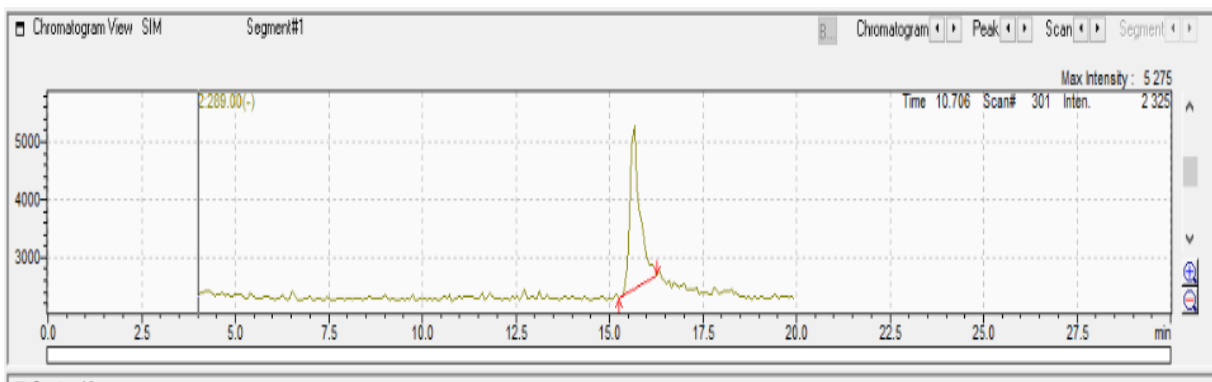


Figure 58: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatechine).

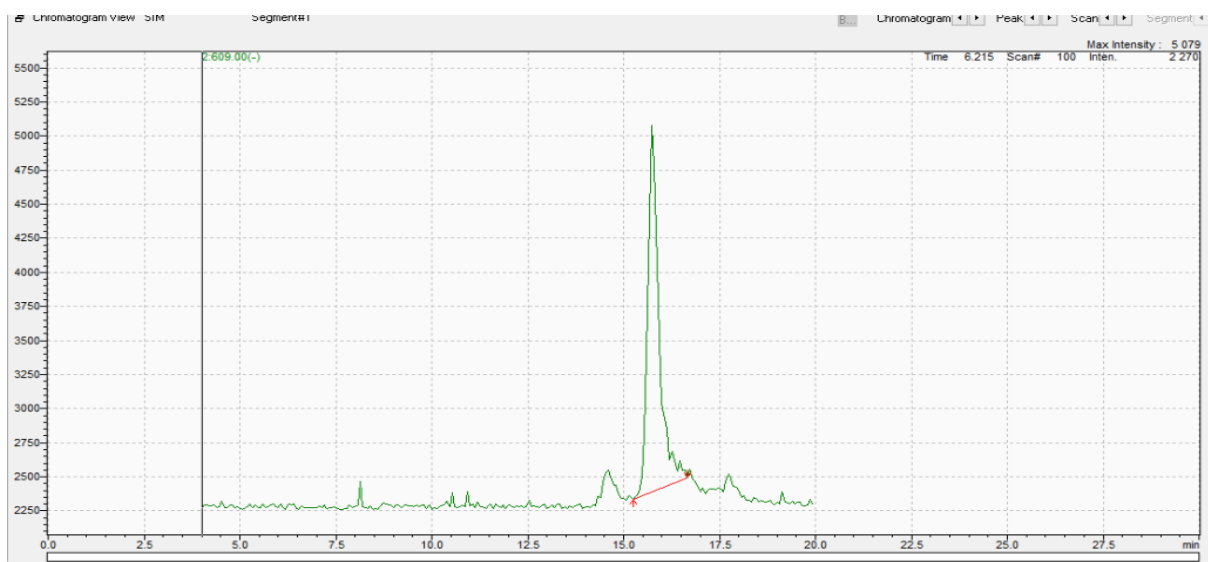


Figure 59: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).

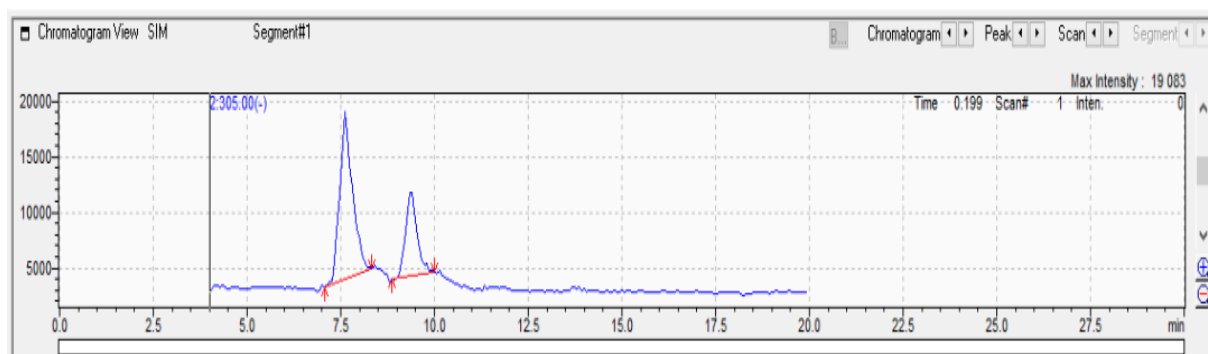


Figure 60 : Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigallocatéchine (2).

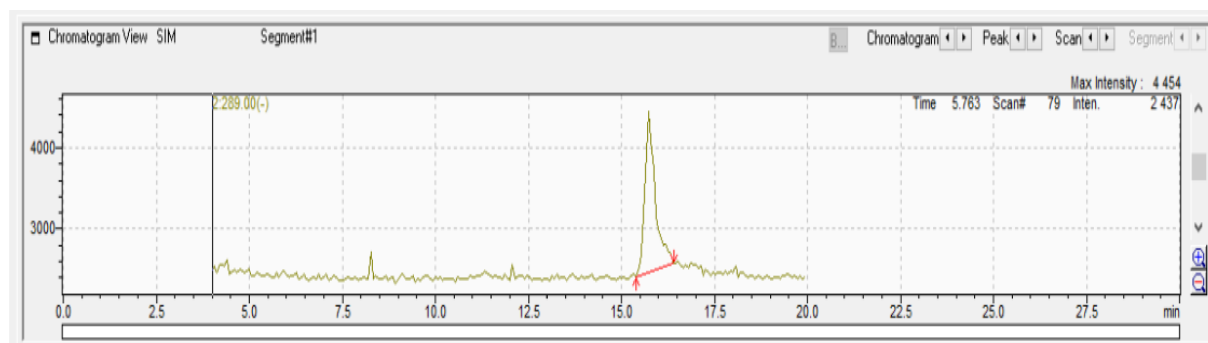
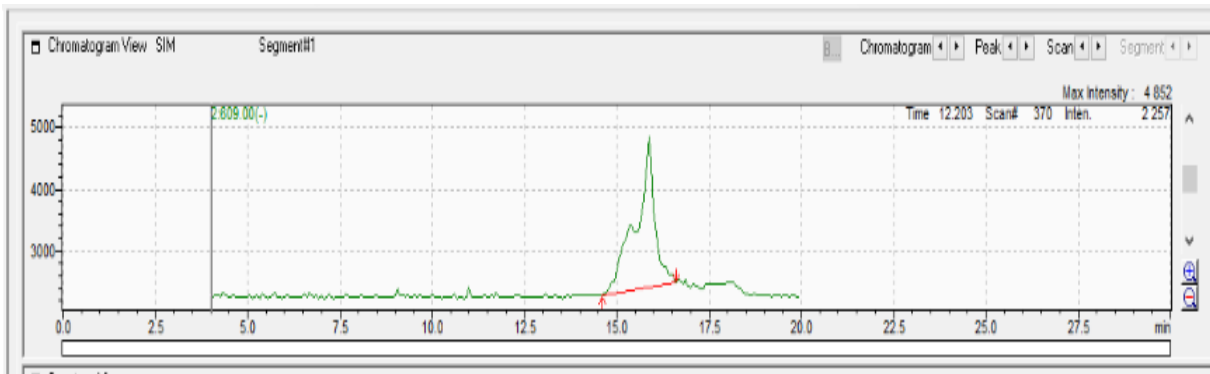
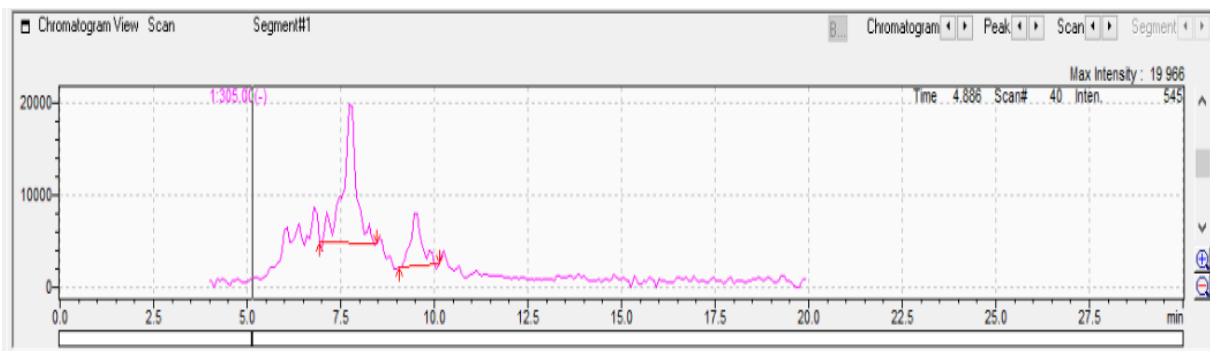


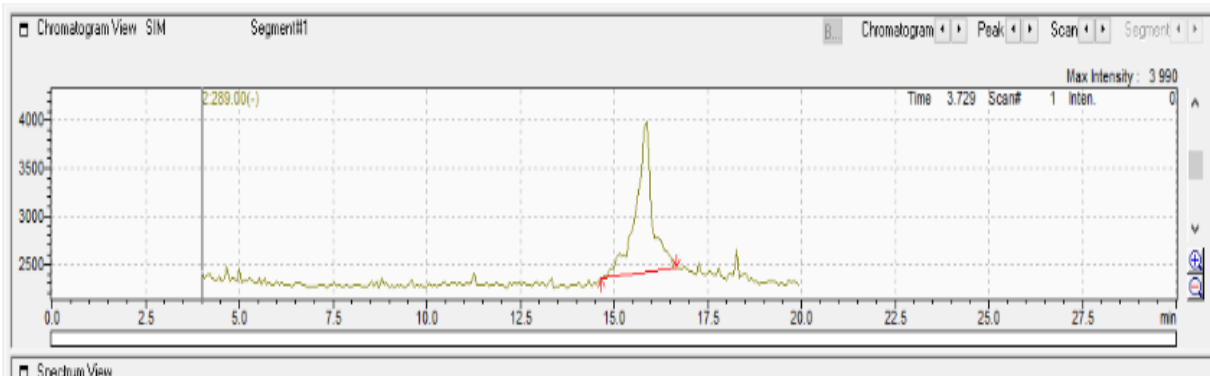
Figure 61: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Beja de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine).



**Figure 62:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).



**Figure 63:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2).



**Figure 64:** Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine).

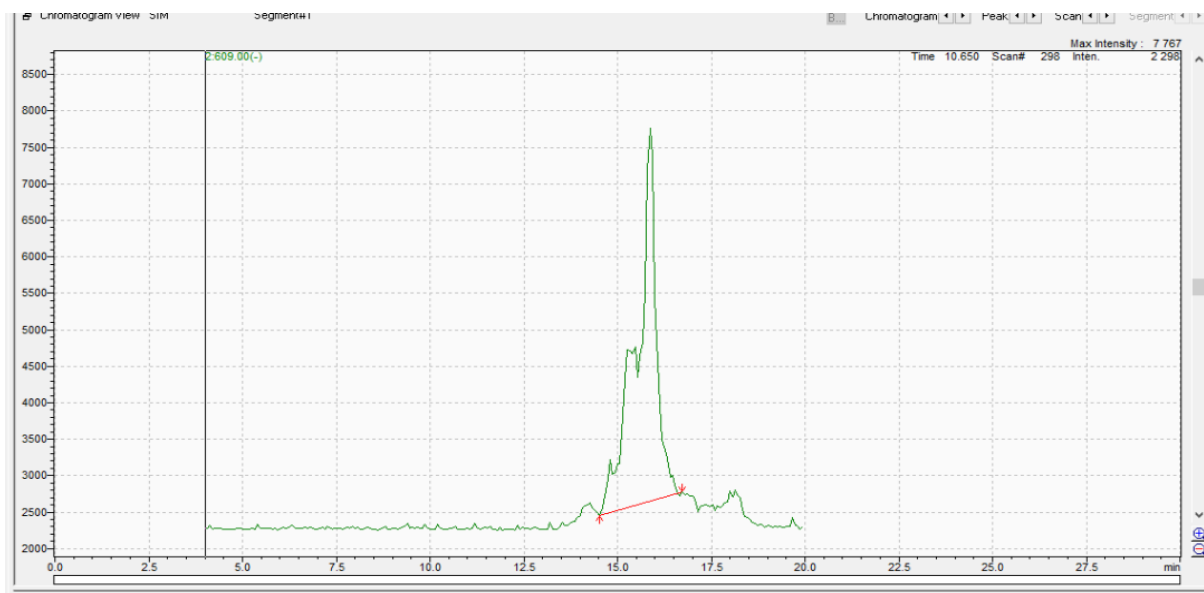


Figure 65: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).

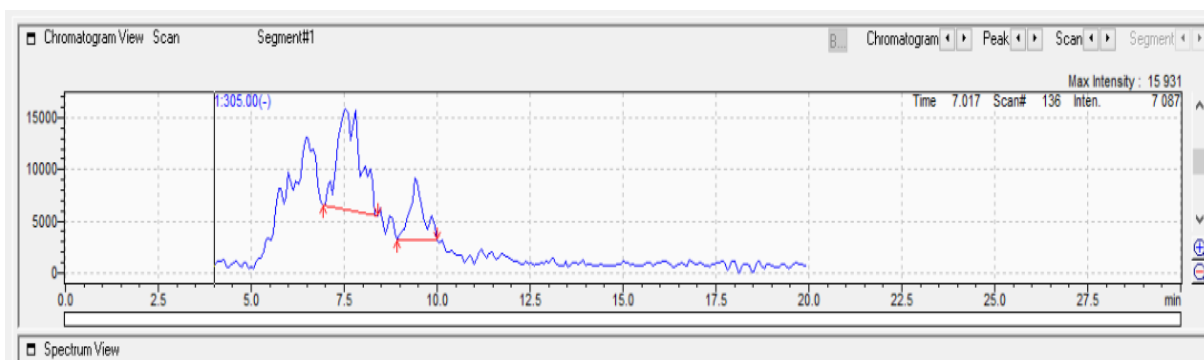


Figure 66: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigallocatechine (2).

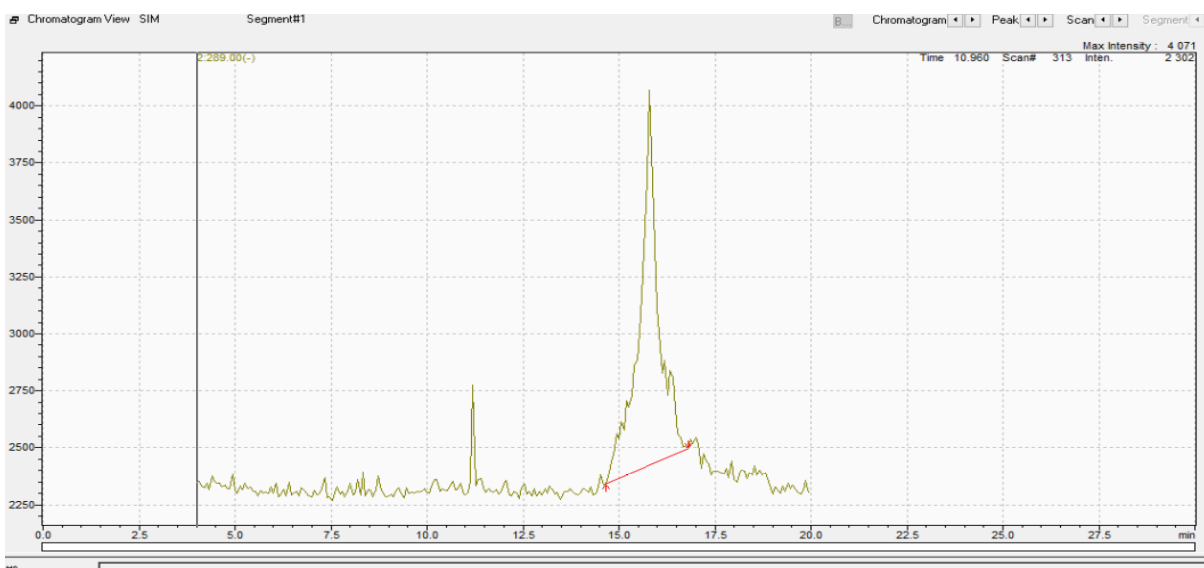


Figure 67: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Jandouba de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine).

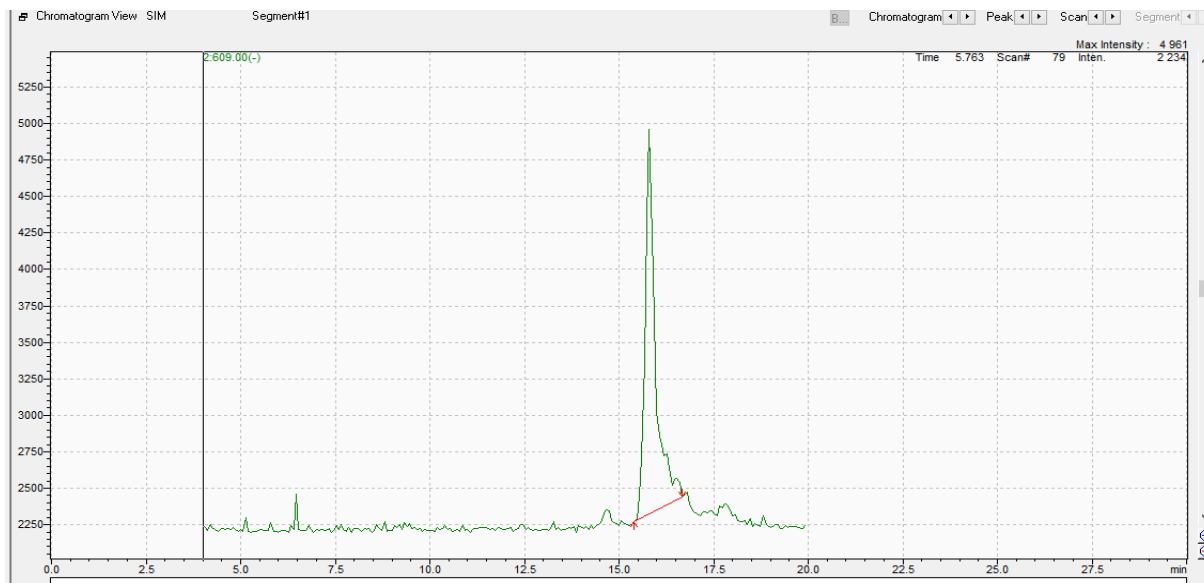


Figure 68: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).

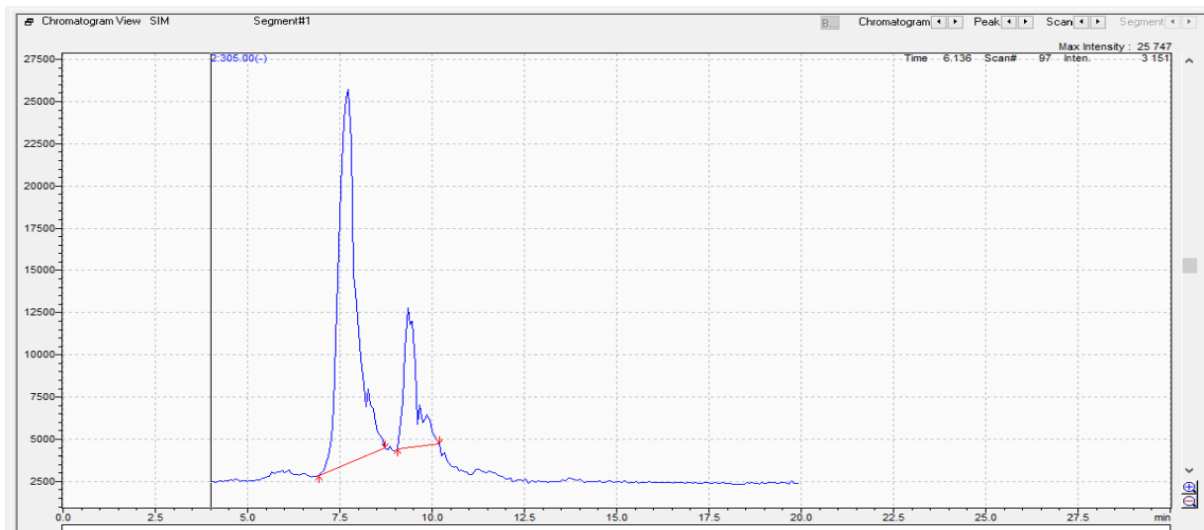


Figure 69: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigalocatéchine (2).

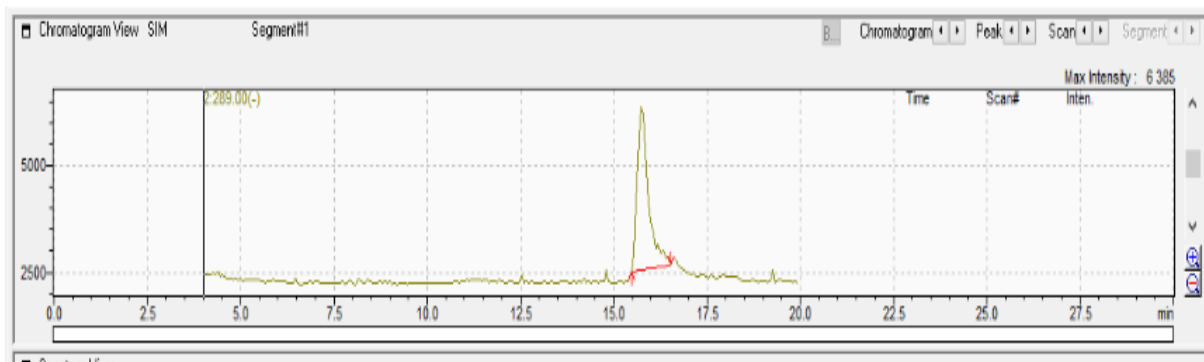


Figure 70: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds femelles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatéchine).

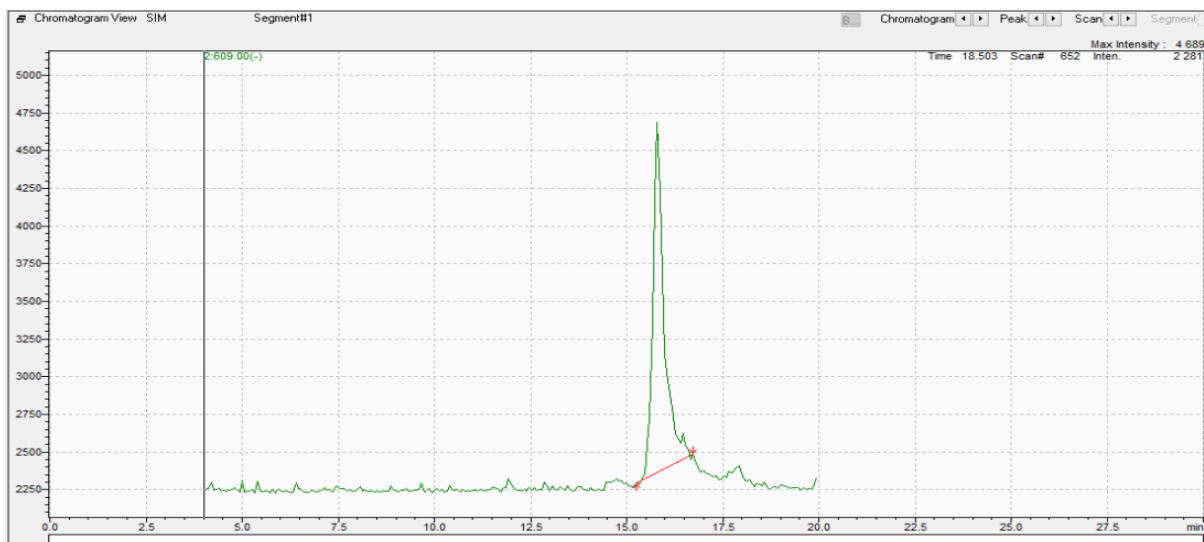


Figure 71: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 289 (rutine).

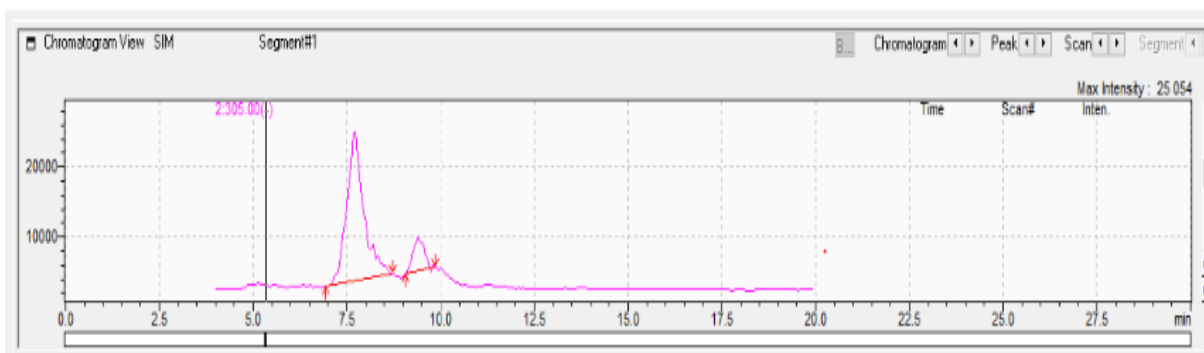


Figure 72: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcoolique des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 309 gallocatéchine (1) et épigallocatéchine (2).

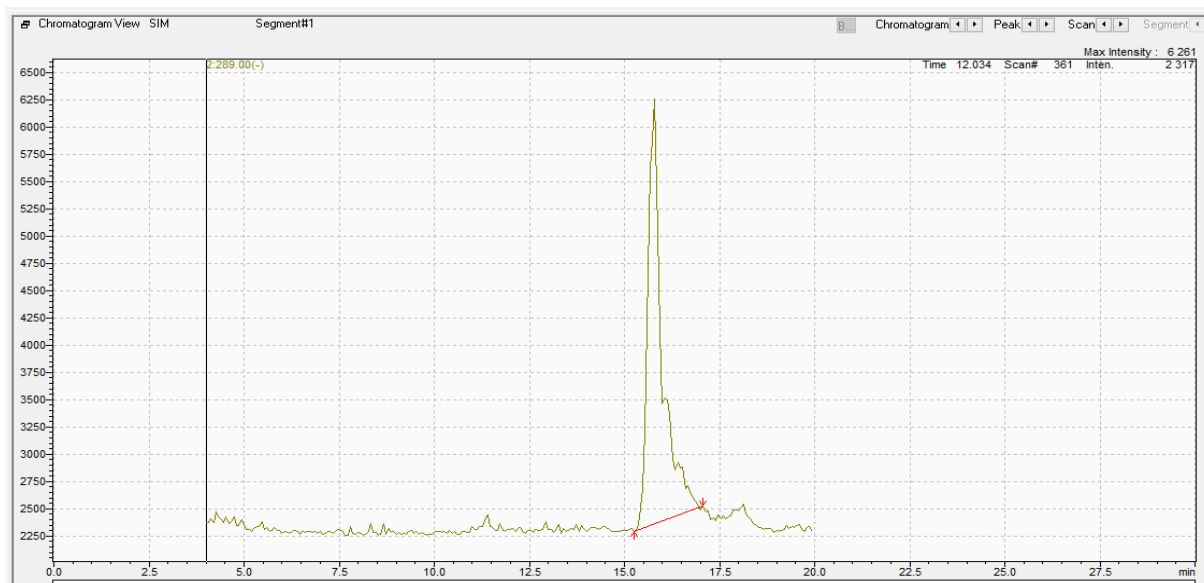


Figure 73: Analyses LC-PDA-ESI / MS de l'extrait hydroalcooliques des feuilles des pieds mâles provenant de Nabeul de *Mercurialis annua* L., chromatogrammes d'ions extraits de m / z 609 (épicatechine).