

N° Ordre...../Faculté/UMBB/2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA- BOUMERDES



Faculté des Sciences

## Thèse de Doctorat

Présenté par

**M<sup>me</sup> TOUBAL Souheyla**

Filière : Biologie

Option : Ecologie des Systèmes Vectoriels

---

### **Caractérisation de la relation chémotypes de l'Ortie- bactéries vectorisées associées et évaluation de leurs activité sur *Culex sp.***

---

Devant le jury :

M <sup>me</sup> SAHIR-HALOUANE	Fatma	Prof	UMBB	Présidente
M <sup>me</sup> NATECHE-METIAZ	Farida	Prof	USTHB	Examinatrice
M <sup>me</sup> GANA-KEBBOUCHE	Salima	Prof	UMBB	Examinatrice
M <sup>me</sup> OULEBSIR-MOHAND KACI	Hakima	MCA	UMBB	Examinatrice
M <sup>me</sup> AIT SLIMANE-AIT KAKI	Sabrina	MCA	UMBB	Examinatrice
M <sup>r</sup> ARAB	Karim	Prof	UMBB	Directeur de thèse

**Année universitaire : 2017/2018**

## Résumé

Le présent travail s'articule autour de deux axes, l'un porte sur la mise en évidence d'une éventuelle corrélation entre les différentes bactéries endophytes associées à la Grande ortie et la synthèse des métabolites secondaire, et l'autre sur l'évaluation de l'activité insecticide des extraits de la plante récoltée à Dellys (UDD) et à Tlemcen (UDT) contre les larves de moustique *C. pipiens* L. Diverses bactéries endophytes ont été isolées à partir des tiges, des feuilles et des racines de la Grande ortie en adoptant la méthode décrite par Arnold (1999), Rubini *et al.* (2005), et El Deeb *et al.* (2013). L'identification des bactéries endophytes a été effectuée par des examens macroscopiques, microscopiques, biochimiques et confirmée par MALDI-TOF MS. Il s'agit de *Bacillus pumilus-ME*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Staphylococcus cohnii* et *Enterococcus faecium*. Par ailleurs, les tests du screening phytochimique ont fait ressortir une répartition hétérogène des métabolites secondaires dans les différentes parties de la même plante (tiges, feuilles et racines). L'analyse de l'association bactérie- plante a révélé une relation entre la présence de certains endophytes et les métabolites secondaires synthétisés par la plante. En effet, la synthèse des leuco-anthocyanes, saponosides, alcaloïdes, coumarines, glucosides, mucilages, anthocyanes, tanins, tanins catéchiques, sénosides, et flavonoïdes est induite par les bactéries du genre *Bacillus*. Celle des quinones libres est provoquée par la présence de bactéries du genre *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* et *Pantoea*. Pour les deux régions, une meilleure activité larvicide effectués sur les larves L2 et L4 de *C. pipiens* L. a été obtenu pour l'extrait d'UDT ( $DL_{50UDD} = 8,05$  mg/ml,  $DL_{50UDT} = 6,16$  mg/ml après 24h de contact). Par ailleurs, les alcaloïdes d'UDD ont montrés une activité insecticide modérée sur les larves L4 ( $DL_{50 \text{ alcaloïdes}} = 6,91$  mg/ml après 48h de contact). En revanche, pour les flavonoïdes d'UDT, la meilleure activité insecticide est attribuée à EAE ( $DL_{50 \text{ EAE}} = 0,31$  mg/ml), suivi de EED ( $DL_{50EED} = 0,61$  mg/ml), puis EB ( $DL_{50 \text{ EB}} = 1,84$  mg/ml) et enfin à la fraction EA ( $DL_{50 \text{ EA}} = 8,89$  mg/ml) ( $p < 0,05$ ). En conclusion, la présente étude suggère que la Grande ortie peut être une source puissante de métabolites secondaires, une niche de plusieurs bactérie endophytes et présente une bonne alternative de lutte biologique, économique et moins nocif sur l'environnement.

**Mots clés :** alcaloïdes, insecticide, flavonoïdes, *Culex pipiens* L., endophytes, Dellys, Tlemcen, *Urtica dioica* L., MALDI-TOF MS.

## Abstract

The present study focuses on two axes, the first one is based on the demonstration of a possible correlation between the different endophytic bacteria associated with the Great Nettle and the synthesis of secondary metabolites. The other is based on the evaluation of the insecticidal activity of extracts from the Dellys (UDD) and Tlemcen (UDT) plant against mosquito larvae *C. pipiens* L. Various endophytic bacteria were isolated from the stems, leaves and roots of Great nettle by adopting the method described by Arnold (1999), Rubini *et al.* (2005), and El Deeb *et al.* (2013). Identification of endophytic bacteria was performed by macroscopic, microscopic, biochemical examinations and confirmed by MALDI-TOF MS. These are *Bacillus pumilus*-ME, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Staphylococcus cohnii* and *Enterococcus faecium*. In addition, phytochemical screening tests revealed a heterogeneous distribution of secondary metabolites in different parts of the same plant (stems, leaves and roots). The analysis of the bacterium-plant association revealed a relationship between the presence of certain endophytes and the secondary metabolites synthesized by the plant. Indeed, the synthesis of leuco-anthocyanins, saponosides, alkaloids, coumarins, glucosides, mucilages, anthocyanins, tannins, catechin tannins, senosides, and flavonoids is induced by bacteria of the genus *Bacillus*. That of free quinones is caused by the presence of bacteria of the genus *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* and *Pantoea*. For both regions, a better larvicidal activity on L2 and L4 larvae of *C. pipiens* L. was obtained for the UDT extract ( $LD_{50UDD} = 8.05$  mg/ml,  $LD_{50UDT} = 6.16$  mg/ml after 24 hours of contact). On the other hand, alkaloids extracted from UDD showed moderate insecticidal activity on L4 larvae ( $LD_{50\text{ alkaloids}} = 6.91$  mg/ml after 48h of contact). In contrast, for flavonoids of UDT, the best insecticidal activity is attributed to EAE ( $LD_{50\text{ EAE}} = 0.31$  mg/ml), followed by DEE ( $LD_{50\text{ DEE}} = 0.61$  mg/ml), then BE ( $LD_{50\text{ BE}} = 1.84$  mg/ml) and finally the AE fraction ( $LD_{50\text{ AE}} = 8.89$  mg/ml) ( $p < 0.05$ ). In conclusion, the present study suggests that Great Nettle can be a powerful source of secondary metabolites, a niche of several endophytic bacteria and presents a good alternative for biological control, economic and less harmful to the environment.

**Key words:** alkaloids, insecticide, flavonoids, *Culex pipiens* L., endophytes, Dellys, Tlemcen, *Urtica dioica* L., MALDI-TOF MS.

# *\*Remerciements\**

*Je remercie en premier lieu Dieu le Tout Puissant de m'avoir doté du courage, de la force et des capacités nécessaires pour pouvoir réaliser cet ouvrage.*

*En premier lieu, je voudrais dire combien je suis particulièrement reconnaissante à mon directeur de thèse Prof. Karim ARAB, de m'avoir accordé sa confiance en m'acceptant pour travailler sur ce sujet avec lui. Il a suivi mes travaux avec un grand intérêt tout en me prodiguant des conseils toujours justes. Et il a su me redonner courage et aider à traverser des moments difficiles et des instants de doute. Je tiens tout particulièrement à le remercier profondément pour son aide appréciable, sa gentillesse, sa grande disponibilité et sa compréhension.*

*Je remercie Mme SAHIR-HALOÛANE F. professeur à l'université de M'Hamed Bougara de Boumerdès en acceptant de présider ce travail malgré ses nombreuses occupations*

*Je tiens à remercier M<sup>me</sup> NATECHÉ-METIAZ F, M<sup>me</sup> KEBBOUCHE-GANA S, M<sup>me</sup> OULEBSIR-MOHAND KACIH et M<sup>me</sup> AIT SLIMANE-AIT KAKI S. qui ont bien voulu accepter de juger ce travail en tant qu'examinatrices de thèse.*

*Je souhaite adresser mes vifs remerciements à M<sup>me</sup> ARAB-BOUCHENAK O. maitre de conférence A à l'Université de Boumerdès qui a tant illuminé mon chemin vers la réussite. Merci d'être à mes côtés dans les moments les plus difficiles, les moments de doute et de faiblesse. Merci pour les moyens que vous avez mis à ma disposition. Je vous remercie pour votre confiance, gentillesse, votre aide permanent malgré votre agenda très chargé.*

*Mes remerciements vont également à M<sup>me</sup> AICHAOUI-YAHIAOUI K, maitre de conférence A à l'Université de Boumerdès pour son aide dans l'étude statistiques ainsi que de m'avoir familiarisé à l'utilisation de certains logiciels. Merci madame pour vos dévouements, disponibilité et gentillesse ainsi que pour les propositions et discussions très enrichissantes et qui tombent toujours dans le bon sens.*

*Je souhaite adresser mes gratitude à Dr Idir BITAM pour son aide dans l'identification des bactéries endophytes par MALDI TOF/MS.*

*Je remercie également PhD NEBBAK A. de l'Unité des Rickettsies, URMITE UMR 63, Faculté de Médecine de la Timone, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille2. je te souhaite un excellent parcours dans tes recherches Amira.*

*Mes vifs remerciements vont aussi à Dr. CHENAFI de l'hôpital de Tizi Ouzou, à M<sup>r</sup> Merdas N. agent technique à la bibliothèque de l'université de Boumerdès, à M<sup>r</sup> BOURNISSA H. ingénieur de laboratoire à la faculté des sciences de l'Ingénieur et M<sup>r</sup> Idernemouche S.*

*A tous (es) les laborantins de la Faculté des Sciences UMBB, ayant participé à la réalisation de notre projet : Nesrine, Khalida et Lila.*

*Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de notre travail.*

*Souheyla TOUBAL*

# *\*Dédicaces\**

*Je dédie ce travail ;*

*À mes chers parents*

*Il me tient énormément à cœur de vous dire Merci bien que ce simple mot n'égalera jamais tout ce que vous avez fait pour moi.*

*Je le dédit également ;*

*À mon mari Djillali, merci d'être à mes côtés dans les moments les plus difficiles et merci pour votre patience ;*

*À ma fille Danya ;*

*À mes frères et sœurs ;*

*À mes nièces et neveux ;*

*À ma belle-famille ;*

*À mes belles-sœurs et beaux-frères ;*

*À mes amis (es)*

**APG** : Angiosperm Phlogeny Group

**AlCl<sub>3</sub>** : trichlorure d'aluminium

**cm** : centimètre

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**D** : dose

**Da** : dalton

**DL<sub>50</sub>** : dose létale 50

**EA** : extrait aqueux

**EAE** : extrait d'acétate d'éthyle

**EB** : extrait butanolique

**EED** : extrait d'éther diéthylique

**ESM** : erreur standard à la moyenne

**FD** : Feuilles Dellys

**Fig** : figure

**FT** : Feuilles Tlemcen

**g** : gramme

**GN** : gélose nutritive

**h** : heure

**H<sub>2</sub>O** : eau

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : peroxyde d'hydrogène

**H<sub>2</sub>S** : sulfure d'hydrogène

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : acide sulfurique

**HCl** : acide chlorhydrique

**HPTLC RP18** : chromatographie sur couche mince à haute performance sur phase inverse

**IR** : infrarouge

**L2** : larves du 2<sup>ème</sup> stade

**L4** : larves du 4<sup>ème</sup> stade

**LSV** : valeur de score logarithmique

**m** : mètre

**mm** : millimètre

**MALDI-TOF MS** : Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation- Time- Of- Flight Mass Spectrometry

**MeOH** : méthanol

**mg EQ/g** : milligramme d'équivalent de quercétine par gramme

**min** : minutes

**NaOH** : hydroxyde de sodium

**nm** : nanomètre

**ONPG** : Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside

**RD** : Racines Dellys

**Rf** : rapport frontale

**RT** : Racines Tlemcen

**sec** : seconde

**Tab** : tableau

**TD** : Tiges Dellys

**TDA** : tryptophane désaminase

**TFA** : acide trifluoroacetic

**TL<sub>50</sub>** : temps léthal 50

**TT** : Tiges Tlemcen

**UDD** : *Urtica dioica* L. récoltée à Dellys

**UDT** : *Urtica dioica* L. récoltée à Tlemcen

**v** : volume

**VP** : Vosge Proskauer

**$\lambda$**  : longueur d'onde

<b>Figure 01.</b> Les différentes parties d' <i>U. dioica</i> L.....	05
<b>Figure 02.</b> Principaux représentants du genre <i>Urtica</i> .....	06
<b>Figure 03.</b> Origine biosynthétique des métabolites secondaires.....	09
<b>Figure 04.</b> Biosynthèse des composés phénoliques.....	11
<b>Figure 05.</b> Quelques phénols et acides phénoliques.....	13
<b>Figure 06.</b> Quelques exemples de coumarines.....	13
<b>Figure 07.</b> Structure de base des flavonoïdes.....	14
<b>Figure 08.</b> Structure chimique de quelques flavonoïdes.....	14
<b>Figure 09.</b> Structure chimique d'un noyau flavylum (2-phénylbenzopyroxonium)...	15
<b>Figure 10.</b> Structure chimique des tanins et éllagiques.....	16
<b>Figure 11.</b> Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes.....	17
<b>Figure 12.</b> Quelques dérivés tropaniques.....	17
<b>Figure 13.</b> La nicotine et son dérivé l'arécoline.....	18
<b>Figure 14.</b> Quelques alcaloïdes dérivés de la phénylalanine et de la tyrosine.....	18
<b>Figure 15.</b> Structure chimique de la vinblastine et la vincristine.....	19
<b>Figure 16.</b> Les modes de transmission des endophytes.....	22
<b>Figure 17.</b> Les principaux arthropodes vecteurs de maladies existant au Maghreb....	25
<b>Figure 18.</b> Cycle de vie des <i>Culicidae</i> .....	26
<b>Figure 19.</b> Larves de <i>Culex</i> .....	27
<b>Figure 20.</b> Œufs en nacelle de <i>Culex pipiens</i> L. ....	28
<b>Figure 21.</b> Morphologie générale d'une larve de IV ème stade de <i>Culicinae</i> ( <i>Culex</i> ).	29
<b>Figure 22.</b> Aspect général d'une nymphe de <i>Culex pipiens</i> .....	29
<b>Figure 23.</b> Représentation générale d'un Culicidés adulte.....	30
<b>Figure 24.</b> Répartition géographique de <i>C. pipiens</i> L. en Algérie.....	31
<b>Figure 25.</b> Carte géographique de et Dellys.....	35
<b>Figure 26.</b> Carte géographique de Tlemcen.....	36
<b>Figure 27.</b> Larves et adultes de moustiques.....	37
<b>Figure 28.</b> Schéma récapitulatif de différentes étapes de travail.....	39
<b>Figure 29.</b> Les différentes étapes de l'isolement des bactéries endophytes.....	41
<b>Figure 30.</b> Protocole d'extraction des flavonoïdes.....	51

<b>Figure 31.</b> Dosage des différentes fractions flavonoïdiques.....	52
<b>Figure 32.</b> Aspect microscopique des bactéries endophytes associées à la Grande ortie après coloration de Gram.....	59
<b>Figure 33.</b> Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Bacillaceae associés à la Grande ortie.....	62
<b>Figure 34 :</b> Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Enterobacteriaceae associés à la Grande ortie.....	63
<b>Figure 35.</b> Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Staphylococcaceae associés à la Grande ortie.....	63
<b>Figure 36.</b> Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Enterococcaceae associés à la Grande ortie.....	64
<b>Figure 37.</b> Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Paenibacillaceae associés à la Grande ortie.....	64
<b>Figure 38.</b> Abondance relative des bactéries endophytes à la Grande ortie dans les deux régions d'études (Tlemcen et Dellys) .....	65
<b>Figure 39.</b> Concentration des fractions flavonoïques des feuilles de la Grande ortie récoltée à Tlemcen.....	71
<b>Figure 40.</b> Spectre d'analyse par infra-rouge des alcaloïdes extraits des feuilles de la Grande ortie.....	72
<b>Figure 41.</b> Spectre d'analyse par infra-rouge des extraits flavonoïques extraits des feuilles de la Grande ortie.....	73
<b>Figure 42.</b> Chromatogramme d'identification des alcaloïdes des feuilles de la Grande ortie par HPTLC-RP 18 à 200nm.....	75
<b>Figure 43.</b> Chromatogrammes des quatre extraits des feuilles de la Grande ortie obtenus par HPTLC-RP18 à 200nm.....	76
<b>Figure 44.</b> Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents les tiges d'UDD et UDT.....	79
<b>Figure 45.</b> Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents les feuilles d'UDD et UDT.....	79
<b>Figure 46.</b> Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents les racines d'UDD et UDT.....	80
<b>Figure 47.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques <i>C. pipiens</i> traités par l'extrait aqueux d' <i>U. dioica</i> L. (UDD) en fonction de temps.....	82

<b>Figure 48.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques <i>C. pipiens</i> traités par l'extrait aqueux d' <i>U. dioica</i> L. (UDT) en fonction de temps.....	83
<b>Figure 49.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques <i>C. pipiens</i> traités par l'extrait aqueux d' <i>U. dioica</i> L. (UDD) en fonction de temps.....	83
<b>Figure 50.</b> Cinétique de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques <i>C. pipiens</i> traités par l'extrait aqueux d' <i>U. dioica</i> L. (UDT) en fonction de temps.....	84
<b>Figure 51.</b> Morphologie observée des larves L4 de <i>C. pipiens</i> avant (a) et après traitement (b) par les extraits d' <i>U. dioica</i> L.....	85
<b>Figure 52.</b> Histogramme des pourcentages de mortalités en fonction des différentes doses issus du traitement par l'extrait aqueux d'UDD et UDT sur les larves L2 et L4 de <i>C. pipiens</i> après 24h.....	85
<b>Figure 53.</b> Droites de régression des probits en fonction du log des doses d'UDD et d'UDT au stade larvaire L2.....	86
<b>Figure 54.</b> Droites de régression des probits en fonction du log des doses d'UDD et d'UDT au stade larvaire L4.....	87
<b>Figure 55.</b> Droites de régressions des probits en fonction du log des temps des larves L2 de <i>C. pipiens</i> traitées par les extraits aqueux d'UDD et d'UDT.....	87
<b>Figure 56.</b> Droites de régressions des probits en fonction du log des temps des larves L4 de <i>C. pipiens</i> traitées par les extraits aqueux d'UDD et d'UDT.....	88
<b>Figure 57.</b> Taux de mortalité des larves L4 traitées par les alcaloïdes d'UDD.....	89
<b>Figure 58.</b> Droites de régressions des probits en fonction du log dose (b) et du log temps (a) des larves L4 traité par les alcaloïdes d'UUD.....	90
<b>Figure 59.</b> Cinétique de mortalité des larves L4 de <i>C. pipiens</i> en fonction des doses des quatre fractions flavonoïdiques après 24h de contacte.....	91
<b>Figure 60.</b> Droites de régression : probits en fonction log dose des larves L4 de <i>C. pipiens</i> traitées par les quatre extraits flavonoidiques d'UDT.....	92
<b>Figure 61.</b> Droites de régression : probits en fonction log temps des larves L4 de <i>C. pipiens</i> traitées par les quatre extraits flavonoidiques d'UDT.....	93

<b>Tableau 01.</b> Activités insecticides des métabolites secondaires.....	20
<b>Tableau 02.</b> Répartition des différents moustiques en Algérie.....	31
<b>Tableau 03.</b> Taille des différents stades larvaires.....	37
<b>Tableau 04.</b> Codage des bactéries endophytes.....	42
<b>Tableau 05.</b> Les différents tests du screening phytochimique et leurs résultats attendus.....	47
<b>Tableau 06.</b> Aspect macroscopique et microscopique des bactéries isolées.....	58
<b>Tableau 07.</b> Etude biochimique des bactéries isolées.....	60
<b>Tableau 08.</b> Identification des bactéries endophytes d' <i>U. dioica</i> L. par MALDI-TOF MS.....	61
<b>Tableau 09.</b> Test phytochimique des feuilles, tiges et racine d'UDD et d'UDT.....	67
<b>Tableau 10.</b> Rendement en extrait aqueux, alcaloïdes et flavonoïdes.....	70
<b>Tableau 11.</b> Longueurs d'ondes et groupements chimiques correspondants.....	72
<b>Tableau 12.</b> Groupements fonctionnels des extraits flavonoïdiques extraits des feuilles de la Grande ortie.....	74
<b>Tableau 13.</b> Paramètres d'identification chromatographique des alcaloïdes par HPTLC-RP18.....	75
<b>Tableau 14.</b> Paramètres d'identification chromatographique par HPTLC-RP18 des fractions flavonoidiques.....	77
<b>Tableau 15.</b> Paramètre toxicologiques des extraits flavonoïdiques d' <i>Urtica dioïca</i> L. sur les larves L4 de <i>C. pipiens</i> (Diptera: Culicidae).....	94

- Introduction.....	01
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I.1. Présentation de la plante.....</b>	<b>04</b>
I.1.1. Position systématique.....	04
I.1.2. Dénomination de la Grande ortie.....	04
I.1.3. Description botanique.....	04
I.1.4. Différentes espèces de la Grande ortie.....	05
I.1.5. Biotope et distribution géographique.....	06
I.1.6. Composition chimique.....	06
I.1.7. Usages.....	07
I.1.7.1. En agriculture.....	07
I.1.7.2. En alimentaire.....	07
I.1.7.3. En industrie.....	07
I.1.7.4. En médecine.....	08
<b>I.2. Les métabolites secondaires des végétaux.....</b>	<b>08</b>
I.2.1. Nature, distribution et rôle écologique.....	08
I.2.2. Classification des métabolites secondaires.....	10
I.2.2.1. Les composés phénoliques.....	10
I.2.2.2. Les alcaloïdes.....	16
I.2.2.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes.....	19
I.2.3. Importance économique et pharmaceutique.....	19
I.2.4. Effet insecticide des métabolites secondaires.....	20
<b>I.3. Les bactéries endophytes.....</b>	<b>21</b>
I.3.1. Distribution et localisation.....	21
I.3.2. Interactions entre plantes et endophytes.....	23
I.3.3. Avantages et utilisations.....	23
I.3.3.1. Promotion de la croissance des plantes.....	23
I.3.3.2. Protection contre les pathogènes.....	24
I.3.3.3. Lutte biologique.....	24
I.3.3.4. Biofertilisation du sol.....	24

<b>I.4. Les maladies vectorielles.....</b>	<b>24</b>
I.4.1. Aperçu générale sur les moustiques.....	25
I.4.2. Biologie de <i>Culex pipiens</i> (Linné, 1758).....	25
I.4.2.1. Position systématique.....	25
I.4.2.2. Cycle de vie.....	26
I.4.2.3. Morphologie générale.....	28
I.4.2.3.1. Œufs.....	28
I.4.2.3.2. Larve.....	28
I.4.2.3.3. Nymphe.....	29
I.4.2.3.4. Adulte (Imago).....	30
I.4.3. Répartition géographique des <i>Culicidae</i> .....	30
I.4.3.1. Dans le monde.....	30
I.4.3.2. En Algérie.....	31
I.4.4. Intérêts des moustiques dans l'écosystème.....	32
I.4.5. Moyens de lutte.....	32
I.4.5.1. Lutte écologique.....	33
I.4.5.2. Lutte génétique.....	33
I.4.5.3. Lutte chimique.....	33
I.4.5.4. Lutte biologique.....	33

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

<b>II.1. Matériel.....</b>	<b>35</b>
II.1.1. Matériel biologique.....	35
II.1.1.1. La Grande ortie ( <i>U. dioica</i> L.).....	35
II.1.1.2. Les moustiques ( <i>C. pipiens</i> L.).....	37
II.1.2 Matériel non biologique.....	38
<b>II.2. Méthodes.....</b>	<b>38</b>
II.2.1. Récolte, séchage, broyage et conservation de la plante.....	39
II.2.2. Isolement des bactéries endophytes de la Grande ortie.....	40
II.2.3. Identification des souches bactériennes.....	42
II.2.3.1. Etude de l'aspect morphologique.....	43

II.2.3.2. Aspect microscopique.....	43
II.2.3.3. Analyses biochimiques.....	43
II.2.3.4. Identification bactérienne par spectroscopie de masse MALDI-TOF MS.....	45
II.2.4. Screening phytochimique.....	46
II.2.5. Mise en évidence de la corrélation.....	48
II.2.6. Préparation des extraits végétaux.....	48
II.2.6.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	48
II.2.6.2. Extraction des alcaloïdes.....	48
II.2.6.3. Extraction des flavonoïdes.....	49
II.2.6.4. Dosage par spectrophotométrie UV-visible.....	52
II.2.7. Caractérisation spectrale et chromatographique des extraits.....	53
II.2.7.1. Analyse par spectrométrie infrarouge des flavonoïdes et des alcaloïdes.....	53
II.2.7.2. Caractérisation chromatographique des flavonoïdes et des alcaloïdes par HPTLC- RP 18.....	53
II.2.8. Evaluation de l'effet insecticide.....	54
II.2.8.1. Activité larvicide de l'extrait aqueux.....	54
II.2.8.2. Activité larvicide des alcaloïdes.....	54
II.2.8.3. Activité larvicide des flavonoïdes.....	54
II.2.8.4. Expression des résultats.....	56

### **Chapitre III : Résultats et discussion**

<b>III.1. Identification des bactéries endophytes.....</b>	<b>57</b>
III.1.1. Identification macroscopique, microscopique et biochimique.....	57
III.1.2. Identification par spectroscopie de masse (MALDI-TOF MS).....	61
<b>III.2. Caractérisation phytochimique de la Grande ortie.....</b>	<b>67</b>
III.2.1. Screening phytochimique.....	67
III.2.2. Rendement en métabolites secondaires.....	69
III.2.3. Dosage des flavonoïdes.....	71
III.2.4. Analyse par infrarouge des différents extraits.....	72
III.2.5. Caractérisation des extraits par HPTLC-RP18.....	75

<b>III.3. Mise en évidence d'une éventuelle corrélation endophytes-métabolites.....</b>	<b>78</b>
<b>III.4. Résultats du test insecticide.....</b>	<b>82</b>
III.4.1. Effet de l'extrait aqueux.....	82
III.4.2. Effet des alcaloïdes.....	89
III.4.3. Effet des flavonoïdes.....	90
- <b>Conclusion.....</b>	<b>96</b>
- <b>Références bibliographiques.....</b>	<b>98</b>

Dans la région du Maghreb, plusieurs maladies vectorielles sont présentes et importantes sur le plan de la santé publique (**Amraoui, 2012**). En terme d'importance épidémiologie mondiale pour l'homme, les moustiques sont considérés comme le premier groupe de vecteurs, le second groupe étant celui des acariens suivi par les tiques et enfin les puces (**Lecointre, 2001**).

Les moustiques ont toujours été considérés comme source de nuisance en Algérie, principalement en raison de la transmission d'agents pathogène à l'homme. *Culex pipiens* L. est l'espèce de moustique qui présente le plus d'intérêt en Algérie en raison de sa large répartition géographique, de son abondance et de sa nuisance réelle, surtout dans les zones urbaines (**Bendali et al., 2006**). Le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane), un insecticide chimique de première génération appartenant à la famille des organochlorés, a rendu de nombreux services en réduisant, voire même en éradiquant, le paludisme dans certains pays. Par la suite, les avancées de l'industrie chimique ont permis le développement d'une deuxième génération d'insecticides, représentée par trois grandes familles : les organophosphorés (téméphos, malathion), les carbamates (carbaryl, propoxur) et les pyréthrinoïdes de synthèse (perméthrine, deltaméthrine). La lutte anti-moustique par des insecticides est très efficace sur les moustiques culicidés, mais présente plusieurs inconvénients. En effet, ils peuvent être, en plus d'un effet néfaste sur la vie aquatique, à l'origine de divers problèmes environnementaux (**Aouinty et al., 2006**) notamment le phénomène de la résistance des insectes aux insecticides (**Kioulos et al., 2013 ; El Ouali Lalami et al., 2014**). Selon le comité d'experts des insecticides OMS (1970), chez les *Culicidae* : 19 espèces sont devenues résistantes dont 16 au DDT, 12 à la dièldrine et 9 aux composés organophosphorés (y compris *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*). Ainsi, pour contribuer à une gestion durable de l'environnement, la mise en place de nouvelles alternatives de lutte contre les moustiques est davantage encouragée. Elle prend diverses formes, mais celles qui attirent l'attention des chercheurs est la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles d'origines végétales comme insecticides (**Ghosh et al., 2012**). Les substances naturelles qui présentent un large spectre d'action en pharmacologie comme anti-malaria, bactéries, fongicides, acaricides, etc., peuvent être aussi utilisées comme insecticides de remplacement (**Diakite, 2008**).

Les plantes produisent plus de 200 000 métabolites secondaires regroupés en trois grandes classes : les alcaloïdes, les molécules phénoliques et les terpénoïdes (**Wink, 2003 ; Aharoni et Galili 2011**). Cependant, leurs production est souvent dépendante de nombreux facteurs.

Les tissus internes des plantes peuvent être colonisés par divers communautés de microorganisme dites bactéries endophytes (**Robert et al., 2008**). Ces derniers peuvent jouer un rôle dans la stimulation de la croissance des plantes (**Molina-Favero et al., 2008 ; Walker, 2013**) et dans la protection des plantes contre les agression des agents phytopathogène par l'élaboration des substance antimicrobiennes et antifongiques (**Weyens et al., 2009 ; Compant et al., 2010; Dudeja et al., 2012**).

Appartenant à la famille des Urticaceae, *Urtica dioica* L. constitue la plante modèle qui va être utilisée tout au long de nos travaux. C'est une plante très riche en métabolites secondaires et dotée de plusieurs vertus thérapeutiques (**Draghi, 2005 ; Delahaye, 2015**). Cependant, aucun travail n'a été fait dans ce sens. En Algérie, à l'exception des travaux menés par **Kemassi (2015)**, les études menées sur l'activité insecticide par l'utilisation des extraits aqueux, les alcaloïdes ou les flavonoïdes vis-à-vis des larves de moustique *C. pipiens* L. sont très limitées ou inexistant. Les autres travaux se sont focalisés particulièrement sur l'étude de la systématique, la morphométrie, la biochimie et la lutte chimique (**Tine, 2009**).

C'est justement, et afin de valoriser l'usage des extraits de la Grande ortie en lutte antimoustique que s'inscrit notre étude. Cette recherche rentre dans le cadre d'un projet de l'équipe de recherche travaillant sur les plantes médicinale au sein du laboratoire de recherche « Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques » de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes. Ainsi, cette étude est orientée vers plusieurs objectifs :

- Isolement et d'identification par des tests macroscopique, microscopique, biochimiques et par MALDI- TOF MS des différentes bactéries endophytes associées à la Grande ortie récoltée dans deux régions de l'Algérie (Dellys et Tlemcen) ;
- Révélation de la présence des métabolites secondaires via les différents tests du screening phytochimique effectués sur les tiges, les feuilles et les racines de la Grande ortie récoltée dans les deux régions (Dellys et Tlemcen) ;
- La mise en évidence d'une éventuelle corrélation entre la présence des bactéries endophytes et la synthèse des métabolites secondaires afin de pouvoir par la suite produire en masse le métabolite concerné ;
- Extraction et caractérisation spectrale (IR) et chromatographiques (HPTLC- RP 18) des extraits ;

- Evaluation de l'effet de l'extrait aqueux, des alcaloïdes et des flavonoïdes sur les larves L2 et L4 de *Culex pipiens* L.

Ce travail se matérialise en trois chapitres. Le premier renferme des données bibliographiques sur les modèles biologiques (*U. dioica* L. et *C. pipiens* L.), les métabolites secondaires des plantes (leurs classification, biosynthèse et rôles biologiques), les bactéries endophytes et les maladies vectorielles. Le deuxième est consacré à la présentation du matériel utilisé ainsi que la méthodologie suivie. Les résultats sont présentés, interprétés et discutés dans un troisième chapitre. Enfin, le travail se termine par une conclusion générale et des perspectives.

*CHAPITRE I*

*SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*

## I.1. Présentation de la plante

### I.1.1. Position systématique

Selon l'Angiosperm Phylogeny Group **APGIII (2009)**, la position systématique de la Grande ortie est la suivante :

Règne :	Plantae
Sous règne	Tracheobionta (plantes vasculaires)
Embranchement :	Magnoliophyta (phanérogames).
Sous-embranchement :	Magnoliophytina (angiospermes)
Classe :	Rosidae (Magnoliopsida)
Sous-classe :	Rosidae dialycarpellées,
Ordre :	Rosales
Famille :	Urticaceae
Genre :	<i>Urtica</i>
Espèce :	<i>Urtica dioica</i> L.

---

### I.1.2. Dénomination de la Grande ortie

D'après **Beloued (1998)**, **Wichtl et Anton (1999)**, et **Ghedira et al. (2009)**, les noms vernaculaires d'*U. dioica* L. sont les suivants :

Arabe : Elhourayga

Kabyle : Azagtouf

Français : Ortie, Ortie commune, Grande ortie, Ortie dioïque, Ortie vivace

Anglais : Common nettle, Stinging nettle, Nettle leaf

Allemand : Brennessel blatter, Brennessel kraut

Italien : Ortica comune

Espagnol : Ortiga gran, Ortiga grossa, Ortiga major, Ortiga mayor.

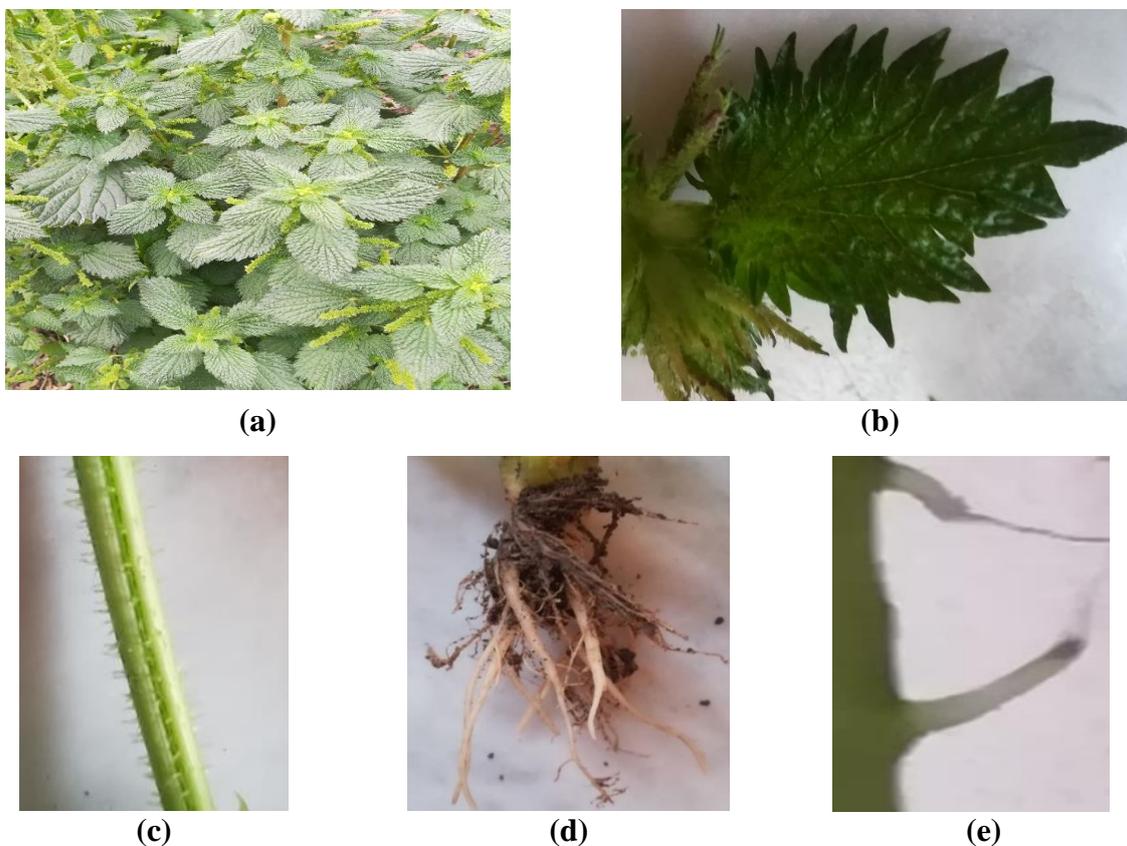
### I.1.3. Description botanique

La Grande ortie est une plante herbacée, vivace mesurant de 0,6 à 1,2 m de haut (**Draghi, 2005**). Les tiges robustes sont dressées (peuvent atteindre jusqu'à 1,5m de hauteur) et portent des feuilles opposées, ovoïdes et acuminées, recouvertes de poils urticants et hérissés. La face inférieure des feuilles présente des nervures très proéminentes. Le bord de la feuille est pourvu de dents aigues. Les poils urticants sont la principale caractéristique des Urticaceae.

Ils sont riches en substances urticantes (acétylcholine, sérotonine, histamine, acide formique, formiate de sodium et leucotriène) responsables de leur pouvoir urticant.

Les fleurs unisexuées, verdâtres, portées par des pieds différents, forment de longues grappes dressées et rameuses (Testai *et al.*, 2002 ; Kavalali *et al.*, 2003). La fleur dépourvue de pétales comprend quatre sépales, quatre étamines ou un pistil presque réduit à l'ovaire ovoïde et surmonté d'un stigmate en pinceau. Le fruit est un akène (Ghedira *et al.*, 2009).

Les racines de la Grande ortie sont des rhizomes-tiges souterraines-jaunâtres, traçants et abondamment ramifiés. Elles fixent l'azote de l'air grâce à l'action des micro-organismes *Rhizobium frankia* (Langlade, 2010 ; Delahaye, 2015) (Fig. 01).



**Figure 01.** Les différentes parties d'*U. dioica* L. (Originale, 2018)

(a) : plante entière, (b) : feuilles, (c) : tige recouverte de poils urticants, (d) : rhizomes frais et (e) : poils urticants de la Grande ortie

#### I.1.4. Différentes espèces de la Grande ortie

Dans le genre *Urtica*, il existe une cinquantaine d'espèces, dont une trentaine en régions tempérées, huit en Europe et cinq en France. Les principales espèces du genre *Urtica* sont *U. dioica* L., *U. urens* L., *U. pilulifera* L., *U. atrovirens* et *U. membranacea* (Draghi, 2005 ; Delahaye, 2015) (Fig. 02).



Petite ortie ou Ortie brûlante



Ortie romaine



Ortie de Dodart



Ortie à membranes

**Figure 02.** Principaux représentants du genre *Urtica* (Delahaye, 2015)

### I.1.5. Biotope et distribution géographique

La Grande ortie est d'origine eurasiatique, aujourd'hui présente dans le monde entier et dans toutes les régions montagneuses jusqu'à 2400m (Draghi, 2005). Elle affectionne les sols ayant subi des actions anthropiques. Elle est rencontrée près des habitations, jardins, ruines, décombres, haies, fossés ou encore à la lisière des bois. Elle pousse sur tous les terrains, argileux ou sablonneux, calcaires ou siliceux, mais toujours riches en azote (plante nitrophile) avec une certaine humidité (plante hydrophile) (Bertrand, 2002).

En Algérie, la Grande ortie est commune dans tout le Tel Algérien (exemples : Djurdjura, Atlas de Blida, Miliana, Boumerdès (foret de Bouarbi) (Beloued, 1998).

### I.1.6. Composition chimique

Les constituants chimiques de la Grande ortie sont d'un intérêt, car les extraits des racines et des feuilles sont largement utilisés en médecine traditionnelle dans de nombreuses régions du monde (Draghi, 2005).

D'après les résultats de l'analyse phytochimique effectuée par Manga Safanah *et al.* (2014), les feuilles d'*U. dioica* L. du Congo sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, polyphénols,

saponines, terpénoïdes et anthocyanes. D'autres études menées par **Guil-Guerrero et al. (2003)**, ont montrées une richesse des feuilles en acide aminé essentiel et en acide ascorbique. La richesse des feuilles de la Grande ortie en molécules bioactives a été également signalée par **Chaurasia et Wichtl (1987)** et **Bombardelli et Morazzoni (1997)**. D'après ces auteurs, l'espèce est très riche en protéines et renferme aussi des flavonoïdes (dérivés du quercétol, du kaempférol et de l'isorhamnétol), des sels minéraux (calcium, potassium, silice), des vitamines (A et C), et des acides phénols (acide caféique, acide cafényl-malique, acide chlorogénique).

Les poils renferment l'acide formique, l'histamine, l'acétylcholine, la sérotonine et les leucotriènes (**Kavalali, 2003**).

Les racines renferment des polysaccharides, une lectine, de nombreux composés phénoliques (acides phénols, scopolétol, aldéhydes et alcools phénylpropaniques et homovanillique) (**Kraus et Spiteller, 1990**), des lignanes (**Bombardelli et Morazzoni, 1997**), des stérols comme le sitostérol (**Chaurasia et Wichtl, 1987**), et des terpènes (**Kraus et Spiteller, 1991**).

### **I.1.7. Usages**

#### **I.1.7.1. En agriculture**

Parmi les dérivés agricoles de la Grande ortie, le purin est le plus utilisé par les agriculteurs. Son usage s'explique par les résultats obtenus, sa simplicité de fabrication et d'utilisation (**Draghi, 2005**). D'après cet auteur, le purin de la Grande ortie s'utilise soit comme fertilisant, soit en traitement préventif de certaines maladies ou invasions de parasites. Il sert de fongicide (contre le mildiou), d'insecticide (contre les pucerons et acariens) et d'activateur ou de régulateur de croissance des végétaux.

#### **I.1.7.2. En alimentaire**

La Grande ortie est également très utilisée à des fins alimentaires : facilement digestible avec un taux élevé en minéraux (spécialement en fer), vitamine C et provitamine A (**Allardice, 1993 ; Bnouham et al., 2003**).

#### **I.1.7.3. En industrie**

Les tiges de la Grande ortie sont intégrées en industrie pour la fabrication de tissu, teinture, colorants (grâce à leurs richesses en chlorophylles), et papier (**Draghi, 2005**).

#### I.1.7.4. En médecine

Les propriétés médicinales de la Grande ortie sont nombreuses et connues depuis l'antiquité (**Coupin, 1920**). La plupart des indications de cette médecine empirique sont aujourd'hui vérifiées et trouvent des explications scientifiques. En effet, elle est inscrite sur la liste des plantes médicinales retenues comme telles par la Pharmacopée Française. Les drogues utilisées sont les parties aériennes et les racines (**Draghi, 2005**).

Cette plante médicinale est reminéralisante, hémostatique, galactogène, et également utilisée en cas d'eczéma (**Chrubasik et al., 2007**). Elle est aussi considérée comme antihyperglycémique (**Bnouham et al., 2003**), anti-inflammatoire (**Gülcin et al., 2004**), antioxydante (**Gülcin et al., 2004 ; Kanter et al., 2005 ; Krishnaiah et al., 2011**), antimicrobienne (**Ramtin et al., 2012 ; Al-Khafaji, 2015**), antiulcéreuse, et analgésique (**Gülcin et al., 2004**), antivirale (**Balzarini et al., 1992 ; Uncini Manganeli et al., 2005**), cardiovasculaire (**Testai et al., 2002 ; Asgarpanah et Mohajerani, 2012**), diurétique (**Tahri et al., 2000**), anticancéreuse (**Nisha et al., 2011**), remède pour les troubles d'estomac (**Yelşilada et al., 2001 ; Duduku et al., 2011**), le traitement des douleurs rhumatismales, le froid, et les toux (**Sezik et al., 1997**), ainsi que pour les insuffisances hépatiques (**Yelşilada et al., 1993**).

## I.2. Les métabolites secondaires des végétaux

### I.2.1. Nature, distribution et rôle écologique

Les métabolites secondaires sont des substances qui dérivent de métabolites primaires (**Aharoni et Galili, 2011**), et qui ne participent pas directement au développement de la plante (**Kliebenstein et Osbourn, 2012**). Contrairement aux métabolites primaires, les produits du métabolisme secondaire ne sont pas indispensables à la survie de l'individu mais à la survie de la population végétale dans son ensemble au sein de son biotope (**Hartmann, 2007**).

On distingue généralement trois grandes classes des métabolites secondaires : les molécules phénoliques (qui dérivent de la voie des phénylpropanoïdes, issues de l'acide shikimique et de l'acide malonique), les alcaloïdes (qui dérivent des acides aminés), et les terpénoïdes (qui dérivent de l'isopentényl pyrophosphate, issu du méthylérythritol-4-phosphate ou de l'acide mévalonique) (**Wink, 2003 ; Aharoni et Galili, 2011 ; Nacoulma, 2013**) (**Fig. 03**)

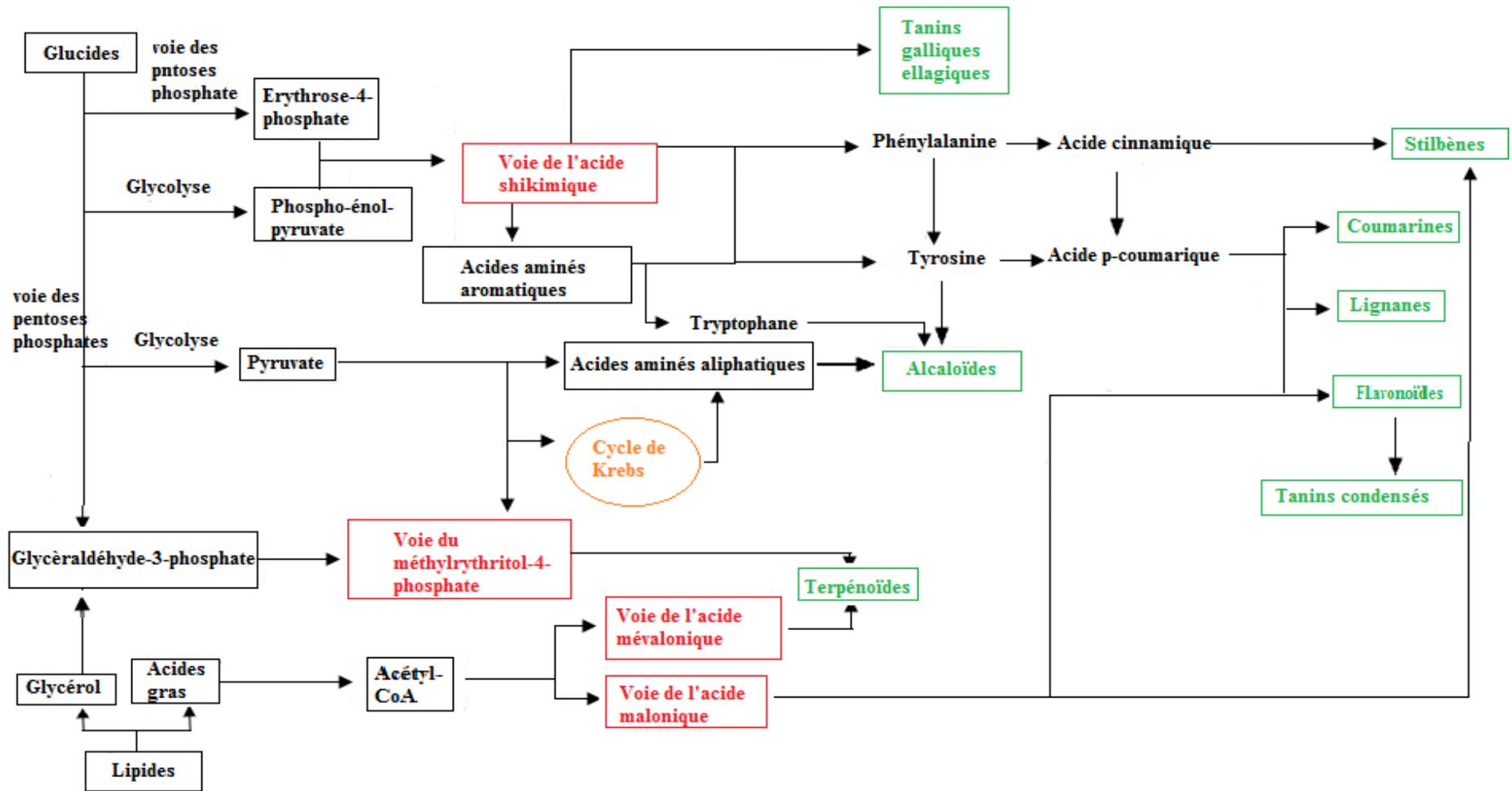


Figure 03. Origine biosynthétique des métabolites secondaires (Wink, 2003 ; Aharoni et Galili, 2011 ; Nacoulma, 2013)

Vert : les métabolites secondaires issus du métabolisme primaire (rouge)

Ils sont souvent synthétisés dans une partie de la plante et stockés dans une autre (**Raven et al., 2000**). A titre d'exemple, la localisation des composés phénoliques à l'échelle cellulaire est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans trois sites : au niveau de la paroi cellulaire, du noyau et de la membrane plasmique mais toujours à très faible concentration. A l'échelle tissulaire, on observe également des répartitions très inégales des différents composés phénoliques. Ainsi les anthocyanes et les pigments de type flavonols sont généralement présents dans les couches cellulaires externes des organes végétaux en particulier les épidermes de fruits et des feuilles (**Sarni et Cheynier, 2006**). Ils diffèrent selon les espèces, en raison de leur structure chimique parfois complexe, et selon le stade de développement de la même espèce. De façon générale, le rôle du métabolite secondaire est en lien avec sa localisation au sein de la plante (**Pathak et al., 1962 ; Zobel et Brown, 1990**). Ainsi, les furanocoumarines sont des substances antimicrobiennes (phytoalexines) jouant un rôle de défense contre les bactéries et les champignons (**Zobel et Brown, 1988**). Selon ces auteurs, on les retrouve accumulées en grande quantité à la surface des feuilles où elles peuvent constituer une sorte de première barrière chimique.

Par ailleurs, les métabolites secondaires participent à la régulation de la démographie des plantes, ou des populations d'animaux qui établissent des relations avec les plantes. Ils ont donc un rôle écologique, en attirant les insectes pollinisateurs, ou en repoussant les insectes ravageurs et les organismes pathogènes. Beaucoup de métabolites se comportent comme des signaux chimiques que la plante utilise pour s'adapter aux changements défavorables de l'environnement (**Chaudhary et al., 1985**).

## **I.2.2. Classification des métabolites secondaires**

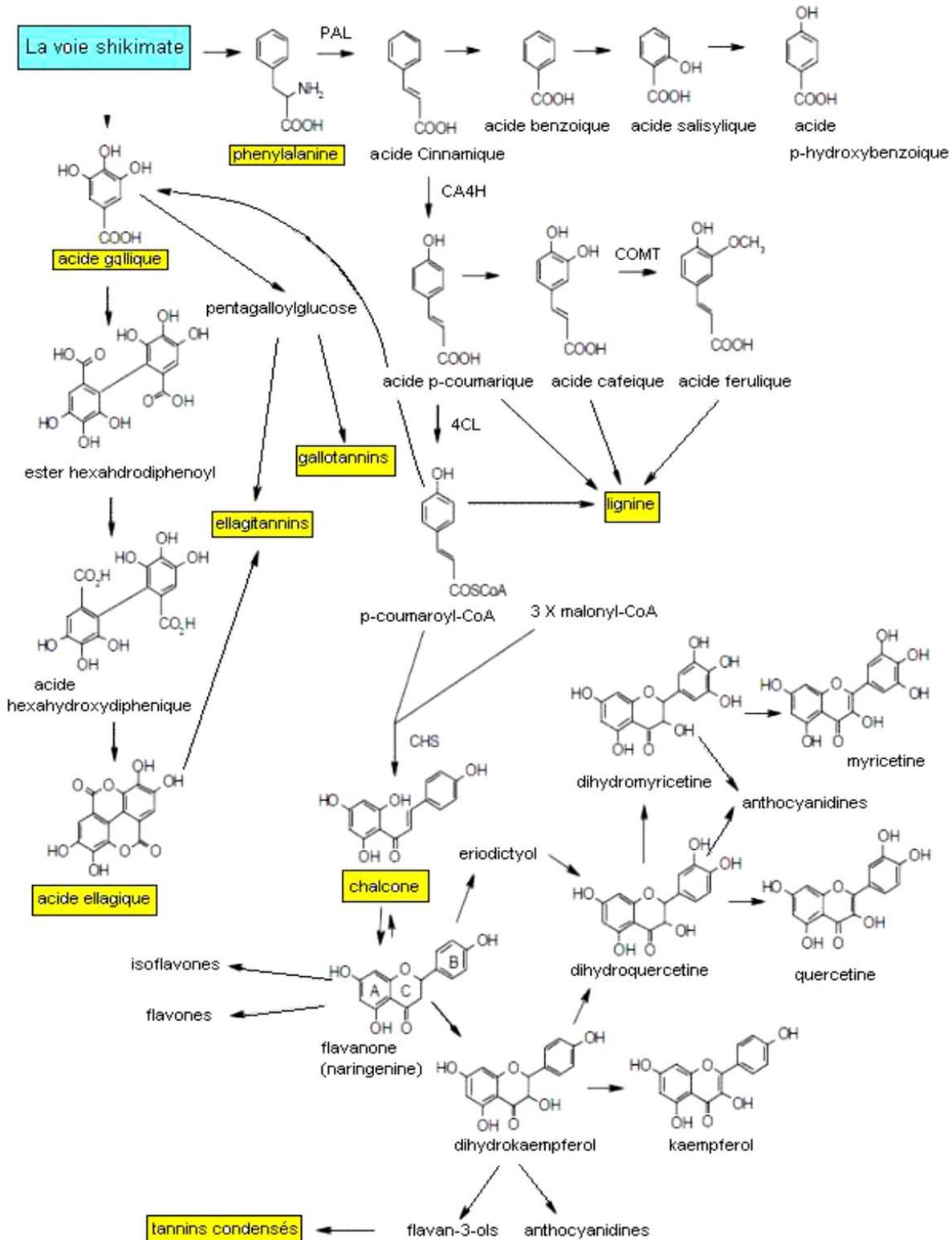
Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes (**Bruneton, 1993**).

### **I.2.2.1. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques, constituent le groupe le plus nombreux et le plus largement distribué dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connus (**Lugasi et al., 2003**). Ils sont caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (**Bruneton, 1999 ; Lugasi et al., 2003**). Les composés phénoliques sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racine, tiges, feuilles, fleurs et fruits (**Boizot et Charpentier, 2006**).

**a. Biosynthèse**

Les composés phénoliques sont issus de la grande voie métabolique de l'acide shikimique ou shikimate (**Fig. 04**) et celle de l'acétate-malonate (**Hollman et al., 1999 ; Elicoh-Middleton, 2000**).



**Figure 04. Biosynthèse des composés phénoliques (Mohammedi, 2006)**

### **a1. Voie de l'acide shikimique**

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, appelée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. L'association des formes actives de ces derniers avec le coenzyme A produisent les principales classes des composés phénoliques (Sarni et Cheyner, 2006).

### **a2. Voie de l'acétate**

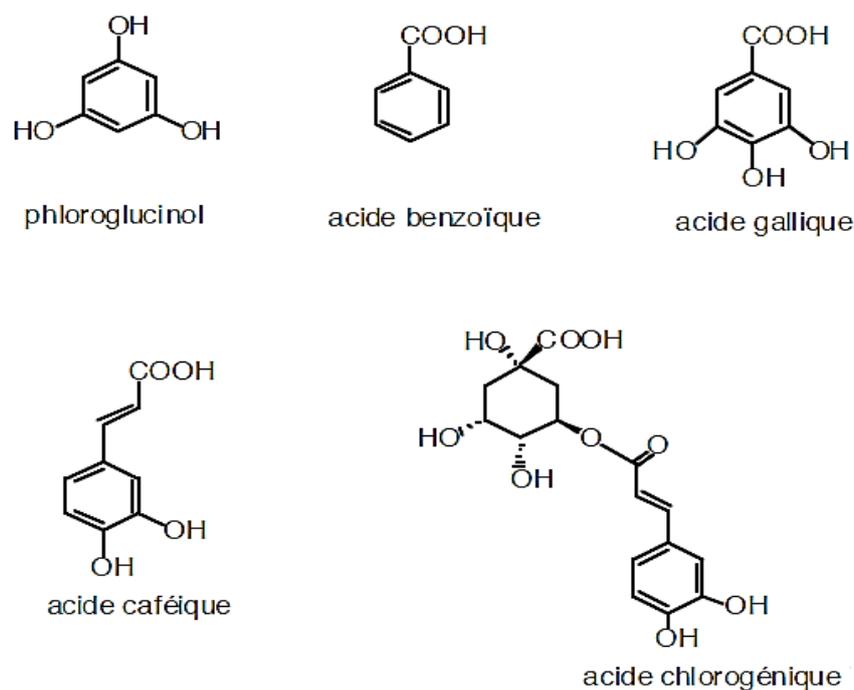
Cette voie de biosynthèse permet de produire des composés aromatiques notamment les chromones, les isocoumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques, due à cette origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones (Hollman *et al.*, 1999; Elicoh-Middleton, 2000).

## **b. Classification des composés phénoliques**

Les principales classes des composés phénoliques sont les acides phénoliques (acide caféique, acide hydroxycinnamique, acide chlorogénique), les flavonoïdes qui représentent plus de la moitié des composés phénoliques, les tanins, et les coumarines (King et Young, 1999 ; Tapiero *et al.*, 2002).

### **b1. Les acides phénoliques**

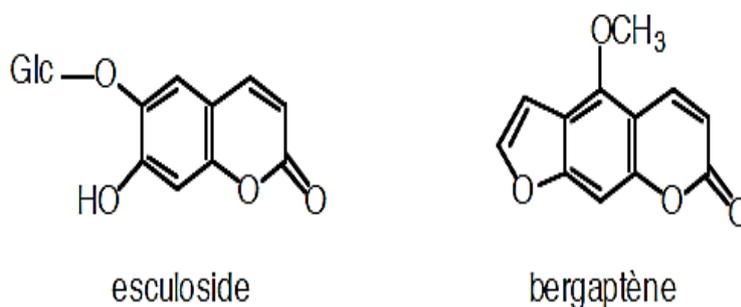
Les acides phénoliques sont de petites molécules constituées d'un noyau benzénique et au moins d'un groupe hydroxyle, elles peuvent être également estérifiées, et liées à des sucres sous forme d'hétérosides. Leur biosynthèse dérive de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. Ayant tendance à s'isomériser et à se polymériser, ces phénols sont solubles dans les solvants polaires (Wichtl et Anton, 2003) (Fig. 05).



**Figure 05.** Quelques phénols et acides phénoliques (Krief, 2003)

### b2. Les coumarines

Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, lactones des acides ortho-hydroxy- Z-cinnamiques. Les coumarines sont fréquemment hydroxylées en position 7 et ces hydroxyles peuvent être méthylés ou engagés dans une liaison hétérosidique. La prénylation du noyau benzénique des coumarines aboutit à la formation de furano et pyranocoumarines. Elles sont responsables de la phototoxicité de certaines espèces végétales (Apiaceae ou Rutaceae), qui se manifeste par une dermatite aiguë (Bruneton, 1993 ; Guignard, 1996 ; Krief, 2003) (Fig. 06).



**Figure 06.** Quelques exemples de coumarines (Krief, 2003)

### b3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes (*flavus*, jaune en latin) représentent une large gamme de composés naturels. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de la couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (Maamri, 2008). Ils sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone à 15 atomes de carbone (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), constitué de deux noyaux aromatiques (A) et (B), reliés par un hétérocycle oxygéné (C) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Dacosta, 2003 ; Milane, 2004) (Fig. 07).

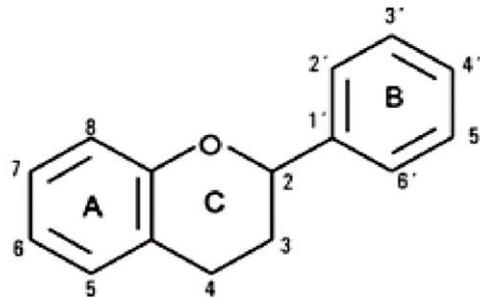


Figure 07. Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003)

Selon Harborne et Williams (2000), les flavonoïdes se répartissent en quinze familles de composés, dont les plus importantes sont les suivantes : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, isoflavones, isoflavanones, auronnes et anthocyanes (Fig. 08) (Annexe 01).

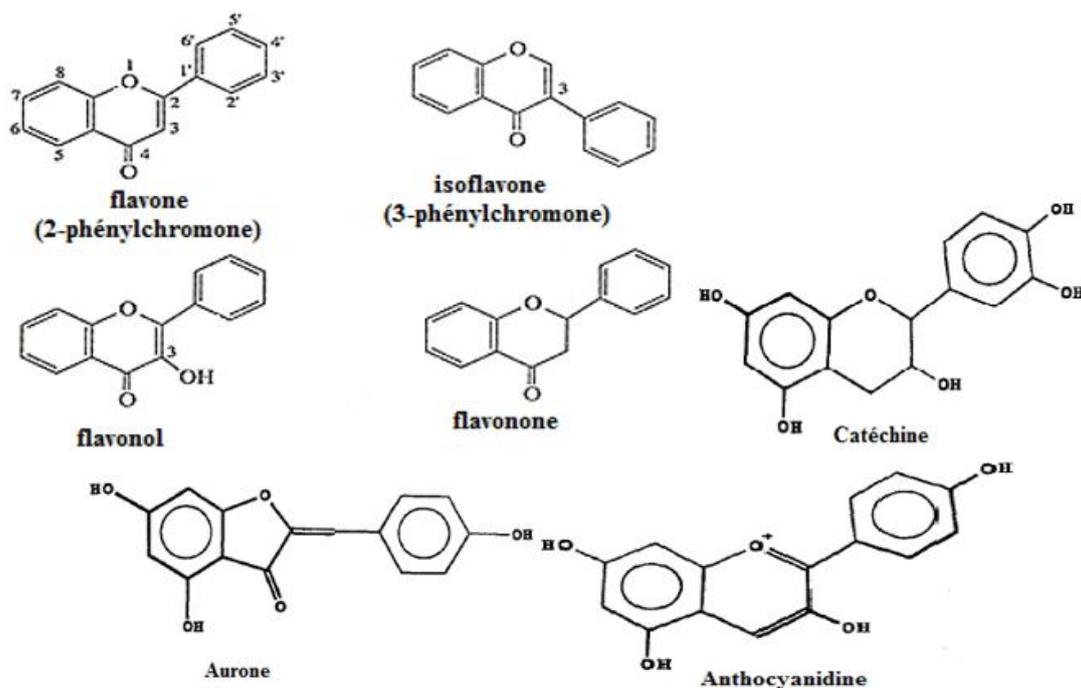


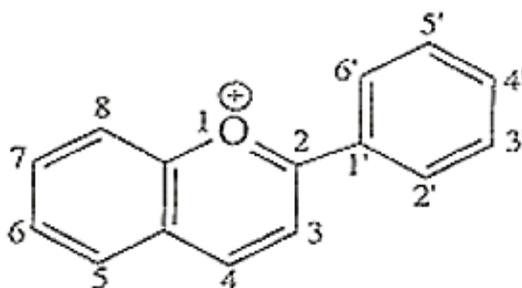
Figure 08. Structure chimique de quelques flavonoïdes (Ghesten *et al.*, 2001)

Les flavonoïdes sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons. Certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (**Elicoh-Middleton et al., 2000**).

La voie shikimate conduit à la synthèse de l'acide cinnamique et donc au cycle B et à la chaîne en C3 qui formera le cycle oxygéné C de la structure de base des flavonoïdes (**Marfak, 2003**). La voie acétate malonate constitue la voie de synthèse du noyau A. La condensation de ces deux voies engendre un précurseur commun la 4, 2',4',6'tétrahydroxychalcone avec la catalyse de la chalcone synthase (**Elicoh-Middleton, 2000**). Ce pigment jaune est métabolisé en différentes classes de flavonoïdes sous l'action d'enzymes spécifiques.

Des réactions post-biosynthétiques de glycosylation et d'acylation sont enfin effectuées pour donner la structure finale aux flavonoïdes (**Marfak, 2003**). Il existe cependant des flavonoïdes non glycosylés comme la quercétine (**Bruneton, 1993 ; Remesy et al., 1996 ; Elicoh-Middleton, 2000**).

Les anthocyanes sont des molécules appartenant à la famille des flavonoïdes (**Brouillard, 1993**). Ces métabolites sont responsables de la coloration vive, allant du rouge au violet, en passant par le bleu, des fruits et des pigments floraux (**Wichtl et Anton, 2003**). Ce sont des dérivés polyphénoliques à noyau flavylum (**Bruneton, 1993**) (**Fig. 09**).



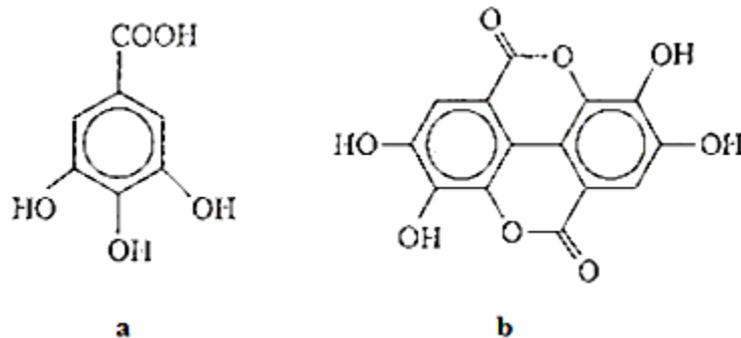
**Figure 09.** Structure chimique d'un noyau flavylum (2-phénylbenzopyroxonium) (**Ghesten et al., 2001**)

#### b4. Les tanins

Ce sont des composés polyphénoliques, hydrosolubles. Ils sont très répandus dans le règne végétal, en particulier chez les Conifères, les Fagaceae, les Rosaceae et chez les Fabiacées (**Ghesten et al., 2001**). Selon **Wichtl et Anton (2003)**, les tanins appartiennent à deux classes chimiques :

- Les tanins galliques et éllagiques, avec comme motif structural de base l'acide gallique (**Fig. 10**).

- Les tanins catéchiques, oligomères et des polymères d'aglycones polyphénoliques, dont la structure devient très vite complexe, en raison du maillage en réseau qui est obtenu (**Fig. 10**).

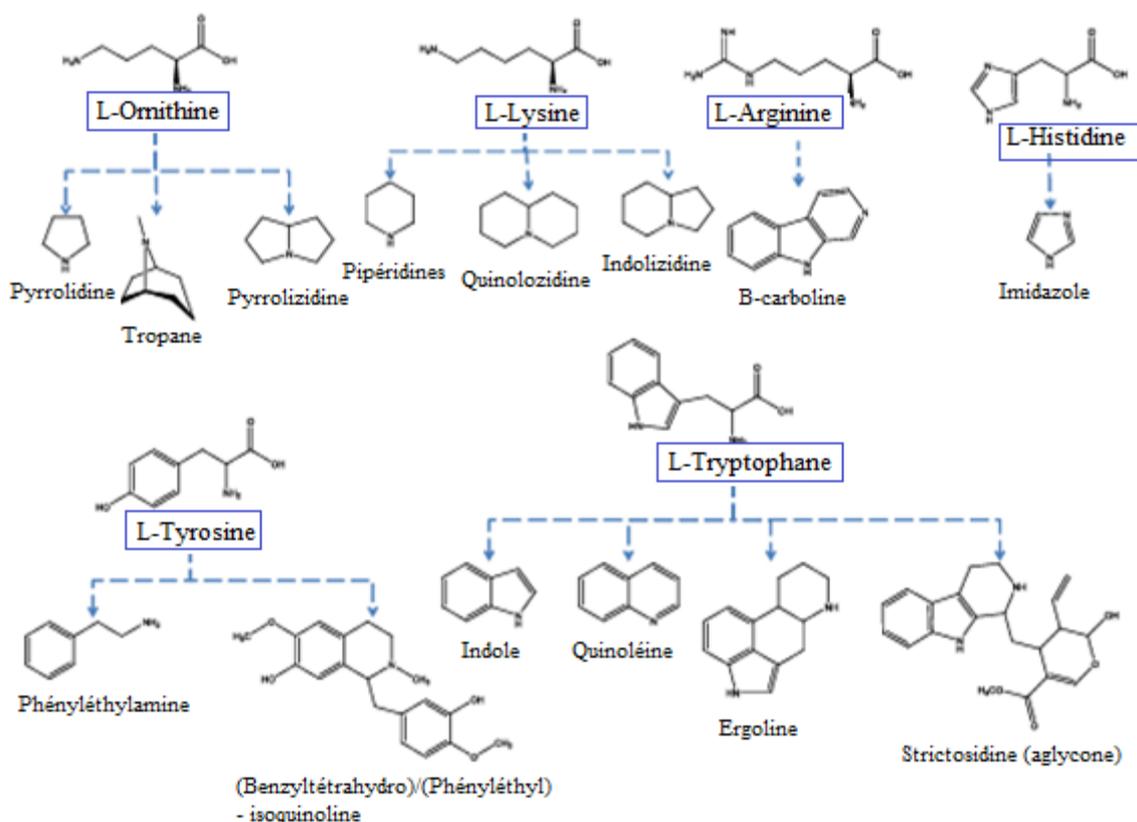


**Figure 10.** Structure chimique des tanins galliques (a) et éllagiques (b) (**Ghesten et al., 2001**)

#### I.2.2.2. Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (N) qui les rend pharmaceutiquement très actifs, notamment au niveau du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire (**Lucienne, 2010**).

Les alcaloïdes sont classés en alcaloïdes « vrais » lorsqu'ils possèdent un azote intra-cycle, en proto-alcaloïdes lorsqu'ils dérivent de l'acides aminés dont l'azote est extra-cycle (L-phénylalanine, acides aminés aliphatiques), et en pseudo-alcaloïdes lorsque leur squelette ne provient pas d'acides aminés (dérivés xanthiques, terpéniques, stéroïdiens, pipéridiniques) (**Nacoulma, 2013**) (**Fig. 11**).

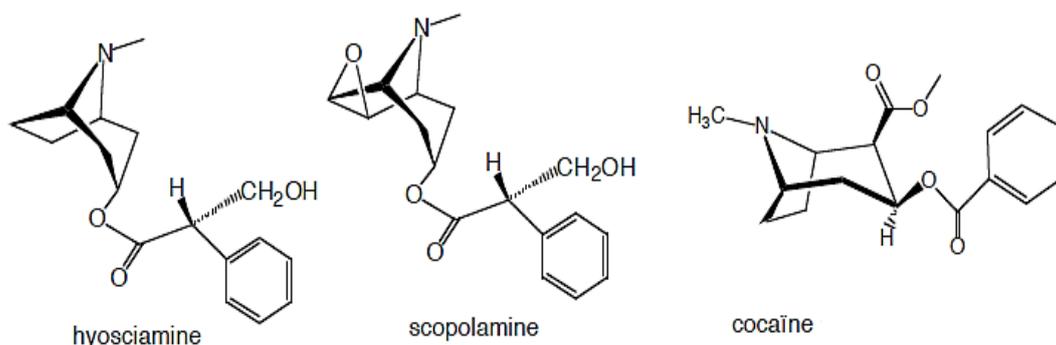


**Figure 11.** Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes (Nacoulma, 2013)

Selon Tyler *et al.* (1981), Bruneton (1993) et Guignard (1996), on distingue :

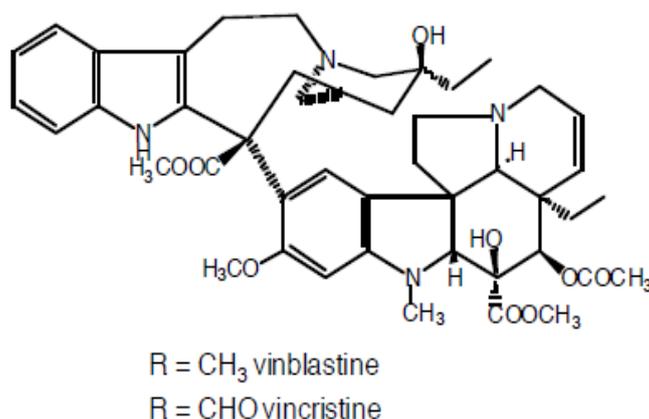
**a. Les alcaloïdes dérivés de l'ornithine et de la lysine**

L'ornithine (C4) et la lysine (C5) sont des acides aminés à l'origine de nombreux alcaloïdes. Des structures complexes sont observées lors de l'assemblage de plusieurs molécules de l'acide aminé, ou lors de l'intervention des autres précurseurs tels l'acétate (tropanes, élaeocarpine), le tryptophane (élaeocarpidine) et l'acide nicotinique (nicotine). L'hyosciamine, la scopolamine et la cocaïne sont les alcaloïdes tropaniques les plus fréquemment rencontrés (**Fig. 12**).



**Figure 12.** Quelques dérivés tropaniques (Krief, 2003)





**Figure15.** Structure chimique de la vinblastine et la vincristine (Krief, 2003)

### e. Les alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

L'acide anthranilique est à l'origine d'alcaloïdes de divers types : quinoléines, quinolones simples et prénylées, furo- et pyrano-quinoléines, acridones, furo- et pyranoacridines et quinazolinones.

#### I.2.2.3. Les terpénoïdes et les stéroïdes

Les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Les terpènes ont pour origine biosynthétique l'acétyl CoA ou le malonyl CoA. Les terpénoïdes et les stéroïdes sont issus à partir des mêmes précurseurs, et formés de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène). Le nombre d'unités isopréniques définit les différentes classes de terpènes : monoterpènes (C<sub>10</sub>), sesquiterpènes (C<sub>15</sub>), diterpènes (C<sub>20</sub>), sesterterpènes (C<sub>25</sub>), triterpènes (C<sub>30</sub>) et tétraterpènes (C<sub>40</sub>). Les terpènes simples en C<sub>10</sub> et C<sub>15</sub> sont certainement apparus tardivement au cours de l'évolution et caractérisent les plantes vasculaires ayant développé des appareils sécréteurs. Les monoterpènes et les sesquiterpènes se rencontrent également dans les huiles essentielles. La cyclisation et la glycosylation des monoterpènes constituent les iridoïdes.

#### I.2.3. Importance économique et pharmaceutique

Comparativement aux métabolites primaires, l'extraction de composés secondaires est souvent difficile à cause de leur faible niveau d'accumulation dans la plante (Kinghorn et Balandrin, 1993), ce qui induit un coût de production souvent assez élevé. Ces composés présentent un intérêt économique notable. On estime en effet qu'au moins 25% des spécialités

pharmaceutique mises sur le marché proviennent de plantes médicinales ou de produits dérivés de celles-ci (Verpoorte, 2000). Environ 75% des médicaments prescrits actuellement dérivent des produits naturels (Farnsworth et Soejarto, 1991 ; Kinghorn et Balandrin, 1993). En effet, Cragg *et al.* (1997) ont signalé que la plupart des antibiotiques et des antitumoraux provient des plantes. De même, Verpoorte (2000) a rapporté qu'entre 1983 et 1994, 78% des nouveaux antibiotiques et 61% des nouveaux antitumoraux autorisés sur le marché sont des produits d'origine naturelle issus des plantes, ou dérivés de ces produits.

#### I.2.4. Effet insecticide des métabolites secondaires

L'effet insecticide des métabolites secondaires extraits à partir des différentes plantes a fait l'objet d'études de divers travaux à travers le monde. Le tableau suivant résume quelques métabolites secondaires et leurs effets sur les insectes (Tab. 01).

**Tableau 01.** Activités insecticides des métabolites secondaires

Plantes	Extraits	Insectes	Régions	Auteurs
<i>Euphorbia guyoniana</i>	Extrait aqueux	<i>Culex pipiens</i>	Algérie	(Kemassi <i>et al.</i> , 2015)
<i>Melia azedarach</i> ; <i>Peganum harmala</i>	La poudre	<i>Melia azedarach</i> ; <i>Peganum harmala</i>	Algérie	(Bounechada et Arab, 2011)
<i>Echinochloa stagninum</i>	Extrait éthanolique et d'éther de pétrole	<i>Culex pipiens</i>	Egypte	(Bream <i>et al.</i> , 2010)
<i>Anthocleista djalensis</i> ; <i>Cassia occidentalis</i> ; <i>Cassia sieberana</i> ; <i>Entada africana</i> ; <i>Erythrina senegalensis</i> ; <i>Fagara zanthoxyloides</i> ; <i>Heliotropium indicum</i> ; <i>Manilkara multinervis</i> ; <i>Momordica balsamina</i> ; <i>Pseudocedrela kotschy</i> ; <i>Securidaca longepedunculata</i> ; <i>Syzygium guineense</i> ; <i>Trichilia emetica</i> ; <i>Xeroderris stuhlmanii</i>	Extraits alcooliques	<i>Anopheles gambiae</i>	Mali	(Diakite, 2008)
<i>Centratherum anthelminticum</i>	Extrait d'éther du pétrole	<i>Anopheles stephensi</i>	Inde	(Srivastava <i>et al.</i> , 2008)
<i>Ricinus communis</i> ; <i>Tetraclinis articulata</i>	Extraits aqueux	<i>Culex pipiens</i> ; <i>Aedes caspius</i> ; <i>Culiseta longiareolata</i> ; <i>Anopheles maculipennis</i>	Maroc	(Aouinty <i>et al.</i> , 2006)
<i>Leucas indica</i>	alkaloid	<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus (tiques)</i>	India	(Divya <i>et al.</i> , 2014)
<i>Calea serrata</i>	Extrait d'hexane	<i>Boophilus</i>	Brésil	(Ribeiro <i>et al.</i> ,

		<i>microplus and Rhipicephalus sanguineus</i>		2008)
<i>Hyptis suaveolens</i>	Extrait éthanolique	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Brésil	(Estrela <i>et al.</i> , 2017)
<i>Calpurnia urea, Maerua angolensis</i>	Extrait éthanolique et extrait d'acétone	<i>Rhipicephalus microplus, Rhipicephalus tutsanicus</i>	Afrique du sud	(Fouché <i>et al.</i> , 2017)

### I.3. Les bactéries endophytes

Les endophytes sont des microorganismes (bactéries et champignons) qui peuvent coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante saine (Bacon et White, 2000). Selon Hallmann *et al.* (1997). Elles améliorent la santé des plantes en agissant comme agents de lutte biologique, protègent les plantes hôtes contre les bactéries phytopathogènes par la synthèse d'un large spectre de molécules antimicrobiennes et la production des sidérophores (Compant *et al.*, 2010).

#### I.3.1. Distribution et localisation

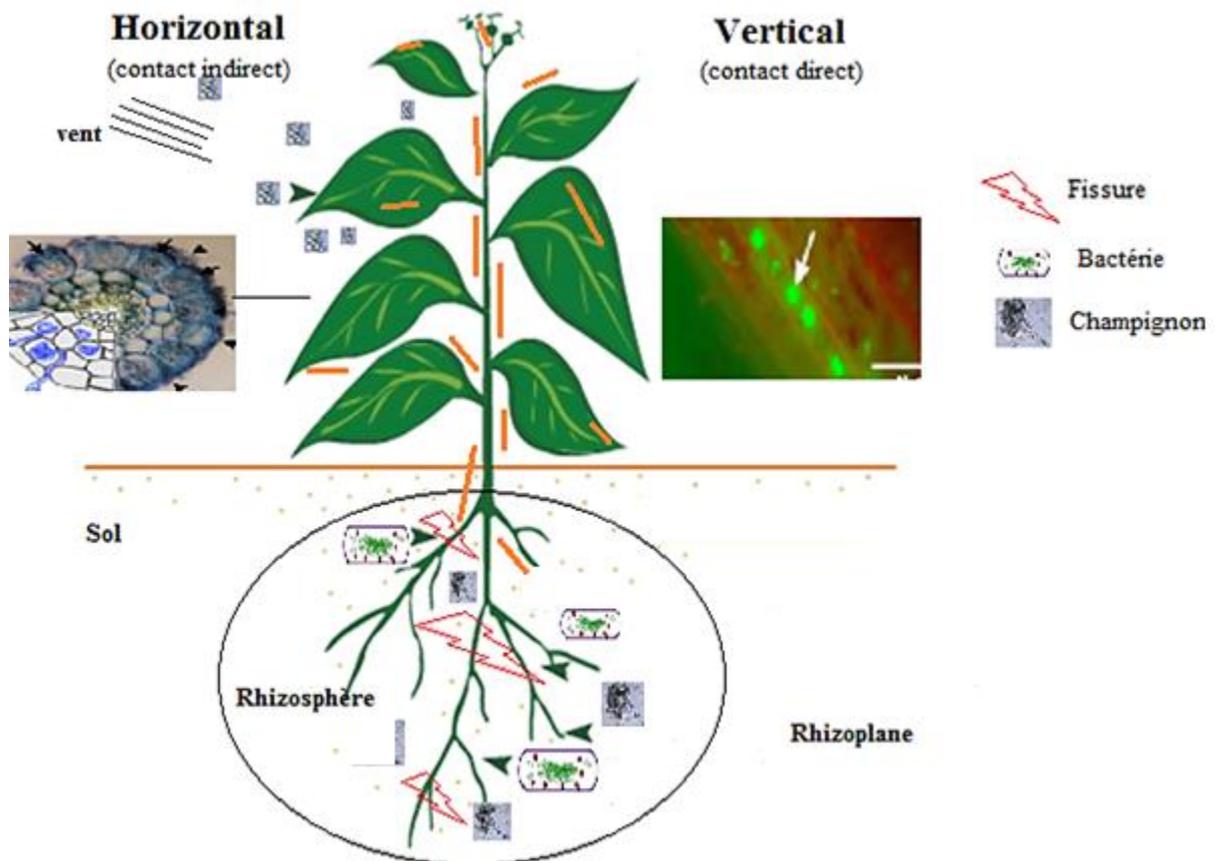
Les bactéries endophytes sont rencontrées dans la majorité des organes des plantes essentiellement les racines, les feuilles, les tiges et rarement les fleurs, les fruits et les graines (Lodewyckx *et al.*, 2002).

Ces microorganismes endophytiques se propagent dans les différents organes de la plante à travers le système vasculaire (Hardoim *et al.*, 2008 ; Compant *et al.*, 2011), afin d'accomplir tout ou une partie de leur cycle de vie, de manière endosymbiotique (Azevedo *et al.*, 2000) (Fig. 16). Généralement les plantes qui poussent dans les paramètres environnementaux uniques (ayant des utilisations ethnobotaniques spéciaux, l'âge extrême ou endroits endémiques) possèdent de nouveaux micro-organismes endophytes qui peuvent fournir de nouvelles pistes (Azevedo *et al.*, 2000).

La rhizosphère est la zone du sol située près des racines et caractérisée par une activité microbiologique intense. C'est un environnement écologique dynamique où les microorganismes et les plantes interagissent pour l'exploitation des micro et macronutriments du sol présent en quantité limitée (Gholami *et al.*, 2012). C'est également un environnement caractérisé par un volume très élevé de substances racinaires favorisant une grande population microbienne (Miransari, 2011).

Deuxièmement, la rhizoplane est la surface des racines, incluant les particules du sol qui y adhèrent (Barea *et al.*, 2005). Plusieurs études ont démontré que les microorganismes du sol

interagissent avec les racines des plantes et les constituants du sol à l'interface entre les racines et le sol (Lynch, 1990 ; Linderman, 1992 ; Glick, 1995 ; Kennedy, 1998 ; Bowen et Rovira, 1999 ; Barea *et al.*, 2002). Finalement, les racines font partie du système dû au fait que certains microorganismes, les endophytes, sont capables de coloniser leurs tissus (Kennedy, 1998 ; Bowen et Rovira, 1999) et influencer leur croissance.



**Figure 16.** Les modes de transmission des endophytes (Originale, 2018)

Les bactéries associées aux plantes et isolées de la rhizoplane et de la phylloplane sont connues sous le terme épiphytes (Andrews et Harris, 2000) tandis que celles isolées de l'intérieur des tissus, qui y habitent sans nuire à leur hôte sont appelées endophytes (Petrini *et al.*, 1989 ; Azevedo *et al.*, 2000).

En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes épiphytes, de la rhizosphère ou de la phyllosphère aussi bien que des graines ou de matériels de propagation infestés (Hallmann *et al.*, 1997). La densité de population des endophytes est très variable et dépend de l'espèce bactérienne, du génotype de l'hôte, de son stade de développement et des conditions environnementales (Dudeja *et al.*, 2012).

### **I.3.2. Interactions entre plantes et endophytes**

Les plantes sont associées avec divers communautés de microorganismes. Les bactéries endophytes, co-evoluées avec les plantes, colonisent les tissus internes de leur plante hôte et peuvent former une gamme de différentes relations, y compris symbiotique, mutualiste, et commensalisme (**Robert et al., 2008**).

Le commensalisme et le mutualisme représentent les étapes équilibrées d'interactions plantes-microorganismes. Le premier procure à l'endophyte les éléments nutritifs, sans nuire à l'hôte. Le second, avantage l'endophyte et alimente la plante hôte par des molécules de défense contre les phytopathogènes (**Waller et al., 2005**).

La stimulation de la croissance des plantes par des bactéries endophytes est due en grande partie à la production de phytohormones, la fixation de l'azote, la solubilisation du phosphate et la production d'ions ammonium (**Molina-Favero et al., 2008 ; Walker, 2013**).

### **I.3.3. Avantages et utilisations**

L'étude des associations plantes-bactéries est très importante, non seulement pour comprendre leurs rôle écologique mais aussi pour des applications biotechnologiques, en particulier pour un meilleur contrôle biologique des pathogènes des plantes (**Weller, 1988; Emmert et Handelsman, 1999; Bloemberg et Lugtenberg, 2001**).

#### **I.3.3.1. Promotion de la croissance des plantes**

Différentes études démontrent que les bactéries endophytes peuvent avoir un effet bénéfique sur la plante hôte. En effet, elle jouent un rôle capital dans la promotion de la croissance des plantes (**Frommel et al., 1991; Chen et al. 1994; Sturz et al., 1997; Downing et Thomson, 2000; Adhikari et al., 2001**), et facilitent la défense des plantes hôtes contre le stress environnemental (**Mastretta et al., 2006; Taghavi et al., 2007; Ryan et al., 2008**). Certains endophytes peuvent accélérer l'émergence des semis, promouvoir l'établissement de la plante sous des conditions défavorables et améliorer ainsi leur croissance (**Dudeja et al., 2012**). Ces interactions peuvent augmenter la capacité des plantes à utiliser les nutriments du sol en augmentant le développement des racines, l'assimilation du nitrate ou bien la solubilisation du phosphore (**Whipps, 2001**).

#### **I.3.3.2. Protection contre les pathogènes**

Plusieurs microorganismes endophytiques ont un effet indirect sur la croissance de la plante. Ils jouent un rôle dans l'induction des mécanismes de défense de l'hôte contre les agents

pathogènes. C'est par la sécrétion de substances antifongiques et antibactériennes, ou par la compétition pour la colonisation des sites et l'utilisation des nutriments que les endophytes protègent l'hôte (Weyens *et al.*, 2009 ; Compant *et al.*, 2010; Dudeja *et al.*, 2012).

### **I.3.3.3. Lutte biologique**

Les bactéries endophytes peuvent être utilisées pour confectionner des produits naturels, afin de contrôler les maladies des plantes (Miller *et al.*, 1998; Beck *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2004; Guan *et al.*, 2005). Elles peuvent servir donc de médiateur de synthèse de nouveaux composés antibactériens, antifongiques et insecticides pour limiter la propagation des maladies des plantes (Sturz *et al.*, 2000; Wellington et Marcela, 2004). Ces endophytes forment une source de métabolites bioactives ayant une activité antivirale, anticancéreuse, anti-inflammatoire et antioxydante (Strobel et Daisy, 2003).

### **1.3.3.4. Biofertilisation du sol**

Il faut également considérer que le biofertilisant inoculé peut être un endophyte. Pour coloniser l'intérieur de la plante et influencer son développement, la structure dynamique qui est la microflore endophyte dépend de plusieurs facteurs abiotiques et biotiques (Hallmann *et al.*, 1997).

## **I.4. Les maladies vectorielles**

Au cours des maladies vectorielles, l'agent infectieux (virus, bactérie, protozoaire ou helminthe) est transmis d'un individu infecté à un autre, principalement par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage (insecte ou acarien) (Rodhain et Perez, 1985).

Selon Amraoui (2012), les principales maladies à transmission vectorielles sont la Chikungunya, la dengue, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, la filariose lymphatique, la fièvre jaune, la maladie de Chagas (trypanosomiase américaine), l'onchocercose, le paludisme, la Schistosomiase (bilharziose), la trypanosomiase africaine et le Zika.

En plus de leur nuisance, les moustiques peuvent causer, des maladies vectorielles (Seye *et al.*, 2006 ; Youssef *et al.*, 2011), provoquant ainsi un impact très considérable sur la santé publique humaine (Pascal *et al.*, 2001). Dans le monde, les espèces de moustiques du genre *Culex* sont responsables de la transmission de maladies parasitaires telles la filariose, la fièvre jaune et le virus West Nile (Aouinty *et al.*, 2006).

Dans la région du Maghreb, plusieurs maladies vectorielles sont présentes. Elles sont dues à des virus, des bactéries ou des protozoaires et sont transmises par des arthropodes vecteurs, principalement des moustiques, des tiques, des phlébotomes, des moucheron (Culicoïdes), des poux ou des puces (**Fig. 17**).



**Figure 17.** Les principaux arthropodes vecteurs de maladies existant au Maghreb (**Amraoui, 2012**)

(a) : Moustique (*Culicidae*), (b) : Tique dure (*Ixodidae*), (c) : Tique molle (*Argasidae*), (d) : Phlébotome (*Psychodidae*) (e) : Culicoïdes (*Ceratopogonidae*), (f) : Poux (*Pediculidae*), (g) : Puce (*Pulicidae*)

#### I.4.1. Aperçu générale sur les moustiques

Les moustiques sont des petits insectes à métamorphoses complètes. Ils sont caractérisés par deux ailes, des antennes longues et des corps fusiformes recouverts d'écailles (**Brunhes *et al.*, 1999**). On dénombre plus de 3000 espèces de moustiques à travers le monde. Seuls les moustiques femelles, dont les repas de sang sont nécessaires à la maturation de leurs œufs, peuvent être vecteurs des maladies (**Schaffner *et al.*, 2001**).

#### I.4.2. Biologie de *Culex pipiens* (Linné, 1758)

##### I.4.2.1. Position systématique

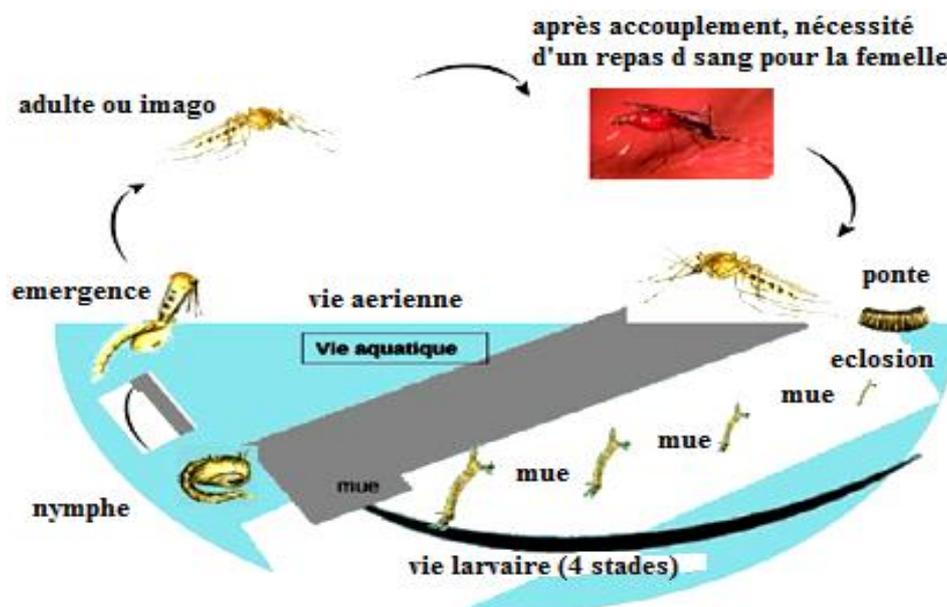
La famille des Culicidés se divise en trois sous-familles, les Toxorhynchitinae, les Anophelinae et les Culicinae (**Duchauffour, 1976 ; Matille, 1993**).

Les Culicidés sont des insectes, mécoptéroïdes, diptères, nématocères remarquables par l'évolution progressive qui affecte parallèlement l'imago et la larve. D'après **Trari et al. (2002)**, **Amraoui (2012)**, leurs position systématique est la suivante :

- Règne : Animalia
- Embranchement : Arthropoda
- Sous- embranchement : Hexapoda
- Classe : Insecta
- Sous-classe : Pterygota
- Ordre : Diptera
- Sous-ordre : Nematocera
- Famille : Culicidae
- Sous- famille : Culicinae
- Genre : *Culex*
- Espèce : *Culex pipiens*

#### 1.4.2.2. Cycle de vie

Le cycle des Culicidés comporte quatre stades : l'œuf, la larve, la nymphe et l'imago ou adulte. Il se décompose en deux phases : une phase aquatique pour les trois premiers stades, et une phase aérienne pour le dernier stade (**Ripert, 2007**) (**Fig.18**).



**Figure 18.** Cycle de vie des *Culicidae* (**Berchi, 2000**)

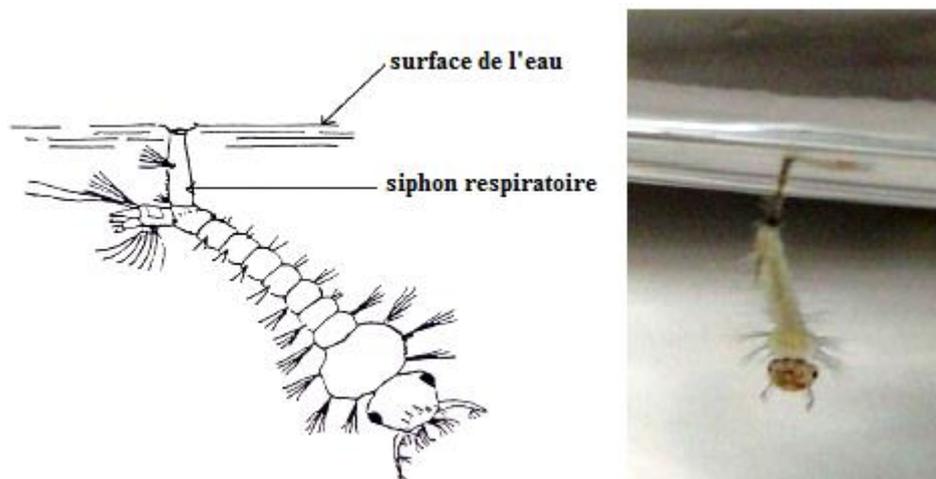
### a. Phase aquatique

#### ○ L'œuf

Quarante-huit heures après la prise du repas sanguin, les femelles fécondées déposent leurs œufs à la surface de l'eau dans des réceptacles naturels. Ils sont pondus soit isolément, soit en amas ou bien fixés à un support végétal immergé. La fécondité totale d'une femelle varie de 500 à 2 000 œufs (20 à 200 par ponte selon la quantité de sang disponible). Les œufs se développent en un à deux jours, lorsque la température de l'eau est suffisante (**Ripert, 2007**).

#### ○ Larve

La larve est disposée obliquement par rapport à la surface de l'eau (**Ripert, 1998 et 2007 ; Euzéby, 2008**) et se déplace par mouvements saccades. Son régime saprophyte est constitué de plancton et de particules organiques ingérés grâce à ses pièces buccales de type broyeur. Elle respire par un siphon (**Fig. 19**). La larve évolue ainsi selon quatre stades pendant 8 à 12 jours, avant d'atteindre le stade nymphal (**Cachereul, 1997 ; Wall et Shearer, 1997**).



**Figure 19.** Larves de *Culex* (**Moulinier, 2003**)

#### ○ Nymph

La nymphe est aquatique et respire l'air atmosphérique au moyen de ces deux trompettes respiratoires. L'extrémité abdominale de la nymphe est aplatie en palettes ou nageoires. La nymphe ne se nourrit pas. Il s'agit d'un stade de transition vers l'adulte durant lequel l'insecte subit de profonds remaniements physiologiques et morphologiques (**Ripert, 2007**). Elle est extrêmement sensible et plonge dans l'eau au moindre mouvement perçu (**Cachereul, 1997 ;**

**Wall et Shearer, 1997**). *Culex pipiens* reste sous cette forme pendant 2 à 4 jours, pour donner un adulte, mâle ou femelle. Cette étape se fait généralement le matin (**Ripert, 2007**).

#### **b. Phase aérienne**

Les mâles se déplacent assez peu du gîte dont ils sont issus, et leur longévité est relativement faible. Par contre, les femelles peuvent migrer jusqu'à 100 km de son lieu de naissance (transport passif par le vent). L'accouplement se produit dans les 48 heures suivant l'émergence des femelles et avant le premier repas sanguin. Elles alternent repas sanguin et ponte des œufs (**Resseguier, 2011**).

### **I.4.2.3. Morphologie générale**

#### **I.4.2.3.1. Œufs**

Mesurant 0,5mm de taille, un œuf comprend de l'intérieure vers l'extérieur : l'embryon, la membrane vitelline pellucide, un endo-chorion épais et un exo-chorion plus ou moins pigmenté (**Rodhain et Perez, 1985**). Au moment de la ponte, il est blanchâtre et prend rapidement par oxydation de certains composants chimiques de la thèque une couleur marron ou noire (**Séguy, 1949**). Les œufs de *Culex* groupés en nacelle sont cylindro-coniques et se tiennent verticalement (**Lounaci, 2003**) (**Fig. 20**).

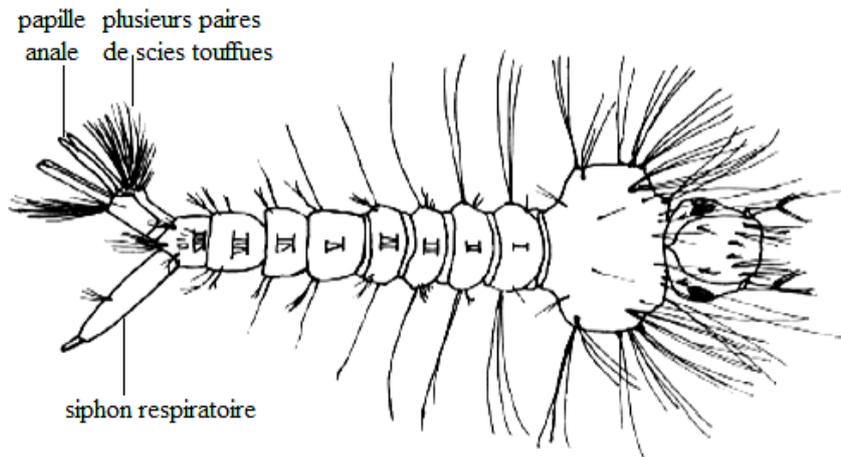


**Figure 20.** Œufs en nacelle de *Culex pipiens* L. (**Amara Korba, 2011**)

#### **I.4.2.3.2. Larve**

Le corps de la larve est divisé en trois parties principales : la capsule céphalique complètement sclérifiée, le thorax aplati composé de trois segments fusionnés (bien plus large que les deux autres parties) et l'abdomen qui se compose de dix segments (**Brunhes et al., 1999**). D'après **Becker et al. (2003)**, la chetotaxie qui représente l'arrangement de 222 paires de soies insérées tout au long du corps de la larve est le principal critère en taxonomie

morphologique des larves. Le quatrième stade larvaire se caractérise par un siphon long et effilé, de même couleur que le corps. Ses mouvements sont rapides et nerveux (**Fig. 21**).

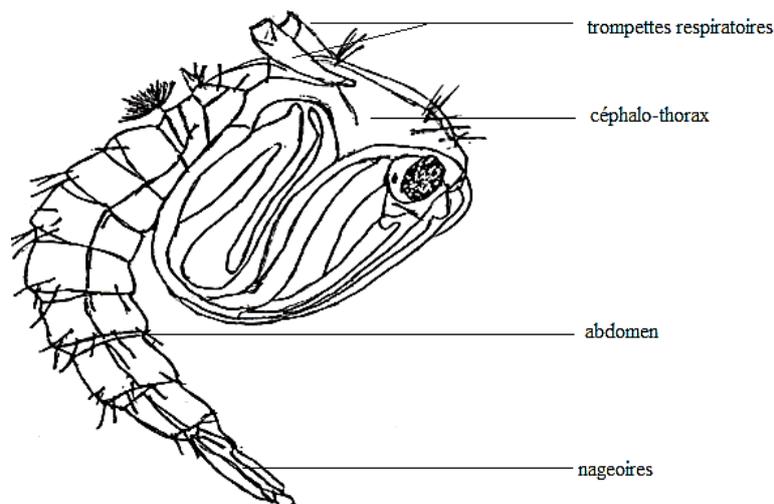


**Figure 21.** Morphologie générale d'une larve de IV ème stade de *Culicinae (Culex)* (**Kettle, 1995**)

#### I.4.2.3.3. Nymphe

C'est une pupe mobile généralement sous forme de virgule ou d'un point d'interrogation vivant dans l'eau mais ne se nourrissant pas. Elle est formée d'un céphalothorax globuleux sur lequel s'insèrent deux trompettes respiratoires permettant à la nymphe de respirer (**Rioux, 1958 ; Cachereul, 1997**).

La cuticule du céphalothorax est transparente et rend visible les ébauches des appendices locomoteurs, des antennes, de l'appareil buccal et des yeux composés des futurs adultes (**Becker et al., 2003**) (**Fig. 22**).



**Figure 22.** Aspect général d'une nymphe de *Culex pipiens* (**Himmi, 1995**)

#### I.4.2.3.4. Adulte (Imago)

L'adulte est de taille moyenne d'environ 9 mm, globalement brun clair, avec des bandes antérieures claires sur les tergites abdominaux. Il est formé de trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen dont la connaissance est indispensable en systématique (**Becker et al., 2003**) (Fig. 23).

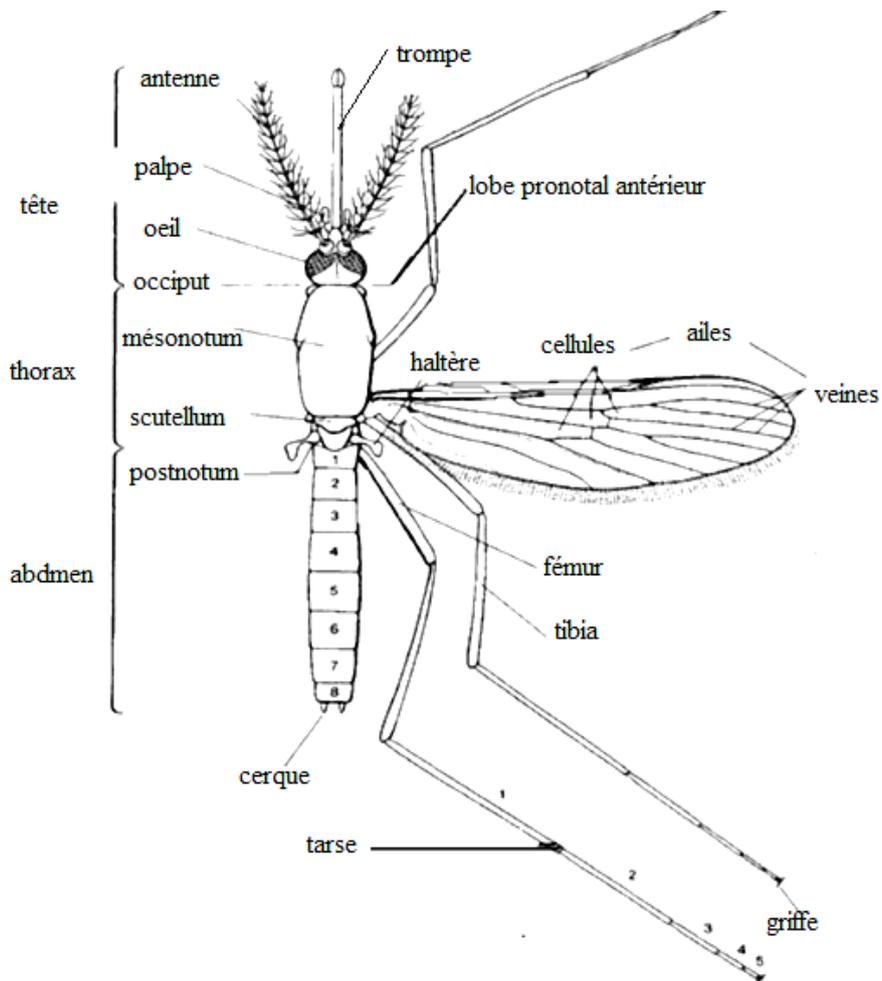


Figure 23. Représentation générale d'un Culicidés adulte (OMS, 1973)

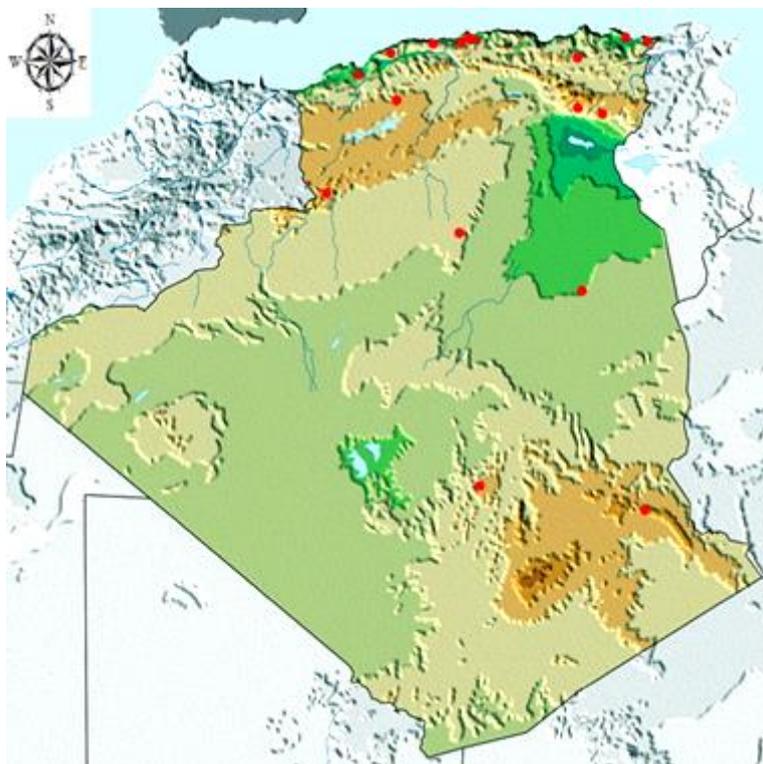
### I.4.3. Répartition géographique des Culicidae

#### I.4.3.1. Dans le monde

Le moustique de la famille des Culicidae est retrouvé en abondance dans tous les habitats, des pics de montagne neigeux aux fosses abyssales, et des déserts aux forêts tropicales (**Morine, 2002**). Les Culicidae sont extrêmement commun dans l'ensemble des zones tempérées d'Europe, d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du nord et du sud (**Morine, 2002**).

### I.4.3.2. En Algérie

Dans les villes d'Algérie, les Culicidae présentent une large répartition géographique (Tabti et Abdellaoui-Hassaine, 2009). D'après Kettle (1995) et Berchi (2000), seules les Culicinae et les Anophelinae sont représentés en Algérie avec six genres (Fig. 24).



**Figure 24.** Répartition géographique de *C. pipiens* L. en Algérie (Senevet et Andarelli, 1999)

Le tableau ci-dessous synthétise les différentes espèces des Culicidés répartie dans les différentes wilayas de l'Algérie (Tab. 02).

**Tableau 02.** Répartition des différents moustiques en Algérie

Wilayas	Moustiques	Références
Alger	<i>Anopheles, Aedes, Culex</i>	(Lounaci, 2003)
Annaba	<i>Culex</i>	(Bendali, 2006)
Batna	<i>Anopheles, Culiseta, Culex</i>	(Boulkenafet, 2006)
Biskra	<i>Aedes, Culex, Culiseta</i>	(Hassain, 2002)
Constantine	<i>Anopheles, Aedes, Culiseta, Culex</i>	(Berchi, 2000)
El-Taref	<i>Culex, Aedes, Anopheles</i>	(Tahraoui, 2008)

<b>Nord-Sahara (Oued-Righ)</b>	<i>Anopheles, Aedes, Culiseta, Culex</i>	<b>(Bebba, 2004)</b>
<b>Oran</b>	<i>Anopheles, Aedes, Culiseta, Culex</i>	<b>(Boulkenafet, 2006)</b>
<b>Skikda</b>	<i>Aedes, Culex, Anophèles</i>	<b>(Boulkenafet, 2006)</b>
<b>Souk-Ahras</b>	<i>Anopheles, Culiseta, Culex</i>	<b>(Hamaidia, 2004)</b>
<b>Sud Algérien (Sahara)</b>	<i>Anopheles, Aedes, Culiseta, Culex</i>	<b>(Boulkenafet, 2006)</b>
<b>Tebessa</b>	<i>Aedes, Culex, Culiseta</i>	<b>(Hamaidia, 2004)</b>
<b>Tizi-Ouzou</b>	<i>Anopheles</i>	<b>(Lounaci, 2003)</b>
<b>Tlemcen</b>	<i>Aedes, Culex</i>	<b>(Hassain, 2002)</b>
<b>Mila</b>	<i>Anopheles, Culex</i>	<b>(Messai <i>et al.</i>, 2010)</b>

#### I.4.4. Intérêts des moustiques dans l'écosystème

Les moustiques jouent un rôle très important dans l'équilibre de l'écosystème, car ils participent à la chaîne trophique. Certaines espèces, en particulier participe à la pollinisation des plantes et à l'assaut finissement des eaux stagnantes (**OMS, 1976**).

Les moustiques représentent un maillon essentiel dans le fonctionnement d'un écosystème aquatique. En effet, par leur présence en grand nombre, ils représentent une biomasse importante dont se nourrissent de nombreux organismes (batraciens, poissons...). De plus, de part leur régime alimentaire, les larves participent au processus de destruction de la matière organique. Leur régime omnivore, avec l'ingestion de feuilles en décomposition par exemple, accélère la décomposition des matières organiques dans les écosystèmes aquatiques (**Boyer, 2006**).

#### I.4.5. Moyens de lutte

La lutte antivectorielle est l'ensemble de moyens chimiques, physiques et biologiques qui visent la limitation des vecteurs et qui permettent de maintenir leurs populations en dessous de la densité vectorielle critique (**Himmi *et al.*, 1998**). L'efficacité d'une lutte dépend de la solidité de ses bases écologiques en particulier, la connaissance de la variation spatio-temporelle, du développement et de l'activité de ses insectes (**Lounaci, 2003**).

#### **I.4.5.1. Lutte écologique**

C'est l'ensemble des mesures environnementales qui font obstacle à la reproduction des moustiques ou qui conduisent à l'élimination des gîtes larvaires. Elle vise la destruction des gîtes et la modification de l'environnement de façon à la rendre défavorable à la survie de l'arthropode (**Azondekon, 2006**). Elle peut se faire par drainages et assèchement des points d'eau, gestion des déjections et des engrais de fermes et gestion adaptée des ensilages (**Balenghien, 2009**).

#### **I.4.5.2. Lutte génétique**

La lutte génétique comprend les lâchers de males stériles (absence de fécondation des femelles hématophages) et la manipulation génétique des femelles (insertion d'un fragment d'ADN), ce qui rend le moustique inapte à transmettre une maladie. Cette méthode est cependant très coûteuse et souvent mal vécue par la population locale, ces lâchers en masse sont souvent une source d'importantes nuisances (**Goislard, 2012**).

#### **I.4.5.3. Lutte chimique**

La lutte chimique consiste à l'utilisation des produits chimiques de synthèse pour lutter contre les larves et les imagos de moustique. Les compositions utilisés au début contre les organismes nuisibles étaient des pesticides de première génération relativement simple à base d'arsenic, de soufre, de chaux, de dérivés de pétrole, de substance à base de fluor ou extraite de plantes comme la nicotine. Ces pesticides se caractérisent par leur toxicité relativement élevée pour les organismes non visés et surtout par leur rémanence, ou encore leur lente décomposition dans l'environnement (**Philogène, 1991**). Par la suite, des composés synthétiques de deuxième génération de nature organochlorés, organophosphorés ou carbamates, ont été mis en place (**Philogène, 1991**).

#### **I.4.5.4. Lutte biologique**

La lutte biologique représente une alternative des plus appropriées et communes. Elle consiste à utiliser des organismes vivants (virus, bactéries, champignons, nématodes et protozoaires) ou des dérivés d'organismes vivants tels que des toxines pour le contrôle des espèces envahissantes (**Gariépy, 2007**).

Deux grands types de luttes biologiques ont été utilisés contre les moustiques. Le premier est l'utilisation d'un poisson prédateur, la gambusie (*Gambusia holbrooki*) (**Pates et Curtis,**

2005). Le deuxième est l'utilisation d'organismes microbiens tels que le *Bacillus sphaericus* (Bs) et *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) (Becker, 1998).

La lutte biologique prend diverses formes, mais celles qui attirent l'attention des chercheurs à l'heure actuelle est la lutte biologique par l'utilisation de substances naturelles d'origines végétales comme insecticides (Ghosh *et al.*, 2012).

## *CHAPITRE II*

### *MATÉRIEL ET MÉTHODES*

Le présent travail, réalisé sur *U. dioica* L. (tiges, feuilles et racines), porte essentiellement sur l'isolement et l'identification des bactéries endophytes, ainsi que sur l'évaluation de son pouvoir insecticide contre *C. pipiens* L.

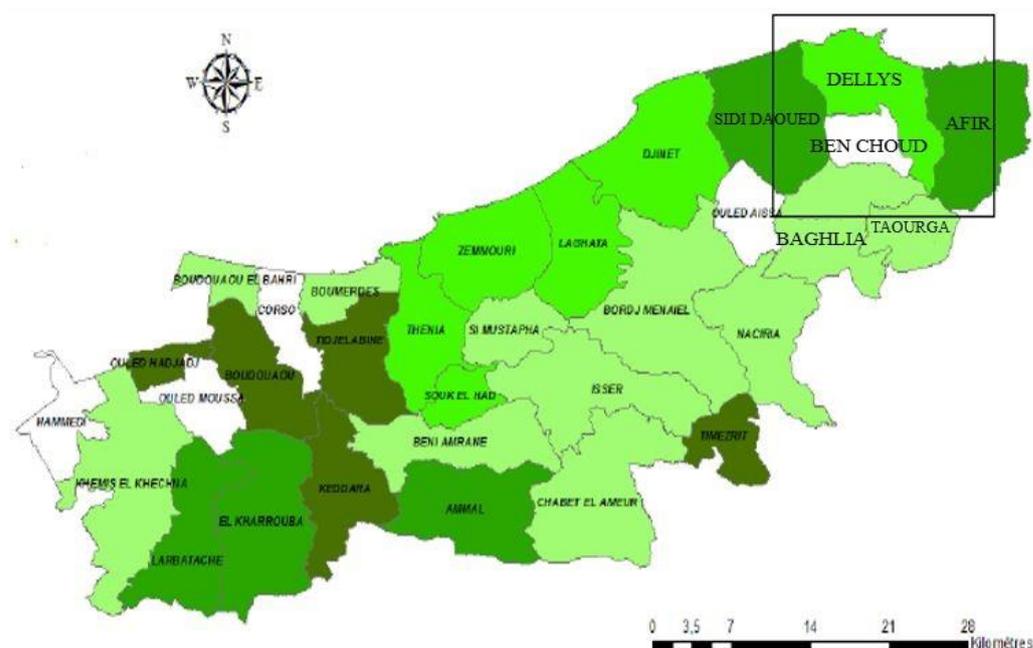
L'expérimentation s'est déroulée au niveau du laboratoire de recherche « Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCOR) » de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès (UMBB). Toutefois, l'identification des bactéries endophytes par MALDI-TOF MS est réalisée à l'Unité des Rickettsies, URMITE UMR 63 de la Faculté de Médecine de la Timone, Université de la Méditerranée, Aix-Marseille 2, France.

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel biologique

#### II.1.1.1. La Grande ortie (*U. dioica* L.)

La plante entière (tige, feuille, et racine) a été récoltée pendant l'hiver (février 2016) dans deux régions différentes de l'Algérie. La première, représentée par commune de Dellys (UDD), est une ville côtière située à 51km de la wilaya de Boumerdès. Elle couvre une superficie de 50,6 km<sup>2</sup> avec comme coordonnées géographiques 36° 54' 48" nord et 3° 54' 51" est. Dellys est limité au nord par la mer méditerranéenne, au sud par la commune de Benchoud, à l'est par la commune d' Afir et à l'ouest par la commune de Sidi Daoued (**Fig. 25**).



**Figure 25.** Carte géographique de et Dellys (Meddour-Sahar, 2014)

La deuxième, représentée par la ville de Tlemcen (UDT), est située au nord-ouest de l'Algérie avec comme coordonnées géographiques  $34^{\circ} 53' 24''$  nord et  $1^{\circ} 19' 12''$  ouest. Couvrant une superficie de  $9061 \text{ km}^2$ , Tlemcen est limitée au nord par la mer méditerranée et par la wilaya d'Ain-Temouchent, au sud par la wilaya de Naâma, à l'est par la wilaya de Sidi Belabès et à l'ouest par le Maroc (Fig. 26).

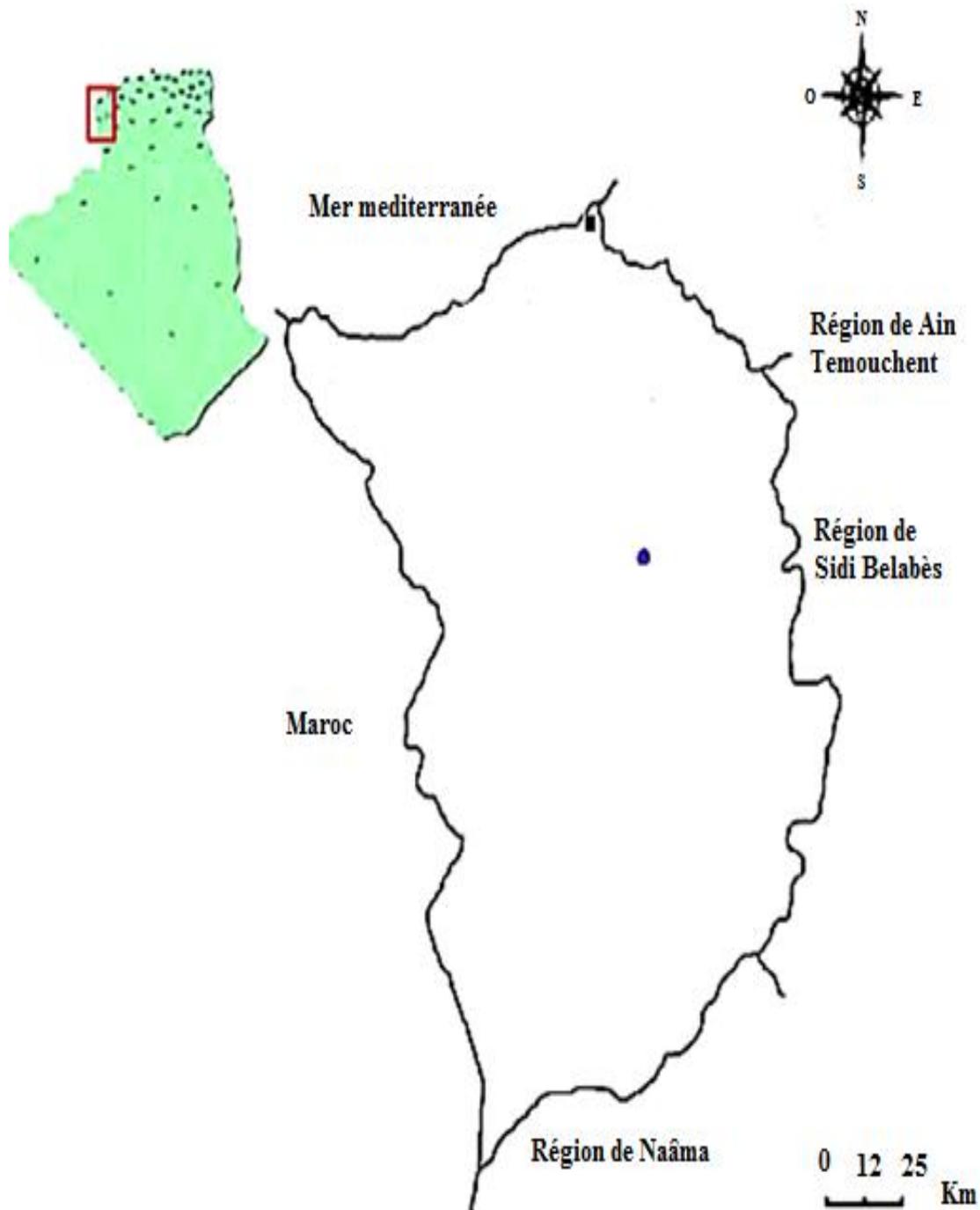
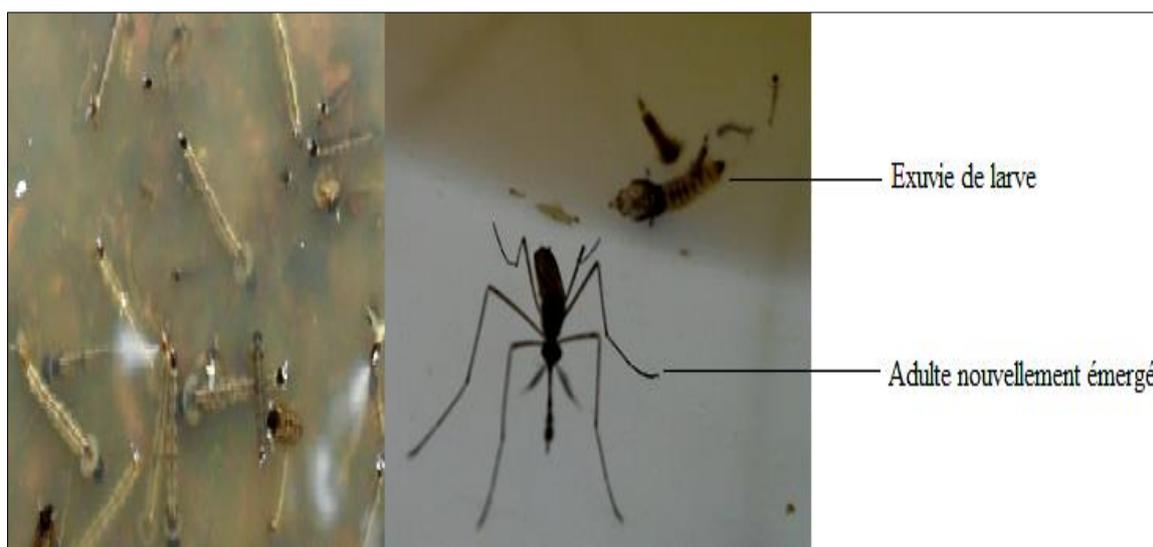


Figure 26. Carte géographique de Tlemcen (Belkhatir *et al.*, 2014)

### II.1.1.2. Les moustiques (*C. pipiens* L.)

Les larves (L2 et L4) de *C. pipiens* L. proviennent d'un site non traité à El Hamiz situé à 15 km de la capitale Alger (Algérie) (**Fig. 27**), et sont identifiés par le Pr. Baba Aissa de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie d'El Harrach (ENSA, Alger). La récolte a été faite à l'aide d'une louche métallique remplis de l'eau de gîte.



**Figure 27.** Larves et adultes de moustiques (**Toubal, 20018**)

Les larves ont été triées selon le critère taille (**Tab. 03**), mises dans des pots contenant de l'eau de gîte. L'élevage est réalisé au laboratoire VALCOR à température ambiante ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) dans des cages ayant comme dimension 20x20x20 cm. Les larves ont été nourries quotidiennement avec un mélange de levure de biscuit et de pain (70%, 30%). Le stade nymphal ne nécessite pas de nourriture (**Rodhain et Perez, 1985**). Les adultes sont nourries avec des souris nouvellement nées.

**Tableau 03.** Taille des différents stades larvaires

Stades larvaires	L1	L2	L3	L4
Taille	1- 1,15 mm	1,5- 2 mm	4- 5 mm	Jusqu'à 1 cm

### II.1.2 Matériel non biologique

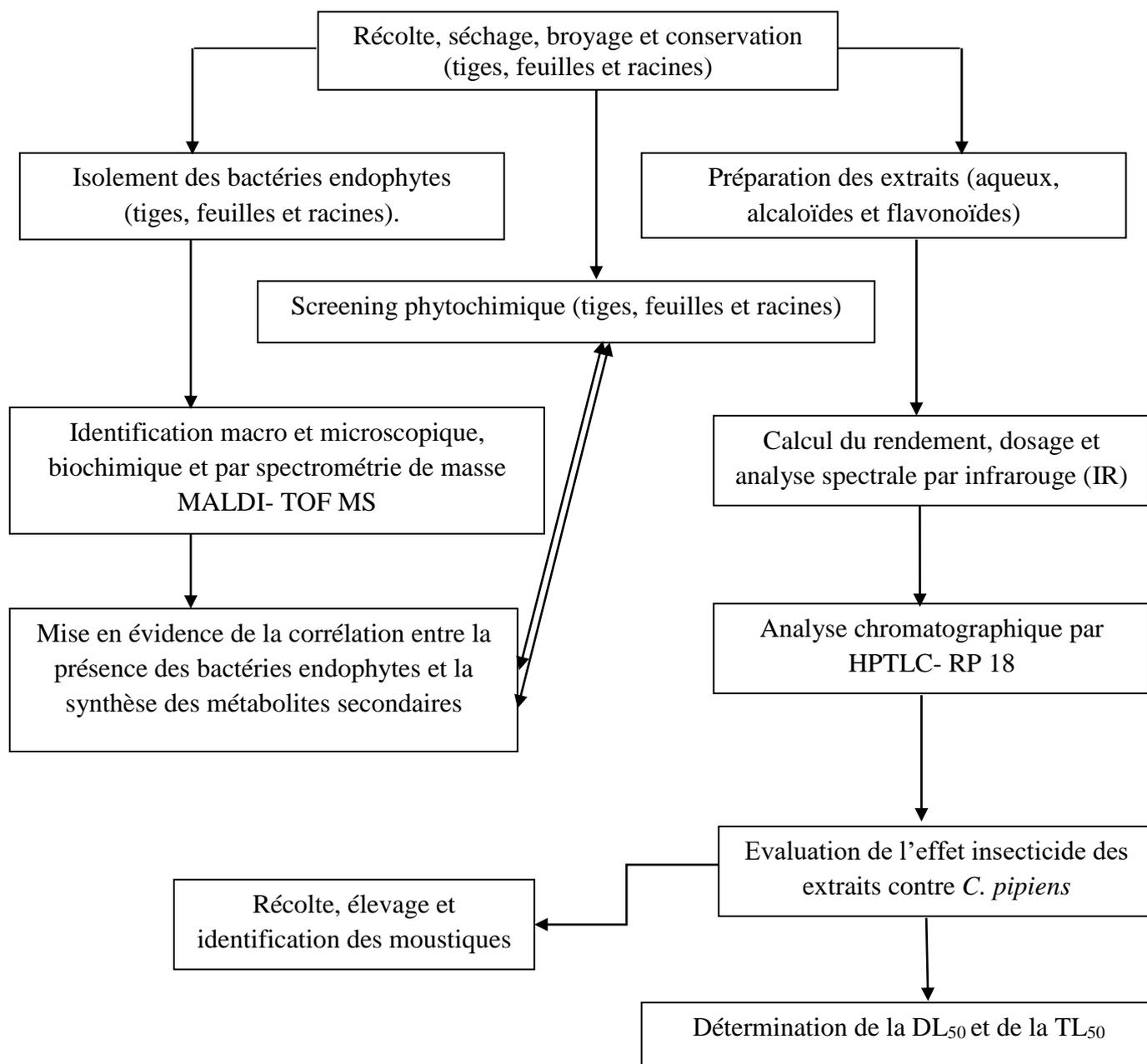
En vue de la réalisation de cette étude, un ensemble de verreries, de produits chimiques, de réactifs et d'appareillages est utilisé. Il s'agit de :

- **Milieux de cultures :** gélose nutritive (GN) (Réalab, Algérie), milieu chromagar orientation (Réalab, Algérie) (**Annexe 02-A**).
- **Produits et réactif d'identification biochimique :** Il s'agit de tests biochimiques (VP, indole, citrate, urée, nitrate, mobilité, mannitol, H<sub>2</sub>S, ONPG, TDA, glucose, lactose).
- **Solvants d'extractions :** les solvants organiques utilisés pour l'obtention des extraits sont l'Ether di éthylique, le méthanol, l'Ether de pétrole, l'Acétate d'éthyle et le Butanol (Sigma-Aldrich, Allemagne).
- **Autres produits utilisés :** les produits utilisés pour réaliser le screening phytochimique, le dosage des flavonoïdes, le MALDI-TOF MS, la caractérisation spectrale par infrarouge (IR) des extraits et l'HPTLC RP18 sont décrits dans l'annexe 02-B et l'annexe 02-C.
- **Appareillage :** spectrophotomètre (Optizen 2120 UV, Corée), rotavapeur (Stuart, France), Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation- Time- Of- Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) (Microflex LT MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics, France), et l'HPTLC- RP 18 (CAMAG, Suisse).

## II.2. Méthodes

L'étude comporte plusieurs étapes (**Fig. 28**), mais elle est essentiellement axée sur :

- L'isolement et l'identification des bactéries endophytes des différentes parties de la plante (tiges, feuilles et racines) ;
- La mise en évidence d'une éventuelle relation entre la présence de certains métabolites secondaires et les bactéries endophytes qui lui sont associées ;
- La collecte, l'élevage et l'identification des moustiques ;
- L'évaluation de l'effet insecticide des extraits aqueux, des flavonoïdes et des alcaloïdes de la Grande ortie récoltée de la région de Dellys (UDD) et de Tlemcen (UDT) sur les moustiques *C. pipiens*, et la détermination de la DL<sub>50</sub> et de la TL<sub>50</sub> ;
- Une étude statistique des résultats obtenus.



**Figure 28.** Schéma récapitulatif de différentes étapes de travail

### II.2.1. Récolte, séchage, broyage et conservation de la plante

La récolte de la plante entière est faite durant toute la durée de travail. Une partie de la récolte, séchée, broyée puis conservée, est utilisée pour réaliser les différentes extractions et les différentes analyses phytochimiques. L'autre partie est utilisée juste après la récolte pour l'isolement et l'identification des bactéries endophytiques.

Le séchage a été effectué à l'air libre et à l'abri de la lumière afin d'éviter toute altération des molécules bioactives de la plante. La durée du séchage est d'environ 30 jours. Une fois séchée, la plante est broyée en poudre très fine à l'aide d'un broyeur électrique (Philips, France) puis conservée dans des flacons en verres hermétiquement fermés.

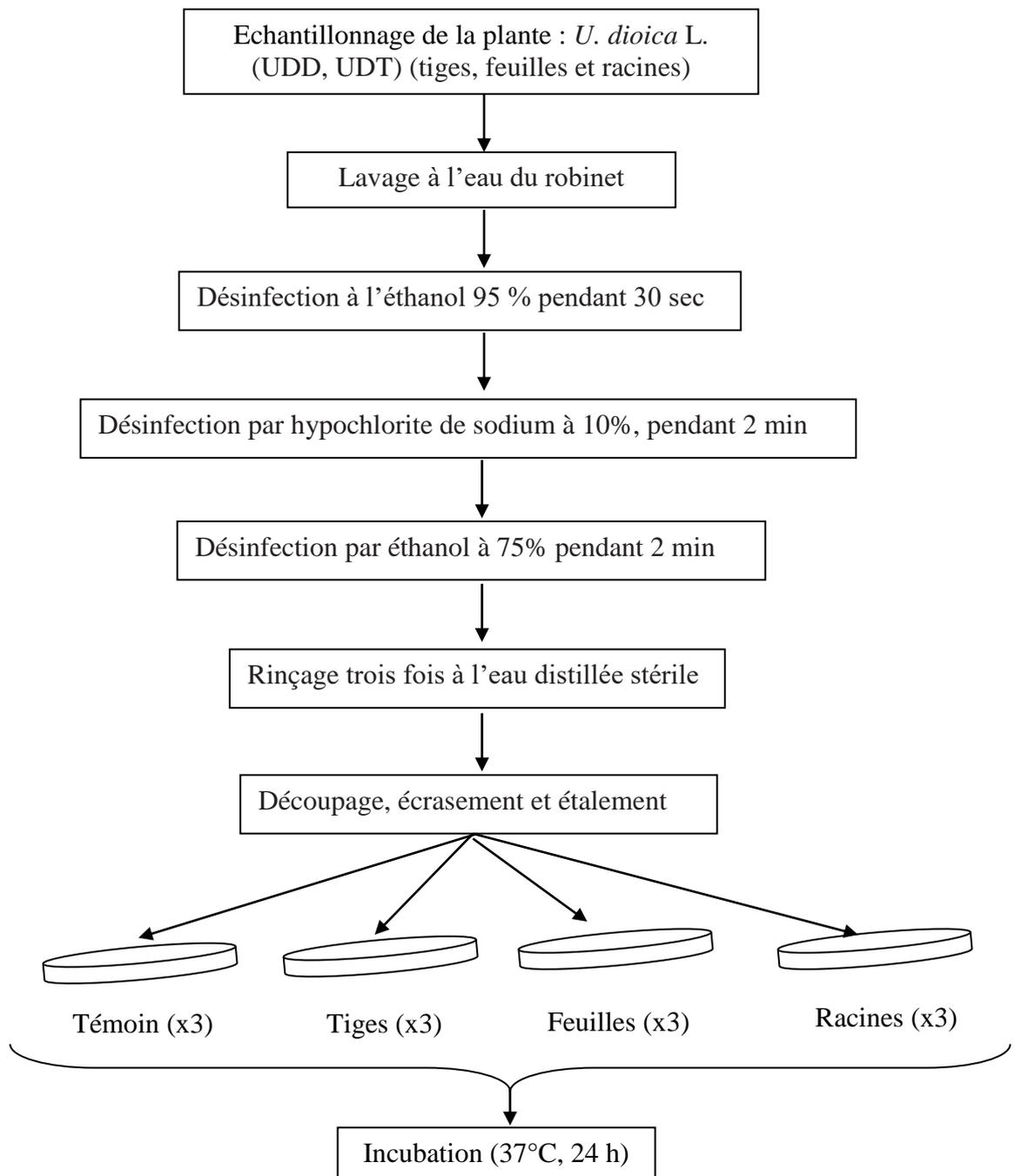
### II.2.2. Isolement des bactéries endophytes de la Grande ortie

La partie fraîche de la plante destinée aux études microbiologiques est récolté dans des conditions aseptiques à partir des plantes saines, dans un endroit aussi propre et ne semblant avoir aucun symptôme pathologique ou un dommage superficiel à l'œil nu. Ces derniers ont été acheminés au laboratoire VALCOR dans des bocaux en verre stériles en vue de leurs études microbiologiques dans un délai ne dépassant pas les 24h.

Au laboratoire, nous avons adopté la méthode décrite par **Arnold (1999)**, **Rubini et al. (2005)**, et **El Deeb et al. (2013)** avec quelques modifications. Ainsi, la surface de la Grande ortie (tiges, feuilles et racines) est préalablement lavée à l'eau du robinet, puis a subi une série de désinfection à l'éthanol à 95 % pendant 30 sec, à l'hypochlorite de sodium à 10%, pendant 2 min puis à l'éthanol à 75% pendant 2 min, de manière à éliminer les microorganismes présents sur le cortex. La plante entière (tiges, feuilles et racines) est ensuite rincée trois fois à l'eau distillée stérile pour éliminer les traces des désinfectants. La zone de prélèvement est choisie et les tissus superficiels sont découpés à l'aide d'un scalpel puis écrasés à l'aide d'une pince stérile. Un volume de 0,1 ml de la solution obtenue de chaque partie de la plante est déposé puis étalé à surface d'une boîte de Pétri contenant au préalable de la gélose nutritive (GN). Parallèlement, une boîte de Pétri contenant 0,1 ml d'eau distillée stérile étalée sur GN servira comme témoin.

L'ensemble est incubé dans une étuve à 37 °C pendant 24 h.

L'opération est répétée trois fois pour chacune des différentes parties d'*U. dioica* L. (tiges, feuilles et racines). Les différentes étapes du travail sont résumées dans le schéma ci-dessous (**Fig. 29**) :



**Figure 29.** Les différentes étapes de l'isolement des bactéries endophytes

#### a. Purification des souches

Après incubation, les souches bactériennes endophytiques ont été sélectionnées en se basant sur des critères morphologiques (forme, surface, élévation, taille, chromogénèse, contour et opacité). Une série de repiquage successive de 06 à 07 fois a été effectuée en utilisant la méthode des stries jusqu'à l'obtention des colonies pures et bien isolées.

### b. Codage

Les bactéries isolées ont été codées par deux lettres et un chiffre. La première lettre correspond à la partie de la plante, la seconde indique la zone de récolte, et le nombre renseigne l'ordre d'apparition des bactéries (**Tab. 04**).

**Tableau 04.** Codage des bactéries endophytes

Parties de la plante	Région d'étude	Exemple	Désignation
Racine « R »	Tlemcen	<b>RT1</b>	Racine de la région de Tlemcen, colonie n° 1
Tige « T »		<b>TT2</b>	Tige de la région de Tlemcen, colonie n° 2
Feuilles « F »	Dellys	<b>FD8</b>	Feuilles de la région de Dellys, colonie n° 8

### c. Conservation

#### c1. Conservation à courte durée

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, une colonie bactérienne jeune, bien isolée est prélevée, puis ensemencée par des stries serrées puis éloignées toute au long du tube stérile contenant au préalable de la gélose inclinée puis incubé (37°C, 24h). Les tubes à cultures positifs, conservés dans un réfrigérateur à 4°C, doivent être repiqués tous les quatre à six semaines afin de pouvoir toujours disposer de souches viables.

#### c2. Conservation à long terme

Elle s'effectue sur le milieu glycérol à 20 %. La méthode consiste à inoculé un tube eppendorf stérile contenant au préalable 1 ml de la solution glycérol à 20 % par des colonies jeunes et pures. L'incubation est faite à 37° C pendant 24 h. Les tubes formant un trouble sont conservés à -20°C pendant 1 an.

### II.2.3. Identification des souches bactériennes

Notre démarche pour l'identification des souches isolées est basée sur les études morphologique (aspect macro et microscopique), biochimique et par MALDI-TOF MS.

### II.2.3.1. Etude de l'aspect morphologique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,...etc ;
- La surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée,...etc ;
- L'élévation : convexe, concave, plate ;
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : punctiformes ou non punctiformes ;
- La chromogénèse : couleur de la colonie ;
- Le contour : régulier, irrégulier ;
- L'opacité : opaque, translucide ou transparente.

### II.2.3.2. Aspect microscopique

#### a. Mobilité à l'état frais

Il s'agit de déterminer si la bactérie est mobile ou non. Ce test permet également de déterminer la forme et l'arrangement des bactéries. Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle. L'observation se fait au microscope optique (Primo Star, Allemagne) au grossissement x10 puis x40.

#### b. Coloration de Gram

C'est une double coloration qui permet d'avoir une idée sur la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour préciser le caractère Gram+ ou Gram-. Avec cette double coloration, les bactéries Gram positive apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram négatives sont colorées en rose ou en rouge.

### II.2.3.3. Analyses biochimiques

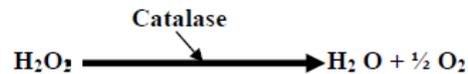
Les tests biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles.

## a. Études des enzymes respiratoires

### a1. Recherche de la catalase

#### ○ Principe

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



#### ○ Mode opératoire

Le test consiste à mettre en contact une colonie isolée, prélevée directement avec une pipette boutonnée ou une anse de platine à usage unique, avec une goutte d'eau oxygénée  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 volumes) préalablement déposée sur une lame de verre propre et sèche.

#### ○ Lecture des résultats

La présence d'une catalase est révélée immédiatement par des bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Guiraud, 2003).

### a2. Recherche de l'oxydase

#### ○ Principe

Ce test détecte un type de chaîne respiratoire, qui comporte un cytochrome C et une oxydase associée. Les bactéries possédant une telle chaîne peuvent oxyder les composés chimiques comme la réactive oxydase. Les électrons sont transférés de ce réactif au cytochrome C et de là, via l'oxydase, à l'oxygène.

#### ○ Mode opératoire

Une fois oxydé, le réactif développe une coloration violette sur le disque d'oxydase imbibé par la suspension bactérienne, ce qui indique un test positif (Guiraud, 2003).

## b. Etude des caractères biochimiques

Après l'étude de l'état frais, la recherche des enzymes respiratoires, et la coloration de Gram les souches sont identifiées par des tests biochimiques (VP, indole, citrate, urée, nitrate, mobilité, mannitol,  $\text{H}_2\text{S}$ , ONPG, TDA, glucose, lactose) (Annexe 03).

#### II.2.3.4. Identification bactérienne par spectroscopie de masse MALDI-TOF MS

##### ○ Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique microbiologique qui permet d'identifier les microorganismes en analysant directement leurs protéines. Cette technique est basée sur la génération de spectres de masse à partir de cellules entières et leur comparaison avec les spectres de référence après ionisation (**Sauget *et al.*, 2017**). D'après ces auteurs, cette technique est un outil d'identification facile à utiliser, rapide, précis et économique.

##### ○ Mode opératoire

Les étapes d'identification par spectroscopie de masse MALDI-TOF MS se résume comme suit :

##### a1. Préparation de la matrice

La matrice est préalablement préparée avant chaque série d'analyse en diluant une solution saturée d' $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (SigmaH, Lyon, France) dans 500 $\mu$ l de l'acétonitrile 50 % (v/v), 250 $\mu$ l de l'acide trifluoroacetic (TFA) 10 % (v/v) et 250  $\mu$ l d'eau HPLC. L'ensemble est secouer vigoureusement, soniqué pendant 10min, centrifugé (13000g, 5min) puis transféré dans un tube polypropylène propre.

##### a2. Etalement sur la cible et soumission dans l'appareil

Chaque colonie bactérienne obtenue à partir d'une culture jeune (18 à 24h) est déposée en double sur la plaque cible MALDI-TOF (BrukerDaltonics TM, Wissembourg, France) puis recouverte par 1,5  $\mu$ l de la solution de la matrice. L'ensemble (plaque cible et matrice) est séché à température ambiante pour quelques minutes avant d'être soumis dans l'appareil MALDI-TOF MS pour l'identification bactérienne (**Pfleiderer *et al.*, 2013**). Pour contrôler la charge sur les spectres de masse, la qualité de la matrice et la performance de l'appareil MALDI-TOF, la solution de matrice a été chargée en double sur chaque plaque MALDI-TOF avec et sans standard de test bactérien (BrukerProte in Calibration Standard I).

Un spectromètre de masse Microflex LT MALDI-TOF (BrukerDaltonics, Allemagne) a été utilisé pour l'identification bactérienne selon les recommandations du fabricant. Les spectres ont été enregistrés en mode linéaire, dans une plage de masses allant de 2 000 à 20 000 Daltons (Da). Pour chaque spectre, des données pour des coups de laser multiples ont été recueillies, additionnées et analysées.

- **Lecture des résultats**

Les spectres des bactéries obtenues sont comparés à la base de données de Bruker. Ainsi, un isolat était considéré correctement et significativement identifié au niveau de l'espèce lorsque la valeur de score logarithmique (LSV) du spectre est supérieure ou égale à 1,9 (**Seng et al., 2009**). Chaque colonie non identifiée a été testée successivement trois fois.

#### **II.2.4. Screening phytochimique**

Dans le but de détecter la richesse en substances bioactives (les métabolites primaires et secondaires) existant dans les différentes parties de la Grande ortie, un screening phytochimique a été effectué sur les tiges, les feuilles et les racines. Ce test est réalisé soit directement sur la poudre de la plante, soit sur son infusé à 5%. Les méthodes d'identification utilisées dérivent de celles décrites par (**Harborne et al., 1998 ; Raaman, 2006**).

L'infusé à 5% de chaque partie (tige, feuilles et racines) est préparé par l'addition de 5g de la poudre végétale à 100 ml d'eau distillée chaude. Après 15 à 20 min de contact, la solution est filtrée à l'aide d'un papier filtre, puis le filtrat obtenue est ajusté à 100ml d'eau distillée. Les différents tests destinés à l'identification des métabolites sont résumés dans le tableau suivant (**Tab. 05**) :

**Tableau 05.** Les différents tests du screening phytochimique et leurs résultats attendus

Métabolites	Mode opératoire	Résultats attendus
Anthocyanes	Rajouter quelques gouttes d'HCl à 5 ml de l'infusé	Rouge
Leuco-anthocyanes	2 g de la poudre végétale est additionnée dans 20 ml d'un mélange de Propanol / Acide chlorhydrique (v/v). Le mélange est porté en bain Marie bouillant pendant 15 mn	Rouge
Tanins	À 5 ml d'infusé, quelques gouttes d'une solution de FeCl <sub>3</sub> à 5% sont ajoutées	Bleuâtre ou bleue noire
Tanins catéchiques	15 ml d'infusé sont additionnés à 7 ml de réactif de Stiansy	Rouge
Tanins galliques	À 5 ml de l'infusé 2 g d'acétate de sodium et quelques gouttes de FeCl <sub>3</sub> sont rajoutés	Bleu foncé
Quinones libres	2 g de poudre humectées par 2 ml d'HCl N, sont mis en contact avec 20 ml de chloroforme pendant 3 heures. Le filtrat est agité avec 5 ml d'ammoniaque <sup>1/2</sup>	Rouge
Saponosides	À 2 ml d'infusé quelques gouttes d'acétate de plomb sont rajoutés	Précipité blanc
Alcaloïdes	Faire macérer 5 g de poudre humectées avec l'ammoniaque <sup>1/2</sup> pendant 24 h dans 50 ml d'un mélange éther chloroforme (3v/v). Le filtrat est épuisé par l'Acide chlorhydrique 2 N. Des réactions de précipitations sont réalisées sur la solution chlorhydrique	En présence d'alcaloïde, le réactif de Dragendroff donne un précipité rouge
Sénosides	Introduire dans une fiole conique 2,5 g de poudre, puis 50 ml d'eau distillée et 2 ml d'HCl concentré sont rajoutés. Le mélange est chauffé dans un bain Marie pendant 15 mn. Après refroidissement, la solution est agitée avec 40 ml d'éther. La couche étherée est séparée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre, ensuite évaporer à siccité. Au résidu refroidi, 5 ml d'Ammoniaque dilué (1/2) sont rajoutés	Elle se développe une coloration jaune ou orangé. Le chauffage de cette solution au bain Marie pendant 2 mn donne une coloration violette rouge en présence des sénosides
Coumarines	Faire bouillir à reflux 2 g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 mn puis filtrer. À 5 ml du filtrat 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10% et quelques gouttes d'HCl à 10% sont rajoutées	Formation d'un trouble
Amidon	À 2 g de poudre végétale rajouter quelques gouttes d'Iode (I <sub>2</sub> )	Coloration bleu violette
Flavonoïdes	Additionner à 5 ml d'infusé 5 ml d'HCl, un copeau de Mg et 1 ml d'Alcool isoamylique	Rouge orangé
Glucosides	Rajouter à 2 g de poudre végétale quelques gouttes de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rouge brique ensuite violette
Mucilages	Introduire 1 ml d'infusé dans un tube à essai, ajouter 5 ml d'alcool absolu	Après 10 mn, précipité floconneux
Iridoïdes	Rajouter à 2 ml de l'infusé, quelque gouttes de l'acide chlorhydrique	Après chauffage, une coloration bleu

### II.2.5. Mise en évidence de la corrélation

Afin de mettre en évidence les relations existantes entre la répartition des endophytes dans les différentes parties de la plante, et la présence des métabolites secondaires, nous avons appliqué aux résultats obtenus une analyse comparative qualitative.

### II.2.6. Préparation des extraits végétaux

#### II.2.6.1. Préparation de l'extrait aqueux

##### a. Principe

Le principe de cette extraction consiste à dissoudre la poudre végétale obtenue à partir de la plante entière (tiges, feuilles et racines) dans de l'eau distillée.

##### b. Mode opératoire

Selon **Bnouham et al. (2003)**, 10 g de chaque plante (UDD et UDT) (tiges feuilles et racines) sont mélangé avec 100ml d'eau distillée préalablement portée à ébullition. Après 20 à 30 min de refroidissement sous agitation à l'aide d'un agitateur (Ibx instruments, Allemagne), on procède à une filtration par un papier Whatman (2 mm). Le filtrat récupéré représente une solution stock initiale à 10%. Une évaporation sous vide au moyen d'un rotavapeur de type Stuart à 40°C a été effectuée.

#### II.2.6.2. Extraction des alcaloïdes

##### a. Principe

La plupart des alcaloïdes sont extraits en utilisant les caractères de solubilité, d'une part dans l'eau, d'autre part dans un solvant organique. Il s'agit en général de faire passer en solution un produit solide (extraction solide-liquide) ou encore de faire passer un produit dissous d'une phase liquide à une phase extractive non miscible avec la précédente (extraction liquide-solide) (**Bruneton, 1999**).

##### b. Protocole d'extraction

La méthode adoptée pour extraire les alcaloïdes d'*U. dioica* L. récoltée à Dellys est celle décrite par **Bruneton (1999)**. Les étapes suivies sont :

- Mettre 30 g de la poudre végétale pulvérisées dans un bécher de 250 ml, puis rajouter 125 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10 %. Agitation et macération pendant 24 h à température ambiante puis filtration ;

- Alcalinisation à pH=9 par NaOH à 30 % ;
- Extraction liquide- liquide par deux fois 40 ml de chloroforme (solvant organique apolaire) à partir du contenu transvaser dans une ampoule à décanter puis procéder à une décantation pour soustraire la phase organique ;
- Les phases organiques réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre puis filtrées, et le solvant est évaporé sous pression réduite à l'aide d'un évaporateur électrique de type Stuart à 45° C.

### II.2.6.3. Extraction des flavonoïdes

#### a. Principe

Tous les flavonoïdes n'ont pas la même propriété de solubilité car certains sont solubles dans l'eau et l'alcool, alors que d'autres ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faible, de ce fait le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité dans les solvants organiques (**Bruneton, 1999**).

#### b. Protocole expérimental

L'extraction des flavonoïdes est réalisée selon la méthode décrite par **Markham (1982)**, avec modification inspirée de la méthode de **Bruneton (1993)**. Elle est basée sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques et qui comprend deux grandes étapes (**Fig. 30**).

##### b1. La macération

Cette phase d'extraction est effectuée à partir de 30 g de la matière sèche finement broyée dans du méthanol à 85 % pendant trois jours à 4° C. Le macérât obtenu est filtré à travers la mousseline. Une seconde extraction suivie d'une filtration du macérât est réalisée sur le sédiment par le méthanol à 85 %. Afin d'éliminer toute trace des autres métabolites, une troisième extraction est effectuée avec le méthanol à 50 %, suivie d'une filtration. Les trois filtrats obtenus des différentes extractions sont combinés, filtrés, puis évaporés à basse pression à 45° C. La phase aqueuse ainsi obtenue est conservée à 4° C pendant 48 h pour accélérer la diffusion des molécules dans les solvants. Enfin, le filtrat combiné subit une filtration afin d'éliminer les salissures.

### **b2. Fractionnement des flavonoïdes par les solvants**

Dans le but de débarrasser le filtrat des cires, des lipides et de la chlorophylle, plusieurs lavages successifs avec l'éther de pétrole (v/v) sont réalisés. La séparation des flavonoïdes en fractions aglycones, requière le mélange de la phase aqueuse avec l'éther diéthylique (v/v). L'obtention des flavonoïdes monoglycosides de la phase aqueuse nécessite l'utilisation de l'acétate d'éthyle. La phase aqueuse restante mélangée avec le n-butanol permet de récupérer les flavonoïdes di et triglycosides. La phase aqueuse finale contient surtout les flavonoïdes glycosylés (plus polaires). Les quatre fractions récoltées sont concentrées par évaporation à basse pression à 45°C (**Fig. 30**). Les quatre fractions obtenus conservées à 4°C vont servir par la suite au dosage quantitatif par spectrophotométrie UV-visible, analyse chromatographique et à l'évaluation de leurs activités insecticides.

### **b3. Calcul du rendement**

Le calcul du rendement en flavonoïdes dans les différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée, il est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{M - M_0}{M_T} \times 100$$

**Avec :**

**R%** : Taux de la matière extraite ;

**M** : Masse du ballon avec l'extrait (g) ;

**M<sub>0</sub>** : Masse du ballon vide (g) ;

**M<sub>T</sub>** : Masse végétale totale utilisée à l'extraction.

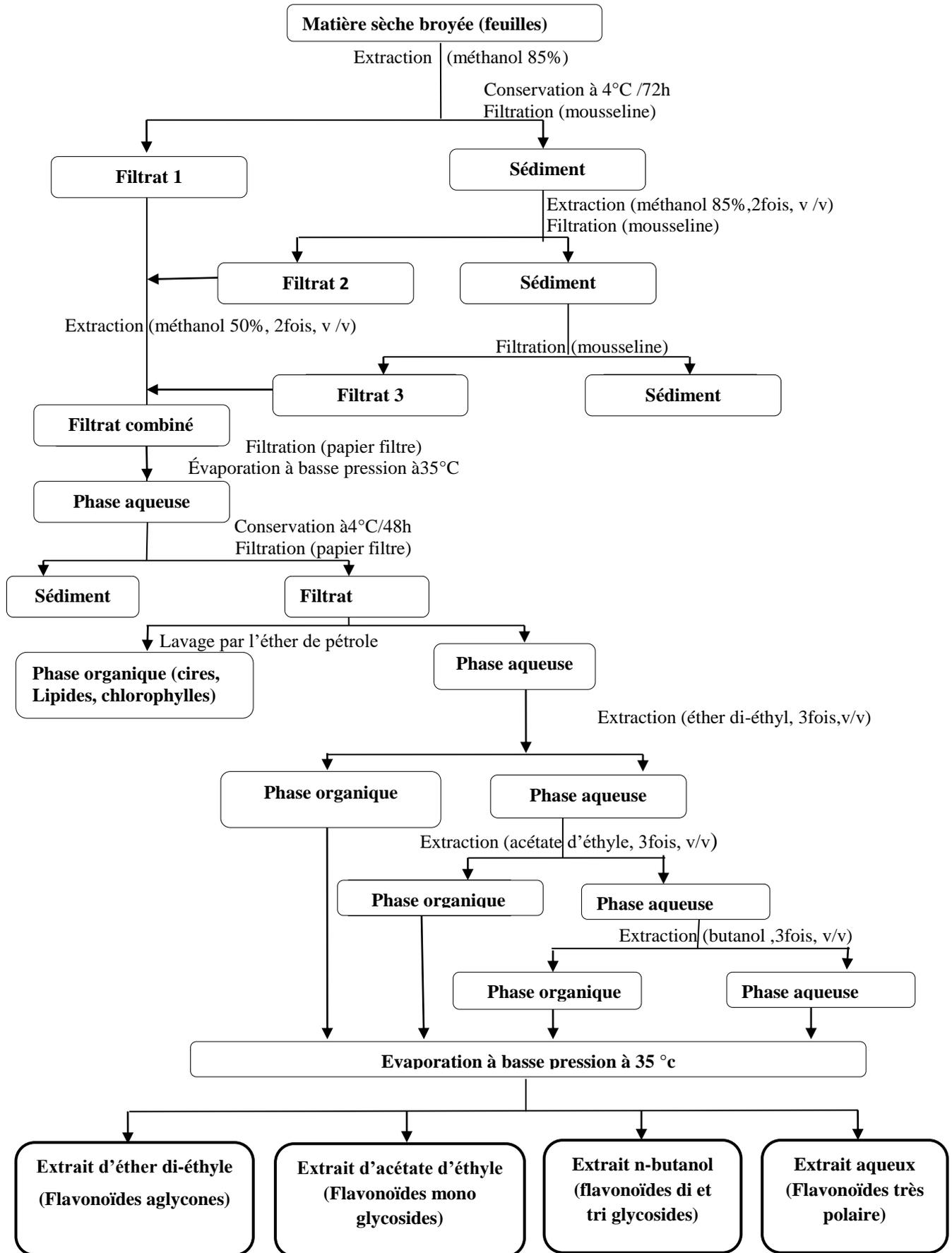


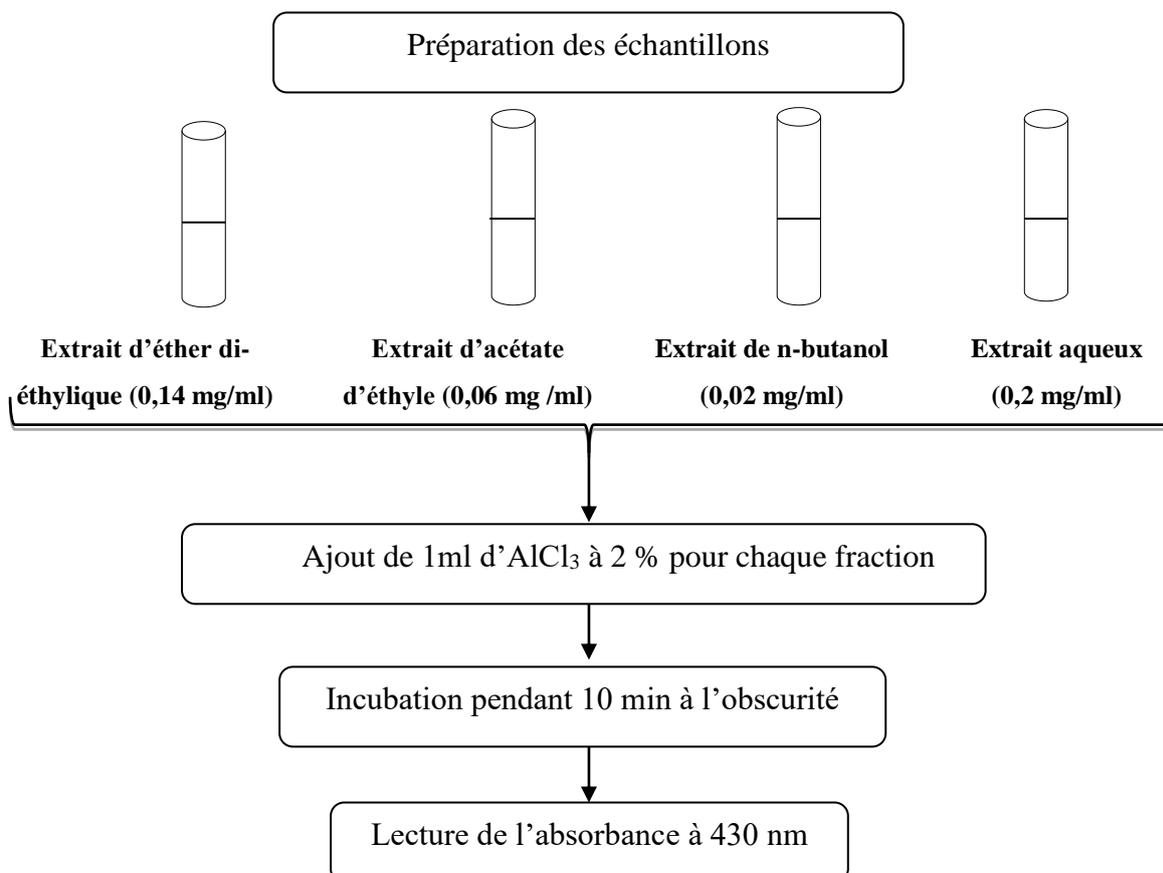
Figure 30. Protocole d'extraction des flavonoïdes (Markham, 1982 ; Bruneton, 1999).

#### II.2.6.4. Dosage par spectrophotométrie UV-visible

La méthode du trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes (**Bahorun et al., 1996 ; Yi et al., 2007**). Les échantillons sont préparés par la dissolution des extraits secs obtenus lors de l'extraction dans le méthanol :

- Extrait d'éther di-éthylique (0,14 mg/ml) ;
- Extrait d'acétate d'éthyle (0,06 mg /ml) ;
- Extrait de n-butanol (0,02 mg/ml) ;
- Extrait aqueux (0,2 mg/ml).

A 1 ml de chaque échantillon, 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (dissous à raison de 2% dans le méthanol) est ajouté. Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm. La valeur de l'intensité obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes présente dans l'échantillon. Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0-350  $\mu\text{g/ml}$ ) (**Annexe 04-A**) et exprimées en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait). Le protocole expérimental est résumé dans la figure ci-dessous (**Fig. 31**) :



**Figure 31.** Dosage des différentes fractions flavonoïdiques

## II.2.7. Caractérisation spectrale et chromatographique des extraits

### II.2.7.1. Analyse par spectrométrie infrarouge des flavonoïdes et des alcaloïdes

#### a. Principe

L'objectif de la spectrométrie infrarouge est l'identification des fonctions chimiques présentes dans un produit. Le principe de cette méthode se base sur les liaisons, entre les atomes composant une molécule et qui possèdent des fréquences de vibration propre. Ces liaisons absorbent les rayons électromagnétiques d'énergie correspondante. Ainsi, la molécule absorbe les rayonnements infrarouges différemment à diverses fréquences, chacune est caractéristique d'une fonction chimique.

#### b. Mode opératoire

Les spectres infrarouges ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Nicolet 560 transformé de piloté par ordinateur pour une gamme de fréquences comprises entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Les échantillons sont déposés sur pastilles de KBr. L'appareil dispose d'une source lumineuse, d'un filtrage numérique destiné à compenser les émissions de  $\text{CO}_2$  et l'absorption d' $\text{H}_2\text{O}$  en temps réel, d'un interféromètre, d'un compartiment échantillon, d'un détecteur ou capteur photosensible et d'un convertisseur analogique numérique qui transforme le signal analogique en un signal numérique manipulable par le système informatique.

### II.2.7.2. Caractérisation chromatographique des flavonoïdes et des alcaloïdes par HPTLC- RP 18

Les composés ont été identifiés par chromatographie sur couche mince à haute performance en phase inverse HPTLC-RP 18 (CAMAG, Suisse). Les conditions expérimentales se résume à une plaque de silice 60 F<sub>254</sub> (10 cm x 10 cm avec 0,2 mm d'épaisseur, Allemagne) où les échantillons ont été déposés sous forme de bande en utilisant une seringue à injection automatique (CAMAG, Suisse), une cuve CAMAG était préalablement saturée avec le solvant de migration et une phase mobile composée d'un mélange de méthanol, d'eau distillée et de HCl (50%, 50%, 1%). Le volume d'injection est de 20  $\mu\text{l}$ . Après la migration, la plaque a été déchargée sur une plaque de chauffage CAMAG puis analysée à 200 nm à l'aide du logiciel WinCATS version 4.03.

## II.2.8. Evaluation de l'effet insecticide

### II.2.8.1. Activité larvicide de l'extrait aqueux

Afin d'évaluer l'effet de l'extrait aqueux de la Grande ortie (UDD et UDT) contre les larves L2 et L4 de *C. pipiens* L. différentes doses (D1, D2, D3, D4, D5 et D6) correspondant à 10, 5, 4, 3, 2 et 1% successivement ont été préparé.

La méthodologie suivie est inspirée de la technique des tests de sensibilité normalisés par l'Organisation Mondiale de la Santé, adoptée pour tester la sensibilité des larves de moustiques, vis-à-vis des insecticides utilisés en campagnes de lutte (OMS, 1963).

À partir de l'extrait initial (solution stock 100 g/l ou 10 %) des concentrations de 10%, 5%, 4%, 3%, 2% et 1% ont été préparées avec de l'eau de gîte. Les tests sont réalisés dans des béchers de 5 cm de diamètre contenant chacun 100 ml de la solution aqueuse et 10 larves de moustiques de la même espèce et du même calibre. Le même nombre de larves est placé dans un bécher témoin contenant 100 ml d'eau du gîte larvaire. Pour chacune des concentrations de l'extrait ainsi que pour le témoin, quatre répétitions sont effectuées. Les mortalités ont été calculées après un temps de contact de 2 h, 4 h, 24 h, 48 h, et 72 h.

### II.2.8.2. Activité larvicide des alcaloïdes

L'effet des alcaloïdes d'UDD sur les larves L4 de *C. pipiens* L. est évalué en testant cinq doses (D1, D2, D3, D4 et D5) correspondant à 100 %, 70 %, 50 %, 25% et 10% respectivement solubilisées dans 50 ml d'eau de gîte. Ainsi, pour 100 ml de chaque dose, 10 larves de *C. pipiens* du quatrième stade sont introduites. Le lot témoin est préparé avec l'eau de gîte uniquement. L'opération est répétée trois fois pour toutes les doses. Les mortalités ont été calculées après un temps de contact de 30 min, 1h, 24 h, 48 h, et 72 h.

### II.2.8.3. Activité larvicide des flavonoïdes

Afin d'évaluer l'effet des quatre fractions flavonoïdiques d'UDT vis-à-vis les larves L4 de *C. pipiens*, différentes doses (D1, D2, D3, D4, D5 et D6) correspondant à 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % et 1% successivement ont été préparé.

En se basant sur les tests préliminaires, la solution mère (SM) a été préparée à partir de 250 mg de chaque fraction dissous dans 50ml d'eau de gîte. Dans le but d'obtenir les différentes doses (D1, D2, D3, D4, D5 et D6). Un volume bien déterminé de la solution mère est introduit dans les tubes renfermant préalablement un volume précis d'eau de gîte et 20 larves chacun. Les observations sont comparées avec un lot témoin de 10 ml d'eau de gîte contenant

20 larves. Le nombre de morts a été déterminé après 30 min, 1 h, 24 h, et 48 h d'exposition. Le test est répété trois fois.

○ **Analyse des données**

Le pourcentage de mortalité observé pour chaque extrait (extrait aqueux, flavonoïdes et alcaloïdes) chez les larves L4 de *C. pipiens* L. témoins et traitées a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux de mortalité \%} = (\text{Nombre de mort} / \text{nombre total d'individus}) \times 100$$

Les mortalités observées ont été corrigées à l'aide de la formule d'**Abbott (1925)**, en tenant compte des mortalités naturelles dans les lots témoins.

$$M_c = [(M_2 - M_1) / 100 - M_1] \times 100$$

**Avec :**

**M1 :** Pourcentage de mortalité dans le lot témoin ;

**M2 :** Pourcentage de mortalité dans le lot traité ;

**Mc :** Pourcentage de mortalité corrigée.

○ **Détermination de la DL<sub>50</sub>**

La dose létale 50 (DL<sub>50</sub>) est la dose nécessaire causant la mortalité de la moitié de la population, elle est calculée à partir de la droite de régression des probits [y=ax+b] correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des doses de traitement. La table des probits de **Cavelier (1976)**, est utilisée à cet effet (**Annexe 04-B**). La DL<sub>50</sub> est calculée à partir des droites de régression Probits = f (log dose) comme suit :

$$Y = a + \log (X)$$

**Dont :**

**Y :** Valeur de probit correspondant à l'effet insecticide (probit de mortalités corrigées) ;

**X :** Dose des extraits testés ;

**a :** La pente.

- **Détermination de la TL<sub>50</sub>**

Le temps létal 50 (TL<sub>50</sub>) correspond au temps nécessaire pour que périssent 50% des individus exposés à une concentration déterminée. Il est calculé à partir de la droite de régression des probits correspondant aux pourcentages des mortalités corrigés en fonction des logarithmes des temps de traitement (probits= $f(\log \text{ temps})$ ) comme suit :

$$Y = a + \log (X)$$

**Dont :**

**Y :** Valeur de probit correspondant à l'effet insecticide (probit de mortalités corrigées) ;

**X :** Temps ;

**a :** La pente.

#### **II.2.8.4. Expression des résultats**

La significativité des résultats de test insecticide des différents extraits de la Grande ortie a été déterminée en utilisant l'analyse de la variance ANOVA à un facteur, suivi par le test de Tukey à l'aide du logiciel Statistica version 6. Les valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme significatives.

## *CHAPITRE III*

### *RÉSULTATS ET DISCUSSION*

### III.1. Identification des bactéries endophytes

#### III.1.1. Orientation macroscopique, microscopique et biochimique

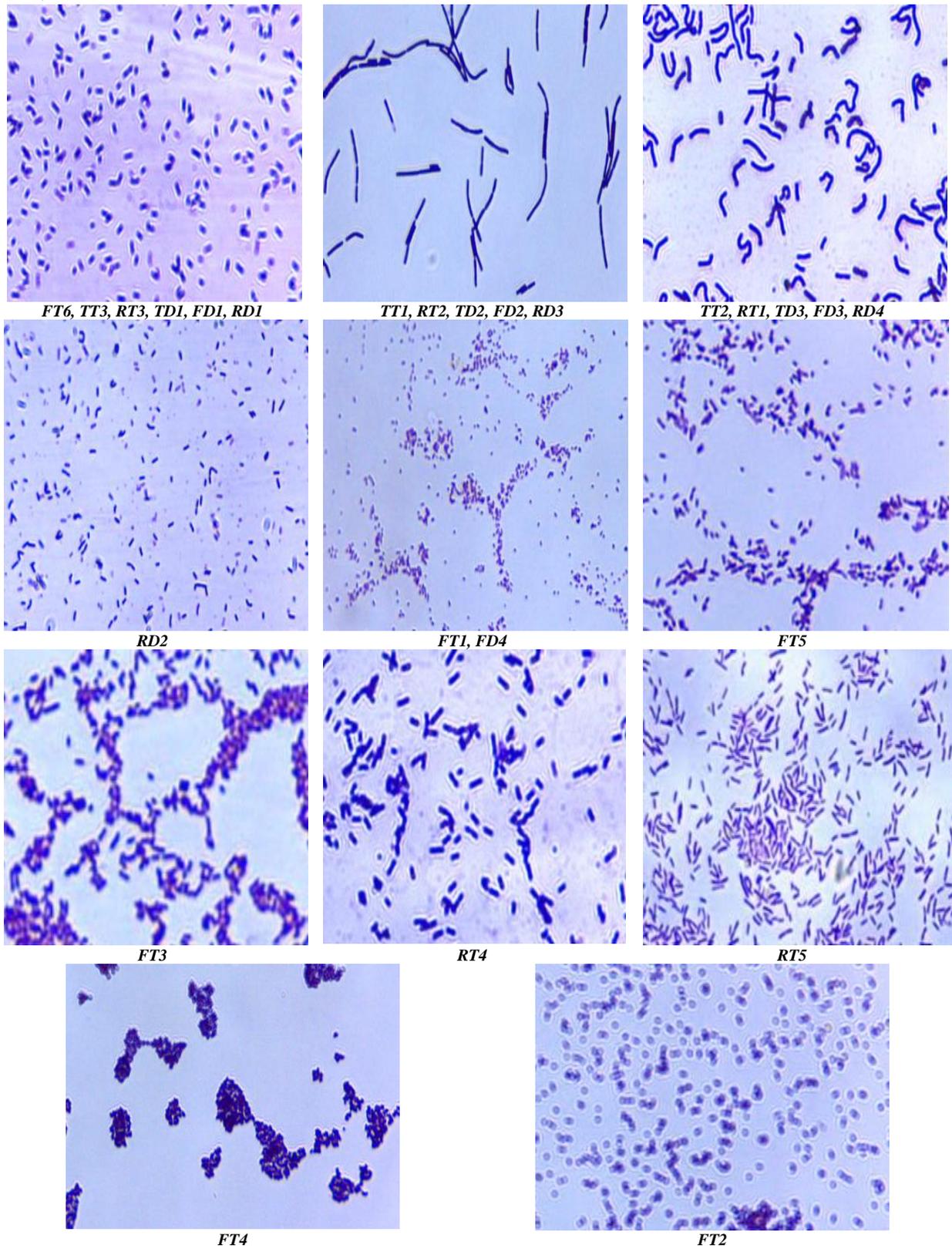
L'étude de l'aspect macroscopique et microscopique nous a donné une première orientation vers la détermination des espèces bactériennes. L'ensemble des résultats de l'identification est résumé dans le tableau 06.

En se basant sur les critères morphologiques et biochimiques, un total de 57 souches endophytiques ont été isolées à partir de la Grande Ortie dont 35 d'*U. dioica* L. de Tlemcen « UDT » et 22 souches de Dellys « UDD ». Les différentes souches appartiennent à cinq familles différentes essentiellement des Bacillaceae, des Paenibacillaceae, des Enterobacteriaceae, des Enterococcaceae et des Staphylococcaceae (**Fig. 32 ; Tab. 07**).

**Tableau 06.** Aspect macroscopique et microscopique des bactéries isolées

Codes	Aspect macroscopique						Aspect microscopique			
	Forme	Surface	Élévation	Taille	Chromogénèse	Contour	Opacité	Etat frais	Spores	Gram
<b>TT1</b> <b>RT2</b> <b>TD2</b> <b>FD2</b> <b>RD3</b>	Colonie large et arrondie	Rugueuse	Plate	<4mm	Jaunâtre	Irrégulier	Opaque	Long bacilles en chaîne immobile	+	+
<b>TT2</b> <b>RT1</b> <b>TD3</b> <b>FD3</b> <b>RD4</b>	Colonie moyenne, ronde	Lisse	Plate	<2mm	Beige	Irrégulier	Opaque	Petits bacilles en chaîne immobile	+	+
<b>FT6</b> <b>TT3</b> <b>RT3</b> <b>TD1</b> <b>FD1</b> <b>RD1</b>	Grande colonie	Lisse	Plate	3mm	Blanchâtre	Irrégulier	Opaque	Petits bacilles en chaîne	+	+
<b>RD2</b>	Grande colonie	Lisse	Plate	<2mm	Blanchâtre	Irrégulier	Opaque	Petits bacilles mobiles	+	+
<b>FT1</b> <b>FD4</b>	Petite colonie ronde et bien isolée	Brillante	Bombée	>1mm	Blanchâtre	Régulier	Translucide	Colibacilles mobile	-	-
<b>FT5</b>	Petite colonie	Lisse	Plate	>1mm	Transparente	Régulier	Translucide	Petits bacilles mobiles	-	-
<b>FT3</b>	Colonie ronde	Lisse	Plate	>1mm	Blanchâtre	Régulier	Opaque	Cocci mobile	-	-
<b>FT4</b>	Petite colonie convexe et ronde	Lisse, brillante	Bombée	>1mm	Blanchâtre	Régulier	Opaque	Cocci en grappe	-	+
<b>FT2</b>	Ronde	Sèche	Légèrement bombé	≈2mm	Blanchâtre	Régulier	Opaque	Cocci mobile	-	+
<b>RT4</b>	Grande colonie	Rugueuse	Plate	>1mm	Blanchâtre	Irrégulier	Opaque	Petits bacilles	-	+
<b>RT5</b>	Grande colonie	Rugueuse	Plate	>1mm	Blanchâtre	Irrégulier	Opaque	Bacille	-	+

*TT : Tiges Tlemcen, TD : Tiges Dellys, RT : Racines Tlemcen, RD : Racines Dellys, FT : Feuilles Tlemcen, FD : Feuilles Dellys*



**Figure 32.** Aspect microscopique des bactéries endophytes associées à la Grande ortie après coloration de Gram (Gr x 40) (Originale, 2018).

*TT* : Tiges Tlemcen, *TD* : Tiges Dellys, *RT* : Racines Tlemcen, *RD* : Racines Dellys, *FT* : Feuilles Tlemcen, *FD* : Feuilles Dellys

**Tableau 07.** Etude biochimique des bactéries isolées

Codes	Catalase	Oxydase	Acétoïne (VP)	Indole	Citrate	Uréase	Nitrate	Mobilité	Mannitol	H <sub>2</sub> S	ONPG	TDA	Glucose	Lactose
TT1 RT2 TD2 FD2 RD3	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
TT2 RT1 TD3 FD3 RD4	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	/	+	-
FT6 TT3 RT3 TD1 FD1 RD1	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
RD2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
FT1 FD4	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
FT5	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
FT3	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
FT4	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
FT2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	/	+	+
RT4	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	/	+	+
RT5	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	/	+	+

*TT : Tiges Tlemcen, TD : Tiges Dellys, RT : Racines Tlemcen, RD : Racines Dellys, FT : Feuilles Tlemcen, FD : Feuilles Dellys*

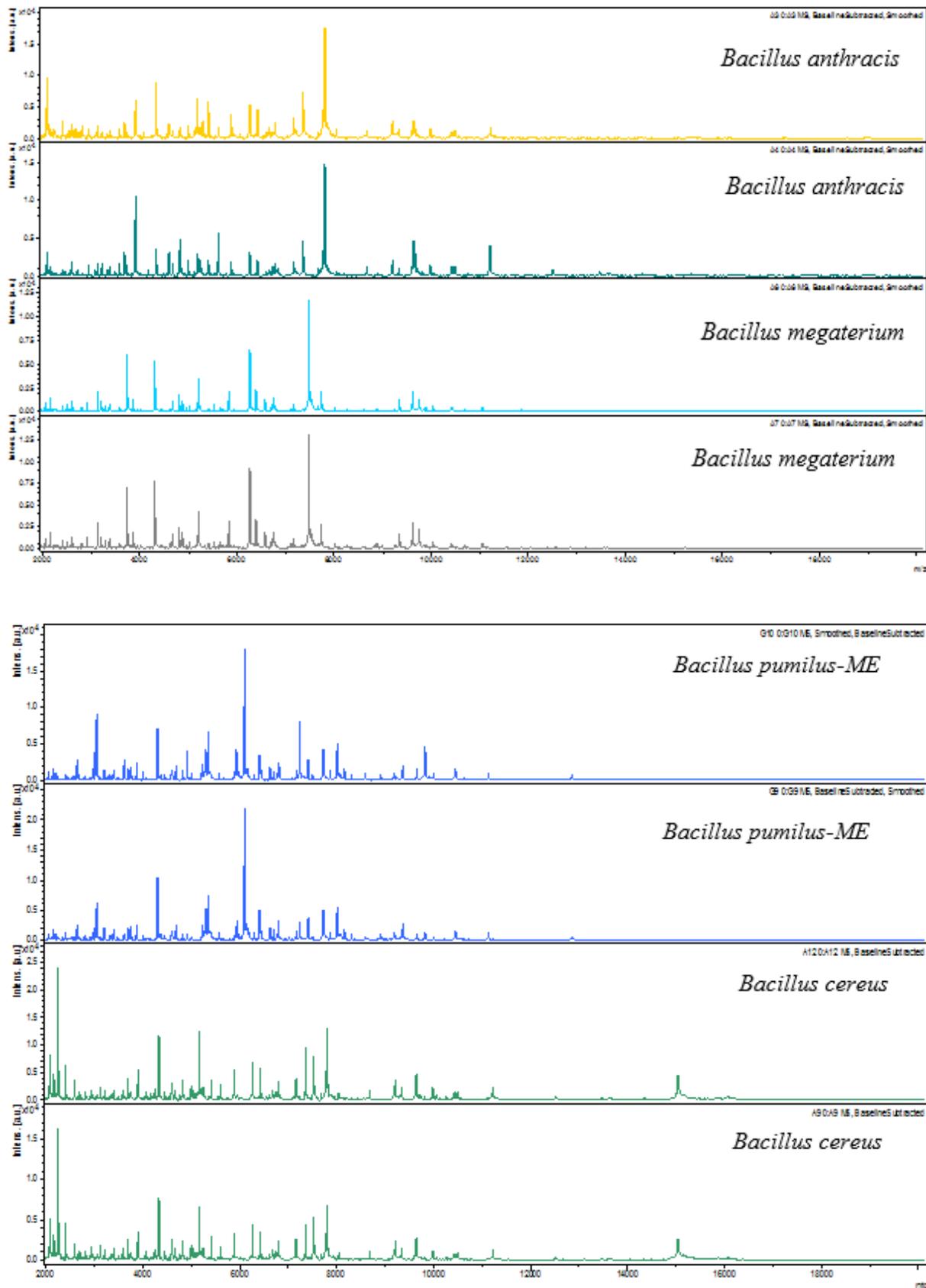
### III.1.2. Identification par spectroscopie de masse (MALDI-TOF MS)

L'identité des différentes souches isolées a été complétée par MALDI-TOF MS. Les valeurs des scores obtenus sont notées sur le tableau 08. Parmi les 57 isolats analysés par MALDI-TOF MS, huit bactéries n'ont pas été identifiées. Parmi eux, cinq bactéries sont des bacilles à Gram+, trois sous forme de cocci Gram+ et deux colibacilles à Gram-. Les 11 espèces identifiées appartiennent à différentes familles (**Figure 33, 34, 35, 36 et 37**).

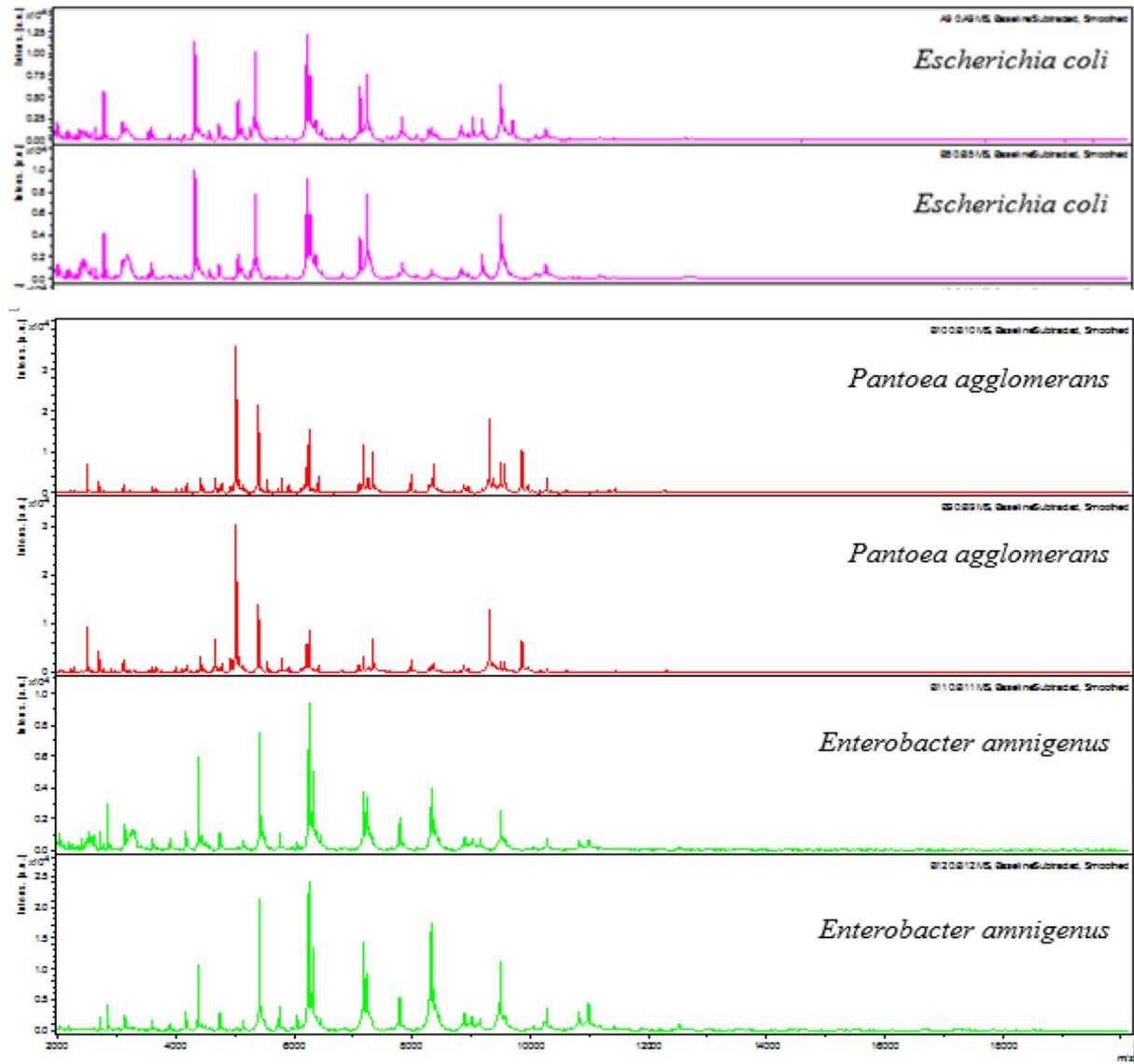
**Tableau 08.** Identification des bactéries endophytes d'*U. dioica* L. par MALDI-TOF MS

Codes	Organisme best match	Région d'étude	Nombres			%	Score value (LSV)	Couleur	Signification des résultats
			S	L	R				
TT1 RT2 TD2 FD2 RD3	<i>Bacillus anthracis</i>	T	2	/	5	20	2,317	V	Identification correcte du genre et de l'espèce
		D	2	5	/	22,72	2,226	V	
TT2 RT1 TD3 FD3 RD4	<i>Bacillus megaterium</i>	T	/	/	5	14,28	2,07	V	
		D	1	2	2	22,72	2,302	V	
FT6 TT3 RT3 TD1 FD1 RD1	<i>Bacillus pumilus-ME</i>	T	3	1	1	14,28	2,233	V	
		D	5	2	2	40,90	2,404	V	
RD2	<i>Bacillus cereus</i>	D	/	/	1	4,54	2,26	V	
FT1 FD4	<i>Escherichia coli</i>	T	/	5	/	14,28	2,354	V	
		D	/	1	/	4,54	2,243	V	
FT5	<i>Pantoea agglomerans</i>	T	/	1	/	2,85	2,175	V	
FT3	<i>Enterobacter amnigenus</i>	T	/	1	/	2,85	2,293	V	
FT4	<i>Staphylococcus cohnii</i>	T	/	1	/	2,85	2,024	V	
FT2	<i>Enterococcus faecium</i>	T	/	1	/	2,85	2,405	V	
RT4	<i>Paenibacillus lautus</i>	T	/	/	1	2,85	1,875	J	Identification correcte du genre
RT5	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	T	/	/	1	2,85	1,757	J	
Not	?	T	2	1	4	20	<1,7	R	Non identifiées
		D	/	/	1	4,54			

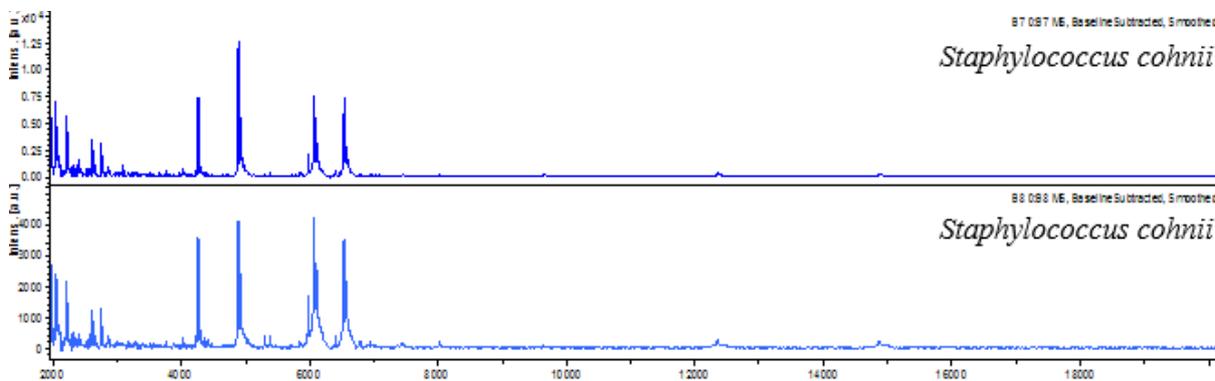
TT: Tiges Tlemcen, TD: Tiges Dellys, RT: Racines Tlemcen, RD: Racines Dellys, FT: Feuilles Tlemcen, FD: Feuilles Dellys, R: Root, V: Vert, J: Jaune, R: Rouge, Not: Non identifiées



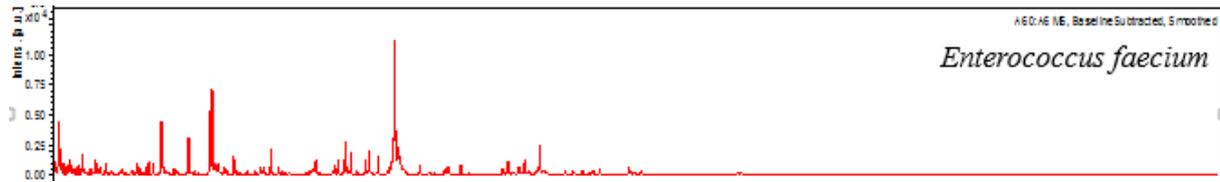
**Figure 33.** Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Bacillaceae associés à la Grande ortie



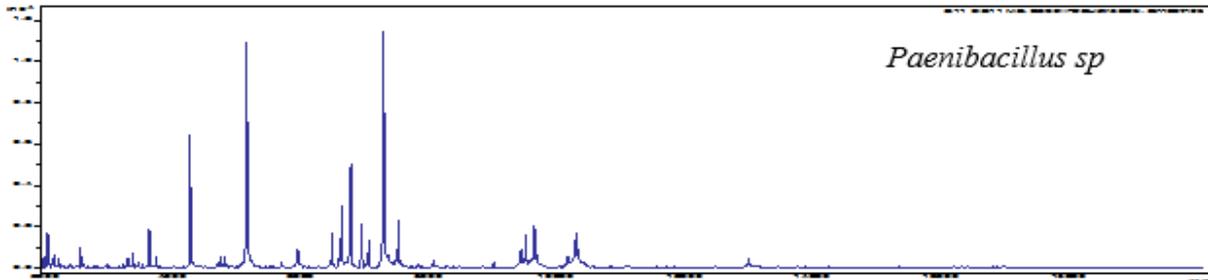
**Figure 34.** Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Enterobacteriaceae associés à la Grande ortie



**Figure 35.** Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Staphylococcaceae associés à la Grande ortie



**Figure 36.** Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Enterococcaceae associés à la Grande ortie



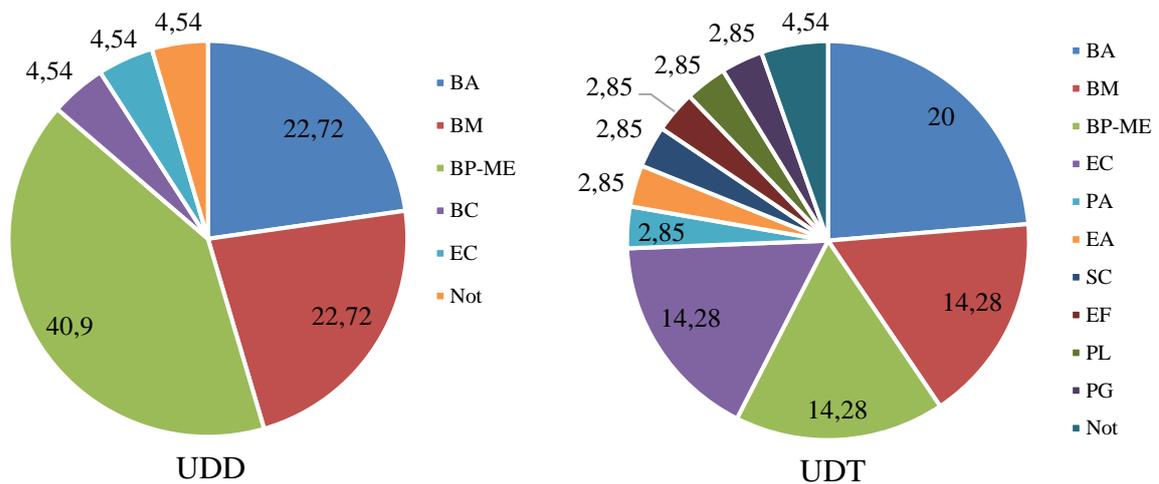
**Figure 37.** Spectres d'identification par MALDI-TOF MS des Paenibacillaceae associés à la Grande ortie

L'efficacité de la désinfection a été vérifiée dans la boîte témoin après 24h d'incubation à 37°C et n'a montrée aucune croissance microbienne, ce qui indique que les épiphytes ont été complètement enlevés.

L'identification des bactéries endophytes à partir des tiges, feuilles et racines de la Grande ortie récoltée dans deux régions de l'Algérie a été effectuée par l'étude de l'aspect macroscopique, microscopique, et biochimique, puis confirmée par MALDI-TOF MS. Il s'agit d'une technologie de microbiologie qui permet d'identifier des micro-organismes en analysant directement leurs protéines. Bien que cette technique a été décrite par **Tshikhudo et al. (2013)**, comme la technique idéale pour l'identification des cellules bactériennes par la détermination facile des empreintes de peptides, **De Bruyne et al. (2011)**, rapportent que divers facteurs peuvent influencer la qualité et la reproductibilité des empreintes bactériennes, en particulier la préparation des échantillons, la méthode de lyse cellulaire, les solutions matricielles et les solvants organiques, ce qui justifie l'utilisation de méthodes alternatives pour assurer une identification correcte. Dans le présent travail, nous avons utilisé comme méthodes alternatives des méthodes d'identifications macroscopiques, microscopiques et biochimiques.

Les résultats obtenus montrent une dominance de Bacillaceae, représentée essentiellement par quatre espèces, à savoir *Bacillus pumilus-ME*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus cereus*, suivi par les Enterobacteriaceae avec trois espèces (*Escherichia coli*, *Pantoea*

agglomerans et *Enterobacter amnigenus*), et les Paenibacillaceae avec deux espèces (*Paenibacillus lautus* et *Paenibacillus glucanolyticus*). Les familles moins fréquentes sont représentées par les Staphylococcaceae et les Enterococcaceae avec *Staphylococcus cohnii* et *Enterococcus faecium* respectivement (Fig. 38).



**Figure 38.** Abondance relative des bactéries endophytes à la Grande ortie dans les deux régions d'études (Dellys et Tlemcen)

BA : *Bacillus anthracis*, BM : *Bacillus megaterium*, BP-ME : *Bacillus pumilus-ME* BC : *Bacillus cereus*, EC : *Escherichia coli*, PA : *Pantoea agglomerans*, EA : *Enterobacter amnigenus*, SC : *Staphylococcus cohnii*, EF : *Enterococcus faecium*, PL : *Paenibacillus lautus*, PG : *Paenibacillus glucanolyticus*, Not : non identifiées

Au total, onze espèces appartenant aux genres *Bacillus*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Paenibacillus* ont été isolées. Ces bactéries endophytes ont déjà été isolées à partir des plantes médicinales par plusieurs auteurs. En effet, **Coêlho et al. (2011)**, ont isolé *B. cereus* et *B. anthracis* des graines et des tiges de Sumauma «*Ceiba pentandra*» et d'Acajou «*Swietenia macrophylla*» de l'Amazonie. **El-Deeb et al. (2013)**, travaillant sur Shara «*Plectranthus tenuiflorus*», récoltée au Sahara d'Arabie Saoudite, ont révélé la présence d'une multitude de bactéries endophytes, dont *Bacillus sp.*, *B. megaterium*, *B. pumilus-ME* et *Paenibacillus sp.* De même, **Jasim et al. (2014)**, ont montré l'endosymbiotisme de *Bacillus sp.* et *Staphylococcus sp.* dans le rhizome de Gingembre "*Zingiber officinale*". **Rasche et al. (2006)**, ont isolé *Staphylococcus* du poivron. Il est important de signaler qu'aucune spécificité bactérie-plante n'a été signalée. Des bactéries du genre *Bacillus* ont été rapportées, comme des endophytes du noyau de maïs (**Rijavec, 2007**), des pois, des pommes de terre, des conifères, des bananes et des haricots (**Elvira-Recuenco et Van Vuurde, 2000 ; Garbeva et al., 2001 ; Izumi et al., 2008 ; Lian et al., 2008 ; López-**

López *et al.*, 2010). Les endophytes du genre *Enterobacter* sont associées également au maïs (Rijavec *et al.*, 2007) et à d'autres plantes comme le riz, le coton, la papaye et le peuplier (Thomas *et al.*, 2007 ; Taghavi *et al.*, 2007 ; Elbeltagy *et al.*, 2001), et leur pouvoir d'agir comme antagoniste des champignons pathogènes du genre *Fusarium* a été décrite par Hinton et Bacon (1995).

Par ailleurs, toutes les espèces du genre *Pantoea* peuvent être isolées à partir de matières fécales, de sol et de plantes (Andersson *et al.*, 1999). Les endophytes du genre *Pantoea* ont été trouvés dans la canne à sucre (Loiret *et al.*, 2004) et dans le soja (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Parmi les bactéries du genre *Pantoea*, *P. agglomerans* est utilisée par les plantes comme agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes et les bactéries (Adriaenssens *et al.*, 2011). Bien que cette bactérie soit bénéfique pour le développement des plantes, elle peut aussi devenir un pathogène humain opportuniste. Cruz *et al.* (2007), ont montré que cette même espèce peut causer de graves infections chez les enfants de plus de six ans. D'après Kratz *et al.* (2003), et Ulloa-Gutierrez *et al.* (2004), *P. agglomerans* est souvent isolée chez l'homme à partir d'infections des tissus mous ou des os / articulations. La transmission de la bactérie aux humains est due à un traumatisme causé par les plantes.

L'analyse de la localisation des bactéries endophytes, au niveau des différents organes de la Grande ortie, a fait ressortir une répartition hétérogène des germes identifiés. La feuille est l'organe qui renferme plus de bactéries endophytes (en terme de diversité) avec six espèces isolées à Tlemcen et quatre espèces à Dellys. Ceci concorde avec les travaux de Seo *et al.* (2010), démontrant que 61,3% de bactéries endophytes ont été isolées à partir des jeunes feuilles de *Radis*. De plus, une dominance de communauté bactérienne du genre « *Pseudomonas* » a été identifiée dans les feuilles de la canne à sucre (Magnani *et al.*, 2010).

En ce qui concerne l'effet du biotope sur la diversité des bactéries endophytes, il semble que *U. dioica* L. récoltée dans la région de Tlemcen est la plus riche en bactéries associées avec sept genres et onze espèces comparé à celle récoltée à Dellys (deux genres et cinq espèces). Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence d'une forte biodiversité au sein de la population de microorganismes dans l'écosystème de la Grande ortie. Au niveau des régions explorées, la biodiversité s'avère variée aux plans qualitatif et quantitatif.

Les quatre espèces bactériennes communes aux deux régions sont *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*-ME et *E. coli*. Les six bactéries endophytes isolées seulement de Tlemcen sont *P. lautus*, *P. glucanolyticus*, *P. agglomerans*, *E. amnigenus*, *E. faecium* et *S. cohnii*. Enfin, *B. cereus* est détecté uniquement à Dellys. Les sols et les organes de plante constituent donc des sites de prédilection de microorganismes endosymbiotiques,

## III.2. Caractérisation phytochimique de la Grande ortie

### III.2.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique des différentes parties (tiges, feuilles et racines) de la Grande ortie, récoltée de la région de Dellys (UDD) et de Tlemcen (UDT), a permis en premier lieu de nous renseigner sur les différents métabolites primaires et secondaires produits. A partir des résultats bruts (**Annexe 05-A et B**), une synthèse des données est portée sur le tableau ci-dessous.

**Tableau 09.** Test phytochimique des feuilles, tiges et racine d'UDD et d'UDT

Métabolites	UDD			UDT		
	Tiges	Feuilles	Racines	Tiges	Feuilles	Racines
<b>Anthocyanes</b>	-	+++	-	-	+++	-
<b>Leuco-anthocyanes</b>	-	-	++	+++	-	+++
<b>Tanins totaux</b>	-	+++	-	-	+++	-
<b>Tanins galliques</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tanins catéchiques</b>	-	+++	-	-	+++	-
<b>Quinones libres</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Saponosides</b>	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<b>Alcaloïdes</b>	-	+++	+	++	+	+
<b>Sénosides</b>	-	+	-	-	+	-
<b>Coumarines</b>	++	+++	+++	++	+++	++
<b>Amidon</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Flavonoïdes</b>	-	+++	-	-	+++	-
<b>Glucosides</b>	+++	-	+++	+++	+	+++
<b>Mucilages</b>	+	+++	+++	++	+++	++
<b>Irridoïdes</b>	-	-	-	-	-	-

UDD : *U. dioica L. de Dellys*, UDT : *U. dioica de Tlemcen*, (-) : Absence de la substance recherchée, (+) : Faible teneur, (++) : Moyenne teneur, (+++) : Forte teneur de la substance recherchée.

Les résultats du test phytochimique ont fait ressortir une répartition hétérogène des métabolites secondaires pour les différentes parties de la même plante (tiges, feuilles et racines). Ainsi, pour les deux régions d'études, les tiges présentent une forte teneur en saponosides et en glucosides. Elles sont moyennement riche en coumarines, et faiblement riche en mucilage, avec une absence totale des anthocyanes, tanins totaux, tanins galliques et

catéchiques, quinones libres, sénosides, amidon, flavonoïdes, et irridioïdes. Cependant, la présence des leuco-anthocyanes et des alcaloïdes a été mise en évidence uniquement au niveau des tiges UDT.

Concernant les feuilles, une richesse en anthocyanes, tanins totaux, tanins catéchiques, saponosides, alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et mucilages est observée. Nous avons enregistré également une faible teneur en sénosides et une absence des leuco-anthocyanes, tanins galliques, quinones libres, amidon et irridioïdes. Il est à signaler que les feuilles UDD sont plus riches en alcaloïdes, et que celles de Tlemcen renferment une faible teneur en quinones libres et en glucosides.

Pour ce qui est des racines, une richesse en saponosides, coumarines, glucosides et mucilages. Par contre elles sont dépourvues d'anthocyanes, tanins totaux, tanins galliques et catéchiques, quinones libres, amidon, flavonoïdes, et en irridioïdes.

Des résultats similaires ont été notés par plusieurs auteurs ayant travaillé sur la même espèce. En effet, **Safanah et al. (2012)**, ayant travaillé en Iraq, ont signalé une richesse en tanins, en flavonoïdes, en saponosides et en alcaloïdes. **Gül et al. (2012)**, en Turquie et **Krystofova et al. (2010)**, en Russie, ont révélé la présence des flavonoïdes et des tanins. **Anderson et Wold (1978)**, ont observé la présence des mucilages dans la partie aérienne de la Grande ortie récoltée au Norvège. De même, **Moses et al. (2013)**, décrivent cette plante comme étant une source riche en saponosides, en alcaloïdes, glucosides et en coumarines. **Afif Chaouche (2015)**, a révélé la présence des tanins totaux, des tanins galliques et catéchiques, des flavonoïdes, des anthocyanes, des alcaloïdes, des saponines, des glucosides et des mucilages dans les feuilles. Les résultats du test phytochimique effectué par **Laoufi (2017)**, ont montré la richesse des feuilles de la Grande ortie récoltées à Dellys en tanins totaux, tanins galliques, flavonoïdes, saponosides, mucilages et alcaloïdes. La même constatation a été faite par **Mir et al. (2013)**. Ces auteurs ont en effet révélé une richesse des racines d'*U. dioïca* L. en saponosides, flavonoïdes, alcaloïdes et en composés phénoliques. Enfin, les tests réalisés par **Safanah et al. (2012)**, se sont révélés positif, vis-à-vis de la présence des tanins, les flavonoïdes et des alcaloïdes. Par ailleurs l'absence de certains métabolites a été signalée par **Moses et al. (2013)** (Quinones libres), **Bellatreche et Faiz (2014)** (Irridoïdes), **Laoufi (2017)** (irridioïdes, quinones libres et sénosides), ce qui est en accord avec nos résultats. L'absence de certains métabolites secondaires au niveau des racines est également notée pour d'autres espèces du genre *Urtica* par **Daoudi et al. (2015)**. Ces derniers ont démontré que les trois plantes (*U. urens*, *U. piluliferae*, *U. membranacea*) récoltées au Maroc (Meknès) sont

dépourvues en alcaloïdes, en saponosides et en mucilages ce qui est en désaccord avec nos résultats.

Les différences observées quant à la présence et l'absence de certains métabolites n'est que le résultat de plusieurs facteurs : milieu biotique et abiotique, l'âge de la plante et surtout la période de récolte.

La richesse de la Grande ortie en substances bioactives a suscité son usage sous forme de purin comme biopesticide contre les pucerons verts et noirs, les acariens, les altises, les araignées rouges et les limaces (**Delahaye, 2015**). Les résultats obtenus par **Benoufella-Kitous (2015)**, signalent que l'extrait aqueux des feuilles d'Ortie a donné un effet non négligeable sur les pucerons *Aphis fabae* après trois jours de traitement. Ainsi, les molécules bioactives des plantes telles que les saponosides, les tanins, et les flavonoïdes sont douées de propriétés insecticides (**Betty et Derek, 1990 ; Satiyamoorthy et al., 1997**).

### III.2.2. Rendement en métabolites secondaires

L'extrait aqueux présente un aspect liquide avec une coloration marron. Le rendement en métabolites secondaires enregistré à partir de 30g de la partie aérienne (tiges, feuilles) de cet extrait est de 1,34% (UDT) et de 1,62% (UDD). Les alcaloïdes de leur part ont donné un aspect liquide également avec une coloration verdâtre dont le rendement enregistré à partir de 30g des feuilles d'UDD est de 4,18%. Concernant les flavonoïdes (UDT), les différentes techniques de fractionnement par les solvants organiques à partir de 30g de la poudre végétale des feuilles ont donnée, pour les quatre fractions, un rendement compris entre 0,36 et 7,2%. Le rendement le plus élevé est représenté par la fraction aqueuse renfermant les flavonoïdes très polaires, et le plus faible rendement est représenté par la fraction d'éther diéthylique riche en flavonoïdes aglycones (**Tab. 10**).

**Tableau 10.** Rendement en extrait aqueux, alcaloïdes et flavonoïdes

Extraits	Partie de la plante	Régions	Rendement (%)	
Aqueux	Tiges	UDD	1,62±1,25	
	feuilles	UDT	1,34±0,95	
Alcaloïdes	Feuilles	UDD	4,8±0,18	
Flavonoïdes	Flavonoïdes polaires (EA)		7,2± 0,12	
	Feuilles	UDT	Flavonoïdes di et triglycosides (EB)	5,7± 0,20
			Flavonoïdes monoglycosides (EAE)	0,93±0,03
			Flavonoïdes aglycones (EED)	0,36±0,01

*Les valeurs sont représentées en moyenne±ESM de trois mesures différentes.*

*UDD : Urtica dioica L. récoltée à Dellys, UDT : Urtica dioica L. récoltée à Tlemcen, EA : extrait aqueux, EB : Extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique*

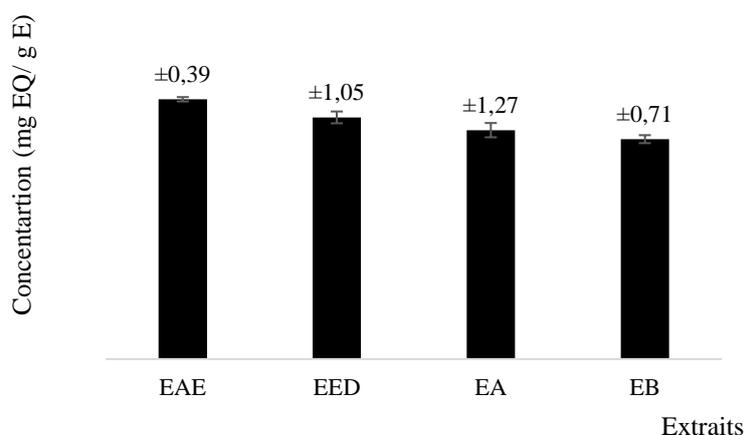
**Bensella (2015)**, a obtenu un rendement en polyphénol, à partir des racines de la Grande ortie récolté à Dellys, nettement supérieur soit une valeur de 8,34%. La qualité et le rendement des composés phénolique dépend étroitement de la nature du solvant utilisé (**Isfahlan et al., 2010**), des facteurs abiotiques (température, humidité, lumière et salinité du sol), des facteurs biotiques (physiologie de la plante, sol et agents pathogènes) (**Podsędek, 2007 ; Falleh et al., 2008**), et de la méthode adoptée (**Laoufi, 2017**). Dans le présent travail, la méthode adoptée pour l'extraction des flavonoïdes est basée sur la solubilité différentielle dans les différents solvants organiques.

Concernant les flavonoïdes, les résultats obtenus par **Afif Chaouche (2015)**, sur la partie aérienne (feuilles, fleurs, tiges) de la Grande ortie récoltée de la région de Tademaït (Algérie) en pleine floraison, montrent un rendement supérieur à celui obtenu lors de cette étude : 45,86% pour l'extrait aqueux, 27,50 % pour la fraction d'acétate d'éthyle, 6,06% pour la fraction butanolique et enfin 5,26% pour la fraction d'éther diéthylique. **Laoufi (2017)**, a noté un rendement de 33, 90±0,02% (fraction aqueuse), de 11,98±0,53% (fraction butanolique), de 1,006±0,34% (fraction d'acétate d'éthyle) et de 0,256±0,65% (fraction d'éther diéthylique). De même, **Daoudi et al. (2015)**, ont enregistré des valeurs en flavonoïdes de 6,17% pour l'extrait aqueux, 2,53% pour l'extrait butanolique et 5,4% pour l'extrait d'acétate d'éthyle d'*U. pilluliferae* récoltée à Meknès (Maroc).

Ces trois derniers auteurs signalent que le plus grand rendement est obtenu pour la fraction aqueuse, et le plus faible est enregistré pour la fraction d'éther diéthylique ce qui est en accord avec nos résultats.

### III.2.3. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des différentes fractions obtenues est déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) en se référant à la courbe d'étalonnage d'une solution de quercétine. Les valeurs de l'absorbance des différentes fractions sont lues à 430 nm. Les résultats obtenus sont reportés dans la figure suivante :



**Figure 39.** Concentration des fractions flavoniques des feuilles de la Grande ortie récoltée à Tlemcen

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes, EA : Extrait aqueux, EB : Extrait butanolique, EAE : Extrait d'acétate d'éthyle, EED : Extrait d'éther diéthylique

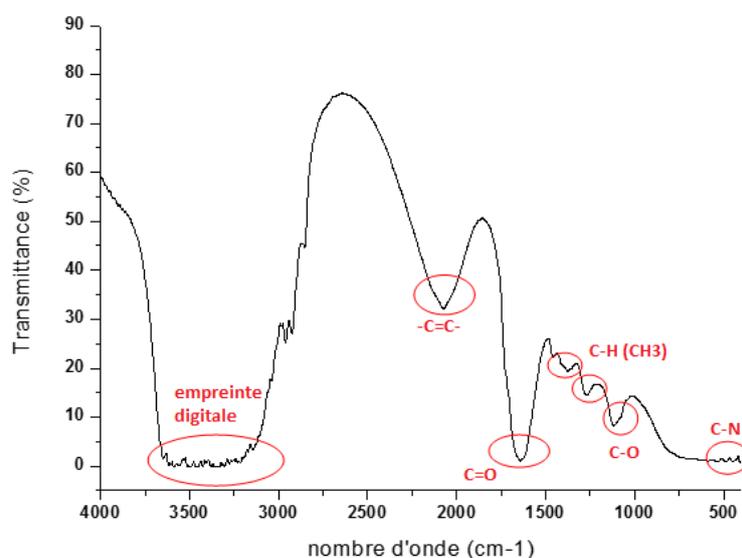
La concentration la plus élevée en flavonoïdes est obtenue pour la fraction EAE ( $46,21 \pm 0,39$  mg EQ/gE), suivi de EED ( $42,99 \pm 1,05$  mg EQ/gE), de la fraction EA ( $40,72 \pm 1,27$  mg EQ/gE) et la fraction EB avec une valeur de  $39,12 \pm 0,71$  mg EQ/gE. Une teneur supérieure est notée par **Afif-Chaouche (2015)**, en utilisant le même protocole, soit une valeur de  $71,093$  mg EQ/ml E pour la fraction EA. Par ailleurs, une teneur inférieure ( $20,29 \pm 0,48$  mg EQ/g dw) est enregistrée par **Zoran et al. (2012)** sur les feuilles de la Grande ortie récoltée en juin dans la forêt de Laktaši (Banja Luka, République de Srpska).

**Laoufi (2017)**, a enregistré une richesse en flavonoïdes polaire (EA) extraits à partir des feuilles de la Grande ortie, soit une valeur de  $150,30 \pm 0,06$  mg EQ/g, suivi des flavonoïdes di et tri glycosides (EB) ( $100,59 \pm 0,03$  mg EQ/g), ensuite des flavonoïdes monoglycosides (EAE) ( $50,73 \pm 0,43$  mg EQ/g) et enfin des flavonoïdes aglycones (EED) ( $4,59 \pm 0,05$  mg EQ/g).

Cette différence n'est que le résultat de l'influence des facteurs biotiques et abiotiques sur la synthèse de ces métabolites secondaires. En effet, les facteurs environnementaux, à savoir la température, l'humidité, l'intensité de la lumière, la fourniture d'eau, de minéraux et de CO<sub>2</sub> influent sur la croissance d'une production de métabolisme végétal et secondaire (Ramakrishna et Ravishankar, 2011).

### III.2.4. Analyse par infrarouge des différents extraits

Les spectres infrarouges représentant la transmittance (T%) en fonction du nombre d'onde (cm<sup>-1</sup>) des alcaloïdes d'UDD est représenté sur la figure 40.



**Figure 40.** Spectre d'analyse par infra-rouge des alcaloïdes extraits des feuilles de la Grande ortie

Le spectre infrarouge des alcaloïdes d'*Urtica dioïca* L. montre la présence de différents groupements fonctionnels (Tab. 11).

**Tableau 11.** Longueurs d'ondes et groupements chimiques correspondants

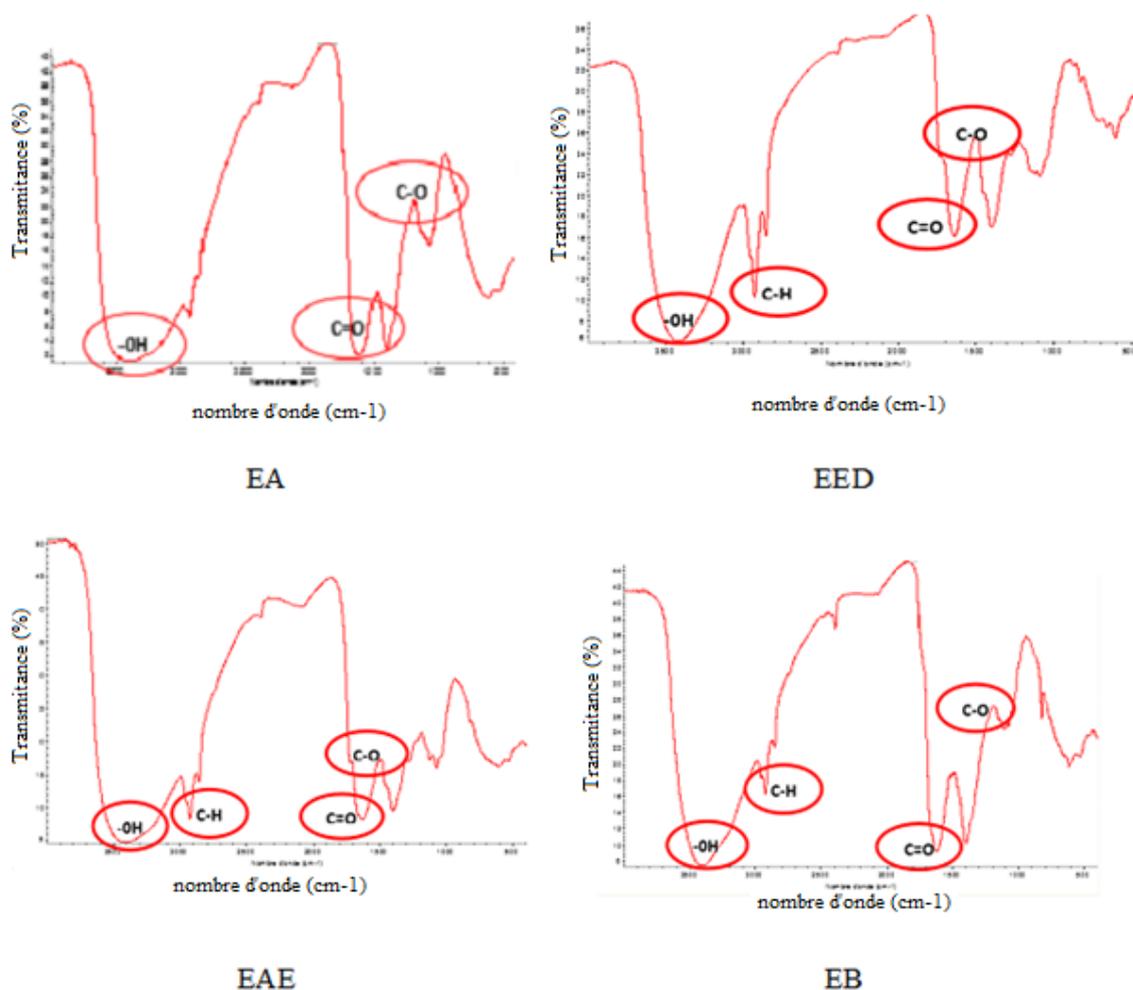
Longueur d'ondes (cm <sup>-1</sup> )	Liaisons	Fonction	Intensité de la bande
3000- 3500	Empreinte digitale		
2000-2500	-C=C-	Alcyne	Bande forte et large
1500-2000	C=O et C instant en alpha	Amide	Bande forte et étroite
1000-1500	C-H(CH3)	Nitrile	Bande moyennement forte

	C-O	Ester	Moyenne à faible bande
<b>1000-500</b>	C-N	Nitrile	Bande faible

Les résultats d'analyse obtenus montrent l'existence de 05 bandes correspondant aux groupements fonctionnels alcyne, nitrile, ester et amide appartenant au groupe d'alcaloïdes tropaniques comme l'atropine, cocaïne, isocyanine, et scopolamine.

Les fonctions C=O révélées dans la Grande ortie peuvent être expliquées par la présence de certains composés tels que : L-ornithine, Cuscohygrine, et l'hygrine appartenant au groupe alcaloïdique pyrrolidinique.

En se basant sur la base de donnée établit par **Mabry *et al.* (1970)**, les résultats de la caractérisation par infra-rouge des extraits flavonoïdiques obtenus sont représentés dans la figure et le tableau suivants :



**Figure 41.** Spectre d'analyse par infra-rouge des extraits flavonoidiques extraits des feuilles de la Grande ortie

*EA : extrait aqueux, EB : Extrait butanolique, EAE : Extrait d'acétate d'éthyle, EED : Extrait d'éther diéthylique*

**Tableau 12.** Groupements fonctionnels des extraits flavonoïdiques extraits des feuilles de la Grande ortie

Fractions flavonoïques	Longueur d'onde (cm <sup>-1</sup> )	Liaisons	Nature de la liaison	Fonction
Fraction aqueuse	3406,21	-OH Libre	Bande large	Phénol
	1619,70	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1079,14	C-O	Bande étroite	Ester
Fraction d'éther di-éthylique	3419,00	-OH Libre	Bande large	Phénol
	2926,52	C-H	Bande étroite	Alcène
	1639,85	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1089,61	C-O	Bande moyenne	Ester
Fraction d'acétate d'éthyle	3413,81	-OH Libre	Bande large	Phénol
	2926,77	C-H	Bande étroite	Alcène
	1637,87	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1122,45	C-O	Bande moyenne	Ester
Fraction butanolique	3412,87	-OH Libre	Bande large	Phénol
	2926,45	C-H	Bande étroite	Alcène
	1618,77	C=O	Bande moyenne	Aldéhyde
	1114,12	C-O	Bande moyenne	Ester

A partir du résultat d'analyse par infra-rouge des différentes fractions de l'extrait flavonoïdique d'*U. dioica* L., il ressort que la Grande ortie se caractérise par plusieurs liaisons à fonctions variées. En effet, les bandes larges autour de 3400 cm<sup>-1</sup> sont associées à la vibration d'élongation de la liaison OH (fonction phénol). Les bandes étroites autour de 2926 cm<sup>-1</sup> correspondent à la vibration de déformation de la liaison CH (fonction alcène). Les bandes fortes autour de 1620 correspondent à la vibration d'élongation de la liaison C=O (fonction aldéhyde). Enfin, les bandes autour de 1100 cm<sup>-1</sup> sont attribuées à la vibration d'élongation de la liaison C-H (fonction ester).

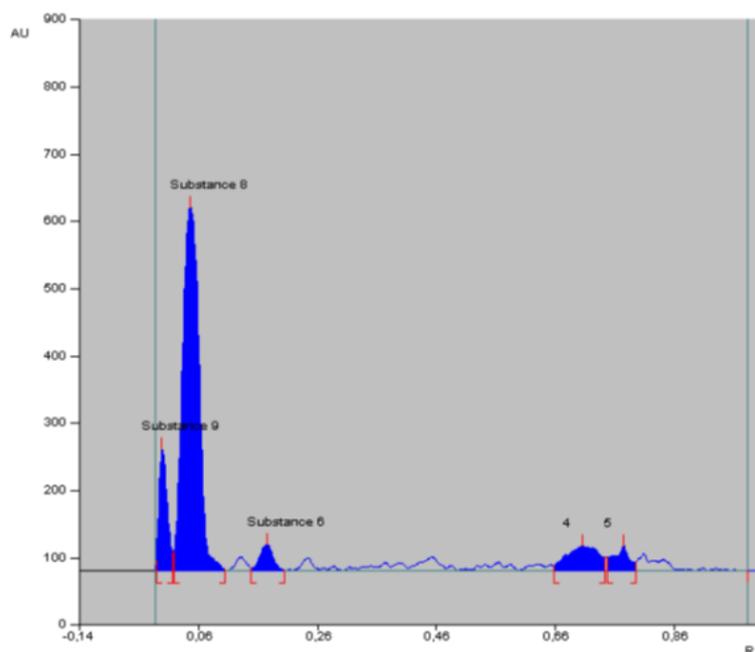
Des résultats similaires ont été obtenus par **Laoufi (2017)**, suite à l'analyse par infrarouges des extraits flavonoidiques des feuilles de la Grande ortie récoltée à Dellys. L'auteur en

question a noté la présence des groupements O-H ( $3306,30\text{ cm}^{-1}$ ), C=C ( $1636,52\text{ cm}^{-1}$ ) et une élongation de la liaison C=O.

De même, **Kavtaradze et al. (2001)** en analysant par infrarouge l'extrait polyphénolique de la Grande ortie a constaté la présence de cinq groupements fonctionnels :  $3400\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $2940\text{ cm}^{-1}$  (OCH),  $2840-2805\text{ cm}^{-1}$  (O-CH-),  $1630-1520\text{ cm}^{-1}$  (aromatique),  $1253\text{ cm}^{-1}$  (furane),  $1280, 1235, 1035\text{ cm}^{-1}$  (lignane).

### III.2.5. Caractérisation des extraits par HPTLC-RP18

L'analyse qualitative des alcaloïdes extraits des feuilles de la Grande ortie (UDD), montrent la présence d'un alcaloïde très fréquent chez les plantes « l'aconitine » (**Fig. 42**). Les paramètres d'identification chromatographiques sont représentés dans le tableau 13.



**Figure 42.** Chromatogramme d'identification des alcaloïdes des feuilles de la Grande ortie par HPTLC-RP 18 à 200nm

**Tableau 13.** Paramètres d'identification chromatographique des alcaloïdes par HPTLC-RP18

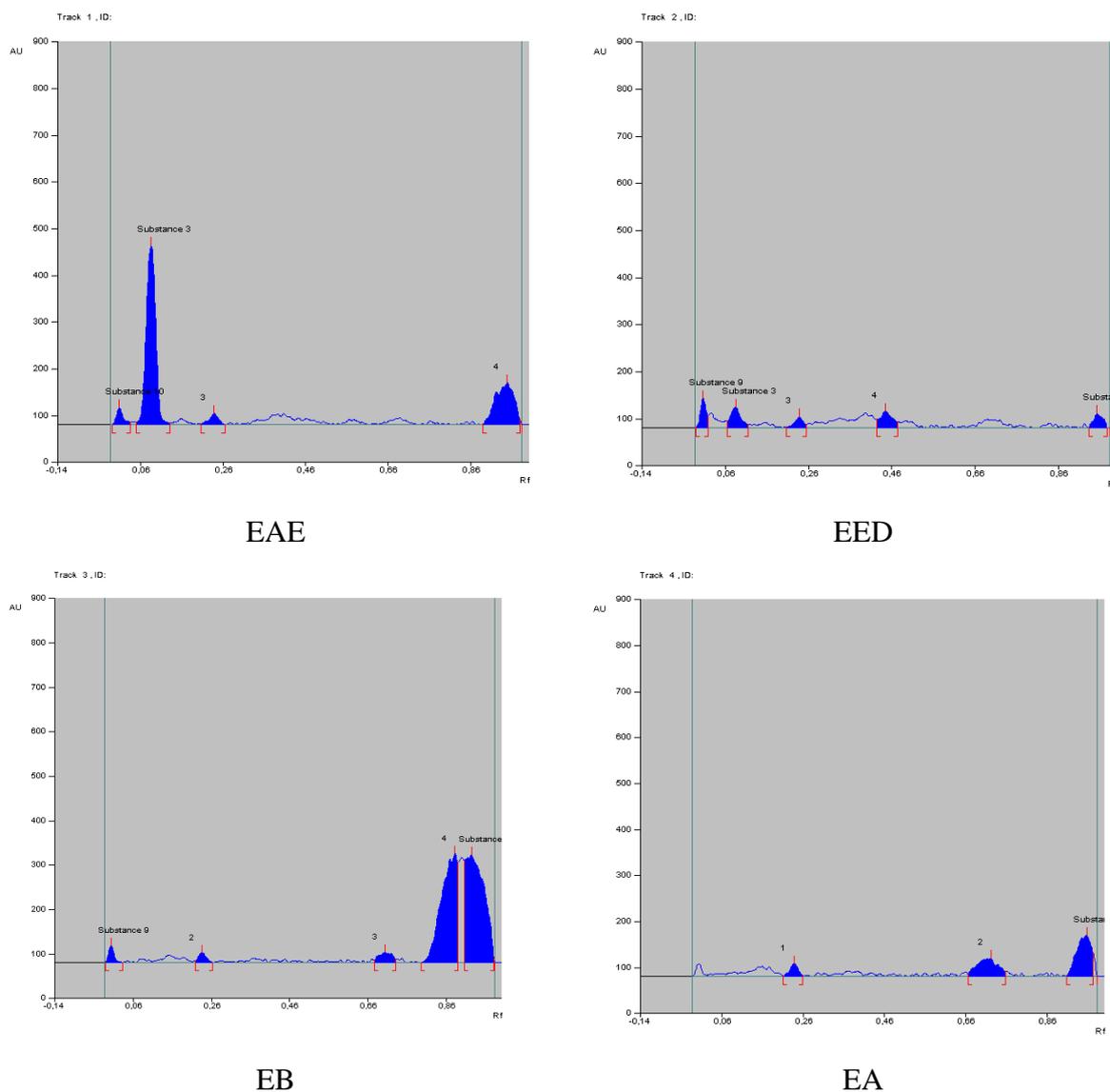
	$\lambda$ max (nm)	Max (%)	Rf max (mm)	Surface %	Substance
Alcaloïdes	637	64,87	0,04	70,56	Aconitine

$\lambda$  : longueur d'onde, Rf : rapport frontale

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux, et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou

moins graves voire mortels (Fournier, 2001). Les alcaloïdes dits terpéniques, représentés essentiellement par l'aconitine, sont connus pour avoir une toxicité principalement neurologique et cardiaque (Flesch, 2005).

Pour ce qui est des flavonoïdes, l'analyse chromatographique des quatre fractions par chromatographie sur couche mince à haute performance sur phase inverse (HPTLC-RP 18) nous a permis de détecter plusieurs composés dont quatre ont été identifiés (Fig. 43) (Tab. 14).



**Figure 43.** Chromatogrammes des quatre extraits des feuilles de la Grande ortie obtenus par HPTLC-RP18 à 200nm

EA : extrait aqueux, EB : extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique

**Tableau 14.** Paramètres d'identification chromatographique par HPTLC-RP18 des fractions flavonoïdiques

Extraits	$\lambda$ max (nm)	Max (%)	Rf max (mm)	Surface %	Substances
<b>EAE</b>	278	71,91	0,08	63,10	Acide gallique
	239, 330	4,47	0,24	3,75	Acide sinapique
	262, 377	16,81	0,95	29,03	Kaempférol
<b>EED</b>	242, 330	11,99	0,24	11,51	Acide sinapique
	262, 377	15,55	0,95	16,35	Kaempférol
<b>EA</b>	242, 330	17,50	0,24	9,68	Acide sinapique
	262, 377	57,37	0,96	54,99	Kaempférol
<b>EB</b>	242, 330	3,95	0,23	1,90	Acide sinapique
	281	42,34	0,92	50,10	Acide syringique

*EA* : extrait aqueux, *EB* : extrait butanolique, *EAE* : extrait d'acétate d'éthyle, *EED* : extrait d'éther diéthylique,  $\lambda$  : longueur d'onde, *Rf* : rapports frontaux

Selon **Lakshmi et al. (2012)**, l'HPTLC est une méthode de caractérisation qui permet d'estimer la composition chimique d'un matériel végétal. L'analyse des différentes fractions flavonoïdiques par HPTLC-RP18 a identifié quatre molécules à savoir l'acide gallique, sinapique et syringique ainsi que le kaempférol. Les deux derniers composants ont été décrits dans les travaux réalisés par **Afif Chaouche (2015)** et **Laoufi (2017)**. En plus de l'acide syringique et du kaempférol, **Laoufi (2017)**, a identifié six autres composés dont l'acide coumarinique, férulique, ellagique, la rutine, la mirycétine et la quercétine. Un nombre plus important de molécules ont été apporté par **Grevsen et al. (2008)** à partir de la Grande ortie récoltée au Danemark.

L'analyse chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de l'extrait d'*U. dioica* a été déterminée en utilisant la technique LC-ESI-MS-MS ainsi que HPLC-DAD. Les huit constituants chimiques identifiés étaient l'acide protocatéchique, l'acide salicylique, la lutéoline, la gossypétine, la rutine, le kaempférol-3-O-rutinoside, le kaempférol-3-O-glucoside et l'acide chlorogénique (**Sobia Ramzan, 2014**). Vingt et un des composés étudiés étaient présents au profil phénolique des extraits MeOH de la Grande ortie (racine, tige, feuille et inflorescence) en utilisant une chromatographie liquide à haute performance couplée à une méthode de détection spectrométrique de masse. L'acide 5-O-cafféoylquinique, la rutine et l'isoquercitrine sont les plus abondants (**Orčić et al., 2014**).

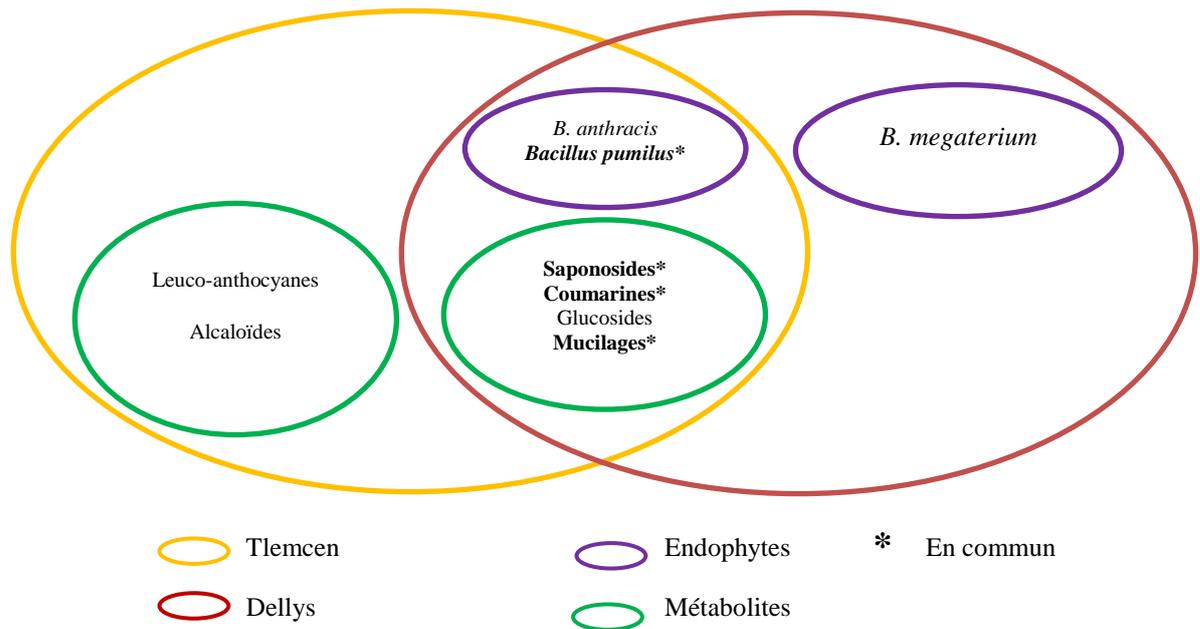
Divers facteurs peuvent influencer la performance, les caractéristiques physico-chimiques et la composition chimique de l'extrait, tels que les conditions environnementales, la technique d'extraction et de séchage, les pratiques agricoles, l'âge de la plante, la période et les sites de collecte (Aberchane *et al.*, 2001; Bourkhiss *et al.*, 2011).

Cette étude a également montré l'existence d'une réelle biodiversité moléculaire. Des travaux antérieurs effectués sur *Urtica dioïca* L. ont révélés la présence de nombreux métabolites secondaires tels que la Quercétine-3-O-ritinoside, le kaempférol-3-O-ritinoside et l'isorhamnetin-3-O-glucoside (Akbay *et al.*, 2003), l'acide caféique, la rutine, la quercétine, l'hyperin et l'isoquercétine (Kavataardze, 2001).

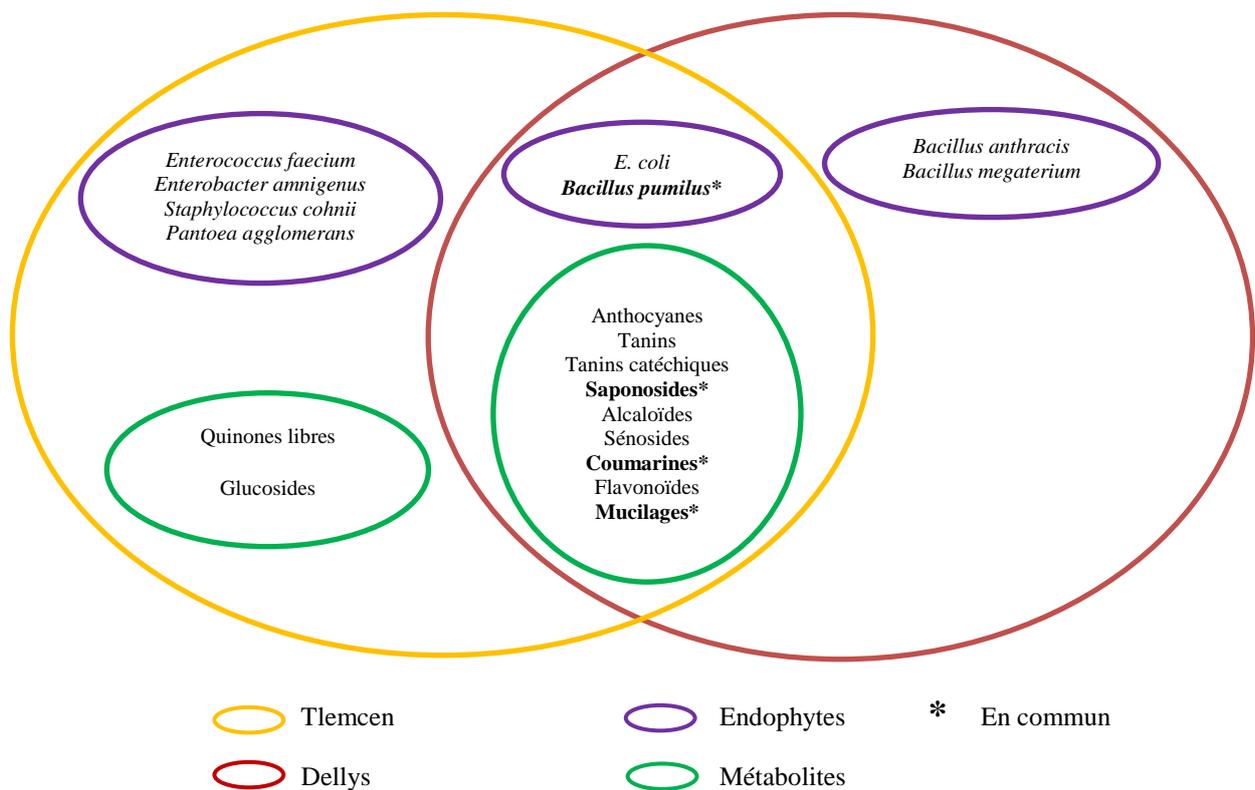
### III.3. Mise en évidence d'une éventuelle corrélation endophytes-métabolites

Il ressort de cette étude que diverses espèces bactériennes ont été trouvées en commun dans les tissus végétaux des deux échantillons de la grande ortie (UDD et UDT). Au total, quatre espèces ont été isolées et identifiées. Il s'agit de *Bacillus anthracis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* et *Escherichia coli*. D'autres espèces d'endophytes sont par contre détectées uniquement dans un des deux échantillons : *Enterococcus faecium*, *Enterobacter amnigenus*, *Staphylococcus cohnii*, *Pantoea agglomerans*, *Paenibacillus lautus* et *Paenibacillus glucanolyticus* endosymbiotiques dans la Grande ortie de Tlemcen, et *Bacillus cereus* endosymbiotique dans la Grande ortie de Dellys. Cette étude démontre l'existence d'une grande diversité de nouvelles espèces de bactéries associées à la Grande ortie. Notre étude montre également que l'environnement immédiat joue un rôle important dans l'acquisition des bactéries par la Grande ortie.

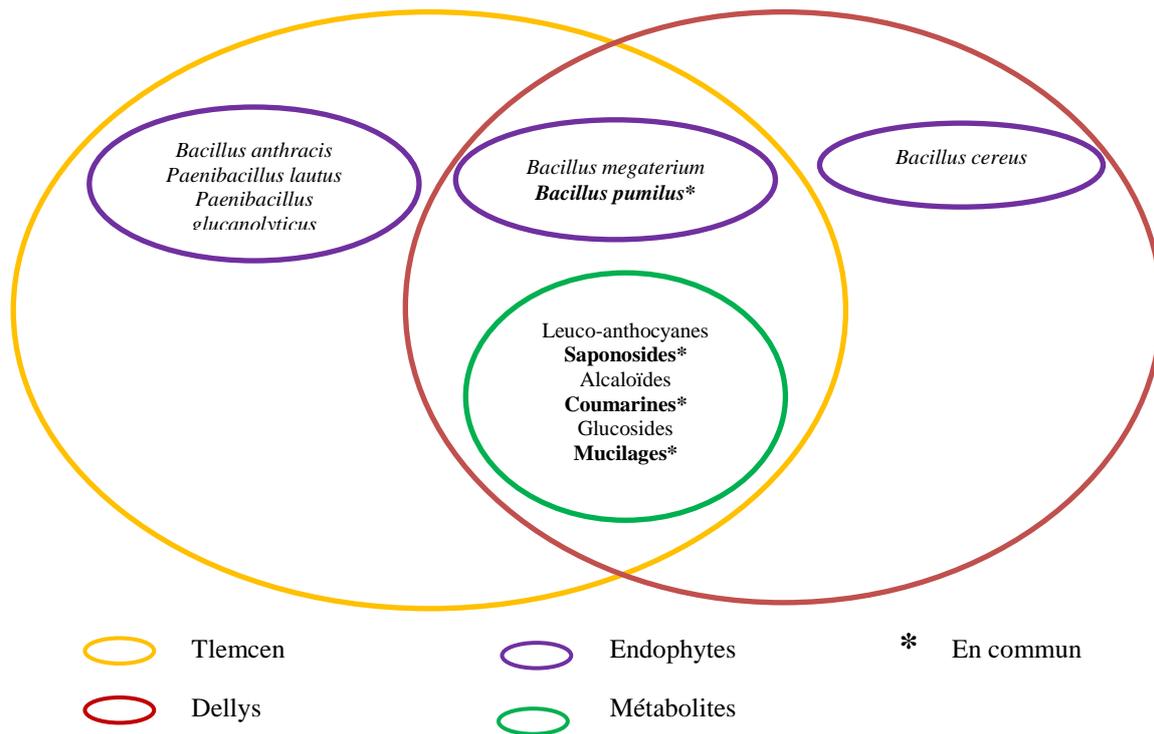
Par ailleurs, les bactéries endophytes colonisent différemment les différents organes de la plante. Les bactéries du genre *Bacillus* ont été rencontrées au niveau des différents organes (tige, feuille, racine). En revanche, *E. coli*, *E. faecium*, *E. amnigenus*, *S. cohnii* et *P. agglomerans* sont trouvées uniquement au niveau des feuilles, et *P. lautus* et *P. glucanolyticus* au niveau des racines (Fig. 44, 45 et 46).



**Figure 44.** Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents dans les tiges d’UDD et UDT



**Figure 45.** Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents dans les feuilles d’UDD et UDT



**Figure 46.** Cercles de corrélation entre les bactéries endophytes et les métabolites présents dans les racines d'UDD et UDT

L'absence d'organismes endophytes dans un organe d'une plante, indique qu'ils sont probablement introduits de l'environnement et ne sont pas des endophytes systémiques de la graine **Glienke (1995)**. Selon cet auteur, ce type de microorganismes peut être plutôt spécifique à d'autres organes de la plantes telles que les feuilles et les tiges. En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes rhizosphériques ou épiphytes de la phyllosphère, aussi bien que de graines (**Lemanceau et al., 2017**). Par ailleurs, la microflore endophyte est une structure dynamique influencée par des facteurs biotiques et abiotiques. Les plantes étant l'un des facteurs majeurs d'influence, puisque les bactéries endophytes dépendent de nutriments offerts par les plantes. Dans notre étude, *E. coli*, *E. faecium*, *E. amnigenus*, *S. cohnii* et *P. agglomerans* peuvent être décrites comme endophytes de la phyllosphère, introduites par l'environnement, ce qui concorde avec les travaux de **Misaghi et Donndelinger (1990)**, **Fisher et al. (1992)**, **Völksch et al. (1992)**, **Sturz et Matheson (1996)**, (**Hallmann et al. (1997)**, **Sturz et al. (1997)**, et **Wilson et al. (1999)**).

Enfin, il semble y avoir une relation entre la présence de certaines bactéries endophytes et les métabolites secondaires synthétisés par la plante. A titre d'exemple, les résultats obtenus ont

fait ressortir une éventuelle association entre les bactéries du genre *Bacillus* et les métabolites suivant : leuco-anthocyanes, saponosides, alcaloïdes, coumarines, glucosides, mucilages, anthocyanes, tanins, tanins catéchiques, sénosides, et flavonoïdes. De même, une association éventuelle est observée entre les bactéries du genre *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* et *Pantoea* avec les quinones libres. Ces relations peuvent être expliquées comme étant le résultat d'une résistance systémique de la plante induite par la présence des endophytes.

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes ou PGPR (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) peuvent être soit des phytostimulatrices ou des phytoprotectrices. Les premiers influencent la croissance des plantes en améliorant la biodisponibilité de certains nutriments par la fixation de l'azote atmosphérique, ou par solubilisation du phosphate, en synthétisant des phytohormones comme les auxines, cytokinines, ou gibbérellines. Les secondes protègent et favorisent la croissance de la plantes en réduisant le niveau de certaines maladies (par la production des antibiotiques délétères pour les pathogènes), en détruisant les molécules signaux des pathogènes, en activant la résistance systémique induite des plantes, qui augmente la résistance des plantes à l'attaque des pathogènes, ou en contrôlant la croissance des pathogènes par la compétition pour les éléments nutritifs, comme la compétition pour le carbone et la compétition pour le fer dont la biodisponibilité dans le sol est faible (**Haas et Défago, 2005**).

Les composés phénoliques (phénols et polyphénols) sont des molécules essentielles dans la stratégie de défense systémique induite des plantes. En effet de nombreux acides phénoliques comme l'acide caféique, ou l'acide gallique ont des activités antivirales, antibactériennes ou antifongiques importantes (**Cowan, 1999**).

Ainsi, les plantes disposent de trois grands groupes de molécules pour interagir avec les différents organismes présents dans leur environnement : les phytoalexines, les phytoanticipines et les molécules signal. Les phytoalexines sont des antimicrobiens synthétisés et accumulés dans les plantes après une exposition à des microorganismes. Les phytoanticipines sont synthétisées constitutivement dans la plante. Les molécules signal transmettent le signal d'une cellule à une autre, ou d'un organisme à un autre, ce qui induit une réponse spécifique.

Concernant l'impact des bactéries PGPR biocontrôles sur l'expression métabolique de la plante hôte, peu de données sont disponibles. Des études réalisées sur le Pois chiche (*Cicer arietinum*) montrent qu'en condition inoculée avec les bactéries du genre *Pseudomonas*, une modification des molécules phénoliques totales de la plante est observée, avec spécifiquement

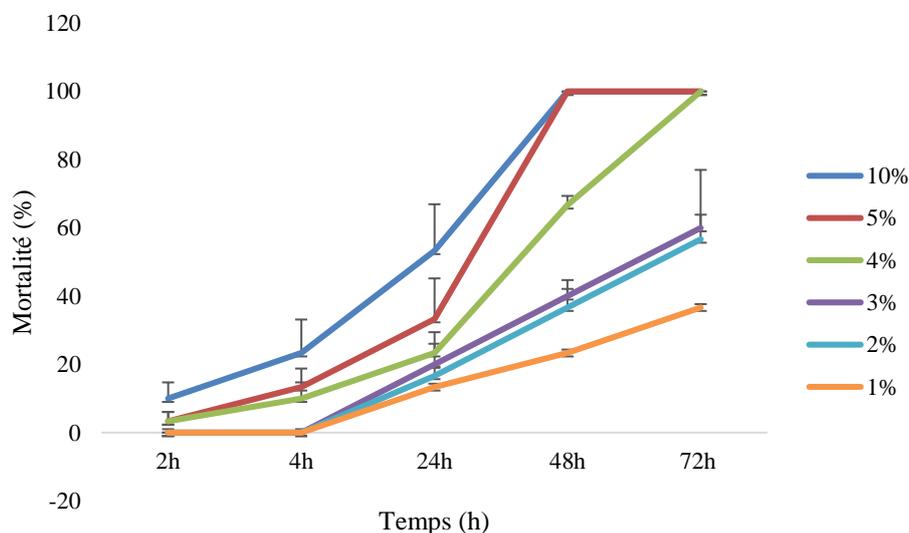
des concentrations en acide férulique plus importantes (Singh *et al.*, 2003). De même, l'inoculation du Bétel (*Piper betle* L.) par *Serratia marcescens* NBRI1213, a engendré une modulation de la synthèse et de localisation d'acides phénoliques, qui se traduit particulièrement par la diminution de la synthèse de certains acides phénoliques, et la synthèse spécifique de l'acide chlorogénique (Lavania *et al.*, 2006).

La capacité des bactéries endophytes à modifier la synthèse des composés phénoliques par les plantes est en faveur d'un mécanisme supplémentaire de biocontrôle, qui en plus des composés antimicrobiens et des sidérophores synthétisés par les endophytes, permet à la plante de résister plus aux attaques des divers pathogènes.

### III.4. Résultats du test insecticide

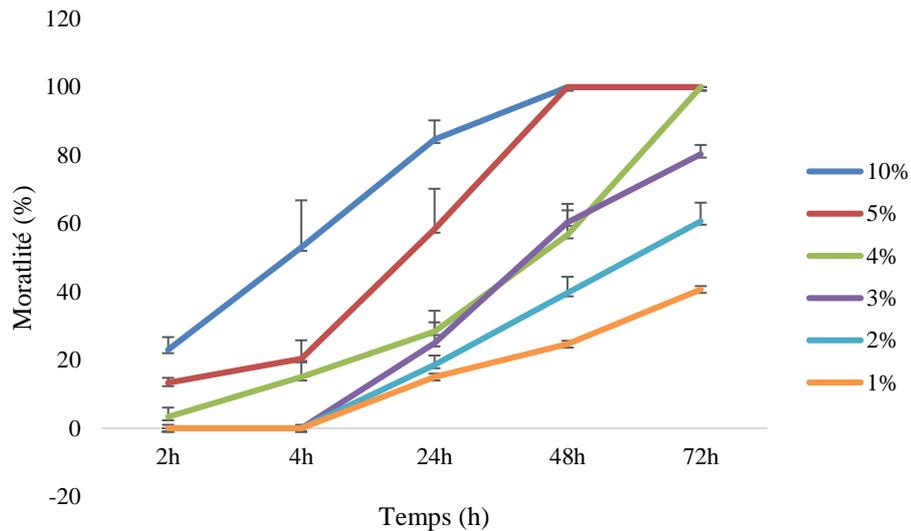
#### III.4.1. Effet de l'extrait aqueux

Les données brutes du test insecticide réalisé par l'extrait aqueux sont notées dans l'annexe 06-A, B, C et D. Les résultats du traitement des larves L2 et L4 de *C. pipiens* par l'extrait aqueux des deux plants UDT et UDD pour les différentes doses 10%, 5%, 4%, 3%, 2% et 1% obtenus après 2h, 4h, 24h et 48h sont illustrés dans les figures suivantes (Fig. 47, 48, 49 et 50):



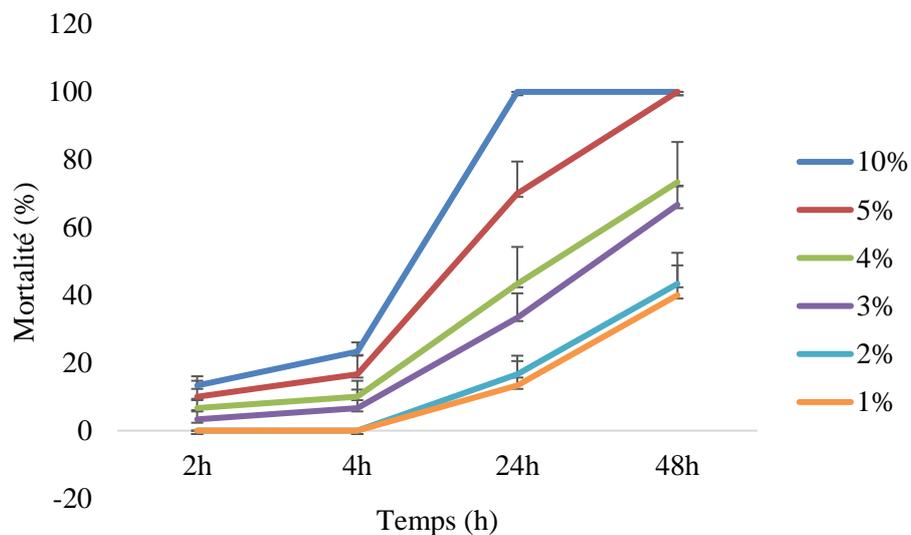
**Figure 47.** Cinétique de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques *C. pipiens* traités par l'extrait aqueux d'*U. dioica* L. (UDD) en fonction de temps

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{10\%} = 27$  mg/ml,  $D_{5\%} = 13,5$  mg/ml,  $D_{4\%} = 10,8$  mg/ml,  $D_{3\%} = 8,1$  mg/ml,  $D_{2\%} = 5,4$  mg/ml et  $D_{1\%} = 2,7$  mg/ml. ( $p < 0,05$ )



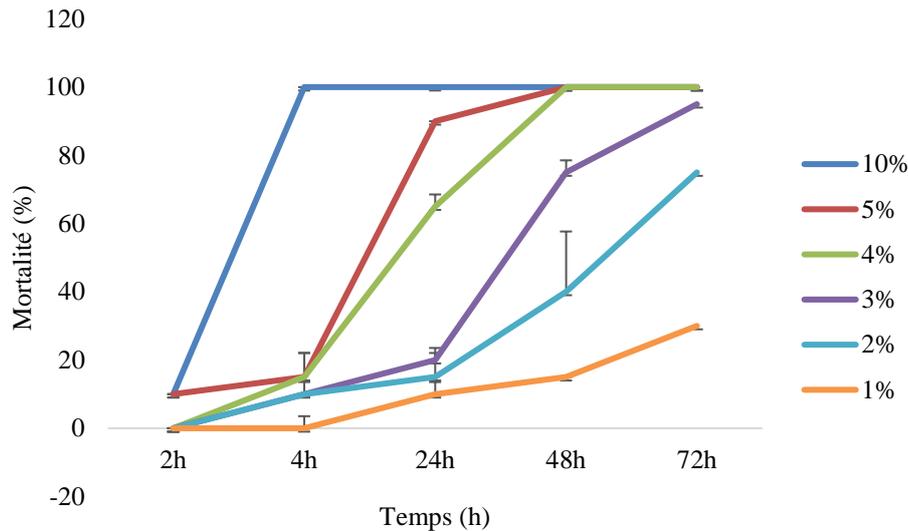
**Figure 48.** Cinétique de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques *C. pipiens* traités par l'extrait aqueux d'*U. dioica* L. (UDT) en fonction de temps

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{10\%} = 27$  mg/ml,  $D_{5\%} = 13,5$  mg/ml,  $D_{4\%} = 10,8$  mg/ml,  $D_{3\%} = 8,1$  mg/ml,  $D_{2\%} = 5,4$  mg/ml et  $D_{1\%} = 2,7$  mg/ml. ( $p < 0,05$ )



**Figure 49.** Cinétique de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par l'extrait aqueux d'*U. dioica* L. (UDD) en fonction de temps

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{10\%} = 27$  mg/ml,  $D_{5\%} = 13,5$  mg/ml,  $D_{4\%} = 10,8$  mg/ml,  $D_{3\%} = 8,1$  mg/ml,  $D_{2\%} = 5,4$  mg/ml et  $D_{1\%} = 2,7$  mg/ml. ( $p < 0,05$ )



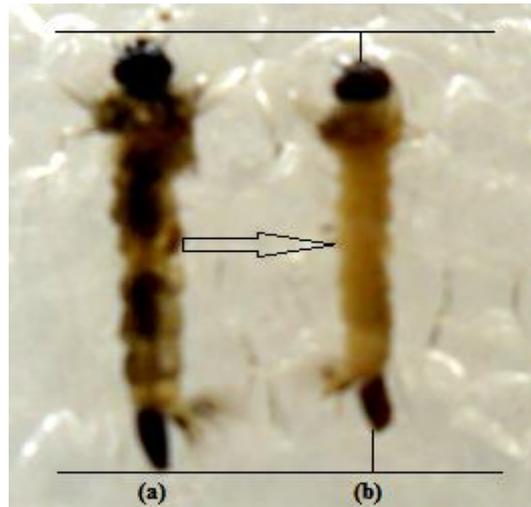
**Figure 50.** Cinétique de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par l'extrait aqueux d'*U. dioica* L. (UDT) en fonction de temps

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{10\%} = 22,33$  mg/ml,  $D_{5\%} = 11,16$  mg/ml,  $D_{4\%} = 8,93$  mg/ml,  $D_{3\%} = 6,69$  mg/ml,  $D_{2\%} = 4,46$  mg/ml et  $D_{1\%} = 2,23$  mg/ml. ( $p < 0,05$ )

D'après les figures 47 et 48, il ressort une importante sensibilité des larves L2 à l'extrait aqueux. Le 100% de mortalité est atteint au bout de 48 h de traitement ( $D_{10\%} = 27$  mg/ml et  $D_{5\%} = 13,5$  mg/ml). Cependant, ce taux de mortalité n'a été obtenu pour la dose 4% (10,8 mg/ml) qu'après 72 h de contact. Ceci est valable pour les deux extraits testés.

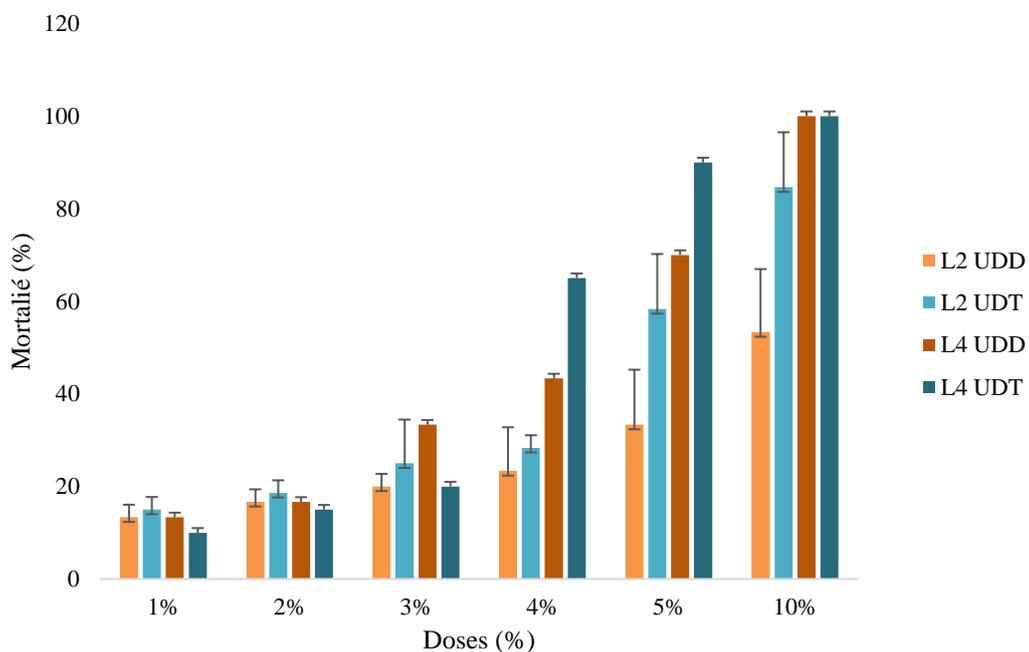
Pour les larves L4, les résultats du traitement montrent une bonne activité larvicide, qui évolue en fonction du temps et des doses. En effet la plus forte dose de l'extrait aqueux obtenu de la grande ortie de Dellys ( $D_{10\% \text{ UDD}} = 27$  mg/ml) a entraîné le 100% de mortalité après 24h de traitement, suivi de la dose  $D_{5\% \text{ UDD}} = 13,5$  mg/ml après 48h. Les données montrent aussi que la totalité de la population de *C. pipiens* a montré une sensibilité après 4h de traitement par la dose la plus élevée de l'extrait aqueux d'UDT ( $D_{10\% \text{ UDT}} = 22,33$  mg/ml). Cette constatation est valable également pour les doses  $D_{5\% \text{ UDT}}$  (11,16 mg/ml),  $D_{4\% \text{ UDT}}$  (8,93 mg/ml), et  $D_{3\% \text{ UDT}}$  (6,68 mg/ml) après 48h de contact. Cependant, aucune mortalité n'a été observée dans les lots témoins.

Il est à signaler également que les larves présentant une sensibilité aux extraits d'*U. dioica* L. sont devenues plus claires, et ont subi une régression de la taille (**Fig. 51**).



**Figure 51.** Morphologie observée des larves L4 de *C. pipiens* avant (a) et après traitement (b) par les extraits d'*U. dioica* L. (Toubal, 2018)

Un histogramme des pourcentages de mortalité, en fonction des différentes doses issus du traitement de l'extrait aqueux d'UDD et UDT sur les larves L2 et L4 de *C. pipiens* après 24h, a été établi (Fig. 52).



**Figure 52.** Histogramme des pourcentages de mortalités en fonction des différentes doses issus du traitement par l'extrait aqueux d'UDD et UDT sur les larves L2 et L4 de *C. pipiens* après 24h

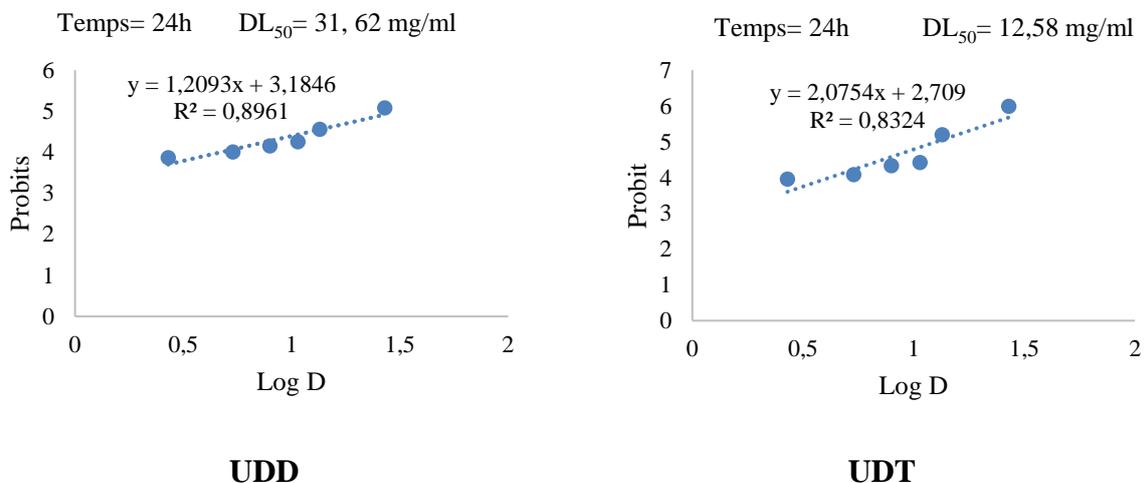
Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes, UDD : *Urtica dioica* L. récolté à Dellys, UDT : *Urtica dioica* L. récolté à Tlemcen

D'après les résultats obtenus, on remarque qu'aux faibles doses ( $D_{1\%}$  et  $D_{2\%}$ ), les extraits aqueux d'UDD et UDT agissent pratiquement de la même manière avec un taux de mortalité légèrement supérieur en faveur d'UDT (L2) et d'UDD (L4).

Une meilleure activité a été observée pour l'extrait aqueux d'UDT (L2) à la dose  $D_{3\%}$  (8,1 mg/ml) comparé à celui d'UDD (8,1 mg/ml). Pour la même dose, les L4 se sont montrés plus sensibles à l'extrait aqueux d'UDD. Ceci peut être expliqué par la concentration de l'extrait en métabolites secondaires.

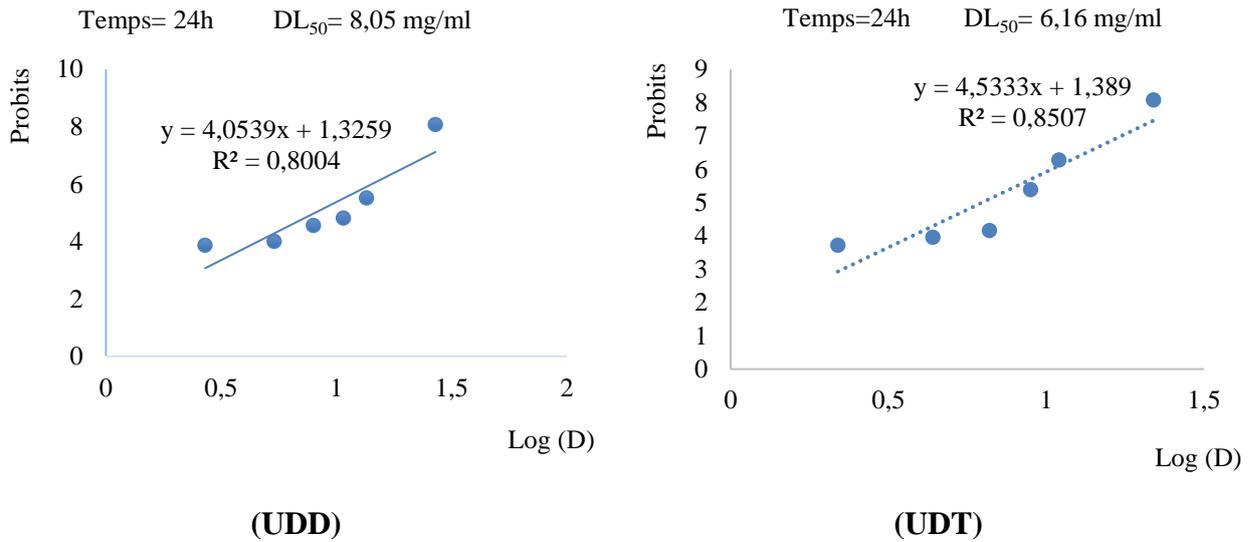
En revanche, un taux de mortalité nettement supérieur a été enregistré, contre les L2 et L4, avec l'extrait aqueux d'UDT pour les autres doses.

Le traçage des droites de régression des probits en fonction des logarithmes des doses après vingt-quatre heures d'observation, nous a permis de calculer la valeur de la  $DL_{50}$  du traitement des larves L2 et L4 de *C. pipiens* par les extraits aqueux d'UDD et UDT (**Fig. 53, 54**). De même, la  $TL_{50}$ , a été déduite à partir des droites de régression des probits en fonction du logarithme du temps à  $D_{10\%}$  pour L2 (UDD et UDT), et à  $D_{4\%}$  (UDD) et  $D_{3\%}$  (UDT) pour L4 (**Fig. 55, 56**).



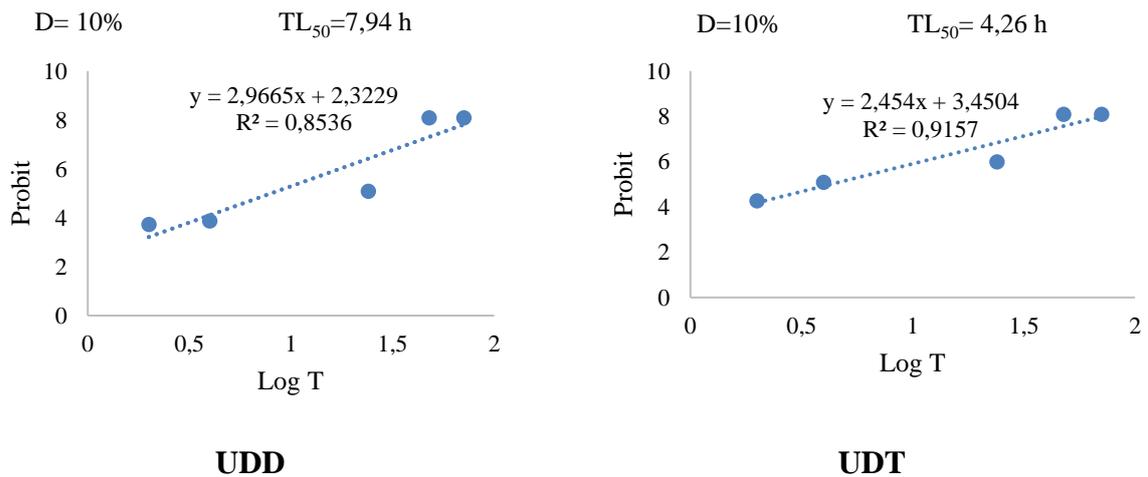
**Figure 53.** Droites de régression des probits en fonction du log des doses d'UDD et d'UDT au stade larvaire L2

UDD : *Urtica dioica de Dellys*, UDT : *Urtica dioica de Tlemcen*



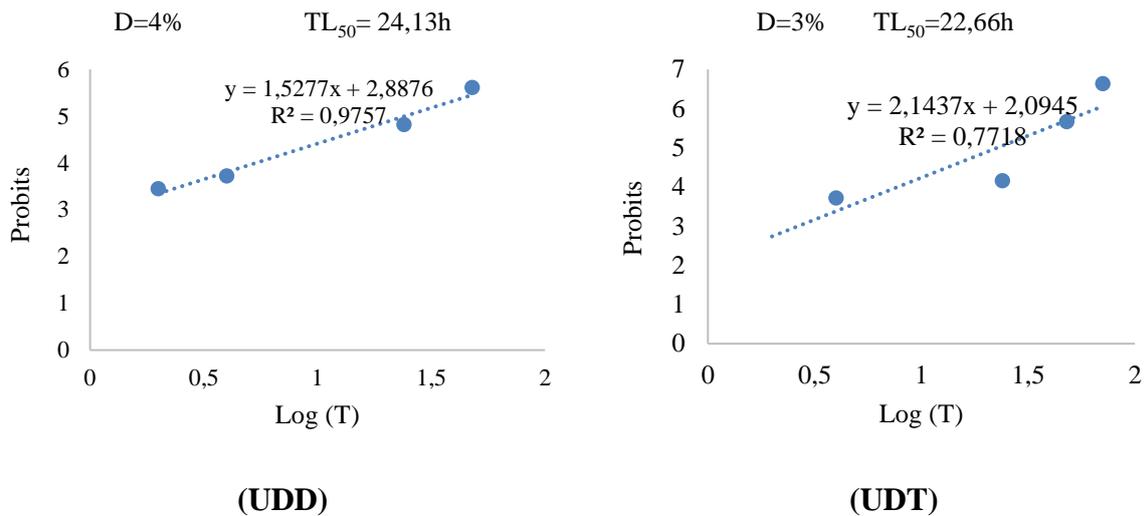
**Figure 54.** Droites de régression des probits en fonction du log des doses d'UDD et d'UDT au stade larvaire L4

UDD : *Urtica dioica de Dellys*, UDT : *Urtica dioica de Tlemcen*



**Figure 55.** Droites de régressions des probits en fonction du log des temps des larves L2 de *C. pipiens* traitées par les extraits aqueux d'UDD et d'UDT

UDD : *Urtica dioica L. récolté à Dellys*, UDT : *Urtica dioica L. récolté à Tlemcen*



**Figure 56.** Droites de régressions des probits en fonction du log des temps des larves L4 de *C. pipiens* traitées par les extraits aqueux d'UDD et d'UDT

UDD : *Urtica dioica* L. récolté à Dellys, UDT : *Urtica dioica* L. récolté à Tlemcen

A partir de ces tracés, les valeurs de la  $DL_{50}$  obtenues après 24h sont 31,62 mg/ml (UDD) et 12,58 mg/ml (UDT) pour les L2, et 8,05 mg/ml (UDD) et 6,16 mg/ml (UDT) pour les L4.

Pour L4, ces valeurs sont comprises entre  $D_{2\%UDD} = 5,4$  mg/ml  $< DL_{50UDD} = 8,05$  mg/ml  $< D_{3\%UDD} = 8,1$  mg/ml et entre  $D_{2\%UDT} = 4,46$  mg/ml  $< DL_{50UDT} = 6,16$  mg/ml  $< D_{3\%UDT} = 6,69$  mg/ml. Les valeurs de la  $DL_{50}$  d'UDT pour les deux stades larvaires (L2 et L4) sont nettement inférieures à celles obtenus d'UDD.

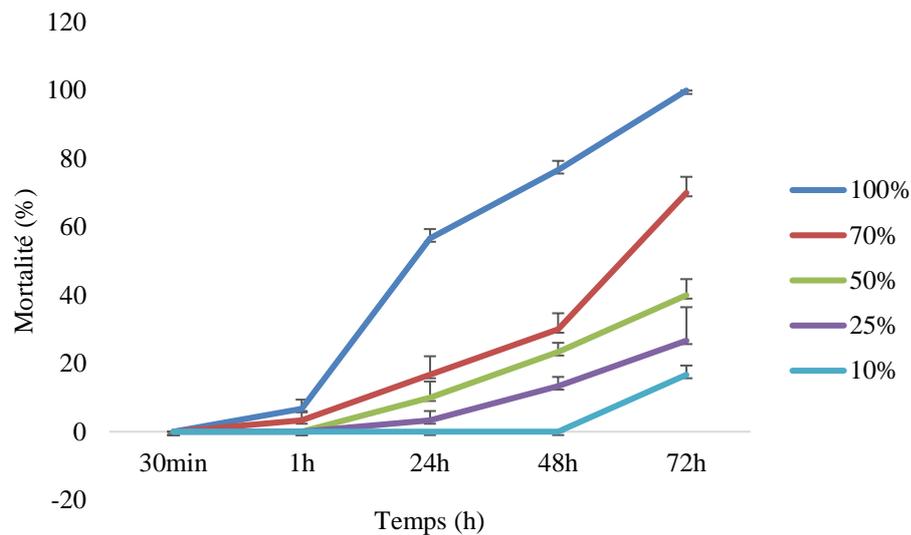
Pour le stade larvaire L2, les valeurs de la  $TL_{50}$  obtenus à partir de la dose D10% pour les deux régions d'études (UDD et UDT) sont de 7,94h (UDD) et 4,26 (UDT).

Pour L4, les valeurs du temps léthal 50 sont de 24,13 h (UDD) et de 22,66h pour UDT. Le temps nécessaire pour tuer la moitié de la population de *C. pipiens* enregistré pour UDT est inférieur à celui d'UDD, ce qui explique la rapidité d'action de l'extrait aqueux d'UDT.

Tous ces résultats de comparaison de la cinétique de mortalité des larves L2 et L4 traités par l'extrait aqueux d'*U. dioica* L. (UDT et UDD) en fonction de temps, de la comparaison des pourcentages de mortalités en fonction des différentes doses issus après 24h de traitement ainsi que le calcul des  $DL_{50}$  et  $TL_{50}$ , nous ont permis de déduire que l'extrait aqueux d'UDT possède une activité larvicide meilleure par rapport à celui d'UDD.

### III.4.2. Effet des alcaloïdes

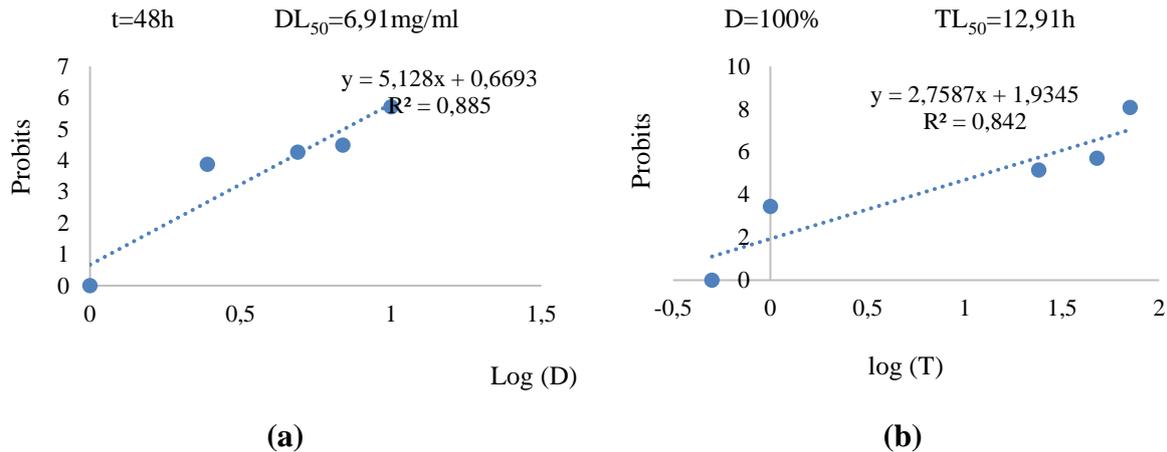
Le traitement des larves L4 de *C. pipiens* par les alcaloïdes d'UDD à différentes doses ( $D_{100\%}= 10 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{70\%}= 7 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{50\%}= 5 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{25\%}= 2,5 \text{ mg/ml}$  et  $D_{10\%}= 1 \text{ mg/ml}$ ) a été effectué. La cinétique de mortalité ainsi que la droite de régression sont représentées sur les figures ci-dessous : (Fig. 57et 58) (Annexe 06-E)



**Figure 57.** Taux de mortalité des larves L4 traitées par les alcaloïdes d'UDD

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{100\%}= 10 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{70\%}= 7 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{50\%}= 5 \text{ mg/ml}$ ,  $D_{25\%}= 2,5 \text{ mg/ml}$  et  $D_{10\%}= 1 \text{ mg/ml}$ . ( $p < 0,05$ )

A partir de ce tracé, nous avons constaté que le taux de mortalité des larves du 4<sup>ème</sup> stade de *C. pipiens* est proportionnel avec l'augmentation des doses utilisées et du temps de contact. En effet, la moitié de la population ( $56,67 \pm 2,72 \%$ ) s'est montrée sensible après 24h d'exposition à la dose la plus élevée des alcaloïdes, et c'est au bout de 72h de contacte qu'un taux de 100% de mortalité a été obtenue. Cependant, aucune mortalité n'a été observée chez les témoins.



**Figure 58.** Droites de régressions des probits en fonction du log dose (b) et du log temps (a) des larves L4 traité par les alcaloïdes d'UUD

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes,  $D_{100\%} = 10$  mg/ml,  $D_{70\%} = 7$  mg/ml,  $D_{50\%} = 5$  mg/ml,  $D_{25\%} = 2,5$  mg/ml et  $D_{10\%} = 1$  mg/ml

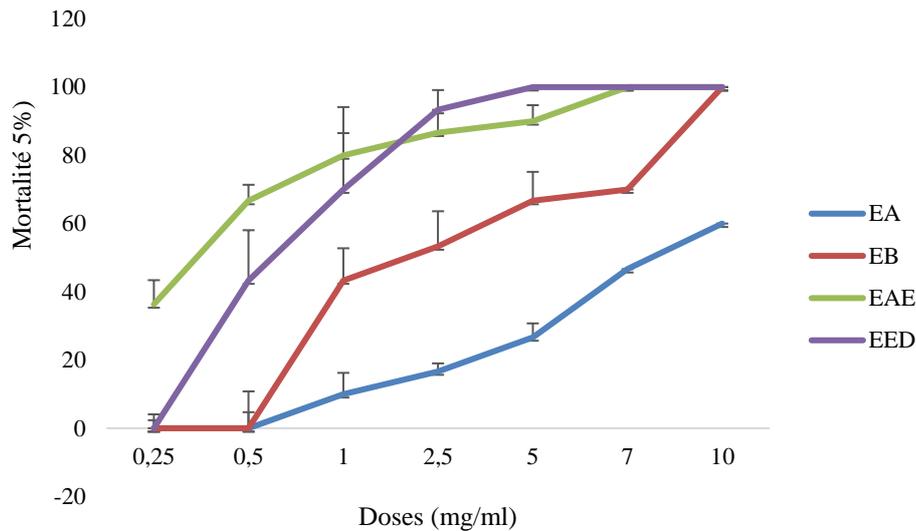
La DL<sub>50</sub> obtenue pour les alcaloïdes d'UDD est de 6,91 mg/ml après 48 h d'exposition des larves L4 aux alcaloïdes ( $D_{50\%} = 5$  mg/ml < DL<sub>50</sub> alcaloïdes = 6,91 mg/ml <  $D_{70\%} = 7$  mg/ml). La valeur de TL<sub>50</sub> est de 12,91 h pour la dose  $D_{100\%} = 10$  mg/ml.

A la lumière de ces résultats, on peut déduire que les alcaloïdes extraits à partir des feuilles de la Grande ortie possèdent une activité insecticide modérée.

### III.4.3. Effet des flavonoïdes

L'effet des quatre extraits flavonoidiques (EA, EB, EAE, et EED) d'UDT à différentes concentration a été évalué sur les larves du quatrième stade de *C. pipiens*. Ces concentrations correspondent à  $D_{100\%} = 10$  mg/ml,  $D_{70\%} = 7$  mg/ml,  $D_{50\%} = 5$  mg/ml,  $D_{25\%} = 2,5$  mg/ml pour EA et EB,  $D_{100\%} = 5$  mg/ml,  $D_{50\%} = 2,5$  mg/ml,  $D_{25\%} = 1,25$  mg/ml,  $D_{10\%} = 0,5$  mg/ml,  $D_5\% = 0,25$  mg/ml pour EAE et  $D_{100\%} = 2,2$  mg/ml,  $D_{50\%} = 1,1$  mg/ml,  $D_{25\%} = 0,55$  mg/ml,  $D_{10\%} = 0,22$  mg/ml,  $D_5\% = 0,11$  mg/ml pour EED.

Les résultats de l'activité insecticide de l'extrait aqueux vis-à-vis les larves de quatrième stade du *C. pipiens* sont répertoriées dans la figure suivante (**Annexe 07-A, B, C et D**) :



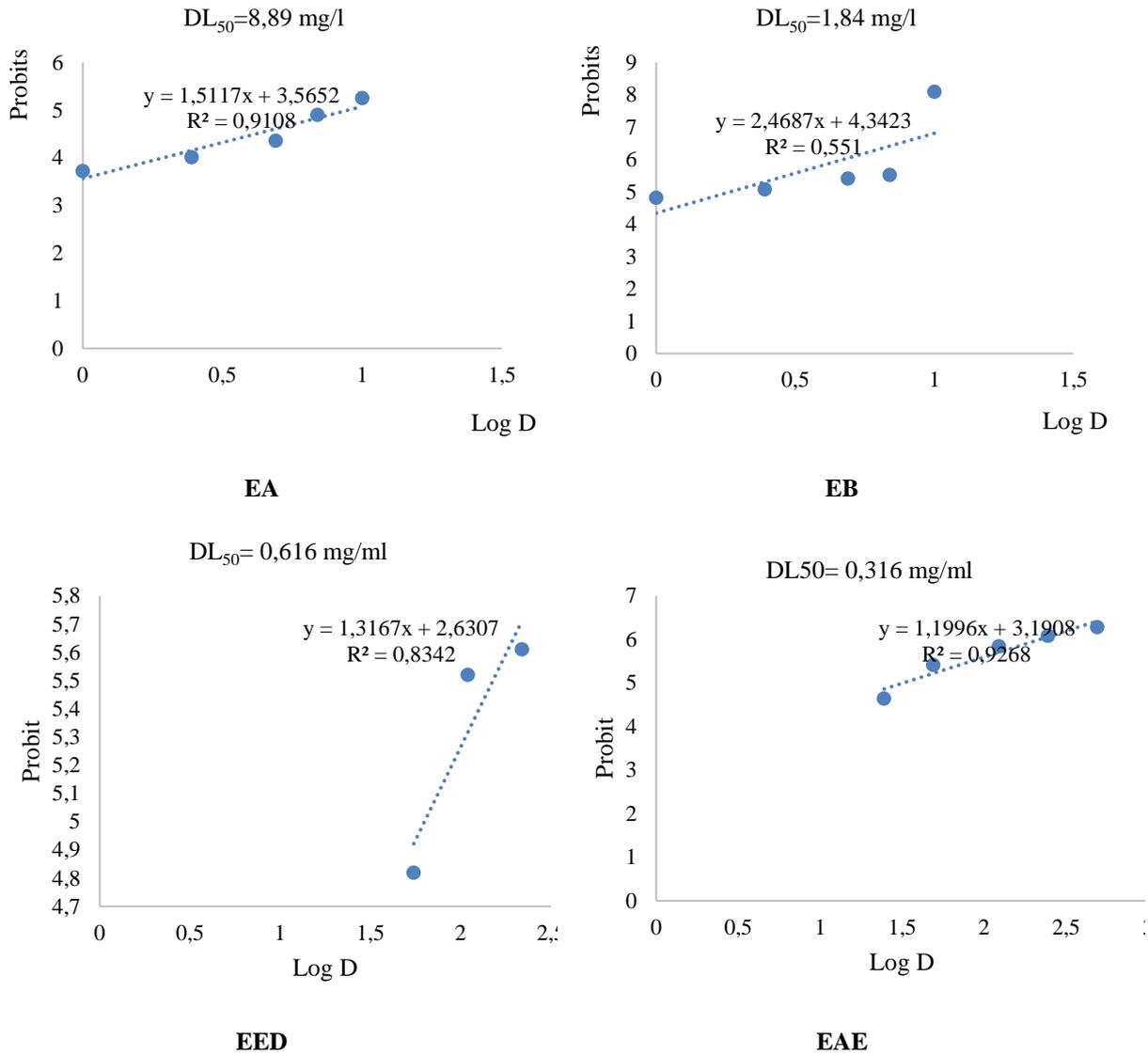
**Figure 59.** Cinétique de mortalité des larves L4 de *C. pipiens* en fonction des doses des quatre fractions flavonoïdiques après 24h de contact

Les valeurs sont représentées en moyenne  $\pm$  ESM de trois mesures différentes, EA : extrait aqueux, EB : extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique. ( $p < 0,05$ )

Il ressort des résultats du traitement une sensibilité considérable des larves L4 de *C. pipiens* vis-à-vis des quatre extraits flavonoïdiques après 24h d'exposition. Le taux de mortalité augmente en fonction des concentrations des extraits testés.

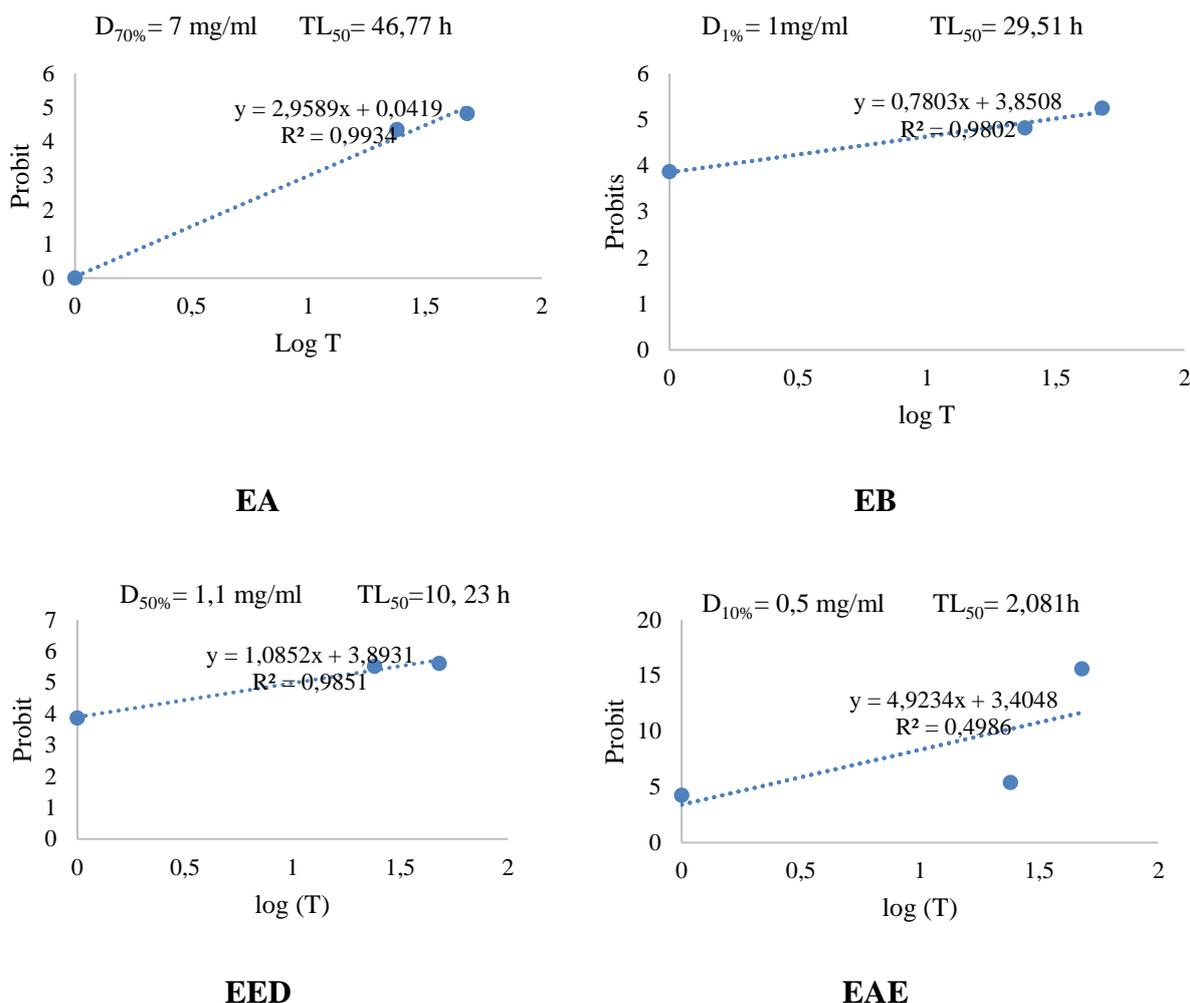
En termes de pourcentage de mortalité les larves du quatrième stade (L4) de *C. pipiens* sont plus vulnérables à l'extrait d'éther diéthylique. En effet, le 100% de mortalité est plafonné dès la concentration 5% suivi de l'extrait d'acétate d'éthyle (7%) et enfin l'extrait n-butanol qui a agi sur toutes les larves à la concentration (10%). Cependant, le 100% de mortalité pour l'extrait aqueux n'a été obtenu qu'après 48h de contact pour la concentration de 10%. Aucune mortalité n'a été observée dans le lot témoin.

La détermination des DL<sub>50</sub> et des TL<sub>50</sub> des extraits flavonoïdiques d'UDT a été effectuée par le traçage des droites de régressions des probits en fonction logarithme des doses pour le premier, et des probits en fonction logarithme du temps pour le second. L'ensemble des résultats sont illustrés dans les figures 60 et 61.



**Figure 60.** Droites de régression : probits en fonction log dose des larves L4 de *C. pipiens* traitées par les quatre extraits flavonoidiques d'UDT

EA : extrait aqueux, EB : extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique



**Figure 61.** Droites de régression : probits en fonction log temps des larves L4 de *C. pipiens* traitées par les quatre extraits flavonoidiques d'UDT

EA : extrait aqueux, EB : extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique

D'après la figure 60, il apparaît que la valeur de  $DL_{50}$  la plus importante correspond à la fraction EAE ( $DL_{50 \text{ EAE}} = 0,31 \text{ mg/ml}$ ). Cette dernière est comprise entre  $D_{5\%}$  et  $D_{10\%}$  ( $D_{10\%} = 0,5 \text{ mg/ml} < DL_{50 \text{ EAE}} = 0,31 \text{ mg/ml} < D_{5\%} = 0,25 \text{ mg/ml}$ ), suivie par la fraction EED ( $D_{25\%} = 0,55 \text{ mg/ml} < DL_{50 \text{ EED}} = 0,61 \text{ mg/ml} < D_{50\%} = 1,1 \text{ mg/ml}$ ). Les valeurs de la  $DL_{50}$  pour EA et EB sont de  $8,89 \text{ mg/ml}$  ( $D_{70\%} = 7 \text{ mg/ml} < DL_{50 \text{ EA}} = 8,89 \text{ mg/ml} < D_{100\%} = 10 \text{ mg/ml}$ ) et  $1,84 \text{ mg/ml}$  ( $D_{10\%} = 1 \text{ mg/ml} < DL_{50 \text{ EB}} = 1,84 \text{ mg/ml} < D_{25\%} = 2,5 \text{ mg/ml}$ ) respectivement (Tab. 14). A partir des résultats illustrés dans la figure 61, il ressort que le  $TL_{50}$  le plus court est obtenu pour la fraction d'EAE ( $TL_{50 \text{ EAE}} = 2,08 \text{ h}$  /  $D_{10\%} = 0,5 \text{ mg/ml}$ ), suivi de la fraction d'EED ( $TL_{50 \text{ EED}} = 10,23 \text{ h}$  /  $D_{50\%} = 1,1 \text{ mg/ml}$ ), puis la fraction d'EB ( $TL_{50 \text{ EB}} = 29,51 \text{ h}$  /  $D_{1\%} = 1 \text{ mg/ml}$ ) et EA ( $TL_{50 \text{ EA}} = 46,77 \text{ h}$  /  $D_{70\%} = 7 \text{ mg/ml}$ ).

**Tableau 15.** Paramètre toxicologiques des extraits flavonoïdiques d'*Urtica dioica* L. sur les larves L4 de *C. pipiens* (Diptera: Culicidae)

Extraits	Equations	Coefficient de régression (R <sup>2</sup> )	DL <sub>50</sub> (mg/ml)	p
EAE	y=1,1996x + 3,1908	0,9268	0,32	0,0024**
EED	y= 1,3167x + 2,6307	0,8342	0,61	0,0129*
EB	y=2,4687x + 4,3423	0,551	1,84	0,0005***
EA	y=1,5117x + 3,5652	0,9108	8,89	0,0002***

EA : extrait aqueux, EB : extrait butanolique, EAE : extrait d'acétate d'éthyle, EED : extrait d'éther diéthylique, \*résultat significatif, \*\* hautement significatif, \*\*\* très hautement significatif.

A partir des résultats de la cinétique de mortalité, du calcul des doses létales DL<sub>50</sub> et des résultats du calcul des temps létaux TL<sub>50</sub> des larves L4 soumises à l'effet des flavonoïdes, il en ressort une bonne activité en terme de toxicité pour les quatre fractions. Cependant, la meilleure activité insecticide est attribuée à la fraction EAE, suivi de la fraction EED, puis la fraction EB et enfin à la fraction EA. Cette propriété est due à la richesse des extraits flavonoïdiques de la Grande ortie en groupements fonctionnels.

D'après **Betty et al. (1990) et Satiyamoorthy et al. (1997)**, les molécules bioactives des plantes comme les saponosides, les tanins, les terpènes et les flavonoïdes sont doués de propriétés insecticides. Ces métabolites, selon **Tonk et al. (2006) et Isman (2006)** grâce à leur effet insecticides pouvant être soit répulsives, soit antiappétantes, insectifuges ou encore un régulateur de croissance des insectes. Leurs toxicité s'exerce de façon sélective sur le système nerveux (neurotoxique), le système reproducteur (reprotoxique) ou le système digestif des bioagresseurs (**Allal-Benfekih et al., 2011**).

Parmi les flavonoïdes, les roténoïdes (et en particulier la roténone) ont largement été étudiés pour leur activité insecticide. Dans certaines formulations, la roténone était associée à du pyrèthre et pouvait également entrée dans la composition d'insecticides ménagers (**Morel, 2011**). La dégueline et la téphrosine (roténoïdes) apparaissent comme de bons larvicides contre *Aedes aegypti* (**Yenesew et al., 2009**) et contre *Culex quinquefasciatus* (**Yenesew et al., 2005**). Certains ptérocarpans possèdent des propriétés insecticides contre *Anopheles gambiae* (néoduline, 4-méthoxynéoduline) (**Jimenez-Gonzalez et al., 2008**).

Le mode d'action de la roténone est bien connu (**Corbett et al., 1984**). Elle agit au niveau de la respiration cellulaire mitochondriale. Elle se lie à la NADH-déshydrogénase en bloquant le complexe 1 de la chaîne respiratoire. Les symptômes de toxicité aiguë chez les insectes sont

la paralysie des pièces buccales, le ralentissement des mouvements respiratoires, une instabilité dans la locomotion, la réduction de la consommation d'oxygène qui conduit à une mort lente de l'insecte (**Rattan, 2010**).

Il a été démontré que l'UDA (*Urtica dioica* Agglutinin) possédait une activité insecticide et qu'elle agissait en synergie avec la chitinase en inhibant la croissance fongique (**Brockaert et al., 1989 ; Huesing et al., 1991**).

Les résultats des essais de toxicité de l'extrait aqueux ainsi que des alcaloïdes d'*Urtica dioica* L. ont révélé une bonne activité insecticide vis-à-vis les larves du quatrième stade de *Culex pipiens*. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par **Bellagh et al. (2015)**, en travaillant sur le purin d'Ortie comme agent de lutte biologique contre la mineuse de la tomate *Tuta absoluta* démontrant ainsi un effet insecticide important.

L'effet insecticide des extraits de la Grande ortie a été évalué par **Benoufella-Kitous (2015)**, qui a signalé un effet non négligeable de l'extrait aqueux des feuilles sur *Aphis fabae* après trois jours de traitement.

**Aouinty et al. (2006)**, ont noté sur des larves L4 de *C. pipiens* exposés aux extraits aqueux des feuilles du bois Thuya *Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast. et du Ricin *Ricinus communis* L. des valeurs de DL<sub>50</sub> deux fois plus élevées, à ceux obtenu par le présent travail, soit respectivement 530 mg.L<sup>-1</sup> et 600 mg.L<sup>-1</sup>. Ceci montre l'intérêt d'*Urtica dioica* L. dans la lutte anti-larvaire. Les larves de *C. pipiens* sont sensibles également à l'extrait éthanolique de *Nerium oleander* donnant ainsi des valeurs de DL<sub>50</sub> et DL<sub>90</sub> de l'ordre de 57,57 mg/ml et 166,35mg/ml respectivement (**El-Akhal et al., 2015**).

## *CONCLUSION*

La présente étude s'articule autour de deux axes. Le premier vise à l'isolement et l'identification des différentes bactéries endophytes associées à la Grande ortie, et l'élaboration d'une éventuelle corrélation entre la présence des bactéries endophytes et la synthèse des métabolites secondaires. Le deuxième est consacré à l'évaluation de l'effet insecticide des extraits aqueux, alcaloïdes et flavonoïdes sur les larves de moustiques *C. pipiens* L.

Les examens macroscopiques, microscopiques, biochimiques et par MALDI-TOF MS, nous a permis d'identifier divers bactéries endophytes à partir des tiges, feuilles et racines de la Grande ortie récoltée dans deux régions de l'Algérie (Dellys et Tlemcen). Les résultats obtenus montrent une dominance de Bacillaceae, représentée essentiellement par quatre espèces, à savoir *Bacillus pumilus-ME*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus cereus*, suivi par les Enterobacteriaceae avec trois espèces (*Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans* et *Enterobacter amnigenus*), et les Paenibacillaceae avec deux espèces (*Paenibacillus lautus* et *Paenibacillus glucanolyticus*). Les familles moins fréquentes sont représentées par les Staphylococcaceae et les Enterococcaceae avec *Staphylococcus cohnii* et *Enterococcus faecium* respectivement. Cette étude a fait ressortir aussi, que les feuilles renferment plus de bactéries endophytes, soit six espèces isolées à Tlemcen et quatre espèces à Dellys. En ce qui concerne l'effet du biotope sur la diversité des bactéries endophytes, il semble que la pollution de l'environnement influence ce type d'association. En effet, *U. dioica* L. récoltée dans la région de Tlemcen est la plus riche en bactéries associées avec sept genres et onze espèces comparé à celle récoltée à Dellys (deux genres et cinq espèces).

Les tests phytochimiques ont fait ressortir une répartition hétérogène des métabolites secondaires dans les différentes parties de la même plante (tiges, feuilles et racines). Ainsi, pour les deux régions d'études, les tiges présentent une forte teneur en saponosides et en glucosides. Les feuilles sont riches en anthocyanes, tanins totaux, tanins catéchiques, saponosides, alcaloïdes, coumarines, flavonoïdes et mucilages est observée. Les racines renferment des saponosides, coumarines, glucosides et mucilages.

Par ailleurs, quatre endophytes : *B. anthracis*, *B. pumilus-ME*, *B. megaterium* et *E. coli* ont été des tissus végétaux des deux échantillons de la Grande ortie (UDD et UDT). D'autres espèces sont par contre détectées uniquement dans l'un des deux échantillons : *E. faecium*, *E. amnigenus*, *S. cohnii*, *P. agglomerans*, *P. lautus* et *P. glucanolyticus* endosymbiotiques

dans la Grande ortie de Tlemcen, et *B. cereus* dans la Grande ortie de Dellys. L'unique endosymbiote colonisant toute la plante est *B. pumilus-ME* (tiges, feuilles et racines). La nature de l'association bactérie-plante a fait ressortir une relation entre la présence de certains endophytes et les métabolites secondaires synthétisés par la plante. En effet, la présence de bactéries du genre *Bacillus* induit la synthèse des leuco-anthocyanes, saponosides, alcaloïdes, coumarines, glucosides, mucilages, anthocyanes, tanins, tanins catéchiques, sénosides, et flavonoïdes. De même, une induction à la synthèse quinones libres est provoquée en présence de bactéries du genre *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* et *Pantoea*.

Concernant l'effet insecticide, les tests préliminaires effectués par l'extrait aqueux des deux échantillons (UDD et UDT) sur les larves L2 et L4 de *C. pipiens* L. ont révélés une meilleure activité larvicide de UDT ( $DL_{50UDD} = 8,05$  mg/ml,  $DL_{50UDT} = 6,16$  mg/ml après 24h de contact). L'effet des alcaloïdes obtenus des feuilles d'UDD sur les larves L4 a montré une activité modérée ( $DL_{50 \text{ alcaloïdes}} = 6,91$  mg/ml). En revanche, pour les flavonoïdes d'UDT, la meilleure activité est attribuée à la fraction EAE ( $DL_{50 \text{ EAE}} = 0,31$  mg/ml), suivi de la fraction EED ( $DL_{50 \text{ EED}} = 0,61$  mg/ml), puis la fraction EB ( $DL_{50 \text{ EB}} = 1,84$  mg/ml) et enfin à la fraction EA ( $DL_{50 \text{ EA}} = 8,89$  mg/ml). ( $p < 0,05$ ).

Il ressort de ce travail que la Grande ortie peut être une source importante de métabolites secondaires et une niche de plusieurs bactéries endophytes pouvant avoir une importance biotechnologique. En perspectives, il serait souhaitable de poursuivre les recherches afin :

- D'isoler et d'identifier d'autres microorganismes, notamment les champignons associés à la Grande ortie ;
- D'évaluer l'effet *in vivo* de *B. pumilus-ME* sur la synthèse des métabolites secondaires ;
- D'isoler, caractériser et purifier les composés actifs des extraits par des méthodes chromatographiques et spectrales tels que l'HPLC ou RMN.

*RÉFÉRENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

1. **Abbott, W. S. (1925).** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of economic Entomology*, 18(2), 265-267.
2. **Aberchane, M., Fechtal, M., Chaouch, A., et Bouayoune, T. (2001).** Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du Cèdre de l'atlas (*Cedrus atlantica Manetti*). In *Annales de la recherche forestière au Maroc*, 34, pp. 110-118. Centre national de la recherche forestière.
3. **Adhikari, T. B., Joseph, C. M., Yang, G., Phillips, D. A., et Nelson, L. M. (2001).** Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(10), 916-924.
4. **Adriaenssens, E. M., Ceysens, P. J., Dunon, V., Ackermann, H. W., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., De Proft, M., et Lavigne, R. (2011).** Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, belonging to the “phiKMV-like viruses”. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3443-3450.
5. **Afif Chaouche, T. (2015).** Etude ethno pharmacologique et évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante de quelques plantes médicinales de la région de Tizi Ouzou- Algérie. Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen, Algérie, 141p.
6. **Aharoni, A., et Galili, G. (2011).** Metabolic engineering of the plant primary secondary metabolism interface. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 239–244.
7. **Akbay, P., Basaran, A.A., Undeger, U., et Basaran, N. (2003).** *In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytotherapy Research*, 17(1), 34-37.
8. **Allal-Benfekih, L., Bellatreche, M., Bounaceur, F., Tail, G., et Mostefaoui, H. (2011).** First approach of using aqueous extracts of *Inula viscosa*, *Salvia officinalis* and *Urtica urens* for the control of *Tuta absoluta* (Lepidoptera, Gelechiidae) an invasive pest of tomato in Algeria. In *Les Cochenilles: ravageur principal ou secondaire. 9ème Conférence Internationale sur les Ravageurs en Agriculture, SupAgro, Montpellier, France, 25-27 octobre 2011* (681-689 pp). Association Française de Protection des Plantes (AFPP).
9. **Allardice, P. (1993).** A–Z of companion planting. London: Cassell Publishers Ltd.
10. **Al-Khafaji, N. (2015).** Evaluation of antibacterial activities of *Urtica dioica* against some pathogenic bacterial strains. *International journal of current advanced research*, 4, 216- 220.
11. **Amara Korba, R. (2011).** Bio-écologie du complexe *Culex pipiens*: (Diptera: Culicidae) responsable de la transmission du virus West Nile et du virus de la Fièvre de

- la vallée du rift en Algérie. Mémoire de Master II, Université- Badji Mokhtar, Annaba, Algérie, 57p.
12. **Amraoui, F. (2012).** Le moustique *Culex pipiens*, vecteur potentiel des virus West Nile et fièvre de la vallée du Rift dans la région du Maghreb. Thèse de Doctorat en virologie-entomologie, Université Mohammed V-Agdal, Maroc, 119p.
  13. **Andersen, S., et Wold, J. K. (1978).** Water-soluble glycoprotein from *Urtica dioica* leaves. *Phytochemistry*, 17(11), 1875-1877.
  14. **Andersson, A.M., Weiss, N., Rainey, F., et Salkinoja-Salonen, M.S. (1999).** Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *Journal of Applied Microbiology*, 86(4), 622–634.
  15. **Andrews, J.H., et Harris, R.F. (2000).** The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38(1), 145-180.
  16. **Aouinty, B., Oufara, S., Mellouki, F., et Mahari, S. (2006).** Évaluation 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). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10(2), 67-71.
  17. **APG III. (2009).** An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161 (2), 105-121.
  18. **Arnold, B. (1999).** Fungal endophytes of tropical trees: Methods and potential for biological control of fungal pathogens of cocoa. *Research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa*. Workshop manual, CATIE, Turrialba, Costa Rica 28 June – 4 July, 1999. Edited by Ulrike Krauss et Prakash Hebbar. 44 -54.
  19. **Asgarpanah, J., et Mohajerani, R. (2012).** Phytochemistry and pharmacologic properties of *Urtica dioica* L. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(46), 5714-5719.
  20. **Azevedo, J. L., Maccheroni Jr, W., Pereira, J. O., et de Araújo, W. L. (2000).** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(1), 15-16.
  21. **Azondekon, R., (2006).** Contrôle de qualité des moustiques imprégnés commercialisés. Mémoire de fin d'étude, Université Benin, 90p.

22. **Bacon C. W. et White J. F., (2000).** Microbial endophytes. *Marcel Dekker Inc*, New York, 101:106p.
23. **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Gazin M., et Pinkas, M. (1996).** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, 46(11), 1086-1089.
24. **Balenghien, T. (2009).** La lutte chimique contre les Culicoides. 18-12.
25. **Balzarini, J., Neyts, J., Schols, D., Hosoya, M., Van Damme, E., Peumans, W., et De Clercq, E. (1992).** The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine) n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. *Antiviral research*, 18(2), 191-207.
26. **Barea, J. M., Gryndler, M., Lemanceau, P., Schüepp, H., et Azcón, R. (2002).** The rhizosphere of mycorrhizal plants. In *Mycorrhizal technology in agriculture* (pp. 1-18). Birkhäuser, Basel.
27. **Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., et Azcon-Aguilar, C. (2005).** Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.
28. **Bebba, N., et Berchi, S. (2004).** Etude comparative des effets des insecticides sur les populations larvaires de Culicidae de Constantine et Oued Righ (Touggourt et Djamâa). Mémoire Magistère, 179p.
29. **Beck, H. C., Hansen, A. M., et Lauritsen, F. R. (2003).** Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. *FEMS microbiology letters*, 220(1), 67-73.
30. **Becker, N., et Ascher, K. R. S. (1998).** The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel Journal of Entomology*, 32, 63-69.
31. **Becker, N., Petrić, D., Boase, C., Lane, J., Zgomba, M., Dahl, C., et Kaiser, A. (2003).** *Mosquitoes and their control* (Vol. 2). New York: Springer.
32. **Bellagh, N., Baghdali, M., Baghdali, S. (2015).** Evaluation de l'activité antimicrobienne des polyphénols des grains d'*Urtica dioica* et essais préliminaires de l'activité larvicide du purin d'ortie sur la mineuse de la tomate «Tuta absoluta». mémoire de Master en biotechnologie microbienne. Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Algérie, 53p.

33. **Belkhatir, D., Metri, A. A., Benkou, F., Bouaza, H., Sidi-Yakhlef, A., Ait-Yahia, R., et Bachir, S. (2014).** Caractérisation anthropogénétique de la population de Beni Ouarsous dans les monts de Traras par le polymorphisme des groupes sanguins (ABO, Rhésus, MNSs et Duffy) : Analyse comparative à l'échelle Méditerranéenne. *Antropo*, 31, 89-97.
34. **Beloued, A. (1998).** Plantes médicinales d'Algérie. Ed. Entreprise nationale du livre, Alger, 359 p.
35. **Bendali, F. (2006).** Etude bioécologique, systématique et biochimique des Culicidae (Diptera : Nematocera) de la région d'Annaba. Lutte biologique anti-culicidienne. Thèse de doctorat en biologie animale, Université de Annaba 113p.
36. **Benoufella-Kitous, K. (2015).** Bioécologie des pucerons de différentes cultures et de leurs ennemis naturels à Oued-Aissi et Drâa Ben Khedda (Tizi-Ouzou). Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, 334p.
37. **Bensella, F., (2015).** Quantification des polyphénols des racines d'*Urtica dioica* L. récoltée à Dellys et évaluation de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire. Mémoire de Master en Biologie des populations et des organismes. Université M'hamed Bougara de Boumerdès, Algérie, 51p.
38. **Berchi S. (2000).** Bioécologie de *Culex pipiens*L. (Diptera : Culicidae) dans la région de Constantine et perspectives de luttés. Thèse de Doctorat, Université de Constantine, Algérie, 133p.
39. **Bertrand, B. (2002).** Les secrets de l'Ortie. 7ème édition Editions de Terran (Collection Le Compagnon Végétal ; n01, 128p.
40. **Betty, P. J., et Derek, W. S. (1990).** Atlas of microscopy of medicinal plants, culinary herbs and spices. *Belhaven Press, a division of Pinter Publishers*, London, 257p.
41. **Bloemberg, G. V., et Lugtenberg, B. J. (2001).** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current opinion in plant biology*, 4(4), 343-350.
42. **Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M., et Legssyer, A. (2003).** Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. *Fitoterapia*, 74(7-8), 677-681.
43. **Boizot, N., et Charpentier, J. P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. *Le Cahier des Techniques de l'INRA, Numéro spécial 2006 : Méthodes et outils pour l'observation et l'évaluation des milieux forestiers, prairiaux et aquatiques*, 79-82.

44. **Bombardelli, E., et Morazzoni, P. (1997).** *Urtica dioica* L. *Fitoterapia*, 68, 387-402.
45. **Boulkenafet, F. (2006).** Contribution à l'étude de la biodiversité des Phlébotomes (Diptera : Psychodidae) et appréciation de la faune Culicidienne (Diptera : Culicidae) dans la région de Skikda. Mémoire de Magister en Entomologie, Option Application Agronomique et Médicale, Constantine, 190p.
46. **Bounechada, M., et Arab, R. (2011).** Effet insecticide des plantes *Melia azedarach* L. et *Peganum harmala* L. sur *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae).
47. **Bourkhiss, M., Hnach, M., Lakhliifi, T., Boughdad, A., Farah, A., et Satrani, B. (2011).** Effet de l'Age et du Stade Végétatif sur la Teneur et la Composition Chimique des Huiles Essentielles de Thuya de Berbere. *Les technologies de laboratoire*, 6(23), 64-68.
48. **Bowen, G. D., et Rovira, A. D. (1999).** The rhizosphere and its management to improve plant growth. In *Advances in agronomy*, (Vol. 66, pp. 1-102). Academic Press.
49. **Boyer, S. (2006).** Résistance métabolique des larves de moustiques aux insecticides: Conséquences environnementales. Thèse de Doctorat, Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 79p.
50. **Bream, A. S., El-Sheikh, T. M. Y., Fouda, M. A., et Hassan, M. I. (2010).** Larvicidal and repellent activity of extracts derived from aquatic plant *Echinochloa stagninum* against *Culex pipiens*. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 5(1), 107-123.
51. **Broekaert, W. F., Van Parijs, J. A. N., Leyns, F., Joos, H., et Peumans, W. J. (1989).** A chitin-binding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties. *Science*, 245(4922), 1100-1102.
52. **Brouillard, R. (1993).** The flavonoids, advances in research since 1986. Ed J.B Harbone, London. 538p.
53. **Brown, A. W. A., Haworth, J., et Zahar, A. R. (1976).** Malaria eradication and control from a global standpoint. *Journal of Medical Entomology*, 13(1), 1-25.
54. **Bruneton, J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Edition TEC et DOC, Paris, 915p.
55. **Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Édition TEC et DOC, Paris, 575p.
56. **Brunhes, J., Rahim, A., Geoffroy, B., Angel, G., et Hervy, J.P. (1999).** Les *Culicidae*s d'Afrique méditerranéenne. Logiciel de l'Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.), Montpellier, 8p.

57. **Cachereul A. (1997).** Les moustiques : cycle de développement, aspects anatomophysiologiques et régulation du cycle ovarien, Thèse de Médecine Vétérinaire, Nante, France, 117p.
58. **Cavelier, A. (1976).** Cours de phytopharmacie. Edition Institut National Agronomique, Alger, Tome 1, 90p.
59. **Chaudhary, S. K., Ceska, O., Warrington, P. J., et Ashwood-Smith, M. J. (1985).** Increased furocoumarin content of celery during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(6), 1153-1157.
60. **Chaurasia, N., et Wichtl, M. (1987).** Flavonolglykoside aus *Urtica dioica* 1, 2. *Planta Medica*, 53(05), 432-434.
61. **Chaurasia, N., et Wichtl, M. (1987).** Sterols and steryl glycosides from *Urtica dioica*. *Journal of Natural Product*, 50(5), 881-885.
62. **Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., and Kloepper, J.W. (1994).** Biological control potential and population dynamics of endophytic bacteria in a cotton/*Fusarium* wilt system. In Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. Proceedings of the 3rd International Workshop on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Adelaide, Australia, 7–11 March 1994. Edited by M.H. Ryder, P.M. Stephens, and G.D. Bowen. CSIRO, South Australia, Australia.
63. **Chrubasik, J.E., Boutogalis, B.O., Hanger, H., et Chrubasik, S.A. (2007).** Comprehensive review on the stinging nettle, effect and efficacy profile. *Phytomedicine*, 14(7), 568 – 579.
64. **Coêlho, M. M., Ferreira-Nozawa, M. S., Nozawa, S. R., et Santos, A. L. (2011).** Isolation of endophytic bacteria from arboreal species of the Amazon and identification by sequencing of the 16S rRNA encoding gene. *Genetics and molecular biology*, 34(4), 676-680.
65. **Compant, S., Clément, C., et Sessitsch, A. (2010).** Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.
66. **Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., et Sessitsch, A. (2011).** Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62(1), 188-197.

67. **Corbett, J.R., Wright, K., et Baillie, A. (1984).** Herbicide interfering with photosynthesis Herbicide interfering with photosynthesis. In *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*.
68. **Coupin, H. (1920).** Les plantes médicinales. Ed. Costas, Paris.
69. **Cowan, M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
70. **Cragg, G. M., Newman, D. J., et Snader, K. M. (1997).** Natural products in drug discovery and development. *Journal of natural products*, 60(1), 52-60.
71. **Cruz, A. T., Cazacu, A. C., et Allen, C. H. (2007).** *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 1989-1992.
72. **Dacosta, E. (2003).** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves DACOSTA, Paris, 317p.
73. **Daoudi, A., Sabiri, M., Bammou, M., Zair, T., Ibijbijen, J., et Nassiri, L. (2015).** Valorisation des extraits de trois espèces du genre *Urtica*: *Urtica urens* L., *Urtica membranacea* Poiret et *Urtica pilulifera* L. *Journal of Applied Biosciences*, 87(1), 8094-8104.
74. **De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B., et Vandamme, P. (2011).** Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and applied microbiology*, 34(1), 20-29.
75. **Delahaye, J. (2015).** Utilisations de l'ortie- *Urtica dioica* L. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Rouen UFR de médecine et de pharmacie, 227p.
76. **Diakite, B. (2008).** La susceptibilité des larves d'Anophèles Gambiae S.L.A à des extraits de plantes médicinales du Mali. Thèses de Doctorat en médecine. Université de Bamako, Mali, 132p.
77. **Divya, T. M., Soorya, V. C., Amithamol, K. K., Juliet, S., Ravindran, R., Nair, S. N., et Ajithkumar, K. G. (2014).** Acaricidal activity of alkaloid fractions of *Leucas indica* Spreng against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* tick. *Tropical biomedicine*, 31(1), 46-53.
78. **Downing, K. J., et Thomson, J. A. (2000).** Introduction of the *Serratia marcescens* chiA gene into an endophytic *Pseudomonas fluorescens* for the biocontrol of phytopathogenic fungi. *Canadian journal of microbiology*, 46(4), 363-369.
79. **Draghi, F. (2005).** L'Ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) : étude bibliographique. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Henri Poincaré Nancy, 89p.
80. **Duchauffour, P. (1976).** Atlas écologique des sols du monde. Ed. Masson, Paris, 178p.

81. **Dudeja, S. S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., et Kothe, E. (2012).** Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of Basic Microbiology*, 52(3), 248-260.
82. **Duduku, D., Sarbatly, R., et Nithyanandam, R. (2011).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
83. **Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., et Minamisawa, K. (2001).** Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5285-5293.
84. **El-Deeb, B., Fayez, K., et Gherbawy, Y. (2013).** Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal of plant interactions*, 8(1), 56-64.
85. **Elicoh-Middleton, J.R., Chithan, K., et Theoharis, C. (2000).** Effect of plant flavonoïds on mammalian cells: implication for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and experimental therapeutics*. 4(52), 673-751.
86. **Elicoh-Middleton, P.G. (2000).** Flavonoïds as antioxydans. *Journal of naturel product*. 63, 1035-1042.
87. **El Ouali Lalami A., El-Akhal, F., El Amri, N., Maniar, S., et Faraj, C. (2014).** État de la résistance du moustique *Culex pipiens* vis-à-vis du téméphos au centre du Maroc State resistance of the mosquito *Culex pipiens* towards temephos central Morocco. *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 107(3), 194-198.
88. **Elvira-Recuenco, M., et Van Vuurde, J. W. L. (2000).** Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian journal of microbiology*, 46(11), 1036-1041.
89. **Emmert, E. A., et Handelsman, J. (1999).** Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology letters*, 171(1), 1-9.
90. **Estrela, D.D.S., de Oliveira, R.P., de Matos, J.G., Cardoso, D.P., de Sousa, P.F.P., de Souza, J.S.N., Farias, M.P.O. (2017).** *In vitro* evaluation of the acaricidal effect of ethanolic extract of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit (Lamiaceae) leaves on engorged females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Pubvet*, 11(9), 854-859.
91. **Euzebey, J. (2008).** Grand dictionnaire illustre de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris : Editions Tec & Doc. 818 p.
92. **Falleh, H., Ksouri, R., Chaib, k, Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., et Abdelly, C., (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331(5), 372- 379.

93. **Farnsworth, N. R., et Soejarto, D. D. (1991).** Global importance of medicinal plants. *The conservation of medicinal plants*, 25-51.
94. **Fisher, P. J., Petrini, O., et Scott, H. L. (1992).** The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist*, 122(2), 299-305.
95. **Flesch, F. (2005).** Intoxication d'origine végétale plant poisoning F. *Flesch (Praticien hospitalier) Centre antipoison, hopitaux universitaires de Strasbourg*.
96. **Fouché, G., Eloff, J.N. et Wellington, K. (2017).** Evaluation of South African Plants with acaricide activity against ticks. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*, 11(6), 381-385.
97. **Fournier, P. (2001).** Les quatre flores de France. Lachevalier, Paris, Vol II.2, 216p.
98. **Frommel, M. I., Nowak, J., et Lazarovits, G. (1991).** Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*, 96(3), 928-936.
99. **Garbeva, P., Van Overbeek, L. S., Van Vuurde, J. W. L., et Van Elsas, J. D. (2001).** Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial ecology*, 41(4), 369-383.
100. **Gariépy, V. (2011).** Évaluation du potentiel des parasitoïdes *Binodoxys communis*, *Aphidius colemani* et *Aphelinus certus* pour la lutte au puceron du soya. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal.
101. **Ghedira, K., Goetz, P., et Le Jeune, R. (2009).** *Urtica dioica* L., *Urtica urens* et/ou hybrides (Urticaceae). *Phytothérapie*, 7(5), 279.
102. **Ghesten, A., Seguin, E., et Orecchioni, A. (2001).** Le préparateur en pharmacie. 2<sup>ème</sup> édition TEC & DOC, Paris, 275p.
103. **Gholami, A., Biyari, A., Gholipoor, M., et Asadi Rahmani, H. (2012).** Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 43(9), 1263-1272.
104. **Ghosh, A., Chowdhury, N., et Chandra, G. (2012).** Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research*, 135(5), 581.
105. **Glick, B. R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 41(2), 109-117.

106. **Glienke, C. (1995).** Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD. Thèse de Doctorat, Université Federale de Paraná, Brésil, 115p.
107. **Goislard, C. (2012).** Les répulsifs anti-moustiques à l'officine.
108. **Grevsen, K., Frette, X. C., et Christensen, L. P. (2008).** Concentration and composition of flavonol glycosides and phenolic acids in aerial parts of stinging nettle (*Urtica dioica* L.) are affected by nitrogen fertilization and by harvest time. *European Journal of Horticultural Science*, 20-27.
109. **Guan, S. H., Sattler, I., Lin, W. H., Guo, D. A., et Grabley, S. (2005).** p-Aminoacetophenonic Acids Produced by a Mangrove Endophyte: *Streptomyces g riseus* subsp. *Journal of natural products*, 68(8), 1198-1200.
110. **Guignard, J.L. (1996).** Biochimie végétale. Masson, Paris, 255 p.
111. **Guiraud, J.P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Ed Dunod, Paris. 651p.
112. **Gül, S., Demirci, B., Başer, K. H. C., Akpulat, H. A., et Aksu, P. (2012).** Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(5), 666-671.
113. **Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. İ., Oktay, M., et Büyükokuroğlu, M. E. (2004).** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of ethnopharmacology*, 90(2-3), 205-215.
114. **Guil-Guerrero, J. L., Reboloso-Fuentes, M. M., et Isasa, M. T. (2003).** Fatty acids and carotenoids from Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(2), 111-119.
115. **Haas, D., et Défago, G. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307.
116. **Hallmann, J., Quandt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., et Kloepper, J. W. (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(10), 895-914.
117. **Hamaidia, H., (2004).** Inventaire et biodiversité des Culicidae (Diptera, Nematocera) dans la région de Souk-Ahras et de Tebessa (Algérie). Mémoire de Magister, Université de Constantine, 152p.
118. **Harborne, A.J. (1998).** Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3ème édition, London, Chapman et Hall, 320p.
119. **Harborne, J. B., et Williams, C. A. (2000).** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.

120. **Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., et van Elsas, J. D. (2008).** Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.
121. **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2831-2846.
122. **Hassain, K. (2002).** Biogéographie et biotypologie des Culicidae (Diptera–Nematocera) de l’Afrique méditerranéenne. Bioécologie des espèces les plus vulnérantes (*Aedes caspius*, *Aedes detritus*, *Aedes mariae* et *Culex pipiens*) de la région occidentale d’Algérie. Thèse de Doctorat, Université de Tlemcen, 191p.
123. **Himmi O., Dakki M., Trari B et Elagbani M.a. (1995).** Les Culicidae du Maroc. Clés d'identification avec données biologiques et écologiques. *Trav. Inst. Sci., Zool.*, 44, Rabat : 50 p.
124. **Himmi, O., Trari, B., El Agbani, M. A., et Dakki, M. (1998).** Contribution à la connaissance de la cinétique et des cycles biologiques des moustiques (Diptera, Culicidae) dans la région de Rabat-Kénitra (Maroc). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat*, 1997(21), 71-79.
125. **Hinton, D. M., et Bacon, C. W. (1995).** Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129(2), 117-125.
126. **Hollman, P. C., Bijsman, M. N., van Gameren, Y., Cnossen, E. P., de Vries, J. H., et Katan, M. B. (1999).** The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free radical research*, 31(6), 569-573.
127. **Huesing, J. E., Murdock, L. L., et Shade, R. E. (1991).** Rice and stinging nettle lectins: insecticidal activity similar to wheat germ agglutinin. *Phytochemistry*, 30(11), 3565-3568.
128. **Isfahlan, A. J., Mahmoodzadeh, A., Hasanzadeh, A., Heidari, R., et Jamei, R. (2010).** Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from Iranian almond (*Prunus amygdalus* L.) hulls and shells. *Turkish Journal of Biology*, 34(2), 165-173.
129. **Isman, M. B. (2006).** Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51, 45-66.
130. **Izumi, H., Anderson, I. C., Killham, K., et Moore, E. R. (2008).** Diversity of predominant endophytic bacteria in European deciduous and coniferous trees. *Canadian journal of microbiology*, 54(3), 173-179.

131. **Jasim, B., Joseph, A. A., John, C. J., Mathew, J., et Radhakrishnan, E. K. (2014).** Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech*, 4(2), 197-204.
132. **Jiménez-González, L., Álvarez-Corral, M., Muñoz-Dorado, M., et Rodríguez-García, I. (2008).** Pterocarpanes: interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7(1), 125-154.
133. **Kanter, M., Coskun, O., et Budancamasnak, M. (2005).** Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11(42), 6684.
134. **Kavalali, G. (2003).** *Urtica*: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles. Londres. Taylor & Francis, New York, 83p.
135. **Kavalali, G., Tuncel, H., Göksel, S., et Hatemi, H. H. (2003).** Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 241-245.
136. **Kavtaradze, N. S., Alaniya, M. D., et Aneli, J. N. (2001).** Chemical components of *Urtica dioica* growing in Georgia. *Chemistry of natural compounds*, 37(3), 287-287.
137. **Kemassi, A., Boukhari, K., Cherif, R., Ghada, K., Bendaken, N., Bouziane, N., Boual Z., Bouras N., Ould Elhadj-Khelil A., Ould Elhadh., E.M. (2015).** Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae). *Revue El Wahat pour les Recherches et les Etudes Vol*, 8(1), 44-61.
138. **Kennedy, A.C. (1998).** The rhizosphere and spermosphere. In D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, et D.A. Zuberer (dir.). *Principles and applications of soil microbiology*. (p. 389--407). Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey.
139. **Kettle, D.S. (1995).** *Medical and Veterinary Entomology*, 2<sup>o</sup> edition, Wallingford: CAB international, 725 p.
140. **King, A. M. Y., et Young, G. (1999).** Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*, 99(2), 213-218.
141. **Kinghorn, A. D., et Balandrin, M. F. (1993).** Human medicinal agents from plants. *American Chemical Society*.
142. **Kioulos, I., Kampouraki, A., Morou, E., Skavdis, G., et Vontas, J. (2014).** Insecticide resistance status in the major West Nile virus vector *Culex pipiens* from Greece. *Pest management science*, 70(4), 623-627.

143. **Kliebenstein, D. J., et Osbourn, A. (2012).** Making new molecules—evolution of pathways for novel metabolites in plants. *Current opinion in plant biology*, 15(4), 415-423.
144. **Kratz, A., Greenberg, D., Barki, Y., Cohen, E., et Lifshitz, M. (2003).** *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Archives of disease in childhood*, 88(6), 542-544.
145. **Kraus, R., et Spiteller, G. (1990).** Phenolic compounds from roots of *Urtica dioica*. *Phytochemistry*, 29(5), 1653-1659.
146. **Krief, S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de Doctorat, Ouganda.
147. **Krishnaiah, D., Sarbatly, R., et Nithyanandam, R. (2011).** A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89(3), 217-233.
148. **Krystofova, O., Adam, V., Babula, P., Zehnalek, J., Beklova, M., Havel, L., et Kizek, R. (2010).** Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International journal of environmental research and public health*, 7(10), 3804-3815.
149. **Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., et Azevedo, J. L. (2004).** Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental microbiology*, 6(12), 1244-1251.
150. **Kukrića., Z.Z. Ljiljana N., Topalić-Trivunovića, Biljana M., Kukavicab Snježana B., Matoša, Svetlana S., Pavičića, Mirela M., Borojab and Aleksandar V. Savića (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *APTEFF*. 43: 257-272.
151. **Lakshmi, T., Rajendran, R., Madhusudhanan, N. (2012).** Chromatographic fingerprint analysis of *Acacia Catechu* Ethanolic leaf extract by HPTLC Technique. *Journal of drug development and research*, 4(1), 180-185.
152. **Langlade, V. (2010).** L'Ortie dioïque, *Urtica dioica* L. Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Nante.
153. **Laoufi, R. (2017).** Caractérisation physico-chimique et biologique des extraits d'une plante médicinale algérienne de la famille des Urticaceae en vue d'une application

- biotechnologique. Thèse de Doctorat en biochimie- immunologie, Université M'hamed Bougara Boumerdès, Algérie, 146p.
154. **Lavana, M., Chauhan, P. S., Chauhan, S. V. S., Singh, H. B., et Nautiyal, C. S. (2006).** Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current microbiology*, 52(5), 363-368.
155. **Lecointre, G., Le Guyader, H., et Visset, D. (2001).** Classification phylogénétique du vivant (Vol. 2). Paris: Belin.
156. **Lemanceau, P., Barret, M., Mazurier, S., Mondy, S., Pivato, B., Fort, T., et Vacher, C. (2017).** Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 82, pp. 101-133). Academic Press.
157. **Lian, J., Wang, Z., et Zhou, S. (2008).** Response of endophytic bacterial communities in banana tissue culture plantlets to *Fusarium* wilt pathogen infection. *The Journal of general and applied microbiology*, 54(2), 83-92.
158. **Linderman, R.G. (1992).** Vesicular-Arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions1. *Mycorrhizae in sustainable agriculture*, (mycorrhizaeinsu), 45-70.
159. **Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R., Taghavi, S., Mezgeay, M., et der Lelie, D. V. (2002).** Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6), 583-606.
160. **Loiret, F. G., Ortega, E., Kleiner, D., Ortega-Rodés, P., Rodes, R., et Dong, Z. (2004).** A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 504-511.
161. **López-López, A., Rogel, M. A., Ormeno-Orrillo, E., Martínez-Romero, J., et Martínez-Romero, E. (2010).** Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 33(6), 322-327.
162. **Lounaci, Z. (2003).** Biosystématique et bioécologie des Culicidae (Diptera, Nematocera) en milieux rural et agricole. Thèse de Magistère, INA, El-Harrach, 120p.
163. **Lucienne, A. (2010).** Les plantes médicinales d'Algérie. Ed Berti, 239p.
164. **Lugasi, A., Hóvári, J., Sági, K. V., et Bíró, L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1-4), 119-125.
165. **Lynch, J. M., et de Leij, F. (1990).** Rhizosphere. *American Cancer Society*.

166. **Maamri, S. (2008).** Etude de *Pistacia atlantica* de deux régions de sud algérien : dosage des lipides, dosage des polyphénols, essais antileishmaniens. Thèse de Magister en Biologie option Biochimie et Microbiologie appliquée, Université M'Hamed Bougara de Boumerdès, 108p.
167. **Mabry, T. J., Markham, K. R., et Thomas, M. B. (1970).** The ultraviolet spectra of isoflavones, flavanones and dihydroflavonols. In *The systematic identification of flavonoids* (pp. 165-226). Springer, Berlin, Heidelberg.
168. **Magnani, G. S., Didonet, C. M., Cruz, L. M., Picheth, C. F., Pedrosa, F. O., et Souza, E. M. (2010).** Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and molecular research*, 9(1), 250-258.
169. **Manga Safanah Mbu J.D., Mushagalusa K.F et Kadima N.J. (2014).** Contribution à l'étude photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo). *Journal of Applied Biosciences*, 75(1), 6211-6220.
170. **Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Limoges 2003, 181p).
171. **Markham, K.R. (1982).** Techniques of flavonoids identification. Ed Academic Press, London, 36-51pp.
172. **Mastretta, C., Barac, T., Vangronsveld, J., Newman, L., Taghavi, S., et Lelie, D.V.D. (2006).** Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 23(1), 175-188.
173. **Matille, L. (1993).** Les diptères d'Europe occidentale. Introduction, technique d'étude et morphologie. Nématocères, Brachycères, Orthoraphes et Aschizes. Ed. Boubée, T1, Paris, 439p.
174. **Meddour-Sahar, O. (2014).** Les feux de forêts en Algérie : analyse du risque, étude des causes, évaluation du dispositif de défense et des politiques de gestion. Thèse de Doctorat en sciences agronomiques. Université mouloud mammeri, Tizi Ouzou.
175. **Messai, N., Berchi, S., Boulknafd, F., et Louadi, K. (2010).** Inventaire systématique et diversité biologique de Culicidae (Diptera: Nematocera) dans la région de Mila (Algérie). *Entomologie Faunistique-Faunistic Entomology*.

176. **Milane, H. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, étude et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat, Strasbourg, 216p.
177. **Miller, C.M., Miller, R.V., Garton-Kenny, D., Redgrave, B., Sears, J., Condrón, M. M., et Strobel, G.A. (1998).** Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. *Journal of applied microbiology*, 84(6), 937-944.
178. **Miransari, M. (2011).** Soil microbes and plant fertilization. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(5), 875-885.
179. **Misaghi, I.J., et Donndelinger, C.R. (1990).** Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80(9), 808-811.
180. **Mohammedi, Z. (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère en Biologie option Produits Naturelles et Synthèse, Université de Tlemcen, 105p.
181. **Molina-Favero, C., Creus, C.M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., et Lamattina, L. (2008).** Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(7), 1001-1009.
182. **Morel, S. (2011).** Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de Doctorat en Chimie des Biomolécules : Synthèse, Structure et Réactivité, Université d'Angers, 266p.
183. **Morine, A. (2002).** Note de cour : les Arthropodes. Biologie d'Ottawa.
184. **Moses, A. G., et Robert, M. N. (2013).** Fourier transform infrared spectrophotometer analysis of *Urtica dioica* medicinal herb used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii region, Southwest Kenya. *World Applied Sciences Journal*, 21(8), 1128-1135.
185. **Moulinier, C. (2003).** Parasitologie et mycologie médicales: éléments de morphologie et de biologie. Editions Médicales Internationales, 796p.
186. **Nacoulma, A.P. (2013).** Reprogrammation métabolique induite dans les tissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*: aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques, 187p.
187. **Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., et Kumar, R. (2011).** In vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian archives of biology and technology*, 54(6), 1093-1098.

188. **OMS. (1973).** Lutte antivectorielle en santé internationale. Genève, 156p.
189. **OMS. (1963).** Méthode à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. Résistance aux insecticides et lutte contre les vecteurs. Treizième rapport du comité OMS d'experts des insecticides, Genève : OMS, *Série de Rapport Technique*, 265, 55-60.
190. **OMS. (1970).** Résistance aux insecticides et lutte anti vectorielle. *Série de Rapport Technique*, 443p.
191. **OMS. (1976).** Weekly epidemiological record. 17-22pp.
192. **Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., et Mimica-Dukić, N. (2014).** Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food chemistry*, 143, 48-53.
193. **Delaunay, P., Fauran, P., et Marty, P. (2001).** Les moustiques d'intérêt médical. *Revue Française des Laboratoires*, 2001(338), 27-36.
194. **Pates, H., et Curtis, C. (2005).** Mosquito behavior and vector control. *Annual Review of Entomology*, 50, 53-70.
195. **Pathak, M.A., Daniels J.R.F., et Fitzpatrick, T.B. (1962).** The presently known distribution of furocoumarins (psoralens) in plants. *Journal of investigative Dermatology*, 39(3), 225-239.
196. **Petrini, L. E., Petrini, O., et Laflamme, G. (1989).** Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. *Phytoprotection*, 70(2), 97-103.
197. **Pfleiderer, A., Lagier, J.C., Armougom, F., Robert, C., Vialettes, B. et Raoult, D. (2013).** Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32, 1471–81.
198. **Philogène, B.J.R. (1991).** L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes : problèmes et perspectives. *La lutte antiacridienne. AUPELF-UREF (ed.). Paris*, 269-278.
199. **Podsedek, A. (2007).** Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 1-11.
200. **Raaman, N. (2006).** Phytochemical techniques. New Delhi. New India. Publishing Agency, 306p.

201. **Ramakrishna, A. et Ravishankar, G. A. (2011).** Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
202. **Ramtin, M., Massiha, A., Khoshkholgh-Pahlaviani, M. R. M., Issazadeh, K., Assmar, M., et Zarrabi, S. (2014).** In Vitro Antimicrobial activity of *Iris pseudacorus* and *Urtica dioica*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(3), 35-39.
203. **Rasche, F., Trondl, R., Nagltreiter, C., Reichenauer, T. G., et Sessitsch, A. (2006).** Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Canadian journal of microbiology*, 52(11), 1036-1045.
204. **Rattan, R. S. (2010).** Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop protection*, 29(9), 913-920.
205. **Raven P., Evert R. et Erichorn S. (2000).** Biologie végétale. Ed. Dunod, Paris, 242p.
206. **Remesy C., Manach C., Demigne C., Texier O. et Regerat F. (1996).** Nutritional interest of flavonoids. *Medecine et Nutrition. Médecine et Nutriment*, 32, 17-27.
207. **Resseguier, P. (2011).** Contribution à l'étude du repas sanguin de *Culex pipiens pipiens*. Thèse de Doctorat.
208. **Ribeiro, V. L. S., Avancini, C., Gonçalves, K., Toigo, E., et von Poser, G. (2008).** Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary parasitology*, 151(2-4), 351-354.
209. **Rijavec, T., Lapanje, A., Dermastia, M., et Rupnik, M. (2007).** Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian journal of microbiology*, 53(6), 802-808.
210. **Rioux J.A. (1958).** Les Culicidae du "Midi" méditerranéen : étude systématique et écologique, Ed. Paul lechevalier, Paris, 301p.
211. **Ripert, C. (1998).** Epidémiologie des maladies parasitaires. Tome 2, Helminthoses, 580p.
212. **Ripert, C. (2007).** Epidémiologie des maladies parasitaires, affections provoqués ou transmises par les arthropodes. Tome 4, Cachan : EM inter, 581p.
213. **Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., et Dowling, D. N. (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
214. **Rodhain, F., et Perez, C. (1985).** Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Paris, Maloine, 458 p.

215. **Rubini, M. R., Silva-Ribeiro, R. T., Pomella, A. W., Maki, C. S., Araújo, W. L., Dos Santos, D. R., et Azevedo, J. L. (2005).** Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1(1), 24.
216. **Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., et Dowling, D.N. (2008).** Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS microbiology letters*, 278(1), 1-9.
217. **Safanah A. F., Faraj M., Hadi, H., Al-Shemari, A. K., et Jassim, M.N. (2012).** Study of Some *Urtica dioica* L. Leaves Components and Effect of Their Extracts on Growth of Pathogenic Bacteria and Identify of Some Flavonoids by HPLC. *Journal of science*, 23 (3), 79.
218. **Sarni-Manchad, P., et Cheynier, V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire, Éd Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 398 p.
219. **Sathiyamoorthy, P., Lugasi-Evgi, H., Van-Damme, P., Abu-Rabia, A., Gopas, J., et Golan-Goldhirsh, A. (1997).** Larvicidal activity in desert plants of the Negev and Bedouin market plant products. *International Journal of Pharmacognosy*, 35(4), 265-273.
220. **Sato, F., Hashimoto, T., Hachiya, A., Tamura, K. I., Choi, K. B., Morishige, T., Fujimoto, H., et Yamada Y. (2001).** Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 367-372.
221. **Sauget, M., Valot, B., Bertrand, X., et Hocquet, D. (2017).** Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria?. *Trends in microbiology*, 25(6), 447-455.
222. **Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervry, J.P., Rhaïem, A., et Brunhes, J. (2001).** Moustique d'Europe. Institut de recherche pour le développement IRD. Logiciel d'identification SMV et SFP, 2010- Société de médecine des voyages et Société française de parasitologie (2010). Recommandations de bonne pratique Texte court: «protection personnelle anti-vectorielle ou protection contre les insectes piqueurs et les tiques».
223. **Séguy, E. (1949).** Diptères du Sud-Marocain (Vallée du Draa) recueillis par ML Berland en 1947. *Revue Française d'Entomologie*, 16, 152-161.
224. **Senevet, C., et Andarelli, L. (1959).** Les moustiquites de l'Afrique du nord et du bassin Méditerranéen: les genres *Culex*, *Uranotaenia*, *Theobaldia*, *Orthopodomyia* et *Mansonia*, Ed. Le chevalier, Paris, 383p.
225. **Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M., et Raoult, D. (2009).** Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of

- bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49(4), 543-551.
226. **Seo, W. T., Lim, W. J., Kim, E. J., Yun, H. D., Lee, Y. H., et Cho, K. M. (2010).** Endophytic bacterial diversity in the young radish and their antimicrobial activity against pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(4), 493-503.
227. **Seye, F., Ndione, R.D., et Ndiaye, M. (2006).** Effets larvicides des produits de neem (huile de *neem pure* et *neemix*) comparés à deux insecticides chimiques de synthèse (la deltaméthrine et le fenitrothion) sur les larves du moustique *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), *J. Sci. Tech.* 4(1) 27-36.
228. **Sezik, E., Yelşilada, F., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T et Takeda Y. (1997).** Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia Erzurum Erzincan Agri, Kars, Iğdir provinces. *Economic Botany*, 51, 195–211.
229. **Sinclair, J.B., et Cerkauskas R.F. (1996).** Latent infection vs. endophytic colonization by fungi. In Redlin S. C. and Carris L. M. (1996): *Endophytic fungi in grasses and woody plants: Systematics, Ecology, and Evolution*. APS PRESS: 3-29.
230. **Singh, U.P., Sarma, B.K., et Singh, D.P. (2003).** Effect of plant growth-promoting *Rhizobacteria* and culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* on phenolic and salicylic acid contents in chickpea (*Cicer arietinum*). *Current Microbiology*, 46,131-140.
231. **Sobia Ramzan, H. (2014).** Protective Role of *Urtica dioica* methanol extract in treating experimentally induced urinary calculi in rats. *Ethiopian International Journal of Multidisciplinary Research*, 1, 1-10.
232. **Srivastava, A., Bartarya, R., Tonk, S., Srivastava, S.S., et Kumari, K.M. (2008).** Larvicidal activity of an indigenous plant, *Centratherum anthelminticum*. *Journal of Environmental Biology*, 29(5), 669-672.
233. **Strobel, G.A., et Daisy, B. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 491-502.
234. **Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Product*, 67, 257-268.
235. **Sturz, A.V., Christie, B.R., et Matheson, B.G. (1997).** Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 162–167.

236. **Sturz, A.V., Christie, B.R., et Nowak, J. (2000).** Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. *Critical Review of Plant Science*, 19, 1–30.
237. **Sturz, A.V., et Matheson, B.G. (1996).** Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. *Plant and soil*, 184(2), 265-271.
238. **Tabti, N., et Abdellaoui-Hassaine, K. (2009).** Etude comparée de l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur les populations purifiées et des populations des gites artificiels de *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) dans la ville de Tlemcen. Département de Biologie et Environnement, Faculté des Science. Université Abou BakrBelkaid, Tlemcen, Algérie.
239. **Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., Barac, T., Vangronsveld, J., et van der Lelie, D. (2009).** Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 748-757.
240. **Tahraoui, C., (2008).** Abondance saisonnière et biodiversité des Culicidae dans les subéraies d'El- Kala. Mémoire d'ingénieur.
241. **Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., Mekhfi, H., Bonouham, M., et Ziyat, A. (2000).** Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica dioica* in the rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 95- 100.
242. **Tapiero, H., Tew, K.D., Nguyen, B.G., et Mathé, G. (2002).** Polyphenol do they play a role in the prevention, of the human pathologies. *Biomed.pharmacother*, 56, 200-207.
243. **Testai, L., Chericoni, S., Calderone, V., Nencioni, G., Nieri, P., Morelli, I., et Martinotti, E. (2002).** Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies. Elsevier, *Journal of Ethnopharmacology*, 81, 105- 109.
244. **Thomas, P., Kumari, S., Swarna, G.K., Prakash, D.P., et Dinesh, M.R. (2007).** Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. *Plant cell reports*, 26(9), 1491-1499.
245. **Tine-Djebbar, F. (2009).** Bioécologie des moustiques de la région de Tébessa et évaluation de deux régulateurs de croissance (halofenozide et méthoxyfenozide) à l'égard de deux espèces de moustiques *Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*: toxicologie,

- morphométrie, biochimie et reproduction. Thèse de doctorat, Faculté des sciences, Université de Annaba, Algérie. pp.168.
246. **Tonk, S., Bartarya, R., Kumari, K. M., Bhatnagar, V. P., et Srivastava, S. S. (2006).** Effective method for extraction of larvicidal component from leaves of *Azadirachta indica* and *Artemisia annua* Linn. *Journal of environmental biology*, 27(1), 103.
247. **Trari, B., Dakki, M., Himmi, O., El Agbani, M.A. (2002).** Les moustiques (Diptera: Culicidae) du Maroc. Revue bibliographique (1916-2001) et inventaire des espèces. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 95(4), 329-334.
248. **Tshikhudo, P., Nnzeru, R., Ntushelo, K., et Mudau, F. (2013).** Bacterial species identification getting easier. *African Journal of Biotechnology*, 12(41).
249. **Tyler, V.E., Brady, L.R., Robbers, J.E. (1881).** *Pharmacognosy*. Lea & Febiger, Philadelphia, 520 p.
250. **Ulloa-Gutierrez, R., Moya, T., et Avila-Aguero, M. L. (2004).** *Pantoea agglomerans* and thorn-associated suppurative arthritis. *The Pediatric infectious disease journal*, 23(7), 690.
251. **Manganelli, R. U., Zaccaro, L., et Tomei, P. E. (2005).** Antiviral activity in vitro of *Urtica dioica* L., *Parietaria diffusa* M. et K. and *Sambucus nigra* L. *Journal of ethnopharmacology*, 98(3), 323-327.
252. **Völksch, B., Ullrich, M., et Fritsche, W. (1992).** Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial ecology*, 24(3), 305-311.
253. **Verpoorte, R. (2000).** Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 52(3), 253-262.
254. **Verpoorte R., Van Der Heijden R., Van Gulik W.M et H.J.G., 1991-** Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. The alkaloids, Academic Press, San Diego, 40, 1-187.
255. **Verpoorte, R., van der Heijden, R., van Gulik, W. M., et ten Hoopen, H. J. (1991).** Plant biotechnology for the production of alkaloids: present status and prospects. In *The Alkaloids: chemistry and pharmacology* (Vol. 40, pp. 1-187). Academic Press.
256. **Walker V., 2013-** Impact de l'inoculation de micro-organismes phyto-bénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. 208p.
257. **Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., HU Ckelhoven, R., Neumann, C., Von Wettstein D. (2005).** The endophytic fungus

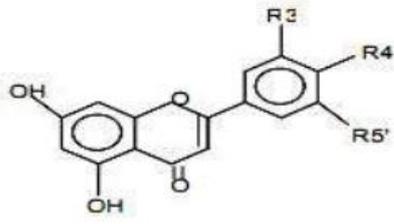
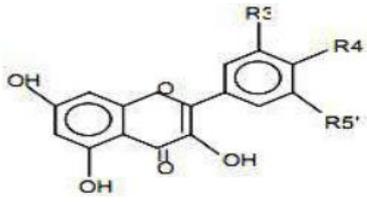
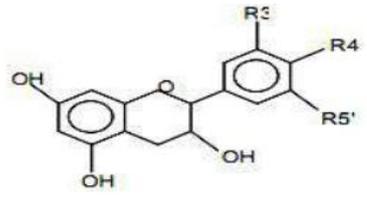
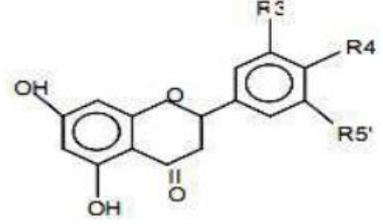
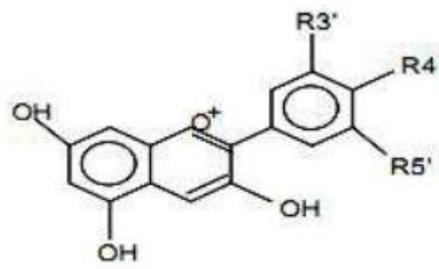
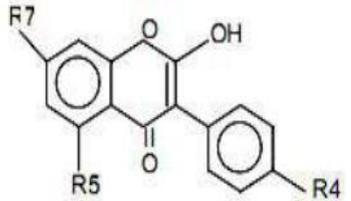
- Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 13386-13391.
258. **Weller, D.M. (1988)**. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 379–407.
259. **Wellington, B., et Marcela, T. (2004)**. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize. *BioControl*, 49, 315-322.
260. **Weyens, N., van der Lelie, D., Taghavi, S., et Vangronsveld, J. (2009)**. Phytoremediation: plant-endophyte partnership take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 248-254.
261. **Whipps, J.M. (2001)**. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52,487-511.
262. **Wichtl, M., et Anton, R. (1999)**. Plantes médicinales thérapeutiques. Tec et Doc, 451p.
263. **Wichtl, M., et Anton, R. (2003)**. Plantes thérapeutiques. 2<sup>ème</sup> édition Tec et Doc, Paris. 689p.
264. **Wilson, M., Hirano, S.S., et Lindow, S.E. (1999)**. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4), 1435-1443.
265. **Wink, M. (2003)**. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.
266. **Yelşilada, E., Honda, G., Szik, E., Tabata, M., Goto, K., et Ikeshiro, Y. (1993)**. Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 31-38.
267. **Yelşilada, E., Sezik, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., et Tanaka, T. (2001)**. Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95–115.
268. **Yenesew, A., Mushibe, E.K., Induli, M., Derese, S., Midiwo, J.O., Kabaru, J.M., Heydenreich, M., Koch, A. et Peter, M.G. (2005)**. 7a-0-methyldeguelol, a modified rotenoid with an open ring- C, from the roots of *Derris trifoliata*. *Phytochemistry*, 66, 653-657.
269. **Yenesew, A., Twinomuhwezi, H., Kabaru, J.M., Akala, H.M., Kiremire, B.T., Heydenreich, M., Peter, M.G., Eyase, F.L., Waters, N.C., et Walsh, D.S. (2009)**. Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from *Derris trifoliata*. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 23, 409-414.

270. **Yi, Z.B., Yu, Y., Liang, Y.Z., et Zeng, B. (2007).** In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids, *Food Science and Technology*, 4, 1000-1016.
271. **Youssef, L., Driss, B., Youssef, E., Omar, L., Khadija, E., Abdellatif, K., Zakaria, K. (2011).** Cartographie de la faune culicidienne dans la province de Khémisset (Maroc). *Sciencelib Mersenne*, 37p.
272. **Zobel, A.M., et Brown, S.A. (1990).** Dermatitis-inducing furanocoumarins on leaf surfaces of eight species of rutaceous and umbelliferous plants. *Journal of chemical ecology*, 16(3), 693-700.
273. **Zobel, A.M et Brown, S.A. (1988).** Histological localization of furanocoumarins in *Ruta graveolans* shoot. *Canadian Journal of Botany*, 67, 915-921.
274. **Kukrić, Z.Z., Topalić-Trivunović, L.N., Kukavica, B.M., Matoš, S.B., Pavičić, S.S., Boroja, M.M., et Savić, A.V. (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Acta Periodica Technologica*, (43), 257-272.

# *ANNEXES*

## Annexe 01

Tableau. Structures et groupements chimiques des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

Classe	Structures chimique	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH <sub>3</sub>	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanone		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R4'	R5	R7	
		OH	OH	OH	Genisteine
		OH	H	O-Glu	Daidezine

## Annexe 02

## Annexe 02-A

Tableau 01. Composition chimique de quelque milieux de cultures

Milieu de culture	Composition chimique/L	Mode opératoire
<b>Gélose nutritive (GN)</b>	Gélatine peptone : 5g ; Extrait de bœuf : 3g ; Gélose : 15g	Faire dissoudre 23g du mélange dans un litre d'eau distillée chaude jusqu'à ébullition (laisser bouillir pendant 1min) puis stériliser à 121°C pendant 15 min. pH=6,8±0,2.
<b>Milieu chromagar orientation</b>	Chromopeptone : 16,1g ; Mélange chromogène : 1.3g ; Gélose : 15g	Prêt à l'emploi
<b>Milieu Hajna-Kligler</b>	Extrait de viande 3g, extrait de levure 3g, peptone 20g, NaCl 5g, Citrate ferrique 0,3g, thiosulfate de sodium 0,3g, lactose 10g, glucose 1g, rouge de phénol 5ml, agar 12g, eau distillée 1l.	Prêt à l'emploi

## Annexe 02-B

Tableau 02. Produits et réactifs utilisés

Méthodes	Produits utilisés
Screening phytochimique	Acide chlorhydrique (HCl), Propanol (C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O), trichlorure de fer (FeCl <sub>3</sub> ), réactif de Stiansy, acétate de sodium (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaOH), chloroforme (CHCl <sub>3</sub> ), ammoniacque (NH <sub>3</sub> ), acétate de plomb (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> Pb <sub>2</sub> ), éther (C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O), sulfate de sodium anhydre (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), Hydroxide de potassium (KOH), Iode (I <sub>2</sub> ), coupeau de Magnésium (Mg), acide sulfurique (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), alcool absolu, réactif de Dragendroff, formol (CH <sub>2</sub> O), alcool éthylique (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O).
Dosage des flavonoïdes	Trichlorure d'aluminium (AlCl <sub>3</sub> ), quercétine, méthanol.
MALDI-TOF MS	$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), acétonitrile, acide trifluoroacetic (TFA), eau HPLC.
HPTLC RP18	La phase mobile : méthanol, d'eau distillée et de HCl (50%, 50%, 1%).

## Annexe 02-C

Tableau 03. Mode de préparation de quelques réactifs utilisés

Réactifs	Mode opératoire
Stiansy	-2 volumes de formol (50 ml) -1 volume de HCl 1N (25 ml)
Dragendroff	-Solution a : 0,85 g de nitrate de bismuth +40 ml d'eau distillée + 10 ml d'acide acétique. -Solution b : 8 g d'iode de potassium + 2 ml d'eau distillée. -On mélange a et b. -15 ml de mélange + 20 ml d'acide acétique puis compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

## Annexe 03

Tableau. Tests d'identifications biochimiques

Tests	But	Réactions	Résultats
Vosge Proskauer (VP)	Ce test permet la recherche de l'acétoïne par la voie butane-diol.	Le bouillon Clark et Lubs est ensemencé par la culture bactérienne. Après incubation de 24h, on rajoute les deux réactifs VP1, VP2.	VP (+) : coloration rouge ; VP (-) : coloration jaune.
Urée-Indole	Ce test permet la recherche de l'uréase, de l'indole (avec le réactif de Kovacs, anneau en rouge).	Le milieu Urée-Indole (milieu Fergusson) est ensemencé par la culture bactérienne. Incuber à 37°C pendant 24h. Après 24h d'incubation, ajouter quelque goutte du réactif de Kovacs pour le test d'indole.	Uréase (+) : coloration rouge. Uréase (-) : coloration jaune. Indole (+) : anneau rouge en surface. Indole (-) : absence d'anneau rouge en surface.
Citrate	L'utilisation du citrate comme seule source de carbone.	Le milieu incliné de citrate Simmons est ensemencé par des stries serrés en surface à partir d'une culture solide puis incubé à 37°C pendant 72h.	Test (+) : virage de la couleur du milieu en bleu. Test (-) : pas de virage de la couleur du milieu en bleu. <b>Remarque :</b> Eviter l'apport de toute autre source de carbone.
Nitrate réductase	La nitrate réductase est une enzyme qui est capable de catalyser la réaction de réduction des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ). Il existe plusieurs types de nitrates réductases : La nitrate réductase capable de réduire les nitrates jusqu'au stade nitrite qui pourront ensuite être réduits en ammoniac grâce à la nitrite réductase. La nitrite réductase capable de réduire le nitrate jusqu'au stade diazote (gazeux).	Après incubation de la culture bactérienne sur un milieu nitraté (bouillon nitraté), on rajoute 2 gouttes du réactif de Griess (mélange du réactif nitrite NR1 et NR2). Après incubation, deux cas sont possible : Le milieu rouge orangé : la bactérie possède l'enzyme nitrate réductase au stade $\text{NO}_2^-$ Le milieu est jaune : ajout de la poudre de Zinc.	NR- : milieu rouge, la bactérie ne possède pas l'enzyme (présence du nitrate dans le milieu). NR+ : milieu jaune, la bactérie possède l'enzyme au stade $\text{N}_2$ .
Mannitol-Mobilité	Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol, il permet aussi	Le milieu mannitol est ensemencé par piqûre centrale à l'aide d'une	Mannitol (+) : apparition d'une coloration jaune.

	la mise en évidence de la mobilité bactérienne.	pipette Pasteur chargée de la culture bactérienne en milieu semi-solide. Incuber à 37°C pendant 24h.	Mannitol (-) : milieu reste rouge. Mobilité (+) : diffusion de la culture à partir de la ligne d'ensemencement en créant un trouble du milieu. Mobilité (-) : pas de diffusion.
ONPG (Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside)	Ce test permet de mettre en évidence une enzyme intervenant dans la dégradation du lactose « $\beta$ -galactosidase ».	A partir d'une culture bactérienne cultivée sur milieu lactose, on réalise une suspension bactérienne dense dans de l'eau physiologique. Introduire dans cette suspension le disque d'ONPG et incuber pendant 18- 24h à 37°C.	Test (+) : apparition d'une coloration jaune. Test (-) : absence de coloration jaune. <b>Remarque :</b> Chez certaines espèces bactériennes, la lecture se fait après 30min d'incubation.
TDA	Mise en évidence de l'uréase, tryptophane désaminase (TDA) ; et la production d'indole	Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane (Urée Indole) puis ajouter quelque goutte de FeCl <sub>3</sub> et étuver (37°C, 24h).	Uréase+ : rouge Uréase- : inchangé TDA+ : obtention d'un précipité brun foncé TDA- : Absence de précipité Indole + : anneau rouge en présence du réactif de Kovacs Indole- : inchangé
Glucose Lactose	Ce test permet de la mise en évidence simultanée de plusieurs caractères : l'utilisation du lactose, fermentation du glucose et production d'H <sub>2</sub> S	La surface est ensemencé abondamment par des stries serrées puis le culot par simple piqûre et à l'aide de la même pipette. Dévisser partiellement le couvercle. Mettre à l'étuve (37°C, 24h).	-bactérie de type fermentative du glucose et Lac+ : culot jaune et pente jaune ; - bactérie de type fermentative du glucose Lac- : culot jaune et pente rouge ; -bactérie de type oxydative du glucose ou Gluc- et Lac- : culot rouge et pente rouge : - bactérie de type oxydative du glucose et Lac+ : culot rouge et pente jaune.
H <sub>2</sub> S	Mise en évidence de la production du gaz		Présence d'un précipité noir dans le culot et la pente

## Annexe 04

## Annexe 04-A

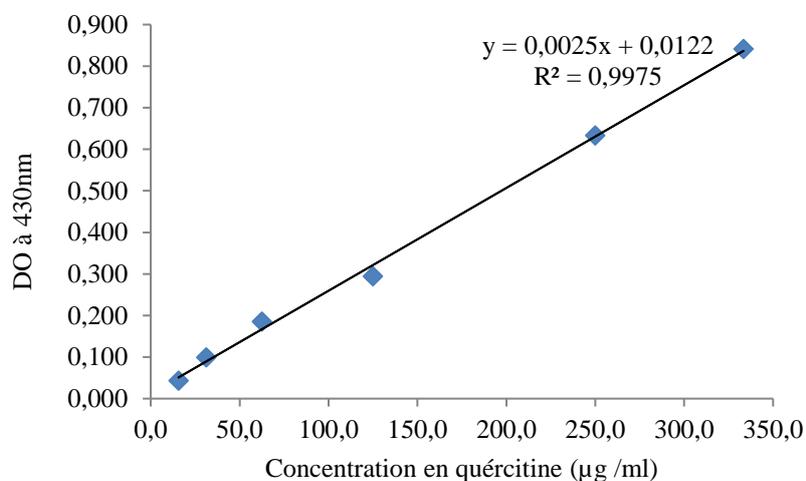


Figure 01. Courbe d'étalonnage établie avec la quercétine (0-350 µg/ml)

## Annexe 04-B

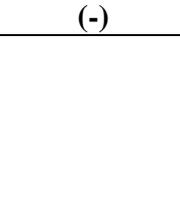
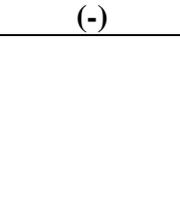
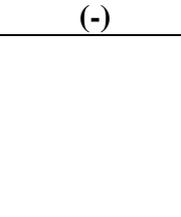
%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

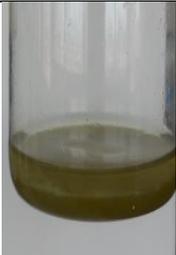
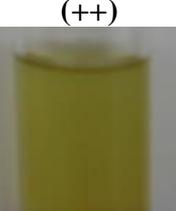
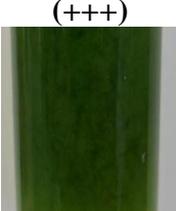
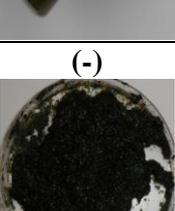
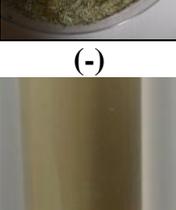
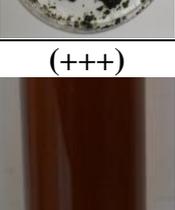
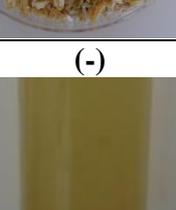
Figure 02. Table des probits (Cavelier, 1976)

## Annexe 05

## Annexe 05-A

Tableau 1. Screening phytochimique des tiges, feuilles et racines de la région de Dellys

Molécules bioactives	Résultats attendus	Résultats obtenus		
		Tiges	Feuilles	Racines
<b>Anthocyanes</b>	Rouge	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Leuco-anthocyanes</b>	Rouge	(-) 	(-) 	(++) 
<b>Tanins</b>	Bleuâtre ou bleu noir	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Tanins galliques</b>	Bleu foncé	(-) 	(-) 	(-) 
<b>Tanins catéchiques</b>	Rouge	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Quinones libre</b>	Rouge	(-) 	(-) 	(-) 

				
<b>Saponosides</b>	Précipité blanc	(+++) 	(+++) 	(+++) 
<b>Alcaloïdes</b>	Précipité rouge	(-) 	(+++) 	(+) 
<b>Sénosides</b>	Violet rouge	(-) 	(+) 	(-) 
<b>Coumarines</b>	Formation d'un trouble	(++) 	(+++) 	(+++) 
<b>Amidon</b>	Bleu violet	(-) 	(-) 	(-) 
<b>Flavonoïdes</b>	Rouge orangé	(-) 	(+++) 	(-) 

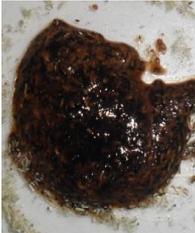
<b>Glucosides</b>	Rouge brique ensuite violette	(+++) 	(-) 	(+++) 
<b>Mucilages</b>	Précipité floconneux	(+) 	(+++) 	(+++) 
<b>Irridoïdes</b>	Bleu	(-) 	(-) 	(-) 

Annexe 05-B

Tableau 2. Screening phytochimique des tiges, feuilles et racines de la région de Tlemcen

Molécules bioactives	Résultats attendus	Résultats obtenus		
		Tiges	Feuilles	Racines
<b>Anthocyanes</b>	Rouge	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Leuco-anthocyanes</b>	Rouge	(+++) 	(-) 	(+++) 
<b>Tanins</b>	Bleuâtre ou bleu noir	(-)	(+++)	(-)

				
<b>Tanins galliques</b>	Bleu foncé	(-) 	(-) 	(-) 
<b>Tanins catéchiques</b>	Rouge	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Quinones libre</b>	Rouge	(-) 	(+) 	(-) 
<b>Saponosides</b>	Précipité blanc	(+++) 	(+++) 	(+++) 
<b>Alcaloïdes</b>	Précipité rouge	(++) 	(+) 	(+) 
<b>Sénosides</b>	Violet rouge	(-) 	(+) 	(-) 

<b>Coumarines</b>	Formation d'un trouble	(++) 	(+++) 	(++) 
<b>Amidon</b>	Bleu violet	(-) 	(-) 	(-) 
<b>Flavonoïdes</b>	Rouge orangé	(-) 	(+++) 	(-) 
<b>Glucosides</b>	Rouge brique ensuite violette	(+++) 	(+) 	(+++) 
<b>Mucilages</b>	Précipité floconneux	(++) 	(+++) 	(++) 
<b>Irridoïdes</b>	Bleu	(-) 	(-) 	(-) 

## Annexe 06

## Annexe 06-A

**Tableau 01.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques *C. pipiens* L. traitées par l'extrait aqueux (UDD)

	Témoin	10% (27 mg/ml)	5% (13,5 mg/ml)	4% (10,8 mg/ml)	3% (8,1 mg/ml)	2% (5,4 mg/ml)	1% (2,7 mg/ml)
2h	0	10±4,72	3,33±2,72	3,33±0	0	0	0
4h	0	13,33±9,82	10±5,45	6,66±0	0	0	0
24h	0	53,33±13,62	33,33±11,88	23,33±9,44	20±2,72	16,66±2,72	13,33±2,72
48h	0	100±0	100±0	63,33±4,72	40±5,45	36,66±5,45	23,33±7,21
72h	0	100±0	100±0	100±17,02	60±7,21	56,66±7,21	36,66±5,45

## Annexe 06-B

**Tableau 02.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L2 des moustiques *C. pipiens* L. traités par l'extrait aqueux en fonction de temps (UDT)

	Témoin	10% (27 mg/ml)	5% (13,5 mg/ml)	4% (10,8 mg/ml)	3% (8,1 mg/ml)	2% (5,4 mg/ml)	1% (2,7 mg/ml)
2h	0	23±3,72	13,33±1,44	3,33±2,72	0	0	0
4h	0	53±13,82	20,33±5,45	15±4,72	0	0	0
24h	0	84,63±11,88	58,33±11,88	28,33±2,72	25±9,44	18,6±2,72	15±2,72
48h	0	100±0	100±0	56,67±7,21	60,33±5,45	39,67±4,72	24,63±7,21
72h	0	100±0	100±0	100±0	80,33±2,72	60,67±5,45	40,67±5,45

## Annexe 06-C

**Tableau 03.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* L. traités par l'extrait aqueux en fonction de temps (UDD)

	Témoin	10% (27 mg/ml)	5% (13,5 mg/ml)	4% (10,8 mg/ml)	3% (8,1 mg/ml)	2% (5,4 mg/ml)	1% (2,7 mg/ml)
2h	0	13,33±4,72	10±4,72	6,67±2,72	3,33±2,72	0	0
4h	0	23,33±5,45	16,67±5,45	10±4,72	6,67±5,45	0	0
24h	0	100±9,44	70±9,44	43,33±10,9	33,33±7,21	16,67±5,45	13,33±7,21
48h	0	100±0	100±0	73,33±11,88	66,67±5,45	43,33±5,45	40±12,49

**Annexe 06-D**

**Tableau 04.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par l'extrait aqueux en fonction de temps (UDT)

	Témoin	10% (22,33 mg/ml)	5% (11,16 mg/ml)	4% (8,93 mg/ml)	3% (6,69 mg/ml)	2% (4,46 mg/ml)	1% (2,23 mg/ml)
2h	0	10±0,36	10±0,54	0	0	0	0
4h	0	100±0	15±0	15±0	10±0	10±0	0
24h	0	100±0	90±7,07	65±7,07	20±0	15±3,54	10±3,54
48h	0	100±0	100±0	100±3,54	75±3,54	40±7,07	15±3,54
72h	0	100±0	100±0	100±0	95±3,54	75±17,68	30±0

**Annexe 06-E**

**Tableau 01.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par les alcaloïdes en fonction de temps (UDD)

	Témoin	100% (10 mg/ml)	70% (7 mg/ml)	50% (5 mg/ml)	25% (2,5 mg/ml)	10% (1 mg/ml)
30min	0	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00	0±0.00
1h	0	6.67±2.72	3.33±2.72	0±0.00	0±0.00	0±0.00
24h	0	56,67±2.72	16,67±5.44	10±4.71	3.33±2.72	0±0.00
48h	0	76,67±2.72	30±4.71	23.33±2.72	13.33±2.72	0±0.00
72h	0	100±0.00	70±4.71	40±4.71	26.67±9.81	16.67±2.72

## Annexe 07

## Annexe 07-A

**Tableau 01.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par EA en fonction de temps (UDT)

	Témoin	100% (10 mg/ml)	70% (7 mg/ml)	50% (5 mg/ml)	25% (2,5 mg/ml)	10% (1 mg/ml)
30min	0	0	0	0	0	0
1h	0	60±10	60±6,67	30±0	10±0	10±0
24h	0	70±4,08	40±4,71	40±6,24	20±2,35	20±4,08
48h	0	50±4,71	40±12,47	10±8,16	20±12,47	0

## Annexe 07-B

**Tableau 02.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par EB en fonction de temps (UDT)

	Témoin	100% (10 mg/ml)	70% (7 mg/ml)	50% (5 mg/ml)	25% (2,5 mg/ml)	10% (1 mg/ml)
30min	0	20±10,03	0	0	0	0
1h	0	46,67±18,88	23,33±9,44	20±4,09	16,67±4,72	13,33±2,36
24h	0	100±0	70±10,81	63,33±9,43	53,33±10,28	43,33±8,5
48h	0	100±0	93,33±4,72	90±7,08	66,67±4,72	60±14,74

## Annexe 07-C

**Tableau 03.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par EAE en fonction de temps (UDT)

	Témoin	100% (5 mg/ml)	50% (2,5 mg/ml)	25% (1,25 mg/ml)	10% (0,5 mg/ml)	5% (0,25 mg/ml)
30min	0	23,33±2,36	16,67±4,72	13,33±2,36	0	0
1h	0	53,33±11,80	46,67±6,24	30±4,09	23,33±6,24	16,67±4,72
24h	0	90±7,08	86,67±4,71	80±14,15	66,67±12,48	36,67±4,71
48h	0	33,33±23,60	100±0	86,67±9,44	73,33±10,29	53,33±6,24

## Annexe 07-D

**Tableau 04.** Pourcentage de mortalité corrigée des larves L4 des moustiques *C. pipiens* traités par EED en fonction de temps (UDT)

	Témoin	100% (2,2 mg/ml)	50% (1,1 mg/ml)	25% (0,55 mg/ml)	10% (0,27 mg/ml)	5% (0,13 mg/ml)
30min	0	13,33±4,72	6,67±2,36	3,33±2,36	0	0
1h	0	26,67±2,36	13,33±2,36	10±4,09	0	0
24h	0	93,33±2,35	70±14,73	43,33±16,52	0	0
48h	0	100±0	73,33±12,49	70±17,82	0	0

*PUBLICATIONS ET  
COMMUNICATIONS*

## Liste des publications et communications

### Publications

Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale :

1. Souheyla Toubal, Ouahiba Bouchenak, Djillali Elhaddad, Karima Yahiaoui, Sarah Boumaza and Karim Arab. (2018). MALDI-TOF MS detection of endophytic bacteria associated with great nettle (*Urtica dioica* L.), grown in Algeria. *Polish journal of microbiology*. 67(1) 67–72. (Impact factor : 0.938)

### Communications

Une communication internationale et deux nationales ont fait l'objet de ce travail :

1. Séminaire internationale sur l'environnement, agriculture et biotechnologies (Bouira le 27 et 28 Novembre 2017)  
Intitulée : Bioinsecticidal activity against *Culex pipiens* L. mosquito vector of human diseases  
Auteurs : Toubal S., El haddad Dj., Sadaoui N., Bouchenak O., Boumaza S., Arab K
2. 1<sup>ère</sup> école d'hiver de formation sur l'analyse de cycle de vie et de l'écoconception (Boumerdès le 18 et 19 Février 2018)  
Intitulée : Effet des alcaloïdes et de l'extrait aqueux d'une Urticaceae sur *Culex pipiens* (Linné, 1758)  
Auteurs : Toubal S., El haddad Dj., Bouchenak O., Sadaoui N., Arab K
3. Premier séminaire national en biologie sur la biodiversité et gestion des bioressources en zones arides et semi arides (Nâama le 10 et 11 avril 2017)  
Intitulée : Effet bioinsecticide contre le moustique *Culex pipiens* L.  
Auteurs : Toubal S., El haddad Dj., Bouchenak O., Yahiaoui K., Sadaoui N., Arab K

## MALDI-TOF MS Detection of Endophytic Bacteria Associated with Great Nettle (*Urtica dioica* L.), Grown in Algeria

SOUHEYLA TOUBAL\*, OUAHIBA BOUCHENAK, DJILLALI ELHADDAD,  
KARIMA YAHIAOUI, SARAH BOUMAZA and KARIM ARAB

Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCOR),  
Department of Biology, Faculty of Sciences,  
University of Boumerdes, Boumerdes, Algeria

Submitted 03 June 2017, revised 25 July 2017, accepted 27 September 2017

### Abstract

Any plant with a vascular system has a specific endophytic microflora. The identification of bacteria is essential in plant pathology. Although identification methods are effective, they are costly and time consuming. The purpose of this work is to isolate and to identify the different bacteria from the internal tissues of *Urtica dioica* L. and to study their diversity. This last is based on the different parts of the plant (stems, leaves and roots) and the harvest regions (Dellys and Tlemcen). The identification of bacteria is done by biochemical tests and confirmed by MALDI-TOF MS. Seven genus and eleven species were isolated from the Great Nettle. They belong to the genera *Bacillus*, *Escherichia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Paenibacillus*. The majority of these bacteria were isolated from Tlemcen which makes this region the richest in endophytic bacteria compared to that harvested from Dellys. The results show also that the leaves are the most diversified in endophytic bacteria. *Bacillus pumilus*-ME is the common species of the three parts of the plant harvested in both regions. From this work, it emerges that the Great Nettle can be settled by various endophytic bacteria which are differently distributed within the same plant harvested in different regions.

---

Key words: *Bacillus pumilus*-ME, diversity, endophytic bacteria, MALDI-TOF MS, *Urtica dioica* L.

---

### Introduction

The internal tissues of plants can be a niche for various types of endophytic microorganisms (bacteria and fungi) (Rosenblueth and Martinez-Romero, 2006, Goryluk *et al.*, 2009). Endophytic bacteria are very ubiquitous in plants and can be isolated from the stems, leaves, roots, fruits, tubers and nodules of leguminous plants (Kobayashi and Palumbo, 2000).

Some endophytes are very beneficial, even necessary for the growth of their host plants (Dudeja *et al.*, 2012, Jasim *et al.*, 2014). They prevent some pathogenic organisms from colonizing plants and can also act as biological control agents against insects (Laib, 2014). However, it is probable that beneficial endophytes can become pathogenic under certain stress conditions when the plant no longer controls them (Arnold, 2007).

The traditional methods of bacterial identification are very effective but have the disadvantage of being laborious and time-consuming (Tshikhudo *et al.*, 2013).

Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is an identification tool that is easy to use, fast, accurate and cost-effective (Gravet and Gessier, 2013, Sauget *et al.*, 2017). Due to the lack of robust information tools and effective databases, this technique did not appear in public and private laboratories until 2008 (Tshikhudo *et al.*, 2013). It was reserved exclusively for biochemical or research laboratories (Gravet and Gessier, 2013). This technique is based on the generation of mass spectra from whole cells and their comparison with reference spectra after ionization (Sauget *et al.*, 2017).

Belonging to the Urticaceae family, *U. dioica* L. is a plant used for food and medicinal purposes. It is also on the list of medicinal plants selected by the French Pharmacopoeia (Draghi, 2005). The aim of this work was to identify the endophytic bacteria isolated from the stems, leaves and roots of the Great Nettle harvested at Dellys and Tlemcen by biochemical tests and by MALDI-TOF MS.

---

\* Corresponding author: S. Toubal, Laboratory of Valorization and Conservation of Biological Resources (VALCOR), Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Boumerdes, Boumerdes, Algeria, e-mail: [toubalsouheyla@hotmail.fr](mailto:toubalsouheyla@hotmail.fr)

## Experimental

### Material and Methods

**Description of the study area.** The different parts of *U. dioica* L. (stems, leaves and roots) were harvested during the month of February 2016 in two different regions of northern Algeria. The first is Dellys, a coastal town located at 115 km from Algiers. The second is Tlemcen, located in the north-west of Algeria, 520 km west of Algiers.

**Isolation of endophytic bacteria.** The plant freshly harvested under aseptic conditions and showing no pathological symptoms was sent directly to the laboratory within a period not exceeding 24 h in view of the microbiological studies.

In order to remove the microorganisms present on the cortex, the whole plant (stems, leaves and roots) was washed with tap water, then underwent a series of disinfection with 95% ethanol for 30 s, with sodium

hypochlorite 10% and 75% ethanol for 2 min., then rinsed 3 times with sterile distilled water to remove traces of the disinfectant (Evans *et al.*, 2003, Rubini *et al.*, 2005). The superficial tissues were scoured using a scalpel and then crushed using a sterile forceps. A volume of 100 µl was deposited and then spread on the surface of a Petri dish containing nutrient agar (Jasim *et al.*, 2014). At the same time, a Petri dish containing a drop of sterile distilled water from the last washing of the plant served as a control. The whole was incubated at 37°C for 24 h. The operation was repeated three times for each of the different parts of *U. dioica* L.

The isolated bacteria were coded by two letters and one number. The first letter derived from the harvest area, and the second from the part of the plant. The number indicates the order in which the bacteria appear.

**Macroscopic and biochemical identification.** After incubation, the different bacteria associated with the Great Nettle underwent a successive series of transplanting until adequate purification and isolation of the colo-

Table I  
Macroscopic and microscopic appearance of isolated bacteria.

Codes	Macroscopic appearance					Microscopic appearance				
	Form	Area	Elevation	Size	Chromogenesis	Contour	Opacity	Fresh state	Spores	Gram
TS1 TR2 DS2 DL2 DR3	Large round colonies	Rough	Flat	< 4 mm	Yellowish	Irregular	Opaque	Long bacilli in a chain motionless	+	+
TS2 TR1 DS3 DL3 DR3	Medium colonies, rounds	Smooth	Flat	< 2 mm	Beige	Irregular	Opaque	Small bacilli in a chain motionless	+	+
TL6 TS3 TR3 DS1 DL1 DR1	Large colonies	Smooth	Flat	3 mm	Whitish	Irregular	Opaque	Small bacilli in a chain	+	+
TL1 DL4	Small, round and well-insulated colonies	Brilliant	Bomb	> 1 mm	Whitish	Regular	Translucent	Colibacilles, mobile	-	-
TL2	Round	Dried	Slightly bulging	2 mm	Whitish	Regular	Opaque	Cocci very mobile	-	+
TL3	Round colonies	Smooth	Flat	> 1 mm	Whitish	Regular	Opaque	Cocci mobile	-	-
TL4	Small, round colonies Convex	Smooth Brilliant	Bomb	> 1 mm	Whitish	Regular	Opaque	Cocci in cluster	-	+
TL5	Small colonies	Smooth	Flat	> 1 mm	Transparent	Regular	Translucent	Small mobile bacilli	-	-
TR4	Large colonies	Rough	Flat	> 1 mm	Whitish	Irregular	Opaque	Small bacilli	-	+
DR2	Large colonies	Smooth	Flat	< 2 mm	Whitish	Irregular	Opaque	Small, very mobile bacilli	+	+
TR5	Large colonies	Rough	Flat	> 1 mm	Whitish	Irregular	Opaque	Bacillus	-	+

TS = Tlemcen stem, DS = Dellys stem, TR = Tlemcen root, DR = Dellys roots, TL = Tlemcen leaves, DL = Dellys leave

Table II  
Biochemical study of isolated bacteria.

Codes	Catalase	Oxidase	Acetoin	Indole	Citrate	Urease	Nitrate	Motility	Mannitol	H <sub>2</sub> S	ONPG	TDA	Glucose	Lactose
TS1 TR2 DS2 DL2 DR3	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
TS2 TR1 DS3 DL3 DR3	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	/	+	-
TL6 TS3 TR3 DS1 DL1 DR1	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-
DR2	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
TL1 DL4	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
TR4	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	/	+	+
TL3	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
TL4	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
TL2	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	/	+	+
TL5	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
TR5	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	/	+	+

TS = Tlemcen stem, DS = Delys stem, TR = Tlemcen root, DR = Delys roots, TL = Tlemcen leaves, DL = Delys leaves, + = presence, - = absence.

gies was achieved. The distinction between the different bacteria was based on morphological criteria (form, area, elevation, size, chromogenesis, shape and opacity).

In order to have a first orientation on the identification of the bacterial species detected, we carried out microscopic examinations such as fresh observation and Gram staining. These tests were complemented by the study of some biochemical characteristics (catalase, oxidase, acetoin, indole, citrate, urease, nitrate, motility, mannitol, H<sub>2</sub>S, ONPG, TDA, glucose, lactose) that allowed to get closer and closer to the identity of each species.

**Identification by MALDI-TOF MS.** The matrix was prepared before each series of analysis by diluting a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) (Sigma H, Lyon, France) in 500  $\mu$ l of 50% (v/v) acetonitrile, 250  $\mu$ l of 10% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) and 250  $\mu$ l of HPLC water. The whole was stirred vigorously, sonicated for 10 min, centrifuged (13 000  $\times$ g, 5 min.) and then transferred to a clean polypropylene tube.

Each bacterial colony obtained from a young culture (18 to 24 h) was deposited in duplicate on the MALDI-TOF target plate (Bruker Daltonics TM, Wissembourg, France) and then covered with 1.5  $\mu$ l of the matrix solu-

tion. The whole (target plate and matrix) was dried at room temperature for a few min. and then analyzed (Pfleiderer *et al.*, 2013). A Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) was used for bacterial identification. The spectra of the bacteria obtained were compared with the Bruker computer database using the flexAnalysis v. 3.3 and MALDI-Biotyper v. 3.0 software for data analysis. The isolate was correctly and significantly identified at the species level when the logarithmic score (LSV) was greater than or equal to 1.9 (Seng *et al.*, 2009).

## Results

The study of the macroscopic and biochemical aspect gave us a first orientation towards the determination of the bacterial species (Tables I and II).

The efficiency of the disinfection was checked in the control box after 24 h of incubation at 37°C and showed no microbial growth, indicating that the epiphytes were completely removed according to the disinfection protocol.

Based on morphological and biochemical criteria, a total of 57 endophytic bacteria were isolated from

Table III  
Identification results by MALDI-TOF/MS.

Codes	Organism best match	Study Area	Numbers			%	Score value (LSV)	Color	Significance of results
			S	L	R				
TS1 TR2 DS2 DL2 DR3	<i>Bacillus anthracis</i>	T	2	0	5	20	2.317	G	Correct identification of the genus and species
		D	2	5	0	22.72	2.226	G	
TS2 TR1 DS3 DL3 DR3	<i>Bacillus megaterium</i>	T	0	0	5	14.28	2.07	G	
		D	1	2	2	22.72	2.302	G	
TL6 TS3 TR3 DS1 DL1 DR1	<i>Bacillus pumilus-ME</i>	T	3	1	1	14.28	2.233	G	
		D	5	2	2	40.90	2.404	G	
DR2	<i>Bacillus cereus</i>	D	0	0	1	4.54	2.26	G	
TL1 DL4	<i>Escherichia coli</i>	T	0	5	0	14.28	2.354	G	
		D	0	1	0	4.54	2.243	G	
TL5	<i>Pantoea agglomerans</i>	T	0	1	0	2.85	2.175	G	
TL3	<i>Enterobacter amnigenus</i>	T	0	1	0	2.85	2.293	G	
TL4	<i>Staphylococcus cohnii</i>	T	0	1	0	2.85	2.024	G	
TL2	<i>Enterococcus faecium</i>	T	0	1	0	2.85	2.405	G	
TR4	<i>Paenibacillus lautus</i>	T	0	0	1	2.85	1.875	Y	
TR5	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	T	0	0	1	2.85	1.757	Y	
UN	?	T	2	1	4	20	<1.7	R	Unidentified
		D	0	0	1	4.54			

TS = Tlemcen stem, DS = Dellys stem, TR = Tlemcen root, DR = Dellys roots, TL = Tlemcen leaves, DL = Dellys leaves, D = Dellys, S = Stem, L = Leaves, R = Root, G = Green, Y = Yellow, R = Red, UN = Unidentified

*U. dioica* L., among them 35 bacteria from Tlemcen and 22 bacteria from Dellys. These bacteria belong to Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Paenibacillaceae, Staphylococcaceae, Enterococcaceae.

The identification of the various isolated bacteria was proved by MALDI-TOF MS. The values of the scores obtained are noted in Table III.

Among the 57 isolates analyzed by MALDI-TOF MS, eight bacteria were not identified. The 11 species identified belong to different families. The results show a dominance of Bacillaceae, represented essentially by four species, namely *Bacillus pumilus-ME*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. There are followed by Enterobacteriaceae with 3 species (*Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans* and *Enterobacter amnigenus*), Paenibacillaceae family with 2 species (*Paenibacillus lautus* and *Paenibacillus glucanolyticus*). The less frequent families are Staphylococcaceae and Enterococcaceae with *S. cohnii* and *E. faecium* respectively.

Analysis of the presence of endophytic bacteria in the two samples of the Great Nettle revealed a heterogeneous distribution of the identified germs.

It appears also that the leaves are richest in endophytic bacteria with 6 species isolated at Tlemcen and 4 species at Dellys. *B. pumilus-ME* is the common species in both regions of the different parts of the Great Nettle (leaves, stems and roots).

As for the effect of the biotope on diversity in endophytic bacteria, it seems that *U. dioica* L. collected in the region of Tlemcen is the richest in bacteria associated with seven genera and eleven species compared to that harvested from Dellys which is represented by 2 genera and 5 species. In addition, 4 bacterial species were isolated from the Great Nettle harvested in both regions. These include *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. pumilus-ME*, and *E. coli*. The 6 endophytic bacteria isolated only from Tlemcen are *P. lautus*, *P. glucanolyticus*, *P. agglomerans*, *E. amnigenus*, *E. faecium* and *S. cohnii*. Finally, *B. cereus* is detected only at Dellys.

## Discussion

Endophytic bacteria have already been isolated from medicinal plants by several authors. Indeed, El-deeb *et al.*, (2013) working on Shara «*Plectranthus tenuiflorus*», harvested from the Sahara of Saudi Arabia, revealed the presence of a multitude of endophytic bacteria including *Bacillus* sp., *B. megaterium*, *B. pumilus-ME* and *Paenibacillus* sp.

Similarly, Jasim *et al.*, (2014) showed the existence of *Bacillus* sp. and *Staphylococcus* sp. in the Ginger rhizome «*Zingiber officinale*». Coêlho *et al.*, (2011) isolated *B. cereus* and *B. anthracis* from the seeds and stems of Sumauma «*Ceiba pentandra*» and Mahogany «*Swietenia macrophylla*» from the Amazon.

Furthermore, all species of the genus *Pantoea* can be isolated from fecal matter, soil and plants (Andersson *et al.*, 1999), where they may be either pathogenic or commensal (Monier and Lindow, 2005). Among the bacteria of the genus *Pantoea*, *P. agglomerans* is used by plants as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi and bacteria (Adriaenssens *et al.*, 2011). Although this bacterium is good for plant development, it may also become an opportunistic human pathogen. Cruz *et al.*, (2007) have shown that the same species can cause serious infections in children over 6 years of age. According to Kratz *et al.*, (2003), Ulloa-Gutierrez *et al.*, (2004) *P. agglomerans* is often isolated in humans from soft tissue or bone / joint infections. The transmission of the bacteria to humans is due to trauma caused by plants.

MALDI-TOF mass spectrometry is a technology of microbiology, which makes it possible to identify microorganisms by directly analyzing their proteins. Although MALDI-TOF MS was described by Tshikhudo *et al.*, (2013), as the ideal technique for the identification of bacterial cells by the easy determination of peptide fingerprints, De Bruyne *et al.*, (2011) report that various factors can influence the quality and reproducibility of bacterial fingerprints, particularly sample preparation, cell lysis method, matrix solutions and organic solvents, which justifies the use of alternative methods to ensure correct identification.

An investigation of the presence of endophytic bacteria from *U. dioica* L. was carried out. The results obtained demonstrate the presence of a diverse endophytic community in the internal tissues of the Great Nettle which are differently distributed within stems, leaves and roots in both regions.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr. Idir Bitam and PhD student Amira Nebbak from the University of the Mediterranean, Faculty of Medicine of Timone, URMITE UMR, Rickettsias Unit for their contribution to bacterial identification by MALDI-TOF MS.

## Literature

- Adriaenssens E.M., P.J. Ceysens., V. Dunon., H.W. Ackermann., J.V. Vaerenbergh., M. Maes., M. De Proft and R. Lavigne. 2011. Bacteriophages LIMelight and LIMEzero of *Pantoea agglomerans*, Belonging to the “phiKMV-Like Virus”. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 3443–3450.
- Arnold A.E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal. Biol. Rev.* 21: 51–66.
- Andersson A.M., N. Weiss., F. Rainey and M.S. Salkinoja-Salonen. 1999. Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J. Appl. Microbiol.* 86: 622–634.
- Coêlho M.M., M.S. Ferreira-Nozawa., S.R. Nozawa and L.W.S. Santos. 2011. Isolation of endophytic bacteria from arboreal species of the Amazon and identification by sequencing of the 16S rRNA encoding gene. *Genet. Mol. Biol.* 34: 4676–4680.
- Cruz A.C., A.C. Cazacu and C.H. Allen. 2007. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease. *J. Clin. Microbiol.* 45: 1989–1992.
- De Bruyne K., B. Slabbincka, W. Waegeman, P. Vauterin, B. De Baets and P. Vandamme. 2011. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 20–29.
- Draghi F. 2005. Ph.D. Thesis in Pharmacy. Stinging nettle (*Urtica dioica* L.): bibliographic study (in French). Henri Poincaré Nancy University. France.
- Dudeja S.S., R. Giri., R. Saini., P. Suneja-Madan and E. Kothe. 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic. Microbiol.* 52: 248–260.
- El Deeb B., KH. Fayez and Y. Gherbawy. 2013. Isolation and characterization of endophytic bacteria from *Plectranthus tenuiflorus* medicinal plant in Saudi Arabia desert and their antimicrobial activities. *Journal. Plant. Interact.* 8: 56–64.
- Evans H.C., K.A. Holmes and S.E. Thomas. 2003. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma magileri*, in Ecuador and preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycol. Prog.* 2: 149–160.
- Goryluk A., H. Rekosz-Burlaga and M. Blaszczyk. 2009. Isolation and characterization of bacterial endophytes of *Chelidonium majus* L. *Pol. J. Microbiol.* 58: 355–361.
- Gravet A. and M. Gessier. 2013. Mass spectrometry and microbiology. (in French). *Immunol. Anal. Biol. Spec.* 28 (5): 297–308.
- Jasim B., J. Aswathy Agnes., C. Jimtha John., M. Jythis and E.K. Radhakrishnan. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. *3 Biotech.* 4:197–204.
- Kobayashi D.Y. and J.D. Palumbo. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. *Microbial endophytes.* 19: 199–233.
- Kratz A., D. Greenberg, Y. Barki, E. Cohen and M. Lifshitz. 2003. *Pantoea agglomerans* as a cause of septic arthritis after palm tree thorn injury; case report and literature review. *Arch. Dis. Child.* 88: 542–544.
- Laib D.J. 2014. The insecticidal activity study of the endophytic fungi *Cladosporium* sp. isolated from pink Laurel *Nerium oleander* L. (Apocynaceae, Gentianales) on bean bean *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae). (in French). *Nature and Technology* 10: 39–44.
- Monier J.M. and S.E. Lindow. 2005. Aggregates of resident bacteria facilitate survival of immigrant bacteria on leaf surfaces. *Microb. Ecol.* 49: 343–352.
- Pfleiderer A., J.C. Lagier., F. Armougom., C. Robert., B. Vialettes and D. Raoult. 2013. Culturomics identified 11 new bacterial species from a single anorexia nervosa stool sample. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32: 1471–1481.

- Rosenblueth M. and E. Martinez-Romero.** 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19: 827–837.
- Rubini M.R., R.T. Silva-Ribeiro., A.W.V. Pomella., C.S. Maki., W.L. Araujo., D.R. Dos Santos and J.L. Azevedo.** 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1: 24–33.
- Sauget M., B. Valot., X. Bertrand and D. Hocquet.** 2017. Can MALDI-TOF mass spectrometry reasonably type bacteria? *Trends Microbiol.* 25: 447–455.
- Seng P., M. Drancourt, F. Gouriet, S.B. LA, P.E. Fournier, J.M. Rolain and D. Raoult.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 49: 543–551.
- Tshikhudo P., R. Nnzeru, K. Ntushelo and F. Mudau.** 2013. Bacterial species identification getting easier. *Afr. J. Biotechnol.* 12.
- Ulloa-Gutierrez R., T. Moya and M.L. Avila-Aguero.** 2004. *Pantoea agglomerans* and thorn-associated suppurative arthritis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 690.

## ملخص

يستند هذا العمل الى محورين، أحدهما يتعلق بالكشف عن وجود ارتباط محتمل بين البكتيريا الداخلية للنبات المرتبطة بنبات القراص وتجميع المركبات الثانوية، ويرتكز الآخر على تقييم النشاط المضاد للحشرات باستعمال مستخلصات من نبات القراص التي تم حصدها في دلس (UDD) وتلمسان (UDT) ضد يرقات بعوض الكيولكس. تم عزل أنواع مختلفة من البكتيريا الداخلية للنبات، وهذا من سيقان وأوراق وجذور نبات القراص من خلال اعتماد طريقة وصفها Arnold (1999)، (Rubini et al., 2005)، (El Deeb et al., 2013). تم التعرف على انواع البكتيريا الداخلية للنبات عن طريق الفحص بالعين المجردة، المجهرية، والكيمياء الحيوية، واتأكد من ذلك باستعمال تقنية MALDI-TOF MS. هذه البكتيريا هي *Bacillus pumilus-ME*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter amnigenus*, *Paenibacillus lautus*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Staphylococcus cohnii* et *Enterococcus faecium*. وعلاوة على ذلك، كشف اختبار الفحص الكيميائي للنبات التوزيع غير المتجانس للمركبات الثانوية في الأجزاء المختلفة من نفس النبات (السيقان والأوراق والجذور). كما كشفت الدراسة عن وجود ارتباط بين وجود البكتيريا الداخلية للنبات مع وجود بعض المركبات الثانوية المصنعة من طرف النبات. في الواقع، تركيب اللوكوانثوسيانين، الصابونين، الالكلويدات، الكومارين، الجليكوسيدات، المواد المخاطية، الانثوسيانين، التانينات، تانينات الكاتشين، السينوزيدات، الفلافونويدات تابع لوجود البكتيريا من جنس *Bacillus*. وكذلك وجود الكينونات الحرة راجع الى وجود *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* et *Pantoea*. لكلا المنطقتين، يعود أفضل نشاط ضد اليرقات L2 و L4 من بعوض الكيولكس للمستخلص المائي لنبات تلمسان UDT (ملغ/مل)  $DL_{50UDD} = 8.05$ ،  $DL_{50UDT} = 6.16$  (ملغ/مل بعد 24 ساعة من الاتصال). وعلاوة على ذلك، أظهرت الالكلويدات المستخلصة من نبات دلس نشاط معتدل على اليرقات L4 (ملغ/مل  $LD_{50} = 6.91$ ). بالنسبة لمركبات الفلافونويد UDT، يعود أفضل نشاط الى EAE (ملغ/مل  $LD_{50} EAE = 0.31$ )، تليها EED (ملغ/مل  $DL_{50EED} = 0.61$ )، و EB (ملغ/مل  $LD_{50} EB = 1.84$ )، وأخيرا EA (ملغ/مل  $LD_{50} EA = 8.89$ ). (=  $p < 0.05$ ). وفي الختام، تقترح هذه الدراسة أن نبات القراص يمكن أن يكون مصدرا ثريا للمركبات الثانوية، تحتوي على العديد من البكتيريا الداخلية للنبات وتقدم بديلا جيدا للمكافحة البيولوجية بطريقة اقتصادية وأقل ضررا على البيئة.

**الكلمات المفتاحية:** الالكلويدات، مبيدات الحشرات، الفلافونويدات، بعوض الكيولكس، بكتيريا داخلية للنبات، دلس، تلمسان، قراص، MALDI-TOF MS.