



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMARI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie-Microbiologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Activité antioxydante et antibactérienne d'extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L. ainsi que l'activité antibactérienne de mycoendophytes isolés à partir de ces feuilles

Réalisé par : M^{lle} LIMANI Dyhia et M^{lle} AKSIL Nissa

Soutenu le : 10/10/2016 devant le jury composé de :

SMAIL-SAADOUN Noria	Professeur	UMMTO	Président
SALMI Djouza	Maitre-assistant B	UMMTO	Promotrice
SEBBANE Hilal	Maitre-assistant A	UMMTO	Examineur
TITOUCHE Yacine	Maitre-assistant A	UMMTO	Examineur

Remerciements

Au terme de ce travail, il nous est agréable de remercier toutes personnes qui ont participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Nos chaleureux remerciements vont particulièrement à :

M^{me} SALMI Djouza, Maitre-assistant B, à l'université Mouloud MAMMERE T-O, d'avoir bien voulu diriger de près ce travail et pour tous ses conseils, ses encouragements et orientation. Qu'elle trouve ici l'expression de nos sentiments de gratitude et de déférence.

M^r HOUALI Karim, Professeur à l'université Mouloud MAMMERE T-O, de nous accueillir au sein du laboratoire de recherche LABAB.

M^{me} SMAIL-SAADOUN Noria, Professeur à l'université Mouloud Mammeri T-O, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire et pour son aide dans l'identification de la plante.

M^r TITOUCHE Yacine, Maitre-assistant A, à l'université Mouloud MAMMERE T-O d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour son aide matérielle qui nous a permis de bien mener la partie microbiologique.

M^r SEBBANE Hilal, Maitre-assistant classe A, à l'université Mouloud MAMMERE T-O, d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour son aide au cours de réalisation de ce mémoire.

A toute l'équipe de laboratoire LABAB, ainsi qu'à nos collègues, de nous avoir aidé et encouragé tout le long de ce travail.

Dédicaces

A mes très chers parents,

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que je porte pour vous. Ce travail est le fruit de vos sacrifices, vos encouragements, vos efforts fournis jour et nuit pour mon éducation, mon bien-être et ma formation. Vous êtes la lumière qui éclaire mon chemin. Que Dieu vous protège et vous accorde une longue vie pleine de bonheur et de santé.

A mon cher adorable frère Younes,

Qui est toujours présent à mes côtés, je vous souhaite la meilleure réussite dans vos projets.

A mes splendides sœurs, Nawal, Lamia et Hayet.

Pour leur soutien et leurs encouragements, je vous souhaite la réussite dans vos parcours.

A mon beau-frère Amine,

Pour son soutien et encouragement. Je vous souhaite que de bonheur à vous et à Nawal.

A mes cher(e)s,

Lisa, Imane, Nassim, Yacine, Lidia et Azzedine et ma tante.

A la mémoire de ma chère grand-mère MISRAOUJ Fatma,

A la mémoire de mes grands parents

Vous êtes toujours vivants dans nos cœurs.

A mes ami(e)s.

A mon cher Jackson.

Dyhia.

Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie

A ma très chère mère, Ouardia

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver, t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de mon Père, Mahiddine

Qui aurait été fière de moi aujourd'hui

A mon cher Dadda Yacine

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

A mes frères et mes sœurs Safia, Dehbia, Linda, Faicel, Lyes, Lyazid.

Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de la réalisation de ce travail.

A Mes neveux et nièces.

A mes beaux-frères Tahar et Said.

A mes oncles et tantes, en particulier mon oncle Madjid.

A mes amies: Dihia, Sabrina, Secoura, Ferroudja.

A mon binôme Dyhia qui a partagée avec moi la réalisation ce travail.

A toute personne qui m'est chère.

Nissa.

Abstract

The *Urtica dioïca* is a medicinal plant, family of Urticaceae. The stinging nettle has been the subject of numerous studies that highlighted activities such as anti-inflammatory, anti-tumor and immune-modulating.

The antioxidant activity was studied with the DPPH method and the potassium ferrocyanide reducing power test. The results have showed that all the different extracts have anti-radical activity and reducing power ferrocyanide. The ethyl acetate extract is the best radical scavenger with an IC_{50} of 10.7mg / ml. The aqueous extract macerated is the most powerful ferrocyanide reducing with $PR_{0,5 AU}$ of 2,1mg/ml. The antibacterial activity of extracts from *Urtica dioïca* was evaluated against reference strains of *Staphylococcus aureus* MRSA and multi-resistant MRSA isolated strains of *Staphylococcus aureus* by the agar diffusion method. The solvent extracts were active on all strains unlike aqueous extracts. The MIC was determined. The ethyl acetate extract showed the lowest MIC (10mg/ml).

Alternaria sp and *Scytalidium* sp isolated from leaves of *Urtica dioïca* showed good antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* strains of reference and stem *Staphylococcus aureus* MRSA multi-resistant insulated from the bin and milk. However, the sterile mycelium did not exert an inhibitory effect on the growth of bacteria tested. The antibacterial activity of *Scytalidium* sp and *Alternaria* sp has proved more powerful than the activity of extracts from *Urtica dioïca*. This fact introduces a new approach, the biological activities recorded during traditional use *Urtica dioïca* could be due to the presence of mycoendophytes within this plant.

Keywords: *Urtica dioïca*, antioxidant activity, antibacterial activity, aqueous extracts, solvents extracts, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus* MRSA, fungal endophytes.

Résumé

L'*Urtica dioïca* est une plante médicinale, de la famille des *Urticaceae*. L'ortie dioïque a fait l'objet de nombreuses études qui ont souligné des activités telles que l'activité anti-inflammatoire, anti-tumorale et immun-modulatrice.

L'activité antioxydante a été étudiée avec la méthode de DPPH et le test de pouvoir réducteur sur ferrocyanure de potassium. Les résultats obtenus ont montré que les différents extraits possèdent une activité anti-radicalaire et un pouvoir réducteur de ferrocyanure. L'extrait d'acétate d'éthyle est le meilleur piègeur de radicaux avec une IC₅₀ de 10.7mg/ml. L'extrait aqueux macéré est le réducteur de ferrocyanure le plus puissant avec une PR_{0.5} AU de 2.1mg/ml. L'activité antibactérienne des extraits d'*Urtica dioïca* a été évaluée, contre des *Staphylococcus aureus* MRSA de référence et des *Staphylococcus aureus* MRSA multi-résistantes isolés à partir du lait et l'ben, par la méthode de diffusion sur gélose. Les extraits par solvant sont révélés actifs sur toutes les souches contrairement aux extraits aqueux. La CMI a été déterminée. L'extrait macéré dans l'acétate d'éthyle montre la plus basse CMI qui est de 10mg/ml.

Alternaria sp et *Scytalidium* sp isolés à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* ont montré une bonne activité antibactérienne sur les souches *Staphylococcus aureus* MRSA de référence et sur les souches *Staphylococcus aureus* MRSA multi-résistantes isolées à partir du l'ben et du lait. Cependant, le mycélium stérile n'a pas exercé un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries testées. L'activité antibactérienne de *Scytalidium* sp et d'*Alternaria* sp est avérée plus puissante que l'activité des extraits d'*Urtica dioïca*. Ce constat lance une nouvelle approche, les activités biologiques enregistrées lors d'utilisation traditionnelle d'*Urtica dioïca* pourraient être dû à la présence des mycoendophytes au sein de cette plante.

Mots clés : *Urtica dioïca*, activité antioxydant, activité antibactérienne, extraits aqueux, extraits par solvants, activité antimicrobienne, *Staphylococcus aureus* MRSA, champignons endophytes.

Liste des figures

Figure 1	Planche botanique d' <i>Urtica dioïca</i>	3
Figure 2	Vue dorsal de la feuille d' <i>Urtica dioïca</i>	5
Figure 3	Tige dérasée d' <i>Urtica dioïca</i>	6
Figure 4	Poils urticants d' <i>Urtica dioïca</i>	6
Figure 5	Racines d' <i>Urticadioïca</i>	7
Figure 6	Fleurs mâle et femelle d' <i>Urtica dioïca</i>	7
Figure 7	Diagramme florale d' <i>Urtica dioïca</i>	8
Figure 8	Fruit d' <i>Urtica dioïca</i>	8
Figure 9	Structure du phénol	10
Figure 10	Structure chimique de base des flavonoïdes	12
Figure 11	Cycle de vie et mode de transmission (verticale et horizontale) du champignon endophyte <i>Neotyphodium</i> sur son hôte <i>Festuca arundinaceae</i>	26
Figure 12	Carte géographique de lieu de récolte Larbaâ Nath Irathen.....	29
Figure 13	Forme libre et réduite du DPPH.....	32
Figure 14	Pourcentages d'inhibitions des extraits macérés de feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> (ECHL, EMET, EACT, EAM) et des témoins en fonction de différentes concentrations.....	37
Figure 15	Pourcentage d'inhibition des extraits aqueux (EAM, EAD, EAI) et des témoins (BHT, vitamine C, quercétine) en fonction de différentes concentrations.....	38
Figure 16	IC ₅₀ des différents extraits et standards.....	39
Figure 17	Densité optique des extraits par solvant (ECHL, EACT, EMET) et aqueux (EAD, EAM, EAI) en fonction de différentes concentrations.....	41

Figure 18	Densités optique des témoins (Ouercetine, BHT, et Vit c) à différentes concentrations (0, 1.5, 3.75, 7.5, 15, et 20 µg/ml).....	41
Figure 19	PR _{0,5 AU} des différents extraits et standards.....	42
Figure 20	Effet antibactérien des différents extraits des feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	44
Figure 21	Effet des extraits aqueux (EAD, EAI, EAM) des feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> sur les souches de référence.....	45
Figure 22	Effet des extraits aqueux (EAI, EAM, EAD) sur les souches multi-résistantes isolées.....	46
Figure 23	Effet inhibiteur des extraits macérés (EAM, EMET, ECHL, EACT) sur les souches de référence.....	47
Figure 24	Effet inhibiteur des extraits macéré (EAM, EMET, ECHL, EACT) sur les souches isolées multi-résistantes.....	48
Figure 25	CMI des extraits macérés dans un solvant (ECHL, EMET, EACT...)	50
Figure 26	Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait chloroformique sur les souches de référence.....	51
Figure 27	Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait chloroformique sur les souches isolées multi-résistantes.....	52
Figure 28	Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait macéré dans l'acétate d'éthyle sur les souches de référence.....	53
Figure 29	Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait macéré dans l'acétate d'éthyle sur les souches isolées multi-résistantes.....	54
Figure 30	Effet inhibiteur dose dépendent de l'extrait macéré dans le méthanol sur les souches de référence.....	55
Figure 31	Effet inhibiteur de l'extrait macéré dans le méthanol sur les souches isolées multi-résistantes.....	56
Figure 32	Mycélium stérile isolé à partir des feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> dans un milieu PDA.....	61
Figure 33	Observation au microscope du mycélium stérile isolé à partir des feuilles d' <i>Urticadioïca</i> au grossissement 400.....	61
Figure 34	<i>Alternaria</i> sp isolé à partir de feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> dans un milieu PDA.....	62
Figure 35	Observation au microscope optique d' <i>Alternaria</i> sp isolé à partir des feuilles d' <i>Urticadioïca</i> au grossissement 400.....	62
Figure 36	<i>Scytalidium</i> sp isolé à partir des feuilles d' <i>Urtica dioïca</i> dans un milieu PDA.....	63
Figure 37	Observation au microscope optique de <i>Scytalidium</i> sp isolé à partir des feuilles d' <i>Urticadioïca</i> au grossissement 400.....	64
Figure 38	Activité antibactérienne des champignons endophytes sur les souches de référence et les souches multi-résistantes MRSA.....	65

Figure 39	Pouvoir antibactérien des champignons endophytes sur les souches de référence.....	66
Figure 40	Pouvoir antibactérien des champignons endophytes sur les souches MRSA multi-résistantes.....	67

Liste des Tableaux

Tableau I	Position systématique de l'espèce <i>Urtica dioïca</i>	4
Tableau II	Principales classes de composés phénoliques.....	11
Tableau III	Classe des flavonoïdes.....	13
Tableau IV	Éléments minéraux contenus dans les feuilles d' <i>Urtica dioïca</i>	15
Tableau V	Constituants chimiques des feuilles d' <i>Urtica dioïca</i>	16
Tableau VI	Constituants chimiques de la tige d' <i>Urtica dioïca</i>	16
Tableau VII	Composition chimique des racines d' <i>Urtica dioïca</i>	18
Tableau VIII	Liste de quelques mycoendophytes producteurs de métabolites secondaires dans la plante hôtes	28
Tableau IX	Aromatogramme des germes étudiés en présence des différents extraits d' <i>Urtica dioïca</i>	43
Tableau X	CMI des extraits macérés (ECHL, EMET, EACT).....	49
Tableau XI	Résultats du test d'effet antibactérien des champignons endophytes sur les souches testées.....	64

Liste des abréviations

Liste des abréviations

Abs :	Absorbance.
ADP :	Adénosine di-phosphate.
APG III :	<i>Angiosperms phylogeny group.</i>
ATCC :	American type culture collection.
BHI :	Brain heart infusion.
BHI b :	Brain heart infusion bouillon.
BHT :	Hydroxytoluene butylé.
Chloram :	Chloramphénicol.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice.
COX :	Enzymes cyclo-oxygénase.
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde.
DPPH• :	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.
EACT :	Extrait macéré dans l'acétate d'acétate d'éthyle.
EAD :	Extrait aqueux par décoction.
EAI :	Extrait aqueux par infusion.
EAM :	Extrait aqueux macéré.
ECHL :	Extrait macéré dans le chloroforme.
EMET :	Extrait macéré dans le méthanol.
HDL :	Lipoprotéine de haute densité.
HPGDS :	Hematopoietic prostaglandin D2 synthase.
IC50 :	Concentration inhibitrice à 50%.
IL-1 :	Interleukine 1.
LDH :	Lactate Déshydrogénase.
LDL :	Lipoprotéines de basse densité.
M. S :	Mycélium stérile.
MH :	Mueller Hinton.
MH b :	Mueller Hinton bouillon.
MRSA :	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> .

MRSS :	Methicillin-Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i> .
NF-Kappa-B :	Facteur nucléaire kappa B.
PBS :	Tampon phosphate.
PDA :	Potato Dextrose Agar.
PR_{0,5} :	pouvoir réducteur.
<i>S.aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i> .
SHBG :	Sex hormone binding globulin.
TCA :	Acide trichloroacétique.
TNF-α :	Facteur de nécrose tumorale α .
UDA :	<i>Urtica dioica</i> Agglutinine.
Vit C :	Vitamine C.

Introduction

La phytothérapie a été utilisée depuis des siècles pour traiter divers pathologies. Tisanes, décoctions, compresses ont été utilisés avec succès. Selon l'organisation mondiale de la santé, en Afrique et en Asie, 80% de la population continue d'utiliser des médicaments traditionnels plutôt que des médicaments dits modernes pour les soins de santé primaire. L'usage répandu de la phytothérapie dans les pays en voie de développement est due à la disponibilité des ressources végétales utilisées, leur efficacité et au coût souvent abordable. Selon SOFOWORA. (1993), la phytothérapie apporte ses propres solutions pour le traitement des infections bactériennes, fongiques, pour le traitement du paludisme, des infections opportunistes contractées par les personnes vivant avec le VIH, du diabète, de l'hypertension artérielle et de la drépanocytose. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'étude des plantes utilisées en médecine traditionnelle.

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications. Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, l'attention s'est portée sur l'activité antioxydant ces dernières années, en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, cancer, diabète, hypertension et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant.

En outre, la maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé qui s'impose à l'échelle mondiale. Face à ce problème de résistance, l'utilisation de la phytothérapie est de plus en plus d'actualité.

L'ortie dioïque, *Urtica dioïca* L., est une plante médicinale qui appartient à la famille des *Urticaceae*, d'origine eurasiatique qui est aujourd'hui présente dans le monde entier. L'utilisation de la grande ortie est multiple. Elle est employée en phytothérapie, en agriculture, en alimentation, en cosmétique et dans l'industrie du textile. Traditionnellement, Les feuilles d'*Urtica dioïca* sont utilisées pour soulager les douleurs causées par le rhumatisme et pour le traitement de l'anémie. De nombreuses études ont montrés que l'*Urtica dioïca* possède des propriétés antimicrobiennes, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, immunostimulantes et anti-tumorales.

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires, une source importante de molécules utilisables par l'Homme dans des différents domaines tel que la pharmacologie, l'agroalimentaire (JEAUN *et al.* 2005). Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, dont plus de 200.000 molécules ont été identifiées. Classés selon leur appartenance chimique en composés phénoliques, alcaloïdes et terpénoïdes (AMAS. 1997). L'*Urtica dioïca* est très riches en métabolites secondaires notamment les flavonoïdes, les acides phénoliques, les stérols et triterpènes. Ces métabolites sont l'origine de ses nombreuses activités biologiques signalées (GHEDIRA. 2009).

Dans les systèmes naturels les plantes sont considérées comme des hôtes potentiels pour une large gamme de microbes, usuellement des bactéries et des champignons. La plante hôte pourra héberger ces microorganismes sur la surface (épiphytes) ou au sein de ses tissus (endophytes) (LINARES. 2010). Les champignons endophytes, représentent une trame

fongique importante qui a été étudiée comme modèle symbiotique des végétaux supérieurs. Ces microorganismes vivent en interaction complexe avec les plantes, colonisant toutes les parties de ces dernières, ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement, et jouent ainsi un rôle essentiel dans l'amélioration de leurs performances écologiques et physiologiques (amélioration du statut nutritif, résistance aux maladies, aux ravageurs, et aux stress physiques). Par ailleurs, les mycoendophytes synthétisent un grand nombre de substances complexes, bioactives et économiquement très importantes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes. Aujourd'hui, la connaissance de la biologie des moisissures est encore partielle. Cependant, la compréhension des métabolismes primaires et secondaires et de la génétique de ces microorganismes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de biosynthèse et leur mise à profit pour l'homme.

C'est dans cette optique que le présent travail a été réalisé dans le cadre d'une recherche mené par le laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologies (LABAB) de le laboratoire de ressource naturelle les objectifs suivants :

Evaluer et comparer l'activité antioxydante de différents extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L. par la méthode de de piégeage du radicale libre DPPH• et le test de pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium ;

Rechercher et comparer l'activité antibactérienne de différents extraits de feuilles d'*Urtica dioïca*, cela *vis-à-vis* des souches *Staphylococcus aureus* MRSA de référence (*S.aureus* LGA251, *S.aureus* MU50, *S.aureus* ATCC 43300), une souche MSSA (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et des *staphylococcus aureus* MRSA multi-résistantes isolés à partir du lait et l'ben (*S.aureus* S84, *S.aureus* S.95, *S.aureus* S96, *S.aureus* S100, *S.aureus* S101) ;

Constater le meilleur procédé d'extraction en se basant sur les résultats de ces deux activités ;

Identifier trois mycoendophytes isolés à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* ;

Rechercher l'activité antibactérienne de trois champignons endophytes isolés, *vis-à-vis* des souches précédentes ;

Comparer l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* et l'activité antibactérienne des champignons endophytes et rechercher le lien entre ces deux vu que les champignons endophytes vivent en interaction complexe avec les plantes hôtes. Selon CLAY et SCHARDL (2002), les champignons endophytes reçoivent la nutrition, la protection, et la possibilité de se propager grâce à leurs hôtes, et en retour la plante hôte bénéficie aussi de certains avantages procurés par l'endophyte. Selon SCHULZ et BOYLE (2005), les champignons endophytes produisent plusieurs métabolites secondaires bioactives dont des substances antibiotiques. Ces métabolites peuvent être l'origine des vertus thérapeutiques signalées lors d'utilisation traditionnelle d'*Urtica dioïca*.

1. Synthèse bibliographique

1.1. Présentation d'*Urtica dioïca*

1.1.1 Etymologie

Le nom latin universel de la grande ortie représentée par la figure 1 est *Urtica dioïca* Linn. La grande ortie se disait *Urtica* en latin lui-même dérivé du mot “Uro” qui signifie brûler ou “urere” dénotation à piquer (BRABANT-HAMONIC. 2004). Le nom d'espèce *dioïca* concerne un végétal dont les fleurs mâles et femelles sont portées par des pieds différents (VALNET. 1993 ; BERTRANT. 2008). Dans *Urtica dioïca* L. le “L” fait référence à la classification de Carl Von LINNE fondateur de la nomenclature binominale.

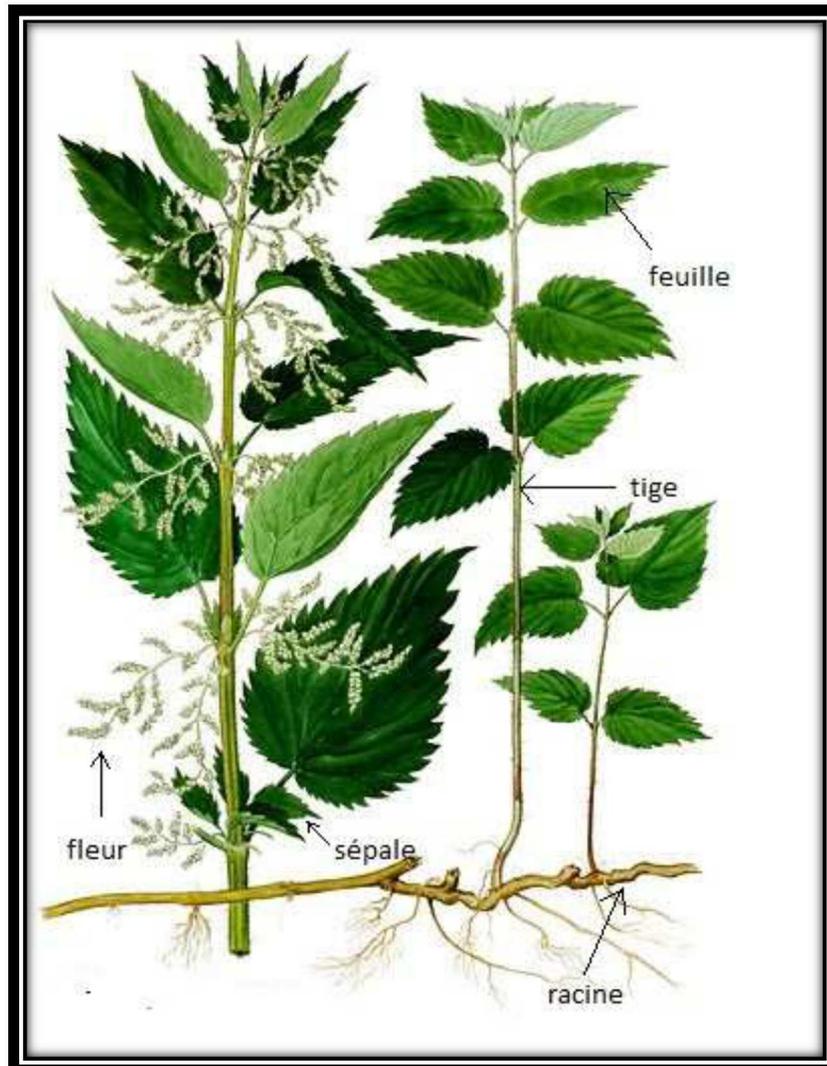


Figure 1 : Planche botanique d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

Selon BERTRAND (2002), plusieurs noms vernaculaires sont attribués à cette plante :

- Appellation française : Ortie piquante, ortie commune, ortie dioïque ;
- Appellation anglais : Stinging nettle ;
- Appellation arabe : Harayig ;
- Appellation berbère : Azegtouf.

1.1.2. Position systématique de la grande ortie

Selon la classification phylogénétique, établie Par l'*angiosperms phylogeny group* (APGIII) faite en 2009, nous avons la systématique suivante :

Tableau I : Position systématique de l'espèce *Urtica dioïca* (APGIII).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes.
Classe	Eudicots.
Ordre	Rosales.
Famille	Urticaceae.
Genre	<i>Urtica</i> .
Espèce	<i>Urtica dioïca</i> .

1.1.3. Les principales espèces du genre *Urtica*

Le genre *Urtica* est représenté par plus d'une cinquantaine d'espèces dont une trentaine en région tempérée (FENNANE *et al.* 1999). Les principales espèces du genre *Urtica* :

- *Urtica dioïca* L. (ortie commune ou ortie dioïque) ;
- *Urtica urens* L. (ortie brûlante ou petite ortie) ;
- *Urtica pilulifera* L. (ortie romaine ou ortie à pilules) ;
- *Urtica cannabina* L. (ortie à feuille de chanvre) ;
- *Urtica atrovirens* Req. (ortie noirâtre, ortie de dodart) ;
- *Urtica membranacea* Poire (ortie douteuse ou ortie à membranes).

1.1.4. Descriptions botanique et écologique de la grande ortie

La grande ortie est d'origine eurasiatique qui est aujourd'hui présente dans presque toutes les régions du monde, de l'Europe et l'Afrique du Nord à l'Asie, ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud et en Afrique du Sud.

C'est une plante herbacée, de la famille des Urticaceae la plus répandue dans le genre *Urtica*, dont la tige dressée peut atteindre 2m de haut. La floraison de la grande ortie a lieu de Juin à Septembre (CECCHINI *et al.* 2008).

UPTON (2013) a montré que la grande ortie constitue par ailleurs un excellent exemple de plante dioïque, chez laquelle existe des pieds mâles et d'autres femelles et donc, portant des fleurs unisexuées. Elles sont anémophiles et anémochores, c'est-à-dire que le vent assure le transport du pollen et la dispersion des graines.

Urtica dioïca L. peut pousser sur tous les types de terrains, argileux ou sablonneux, calcaires ou siliceux. Ces terrains doivent toutefois être riches en azote (plante nitrophile), et humides (plante hydrophile). Elle résiste toutefois à la sécheresse. La grande ortie est une plante rudérale très envahissante (BERTRAND. 2002).

1.1.4.1. Appareil végétatif

L'appareil végétatif est l'ensemble des organes d'une plante (racine, tige, feuille) qui assurent sa croissance végétative.

- **Description des feuilles**

Les feuilles de la grande ortie sont de couleur vert foncé (riche en chlorophylle), alternes ou opposées deux à deux, ovales à lancéolées, cordiformes et se terminant en pointe, simples, charnues. Elles sont en général deux fois plus longues que larges, environ 1,5-20 cm de long par 0,6-12cm de largeur. Elles sont bordées de fortes dents triangulaires. Les nervures sont proéminentes sur la face inférieure. Les cellules épidermiques renferment des corpuscules calcifiés appelés cystolithes. La forme plus ou moins allongée des cystolithes est un caractère propre aux Urticacées (REAUME. 2010 ; UPTON. 2013). Ces cystolithes correspondent à des amas de cristaux de carbonate de calcium qui sont portés par un pédicelle relié à l'épiderme de certaines feuilles ou situés également à la base de poils tecteurs (BOTINEAU. 2010). Elles réparent une faible odeur herbacée, leur saveur est aigrelette et astringente.

Selon GHEDIRA *et al.* (2009), le limbe et le pétiole sont couverts de trois sortes de poils : poils urticants ; les poils tecteurs non urticants qui sont longs, coniques unicellulaires, dont la partie basilaire fortement renflée contient des cristaux de carbonates de calcium ; poils glandulaires courts, constitués par un court pédicelle. Ces poils glandulaires et tecteurs sont surtout localisés à la face supérieure du limbe.

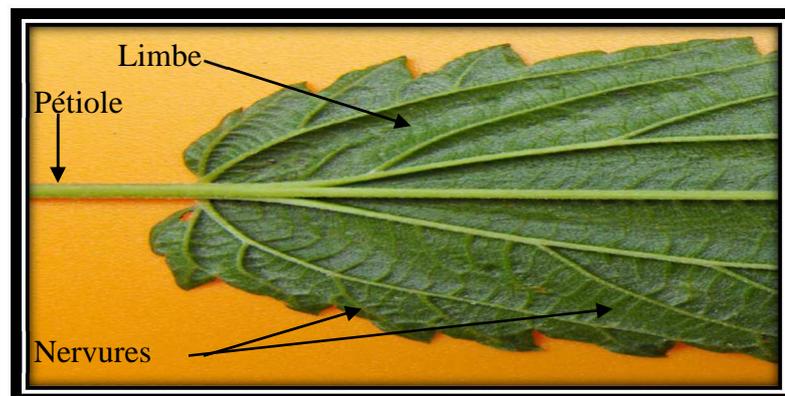


Figure 2 : Vue dorsale de la feuille d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

- **Description de la Tige**

La tige de la grande ortie est robuste, dressée et carrée, pleines, et à section quadrangulaires, peut atteindre 2m de hauteur. Comme la feuille, elle est recouverte de poils courts et de poils urticants unicellulaires (WICHTL et ANTON. 2003).

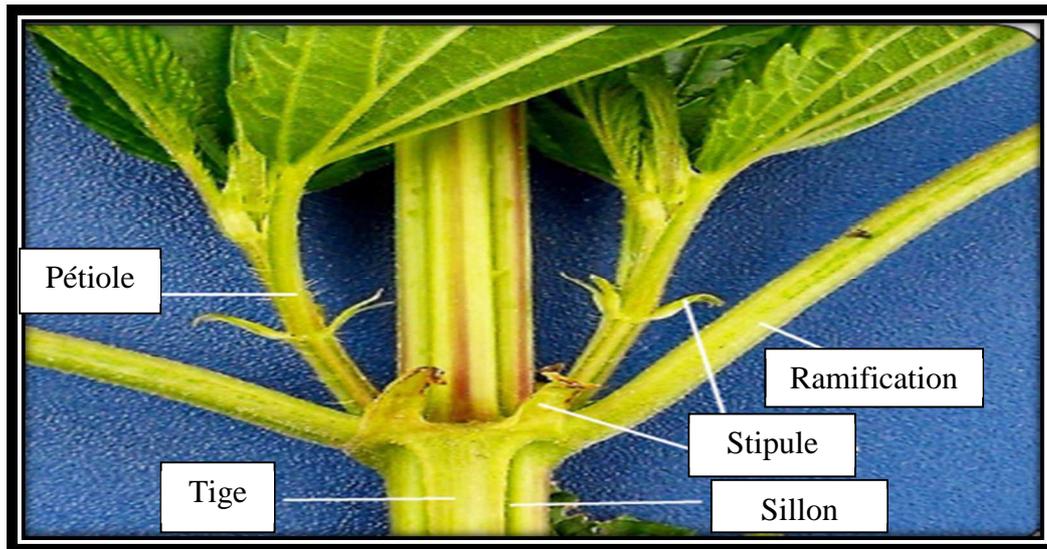


Figure 3: Tige dressée d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

- **Description des poils urticants**

Le poil urticant de la grande ortie comprend une longue cellule dont la base est renflée et enfoncée dans une petite excroissance de tissus épidermique et sous-épidermique. La paroi de la cellule principale est imprégnée de silice et sa partie effilée peut facilement se rompre au moindre contact, libérant alors un liquide urticant contenant du formiate de sodium, de l'acétylcholine, de la sérotonine et de l'histamine (LAGLANDE. 2014).



Figure 4 : Les poils urticants d'*Urtica dioïca* (JOSHI *et al.* 2014).

- **Description des racines**

La grande ortie présente de longs racines, qui lui permettent de former des colonies, d'où son pouvoir envahissant (RUZICKOVA. 2012). Les rhizomes rampants mesurent de 1 à 5mm d'épaisseur, jaunâtres et sont pourvus d'un chevelu de fines racines adventives qui développent chaque année de nouvelles pousses (LANGLADE. 2010).

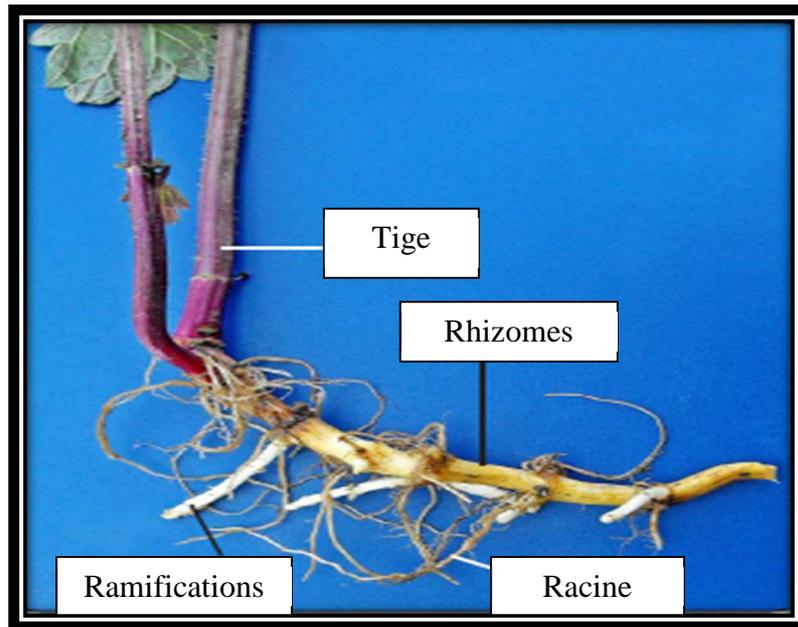


Figure 5 : Racines d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

1.1.4.2. Appareil reproducteurs

L'ortie dioïque peut se multiplier de deux façons (FLEURENTIN. 2008) :

- Par reproduction sexuée faisant intervenir les fleurs mâles et femelles portées par des pieds différents. La pollinisation est anémophile (par le vent), grâce à des anthères explosives, qui projettent le pollen.
- Par reproduction asexuée en produisant des clones à partir de stolons (tiges rampantes formant des nœuds qui donnent naissance à de nouvelles plantes) ou de rhizomes.

- **Description des fleurs**

Les fleurs sont unisexuées, minuscules et réunies en grappes, mâles et femelles sur des pieds différents. Les grappes femelles sont tombantes, les grappes mâles dressées (FENNANE *et al.* 1999).



Figure 6 : Fleurs mâles et femelles d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

La fleur femelle est formée de 4 tépales dont deux beaucoup plus gros, enveloppant un ovaire uniloculaire et deux petits extérieurs. La fleur mâle comporte 4 tépales et 4 étamines, recourbées dans le bouton et se redressant de manière élastique à l'anthèse, en projetant au loin un petit nuage de pollen (FENNANE *et al.* 1999).

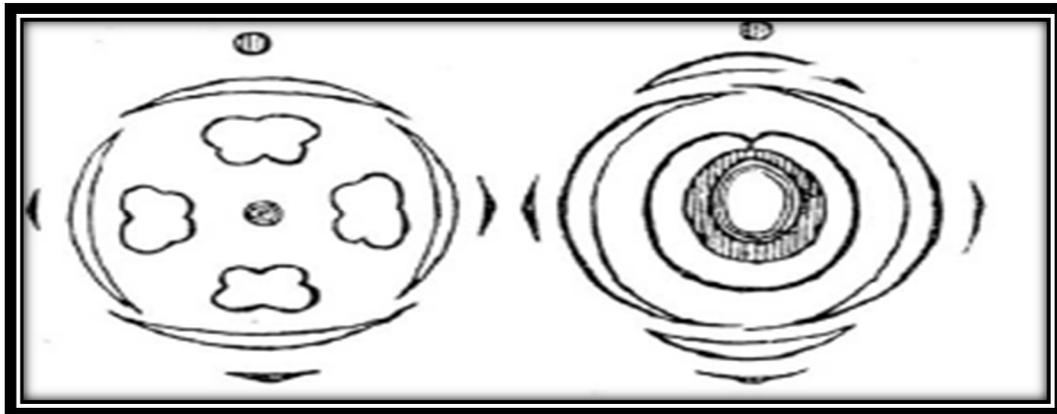


Figure 7 : Diagramme florale d'*Urtica dioïca* (GHEDIRA *et al.* 2005).
(Fleur male à droite, fleur femelle à gauche).

- **Description du fruit et graine**

Le fruit d'*Urtica dioïca* L. est constitué d'un akène ovale de couleur jaune-brun. Il est entouré d'un calice persistant et reste enveloppé dans deux gros sépales accrescents, larges et ovales. Il contient une graine unique, albuminée, à embryon droit (WICHTL et ANTON. 2003; GHEDIRA *et al.* 2009).

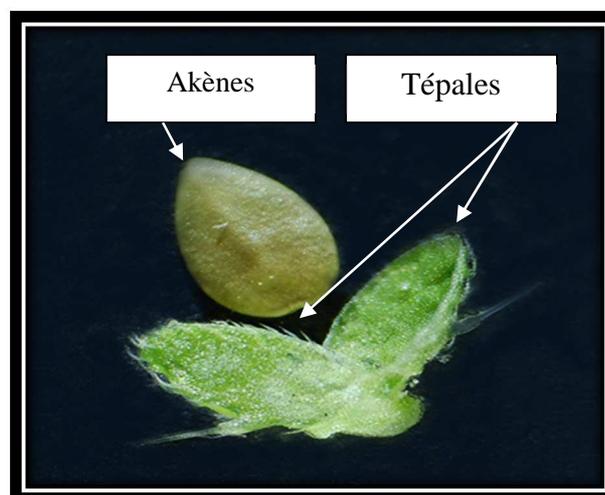


Figure 8 : Fruit d'*Urtica dioïca* (REAUME. 2010).

1.2. Métabolites secondaires

Les plantes photosynthétiques convertissent le dioxyde de carbone (CO₂) en métabolites primaires, qui sont nécessaires pour leur vitalité. En outre, elles possèdent des métabolites dits secondaires, ces derniers ne sont pas nécessaires pour leurs évènements biochimiques essentiels et diffèrent en fonction des espèces (LIU. 2004).

Les métabolites secondaires sont largement répandus dans le règne végétal, on les trouve dans tous les fruits et les légumes. Ces composés sont présents dans toutes les parties des plantes mais avec une répartition quantitative qui varient entre les différents tissus (BOIZOT et CHARPENTIER. 2006).

Ils participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques (agents pathogènes, blessures, symbiose) ou abiotiques (lumière, rayonnements UV, faible température). Les métabolites secondaires contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume) (VISIOLI *et al.* 2000).

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, classés selon la nature biochimique des molécules, leurs propriétés et effets biologiques et/ou leur origine biosynthétique.

Selon MAROUF (2000) et MACHEIX *et al.* (2005), les composés du métabolisme secondaire sont classés en 3 grandes classes :

- les composés terpéniques ;
- les composés phénoliques ;
- les alcaloïdes et composés azotés.

1.2.1. Les terpènes

Les terpènes constituent le plus grand ensemble de métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes). Du point de vue structural, les terpènes constituent une grande famille de composés prénologues, c'est-à-dire d'homologues à enchaînement isoprénique (DEY et HARBORNE. 1991). Ces substances organiques font partie des métabolites secondaires les plus répandus dans la nature (BOUVIER *et al.* 2005). En effet, plus de 36.000 structures différentes ont été identifiées (HILL. 2002), plusieurs sont isolés à partir des fleurs, des tiges, des racines et différentes parties des plantes (SCHULZ *et al.* 2003).

Beaucoup de terpènes servent comme des additifs dans les industries alimentaires et cosmétiques (TSAO. 1995), et plusieurs d'entre eux possèdent des activités biologiques telles que l'activité antimicrobienne, anti-carcinogénique, anti-inflammatoire (MURAKAMI. 2004 ; GRIFIN. 1999), anesthésique et anti-histaminique, diurétique (HSISOU. 2000 ; VELICKOVIE. 2003), neuroprotective (HYUN. 2007). On peut citer également les propriétés anti-tumorales et cytotoxiques des diterpènes (taxol), et des activités anti-oxydantes (HILL. 1993).

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique, soit à chaîne ouverte. Leur formule brute est $(C_5H_x)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs de 1 à 8 sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule $C_5 H_8$ (SEENIVASAN. 2006)

Selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporées dans leur structure, les terpènes sont subdivisés en hémiterpènes ($C_5 H_8$), monoterpènes ($C_{10} H_{16}$), sesquiterpènes ($C_{15} H_{24}$), diterpènes ($C_{20} H_{32}$), Triterpènes ($C_{30} H_{48}$), Tetraterpènes ($C_{40} H_{64}$) et polyterpènes ($(C_5 H_8)_n$) (SCHULZ. 2003).

1.2.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Les polyphénols sont caractérisés par la présence d'au moins un cycle aromatique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (BRUNETON. 1993) (Figure 9). La structure des composés phénoliques naturels varie de molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Plus de 8000 structures phénoliques ont été identifiées (URQUIAGA et LEIGHTON. 2000).

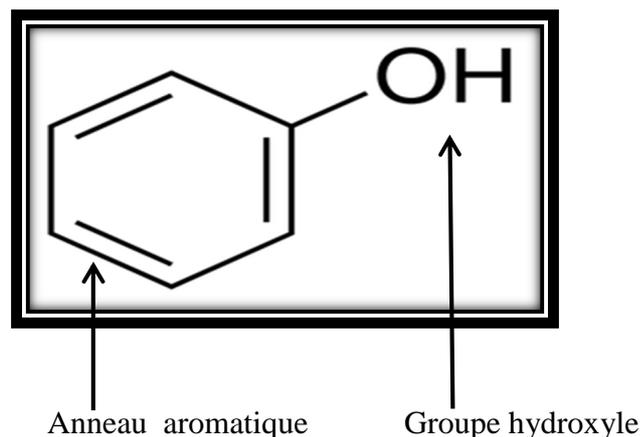
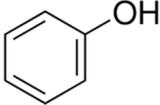
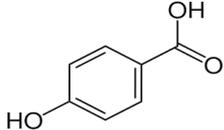
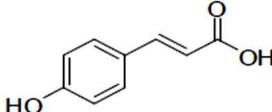
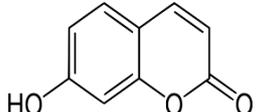
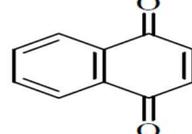
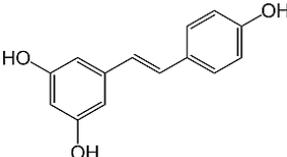
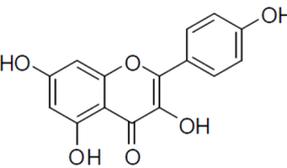
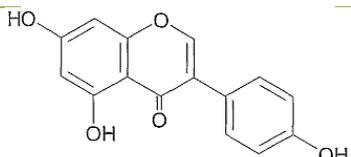
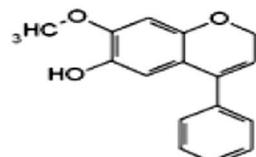
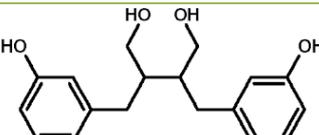


Figure 9 : Structure de Phénol (BRUNETON. 1993 ; MACHEIX *et al.* 2005).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettent de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel. D'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (effet antioxydant, effet anti-tumoral...) (MACHEIX *et al.* 2005).

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau VI) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite, par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc...), enfin, par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc...) (HERBERT.1989 ; MACHEIX *et al.* 2005).

Tableau II : Les principales classes de composés phénoliques (BRUNETON. 1999 ; MACHEIX *et al.* 2005).

Squelette carboné	Classe	Exemple	Squelette
C6	Phénols simples	Hydroquinone	
C6-C1	Acides hydroxy-benzoïques	Acide para-hydroxy-benzoïque	
C6-C3	Acides hydroxy-cinnamiques	Acide p-coumarique	
	Coumarines	Ombelliférone	
C6-C4	Naphtoquinone	Juglon	
C6-C2-C6	Stilbénoides	Trans-resvératrol	
C6-C3-C6	Flavonoïdes <i>lato sensu</i>	Kaempférol	
	Isoflavonoïdes	Daidzéine	
	Anthocyanes	Dalphinol	
(C6-C3) ₂	Lignanes	Entérodiol	
(C6-C3) _n	Lignines	Annexe 2	
(C6-C3-C6) _n	Tanins condensés	Procyanidol	Annexe 3

- Acides hydroxy-benzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Parmi les acides hydroxy-benzoïques les plus abondants on retrouve l'acide benzoïque, l'acide gallique et l'acide p-hydroxy-benzoïque (BRUNETON. 1993).

- Acides hydroxy-cinnamiques

Ils dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques (LAFAY et GIL-IZQUIERDO. 2008). Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent une réactivité chimique importante de ces molécules.

❖ **Coumarines**

Les coumarines dérivent des acides hydroxy-cinnamiques, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- α -pyrone (O'KENNEDY et THORNES. 1997). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres.

❖ **Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes représentent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, dont plusieurs sont responsables de couleur vive des fleurs, des fruits et des feuilles (KIM *et al.* 2004).

Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphenyl propane C6-C3-C6, les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (HELLER. 1993).

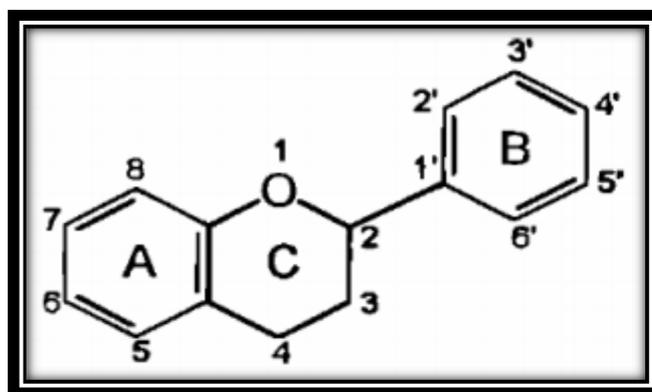


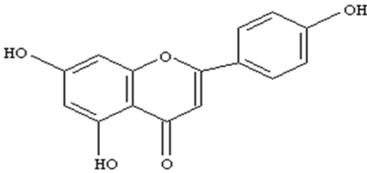
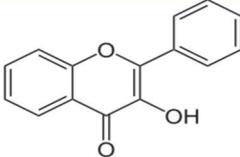
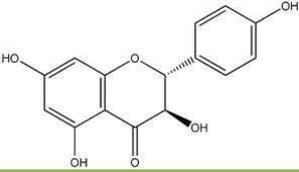
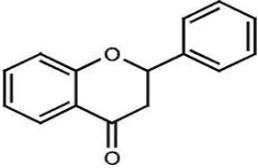
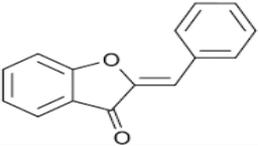
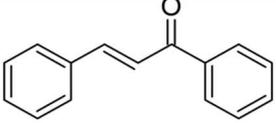
Figure 10 : Structure chimique de base des flavonoïdes (KRISHNA *et al.* 2001).

Néanmoins d'un point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde, aussi bien que du sucre lié. Les classes les plus importants sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones et les anthocyanes (HARBORNE et WILLIAMS. 2000). Ces divers composés se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits.

Les flavonoïdes sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une

multitude d'activités biologiques, notamment des propriétés antioxydants, vasco-protectrices, anti-hépatotoxiques, antiallergiques, anti-inflammatoires, antiulcéreuses et même anti-tumorales significatives (MANTHEY. 2000 ; KIM *et al.* 2004).

Tableau III : Classes des flavonoïdes (BRUNETON. 2009).

Classe	Squelette	Aglycone	Hétérosides	Dérivés méthyloxylé
Flavone		chrysin apigénine rutine luteoline	Apiine	Tangéritine Nobilétine
Flavonol		kaempferol quercétine	Rutine	Pachipodol Rhamnazine
Flavononol		Dihydrokaempferol Dihydroquercétol	Hespéridine Naringine	
Flavanone		Nuringetol Butine Eriodictyol		Hesperétine Homoeriodictyol
Aurone		Hispidol Aureusidine Sulfurétine maritimétine		
Chalcone		Isoliquiritigénine Butéine		Xanthohumol

❖ Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (FRUTOS *et al.* 2004). Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (FRUTOS *et al.* 2004).

Les tanins sont des molécules à activités pharmacologiques remarquable et ont des effets signifiants sur la santé humaine (BRUNETON. 1999). Ils ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénoliques (FRUTOS *et al.* 2004). Elles ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'autres oxydations (CHUNG *et al.* 1998). Selon leur nature chimique, ces composés sont divisés en deux classes, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (FRUTOS *et al.* 2004).

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucose et d'acide gallique (GUIGNARD et DUPONT. 2007). Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de l'acide péllagique (GUIGNARD et DUPONT. 2007).

Les tanins condensés sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol, dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (HARBORNE. 1980 ; AWIKA et ROONEY. 2004). Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux (GUIGNARD et DUPONT. 2000).

1.2.3. Les composés azotiques (alcaloïdes)

C'est des substances organiques d'origine végétale et azotées à caractère alcalin et présentent une structure moléculaire hétérocyclique complexe (BADIAGA. 2011). Les alcaloïdes sont des composés de métabolismes secondaires, il existe environs 12000 répertoriés. Les alcaloïdes constituent un vaste groupe de substances secondaires et paraissent servir comme moyen de dissuasion chimique contre les prédateurs. Ils se caractérisent par un goût assez amer, chimiquement, ils sont constitués de carbone, hydrogène, oxygène et d'azote. Ce sont essentiellement les acides aminés qui donnent naissance aux alcaloïdes (BRUNTEN. 1999).

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans des domaines variés. Les alcaloïdes sont utilisées dans plusieurs médicaments, ils affectent chez l'être humain le système nerveux particulièrement les transmetteurs chimiques tels que l'acétyl-choline, norepinephrine, acide α -aminobutyrique (GABA), dopamine et la sérotonine. D'autres effets pharmacologiques sont attribués également aux alcaloïdes telles que l'effet analgésique, anticholinergique, anti-malaria, anti-hypertensive, stimulant centrale et anti-tumeur (BADIAGA. 2011). Selon le même auteur, les alcaloïdes sont subdivisés en trois classes : les alcaloïdes vrais ; les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes.

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, ils sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde (BADIAGA. 2011).

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (BADIAGA. 2011). Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate (GUIGNARD et DUPONT. 2007).

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont solubles dans l'eau (BADIAGA. 2011).

1.3. Composition chimique et molécules bioactives d'*Urtica dioïca* L.

La composition chimique des différents organes d'ortie dioïque, à savoir les feuilles, les fruits et les racines, a été sujet de nombreuses études depuis la seconde moitié du 19^{ème} siècle. Ces études ont révélé que l'*Urtica dioïca* est riche en plusieurs constituants chimiques qui appartiennent à des classes chimiques différentes telles que les polyphénols, les minéraux et les protéines.

Selon MOTSIE (2008), les constituants responsables des propriétés pharmacologiques de la grande ortie varient selon la nature du sol, l'exposition de la plante et de la saison.

Les constituants chimiques de l'*Urtica dioïca* L. varient d'un organe à un autre. En outre, la grande ortie a la particularité de synthétiser des substances spécifiques au règne animal tel que l'acétylcholine, histamine, sérotonine, et acide formique (MOREL. 2008).

1.3.1. Composition chimique des feuilles

Les feuilles d'*Urtica dioïca* L. sont constituées de flavonoïdes, vitamines (principalement l'acide ascorbique) et d'hydrate de carbone (TOLDY *et al.* 2005).

Selon COUPLAN (2013), les feuilles d'*Urtica dioïca* L. sont riches en protéines, elles constituent 5 à 9 % du poids frais et 40% du poids sec. La composition en acide aminé des feuilles de la grande ortie inclus 13 acides aminés représentés par l'acide aspartique, acide glutamique, phénylalanine, histidine, glycine, valine, leucine, serine, arginine, alanine, tyrosine, thréonine et lysine (YATSUK *et al.* 2004). Les feuilles de la grande ortie sont également riches en minéraux (Tableau II).

Par ailleurs les autres constituants sont présents en faible quantité (Tableau III).

Tableau IV: Eléments minéraux contenus dans les feuilles d'*Urtica dioïca* (TESSIER. 1994).

Eléments	Taux de présence
Azote	3 à 5.5 %
Calcium	0.70 %
Potassium	0.35%
Chlore	0.30 à 1.90 %
Phosphore	0.30 à 0.60%
Soufre	0.25 à 0.70%
Magnésium	0.16%
Sodium	0.025%
Fer	0.015%

Tableau V : Les constituants chimiques des feuilles d'*Urtica dioïca* L.
(BARNES *et al.* 2002 ; GHEDIRA *et al.* 2009).

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
Neuromédiateurs	Acétylcholine, histamine, sérotonine, choline acétyltransférase, leucotriène.
Flavonoïdes	3-glucosides, 3-rutinosides du quercétol, kaempférol, isorhamnétol.
Acides phénoliques	Acide caféique et ses esters (acide caféyl-malique), acide chlorogénique, acide néochlorogénique.
Vitamines et Oligo-éléments	Acide ascorbique (vitamine C), riboflavine B2, tocophérol (vitamine E), vitamine K, pyridoxine B6, acide pantothénique B5, cuivre, zinc, nickel.
Pigments	Chlorophylle (1 à 5%) : 75% α -chlorophylle et 25% β -chlorophylle, carotène : β -carotène et xanthophyles.
Autre	Scopolétol, sitostérol, glycoprotéines, lipides, sucres, acides aminés libres, traces de nicotine, Huile essentielle, Tanins

1.3.2. Composition chimique de la tige

Les flavonoïdes sont la principale classe des polyphénols dans la tige, en effet, ils constituent 54.4 % du total de ces derniers. En termes d'importance, la seconde classe est celle des anthocyanes présente uniquement dans les tiges et ils constituent 28.6% du total des polyphénols de la tige (PINELLI *et al.* 2008).

Tableau VI : Constituants chimiques de la tige d'*Urtica dioïca* (PINELLI *et al.* 2008 ; KOPYTKO *et al.* 2011).

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
Acides phénoliques	Acide chlorogénique Acide 2-O-caféyl-malique Acide p-coumarique
Flavonoïdes	Rutine, Quercétine 3-O-rutinoside Glucoside p-cumaryl Kaempferol 3-O-glucoside Isorhamnetine 3-O-rutinoside

1.3.3. Composition chimique des fruits

Selon WICHTL et ANTON (2003), les fruits murs renferment environ 30% d'huile grasse qui contient des acides gras représentés principalement par l'acide linoléique (74-83%) et 0.1% de δ -tocophérol. Les analyses de la fraction lipidique des graines d'ortie indiquent la présence

d'une forte proportion d'acides gras insaturés, plus spécialement l'acide palmitique, et une faible quantité d'oméga-3 (YENER *et al.* 2008).

Des polysaccharides formant des mucilages et des caroténoïdes sont aussi présents tel que la β -carotène, lutéine et la violaxanthine (WICHTL et ANTON. 2003).

1.3.4. Composition chimique des fleurs

À partir d'extraits méthanoliques de fleurs d'*Urtica dioïca*. CHAURASIA et WICHTL (1987) ont isolés et identifiés sept flavonoïdes :

- Kaempférol-3-O-glucoside ;
- Kaempférol-3-O-rutinoside ;
- Quercétine-3-O-glucoside ;
- Quercétine-3-O-rutinoside ;
- Isorhamnétine-3-O-glucoside ;
- Isorhamnétine-3-O-rutinoside ;
- Isorhamnétine-3-O-néohespéridoside.

De plus, on retrouve le β -sitostérol et β -sitostérol glucoside et scopolétole dans les fleurs, ainsi que dans le reste des autres parties de la plante. Selon AKBAY *et al.* (2003), l'acide chlorogénique et l'acide caféyl-malique sont présents dans les fleurs femelles.

1.3.5. Composition des poils urticants

Selon FLEURENTIN (2008), les poils urticants contiennent de l'histamine, de l'acide formique, de l'acide acétique, de l'acétylcholine, de l'acide butyrique, des leucotriènes, de la 5-hydroxytryptamine (sérotonine).

1.3.6. Composition chimique des racines

Les différentes études ont montré que les racines renferment de nombreuses molécules appartenant à différentes familles chimiques (Tableau V). Les polytostérols, les lignanes, les polysaccharides et la lectine, *Urtica dioïca Agglutinine (UDA)*, sont considérés comme le principe actif des racines (CHRUBASIK *et al.* 2007).

La lectine *UDA* est présente uniquement dans les racines. C'est une petite protéine monomérique, de faible poids moléculaire (8,5kDa), composée d'une simple chaîne polypeptidique de 89 acides aminés avec une grande proportion de glycine, cystéine et tryptophane. L'*UDA* est capable d'agglutiner les érythrocytes, quelque que soit leur groupe sanguin, et elle est inhibée par les groupements N-acétyl-glucosamine (WICHTL et ANTON. 2003).

Tableau V : Constituants chimiques des racines d'*Urtica dioïca* (GHEDIRA *et al.* 2009).

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques
Stérols	3- β -sitostérols, campestérol, daucostérol, sitostérol-3- β -D-glucoside, stigmast-4-ène-3-one, stigmastérol, 24-R-ethyl-5a-cholestan-3 β ,6a-diol
Lignanes	(+)-néoolivil, (-)-sécoisolaricirésinol, déhydrodiconiferyl alcool, isolariciré sinol, pinorésinol, 3,4divanillyltétrahydrofurane
Lectines <i>UDA</i>	Chaîne polypeptidique unique sans polysaccharides
Flavonoïdes	Rutine, quercétine, p-hydroxylbenzalcool
Acides phénoliques	Acide trans-férulique (monomérique), acide ursolique, acide érucique aotriacotane (alcane)
Coumarines	Scopolétole
Triterpènes	Acide oléanolique
Céramides et acides gras	Acide α -dimerphecologique Acide (10E, 12Z)-9-hydroxy-10,-12- octadécadiénoïque, acide linoléique
Polysaccharides	Glycanes, glucogalacturonanes, acide arabinogalactane
Autres	Dérivés phénylpropaniques (alcool homovanillique et son glucoside), diols monoterpéniques et leurs glucosides, p-hydroxybenzaldéhyde, tanins

1.4. Activités biologiques d'*Urtica dioïca*

L'ortie dioïque fut très largement étudiée pour ces propriétés médicinales. Nos ancêtres consommaient déjà l'ortie piquantes. Durant l'antiquité, DISCORDE fut l'un des premiers à parler des nombreux bienfaits (aphrodisiaques, diurétiques, laxatives, emménagogues, les cataplasmes des feuilles écrasés contre les plaies gangreneuses, les ulcères et les suppurations), ces derniers furent confirmés par Galien 100 ans plus tard (BERTRAND. 2010).

Au 16^{ème} siècle, l'utilisation de la grande ortie se diversifie à des fins industrielles : fabrication de papiers, des vêtements, créations de cordes, de filet de pêches. (MOUTSIE. 2002).

Au 19^{ème} siècle, l'ortie piquante sera massivement cultivée, dans un but alimentaire (sous forme de soupes, thés, salades), industriel (utilisé pour l'extraction de la chlorophylle qui est employé comme un colorant alimentaire, des arômes utilisés pour les dentifrices), cosmétiques (sous forme de champoing car on lui attribue la capacité de stimuler la croissance des cheveux) et agricole. C'est à cette période que plusieurs études scientifiques ont vu le jour pour déterminer les bienfaits de l'ortie dioïque, en particulier avec le purin d'ortie, dont les premières études furent menées par les suédois en 1980. Actuellement, l'ortie dioïque est toujours utilisée comme un engrais puissant. Il est également à noter que c'est à cette période que l'*Urtica dioïca* a été mentionné dans la lutte contre le cancer (KAVALILI. 2003 ; BINNS. 2006 ; BERTRAND. 2010 ; TISSIER. 2011).

Au 20^{ème} siècle, WASISCKY confirme l'action de la grande ortie dans le traitement du diabète (LARBET. 2011). En 1934, CREMER démontre ses propriétés antianémiques et reconstituent en mettant en évidence la prolifération des globules sanguins induite par cette dernière. De même, LECLEC s'intéressa aux vertus hémostatiques de l'ortie dioïque (FLEURENTIN. 2008). Au début des années 1980 on utilisait les racines de la grande ortie dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate.

1.4.1 Activités biologiques des parties aériennes d'*Urtica dioïca*

De nombreuses études ont été réalisées pour analyser les différentes propriétés des feuilles d'*Urtica dioïca*. Elles ont mis en évidence que ces feuilles possèdent un grand nombre de propriétés pharmacologiques.

1.4.1.1. Activité anti-inflammatoire

L'étude de l'extrait hydroalcoolique de feuilles d'*Urtica dioïca* a démontré une réduction dose-dépendante de la sécrétion de cytokines à activité anti-inflammatoire. Sur le plan pharmacologique, *in vitro*, les dérivés de l'acide caféique et les extraits hydroalcooliques de la grande ortie inhibent la biosynthèse des enzymes de la cascade arachidonique, des métabolites de leucotriènes et des prostaglandines impliqués dans le processus inflammatoire (WICHTL et ANTON. 2003 ; FLEURENTIN. 2008).

OBERTREIS *et al.* (1996) a montré que l'extrait éthanolique de feuilles d'*Urtica dioïca* inhibent, *in vitro*, les enzymes cyclo-oxygénases COX1 et COX2 qui se trouvent en amont dans la voie de l'inflammation et bloque ainsi la formation de prostaglandines pro-inflammatoires.

Selon ROMBI et ROBERT (2006), l'extrait éthanolique de feuilles d'ortie dioïque réduisait d'une façon significative les concentrations du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et de l'interleukine 1 (IL-1), deux cytokines pro-inflammatoires dont la sécrétion dans le sang est stimulée par des lipopolysaccharides. Cette expérience fut réalisée sur du sang humain

provenant de volontaires sains. Après 24 heures, la concentration du TNF- α avait diminué de 51 % et celle de l'IL-1 de 99,7 %, la concentration de l'extrait testé est de 5mg/ml.

Dans plusieurs maladies inflammatoires, la transcription du facteur nucléaire kappa B (NF- kappa-B) est élevée et serait responsable de l'expression augmentée de certains gènes pro-inflammatoires. RHIEHEMANN (1999) a montré, *in vitro*, qu'un extrait aqueux de feuilles d'*Urtica dioïca* inhibe fortement l'activation du NF-kappa-B (protéine de la famille des facteurs de transcription qui est impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire dans plusieurs types de cellules, dont des lymphocytes T humains et des macrophages). L'inhibition de l'activité du facteur de transcription NF-Kappa-B participe à cet effet anti-inflammatoire. Cette activation ne peut pas avoir lieu car la dégradation de son inhibiteur, la sous-unité IKappa-B α , est empêchée par les composés de l'extrait aqueux d'ortie dioïque (ces composées n'ont pas été identifiées). Ainsi, l'inhibiteur ne peut pas être dégradé, il continue d'exercer son action inhibitrice sur le NF-Kappa-B. Ce dernier étant inhibé ne peut pas introduire l'expression des gènes inflammatoires.

DAR *et al.* (2013) et YANG *et al.* (2013) ont conclu que les résultats obtenus par les extraits d'*Urtica dioïca* sur les maladies inflammatoires et notamment la polyarthrite rhumatoïde serait due à la fois à l'acide caféique, aux flavonoïdes, aux polyphénols et à la forte teneur en silicium.

1.4.1.2. Activité analgésique et anti-arthrosique

Une étude a été réalisée sur des souris pour évaluer l'activité analgésique d'un extrait aqueux de feuilles d'ortie dioïque. Après administration d'un extrait à la dose de 1200 mg/kg, les souris montrèrent une plus grande résistance à une stimulation thermique dans le test de la plaque chauffante à 55°C, en prenant 190 % plus de temps à réagir par rapport aux animaux de contrôle. Le mécanisme de l'action analgésique est lié à l'effet de l'extrait de feuilles d'*Urtica dioïca* sur la cascade arachidonique mais des études sont encore nécessaires afin de pouvoir clairement l'identifier.

Une étude réalisée par RAMN et HANSEN (1995) sur des patients souffrant des douleurs rhumatismales auxquels ont été administrées des doses quotidiennes de 1.54g d'extrait sec de feuilles d'*Urtica dioïca* pendant 3 semaines. A l'issue de ce traitement il a été observé une amélioration subjective de la symptomatologie rhumatismale chez 70% des sujets.

1.4.1.3. Activité antiallergique

L'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioïca* a montré, *in vitro*, l'inhibition de plusieurs événements inflammatoires clés responsables des allergies saisonnières. Parmi ces mécanismes on peut citer une action antagoniste *vis-à-vis* du récepteur H1 de l'histamine ainsi qu'une inhibition de la tryptase des mastocytes responsables de la dégranulation et de la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires responsables des symptômes du rhume des foins (éternuements, larmolement, congestion nasale). L'extrait aqueux de la grande ortie inhibe également l'enzyme Hématopoïétique prostaglandin D2 synthase (HPGDS) qui est une enzyme importante de la voie inflammatoire puisqu'elle permet la synthèse de la prostaglandine D2 qui est déterminante dans les maladies allergiques (ROSCHEK *et al.* 2007).

1.4.1.4. Activité diurétique

Le mécanisme de l'effet diurétique d'*Urtica dioïca* n'a pas été expliqué. Néanmoins, Il a été démontré que les parties aériennes d'*Urtica dioïca* développent une action favorable sur la diurèse, accompagnée par une forte élimination de chlorures et d'urée.

TAHRI *et al.* (2000) ont réalisé une étude sur des rats anesthésiés Wistar qui ont reçu une perfusion intraveineuse continue pendant 1,25 heures d'un extrait aqueux des parties aériennes d'*Urtica dioïca* à une faible dose de 4 mg/kg/h, ou à une dose élevée de 24 mg/kg/h. Les résultats obtenus ont montré que la pression artérielle sanguine est réduite proportionnellement à la dose de perfusion de l'extrait d'*Urtica dioïca* (respectivement 15 et 38 %). Ces effets ont été accompagnés par une augmentation corrélée de la diurèse (respectivement 11 et 84 %) et de la natriurèse (la concentration en sodium (Na) des urines pour une diurèse donnée) (respectivement 28 et 143 %).

La grande ortie est utilisée en thérapeutique complémentaire dans les troubles de la miction (WICHTL et ANTON. 2003).

1.4.1.5. Effet cardiovasculaire et hypotensif

Une étude a été réalisée sur le cœur et l'aorte de rat avec l'extrait aqueux des feuilles d'ortie dioïque. L'effet cardiovasculaire (prévention de la thrombose artérielle) dû à l'action inhibitrice de l'agrégation plaquettaire, a été essentiellement attribué aux flavonoïdes présents dans les feuilles d'*Urtica dioïca*. Les flavonoïdes ont également inhibés l'agrégation plaquettaire induite par l'adénosine di-phosphate (ADP) et le collagène (ROMBI et ROBERT. 2006).

Selon ces deux auteurs, l'extrait d'*Urtica dioïca* exerce une action vasodilatatrice par la libération de NO endothélial, l'ouverture des canaux potassiques et une action inotrope négative, produisant un effet hypotensif temporaire.

1.4.1.6. Action antiulcéreuse

Les extraits aqueux d'ortie dioïque ont eu une activité antiulcéreuse efficace contre un ulcère induit par l'éthanol et une activité analgésique efficiente contre une dilatation gastrique générée par l'acide acétique, par conséquent, ils peuvent être utilisés dans les thérapies contre les ulcères et les lésions de la muqueuse gastrique (GÜLÇIN *et al.* 2003).

1.4.1.7. Action sur le profil lipidique

DAHER *et al.* (2006) ont mené une étude sur les rats et ont démontrés les propriétés hypolipidémiantes et hypocholestérolémiantes de l'extrait aqueux de feuilles d'*Urtica dioïca*. Ces derniers ont reçu pendant 30 jours un extrait aqueux de l'ortie dioïque et ont reçu un régime alimentaire normal ou enrichi en graisse afin d'étudier leur profil lipidique sanguin. Il a ainsi été observé une diminution significative des taux de LDL Cholestérol, Cholestérol total, ainsi qu'une diminution du ratio cholestérol LDL/HDL. L'évaluation de l'activité des transaminases (ALAT et ASAT) et de la Lactate Déshydrogénase (LDH) a montré qu'aucun dommage au foie ne s'est produit durant l'étude.

1.4.1.8. Activité antiasthénique

Une étude multicentrique portant sur des sujets présentant un état asthénique a montré une réduction progressive et constante de tous les symptômes de l'asthénie chez l'être humain.

L'efficacité de l'extrait aqueux de feuilles d'*Urtica dioïca* testé a été jugée bonne, voire excellente pour 79 % des sujets, avec 93 % de bonne tolérance à l'extrait (TESSIER. 1994).

Selon DAHOUT et WUYTS (1991), l'ortie dioïque détiendrait ses propriétés antiasthéniques de ses vitamines A, B2, B5, C, E, K, ses minéraux (magnésium, soufre,...), ses acides aminés essentiels et ses principes antianémiques fer, acide folique et chlorophylle.

1.4.1.9. Activité antioxydant

Les qualités antioxydants d'*Urtica dioïca* ont pu être mises en évidence. Ce pouvoir se révèle efficace *vis-à-vis* de différents systèmes oxydatifs *in vitro* (CETINUS *et al.* 2003). Les composants phénoliques apparaissent comme responsables de l'activité antioxydant des extraits d'ortie dioïque. Les divers mécanismes antioxydants de ces extraits peuvent être attribués à leur forte capacité à donner de l'hydrogène, à leur capacité à chélater les métaux et leur forte efficacité à piéger le peroxyde d'hydrogène et les radicaux libres (GÜLÇIN *et al.* 2003 ; TOLDY. 2005).

Il a été démontré qu'un régime complémentaire à base d'ortie dioïque chez des rats soumis à une activité physique telle que la nage permettait de protéger leurs cerveaux en diminuant les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène et en augmentant l'activité de liaison de l'ADN par NF-Kappa B (TOLDY *et al.* 2005 ; GHADIRA *et al.* 2009).

1.4.1.10. Activité antimicrobienne

Des études ont montré les propriétés antimicrobiennes des feuilles d'*Urtica dioïca*. Les constituants chimiques tels que les flavonoïdes, alcaloïdes et terpènes sont actifs contre une large gamme de bactéries, levures et champignons (DAR *et al.* 2013; SALEHZADEH *et al.* 2014). Selon GÜLÇIN *et al.* (2003), l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioïca* est actif contre *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* et *Escherichia coli*.

1.4.1.11. Action eupeptique

L'ortie dioïque est largement astringente par la présence des tanins. En conséquence, la grande ortie améliore l'absorption intestinale, permettant ainsi de lutter contre la fatigue chronique. Elle peut être utilisée comme anti-diarrhéique, son action au niveau digestif est encore mal connue.

L'ortie dioïque joue un rôle important dans la prévention de maladies chroniques du colon, elle est utilisée comme complément des traitements classiques (KONRAD *et al.* 2005 ; BAGHAEI *et al.* 2010).

1.4.1.12. Activité anti-hyperglycémiant

Selon BNOUHAM *et al.* (2003), l'extrait aqueux d'ortie dioïque ne possède pas d'activité hypoglycémiant, mais qu'il a plutôt un effet anti-hyperglycémiant. En effet, il va diminuer l'absorption du glucose au niveau intestinal. L'absence d'effet hypoglycémiant de l'extrait dans un diabète induite par alloxane chez un rat qui est un modèle de diabète avec hypo-insulinémie démontre que cet extrait peut agir sur l'homéostasie du glucose de façon extra-pancréatique, ce qui indique que la présence d'insuline est nécessaire pour permettre l'activité hypoglycémiant de l'ortie dioïque. Cette étude a démontré que l'ortie dioïque inhibe de façon significative l'absorption de glucose dans l'intestin grêle chez le rat anesthésié.

1.4.1.13. Activité immun-modulatrice

AKBAY *et al.* (2003) ont réalisée, *in vitro*, une étude qui a mis en évidence l'activité immuno-modulatrice de la fraction flavonoïque totale des parties aériennes de l'ortie dioïque (notamment du rutinoside de quercétine, du rutinoside de kaempferol et de l'isorhamnetine-3-O-glucoside). Ces flavonoïdes agissent en stimulant la prolifération des lymphocytes et en inhibant la production de NO, ce qui est l'origine des effets anti-inflammatoire et immunostimulantes d'ortie dioïque (HARPUT *et al.* 2005 ; ROMBI et ROBERT. 2006).

KAVALALI (2003) a démontré que l'extrait aqueux d'*Urtica dioïca* possède une activité sur les cellules leucémiques de la souris, et que ce même extrait a également montré une grande activité dans une culture de myélomes (tumeurs malignes de la moelle osseuse).

1.4.2. Activités biologiques des racines d'*Urtica dioïca*

1.4.2.1. Activité anti-tumorale

KONRAD *et al.* (2005) ont mené une étude sur l'effet antiprolifératif d'un extrait méthanolique des racines d'ortie dioïque sur des cellules humaines cancéreuses de la prostate. Un effet antiprolifératif de l'extrait a ainsi été observé sur des cellules épithéliales prostatiques (LNCAP) durant 7 jours, alors que la croissance des cellules stroma est restée inchangée. L'inhibition était temps-dépendante avec un maximum de réduction de la croissance (30%). Aucun effet cytotoxique de l'extrait n'a été observé au cours de l'étude.

1.4.2.2. Activité Antifongique

Des études ont démontré que l'*UDA* possédait une activité antifongique et qu'elle agit en synergie avec la chitinase et inhibe la croissance fongique. La croissance de plusieurs champignons pathogènes et saprophytes (*Botrytis cinerea*, *Collectotrichum lindemuthanium*, *Phoma betae*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Septoria nodorum*, *Trichoderma hamatum*) a été inhibée *in vitro* par un extrait de racines d'ortie dioïque (HADIZADEH *et al.* 2009).

1.4.2.3. Activité antivirale

Les lectines végétales sont supposées conférer un effet antiviral en interférant avec la fusion du virion à la membrane cellulaire cible. Ainsi, il a été démontré, *in vitro*, que l'*UDA* inhibe l'effet cytopathogène induit par le VIH de type 1 et 2, le cytomégalovirus, le virus respiratoire syncytial et le virus influenza A. L'*UDA* lié à la N-acétylglucosamine est avérée être un potentiel inhibiteur de la formation d'un syncytium (jonction) persistant entre le VIH-1 et VIH-2 et les cellules CD4+ et abroge efficacement la capture et la transmission du VIH par les lymphocytes T (ROMBI et ROBERT. 2006).

1.4.2.4. Action sur l'hypertrophie bénigne de la prostate

De nombreuses études ont démontré l'intérêt de la racine d'ortie dioïque dans le traitement des symptômes de l'hypertrophie bénigne de la prostate. L'ortie dioïque se montre efficace grâce à ses propriétés antiprolifératives, qui se caractérisent entre autre par une inhibition des facteurs de la croissance, ainsi qu'une inhibition de l'enzyme aromatasase et une interaction avec sex hormon binding globulin (SHBG) ou protéine de transport des hormones sexuelles.

L'aromatasase est une enzyme clé du métabolisme des stéroïdes, elle intervient dans la conversion de la testostérone en œstrogènes. Avec l'âge, le rapport androgènes/œstrogènes dans le sang et la prostate tend en faveur des œstrogènes. Donc, l'inhibition de l'aromatasase conduit à une diminution des taux d'œstrogènes, et donc pourrait influencer sur la taille de la prostate. En 1995, GANBER et SPITELLER ont étudié les extraits méthanoliques de racines d'ortie dioïque

pour leur effet inhibiteur, *in vitro*, sur l'aromatase. L'inhibition de l'enzyme était détectée seulement après séparation par chromatographie. Les effets inhibiteurs sur l'aromatase ont pu être démontrés pour une variété de composés appartenant à différentes classes. Ces composés sont les suivants: le secoisolariciresinol, l'acide oléanique, l'acide ursolique, l'acide (9Z, 11E)-13-hydroxy-9, 11-octadécadiénoïque et le 14-octacosanol.

La SHBG est une protéine plasmatique qui se lie aux hormones sexuelles (œstrogènes et androgènes) et régule ainsi leur fraction libre plasmatique. Elle possède aussi des sites de liaison pour les récepteurs membranaires situés dans le tissu prostatique et l'endomètre. En 1983, SCHMIDT et ses collaborateurs ont montré que l'extrait éthanolique de racine d'ortie inhibe de façon compétitive la liaison de dihydrotestostérone aux SHBG. Les constituants de l'extrait responsables de cet effet ont été identifiés, ce sont des molécules appartenant à la famille des lignanes dont le sécoisolaricirésinol et le néoolivil. Deux molécules obtenues après transformation du sécoisolaricirésinol par la flore bactérienne intestinale, à savoir l'entérodiol et l'entérolactone, montrent finalement une efficacité plus importante que le constituant dont elles dérivent (DIEDERICHS. 2005).

Certaines études réalisées chez l'animal indiquent que des préparations à base des racines d'ortie dioïque peuvent inhiber l'augmentation de taille de la prostate. Les composés responsables de l'effet n'ont pas encore été clairement identifiés. Au niveau cellulaire, les extraits d'*Urtica dioïca* semblent inhiber la prolifération et le métabolisme cellulaire, et cela se reflète sur le plan histologique par l'augmentation du volume des noyaux cellulaires. Dans l'ensemble, les données ne sont pas encore concluantes et le mécanisme de l'effet n'est pas claire (CHRUBASIK *et al.* 2007).

1.5. Les champignons endophytes

Les champignons sont des êtres eucaryotes, hétérotrophes, unicellulaires ou filamenteux, sans organisation tissulaire (LUTZONI *et al.* 2004).

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction, ils se reproduisent soit sexuellement, soit de façon asexuée par un grand nombre de spores, ce qui représente le principal critère de leur classification (TABUC. 2007).

1.5.1. Généralités sur les champignons endophytes

Les champignons endophytes sont des microorganismes qui colonisent les tissus végétaux sains. Ils exhibent généralement et typiquement une vie discrète le plus souvent entière et quelques fois partielle avec la plante hôte par le biais d'une relation symbiotique, plusieurs espèces fongique endophytes colonisent les plantes (LI *et al.* 2010 ; KUMAR et HYDE. 2004).

Les endophytes peuvent également protéger la plante contre de nombreuses menaces biotiques et abiotiques (AZEVEDO *et al.* 2000). Ils colonisent les espaces intercellulaires ainsi que l'intérieur des cellules du xylème et le phloème (SIEBER. 2002).

Il est de plus en plus d'efforts pour caractériser et identifier les champignons endophytes isolés à partir de plantes médicinales. De nombreuses études ont montré que certaines propriétés médicinales des plantes peuvent être liées à des champignons endophytes hébergés par ces plantes (AZEVEDO *et al.* 2000).

1.5.2. Diversité des champignons endophytes

La diversité des champignons endophytes est élevée, avec de nouvelles espèces de champignons encore non décrites (ALBRECHTSEN *et al.* 2010). Les champignons sont associés à des végétaux depuis plus de 400 millions d'années (KRINGS *et al.* 2007). La spécificité des champignons endophytes à l'égard de la plante-hôte est déterminée par plusieurs facteurs tel que les régulateurs de nature chimique, le génotype de l'hôte, la période de l'année et des facteurs physico-chimiques environnants (TOTI *et al.* 1992).

• Répartition et abondance au sein des phytotaxons

La colonisation des membres du règne des Planta par les champignons endophytes est ubiquiste. Ces organismes furent découverts pour la première fois chez les graminées fourragères par DE BARY en 1866. Des lors, ce groupe fongique fut caractérisé chez une large gamme de phytotaxons, non seulement chez les angiospermes, dans lesquels sont rangés la majorité des espèces, mais également chez les mousses (JAKUCS *et al.* 200), les fougères (SUN *et al.* 2011), les plantes arbustives (BARROW *et al.* 2004), les plantes à feuilles caduques, des conifères (DECKERT. 2000), et les lichens (SUN *et al.* 2011).

Les communautés d'endophytes peuvent varier spatialement dans de nombreux types de plantes (KUMAR et HYDE. 2004). Chaque plante des quelques 270.000 espèces de plantes existantes sur terre est l'hôte d'un ou plusieurs endophytes (HYDE et SOYTONG. 2008).

• Diversités des champignons endophytes aux seins de feuilles

Les champignons endophytes semblent être très diversifiés dans un large éventail d'Angiospermes tropicales (ARNOLD *et al.* 2001). Toutes les feuilles de ces espèces contiennent des champignons endophytes (PETRINI *et al.* 1982). Ils sont cosmopolites, c'est le type de colonisation prédominant de ce groupe. Les genres *Neotyphodium*, *Epichloë*,

Lophodermium, *Phialophora* et *Rhizoctonia* sont cités à titre d'exemples (STONE *et al.* 2004).

Par ailleurs, dans les feuilles, il peut y avoir des variations des champignons endophytes entre le pétiole, le limbe et la nervure médiane (SCHULZ. 1993), mais aussi entre les types de cellules (PETRINI. 1992 ; TOOFANEE et DULYMAMODE. 2002).

Les endophytes sont plus fréquents dans les nervures et les pétioles que dans les tissus internervaires. Les endophytes du limbe de la feuille de *Licula Ramsayi* ont tendance à se concentrer dans la nervure de la feuille (TOOFANEE et DULYMAMODE. 2002).

1.5.3. Transmission des Endophytes

Les endophytes possèdent deux modes de reproduction. Le premier se fait par la croissance végétative des hyphes qui est complètement interne (transmission verticale) (SELOSSE et SCHARDL. 2007). Le second se fait via les spores (transmission horizontale) (CLAY et HOLAH. 1999).

- **Transmission verticale** (passage direct des plantes "parents" aux propagules).

Les champignons endophytes se transmettent à partir de la plante-hôte vers la descendance. Les semences du végétal portent elles-mêmes leur propre inoculum d'endophytes. La transmission est effectuée généralement via les formes végétatives du champignon (hyphes). Ce mode de transmission est qualifié aussi de reproduction asexuée, connu notamment chez les Graminées (FAETH. 2002).

- **Transmission horizontale**

Elle s'effectue entre les plantes de la même espèce ou d'espèces différentes via les spores. Ces spores sont déposées sur les différentes parties du végétal, en particulier les feuilles. Sur le cacaoyer (*Theobroma cacao*), on estime à plus de 10.000 nombre moyen de spores déposées quotidiennement sur une feuille bien développée (ARNOLD *et al.* 2001 ; LUIS. 2008).

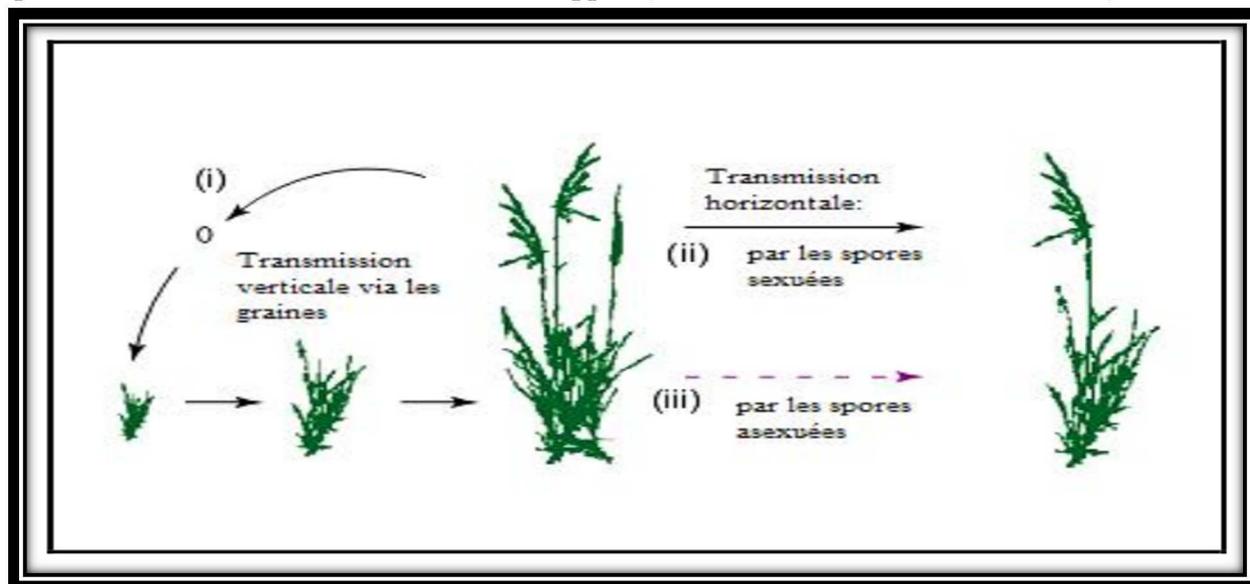


Figure 11 : Cycle de vie et mode de transmission (verticale et horizontale) du champignon endophyte *Neotyphodium* sur son hôte *Festuca arundinaceae* (SAIKKONEN *et al.* 2004).

1.5.4. Rôles de mycoendophytes

L'ubiquité et l'hyper diversité des mycoendophytes supposent que ces derniers peuvent jouer des rôles extrêmement importants dans le fonctionnement des écosystèmes, ainsi il est probable que leurs actions au sein d'un biotope donné sont multiples (CLAY et HOLAH. 1999).

Les endophytes vivant asymptomatique dans les tissus végétaux ont été trouvés dans presque toutes les plantes étudiées (SCHULZ *et al.* 1993). Ils jouent un rôle important dans les activités physiologiques des plantes hôtes qui influent sur la mise en valeur du stress, les insectes, les nématodes et la résistance aux maladies (CARROLL. 1986). Ils constituent une source précieuse de métabolites secondaires bioactifs (LI *et al.* 2000 ; STROBEL. 2002) et seraient une source de nouveaux médicaments d'importance biotechnologique et des programmes de gestion des maladies des plantes (AZEVEDO *et al.* 2000).

En contrepartie de la nutrition offerte par la plante-hôte, les champignons endophytes confèrent à cette dernière la capacité de maintenir et d'améliorer ses performances biotiques, même sous des conditions écologiques sévères, par la protection contre beaucoup de ravageurs et d'agents phytopathogènes et même contre des facteurs de stress abiotiques (stress hydrique, salin, radiatif, pollution,...) (CARROLL. 1986 ; RODRIGUEZ *et al.* 2004).

❖ La croissance

Plusieurs études suggèrent que les plantes cultivées avec certains champignons endophytes produisent une grande biomasse, et ont une résistance accrue aux agents pathogènes (STOVAL et CLAY. 1988 ; CLAY *et al.* 1989). Dans ce contexte de bio-protection, il a été constaté que les plantes colonisées par ce groupe fongique se développent mieux, ceci est dû en partie à la synthèse de certains types de régulateurs de croissance qui sont des molécules essentielles pour la croissance, le développement et la défense des plantes tels que l'acide 3-indolacétique, cytokinines, et les gibbérellines qui sont impliquées dans une multitude de procédés de développement chez la plante, tels que la croissance cellulaire, dominance apicale, initiation des racines adventives et latérales, différenciation cellulaire vasculaire, développement des étamines et résistance aux stress biotiques et abiotiques (TAN et ZOU. 2001).

❖ Ecologie et agriculture

Les champignons endophytes jouent un rôle déterminant en matière d'assimilation des éléments minéraux (N et P notamment), et ils ont des capacités de fixation d'azote des plantes hôtes (MALINOWSKI et BELESKY. 2000). Ils participent au maintien de l'équilibre écologique en libérant dans l'environnement, à partir de la matière qu'ils décomposent, du carbone et des sels minéraux (RODRIGUEZ *et al.* 2004).

Les arbres peuvent également bénéficier de la présence d'endophytes, car ces derniers limitent la croissance et la survie des insectes herbivores (FAETH et HAMMON. 1997), ou augmentent la résistance pathogène à l'hôte (MITTERMEIER *et al.* 1999).

❖ Production de métabolites secondaire

Les mycoendophytes sont considérés comme un important réservoir de nouveaux métabolites secondaires bioactifs (TAN et ZOU. 2001). Produisant le plus grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres catégories de microorganismes (ZHANG *et al.* 2006), ainsi qu'une grande diversité structurale comprenant des alcaloïdes, stéroïdes, peptide, terpenoïdes, isocoumarine, quinone, phénylpanoïdes, lignanes, phénols, acide phénoliques, composés aliphatiques, lactones et autres (SURYANARAYANAN *et al.* 2002). Ces substances naturelles produites par les champignons endophytes possèdent un large spectre d'activité

biologique (ZHANG *et al.* 2006), comprenant des composés antibiotiques, antifongiques, antiviraux, immunosuppresseurs, agents anticancéreux, antioxydants, insecticides et autres substances bioactives (STROBEL *et al.* 2004 ; STROBEL et DAISY. 2003).

Tableau VIII : Liste de quelques mycoendophytes producteurs de métabolites secondaires dans leur plante hôte (SACHIN *et al.* 2013).

<i>Champignons endophytes</i>	<i>Plantes hôtes</i>	<i>Métabolites</i>
<i>Taxomyces andreanae</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	taxol
<i>Enterophospora infrequens</i>	<i>Nothapodytes foetida</i>	campotothecin
<i>Fusarium solani</i>	<i>Apodytes dimidiata</i>	campotothecin
<i>Altenaria sp</i>	<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>	Pedophyllotoxin
<i>Fusarium sp</i>	<i>Sabina recurva</i>	Pedophyllotoxin
<i>Altenaria sp</i>	<i>Catharonthus roseus</i>	Vinblastine
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Catharonthus roseus</i>	Vincristine
<i>Chaetium oxysporium</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericine
<i>Cephalosporiem sp</i>	<i>Paripolyphylla var.yunnansis</i>	Diosgenin
<i>Acremonium sp</i>	<i>Hyperzia serrata</i>	Hyperzine A
<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Dysoxylum binecatariferum</i>	Rohitukine
<i>Eupenicillin parvun</i>	<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtin

2. Partie expérimentale

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel

2.1.1.1. Matériel végétal

Les feuilles d'*Urtica dioïca* ont été récoltées en mois de Janvier 2016, dans la région de Larbaâ Nath Irathen (figure 12), située à 30 km à l'est de Tizi-Ouzou par M^{me} SALMI D., maitre-assistant B à l'université Mouloud MAMMARI. Ces feuilles ont été identifiées par M^{me} SMAIL-SAADOUN N., Professeur à l'université Mouloud MAMMARI. Ensuite, ces feuilles ont été nettoyées, séchées et broyées. La poudre obtenue a été stocké à l'abri de la lumière.

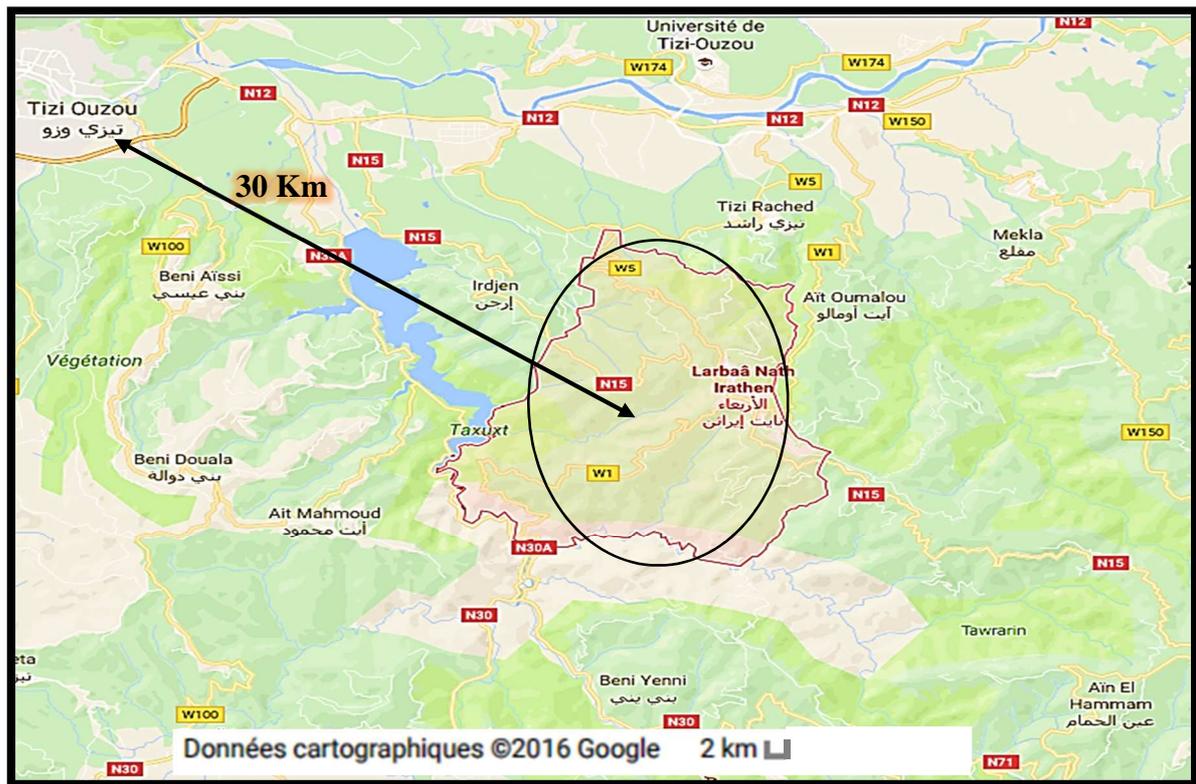


Figure 12 : Carte géographique de lieu de la récolte Larbaâ Nath Irathen.

2.1.1.2. Microorganismes

❖ *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1µm. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ces bactéries sont immobiles, asporulées, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré d'où leurs nomination les staphylocoques dorés (PATRICK *et al.* 1988). *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. Elle est responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, d'infections potentiellement mortelles. *S. aureus* est aussi responsable de méningite et d'ostéomyélite (STEVEN *et al.* 2004).

Le support bactérien est constitué par neuf souches de *Staphylococcus aureus*, dont, une souche de référence Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Et trois souches Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) de référence :

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ;
- *Staphylococcus aureus* LGA251 ;
- *Staphylococcus aureus* MU50.

Et cinq souches multi-résistantes isolées à partir de l'ben et du lait cru de vache, identifiées et aimablement fournies par M^r TITOUCHE Y., maitre-assistant A à l'université Mouloud MAMMERI. Ces souches sont des MRSA et résistent face aux antibiotiques suivant : pénicilline ; ampicilline ; oxacilline, céfoxitine ; augmentin ; acide nalidixique ; tétracyclines ; ofloxacine ; norfloxacine.

- *Staphylococcus aureus* S84 isolé à partir du lait cru ;
- *Staphylococcus aureus* S95 isolés à partir du l'ben ;
- *Staphylococcus aureus* S96 isolés à partir du l'ben ;
- *Staphylococcus aureus* S100 isolé à partir du lait cru ;
- *Staphylococcus aureus* S101 isolé à partir du lait cru.

❖ **Champignons endophytes**

Les mycoendophytes isolés à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* par M^{me} SALMI D.

2.1.1.3 Appareillages

- Étuve à 37°C (memmert) ;
- Balance (Denver instrument) ;
- Balance de précision (Kern EW) ;
- Bain-marie (memmert) ;
- Vortex (Heidolph BIOBLOCK SCIENTIFIC) ;
- Agitateur magnétique (VariMAG electronicrührer) ;
- Rotavapeur (Stuart) ;
- Lyophilisateur à plaque (BETA, Allemagne) ;
- Spectrophotomètre UV-Visible (Medline) ;
- Centrifugeuse (SIGma 4-16 k) ;
- Autoclave (Pb international) ;
- Plaque chauffante (SANOclav) ;
- PH mètre (Hanna instruments) ;
- Microscope optique (hund WETZLAR).

2.1.1.4. Solvants organiques

Chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol.

2.1.1.5. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées, et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de culture suivants :

- Mueller Hinton (MH) ;
- Mueller Hinton bouillon (MH b) ;
- Brain Heart Infusion (BHI) ;
- Brain Heart Infusion bouillon (BHI b) ;
- Potato Dextrose Agar (PDA).

2.1.1.6. Réactifs et produits chimiques

Le 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) ; hydroxytoluene butylé (BHT) ; vitamine C ; quercitine ; chlorure de fer (FeCl₃) ; acide trichloroacétique (TCA) ; Ferrocyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ ; Tampon phosphate (PBS) : [phosphate de potassium monobasique (KH₂PO₄) + le phosphate de sodium dibasique (Na₂HPO₄)].

✓ **Autre** : chloramphénicol ; eau distillée ; le diméthyle sulfoxyde (DMSO) ; Eau physiologique.

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Préparation des extraits végétaux

Les différents types d'extrait ont été préparés à partir de la poudre des feuilles d'*Urtica dioïca*.

✓ **Extraits aqueux**

Les extraits aqueux des feuilles d'*Urtica dioïca* L. ont été obtenus par trois méthodes différentes (REBAYA *et al.* 2015).

▪ **Macération aqueuse**

La poudre d'ortie est mis à macérer dans de l'eau distillée à un rapport de 10g/100ml sous agitation douce à l'aide d'agitateur magnétique pendant 24 heures et cela à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'extrait aqueux est récupéré après filtration du mélange en utilisant du papier wattman n°1 (filtration du l'extrait trois fois).L'extrait aqueux macéré (EAM) obtenu est lyophilisé. La poudre obtenue est conservé à 4°C.

▪ **Décoction**

L'extrait aqueux a été préparé à partir de 10g de poudre des feuilles d'ortie dioïque qui ont été mélangé avec 100 ml d'eau distillé mis à bouillir pendant 10 minutes sur une plaque chauffante .Après filtration (trois fois) à l'aide du papier wattman n°1. La solution de l'extrait aqueux par décoction (EAD) obtenue est lyophilisée. La poudre obtenue est conservée à 4°C.

❖ **Infusion**

Préparé à partir de 10g de poudre des feuilles d'ortie dioïque, qui ont été mélangé avec 100ml d'eau distillée bouillante. Le mélange a été mis sous agitation magnétique pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. L'extrait est récupéré après filtration du mélange en utilisant le papier wattman n°1(le mélange est filtré trois fois). L'extrait aqueux par infusion (EAI) obtenu est lyophilisé. La poudre obtenue est conservé à 4°C.

✓ **Extraits par solvants organiques**

L'extraction par solvant a été effectuée en utilisant trois solvants à polarité différente en suivant le même mode opératoire. Ces solvants sont : le méthanol, le chloroforme et l'acétate d'éthyle.

L'extrait par méthanol (EMET) des feuilles d'ortie dioïque a été préparé à partir de 10g de poudre des feuilles qui ont été mis à macérer dans 100 ml de méthanol à température ambiante et à l'abri de la lumière, et cela sous agitation magnétique pendant 24 heures.

Le mélange a été filtré trois fois en utilisant du papier wattman n°1. Le filtrat obtenu a été évaporé à sec à l'aide du rota-vapeur. L'extrait récupéré a été mis à l'étuve (40°C) dans un cristalliseur pour faire évaporer le reste du solvant. L'extrait obtenu a été conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation (REBAYA *et al.* 2015) (Figure 16). En suivant le même protocole, les extraits macérés dans le chloroforme (ECHL) et l'acétate d'éthyle (EACT) ont été préparés.

2.1.2 Activité antioxydant

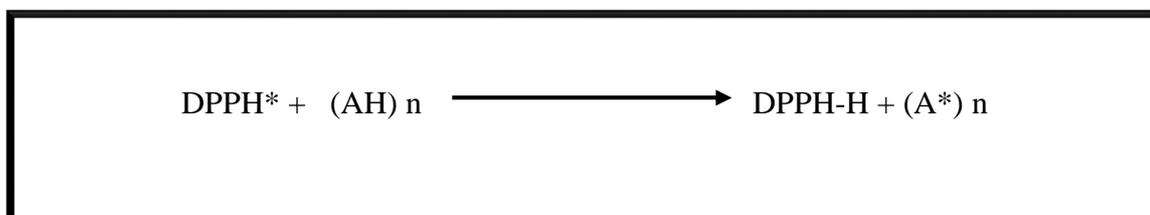
Afin d'évaluer l'activité antioxydant des différents extraits, deux tests ont été réalisés dont le premier est le test DPPH et le deuxième est le test du FRAP.

2.1.2.2. Test de piégeage du radical libre DPPH

• **Principe**

Selon SANCHEZ-MORENO. (2002), le DPPH• est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH• est réduit en diphényle picryl hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons.

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où AH représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH• (violet) pour le transformer en diphényle picryl hydrazine (jaune) (BRAND-WILLIAM *et al.* 1995).

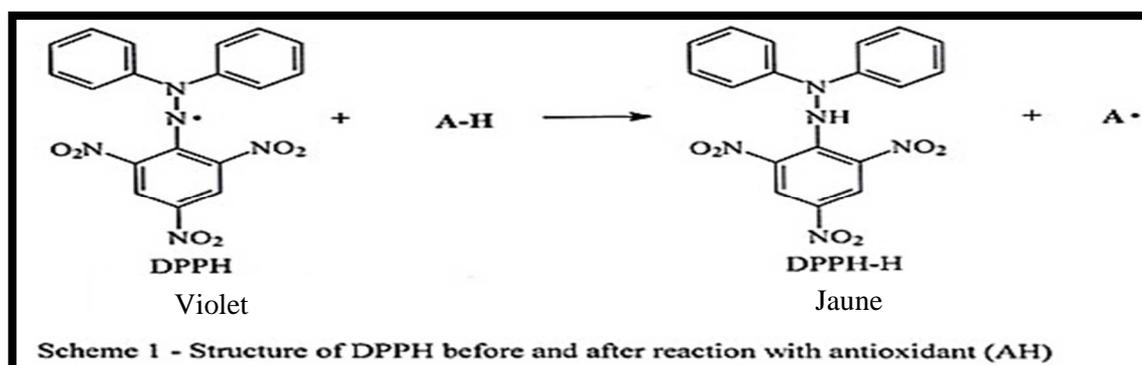


Figure 13 : Forme libre et réduite du DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.* 1995).

- **Mode opératoire**

La méthode décrite par BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) a été employée. 50µl de l'échantillon à tester à différentes concentrations (0, 4, 10, 20, 30, 40mg/ml) sont mélangés avec 2ml de la solution DPPH• à 4%. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante, la lecture de l'absorbance se fait à 517nm contre un blanc. Un contrôle négatif a été préparé en parallèle.

La même expérience a été réalisée pour les différents extraits d'ortie dioïque (EAI, EAD, EAM / ECHL, EACT, EMET) et les contrôles positifs représentés par la vitamine C, la quercétine et le BHT ont également été conduits à différentes concentrations (0 ; 4 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40mg/ml). Les essais ont été répétés 3 fois.

Les résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues. Pour chaque extrait le pourcentage de réduction du DPPH• a été déterminé selon la formule suivante (YEN *et al.* 1994) :

$$\text{DPPH \%} = [(\text{Abs control} - \text{Abs échantillon}) / \text{Abs control}] \times 100$$

Où:

- **DPPH• (%)** : Pourcentage de réduction du DPPH•.
- **Abs control** : Absorbance du contrôle négatif à 517nm.
- **Abs échantillon** : Absorbance de l'échantillon à 517nm.

La courbe tracée selon les différentes concentrations de l'extrait d'ortie, vitamine C, BHT, et de la quercétine en fonction du % d'inhibition du radical DPPH• permet de calculer le paramètre IC₅₀ (concentration inhibitrice à 50%). Ce paramètre est défini comme étant la concentration inhibitrice du substrat qui cause la perte de 50% d'activité de DPPH• (SAMARTH *et al.* 2008).

2.1.2.3. Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium

- **Principe**

La méthode est basée sur la réaction de réduction du Fe³⁺ présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en Fe²⁺, la réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe³⁺) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe²⁺), l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700nm. L'augmentation de l'absorbance correspond à l'augmentation de pouvoir réducteur des composés testés.

- **Mode opératoire**

Le protocole expérimental utilisé est celui d'OYAIZU. (1986) où : 1ml de l'échantillon à différentes concentrations (0 ; 3 ; 7,5 ; 15 ; 22,5 ; 30 mg/ml) est mélangé avec 1ml d'une solution tampon PBS à pH= 6,6 et 1ml d'une solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20min, puis refroidi à la température ambiante. 1ml d'acide trichloracétique à 10% est ajouté pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000g pendant 10min. 1ml du surnageant est ajouté à 1ml d'eau distillée et 200µl d'une solution de chlorure de fer à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait contre un blanc à 700nm à l'aide

d'un spectrophotomètre. L'augmentation de la densité optique (DO) signifie une augmentation du pouvoir réducteur du fer de l'échantillon testé.

La même expérience a été réalisée pour les différents extraits des feuilles d'ortie dioïque (EAD, EAI, EAM, ECHL, EMET, EACT), et les contrôles positifs représentés par la vitamine C, la quercétine et le BHT (0 ; 1,5 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 20 µg/ml). Les essais ont été répétés 3 fois.

Pour comparer l'activité des différents extraits et témoins positifs, on a déterminé le pouvoir réducteur $PR_{0,5 AU}$ défini comme la quantité d'une substance en mg/ml pour les extraits et en µg/ml pour les témoins positifs, du volume réactionnel qui donne une unité d'absorbance de 0.5 à 700nm.

2.1.2.4. Activité antibactérienne des extraits d'*Urtica dioïca*

Pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca*, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant les disques stériles en papier wattman. Cette méthode est appelé aromatoigramme.

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition.

- **Méthode de diffusion (Aromatoigramme)**

En suivant la méthode d'ADESOKAN *et al.* (2007), les extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* ont été préparés à une concentration de 40mg/ml. Ensuite, des disques en papier wattman sont imprégnés avec 20µl de chaque solution.

A partir de colonies jeunes de 18 heures, une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologique stérile pour chaque souche. La turbidité de cette suspension est ajustée à l'équivalent de 0.5 McFarland. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes pétri contenant la gélose MH. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne puis frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. A l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose MH inoculée.

Les disques imprégnés des différents extraits sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose MH, de même, des disques contenant l'antibiotique chloramphénicol (témoin positif) prêts à l'emploi et des disques imprégnés de DMSO et d'eau distillée (témoins négatifs) ont été déposés. Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. L'activité antimicrobienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque (DOUGHARI *et al.* 2007). Les tests ont été répétés deux fois.

- **Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

Deux méthodes ont été employées, méthode de dilutions en milieu liquide et méthode de diffusion sur gélose.

- **Méthode de dilution en milieu liquide**

L'inoculum préparée dans du MHb standardisé à l'équivalent de 0.5 McFarland est distribuée dans une série de 3 eppendorf à raison de 100µl par un. Ensuite, 250µl des d'extrait de concentration connue (à partir de la gamme de concentration de l'extrait) est additionné dans chaque eppendorf contenant 650µl de MHb. Nous avons obtenus à la fin une série d'eppendorfs

avec différentes concentrations des extraits. Après une bonne agitation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

En parallèle nous avons préparé pour chaque concentration, de chaque extrait, un tube contrôle négatif, contenant que le milieu de culture MHb et l'extrait, et un tube de contrôle positif, contenant que l'inoculum bactérien et le MHb.

La lecture des résultats est effectuée par comparaison de la turbidité des tubes expérimentaux avec les tubes témoins. La croissance des bactéries se traduit par un aspect trouble du milieu de culture. Par contre, le milieu reste limpide en cas d'inhibition de la multiplication bactérienne (COURVALIN *et al.* 1987).

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'extrait ne donnant pas de croissance visible. Les tests ont été répétés deux fois.

▪ **Méthode de dilution sur gélose**

La méthode de COURVALIN *et al.* (1987) a été utilisée. Différentes dilutions des extraits macérés dans un solvant (ECHL, EMET, EACT) ont été préparées (10 ; 20 ; 30 ; 40mg/ml). Des disques de papier wattman stériles de 6mm de diamètre sont imprégnés par 20µl d'extraits préalablement dissouts dans le DMSO.

À l'aide d'une pince stérile, les disques sont déposés à la surface d'un milieu MH ensemencé par une suspension microbienne, d'une densité optique équivalente à 0.5 McFarland. Après diffusion, les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après l'incubation l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible à l'extrait. Les tests ont été répétés deux fois, des disques imprégnés de DMSO ont représenté le témoin négatif.

La concentration minimale inhibitrice correspond à la plus faible concentration d'extrait qui provoque l'apparition d'un spectre d'inhibition ou une zone d'inhibition.

2.1.2.5. Identification des mycoendophytes

La classification actuelle du règne des Champignons s'appuie sur des critères morphologiques et sur le mode de reproduction. Elle est pratique, mais insatisfaisante (CORDIER. 2012).

Les champignons sont identifiés par la méthode morphologique ou bien génotypique (moléculaire) (WEISS *et al.* 2004). L'identification des champignons endophytes isolés à partir d'*Urtica dioïca* est effectuée suite à une observation moyennant un microscope optique, en se basant sur les caractères morphologiques des hyphes (cloisonnement, coloration) et des formes reproductrices (formes et couleurs des spores). La détermination est optée à l'échelle du genre car il est difficile de caractériser l'espèce fongique en se basant sur les données morphologiques uniquement.

➤ **Identification macroscopique**

• **Description des colonies**

Texture

- ✓ laineuse : mycélium aérien abondant ;
- ✓ duveteuse : mycélium aérien court ;
- ✓ poudreuse : mycélium aérien produisant de nombreuses conidies créant une surface d'apparence poudreuse semblable à du sucre ou de la farine ;

- ✓ glabre : mycélium aérien peu abondant avec surface lisse.

Couleur : surface, revers, pigment diffusible ;

- ✓ brun, gris, noir = champignon dématié ;
- ✓ blanc ou autre couleur (rouge, vert, jaune, mauve, etc.) = champignon hyalin.

➤ **Identification microscopique**

Nous nous sommes référées pour l'identification aux différents articles qui ont traités les Deutéromycètes et leurs caractéristiques.

Pour l'examen des structures microscopiques, il y a lieu de s'intéresser aux :

- ✓ hyphes : septés, non septés, larges, étroits ;
- ✓ conidiophores: absents, simples, ramifiés ;
- ✓ cellules conidiogènes: annellide, phialide... ;
- ✓ conidies: uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...) (LANIER *et al.* 1978).

2.1.2.6. Activité antibactérienne des champignons endophytes

• **Principe**

On a étudié l'activité antibactérienne des champignons endophytes en utilisant la méthode de double culture de diffusion sur gélose. Des disques des champignons âgés au moins de trois semaines ont été testés contre 9 souches de *Staphylococcus aureus*. Cette technique a été décrite par DEVARAJU et SATISH en 2011. Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien (métabolites secondaires des champignons) en milieu solide dans une boîte de pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition en fonction du diamètre d'inhibition.

• **Mode opératoire**

L'inoculation de la gélose se fait par une suspension bactérienne préparée à partir d'une culture pure et jeune de 18 heures dans l'eau physiologique stérile. L'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0.5 McFarland. L'ensemencement des milieux se fait par écouvillonnage des boîtes de pétri cloisonnées. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. L'opération est répétée 3 fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

Des disques de 6mm de diamètre des champignons sont préparés à l'aide du bout cylindrique stérile d'une pipette pasteur, et cela à partir d'une boîte pétrie qui contient la culture du champignon dans un milieu PDA. Ensuite, ces disques ont été déposés sur la gélose ensemencée à l'aide d'une pince stérile. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Les tests ont été répétés deux fois.

↳ **Analyse statistique :**

Les résultats obtenus suite à l'évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne sont analysés statistiquement. Ils subissent une ANOVA à deux facteurs. L'analyse de la variance (terme souvent abrégé par le terme anglais ANOVA : ANalysis Of VAriance) est un test

statistique permettant de vérifier que plusieurs échantillons sont issus d'une même population et/ou présentant des différences. Ce test s'applique lorsque l'on mesure une ou plusieurs variables explicatives catégorielles (appelées alors facteurs de variabilité, leurs différentes modalités étant parfois appelées « niveaux ») qui ont de l'influence sur la distribution d'une variable continue à expliquer. On parle d'analyse à un facteur, lorsque l'analyse porte sur un modèle décrit par un facteur de variabilité, d'analyse à deux facteurs ou d'analyse multifactorielle.

Dans cette étude, ce traitement statistique est réalisé sur ordinateur en utilisant le logiciel STATISTICA version 7.1. La variable mesurée prise en compte est le pouvoir antioxydant et le pouvoir antibactérien mesuré. Pour le pouvoir antibactérien, les deux facteurs étudiés sont les souches bactériennes (les champignons) et le deuxième facteur est les extraits contre un seul facteur quantitatif qui est le pouvoir antibactérien.

2.2. Résultats et discussions

2.2.1. Evaluation de l'effet antioxydant des extraits d'*Urtica dioïca*

L'évaluation de l'activité antioxydante est nécessairement réalisée par au moins deux méthodes différentes (WONG et KOH. 2006).

- **Test de piégeage du radical libre 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)**

Le test de DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure activité antioxydante des composés phénoliques (Williams *et al.* 1995).

L'activité antioxydante des extraits macérés dans un solvant organique (EMET, ECHL et EACT) et extraits aqueux (EAI, EAD et EAM) de feuilles d'*Urtica dioïca* et des témoins (Vit C, BHT et quercétine) a des concentrations (0 ; 4 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 mg/ml) *vis-à-vis* du radical DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par diminution de l'absorbance induite par des substances anti radicalaires (SOARES *et al.* 1997).

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus (figure 14 et 15) révèlent que les extraits d'*Urtica dioïca* possèdent une activité anti-radicalaire. Pour mieux caractériser ce dernier, les IC₅₀ de chacun des différents extraits ont été déterminées (figure 20). Le taux d'inhibition (98,42 ± 0,014%) est obtenu pour L'ECHL suivi par les extraits, Vit C, BHT, quercétine, EACT, EMET et EAM (Figure14) qui sont de 96, 951 ± 0,005% ; 96,72 ± 0,00% ; 95,31 ± 0,001% ; 94.72 ± 0,059%, 78,73 ± 0,004% et 57,05 ± 0,100 % respectivement.

Les résultats présentés dans la figure 15 montrent que l'EAM possède la valeur la plus élevée (57,05 ± 0,100%), suivi par EAI et EAD qui ont donnés des pourcentages de 41,26 ± 0,045% et 36,70 ± 0,089% respectivement et sont largement inférieurs au pourcentage d'inhibitions des témoins.

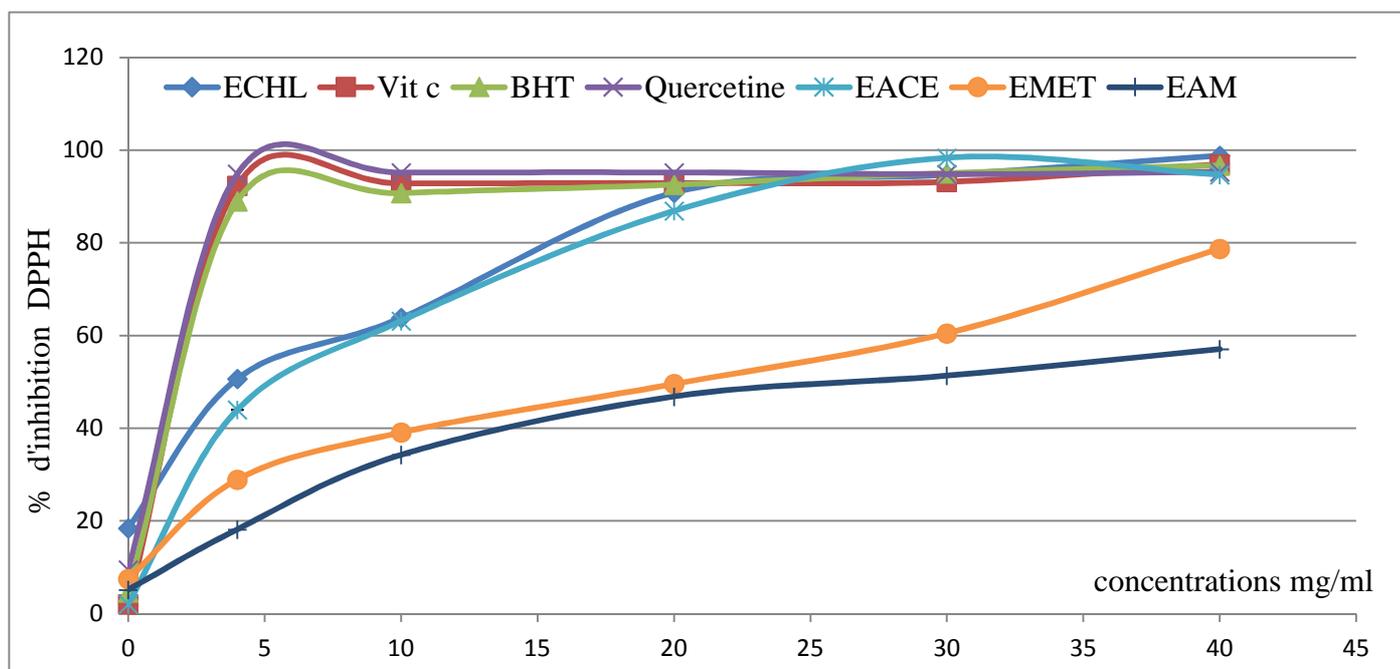


Figure14 : Pourcentage d'inhibition des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* macérés (EMET, ECHL, EACT, et EMA) et les témoins (Vit C, BHT, et quercétine) en fonction de différentes concentrations.

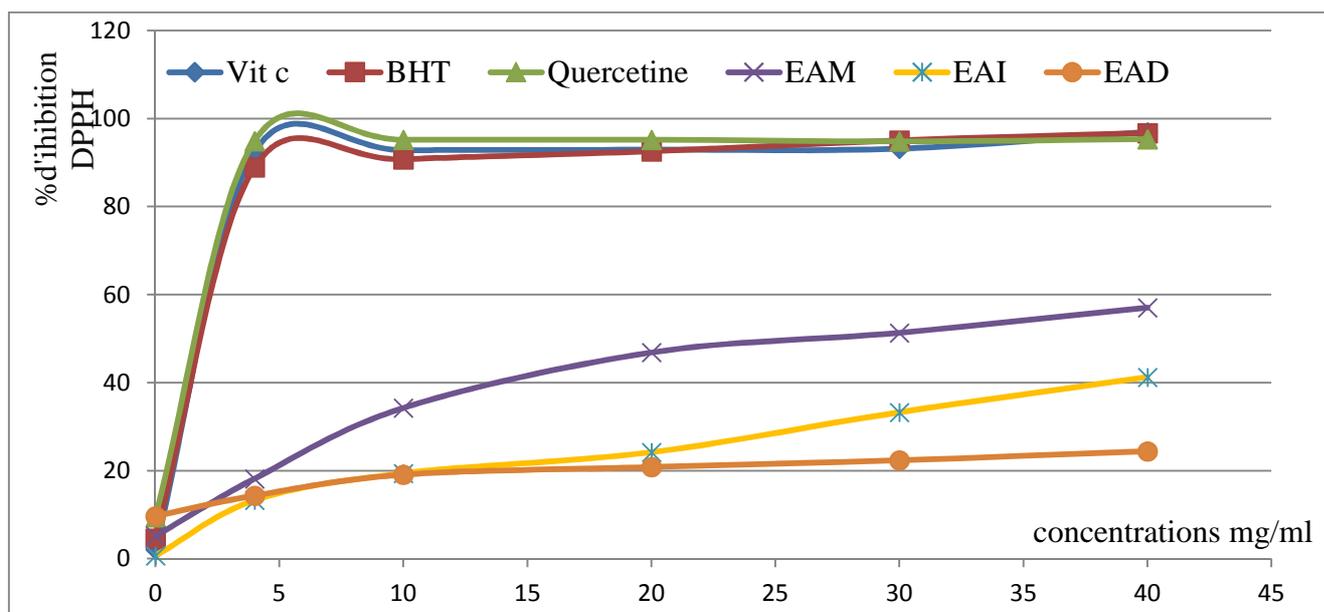


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition des extraits bruts aqueux (EAD, EAI et EAM) et des témoins en fonction de différentes concentrations.

Quelques études antérieures ont également montré que l'effet inhibiteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante. Une étude menée par GÜLÇİN *et al.* (2003), en travaillant sur l'extrait aqueux d'*Urtica dioïca*, avait donné le résultat suivant quercétine >Extrait aqueux > BHA avec 93% ; 37% ; 32% respectivement à une concentration de 60µg/ml.

La forte activité antioxydante des extraits macérés dans un solvant organique a déjà été signalée par AYTAC *et al.* (2012), en travaillant sur des extraits éthanoléiques des différentes parties (graines, racines, fleurs, feuilles) d'*Urtica dioïca* qui avait donné un pourcentage d'inhibition de 76,4% pour l'extrait éthanoléique de feuilles d'*Urtica dioïca*, une activité plus importante que celle des témoins BHT, BHA et α -tocophérol avec des pourcentages d'inhibitions de 66.2 %, 70.6 %, et 50.1 % respectivement.

- **Calcul de la concentration inhibitrice IC₅₀**

IC₅₀: il définit la concentration efficace du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH en solution. Les valeurs de IC₅₀ des différents extraits ont été estimées en utilisant la courbe de régression linéaire : $y = ax + b$.

La différence de l'activité est mise en évidence en utilisant ce paramètre (IC₅₀) qui est inversement proportionnel au potentiel anti-radicalaire d'un antioxydant, une valeur d'IC₅₀ faible correspond à une activité élevée (PRAKASH *et al.* 2007).

Les valeurs des IC₅₀ représentés dans l'histogramme ci-dessus varient de 1,534 mg/ml pour la Vit C à 33,37 mg/ml pour l'EAM. Les extraits EACT et ECHL ont exhibé la capacité à réduire le radical DPPH avec des valeurs d'IC₅₀ atteignant 10,7 et 16,3 mg/ml respectivement. L'EAI est le deuxième système approprié avec des IC₅₀ de 22,31mg/ml, suivi de l'EMET avec IC₅₀ de 23,34mg/ml. Les valeurs des IC₅₀ relatives aux témoins BHT et quercétine sont de l'ordre de 14,7 et 15,24 mg/ml respectivement. L'activité anti-radicalaire la plus faible a été enregistrée dans les extraits l'EAD et l'EAM avec des IC₅₀ de 25,64 et 33,37 mg/ml respectivement.

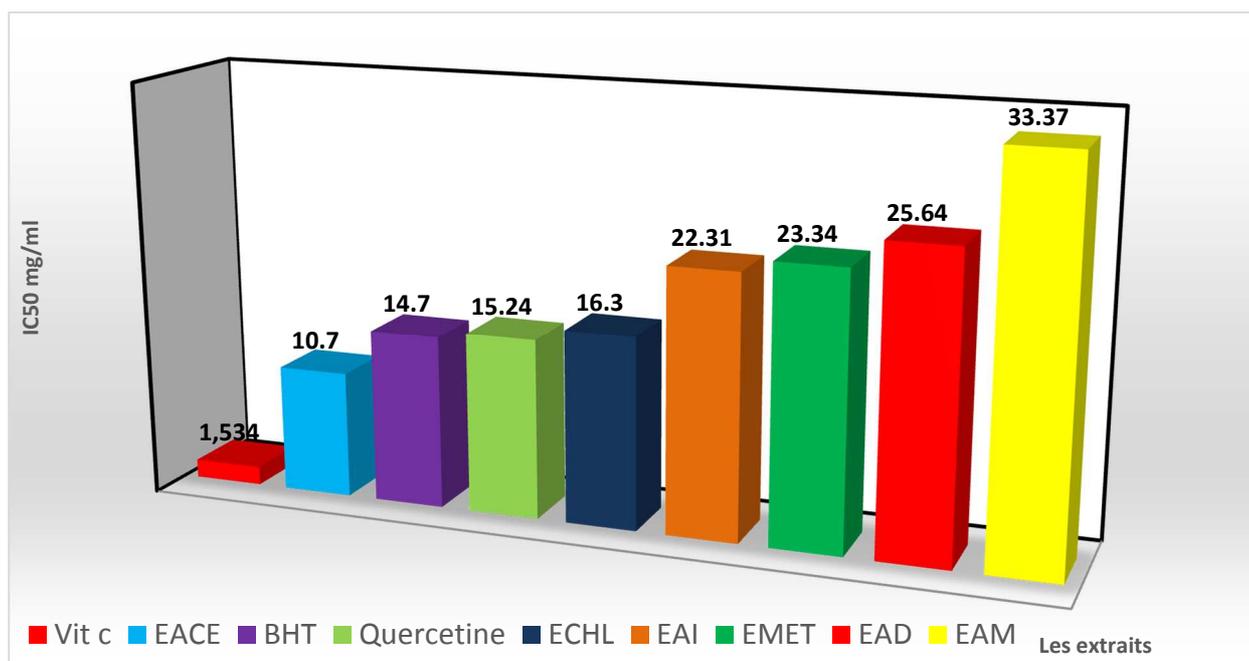


Figure 16 : IC₅₀ des différents extraits et témoins.

Ces résultats montrent que les extraits obtenus avec des solvants organiques sont meilleurs pour l'extraction d'antioxydants à partir de feuilles d'*Urtica dioïca*. De ce constat, nous pouvons dire que les métabolites secondaires semblent plus solubles dans les solvants que dans de l'eau, de même l'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction. Pour les extraits aqueux, on suppose que la méthode d'extraction, et les paramètres physicochimiques (température, le temps de l'extraction) influent elle-même sur le rendement d'extraction.

En effet, plusieurs études antérieures ont été réalisées dans ce contexte, nous citons à titre d'exemple, les résultats obtenus par KUKRIC *et al.* (2012). Ils ont signalés une IC₅₀ de $31,38 \pm 0,102 \mu\text{g/g}$ en travaillant sur l'extrait éthanoïque d'*Urtica dioïca*, une valeur de $5,36 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$ pour la vitamine C et $23,16 \pm 0,84 \mu\text{g/g}$ pour le BHT. Une autre étude menée par KHARE *et al.* (2012), sur l'extrait hydroalcoolique d'*Urtica dioïca* avait donné des IC₅₀ de $88,33 \pm 2,88 \mu\text{g/ml}$ pour l'extrait et $2,8 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$ pour la vitamine C. Une autre étude réalisée par MAVI *et al.* 2004 ont signalés une IC₅₀ de 1012 mg/l en travaillant sur l'extrait aqueux d'*Urtica dioïca*.

En confrontant nos résultats à ceux trouvés par les auteurs précédemment cités, lors de leurs études faites sur l'activité antioxydante des extraits aqueux et par solvants organiques de feuilles d'*Urtica dioïca*. Nous constatons que les valeurs de nos IC₅₀ sont supérieures à celles trouvées par ces auteurs. Ceci, on pourrait supposer que l'activité antioxydante d'un extrait est un paramètre qui dépend fortement des conditions opératoires de l'extraction, et en particulier de la nature et de la polarité du solvant, en revanche, une abondante littérature recommande l'association aqueux et solvant pour un meilleur rendement.

En effet, l'étude de l'impact de la provenance de notre plante correspond à une approche très globale mettant en évidence l'impact d'un complexe de facteurs environnementaux en interaction. En l'absence de caractérisation climatique des régions, il est difficile d'attribuer ces

différences à tel ou tel facteur de l'environnement aérien ou édaphique (DRAGOVIC-UZELAC *et al.* 2007).

Ainsi, tous les extraits étudiés possèdent une activité anti-radicalaire concentration dépendante, les extraits aqueux exercent une activité moins importante. De ce constat, nous pouvons dire que les métabolites secondaires semblent plus solubles dans les solvants que dans de l'eau, de même l'utilisation de différents solvants à polarité différente permet de séparer des composés selon leur degré de solubilité dans le solvant d'extraction.

L'effet scavenger d'un extrait pourrait devenir potentiellement intéressant après optimisation des conditions d'extraction, séparation et d'augmentation de la concentration (TURKMEN *et al.* 2007).

- **Test du pouvoir réducteur sur le ferrocyanure de potassium**

Le pouvoir réducteur d'un composé sert comme indicateur du potentiel de l'activité antioxydant (GEONG *et al.* 2004).

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode facile et reproductible, pour cela elle est très utilisée pour distinguer les extraits les plus actifs (LI *et al.* 2007). L'acide ascorbique, BHT, et quercétine sont utilisés comme témoins.

Pour tous les extraits, des dilutions en cascade ont été préparées (0 ; 3 ; 7,5 ; 15 ; 22,5 ; 30 mg/ml), et (0 ; 1,5 ; 3,75 ; 7,5 ; 15 ; 20 µg/ml) pour les témoins. Les pouvoirs réducteurs sont mesurés à 70 nm.

L'évaluation de l'activité antioxydante de nos extraits par solvants organiques (ECHL, EMET, et EACT) et aqueux (EAM, EAI, et EAD) d'*Urtica dioïca* est déterminée par le test de pouvoir réducteur sur le ferrocyanure. Nous avons tracé les courbes qui représentent les variations du pouvoir réducteur exprimé en absorbance en fonction de la concentration. On montre que la densité optique est proportionnel à l'augmentation de la concentration de nos échantillons.

Le pouvoir réducteur des extraits aqueux et par solvants de feuilles d'ortie dioïque et témoins: EAM ; quercétine ; BHT ; EAD ; EMET ; Vit C ; ECHL ; EACT ; EAI avec des valeurs $1,524 \pm 0,029$; $1,492 \pm 0,130$; $1,422 \pm 0,025$; $1,375 \pm 0,032$; $1,203 \pm 0,04$; $1,196 \pm 0,024$; $0,601 \pm 0,010$; $0,489 \pm 0,059$; $0,462 \pm 0,064$ nm respectivement.

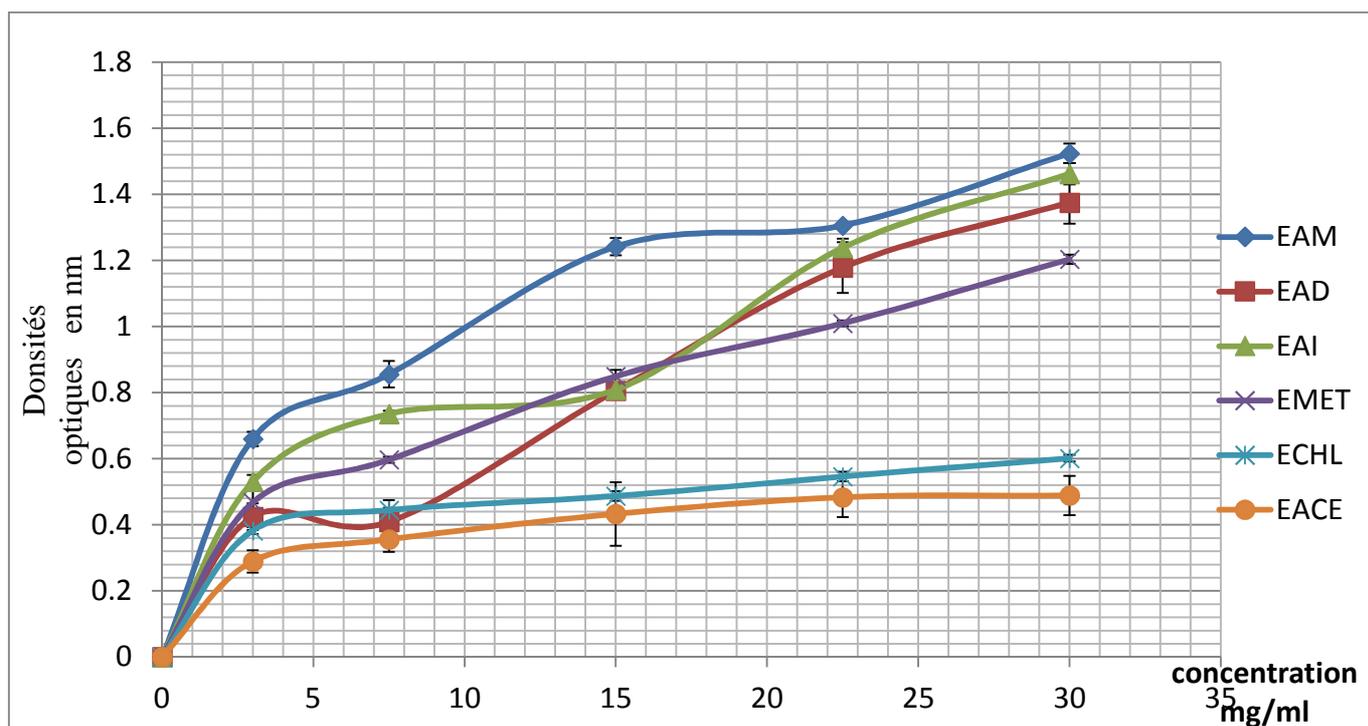


Figure 17 : Densités optiques des extraits par solvant organique et aqueux (EMET, ECHL, EACT, EAM, EAD et EAI) aux concentrations (0 ; 3 ; 7,5 ; 15 ; 22,5 et 30mg/ml).

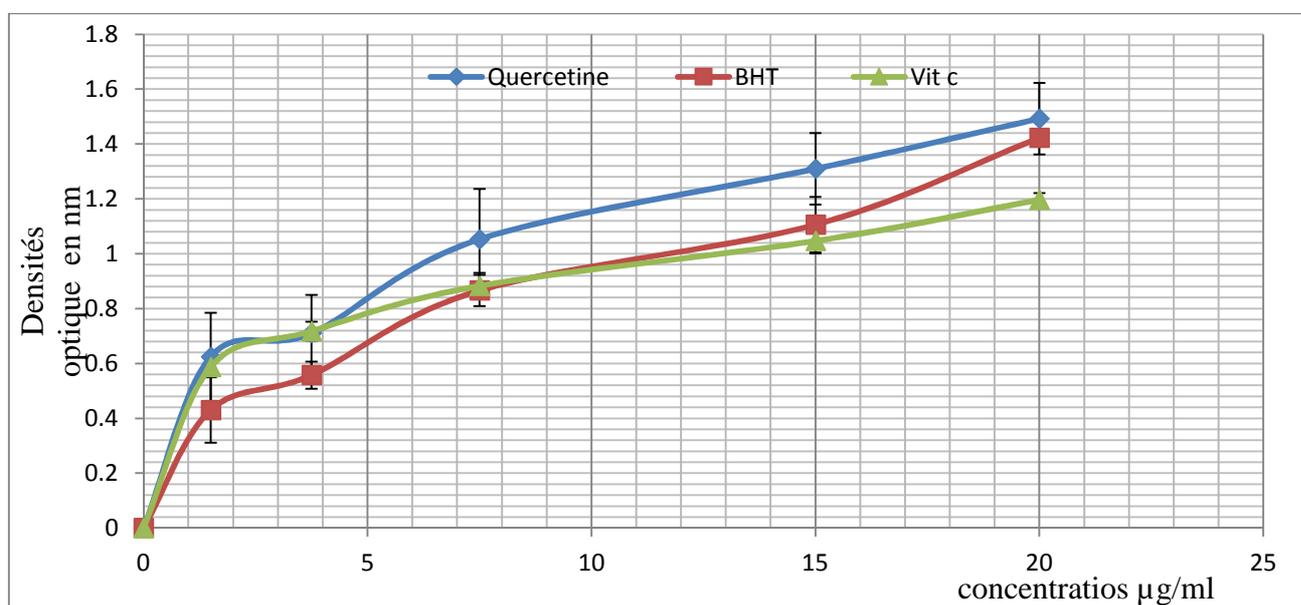


Figure 18 : Densités optique des témoins (quercétine, BHT, et Vit c) à différentes concentrations (0, 1.5, 3.75, 7.5, 15, et 20 µg/ml).

Le pouvoir réducteur des extraits de la plante est dose dépendante (concentration dépendante). A la concentration de 0,3 mg/ml, l'EAM d'*Urtica dioïca* possède le pouvoir réducteur le plus élevée présenté par l'absorbance ($DO=1,524 \pm 0,029nm$) par rapport aux autres extraits aqueux et par solvants. Cela pourrait suggérer que la macération aqueuse est le meilleur model pour l'extraction des polyphénols car elle se déroule à température ambiante, ce qui est très positif pour conserver l'intégrité des molécules polyphénoliques sensibles aux

changements de température (BUDIC-LETOC *et al.* 2005). Nos résultats concordent avec ceux obtenus antérieurement par GULCIN *et al.* (2003) sur l'extrait aqueux de feuille d'*Urtica dioïca* avait donné une absorbance de l'extrait de feuille supérieure à celle du témoin α -tocopherol.

De ces résultats, nous ne pouvons pas être formels en excluant toute incertitude et comparer directement les courbes données par la cinétique des composés contenus dans les extraits. Pour cela, on a introduit le paramètre $PR_{0,5AU}$ qui permet de les comparer selon la concentration pour laquelle le produit de la réduction donne une absorbance de 0,5nm. Ce paramètre étant introduit pour comparer la rapidité et l'efficacité des composés à céder des électrons se montre indispensable pour une comparaison des capacités réductrice.

Les résultats mentionnés sous dessus sont obtenus après l'extrapolation de la valeur de l'absorbance 0.5 nm représenté sur l'axe des ordonnées sur l'axe des abscisses.

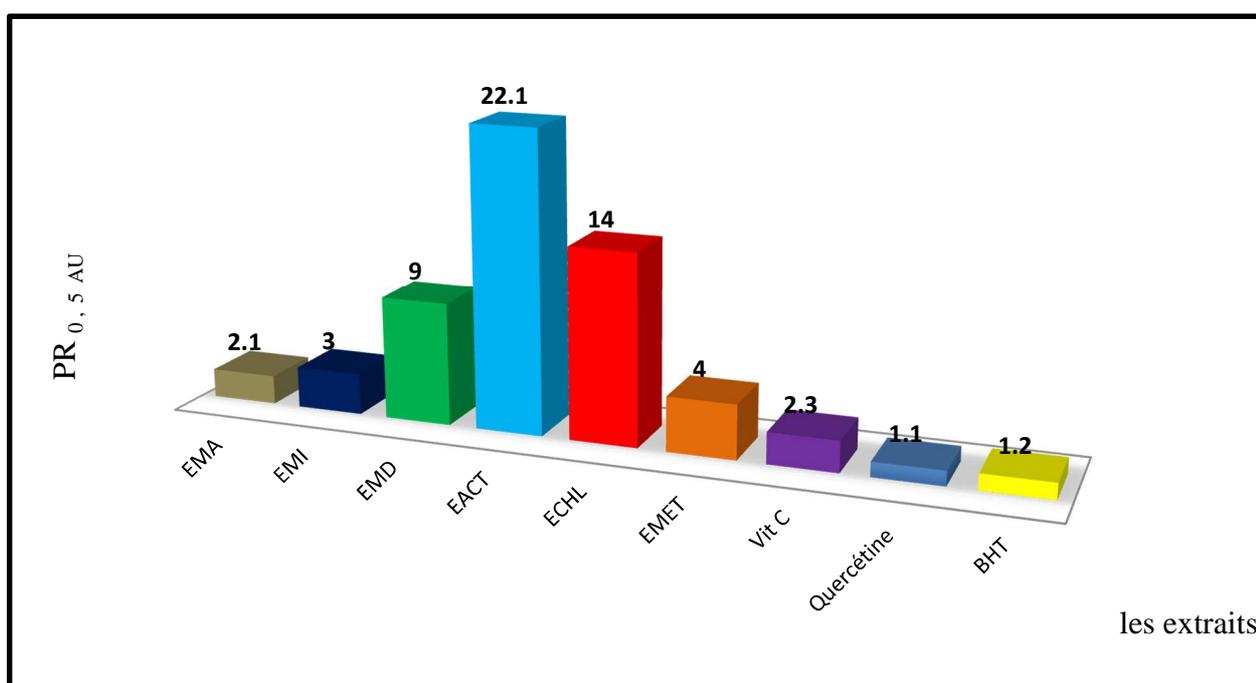


Figure 19 : $PR_{0,5AU}$ des extraits et témoins

Les différents extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* renferment des teneurs très variables en composés phénoliques et par conséquent ont des activités anti oxydantes différentes. Ces teneurs en composés varient en fonction de la provenance et de nature des solvants d'extraction utilisée. Ainsi, nous pouvons constater que l'activité antioxydante pourrait être liée à la complexité des extraits bruts en substances poly phénoliques y compris les tanins et les flavonoïdes et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (VERMERRIS et NICHOLSON. 2006). De même, cette activité pourrait être justifiée par la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs et inhibiteurs des oxydants (SIDDHURAJU et BECKER K. 2007).

Kjn 2.2.2. Activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L.

L'aromatogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches *vis-à-vis* des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* macérés dans un solvant (EMET, ECHL, EACT) et les extraits aqueux (EAI, EAD, EAM). Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm de la moyenne des zones d'inhibitions des deux essais, obtenu *vis-à-vis* les différentes souches de *Staphylococcus aureus*.

Tableau IX : Aromatogramme des germes étudiés en présence des différents extraits d'*Urtica dioïca*.

Souche \ Extrait	EAI	EAD	EAM	EMET	ECHL	EACT	Chloram
<i>S. aureus</i> LGA251	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	9 ± 0	11 ± 0	11 ± 0.5	29 ± 0
<i>S. aureus</i> MU50	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0	8 ± 0	8 ± 0	29 ± 0.5
<i>S. aureus</i> 25923	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0	8 ± 0	7 ± 1	27.5 ± 0
<i>S. aureus</i> 43300	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	8.5 ± 0	10 ± 0	10 ± 0	30 ± 0
<i>S. aureus</i> S84	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0	8.5 ± 0.5	7.5 ± 0.5	30 ± 2
<i>S. aureus</i> S95	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	6.5 ± 0.5	7.5 ± 0.5	7.5 ± 0.5	28.5 ± 0
<i>S. aureus</i> S96	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7 ± 0	8.5 ± 0.5	7.5 ± 0.5	29 ± 1
<i>S. aureus</i> S100	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	8.5 ± 0.5	8.5 ± 0.5	8.5 ± 0.5	28.5 ± 0.5
<i>S. aureus</i> S101	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	7.5 ± 0.5	8 ± 0	8 ± 0	28.5 ± 0

Chloram : chloramphénicol

Le tableau IX montre clairement qu'il y a une grande hétérogénéité dans les résultats des différents extraits et de témoin positif le chloramphénicol. Le pouvoir antibactérien est plus ou moins important selon la souche et l'extrait testé. Les souches testées semblent être sensibles aux extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* macérés dans un solvant (ECHL, EACT, EMET) (figure 23 et 24). Les valeurs de la moyenne de zones d'inhibition sont comprises entre 7 et 11mm. La meilleure valeur est de 11mm de l'ECHL et l'EACT sur la souche *Staphylococcus aureus* LGA251. Les souches testées semblent résistantes aux extraits aqueux (EAD, EAM, EAI) de feuilles d'*Urtica dioïca* (figure 21 et 22). Les extraits aqueux n'ont pas exercés un effet antibactérien sur toutes les souches testées. Quant au témoin positif Chloramphénicol, il a exercé un important effet inhibiteur sur toutes les souches testées (27.5 - 30mm).

L'histogramme suivant (figure 20) représente les diamètres de zones d'inhibition des différents extraits testés ainsi que celles du témoin positif.

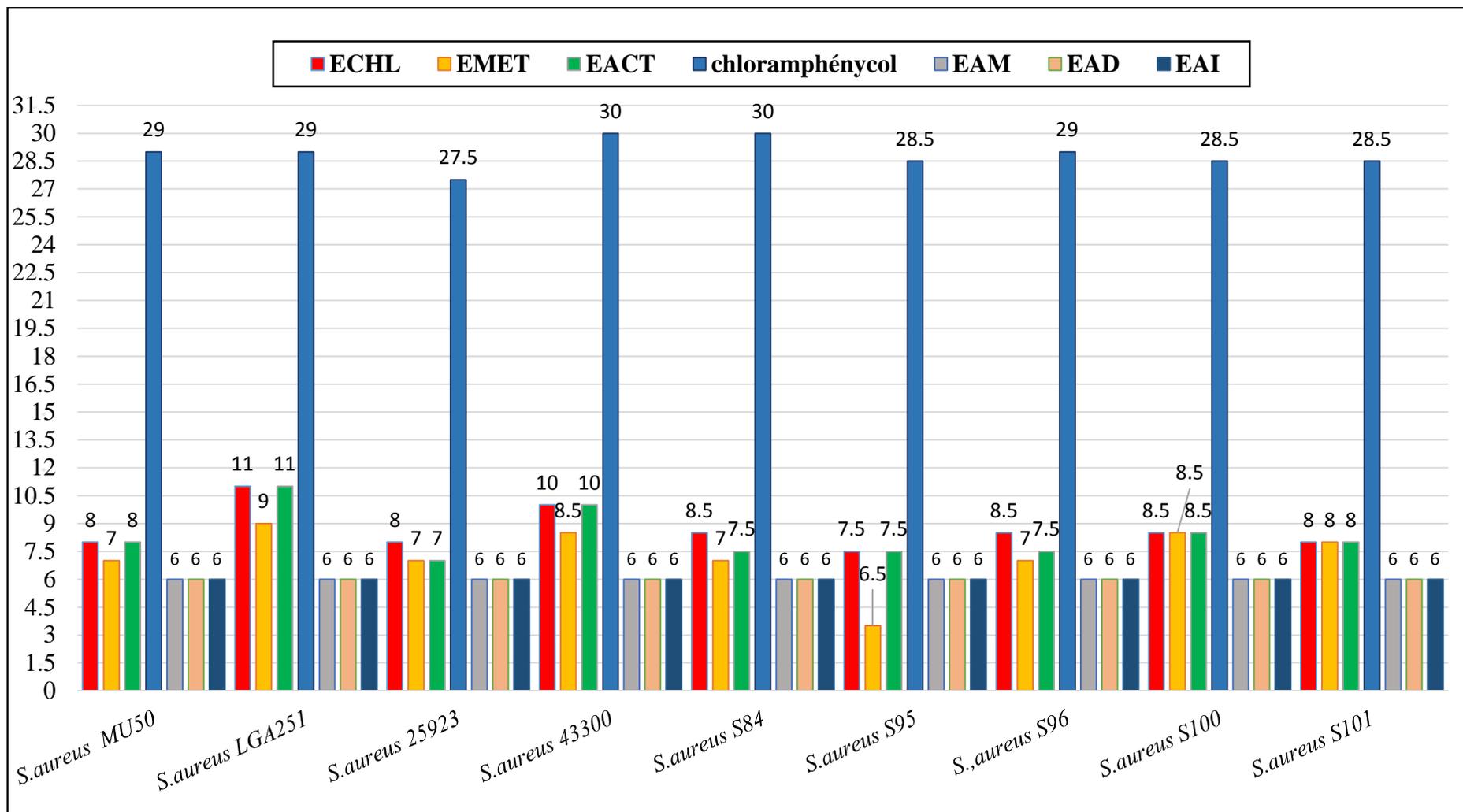
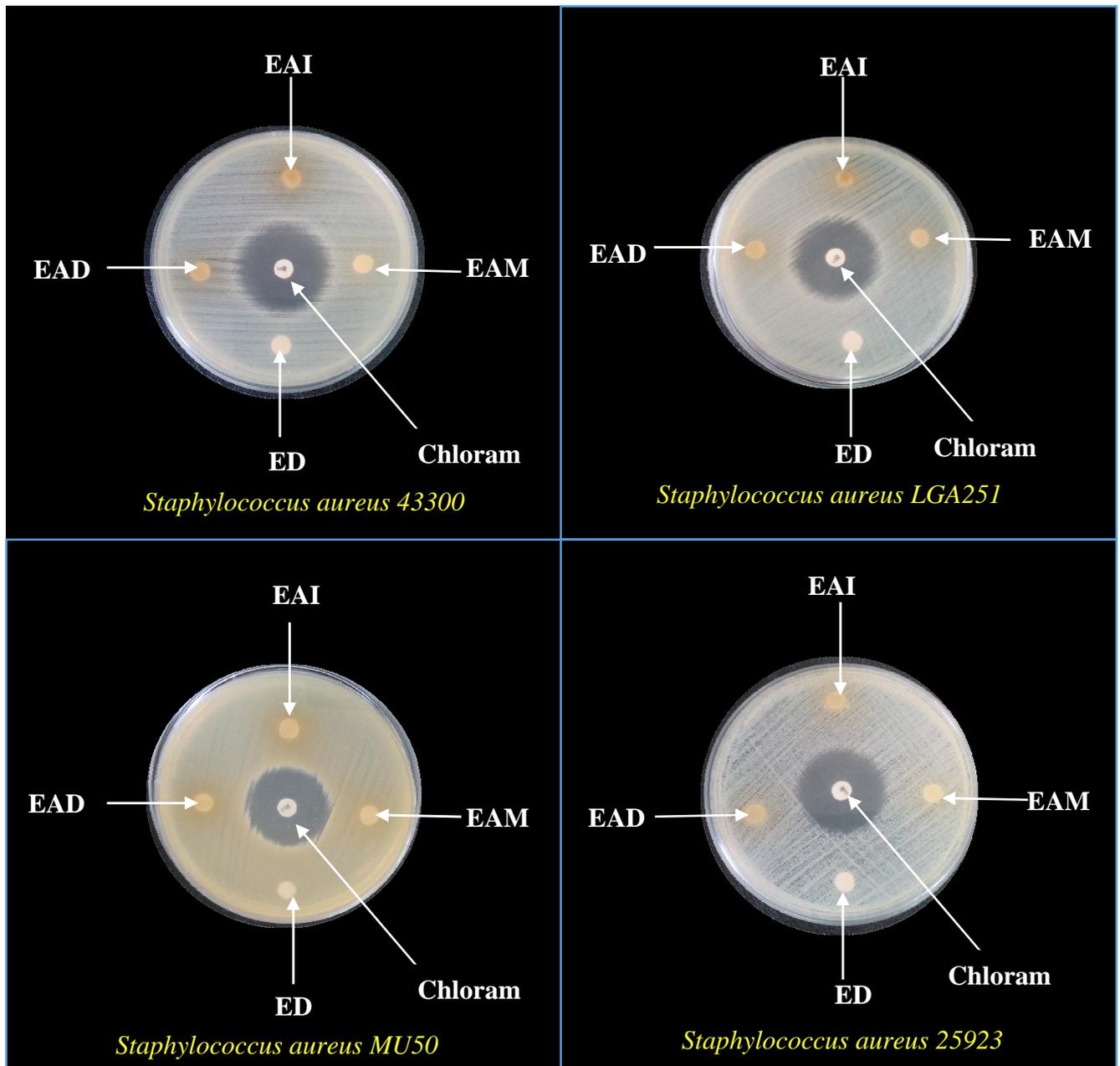


Figure 20 : Effet antibactérien des différents extraits des feuilles d'*Urtica dioïca*.

Les figures 21 et 22 représentent les résultats obtenus dans le test d'activité antibactérienne des extraits aqueux (EAD, EAI, EAM) sur les souches *Staphylococcus aureus* de références ainsi que les souches *Staphylococcus aureus* isolées multi-résistantes. L'absence de l'effet antibactérien se traduit par l'absence de zone d'inhibition au tour des disques imbibé d'extrait. Le Chloramphénicol montre un effet inhibiteur sur toutes les souches testées.



Chloram : chloramphénicol (témoin positif)

ED : eau distillée (témoin négatif)

Figure 21 : Effet des extraits aqueux (EAD, EAI, EAM) des feuilles d'*Urtica dioïca* sur les souches de référence.

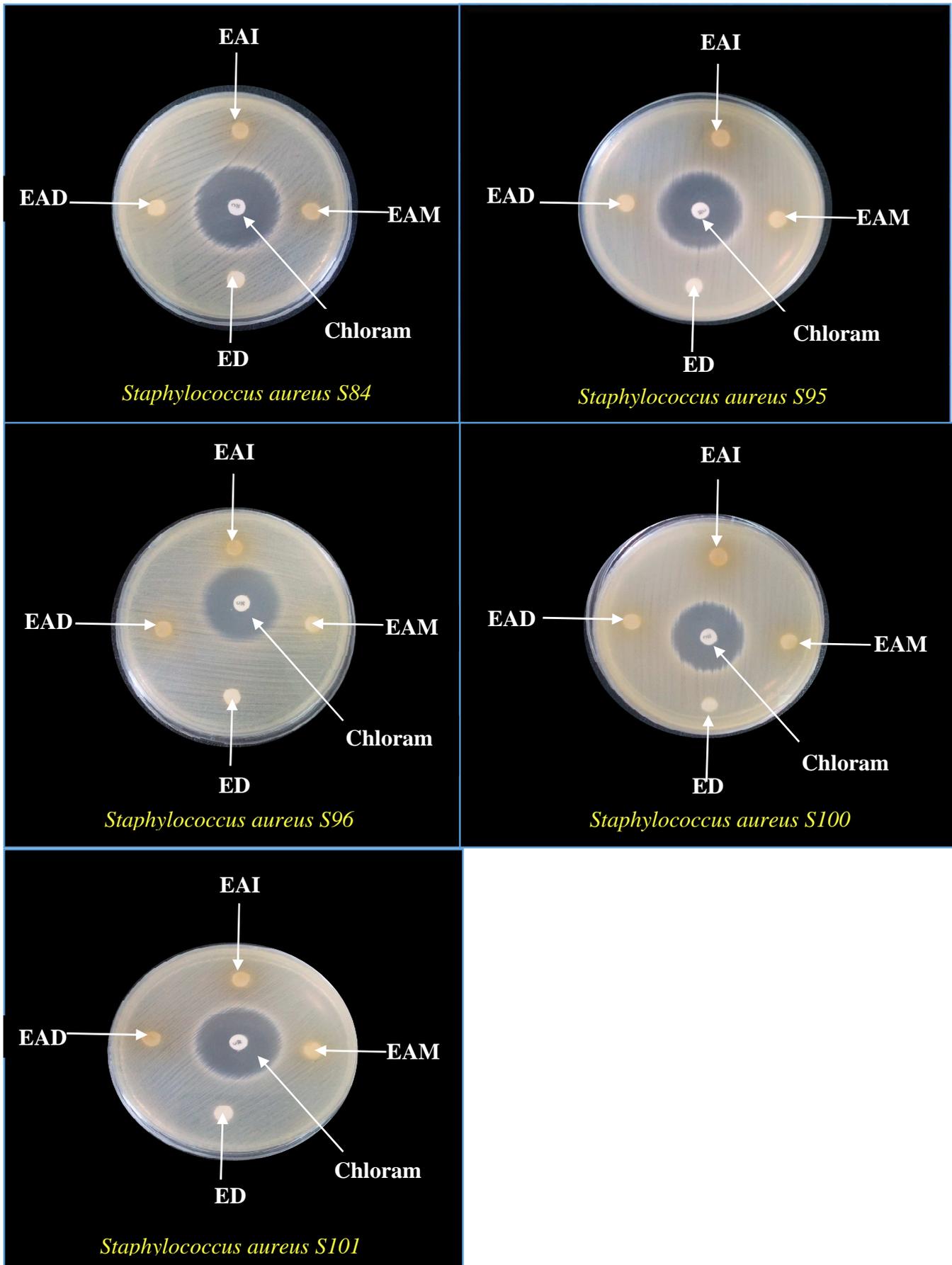


Figure 22 : Effet des extraits aqueux (EAI, EAM, EAD) sur les souches multi-résistantes isolées.

Les figures 23 et 24 représentent l'effet inhibiteur des extraits EAM, ECHL, EMET et EACT sur les souches *Staphylococcus aureus* de référence et souches *Staphylococcus aureus* isolées multi-résistantes. Cet effet se traduit par l'apparition des zones d'inhibition au tour des disques imbibés d'extrait. L'ECHL, l'EACT et l'EMET ont exercé une activité antibactérienne sur toutes les souches testées. Cependant, l'EAM n'inhibe pas la croissance des souches testées. Aucun effet n'a été exercé par les témoins négatifs DMSO et ED. Le témoin positif a montré un bon effet inhibiteur sur toutes les souches testées.

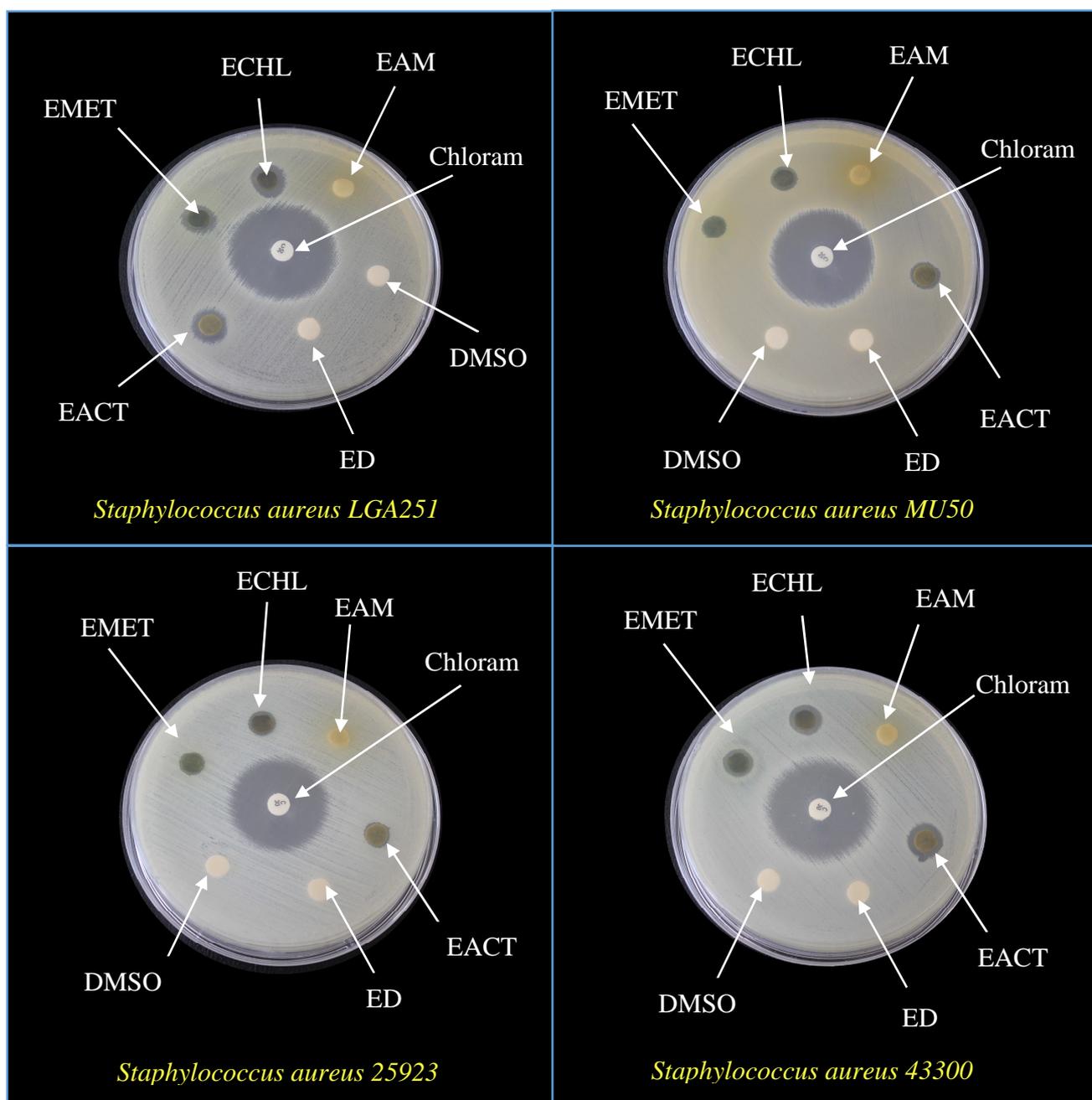


Figure 23 : Effet inhibiteur des extraits macérés (EAM, EMET, ECHL, EACT) sur les souches de référence.

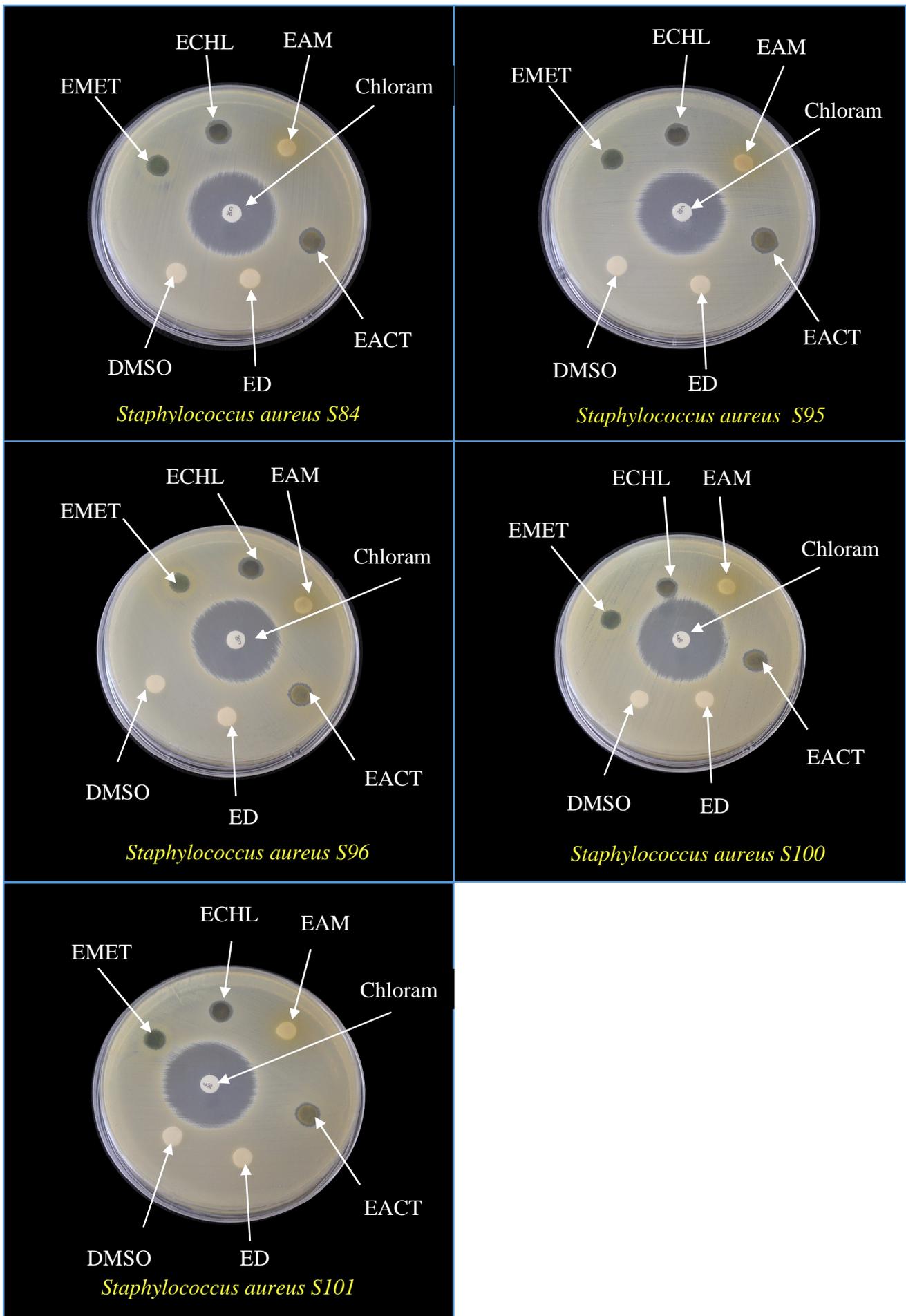


Figure 24 : Effet inhibiteur des extraits macéré (EAM, EMET, ECHL, EACT) sur les souches isolées multi-résistantes.

- **Détermination de la CMI sur milieu gélosé**

La méthode de dilution sur gélose a été utilisée pour déterminer la CMI des extraits révélés actifs sur les souches testés. Les figures 26, 27, 28, 29, 30 et 31 représentent les résultats obtenus dans ce test. La gamme de concentration utilisée est de 10, 20, 30 et 40 mg/ml. Les disques ont été imprégnés avec 20µl de chaque extrait. La CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait qui donne une zone d'inhibition. L'EACT montre la plus basse CMI de 20mg/ml sur *S.aureus S95* et une CMI de 10mg/ml sur le reste des souches. L'EMET montre une CMI de 40mg/ml sur *S.aureus S95* et de 20mg/ml sur *S.aureus MU50*, tandis que l'ECHL montre une CMI de 40mg/ml sur *S.aureus S95* et une CMI 30mg/ml sur les autres souches.

Tableau X : CMI des extraits macérés dans un solvant organique (mg/ml).

Souches	ECHL	EACT	EMET
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	30	10	20
<i>S.aureus</i> ATCC 43300	30	10	10
<i>S.aureus</i> MU50	30	10	10
<i>S.aureus</i> LGA251	30	10	10
<i>S.aureus</i> S84	30	10	10
<i>S.aureus</i> S95	40	20	40
<i>S.aureus</i> S96	30	10	10
<i>S.aureus</i> S100	30	10	10
<i>S.aureus</i> S101	30	10	10

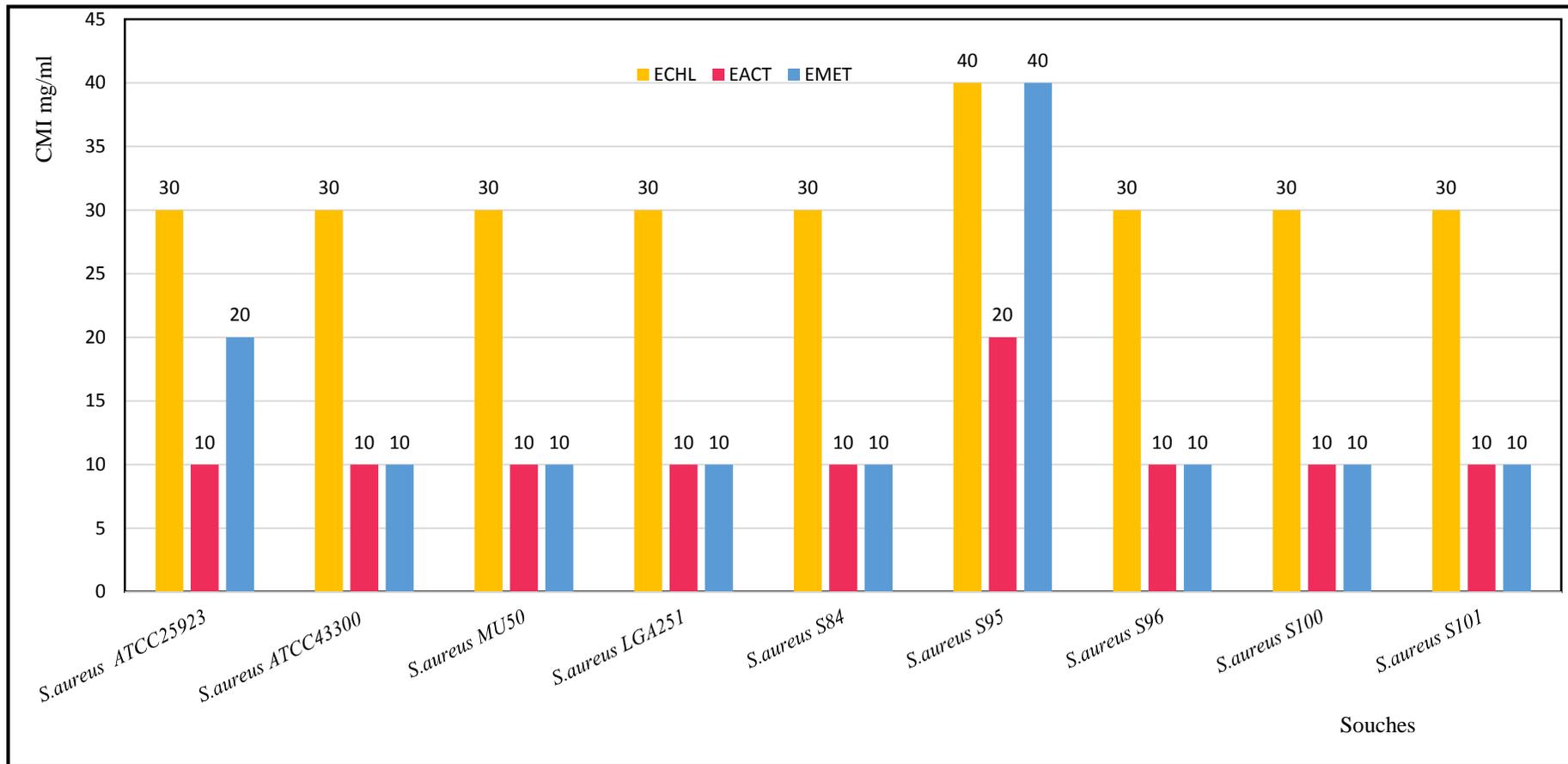


Figure 25: CMI des extraits macérés (ECHL, EMET, EACT).

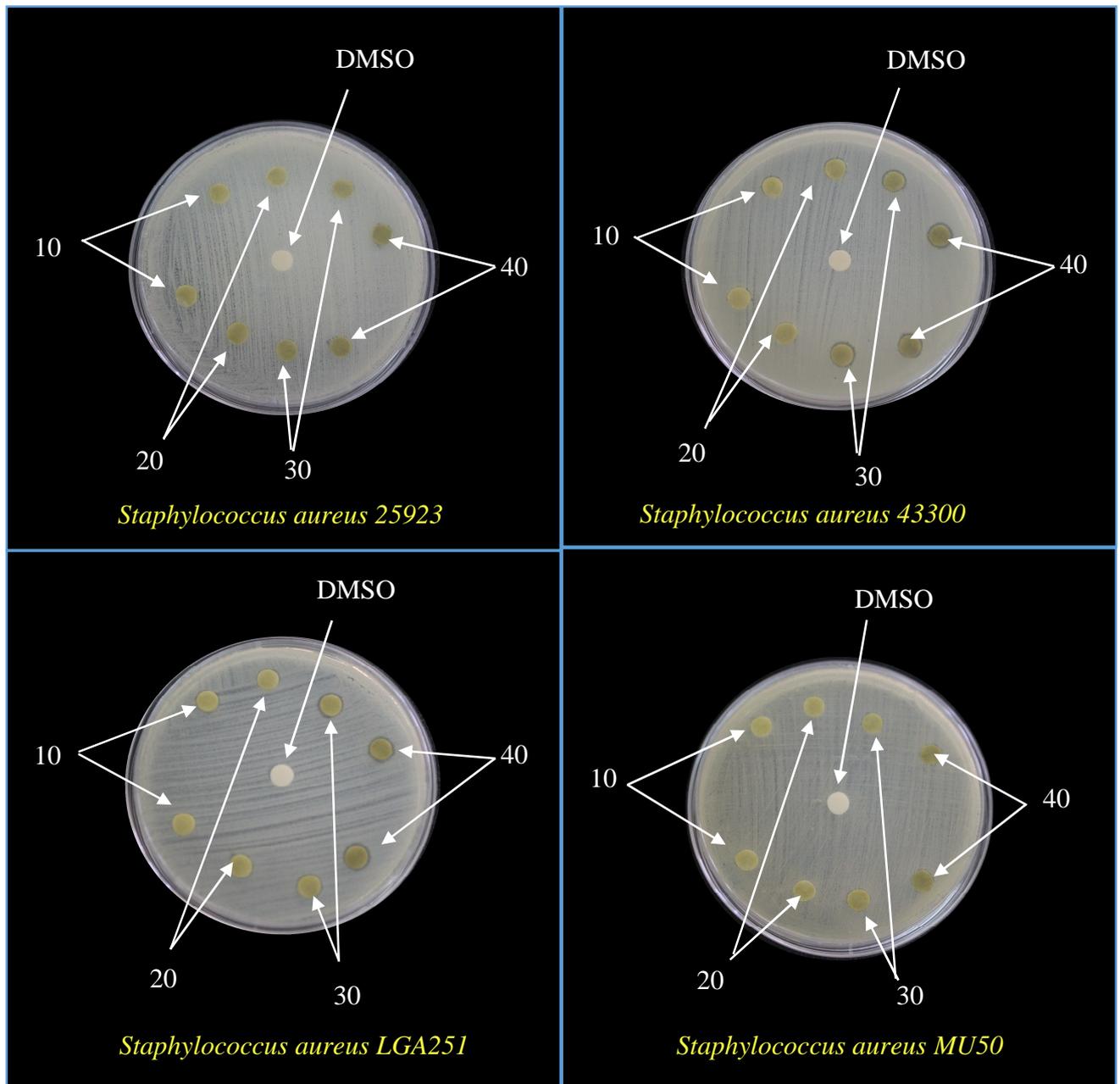


Figure 26 : Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait chloroformique sur les souches de référence.

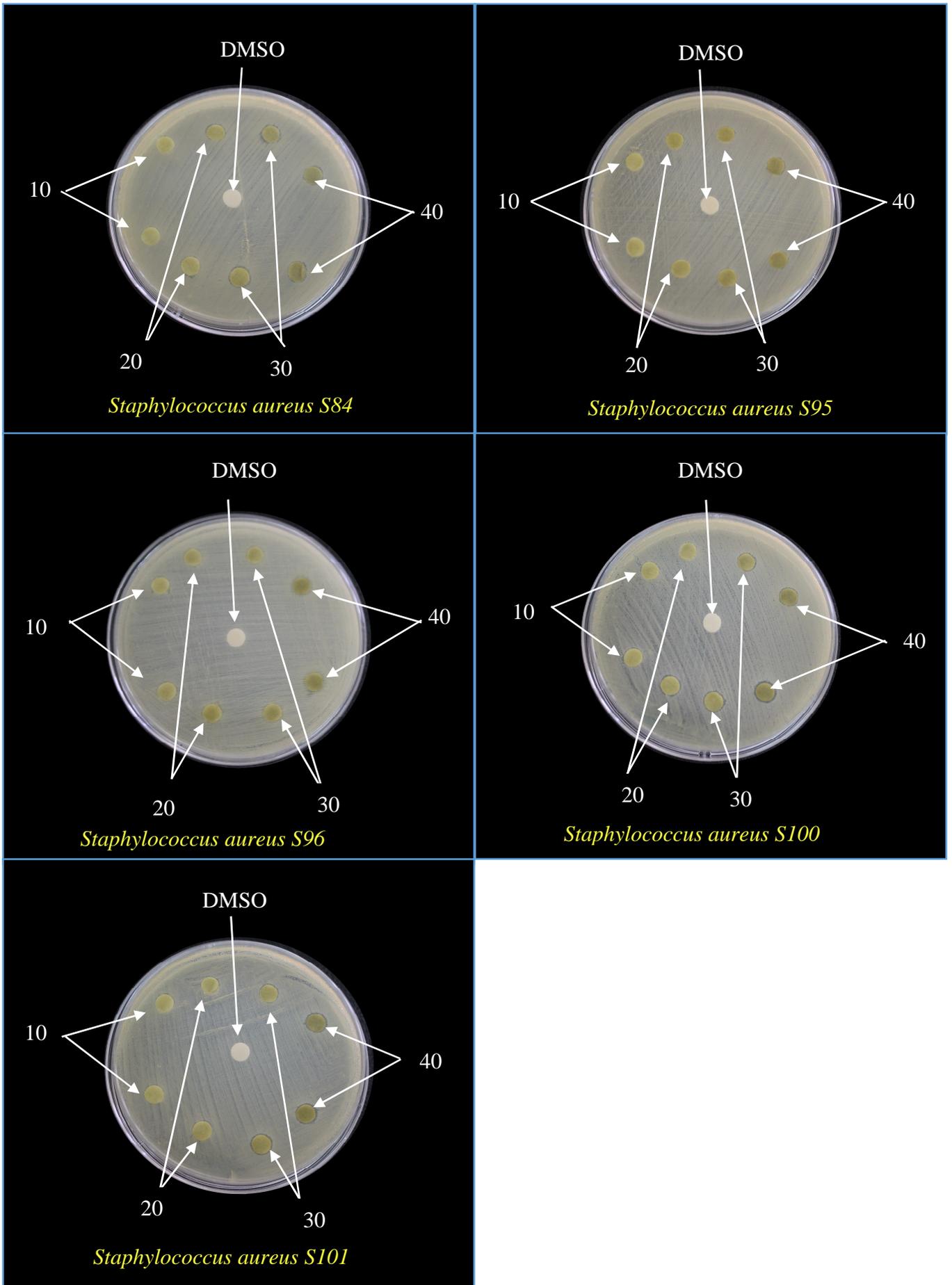


Figure 27 : Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait chloroformique sur les souches isolées multi-résistantes

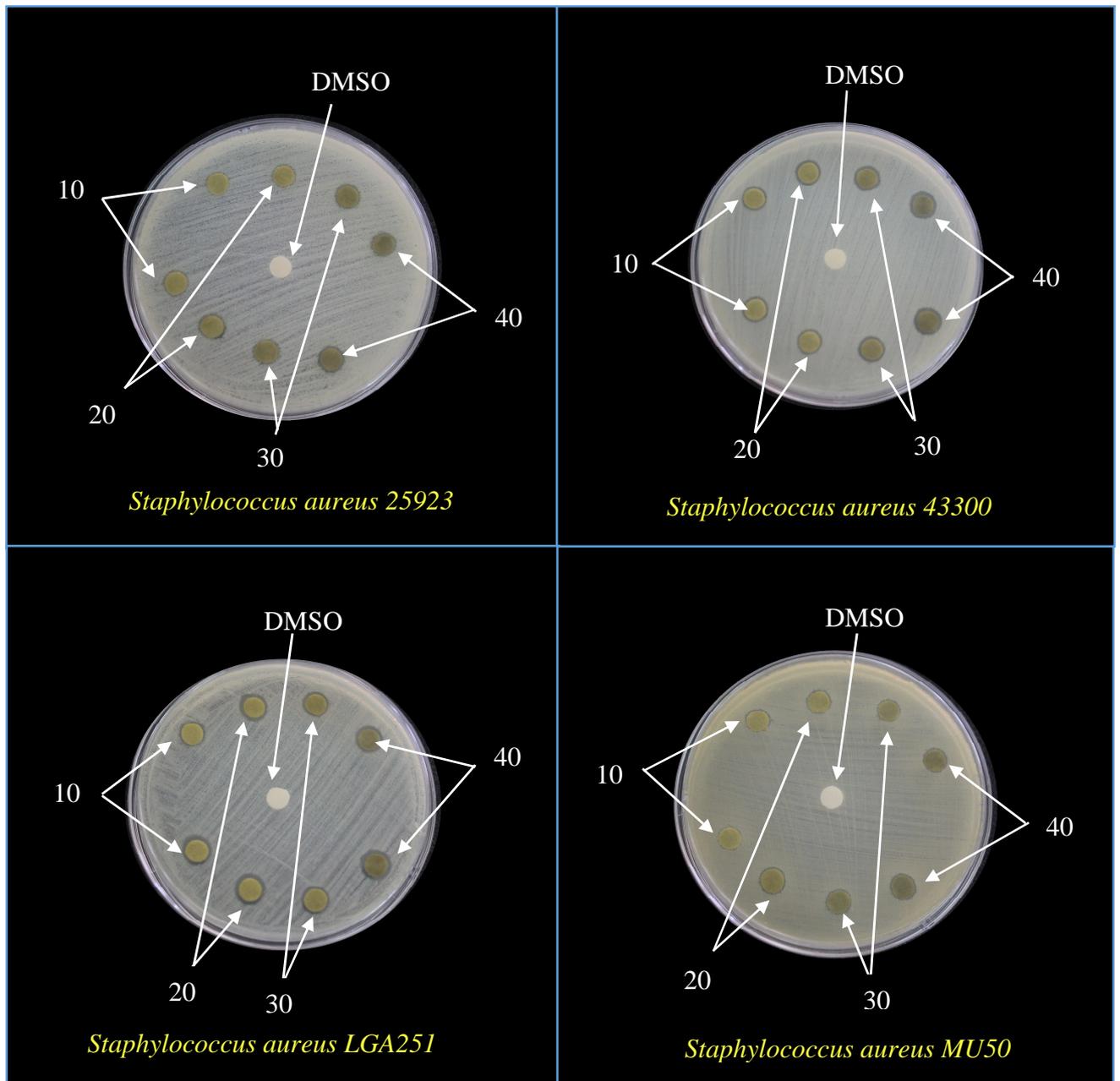


Figure 28 : Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait macéré dans l'acétate d'éthyle sur les souches de référence.

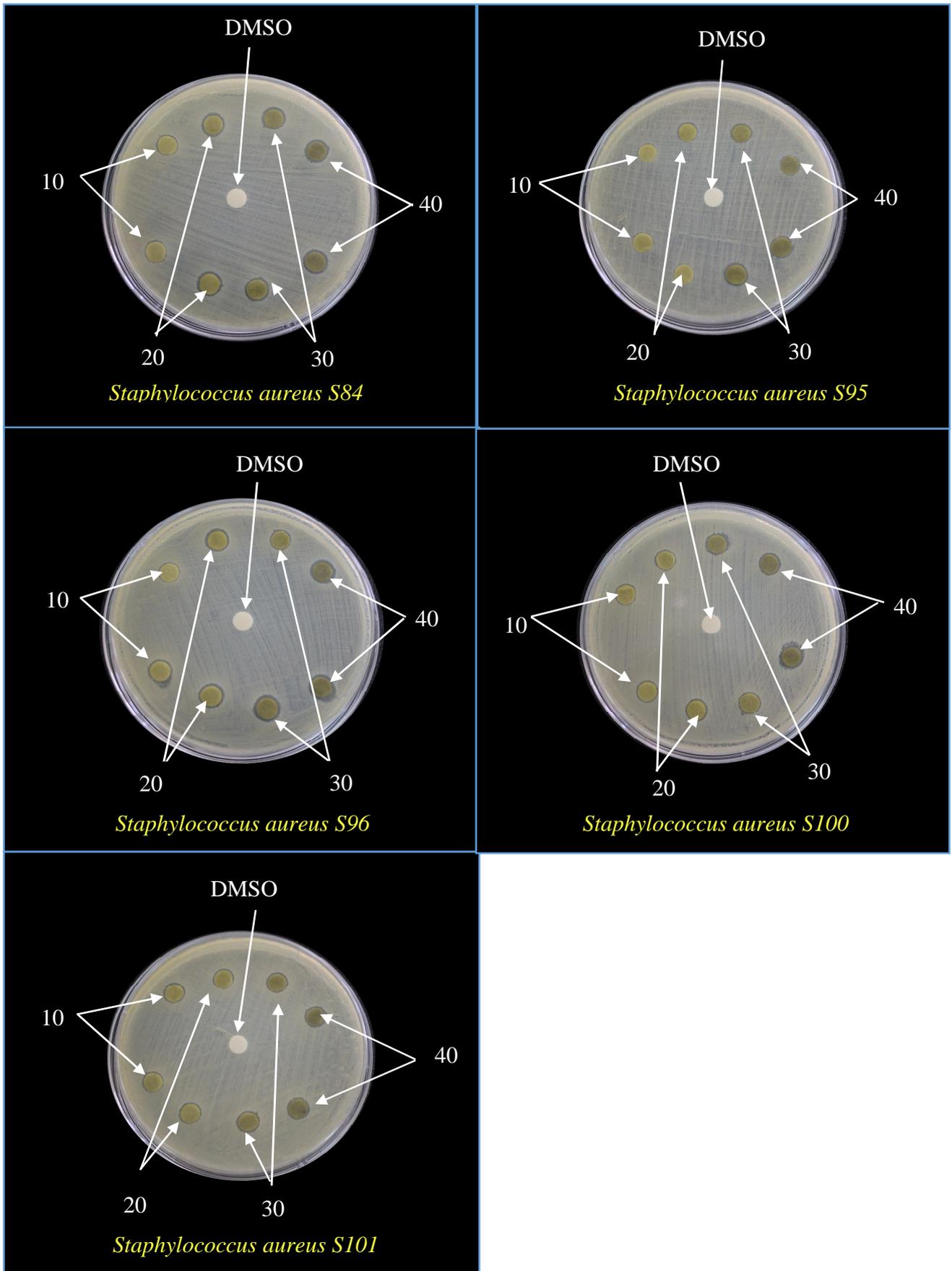


Figure 29 : Effet inhibiteur dose dépendant de l'extrait macéré dans l'acétate d'éthyle sur les souches isolées multi-résistantes.

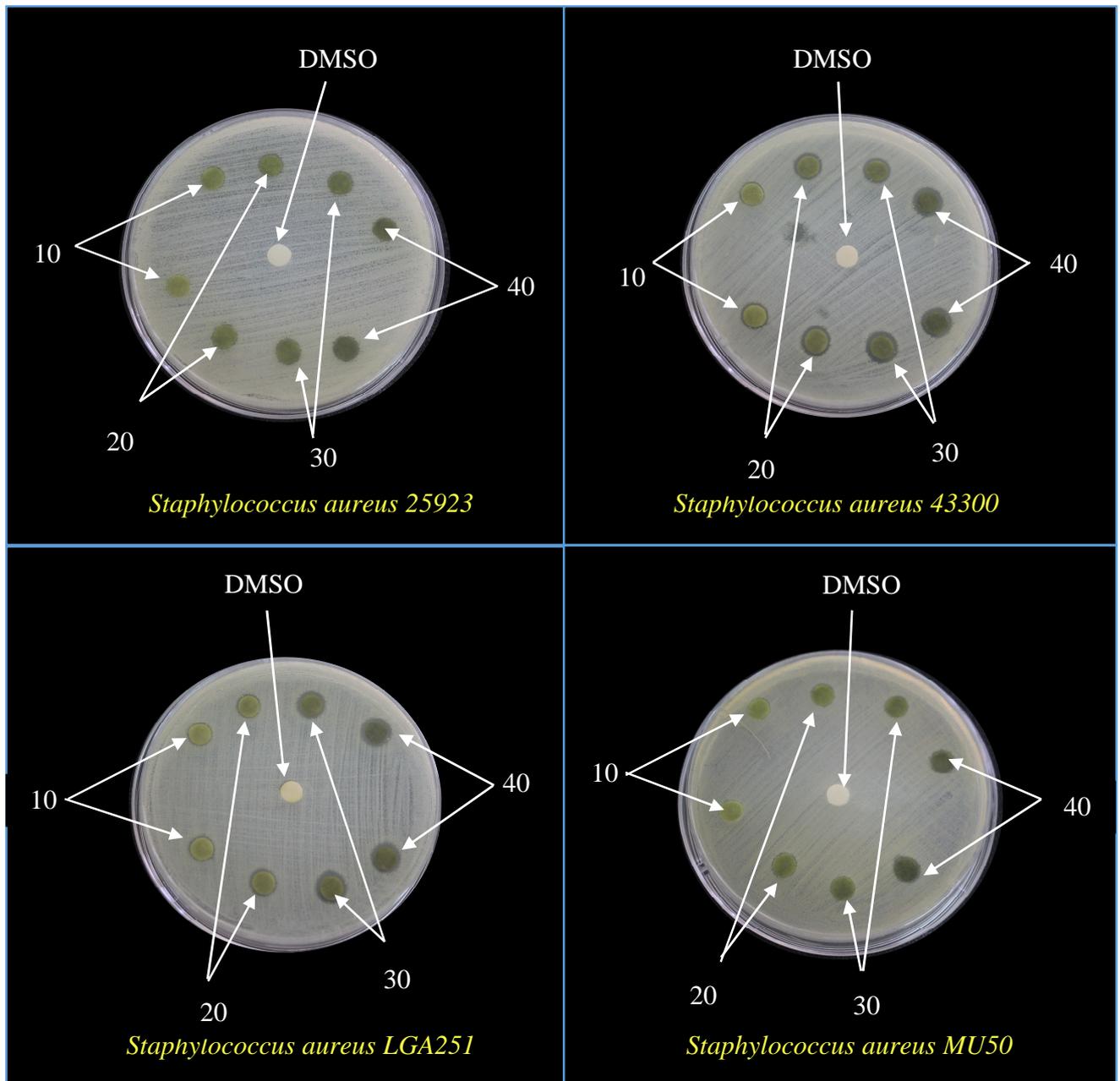


Figure 30 : Effet inhibiteur dose dépendent de l'extrait macéré dans le méthanol sur les souches de référence.

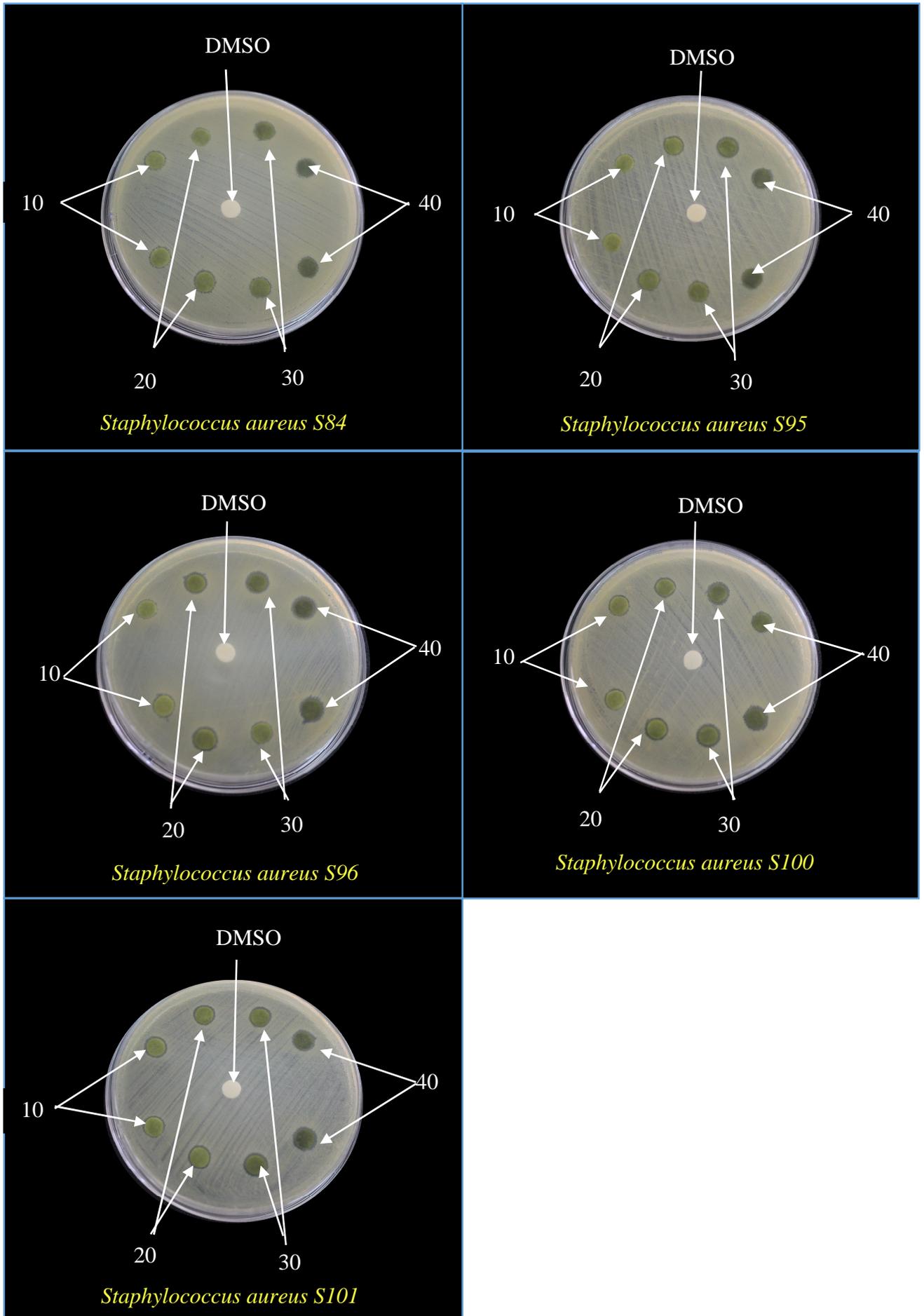


Figure 31 : Effet inhibiteur de l'extrait macéré dans le méthanol sur les souches isolées multi-résistantes.

L'activité antibactérienne des extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L. macérés dans un solvant organique (ECHL, EMET, EACT) et des extraits aqueux (EAM, EAD, EAI) a été évaluée dans cette étude, par la technique de diffusion sur gélose, cela *vis-à-vis* de neuf souches bactériennes, selon la méthode d'ADESOKAN. (2007).

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que les extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L. macérés dans un solvant organique (ECHL, EMET, EACT) ont exercés un effet inhibiteur sur la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est une souche de référence MSSA et sur les souches MRSA de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S. aureus* LGA251, *S. aureus* MU50) ainsi que sur les souches MRSA isolées et multi-résistantes (*Staphylococcus aureus* S84, *S. aureus* S95, *S. aureus* S96, *S. aureus* S100, *S. aureus* S101). Cet effet se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition au tour de disque imprégné d'extrait. Les diamètres des zones d'inhibitions sont compris entre 7 et 11mm. L'antibiotique chloramphénicol s'est montré plus actifs que les trois extraits macérés sur toutes les souches testées. Les diamètres d'inhibition sont compris entre 27.5 et 30mm. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que les extraits actifs sont des extraits bruts non purifiés alors que les antibiotiques standards sont des molécules pures

Les résultats du test du pouvoir antibactérien des trois extraits macérés (ECHL, AMET, EACT) sont avérés proches sur toutes les souches testés. A l'exception d'un cas, résulte de l'extrait d'EMET sur *Staphylococcus aureus* S95 (zone d'inhibition = 6.5 ± 0.5 mm) qui peut se traduire par des phénomènes physiques, soit la dispersion de solvant sur le disque est insuffisante, donc n'a pas fait un contact entre l'extrait et la bactérie, soit le solvant n'est pas absorbé par le disque. Sur *Staphylococcus aureus* LGA251 nous avons obtenu avec l'extrait ECHL et EACT une moyenne de diamètre d'inhibition maximale de 11 ± 0 mm. Cette souche semble être la plus sensible à ces extraits.

Ces résultats obtenus avec les extraits macérés dans un solvant organique (ECHL, EACT, EMET) pourraient confirmer l'efficacité des extraits d'*Urtica dioïca* L. et son pouvoir antibactérien. En effet, de nombreux travaux de recherche ont souligné cet effet antibactérien des feuilles d'*Urtica dioïca*. KUKRIC *et al.* (2012) ont signalé que l'extrait macéré dans l'éthanol et dissous dans le méthanol de feuilles d'*Urtica dioïca* L. exerce une activité antibactérienne sur *Bacillus subtilis* IP 5852 et *Escherichia coli* isolé à partir des aliments.

En outre, SINGH *et al.* (2013) ont signalé que les extraits macérés dans le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol exercent une activité antibactérienne sur *Mycobactérium semegmatis* responsable de pathologie infectieuse telle que la pneumopathie, avec un diamètre d'inhibition de 15mm, 10mm, 10mm respectivement. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenu dans cette étude. Egalement, la même étude a rapporté que l'extrait macéré dans l'hexane de feuilles d'*Urtica dioïca* L. possède un effet antibactérien sur *Mycobactérium tuberculosis* responsable de la tuberculose.

BOBIS *et al.* (2015), ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de feuilles de cinq plantes médicinales dont *Urtica dioïca*. Ils ont utilisé plusieurs souches dont *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* FV 755-0139, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que l'extrait macéré dans l'éthanol de feuilles d'*Urtica dioïca* possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries testés avec un diamètre d'inhibition de 18mm, 6mm, 6mm respectivement.

Cette activité observée pourrait s'expliquer par les résultats d'analyse chimique obtenus par GHEDIRA *et al.* (2009) ; SINGH *et al.* (2013) ; MANGAMBU *et al.* (2014) ; BOBIS *et al.* (2015), ainsi que d'autres, qui révèlent la présence des métabolites secondaire dans les feuilles d'*Urtica dioïca* tels que les tanins, alcaloïdes, et les flavonoïdes dont les propriétés antimicrobiennes ont déjà été démontrées (BOUZID. 2011).

En revanche, les extraits aqueux n'ont pas exercés un effet inhibiteur sur toutes les souches bactériennes testés. La méthode d'extraction pourrait être l'origine de ces résultats. En fait, Il a été rapporté que les huiles essentielles des plantes, et non leurs extraits, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (RIOS et RECIO. 2005).

Selon CANDAN et ses collaborateurs (2003), les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager. Parmi les composés responsables de l'action antibactérienne on trouve les diterpénoïdes, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes (FERNANDEZ-LOPEZ *et al.* 2005). Ces composés sont de nature hautement lipophile et sont extraits par des solvants de faible polarité comme le chloroforme (ALBANO et MIGUEL. 2010). Ceci pourrait expliquer l'absence de l'effet antibactérien dans les tests des extraits aqueux.

Les résultats du test d'activité antibactérienne des extraits aqueux obtenu dans ce travail sont loin de ceux indiqués par de GÜLÇİN *et al.* (2003), qui ont trouvé que l'extrait aqueux infusé de feuilles d'ortie dioïque exerce une activité antibactérienne remarquable sur neuf souches bactérienne dont *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 avec un diamètre d'inhibition de 8mm. En outre, SINGH *et al.* (2013) ont signalés que l'extrait aqueux de feuilles de la grande ortie a montré un effet inhibition sur *Mycobactérium semegmatis* avec une zone d'inhibition de 7mm. On peut céder cette divergence aux facteurs influençant la composition chimique des plantes. Les travaux de nombreux auteurs ont montré que les plantes réagissaient au milieu environnant et qu'au cours de leur vie, la composition chimique de leurs métabolites pouvait évoluer. Les extraits des végétaux sont donc très fluctuants dans leur composition, de la période de récolte ainsi de l'organe considéré. La maturité ou l'état phénologique de la plante au moment de la récolte sont difficiles à vérifier et à contrôler (DETHIER. 1996). Sur une même tige, les feuilles ou les fleurs n'apparaissent pas simultanément et suivant leur âge, n'ont pas la même composition (TOUCHE. 1997).

D'autre part, les facteurs climatiques (la température, l'humidité relative, le régime des vents, l'alternance de chaleur et de lumière, etc...) exercent une influence chez les végétaux. L'influence du sol ou facteur édaphique est aussi très grande. Les propriétés physiques du sol (porosité, rétention d'eau...), sa nature (argileuse, sablonneuse...) et sa composition (teneur en azote, terrains calcaires, siliceux...) sont des facteurs déterminants pour la végétation, ce que fait que la composition chimique d'une plante d'une même espèce varie selon le la zone géographique, ce que pourrait expliquer la divergence de nos résultats et ceux obtenu pas GÜLÇİN *et al.* (2003) (la grande ortie qu'ils ont utilisée a été récoltée en Turquie). D'un autre côté, les pratiques culturales telles que la densité de la population, l'intensité et les modalités de l'irrigation et l'apport des engrais sont également déterminants sur le rendement et la qualité de l'extrait végétal (GUIGNARD. 1983).

Le prétraitement du matériel végétal comme le séchage, les conditions de conservation, notamment les modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air et aussi du soleil ont également une influence sur la composition de l'extrait végétal. Le procédé d'obtention d'un extrait peut également intervenir sur sa composition chimique. En effet, il existe une abondante littérature sur les modifications de la composition au cours de l'extraction de l'extrait d'une plante, Sous l'action de la chaleur, de la teneur en oxygène, de l'état d'hydratation, de nombreuses réactions sont susceptibles de se produire telles que les réactions d'hydrolyse, de réarrangement photochimique ou, en milieu acide, d'oxydo-réduction (RETAMAR. 1986). De plus, la façon de mener les extractions (temps des opérations, broyages de la matière végétale, nombres de lavages) peuvent jouer sur la composition et les caractéristiques organoleptiques de l'extrait (DETHIER. 1996). Selon MOUSSAID *et al.* (2012), l'activité des principes actifs serait liée aux conditions de séchage et de broyage de la plante. D'autre part, il semble également que le broyage avec nitrogène liquide soit recommandé, car le broyage est aussi à l'origine de la génération de la chaleur responsable de la perte des molécules volatiles ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules thermolabiles (JONES et KINGHORN. 2005).

La méthode de dilution en milieu liquide et celle de la dilution en milieu solide ont été utilisées pour la détermination de la CMI.

Pour la méthode de dilution en milieu liquide, la CMI représente la plus basse concentration de l'extrait pour laquelle il n'y a pas de trouble induit par la croissance des germes étudiés, visible à l'œil nu, après un temps d'incubation de 24h. Le trouble a été visible dans tous les eppendorfs. Les résultats de cette méthode confirment que les extraits aqueux n'exercent pas un effet inhibiteur sur la croissance des germes testés.

La concentration minimale inhibitrice des extraits actifs (ECHL, EACT, EMET) a été évaluée par le billet de dilution sur milieu solide. Nos résultats confirment bien l'activité de ces trois extraits. Les CMI obtenus sont groupés dans le tableau X. L'EACT montre la plus basse CMI de 20mg/ml sur *S.aureus S95* et une CMI de 10mg/ml sur le reste des souches. L'EMET montre une CMI de 40mg/ml sur *S.aureus S95* et de 20mg/ml sur *S.aureus MU50*, tandis que l'ECHL montre une CMI de 40mg/ml sur *S.aureus S95* et une CMI 30mg/ml sur les autres souches. On remarque que l'EACT est l'extrait le plus actif sur ces souches. *S.aureus S95* semble être la plus résistante

Ces résultats sont proches de celui obtenu par BOBIS *et al.* (2015) qui ont signalé une CMI de 35mg/ml avec l'extrait de feuilles d'*Urtica dioïca* macéré dans l'éthanol sur *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, ainsi qu'une CMI de 35mg/ml sur *Bacillus cereus* ATCC 14579 et une CMI de 70mg/ml sur *E. coli* FV 755-0139.

Une étude similaire menée sur les extraits de feuilles d'*Urtica dioïca* L. par KUKRIC *et al.* (2012), avait donné une CMI de 36.2mg/ml sur *Bacillus subtilis*, la même étude a signalé une CMI de 72.4mg/ml sur une souche hospitalière d'*E. coli*. Par ailleurs, SINGH *et al.* (2003) ont trouvé une CMI de 250µg/ml avec l'extrait de feuilles d'*Urtica dioïca* L. macéré dans l'hexane sur *Mycobactérium tuberculosis*.

Du fait que la principale cible de ces composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort (RHAYOUR. 2002).

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des extraits végétaux peut dépendre du contenu en composés polyphénoliques. Les mécanismes d'action des composés naturels sont expliqués de différente manière selon les auteurs. Selon CHABOT *et al.* (1992), l'activité antimicrobienne est liée à la polarité des substances bioactives. Les composés les moins polaires comme les flavonoïdes n'ayant pas de groupement hydroxyle OH sur leur cycle B sont plus actifs *vis-à-vis* des agents microbiens que ceux portant le groupement hydroxyle. D'autre part, MORI *et al.* (1987) ont trouvé que les flavonoïdes trihydroxylés 3',4',5' sur le cycle B et substitués 3-OH sont nécessaires pour l'activité antimicrobienne.

Les travaux antérieurs de SARKER *et al.* (2005), montrent également que l'effet d'un extrait est probablement due à la synergie entre le nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement. Ceci est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les terpénoïdes, les glycostéroïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (SEIDEL. 2005). Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

2.2.3. Identification des champignons endophytes

Les champignons endophytes ont été isolés à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* par M^{me} SALMI D. Dans ce travail, l'identification des mycoendophytes a été faite en se basant sur les observations macroscopiques, morphologiques et structurales des mycoendophytes. De ce fait, l'identification est surtout fondée sur leurs caractères phénotypiques. L'identification nous a permis de sélectionner deux genres *Scytalidium* sp et *Alternaria* sp, les caractéristiques macroscopiques et microscopiques observés sont présentés dans les figures 32 ; 33 ; 34 ; 35 ; 36 et 37. Toutefois cette méthode semble insuffisante pour identifier l'espèce des champignons endophytes ainsi que le genre du mycélium stérile. Les résultats d'identification ont été confirmés par Mme SMAÏL-SADOUNE N.

- Mycélium stérile : n'a pas été identifié, on a observé des filaments sans qu'il y ait présence des spores, lors de l'observation microscopique, il se pourrait que ce mycoendophyte présente une reproduction sexuée.



Figure 32 : Mycélium stérile isolé à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* dans un milieu PDA.



Figure 33: Observation au microscope du mycélium stérile isolé à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* au grossissement 400.

- *Alternaria* sp : est un genre de champignons à reproduction asexuée (Deutéromycètes) de la famille des Pleosporaceae. La principale caractéristique d'identification d'*Alternaria* sp est la conidie. Les *Alternaria* sp sont des champignons fréquents dans notre environnement. Ils peuvent être isolés de végétaux très divers. *Alternaria* sp comprend près de 275 espèces (SIMMONS. 2007) avec des modes de vie saprophytes (LOGRIECO *et al.* 2009). Autant que parasites de faiblesse, les *Alternaria* sp sont capables de mener une existence saprophytique pendant des périodes plus ou moins longues.



Règne : *Fungi*

Division : *Ascomycota*

Classe : *Dothideomycetes*

Ordre : *Pleosporales*

Famille : *Pleosporaceae*

Genre : *Alternaria* sp

Figure 34 : *Alternaria* sp isolé à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* dans un milieu PDA.

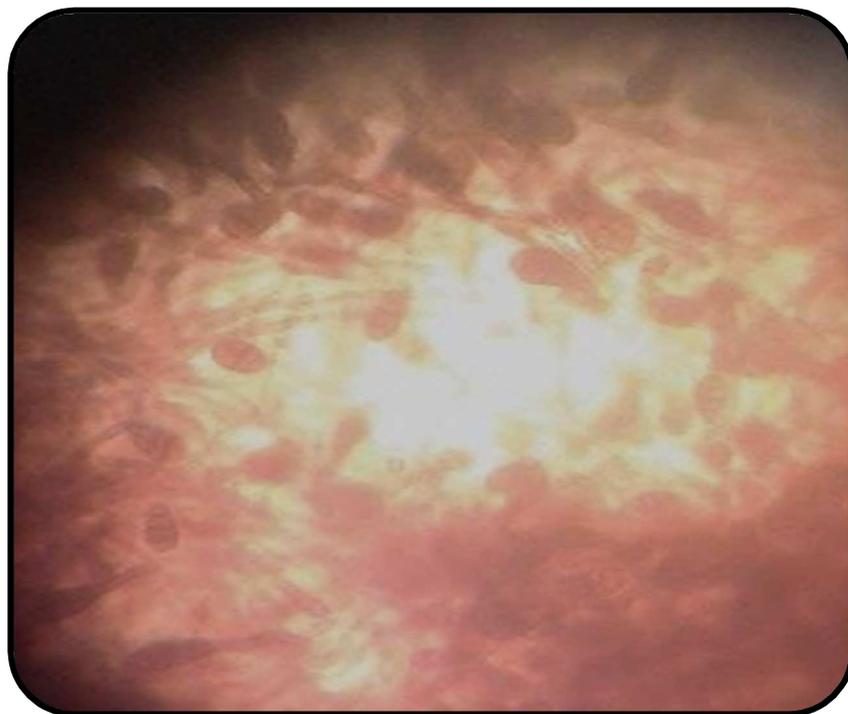


Figure 35 : Observation au microscope optique d'*Alternaria* sp isolé à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* au grossissement 400.

- *Scytalidium* sp : C'est un champignon endophytes caractérisé par des hyphes cloisonnés et arthroconydia. *Scytalidium* sp est un champignon qui appartient au groupe de *coelomycètes* qui est un groupe important et hétérogène, il est un genre de champignons dans l'ordre *Helotiales*, il n'a pas encore été placé avec certitude dans une famille. Ces organismes sont très répandus dans l'environnement et ils sont surtout présents dans le sol, le bois et les débris végétaux en décomposition. Il est connu pour causer des onychomycoses et des lésions sous-cutanées chez les humains. Deux espèces contaminent l'homme au niveau des pieds : *Neoscytalidium dimidiatum* et *Scytalidium hyalinum*. Ce genre de champignons anamorphique a une distribution à grande échelle et contient 18 espèces (GARCIA-AGUIRRE. 2013)



Règne : *Fungi*
Division : *Ascomycota*
Classe : *Leotiomycetes*
Ordre : *Helotiales*
Genre : *Scytalidium* sp

Figure 36 : *Scytalidium* sp isolé à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* dans un milieu PDA.

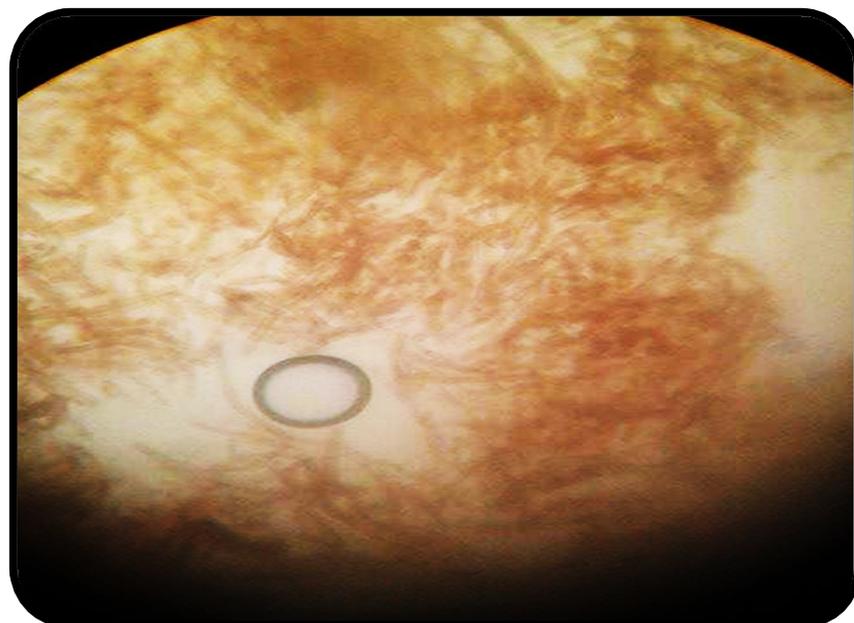


Figure 37: Observation au microscope optique de *Scytalidium* sp isolé à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* au grossissement 400.

2.2.4. Activité antibactérienne des mycoendophytes isolés à partir des feuilles d'*Urtica dioïca*

Le test d'activité antibactérienne de trois champignons endophytes isolées à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* a été effectué en utilisant la technique de double culture de diffusion sur gélose. Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm de la moyenne de zones d'inhibitions des deux essais, obtenus *vis-à-vis* des neuf souches de *Staphylococcus aureus* dont quatre MRSA de références et cinq souches MRSA isolées et multi-résistantes.

Tableau XI : Résultats du test d'effet antibactérien des champignons endophytes sur les souches testées.

Souche	Mycélium stérile 1	<i>Alternaria</i> sp	<i>Scytalidium</i> sp
<i>S. aureus</i> MU50	6 ± 0	13,75 ± 0,75	14,5 ± 0,75
<i>S. aureus</i> LGA251	6 ± 0	14,25 ± 0,25	15,25 ± 1
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	6 ± 0	13 ± 1	14,25 ± 0,25
<i>S.aureus</i> ATCC 43900	6 ± 0	15,75 ± 0,25	17,75 ± 0,25
<i>S.aureus</i> S84	6 ± 0	13 ± 0	15 ± 0
<i>S.aureus</i> S95	6 ± 0	16 ± 0	15 ± 0,5
<i>S.aureus</i> S96	6 ± 0	15 ± 0,5	17,25 ± 0,25
<i>S.aureus</i> S100	6 ± 0	14,25 ± 1,25	15,25 ± 0,25
<i>S.aureus</i> S101	6 ± 0	15,25 ± 1,25	15,5 ± 2

(-) aucune zone d'inhibition

Le Tableau XI montre qu'il y a une divergence dans l'effet inhibiteur des trois champignons endophytes sur la croissance des bactéries. Le pouvoir antibactérien exercé varie selon la souche et le champignon endophyte testé. Les souches testées semblent être sensibles au champignon *Alternaria* sp et de *Scytalidium* sp isolées à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* contrairement au mycélium stérile. Ce dernier n'a exercé aucun effet antibactérien sur les souches de références MRSA, la souche de référence MSSA ainsi que sur les souches MRSA isolées et multi-résistantes. *Alternaria* sp isolées à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* a montré un bon pouvoir antibactérien sur toutes les souches testées. Les valeurs de la moyenne de zones d'inhibition sont comprises entre 13 et 15,75mm. Également, *Scytalidium* sp isolées à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* a montré un bon pouvoir antibactérien sur les souches de références MRSA ainsi que sur les souches MRSA isolées et multi-résistantes. Les valeurs de la moyenne de zones d'inhibition sont comprises entre 14,25 et 17,75mm. On remarque que *Scytalidium* sp exerce un effet légèrement plus important que celui d'*Alternaria* sp.

L'histogramme suivant (figure 38) représente le pouvoir antibactérien des trois champignons endophytes sur les neuf souches bactériennes.

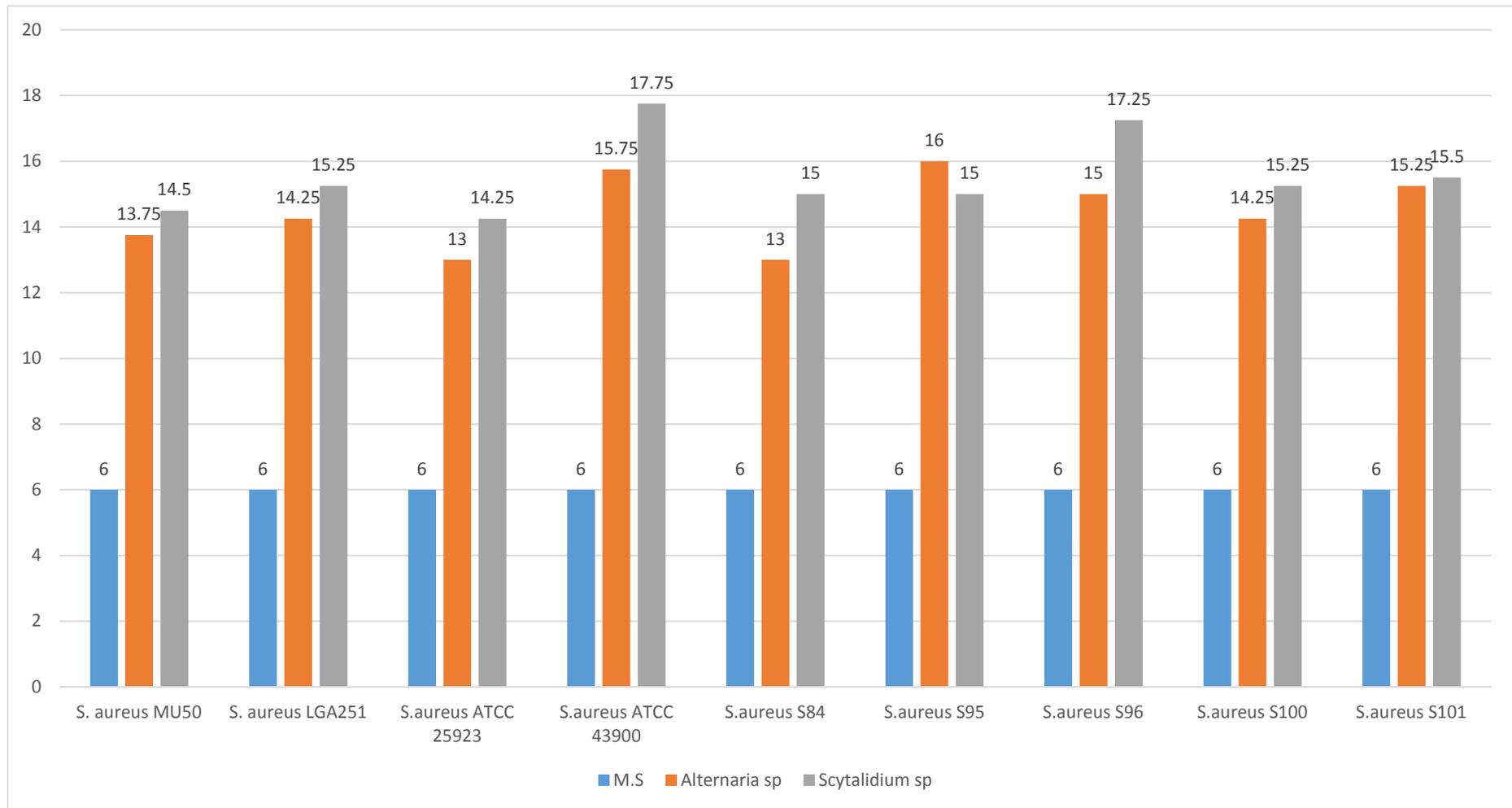
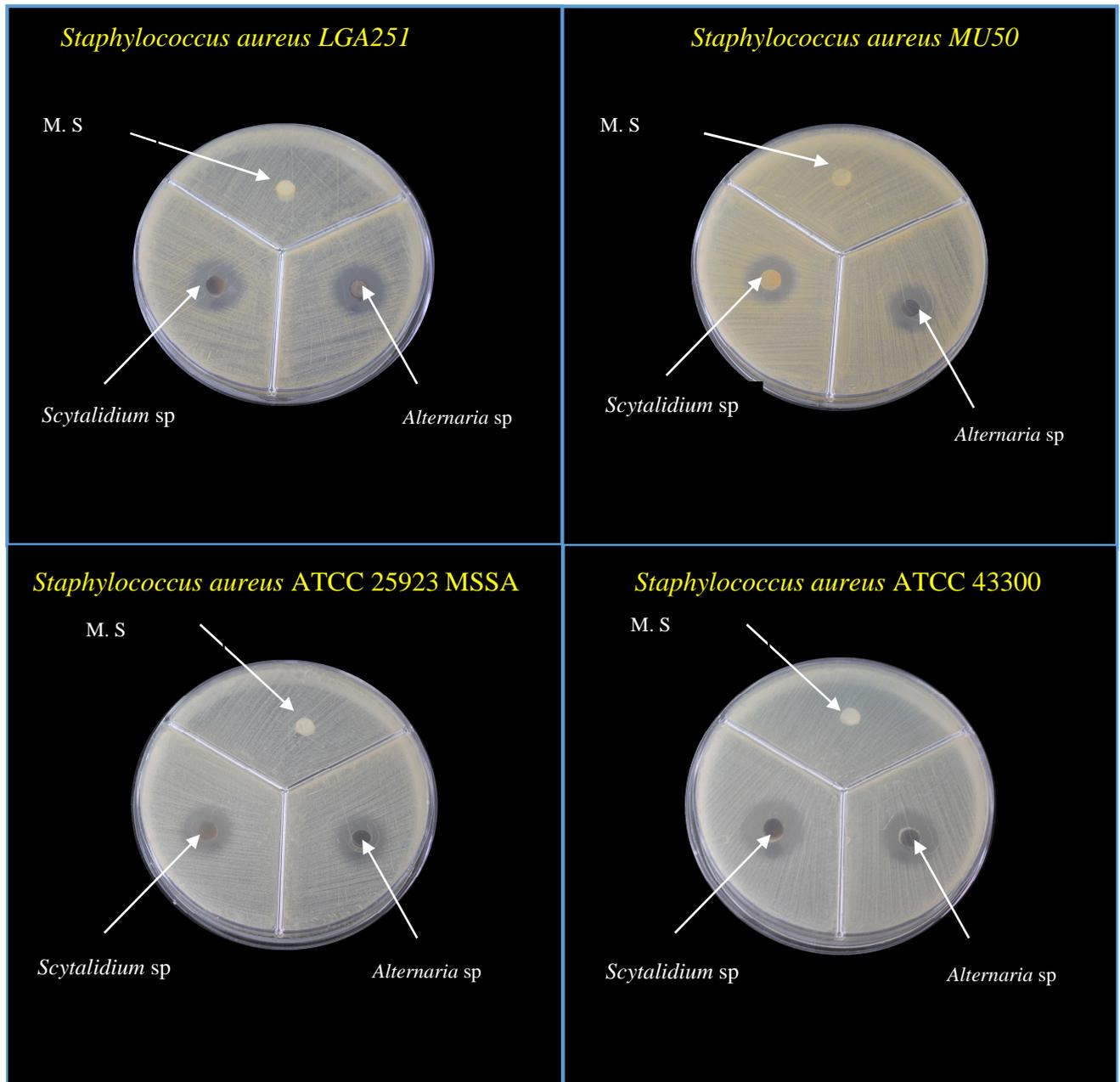


Figure 38 : Pouvoir antibactérien des champignons endophytes sur les souches de référence et les souches multi-résistantes MRSA.

Les figures 39 et 40 représentent les résultats obtenus dans le test d'activité antibactérienne des trois champignons endophytes isolées à partir des feuilles d'*Urtica dioïca* sur les souches *Staphylococcus aureus* MRSA de références, *Staphylococcus aureus* MSSA, ainsi que les souches *Staphylococcus aureus* MRSA isolées et multi-résistantes. On remarque sur les images qu'aucun effet antibactérien n'a été exercé par le mycélium stérile. Ce que se traduit par l'absence de zone d'inhibition au tour de ce champignon. Les zones d'inhibition au tour d'*Alternaria* sp et de *Scytalidium* sp montrent qu'ils ont un bon pouvoir antibactérien sur toutes les souches de *S. aureus*.



M. S : Mycélium stérile

Figure 39 : Pouvoir antibactérien des champignons endophytes sur les souches de référence.

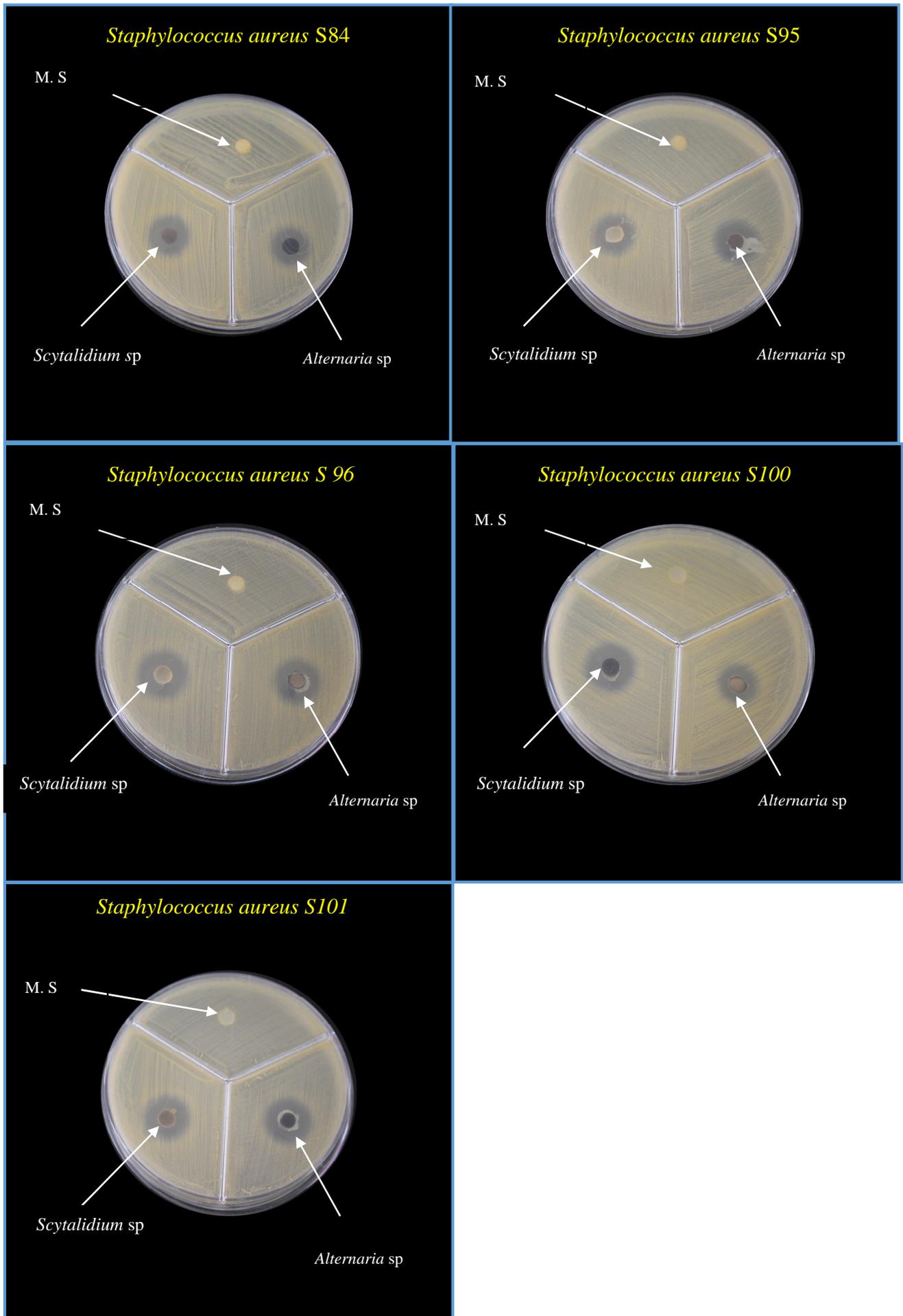


Figure 40 : Pouvoir antibactérien des champignons endophytes sur les souches MRSA isolées et multi-résistantes.

L'activité antibactérienne de trois champignons endophytes (mycélium stérile, *Alternaria* sp, *Scytalidium* sp) isolées à partir de feuilles d'*Urtica dioïca* a été évaluée vis-à-vis neuf souches de *Staphylococcus aureus* dont une souche MSSA, trois MRSA de références et cinq souches MRSA isolées et multi-résistantes, par la méthode de double culture de diffusion sur gélose décrite par DEVARAJU et SATISH. (2011).

Les résultats obtenus dans le présent travail montrent que *Alternaria* sp et *Scytalidium* sp ont une bonne activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est une souche de référence MSSA et sur les souches MRSA de référence (*Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *S. aureus* LGA251, *S. aureus* MU50) ainsi que sur les souches MRSA isolées et multi-résistantes (*Staphylococcus aureus* S84, *S. aureus* S95, *S. aureus* S96, *S. aureus* S100, *S. aureus* S101). Ce pouvoir antibactérien se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition au tour de disque. Cependant, le mycélium stérile n'a pas exercé un effet inhibiteur sur la croissance de bactéries testées.

Pour *Alternaria* sp, les valeurs de la moyenne de zones d'inhibition sont comprises entre 13 et 15,75mm. La souche la plus sensible à ce mycoendophyte est avérée *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, avec une moyenne d'inhibition de 15,75mm. La plus basse valeur de diamètre d'inhibition enregistré avec les blocs d'*Alternaria* sp est de 13mm obtenu contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* S101.

Par ailleurs, pour *Scytalidium* sp les valeurs de la moyenne de zones d'inhibition sont comprises entre 14,25 et 17,75mm. Les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 et *Staphylococcus aureus* S96 sont les plus sensibles à ce champignon endophyte, un diamètre de 17.75mm a été enregistré. On remarque que *Scytalidium* sp exerce un effet légèrement plus important que celui d'*Alternaria* sp. A titre d'exemple, sur la souche *Staphylococcus aureus* S96, la moyenne de zone d'inhibition enregistrée avec le bloc de *Scytalidium* sp est de 17,75mm alors qu'avec *Alternaria* sp la moyenne est de 15mm.

Ces résultats concordent avec ceux obtenus antérieurement par MACIA-VICENTE *et al.* (2008) ; NUANGMEK *et al.* (2008) ; TING *et al.* (2009) et DEVARAJU et SATISH. (2011), selon lesquels les endophytes peuvent avoir une activité antimicrobienne due à la production de composés antimicrobiens, qui sont capables d'inhiber un large spectre de microorganismes pathogènes.

Également, l'activité antibactérienne a été signalée chez des endophytes isolés à partir de *Withania somnifera* (MADKI *et al.* 2010) et à partir d'*Acanthus ilicifolius* L. et *Acrostichum aureum* L. (MARIA *et al.* 2005) qui ont montré une bonne activité contre des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et contre des champignons pathogènes. Ainsi que les endophytes isolés de *Garcinia mangostana* ont démontré une activité antibactérienne (RDJI *et al.* 2011).

Plusieurs études ont démontré que des champignons endophytes isolés de différentes plantes possèdent une activité antimicrobienne due à leur capacité de produire des métabolites secondaires. Ils synthétisent une large variété de métabolites secondaires, beaucoup de ces substances exposent des propriétés bioactives et qui ont été adoptées par conséquent pour usage médicale tels que les antibiotiques (STROBEL *et al.* 2004 ; PIMENTEL *et al.* 2011).

SCHULZ *et al.* (2002) avaient isolé à partir des champignons endophytes des composés appartenant à divers groupes. Ils ont signalés l'identification des terpénoïdes, stéroïdes, xanthones, chinones, phénols, isocoumarines, benzopyranones, tétralones, cytochalasines et enniatines.

Par ailleurs, les alcaloïdes sont d'origine naturelle des composés chimiques contenant des atomes d'azote basiques. Les alcaloïdes sont des métabolites secondaires assez fréquents chez les mycoendophytes, et certains d'entre eux présentaient également des activités antimicrobiennes (SOUZA *et al.* 2004). Ainsi que des phénols et des acides phénoliques ont été aussi isolés à partir de certaines cultures endophytes provenant d'une variété de plantes hôtes. D'autre part, de nombreux stéroïdes sont produits par des endophytes, mais la plupart des composés isolés ont montré une activité antimicrobienne modérée. Les sesquiterpéniques, diterpénoïds et triterpénoïdes sont les principaux térapénoïdes isolés des endophytes (YU *et al.* 2010). Certains endophytes produisent des quinones qui présentent une inhibition de croissance contre les phytopathogènes tels que les spiroketals d'*Edenia gomzompae*. L'acide Torreyanic est une quinone dimère inhabituelle isolée de *Pestalotiopsis microspora*, endophyte du *Torreya taxifolia* (LEE *et al.* 1996). Ces études pourraient expliquer l'activité antibactérienne des champignons *Alternaria* sp et de *Scytalidium* sp isolées à partir des feuilles d'*Urtica dioïca*.

Les résultats obtenus avec mycélium stérile peuvent s'expliquer par l'absence des métabolites secondaires qui possèdent une activité antibactérienne.

Références bibliographiques

- **ADESOKAN A., AKANJI M A et YAKUBU MT. (2007).**Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantiachloranthastem* bark. *African Journal of Biotechnology*, 22, 2502 - 2505.
- **AKBAY P., BASARAN A., UNDEGER U. et BASARAN N. (2003).***In vitro* immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioïca*. *Phytotherapy Research: PTR*,17 (1), 34-37.
- **ALBANO S. M., MIGUEL M.G. (2011).** Biological activities of extracts of plants grown in
- **ALBRECHTSEN B R., BJÖRKÉN L., VARAD A., HAGNER Å., WEDIN M., KARLSSON J., ET JANSSON S. (2010).**Endophytic fungi in European aspen (*Populustremula*) leaves diversity, detection, and a suggested correlation with herbivory resistance. *Fungal diversity*, 41:17–28.
- **ALI L., KHAN AL., HUSSAIN J., AL-HARRASI A., WAQAS M., KANG SM., AL., RAWAHI A., LEE IJ. (2016).**Sorokiniol: a new enzymes inhibitory metabolite from fungal endophyte *bipolarissorokiniana* LK12.*BMC Microbiol*, 9; 16(1):103.
- **ARNOLD A E., MAYNARD Z ET GILBERT G S. (2001).** Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: patterns of abundance and diversity. *Mycological research*,108(12): 1502-1507.
- **ARNOLDAE., ENGELBRECHT BMJ. (2007).**Fungal endophytes double minimum leaf conductance in seedlings of a tropical tree. *Journal of tropical ecology*, 23: 369–372.
- **ATTOU A. (2011).**Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Rutachalepensis* (Fidjel) de la région d'Ain Témouchent. Thèse de magister de l'université de Tlemcen, pp : 65-66.
- au niveau du végétal, *RivistaItaliana EPPOS, Numero spécial*, p. 288-294.
- **AWIKA J M., ROONEYL W., WUX., PRIOR R L et CISNEROS-ZEVALLOS L. (2003).** Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of agricultural and food chemistry*,51(23), 6657-6662.
- **AYTAÇ GÜDER and HALIL KORKMAZ. (2011).** Evaluation of in-vitro Antioxidant Properties of Hydroalcoholic Solution Extracts *Urtica dioïca*L.,*Malvaneglecta*Wallr. And their mixture.*Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (3): 913-923.
- **AZEVEDO J L., MACCHERONI JR. W., PEREIRA J O et DE ARAUJO W L. (2000).** Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic journal of biotechnology*, 3 (1): 40-65.
- **BADIAGA M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia Smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako, Mali.
- **BAGHAEI A., ESMAILY H., ABDOLGHAFFARI A H., BAEERI M., GHARIBDOOST F et ABDOLLAHI M. (2010).** Efficacy of setarud (IMod), a novel drug with potent anti-toxic stress potential in rat inflammatory bowel disease and

- comparison with dexamethasone and infliximab. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 47 (4), 219-26.
- **BARNES J., ANDERSON L A., PHILLIPSON J D. (2002).** Herbal medicines. 2^{ème}Ed., Pharmaceutical Press, Londres ; in : Langlade V. (2010). L'Ortie dioïque, *Urtica dioïca* L., étude bibliographique en 2010. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Nantes, Nantes, France.
 - **BENZIE IF., STRAIN JJ. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytic biochemistry* volume 239, Issue 1, 15 July 1996, Pages 70-76.
 - **BERTRAND BERNARD.(2002).** Les secrets de l'Ortie.- 7ème édition .Editions de Terran, 2002.- 128p.- (Collection Le Compagnon Végétal; n01).Paris ; in : DRAGHI F. (2005). L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca* L.) : Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
 - **BERTRAND. (2010).** les secrets de l'ortie. De terran. vol1. le compagnon végétal ; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
 - **BISHT SHIVANI., SNEHLATA BHANDARI and N S BISHT. (2012).** *Urtica dioïca* (L): an undervalued, economically important plant. *Agricultural Science Research journals*, vol. 2(5); pp. 250-252.
 - BLACKWELL. M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. *American journal of botany*, vol(98): 426 -438.
 - **BNOUHAM M., MERHFOUR F Z., ZIYYAT A., MEKHFI H., HAZIZ M., LEGSSYER A. K. (2003).** Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioïca*. *Fitoterapia*, 74, 677-681.
 - **BOBISA O., DEZMIREANA D. S., TOMOSA L., CHIRILAB F. ET AL. MARGHITASL. (2015).** Influence of Phytochemical Profile on Antibacterial Activity of Different Medicinal Plants against Gram_Positive and Gram_Negative Bacterial. *Applied Biochemistry and Microbiology*, , Vol. 51, No. 1, pp. 113–118.
 - **BOIZOT N., et CHARPENTIER .J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, 79-82.
 - **BOTINEAUM. (2010).** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. TEC and DOC. Lavoisier, Paris ; in : DRAGHI F. (2005). L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca* L.) : Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
 - **BOUVIER F., RAHIER A., CAMARA B. (2005).** Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Progress in lipid research*, 44, 357-429.
 - **BOUZID W., YAHIA M., ABDEDDAIM M., ABERKANE M C et AYACHI A. (2011).** Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'*Aubepin monogyne*. *Lebanese science journal*, (12), 59-69.
 - **BRABANT-HAMONIC JULIETTE. (2004).** Tisanes et vieux remèdes. Édition Ouest-France. Page 24 et page 56.

- **BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M.E. et BERSETC. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmwisstechnol*, 28, 25-30.
- **BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes Médicinales. 2^{ème} Ed., Lavoisier tec et doc, Paris ; in : BENHAMMOU N. (2011). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest du Sud-Ouest Algérien. Université Abou Bakr Belkaid, Tlemcen, Algérie.
- **BRUNETON J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie et Plantes Médicinales. 5^{ème} Ed., Lavoisier tec et doc, Paris ; in : DRAGHI F. (2005). L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca L.*) : Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
- **BRUNETON J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. 4^{ème} Ed., Lavoisier Tec & Doc. Éditions médicales internationales, Paris ; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **BUDIC-LETOC I., LOVRIC T., PEZO I., KLUJUZURIC JG. (2005).** Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced macération processes of the babic grape variety. *Food technology and biotechnology*, 43 (1): 47-53.
- **CANDAN F., UNLU M., TEPE B., DAFERERA D., POLISSIOU M., SÖKMEN A. et AKPULAT H A. (2003).** Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
- **CARROLL G C. (1986).** The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA N. J et VAN DEN HEUVEL J (Eds.). *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge University Press. Pp 205-222.
- **CARY STORBEL and BRYN DAISY. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67 (4): 491-502.
- **CECCHINI T., T. TECLI B. (2008).** Plantes médicinales. Sur les presses de pollina. L48125A. Ed 10223. Luçon. France.
- **CHABOT S., BEL-RHLID R., CHÊNEVERT R., PICHE Y. (1992).** Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New phytologist*, 122, 461-467.
- **CHAURASIA N., WICHTL M. (1987).** Flavonolglykoside aus *Urtica dioïca*. *Plantamedica*, 53 (5), 432-434.
- **CHRUBASIK J. E., BASIL D. R., WAGNER H. et CHRUBASIK S. (2007).** A Comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 14 (7-8), 568-79.
- **CHUNG K T., WONG T Y., WEI C I., HUANG Y W et LIN Y. (1998).** Tannins and human health: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(6), 421-464.
- **CHUNJIE LI., ZHIBIAO NAN., FEI LI. (2008).** Biological and physiological characteristics of *Neotyphodium gansuense* symbiotic with

- Achnatherum nebulosum*. *Microbiological research*, Volume 163, Issue 4, 15 July 2008, Pages 431–440.
- **CLARKEBB. WHITE JFJ., HURLEY RH., TORRES MS., SUN S., HUFF DR. (2006).** Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. *Plant disease*, 90: 994–998.
 - **CLAY K. (1990).** Fungal endophytes of grasses. *Ecology*, 21. 275-297.
 - **CLAY K. ET HOLAH J. (1999).** Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. Diversity in successional fields. *Science*, 285: 1742–1745.
 - **CLAY K., SCHARDL CL. (2002).** Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American naturalist*, 160: S99–S127.
 - **COUPLAN F. (2013).** Remèdes et recettes à l'ortie. Rustica Editions, Paris; in: DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
 - **COWAN MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
 - **DAHER C F., KARMEN G Bet BAROODYG M. (2006).** Effect of *Urtica dioïca* extract intake upon blood lipid profile in the rats. *Fitoterapia*, 77 (3), 183-188.
 - **DAR S A., GANAI F A., YOUSUF A R., BALKHI M U H., BHAT T M et SHARMA P. (2013).** Pharmacological and Toxicological Evaluation of *Urtica dioïca*. *Pharmaceutical biology*, 51 (2), 170-180.
 - **DECKERT R J. (2000).** Structural and ecological aspects of the relationship of phyllosphere fungi with their host, *Pinus strobus* L. Theses PhD. University of Guelph (Canada). 172 pp.
 - **DECKERT R J., HSIANG T ET PETERSON R I. (2002).** Genetic relationships of endophytic *Cladophiala* spp. from needles of *Pinus strobus*. *Mycological research*, 106(3): 305-313.
 - **DETHIER M. (1996).** Contribution à l'étude des plantes aromatiques du Burundi, *Thèse de doctorat, Université de Montpellier II*, 275 p.
 - **DEVARAJU R. AND SATISH S. (2011).** Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences* ;2: 75-79.
 - **DEY P M., HARBORNE J B. (1991).** Methods in plant biochemistry, 7^{ème} Ed., Academic press, London ; in : HARKATI B. (2011). Valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante *Asteraceae* : *Scorzonera undulata*. Université Mentourie, Constantine, Algérie.
 - **DIEDERICHS A. (2005).** La phytothérapie dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate. Etude de quatre plantes : *Epilobium* sp., *Pygeum africanum* H., *Serenoa repens* B et *Urtica dioïca* L., Université Louis Pasteur, Strasbourg.
 - **DOUGHARI J H., PUKUMA M S., and DE N. (2007).** Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. et *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *African Journal of biotechnology*, 19, 2212 - 2215.

- **DRAGHI F. (2005).** L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca L.*) : Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
- **Dragovic-Uzelac V., Levaj B., Mrkic V., Bursac D., Boras M. (2007).** The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food chem*, 102: 966-975
- **DUPONT F., GUIGNARD J L. (2007).** Abrèges Botanique Systématique Moléculaire. 14^{ème} Ed., Masson, Paris ; in : **BENHAMMOU N. (2011).** Activité antioxydant des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest du Sud-Ouest Algérien. Université AbouBakrBelkaïd, Tlemcen, Algérie.
- **FAETH S H. (2002).** Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *OIKOS* ,98: 25-36.
- **FENNANE M., TATTOU M., MATHEZ J., OUYAHYA A., EL OUALIDIJ. (1999).** Flore pratique du Maroc. Manuel de détermination des plantes vasculaires. *Travinstscisér, Bot I* : 558.
- **FERNANDEZ-LOPEZ J., ZHI N., ALESON-CARBONELL L., PEREZ-ALVAREZ J A. et KURI V. (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.
- **FISHER et YANG. (2002).** Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immune therapy. *Anticancer res*, 22(3):1737-54.
- **FLEURENTINJ. (2008).** Plantes médicinales: traditions et thérapeutique. Ouest France. Beau livre ; in : **DELAHAYE J. (2005).** Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **FRUTOS P., HERVÁS G., GIRÁLDEZ F and MANTECÓN A. (2004).** Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of agricultural research*, 2 (2), 191-202.
- fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: Palicourea longiflora (aubl.) riche *Strychnos cogens benth.* *Acta. Amaz.*, 34:185–195.
- **GANBER D., SPITELLER G. (1995).** Aromatase inhibitors from *Urtica dioïca* roots. *Planta med*, 21,2, 138-140.
- **GARCÍA ADRIANA., SANDRO A RHODEN., CELSO J RUBIN FILHO., CELSO V NAKAMURA., JOÃO A PAMPFILE . (2012).** Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. *Biological research*, 45:139-148, 2012.
- **GARCIA-AGUIRRE G., VANZINNI-ZAGO V. et QUIROZ-MERCADO H. (2013).** Growth of *Scytalidium* sp. in a counterfeit bevacizumab bottle. *Indian J Ophthalmol*. 2013 Sep; 61(9): 523–525.
- **GARY STROBEL and BRYN DAISY. (2003).** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, p. 491–502. vol. 67, No. 4.
- **GHEDIRA K., GOETZ P., LE JEUNE R. (2009).** *Urtica dioïca* L., *Urtica urens* et/ou hybrids (*Urticaceae*). *Phytotherapie*, 7, 279-285.

- **GRIFFIN S G., WYLLIE S G., MARKHAM J L., LEACH D N. (1999).** The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and fragrance journal*, (14), 322-332.
- **GÜLÇİN I., KÜFREVIÖ GLU I., OKTAY M.et BÜYÜKOKUROĞLU M E. (2003).** Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *Journal of ethnopharmacology*, 90, 205-215.
- **HAMILTON C E., BAUERLE T L. (2012).** A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal divers*,2012, 54, 39-49.
- **HAN Y. (2005).** Ginkgo terpene component has an anti-inflammatory effect on candida albicans-caused arthritic inflammation. *Internationlimmunopharmacology*, 5,1049-1056.
- **HARBORNE J B. (1980).** Secondary Plant Products, Encyclopedia of Plant Physiology. Charlwood BV Ed., Springer-Verlag, Berlin; in : SOUALEM Z. (2015). Activités biologiques du Seigle et du Sorgho chez le rat « Wistar » rendu diabétique par la Streptozotocine., Thèse pour le diplôme Doctorat en biologie, Université Abou BekrBelkaid, Tlemcen, Algérie.
- **HARBORNE J B., WILLIAMS C A. (2000).** Advances in Flavonoïd research Since 1992. *Phytochemistry*, 55,481-504.
- **HARPUT U. SEBNEM, ICLAL SARACOĞLU ET YUKIO OGIHARA. (2005).** Stimulation of Lymphocyte Proliferation and Inhibition of Nitric Oxide Production by Aqueous *Urtica dioica* extract. *Phytotherapy research: PTR*,19 (4), 346-48.
- **HELLER W., FORKMANN G. (1993).** Biosynthesis of flavonoids. Ed., Chapman & Hall, Londres; in: HARKATI B. (2011). Valorisation et identification structural des principes actifs de la plante asteraceae : scorzorenaundulata. Université Mentourie, Constantine, Algérie.
- **HERBERT R B. (1989).**The Biosynthesis of Secondary Metabolites. 2^{ème}Ed. Chapman and Halle, London; in: BOUBEKRI C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques.Thèse pour le diplôme Doctorat en biologie, Université Mohamed Khider, Biskra, Algérie.
- **HILL R A. (1993).**In the Chemistry of Natural Products. 2^{ème}Ed., Blackie and Son, Glasgow ; in : BOUMAZA O. (2013). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Genistatricuspida*(Fabaceae), et *Haloxylon scoparium*(Chenopodiaceae). These pour obtenir le diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique, Université Mentouri , Constantine, Algérie.
- **HILL R A. (2002).** Dictionary of Natural Products, 10^{ème}Ed., Chapman & Hall/CRC, New York ; in : TIGRINE C. (2014). Effets anticancéreux et chimioprotecteur de l'extrait polyphénolique, riche en flavonoïdes, des feuilles de *Cléome arabica*. Thèse pour le diplôme Doctorat Biochimie, Université Ferhat Abbas Sétif 1, Sétif, Algérie.
- **HONGSHENG YU., LEI ZHANG., LIN LI .,CHENGJIAN., ZHENG., LEI GUO., WENCHAO LI., PEIXIN SUN., LUPING QIN. (2010).** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes.*Microbiological Research*. Volume 165, Issue 6, 20 August 2010, Pages 437–449.

- **HSIOU Y D., YANG CH. W., and HANG CH L. (2000).** Journal of the chinese chemical society, 47, 561-566.
- **HYDE K D., SOYTONG K. (2008).** The fungal endophytes dilemma. *Fungal diversity*, vol, (33):163-173.
- **HYUN J., HYUN J K., HYANG S C. (2007).** Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids, *Life sciences*, **80,835-841**.
- **JAKUCS E., NAAR Z., SZEDLAY G., ORBAN S. (2003).** Glomalean and septate endophytic fungi in Hypopterygium mosses (Bryopsida). *Cryptogam mycol*,**24:27-37**.
- **JEONG S M., KIM S Y., KIM D R., JO S C., NAM K C., AHN D U., LEE S C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of agriculture and food chemistry*, **52: 3389-3393**.
- **JONES W P., KINGHORN A D. (2005).** Extraction of plant secondary metabolites. Natural products isolation. *Humana Press*, Totowa, **323-411**.
- **JULIA E. CHRUBASIK., BASIL D. ROUFOGALIS., HILDEBERT WAGNER., SIGRUN CHRUBASIK A. (2007).** Comprehensive review on the stinging nettle effect and efficacy profiles. Part II: *Urticae radix*. *Phytomedicine*, **14 (2007) 568-579**.
- **KAVALALI G. (2003).** *Urtica*: Therapeutic and Nutritional Aspects of Stinging Nettles. Ed., Taylor & Francis, Londres ; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioica*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **KHARE V., KUSHWAHA P., VERMA S., GUPTA A., SRIVASTAVA S., RAWAT AKS.(2012).** Pharmacognostic evaluation and antioxidant activity of *Urtica dioica* L. *Chin med*, **2012; 3:128-35**.
- **KIM H P., SON K H., CHANG H W and KONG S S. (2004).** Antiinflammatory plant flavonoids and cellular action mechanism. *Journal of Pharmacological Sciences*,**96, 229-254**.
- **KIM H. Y., CHOI G. J., LEE H. B., LEE S. W., KIM H. K., JANG K. S., SON S. W., LEE S. O., CHO K. Y., SUNG N. D. AND KIM J. C. (2007).** Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. *Letters in Applied Microbiology*; 44: 337.
- **KONRAD A., M. MÄHLER, S. ARNI, BEATRICE F., S. KLINGELHÖFER et F. SEIBOLD. (2005).** Ameliorative Effect of IDS 30, a Stinging Nettle Leaf Extract, on Chronic Colitis ». *International journal of colorectal disease*,**20 (1), 9-17**.
- **KOPYT'KO YA F., LAPINSKAYA E S., SOKOLOSKOYA T A. (2012).** Application, chemical composition, and standardization of nettle raw material and related drugs, *pharmaceutical chemistry journal*, **45(10), 622-631**.
- **KRINGS M., TAYLOR TN., HASS H, KERP H, DOTZLER N, HERMSEN EJ. (2007).**Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New phytologist*, **174: 648-657**.
- **KRISHNA D., CHALUVADI M., RAJ N and SRIPAL R. (2001).** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology*,**33, 2-16**.

- **KUKRIĆA Z., TOPALIĆ-TRIVUNOVIĆA N., KUKAVIČA M., MATOŠA B., PAVIČIĆA S., BOROJAB M. and SAVIĆA AV. (2012).** Characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.). *Original scientific paper*, **43**, 257-272.
- **KUMAR D S S., HYDE KD. (2004).** Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygiumwilfordii*. *Fungal diversity*, **17**:69–90.
- **LANGLADE V. (2010).** L'Ortie dioïque, *Urtica dioica* L., étude bibliographique en 2010. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Nantes, Nantes, France.
- **LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A. 1976.** Mycologie et Pathologie Forestière, (2), Pathologie forestière. Edition Masson. 478 pp.
- **LEJOLY L. (2005).** Systématique des plantes à fleurs en relation avec les principales plantes médicinales. Université Libre De Bruxelles Institut De Pharmacie.
- **LERBET B. (2011).** << l'ortie >>; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie – *Urtica dioica*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **LI W C., ZHOU J., GUO SY And GUO LD.(2007).** Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China. *Fungal Diversity*, **25**: 69-80.
- **Li H B., Cheng K W., Wong C C., Fan K W., F., TIAN Y. (2007).** Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food chemistry*, **102**: 771-776.
- **Li J Y., STROBEL G A ., HARPER J. K., E. LOBKOVSKY., and J. CLARDY. (2000).** Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus. *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org lett*, **2**:767–770.
- **LIU R H. (2004).** Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of nutrition*, **134**, 3479–3485.
- **LOGRIECO A., MORETTI A., SOLFRIZZO M. (2009).** *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal*. **2** (2): 129-140.
- **LUIS C., MEJI A., ENITH I., ROJAS., ZULEYKA MAYNARD., SUNSHINE VAN BAEI A., ELIZABETH ARNOLD., PRAKASH HEBBAR., GARY J SAMUELS ., NANCY ROBBINS., EDWARD ALLEN HERRE. (2008).** Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobromacaca pathogens. *Science direct*. *Biological Control* **46**: 4–14.
- **LUTZONI F., KAUFF .F., COX .CJ., MCLAUGHLIN .D., CELIO G., DENTINGER .B., PADAMSEE. M., HIBBETT D., JAMES. TY., BALOCH E., GRUBE M., REEB. V., HOFSTETTER V., SCHOCH C., ARNOLD AE., MIADLIKOWSKA J., SPATAFORA J., JOHNSON D., HAMBLETON S., CROCKETT M., SHOEMAKER R; SUNG GH; LÜCKING R; LUMBSCH T, O'DONNELL K, BINDER M., DIEDERICH P., ERTZ D., GUEIDAN C., HANSEN K., HARRIS RC., HOSAKA. K., LIM .YW., MATHENY. B., NISHIDA. H., PFISTER. D., ROGERS. J., ROSSMAN A., SCHMITT I., SIPMAN H., STONE J., SUGIYAMA J., YAHR R., VILGALYS R. (2004).** Assembling the fungal

- tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *Am j bot*, 91(10):1446-80. doi: 10.3732/ajb.91.10.1446.
- **MACHEIX J J., FLERIET A et CHRISTIAN A. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique. PPTUR : Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne ; in : BOUBEKRI C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Université Mohamed Khider, Biskra, Algérie.
 - **MACIA-VICENTE J. G., JANSSON H. B., MENDGEN K. AND LOPEZ-LLORCA L. V.** Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Canadian Journal of Microbiology* 2008; 54: 600-609.
 - **MADKI M. A., MANZOOR A. S., POWAR P. V. AND PATIL K. S. (2010).** Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2: 848-858.
 - **MALINOWSKI D P et BELESKY D P. (2000).** Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop science*, 40 (4):923-940.
 - **MANTHEY J M. (2000).** Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirc*, 7, 28-34. MODARRESI-CHAHARDEHI A., D. IBRAHIM, S. FARIZA-SULAIMAN, et L. MOUSAVI. (2012). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de biología tropical*, 60 (4), 1567-76.
 - **MARIA G. L., SRIDHAR K. R. AND RAVIRAJA N. (2005).** S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*; 1: 67-80.
 - **MAROUF A., JOËL R. (2007).** La botanique de A à Z. Ed Dunod, Paris ; in : KEBIECHE M. (2009). Activité biochimique des extraits flavonoïdiques de la plante *Ranunculus repens* L : effet sur le diabète expérimental et l'hépatotoxicité induite par l'Epirubicine. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat en biochimie, Université Mentouri , Constantine, Algérie.
 - **MAV A., TERZI Z., UFUK OZGEN., A YILDIRIM., and MAKSUT COS KUN. (2004).** Antioxidant Properties of Some Medicinal Plants: *Prangosferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malvaneglecta* (Malvaceae), *Cruciatataurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galiumverum subsp. Verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol pharm. Bull*, 27 (5) 702-705 (2004).
 - **MAVI A., TERZI Z., ÖZGEN U., YILDIRIM A and COSKUN M .(2004).** Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangosferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malvaneglecta* (Malvaceae), *Cruciatataurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galiumverum subsp. verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol pharm bull*, 27: 702-705.
 - **MITTERMEIER R A., N MEYERS., P R GIL., and C G MITTERMEIER. (1999).** Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered ecoregions. Toppan Printing Co. Tokyo. Japan.-887.

- **MITTMAN P. (1990)**. Randomized, double-blind study of freeze-dried *Urtica dioica* in the treatment of allergie rhinitis. *Planta med*,56, 1, 44-47.
- **MOKOSO M., DE DIEU J., KASALI M. F., NTOKAMUNDA K J. (2014)**. Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (Congo). *Journal of applied biosciences*, 75, 6211–6220.
- **MOREL J M. (2008)**. Traité Pratique de phytothérapie, Ed Grancher, collection le corps et l'esprit. Paris ; in : Langlade V. (2010). L'Ortie dioïque, *Urtica dioica* L., étude bibliographique en 2010.Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Nantes, Nantes, France.
- **MORI A., NISHINO C., ENOKI N., TAWATA S. (1987)**. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26, 2231-2234.
- **MOUSSAID M., ELAMRANI A A., BERHAL C., MOUSSAID H., BOURHIMI N., BENAÏSSA M. (2012)**. Comparative evaluation of phytochemical and antimicrobial activity between two plants from the *Lamiaceae* family: *Marrubiumvulgare*(L.) and *Origanummajorana*(L.). *International journal of natural products research*, 1 (1), 11-13.
- **MOUTSIE. (2008)**. L'ortie, Une Amie qui Vous Veut du Bien, l'Encyclopédie d'Utovie, Ed Utovie, Paris ; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioica*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **MURAKAMI A., TANAKA T., LEE J Y., SURCH Y J., KIM H W., KAWABATA K., NAKAMURA Y., JIWAJINDA S., OHIGASHIV H. (2004)**. Zerumbone, Asesquiterpene en subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *International journal of cancer*, 110, 481-490.
- **NICOLA DI VIRGILIOA., ELENI G PAPAZOGLOUB., ZOFIJA JANKAUSKIENEC., SARA DI LONARDOD.,MARCIN PRACZYKE., KATARYNA WIELGUSZE (2014)**. The potential of stinging nettle (*Urtica dioica*L.) as a crop with multiple uses. *Industrial crops and products* ,xxx (2014) xxx–xxx.
- **NUANGMEK W., MCKENZIE E. H. C. AND LUMYONG S. (2008)**. Endophytic fungi from wild banana (*Musa acuminata*Colla) works against anthracnose disease caused by *Colletotrichum musae*. *Research Journal of Microbiology* ;3: 368-374.
- **O'KENNEDY R., et THORNES R D. (1997)**. Coumarins: Biology, Applications and Mode of Action. John Wiley& Sons IncEd.,New York ; in : BENHAMMOU N. (2011). Activité antioxydant des extraits des composésphénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouestet du Sud-Ouest Algérien. Université AbouBakrBelkaïd, Tlemcen, Algérie.
- **OBERTREIS B et al. (1996)**.The effect of extracts of the roots of the stingingnettle (*Urtica dioica*). *Planta med*,21, 1, 31-32.
- oils", *J Verghese Ed., Synthite, Pub., Inde*.
- **OYAIZU M. (1986)**. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese journal of nutrition*,44, 307-315.

- **PATRICK B., JEAN L. et MICHEL S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{ère}Ed., Médecine – Sciences Flammarion, Paris ; in : Rhayour K. (2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacteriumphlei* et *Mycobacteriumfortuitum*. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Fès, Maroc.
- **PETRINI O., SIEBER T N., TOTIL., VIRET O.(1992).** Ecological and metabolite production, and substratutilization in endophyte fungi. *Natural toxine*, (1):185-196.
- **PETRINI O., STONE J., etCARROLL F E. (1982).** Endophytic fungi in evergreen shrubs in western oregon: a preliminary study. *Canadian journal of botany*, 60: 789-796.
- **PIMENTEL M. R., MOLINA G., DIONISIO A. P., MAROSTICA JUNIOR M. R. AND PASTORE G. M. (2011).**The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int*(23) : 211-250.
- **PINELLI P., IERI F., VIGNOLINI P., BACCI L., BARONTI S., ROMANI A. (2008).** Extraction and HPLC analysis of phenolic compounds in leaves, stalks, and textile fibers of *Urtica dioica*L., *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (19). Portugal. Industrial Crops and Products. 33: 1-6.
- **PRAKASH D., UPADHYAY G., BRAHMA N., and SINGH H.B. (2007).** Singh antioxidant and free radical scavenging activities of seeds and agri-wstes of somesvatietes of soybean (*glycine max*). *Foodchemistry*, 104:783-790.
- **RAMAROWICZA., R B PEGGB, P. RAHIMI-MOGHADDAMCB., BARLD J A. WEIL. (2004).** Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food chemistry*, 84 (2004) 551–562.
- **Rdji M., Sumiati A., Rachmayani R. and Elya B. (2011).** Isolation of fungal endophytes from *Garciniamangostana* and their antibacterial activity. *African Journal of Biotechnology*; **10**: 103-107.
- **REAUME TOM. (2010).** Stinging nettle *Urtica dioica*urticaceae-nettle family. Nature manitoba.
- **RETAMAR J.A. (1986),** "Essential oils from Aromatic species", Chapitre 3 de "On essential
- **RHAYOUR K. (2002).** Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacteriumphlei* et *Mycobacteriumfortuitum*, Thèse de doctorat. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès. Maroc. 158 p.
- **RIOS J. et RECIO M. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80-84.
- **RODRIGUEZ R. J., REDMAN R S. et HENSON J M. (2004a).** The role of fungal symbiosis in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 9: 261-272.
- **RODRIGUEZR J., J F WHITE JR., A E ARNOLD and RSREDMAN. (2008).** Fungal endophytes, diversity and functional roles. *New phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- **ROMBI M. et ROBERT D. (2006).** 120 Plantes Médicinales: Composition, Mode d'Action et Intérêt Thérapeutique...de l'Ail à la Vigne rouge. AlpenEd., Paris ; in :

- DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **ROSCHEK B., RYAN C F., MATTHEW M L et RANDALL S A. (2009).** Nettle Extract (*Urtica dioïca*) Affects Key Receptors and Enzymes Associated with Allergic Rhinitis .*Phytotherapy research: PTR*,23 (7), 920-26.
 - **SACHIN N., MANJUNATHA B L., KUMARAP M., RAVIKANTH G., SHWETA S., SURYANARAYANAN T S., GANESHIAIAH K N., UMA SHAANKER R. (2013).** Do endophytic fungi possess pathway genes for plant secondary metabolites?.*Current science*, vol(104) n°2: 178-182.
 - **SAIKKONEN K., WÄLI P., HELANDER MetFAETH S H. (2004).** Evolution of endophyte-plantsymbiosis. *Trends in plant science*, 19 (6): 275-280.
 - **SAMARTH R M., PANWAR M., SONI A., KUMAR M., KUMAR A. (2008).** Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radio protective plant extract. *Food chemistry*, 106, 868-873.
 - **SANCHEZ-MORENO C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *The international journal of foodscience and technology*,8, 121-137.
 - **SARKER S D., LATIF Z., GRAY A I. (2005).** Natural Products Isolation. Humana Press, Totowa ; in : ALI-BOUTLELIS D. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne,antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubiumvulgare* L. Thèse pour obtenir le diplôme de doctorat enbiologie végétale, UniversiteBadji Mokhtar – Annaba, Algérie.
 - **SCHARDL C., YOUNG C., FAULKNER J., FLOREAS., PAN J. (2012).** Chemotypic diversity of epichloae, fungal symbionts of grasses. *Fungal ecology*, 2012, 5, 331-344.
 - **SCHULZ B. AND BOYLE C. (2006).** What are Endophytes? In Soil Biology, V 9 Microbial Root Endophytes. B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp 1-13.
 - **SCHULZ B., WANKE U., DRAEGER S & AUST H J. (1993).** Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological research*, 97: 1447-1450.
 - **SCHULZ BJE. (2006).** Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In:Schulz BJE., Boyle CJC., Sieber TN. eds. *Microbial root endophytes*, 261–280.
 - **SCHULZ H., SCHRADER B., QUILITZSCH R., PFEFFER S., KRUGERH. (2003).** *Journal of agricultural and food chemistry*, 51, 24-75.
 - **SEENIVASAN P. (2006).** *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *Journal of complementary and alternative medicine*, (9), 6-39.
 - **SELOSSE MA., SCHARDL CL. (2007).** Fungal endophytes of grasses: hybrids rescued by vertical transmission? An evolutionary perspective. *Newphytologist*, 173: 452–458.
 - **SHANKAR NAIKB., SHASHIKALAJ., KRISHNAMURTHYLY. (2006).**Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their

- antagonistic activities in vitro. *Microbiological research*, vol164. Issue 3 -2009. Pages 290–296.
- **SIDDHURAJU. , P ET BECKER K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Seed extracts. *Food chemistry*,101(1), 10-19.
 - **SIEBER T N. (2002).** Fungal root endophytes. In WAISEL Y., ESHEL A et KAFKAFI U. (eds.) *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekkert Inc. pp 887–917.
 - **SIMMONS EG. (2007).** *Alternaria*. An Identification Manual. : CBS Biodiversity Series No. 6. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
 - **SINGH RS., HUSSAIN R., VERMA P., SHARMA. (2013).** Anti-mycobacterial screening of five Indian medicinal plants and partial purification of active extracts of *Cassia sophera* and *Urtica dioica* Asian. *Pacific journal of tropical medicine*, 366-371.
 - **SOARES J R., DINS T C P., CUNHA A P., ALMEIDA L M. (1997).** Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free radical research*, 26 (1997), p. 469.
 - **SOUZA, A. Q. L., SOUZA, A. D. L., FILHO et S. A. (2004).** Atividade antimicrobiana de
 - **STEVEN P., RACHEL C., MARTHA E., PAUL H., JANE Set PETER W.J. (2004).** Microbiology of waterborne diseases. *Elsevier academic press*, 71-132.
 - **STONE J K., POLISHOOK J D et WHITE J F. (2004).** Endophytic fungi. In MUELLER G. M., BILLS G.F. et FOSTER M. S. (eds.) Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods. *Elsevier academic press*, pp. 241-269.
 - **STOVALL ME et CLAY K. (1988).** The effect of the fungus, *Balansiacyperis* on growth and reproduction of *purple nutsedge*. *Cyperus rotundus*. *New phytol*, 109: 351–359.
 - **STROBEL G A (2003).** Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, vol(5): 535-544.
 - **STROBEL G. A. (2002).** Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical reviews in biotechnology*, 22: 315-333.
 - **STROBEL G., DAISY B.(2003).** Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and molecular biology*, Vol(67) n°4 : 491-502.
 - **STROBEL G., DAISY B., CASTILLO U. AND HARPER J. (2004).** Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*; **67**: 257-268.
 - **SUN X., GUO L D., HYDE X D. (2011).** Community composition of endophytes fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. *Fungal diversity*, vol(47):85-95.
 - **SURYANARAYANAN T S., MURALI T Set VENKATESAN G. (2002).** Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian journal of botany*, 80: 818-826.
 - **SURYANARAYANAN T S et THENNARASAN S. (2004).** Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal diversity*, 15: 197-204.
 - **TABUC C. (2007).** Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de

- Toulouse. Université de Bucarest, Spécialité: Pathologie, Mycologie, Génétique et Nutrition UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Laboratoire Biologie Animale. 190p.
- **TAN R X et ZOU W X. (2001).** Endophytes: à rich source of functional métabolites. *Nat prodrep*, 18: 448-459.
 - **TEISSEIRE P J. (1991).** Chimie de Substances Odorantes, Tec et Doc Lavoisier, Paris ; in : ZENASNI L. (2014). Etude de polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth et du genre *Nepeta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Thèse de doctorat, université Mohammed V Agdal, Rabat, Maroc.
 - **TESSIER A. (1994),** Phytothérapie Analytique, Phytochimie et Pharmacologie. Ed Marc-Aurèle. Paris, France ; in : Langlade V. (2010). L'Ortie dioïque, *Urtica dioïca* L., étude bibliographique en 2010. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Nantes, Nantes, France.
 - **TESTAI L., CHERICONI S., CALDERONE V., NENCIONIG., NIERI P., MORELLI and MARTINOTTI E. (2002).** Cardiovascular effects of *Urtica dioïca* L. (Urticaceae) root extracts: *in vitro* and *in vivo* pharmacological studies. *J. Ethnopharmacol*, 81(1): 105-109.
 - **TING A. S. Y., MAH S. W. AND TEE C. S. (2009).** Prevalence of Endophytes Antagonistic Towards *Fusarium Oxysporum* F. Sp. *Cubense* Race 4 in Various Plants. *Am -Eurasian J Sustain Agric*; 3: 399-406.
 - **TISSIER. Y. (2011).** Les vertus de l'Ortie. Tredaniel. Le Courrier du Livre. France; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
 - **TOLDY A., STADLER., SASVARIM., JAKUSJ., KYUNG J. J., CHUNGH. Y., BERKESI., CSABA N. (2005).** The effect of exercise and nettle supplementation on oxidative stress markers in the rat brain. *Brain research bulletin*, 65 (6), 487-93.
 - **TOOFANEE S B et DULYMAMODE R. (2002).** Fungal endophytes associated with *Cordemoya integrifolia*. *Fungal diversity*, 11: 169-175.
 - **TOTI L., VIRET O., CHAPELA I et PETRINI O. (1992).** Differential attachment by conidia of the endophyte, *Discula umbrinella* (Berk & Br.) Morelet, to host and non-host surfaces. *New phytologist*, 121: 469-475.
 - **TOUCHE J. (1997).** Représentativité et reproductibilité des extraits de végétaux aromatiques
 - **TSAO R., COATS J R. (1995).** Starting from nature to make better insecticides. *Chemtech*, 25, 23-28.
 - **TURKMEN N., VELIOGLU Y S., SARI F., POLAT G. (2007).** Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of black tea. *Molécules*, 12: 484-496.
 - **UPTON ROY (R.H. DAYU). (2013).** Stinging nettles leaf (*Urtica dioïca* L.): Extraordinary vegetable medicine. *Journal of herbal medicine*, 3 (2013) 9–38.
 - **URQUIAGA I and LEIGHTON F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Journal of biological research*, 33, 55-64.

- **VALNET JEAN. (1983).** Phytothérapie: traitement des maladies par les plantes.- 5ème édition. Paris: Maloine. 1983 - 942p ; in DRAGHI F. (2005). L'Ortie dioïque (*Urtica dioïca L.*): Etude Bibliographique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université Henri Poincaré, Nancy, France.
- **VELICKOVIÉ A S., RISTIÉ M S., VELIKOVIÉ D T., ILIÉAND S N., MITIÉ N D. (2003).** *Journal of the serbian chemical society*, **68(6)**, 435-445.
- **VERMERRIS W., NICHOLSON R. (2006).** Phenolic compound chemistry. Ed: SPRINGER. P: 1-70.
- **WICHTL M., ANTON R. (2003).** Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Lavoisier Tec & Doc, Paris ; in : DELAHAYE J. (2005). Utilisation de l'ortie –*Urtica dioïca*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université de Rouen, Rouen, France.
- **WILSON R. (1997).** Entophytic fungi from four tree species in New Brunswick and a comparison of two methods of identification of *Leptostromaisolates* of *Pinusresinosa*: morphology and molecular probing. Thèse Philosophia Doctor (PhD.). University of New Brunswick. Canada. 131 pp.
- **YATSUK V Y., SOCHNIKOVAO V., CHALYI G A. (2004).** Development, Study, and Marketing of a New pharmaceutical product, 2nd Ed., PGFA, Pyatigorsk; in: **KOPYT'KO YA F., LAPINSKAYA ES., SOKOLOSKOYA TA. (2012).** Application, chemical composition, and standardization of nettle raw material and related drugs; *pharmaceutical chemistry journal*, 45(10) 622-631.
- **YEN G C., DUH P D. (1994).** Scavenging effect of methanolic extract of *Peanut hulls* on free radical and active oxygen species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42, 629-632.
- **YU H., ZHANG L., LI L., ZHENG C., GUO L., LI W., SUN P. AND QIN L. (2010)** RECENT developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* ;**165(6)**: 437-449.
- **ZHANG H W., SONG Y C., TAN R X. (2006).** Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports*, vol(23): 753-771.

Annexes

Annexe 1

Composition des milieux de culture

❖ Milieu Mueller-Hinton (MH)

Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine.....	17.5 g
Amidon de maïs.....	1.5 g
Agar	17 g
pH = 7,4	

❖ Milieu Brain Heart Infusion (BHI)

Protéose-peptone	10,0 g
Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf	5,0 g
Glucose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogéo-phosphate de sodium	2,5 g
pH = 7,4	

❖ Potato Dextrose Agar (PDA)

Extrait de pomme de terre	
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

Annexe 2

Structure d'une lignine

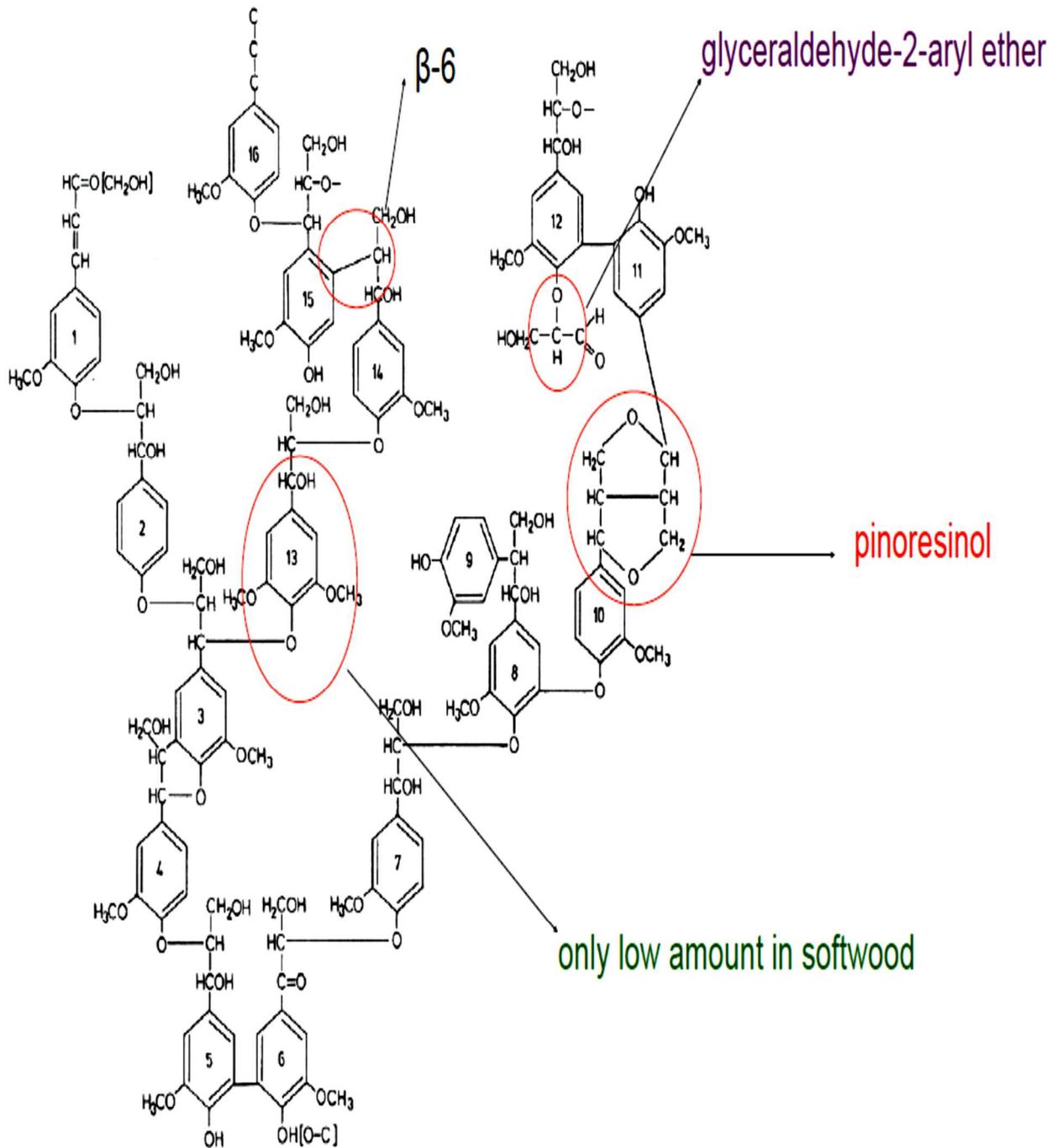


Figure 1 :La Composition chimique d'une lignine(ADLER. 1993).

Annexe 3

Structure des tanins condensés

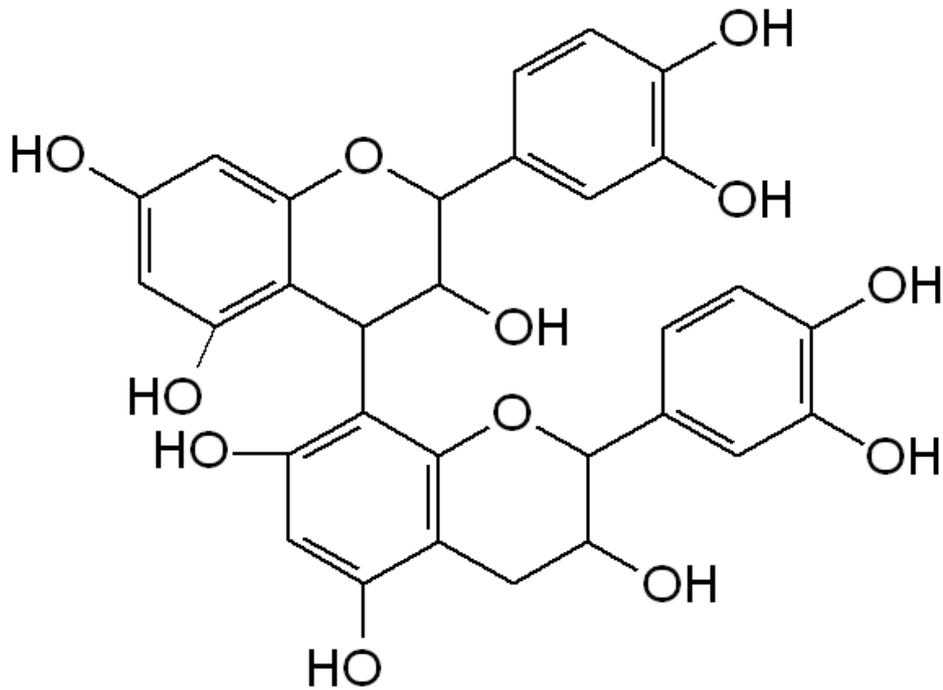


Figure 2 : La structure chimique du tanin condensé procyanidine(PERRET. 2001).

Annexe 4

- **Préparation de Phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4):**

0.9073g ———→ 100ml

- **Préparation de Phosphate de sodium dibasique (Na_2HPO_4):**

0.5935g ———→ 50ml

- **Préparation du tampon du phosphate (pH= 6,6):**

65,3ml de KH_2PO_4 + 34,7ml de NaHPO_4 .

- **Préparation de la solution TCA (10%) :**

10g 100ml ———→

- **Préparation de la solution de ferrocyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1%) :**

1g 100ml ———→

- **Préparation de la solution de Chlorure de fer FeCl_3 (0.1%) :**

0.1g 100ml ———→

EMET	conc2	0.713000							****	****							
Querc	conc1	0.778333							****	****	****						
EAD	conc6	0.783667							****	****	****						
EAI	conc5	0.791000							****	****	****	****	****				
EAM	conc4	0.796667							****	****	****	****	****				
Vit C	conc1	0.802000							****		****		****				
EAM	conc3	0.898333							****		****		****				
EAI	conc4	0.903333							****	****	****	****	****				
EMET	conc1	0.927667									****		****				
EACT	conc1	0.933333									****	****	****				
EAD	conc5	0.942333											****				
EAI	conc3	0.950000											****				
EAD	conc4	0.950333											****				
EAD	conc3	0.959667											****				
ECHL	conc1	0.971000											****				
EAM	conc2	0.980667											****				
EAD	conc2	0.993667											****				
EAI	conc2	1.026333											****	****	****		
EAD	conc1	1.036333											****		****		
EAI	conc1	1.136000											****		****		
EAM	conc1	1.138667											****	****			
BHT	conc1	1.235000															****

Conc : concentration

Groupe homogène : test de réduction sur le ferrocyanure de potassium.

Extrait	conc	variable																
ECHL	conc1	0.000000	****															
Vit C	conc1	0.000000	****															
EACT	conc1	0.000000	****															
Querc	conc1	0.000000	****															
BHT	conc1	0.000000	****															
EAI	conc1	0.000000	****															
EMET	conc1	0.000000	****															
EAD	conc1	0.000000	****															
EAM	conc1	0.000000	****															
EACT	conc2	0.289333		****														
EACT	conc3	0.355667		****	****													
ECHL	conc2	0.382333		****	****	****												
EAD	conc3	0.409000		****	****	****	****											
EAD	conc2	0.424333		****	****	****	****											
BHT	conc2	0.430000		****	****	****	****											
EACT	conc4	0.433000		****	****	****	****											
ECHL	conc3	0.444667		****	****	****	****	****										
EMET	conc2	0.467667		****	****	****	****	****										
EACT	conc5	0.483333		****	****	****	****	****										
ECHL	conc4	0.487000		****	****	****	****	****										
EACT	conc6	0.489000		****	****	****	****	****										
EAI	conc2	0.530333			****	****	****	****	****									
ECHL	conc5	0.546000			****	****	****	****	****									
BHT	conc3	0.557667			****	****	****	****	****									
Vit C	conc2	0.587000				****	****	****	****									
EMET	conc3	0.597000				****	****	****	****									
ECHL	conc6	0.601667				****	****	****	****									
Querc	conc2	0.624333					****	****	****		****							
EAM	conc2	0.659667						****	****	****	****							
Vit C	conc3	0.717667							****	****	****	****						
EAI	conc3	0.735333							****	****	****	****						
EAD	conc4	0.805667								****		****						
EAI	conc4	0.809000								****	****	****						
Querc	conc3	0.815333								****	****	****						
EMET	conc4	0.849333								****		****	****					
EAM	conc3	0.855667								****		****	****					

Groupe homogène : test d'aromatogramme

Extrait	souche	variable												
EAM	MU	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	a.MRSAd	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	a.MRSAc	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	a.MRSAb	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	a.MRSAa	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	S.a MRSA	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	S.a MSSA	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	LGA	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAI	MU	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAD	a.MRSAe	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAD	a.MRSAd	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAD	a.MRSAc	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAD	a.MRSAb	6.00000	****	****	****	****	****	****						
EAD	a.MRSAa	6.00000	****		****	****	****	****						
EAD	S.a MRSA1	6.00000	****			****	****	****						
EAD	S.a MSSA2	6.00000	****				****	****						
EAD	LGA	6.00000	****					****						
EAD	MU	6.00000	****											
EAM	a.MRSAe	6.00000	****											
EAM	a.MRSAd	6.00000	****											
EAM	a.MRSAc	6.00000	****											
EAM	a.MRSAb	6.00000	****											
EAM	a.MRSAa	6.00000	****											
EAM	S.a MRSA1	6.00000	****											
EAM	S.a MSSA2	6.00000	****											
EAM	LGA	6.00000	****											
EAI	a.MRSAe	6.00000	****											
EMET	a.MRSAb	6.50000	****	****	****	****	****	****						
EMET	a.MRSAe	6.50000	****	****	****	****	****	****						
EMET	a.MRSAc	7.00000	****	****	****	****	****	****	****					
EMET	MU	7.00000	****	****	****	****	****	****	****					
EMET	a.MRSAa	7.00000	****	****	****	****	****	****	****					
EMET	S.a MSSA1	7.00000	****	****	****	****	****	****	****					
EACT	S.a MSSA2	7.00000	****	****	****	****	****	****	****					
ECHL	a.MRSAb	7.50000		****					****	****				
EACT	a.MRSAa	7.50000		****	****				****	****				
EMET	a.MRSAd	7.50000		****	****	****			****	****				

EACT	a.MRSAc	7.50000		****	****	****	****		****	****			
EACT	a.MRSAb	7.50000		****	****	****	****	****	****	****			
ECHL	a.MRSAe	8.00000							****	****	****		
EACT	a.MRSAe	8.00000							****	****	****		
ECHL	S.a MSSA	8.00000							****	****	****		
EACT	MU	8.00000							****	****	****		
ECHL	MU	8.00000							****	****	****		
EACT	a.MRSAd	8.50000							****	****			
ECHL	a.MRSAd	8.50000							****	****			
ECHL	a.MRSAc	8.50000							****	****			
ECHL	a.MRSAa	8.50000							****	****			
EMET	S.a MRSA	8.50000							****	****			
EMET	LGA	9.00000								****			
EACT	S.a MRSA1	10.00000									****	****	
ECHL	S.a MRSA2	10.00000									****		
EACT	LGA	10.50000									****	****	
ECHL	LGA	11.00000										****	

Souches	Abréviations
<i>S. aureus</i> 25923	s.a MRSA1
<i>S. aureus</i> 43300	s. a MRSA2
<i>S. aureus</i> LGA251	LGA
<i>S. aureus</i> MU50	MU
<i>S. aureus</i> S84	a.MRSAa
<i>S. aureus</i> S95	a.MRSAb
<i>S. aureus</i> S96	a.MRSAc
<i>S. aureus</i> S100	a.MRSAd
<i>S. aureus</i> S101	a.MRSAe

Groupe homogène : test de double culture de diffusion sur gélose

mycoendophytes	souche	variable				
M.S	a.MRSAe	6.00000	****			
M.S	LGA	6.00000	****			
M.S	S.a MSSA1	6.00000	****			
M.S	a.MRSAd	6.00000	****			
M.S	a.MRSAc	6.00000	****			
M.S	S.a MRSA2	6.00000	****			
M.S	a.MRSAb	6.00000	****			
M.S	a.MRSAa1	6.00000	****			
M.S	MU	6.00000	****			
alternaria	S.a MSSA2	13.00000		****		
alternaria	a.MRSAe	13.00000		****		
alternaria	LGA	13.75000		****		
alternaria	MU	14.25000		****	****	
sytalidium	S.a MSSA1	14.25000		****	****	
alternaria	a.MRSAb	14.25000		****	****	
sytalidium	LGA	14.50000		****	****	
sytalidium	a.MRSAe	15.00000		****	****	****
sytalidium	a.MRSAd	15.00000		****	****	****
alternaria	a.MRSAc	15.00000		****	****	****
alternaria	a.MRSAa	15.25000		****	****	****
sytalidium	a.MRSAb	15.25000		****	****	****
sytalidium	MU	15.25000		****	****	****
sytalidium	a.MRSAa	15.50000		****	****	****
alternaria	S.a MRSA2	15.75000		****	****	****
alternaria	a.MRSAd	16.00000		****	****	****
sytalidium	a.MRSAc	17.25000			****	****
sytalidium	S.a MRSA2	17.75000				****