

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre
Département de Biologie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie appliquée

Par : ZEGOUBA bouchra

LAHLAH Bachra

Thème

Valorisation de l'extrait aqueux foliaire de l'ortie (El Herayeg), *Urtica dioica* par l'étude de ses activités anticholinestérase sur *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum vulgare*

Soutenu publiquement le : 26/06/2018

Devant le jury :

M. BOURAS Nouredine

Professeur

Univ. Ghardaïa **Président**

Mme. HAMID OUDJANA Aicha

Maître Assistant B

Univ. Ghardaïa **Encadreur**

M. BELHACHEMI Mohammed

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa **Examineur**

Habib

Année universitaire 2017/2018



Dédicace

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, L'amour, le respect, la
reconnaissance...*

Aussi, c'est tout simplement que Je dédie ce travail :

*A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils
ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*A mes chers frères : **MOHAMED ,AHMED ET SAAID.***

*A ma précieuse sœur : **AHLAM,** je souhaite son près retour et le bonheur dans sa
vie.*

*A toute la famille: **ZEGOUBA ET CHARRED.***

*Je dédie à mon binôme **BACHRA** qui a cru en moi jusqu'au bout et qui à toujours
était à mes cotés. A tous mes proches et amies : **SAAIDA, AMIRA, MERIEM.***

*A tous ceux qui me sont chers A toute mes amis partout et en particuliers et surtout
les étudiants de promotion 2 ème **MASTER** biochimie appliquée.*

A tous ceux qui me sont chers.



BOUCHRA



Dédicace

Avant tous, je remercie dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience pour réaliser ce travail malgré toutes les difficultés rencontrées.

Je dédie ce modeste travail : A mes parents, qui ont toujours cru en moi et qui, malgré la distance, m'ont accompagné moralement tout au long de ce parcours. L'éducation, soin et conseils qu'ils m'ont prodigués, m'ont toujours guidé pour faire les bons choix dans ma vie. Ils m'ont appris comment réaliser les rêves difficiles.

A mes chers frères : Ayachi, et sa femme Hoda, Saïd pour leur soutient et leur amour ;

A mes belles sœurs : Soumia et son mari Lazhar qui aide moi pour faire ce travail, Fayza, Yousra, Fatima et surtout ma petite chère Chahla

A mon adorable neveu : Mohamed lamine

A mon oncle Zineb et sa famille surtout son fils Lamri

A ma grande famille à Batna et à toute la famille: LAHLAH

A mon encadreur M^{me} HAMID OUDJANA Aicha, Pour avoir accepté la charge d'être rapporteuse de ce mémoire, merci pour votre guide de terminer ce projet.

A ma deuxième famille, celle de l'étude, mes enseignements de primaire à l'université, tous les travailleurs d'université de Ghardaïa. Mes amies, mes collègues et en particuliers et surtout les étudiants de promotion

2^{ème} MASTER biochimie appliquée.

Ma précieuse copine ne et mon binôme Bouchra

A mes chères amis : Rebha, Soad, Iman, Kalthoum.

A tous ceux qui par un geste, un sourire a contribué à l'élaboration de cet œuvre.



BACHRA

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier le grand Dieu qui nous à aidée et nous a donné le courage, la santé, la patience pour pouvoir réaliser ce travail.

Nous remercions pour ce faire les membres de nos familles pour leurs soutiens, et leurs encouragements.

*C'est avec beaucoup de reconnaissance que nous adressons nos sincères remerciements à l'égard de notre promotrice Mme **HAMIDOUAOUJANA Aicha** pour avoir proposé ce thème, suivi et dirigé ce travail, nous le remercions infiniment, pour son aide, ses conseils, ses orientations ainsi que, ses remarques et ses critiques qui nous ont été d'un apport précieux. Nous profitons l'occasion pour remercier les membres de jury d'avoir d'examiner et d'évaluer notre travail.*

*Un grand remerciement pour **M^r ABDELAZZIZ BRAHIM** Pour la préparation des échantillons. , ses suggestions et tout le soutien dont nous avons bénéficié.*

*Nous remercions tous les enseignants du département de la biologie ainsi que les techniciens du laboratoire du l'Université du Ghardaïa. surtout **M^r MESSAITFA, MOULAY, HICHEM ET CHIKH***

Un remerciement exceptionnel à tous mes amis et tous les étudiants de master 2 de la promotion 2018.

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

BOUCHRA ET BACHRA

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Taux de mortalité cumulée observé chez les larves (L4) de <i>Culex pipiens</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Urtica dioica</i>	29
2	Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué.....	32
3	Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL ₅₀ pour l'extrait aqueux d' <i>Urtica dioica</i>	33
4	Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez les larves de <i>Culex pipiens</i> traitées par l'extrait aqueux d' <i>Urtica dioica</i> à différentes concentrations.....	34
5	Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL ₅₀ évaluées pour les cinq concentrations de l'extrait aqueux.....	36
6	Taux de germination de <i>Sorghum vulgare</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles d' <i>Urtica dioica</i>	42

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Ortie dioïque. (A) parties aériennes, (1) fleur femelle, (2) fleur mâle, (6) akène, (7) poils urticants.....	05
2	Hydrolyse de l'acétylcholine.....	14
3	Structure tridimensionnelle de la TcAChE de feuillet β et d'hélices α	15
4	Le site actif de la TcAChE.....	16
5	Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase.....	17
6	Protocole d'extraction par reflux.....	19
7	Protocole d'étude de la mortalité.....	20
8	Représentation du <i>Sorghum bicolor</i>	22
9	Réaction colorimétrique d'Ellman	25
10	Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux foliaire d' <i>Urtica dioica</i> (Ortie).....	31
11	Relation entre la mortalité corrigée des larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i> et la dose l'extrait aqueux foliaire d' <i>Urtica dioica</i> (Ortie).....	33
12	A, B, C, D, E, action de l'extrait aqueux foliaires de l' <i>Urtica dioica</i> sur les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i>	37
13	Temps létale de 50 des larves (TL ₅₀) à différentes doses de l'extrait aqueux d' <i>Urtica dioica</i> (Ortie).....	38
14	Activité cholinestérasique chez les larves de stade 4 de <i>Culex pipiens</i> témoins et traités par différentes dose d'extrait de l' <i>Urtica dioica</i> (ortie).....	39
15	Taux de protéines chez les <i>Culex pipiens</i> (L ₄) traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de l' <i>Urtica dioica</i> (Ortie).....	40
16	l'activité spécifique cholinestérasique chez les <i>Culex pipiens</i> (L ₄) traités à différentes doses d'extraits des feuilles de l' <i>Urtica dioica</i>	41
17	Taux de germination de <i>Sorghum vulgare</i> (Sorgho) traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de l' <i>Urtica dioica</i> (Ortie).....	43

Liste des photos

N°	Titre	Page
1	<i>Urtica dioica</i> (HASSI LGARA, MENIA, GHARDAIA).....	03
2	Séchage et broyage de la plante.....	04
3	Photo de Larve L4 de <i>Culex pipiens</i>	08
4	Femelle de <i>Culex pipiens</i> lors d'un repas de sang.....	09
5	Œufs de <i>Culex pipiens</i>	10
6	Cycle de développement chez les moustiques.....	11
7	Bassin de prélèvement El-Atteuf, Ghardaïa.....	12
8	Cage utilisée pour l'élevage de <i>Culex pipiens</i>	13
9	Montage d'extraction à reflux.....	18
10	Montage de rota vapeur pour l'élimination du solvant.....	18
11	<i>Sorghum vulgare</i> (Sorgho).....	21
12	Teste de la fertilisation.....	23

Liste des abréviations

%	pourcentage
°C	dégré Celsius
µg	microgramme
µl	microlitre
AChE	acétylcholinestérase
BSA	le sérum albumine bovin.
<i>Cx pipiens</i>	<i>Culex pipiens.</i>
Cyc	Cystéine
DNTB	dithiobisnitrobenzoate
EC	enzyme commission
g	gramme
Glu	Glutamine
His	Histidine
L	litre
L4	Larve de quatrième stade.
M	la masse molaire
mg/l	milligramme par litre
min	minute
ml	millilitre
nm	nanomètre
Phe	Phénylalanine
S	seconde
Ser	Serine
TcAChE	Triade catalytique d'acétylcholinestérase
TNB	acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)

Résumé

Cette étude porte sur l'effet toxique de l'extrait aqueux foliaire de l'ortie (El herayeg), sur les larves L4 de *Culex pipiens* obtenus à partir d'un bassin d'irrigation dans la région d'el atteuf, wilaya de Ghardaïa. Ainsi que l'étude de l'effet fertilisant sur *Sorghum vulgare* L. Les feuilles d'*Urtica dioica* sont récoltées dans la région de HASSI LGARA (MENIA) de la wilaya de GHARDAIA au mois de Décembre et soumises à un séchage, broyage et une extraction à reflux. Les tests de la toxicité sont réalisés à différentes doses de l'extrait aqueux de *Urtica dioica* et permet de déterminer le taux de mortalité (augmente avec l'augmentation de la dose dans le temps), la DL₅₀ et la TL₅₀ les tests biochimiques permettent de déterminer l'activité cholinestérasique, l'activité spécifique et le taux de protéines. Chez les larves de *Culex pipiens*, le test de fertilisation permet de déterminer le taux de germination en fonction des différentes doses. L'étude montre que l'augmentation de la dose entraîne une diminution du taux de mortalité. Le temps léthal 50 (TL₅₀) le plus court est enregistré chez les larves traitées par la dose 100%, avec une dose létale 50 (DL₅₀) de 0,0446 mg/ml. Le traitement des larves de *Culex pipiens* par différentes doses d'extrait d'*Urtica dioica* (l'ortie) montre une diminution importante de l'activité cholinestérasique plus perceptible à la dose la plus forte, 2.89±0.48 nanomole /mn/ml pour la dose 100%, par rapport à l'activité cholinestérasique chez les individus témoins qui est égale à 5.59±0.35 nanomole /mn/ml. Ainsi il apparaît une diminution du taux de protéines pour tous les lots traités, le maximum de diminution est noté à la dose pure, avec 117,53 ± 3,555µg/ml, de même une variation de l'activité spécifique est notée, le maximum de diminution est à la dose 20% avec 0.020±0.012 nanomole /mn/µg. Le traitement de *Sorghum vulgare* par différentes doses d'extrait d'*Urtica dioica* montre un taux de germination plus élevé est enregistré au niveau des pots traités avec la dose la plus faible 20%. L'extrait foliaire aqueux de l'ortie possède des propriétés anticholinestérasique chez les larves de *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum vulgare* L.

Mots clés: *Urtica dioica* L., toxicité, extraits foliaires, *Culex pipiens* (L4), cholinestérase, mortalité, *Sorghum vulgare* L.

Abstract

This study investigates the toxic effects of aqueous foliar extracts of nettle (El herayeg) on *Culex pipiens* L4 larvae obtained from an irrigation basin in the region of El atteuf, wilaya de Ghardaia. As well as the study of the fertilizing effect on *Sorghum vulgare* L. Nettle leaves are harvested at HASSI LGARA (MENIA) region of the wilaya of GHARDAIA in December, and subjected to drying, grinding and reflux extraction. Toxicity tests are carried out at different doses of the aqueous extract of *Urtica dioica* and can determine the mortality rate (increased with the increasing of the dose over time), the LD50 and the TL50 biochemical tests allow determining cholinesterase activity, specific activity and protein level. In *Culex pipiens* larvae, the fertilization test makes it possible to determine the germination rate according to the different doses. The study shows that the increasing of dose results the decrease in the mortality rate. The shortest lethal time 50 (TL50) was recorded in larvae treated with 100% dose, with a lethal dose 50 (LD50) of 0.0446 mg / ml /. Treatment of *Culex pipiens* larvae by different doses of extract of *Urtica dioica* (nettle) shows a significant decrease in cholinesterase activity that's more noticeable at the highest dose, 2.89 ± 0.48 nanomol / min / ml for the 100% dose, compared with cholinesterase activity in individuals control that equals 5.59 ± 0.35 nanomol / min / ml. Thus, it appears a decrease in the protein level for all the treated batches, the maximum reduction is noted at the pure dose, with 117.53 ± 3.555 μg / ml, likewise a variation of the specific activity is noted, the maximum of decrease is at the 20% dose with 0.020 ± 0.012 nanomol / min / μg . The treatment of *Sorghum vulgare* with different doses of *Urtica dioica* extract shows a higher germination rate in the pots treated with the lowest dose of 20%. The aqueous leaf extract of nettle has anticholinesterase properties in larvae of *Culex pipiens* and fertilizer on *Sorghum vulgare* L.

Key words: *Urtica dioica* L., toxicity, leaf extracts, *Culex pipiens* (L4), cholinesterase, mortality, *Sorghum vulgare* L

ملخص

هذه الدراسة تتركز على الآثار السمية للمستخلصات المائية لنبات القراص (الحريق)، على يرقات بعوضة الكوليكس (المرحلة الرابعة) المتحصل عليها من حوض الري في منطقة العطف، ولاية غرداية. ودراسة تأثير التسميد على الذرة (البشنة). تم حصاد أوراق الحريق في حي حاسي القارة (المنبعة) ولاية غرداية في شهر ديسمبر، وتعرضها للبيضاء للتجفيف والطحن والاستخلاص، أجريت اختبارات السمية بجرعات مختلفة من المستخلص المائي للحريق (القراص)، وهذا يسمح بتحديد معدل الوفيات (زيادة مع زيادة الجرعة مع مرور الوقت)، الوقت القاتل 50، الجرعة القاتلة 50 و القياسات البيوكيميائية يسمحون بتحديد نشاط الكولينستيراز، النشاط المعين و مستويات البروتين ليرقات الكوليكس. كما يسمح لاختبار الإخصاب بتحديد معدل الإنبات وفقاً للجرعات المختلفة. أظهرت الدراسة أن زيادة الجرعة تؤدي إلى انخفاض معدل الوفيات. الوقت القاتل 50 الاقصر يتم تسجيله في الجرعة 100٪ من المستخلص ، مع جرعة قاتلة 50 مع 0.0446 ملغ / مل / . يظهر علاج يرقات الكوليكس انخفاضاً ملحوظاً في نشاط إنزيم الكولينستيراز عند أعلى جرعة ، 0.48 ± 2.89 نانومول / دقيقة / مل لجرعة 100٪ مقارنة مع نشاط الكولين للأفراد المراقبة أي ما 5.59 ± 0.35 / دقيقة / مل، ها كذا يبدو أن هناك انخفاض في مستويات البروتين لجميع المجموعات المعالجة، ويلاحظ الحد نانومول الأقصى في الجرعة النقية ، مع 117.53 ± 3.555 ميكروغرام / مل ، وبالمثل لوحظ وجود اختلاف في النشاط المحدد ، والحد الأقصى من الانخفاض هو في جرعة 20 ٪ مع 0.012 ± 0.020 نانومول / دقيقة / ميكروغرام. يظهر علاج نبات الذرة الرفيعة (البشنة) بجرعات مختلفة من مستخلص نبات الحريق (القراص) معدل إنبات أعلى في الأوعية المعالجة بأقل جرعة من 20٪. المستخلص المائي لأوراق الحريق له خصائص المبيدات الحشرية وانتيكولينستيراز على يرقات بعوضة الكوليكس والأسمدة على ذرة البشنة.

الكلمات المفتاحية: الحريق (القراص) ، السمية ، مستخلص ورقي، بعوضة الكوليكس ، كولينستيراز، وفيات،

الذرة البيضاء (البشنة).

TABLE DES MATIERES

Dédicace

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Liste des abréviations

Résumé

Introduction..... 1

CHAPITRE I- Méthodologie de travail

I.1.-Principe adopté 3

I.2.- Matériels d'études 3

I.2.1.-Matériel biologique 3

I.2.1.1.-Choix de la matière végétale 3

I.2.1.1.1.-Dénominations vernaculaires 4

I.2.1.1.2.-Position systématique 4

I.2.1.1.3.-Description de la plante 5

I.2.1.1.4.-Habitat 6

I.2.1.1.5.-Compositions chimiques 6

I.2.1.1.6.-Domaines d'utilisation de l'Ortie 7

I.2.1.2.Choix de l'insecte 8

I.2.1.2.1. Généralité sur *Culex pipiens* 9

I.2.1.2.2.-Position systématique..... 9

I.2.1.2.3.-Cycle de développement 10

I.2.1.2.4.-Elevage des moustiques 12

I.2.1.2.4.1.-Echantillonnage 12

I.2.1.2.4.2. Elevage 12

I.2.1.3.-Cholinestérase 13

I.2.1.3.1.-Acétylcholinestérase 13

I.2.1.3. 1.1.- Définition 13

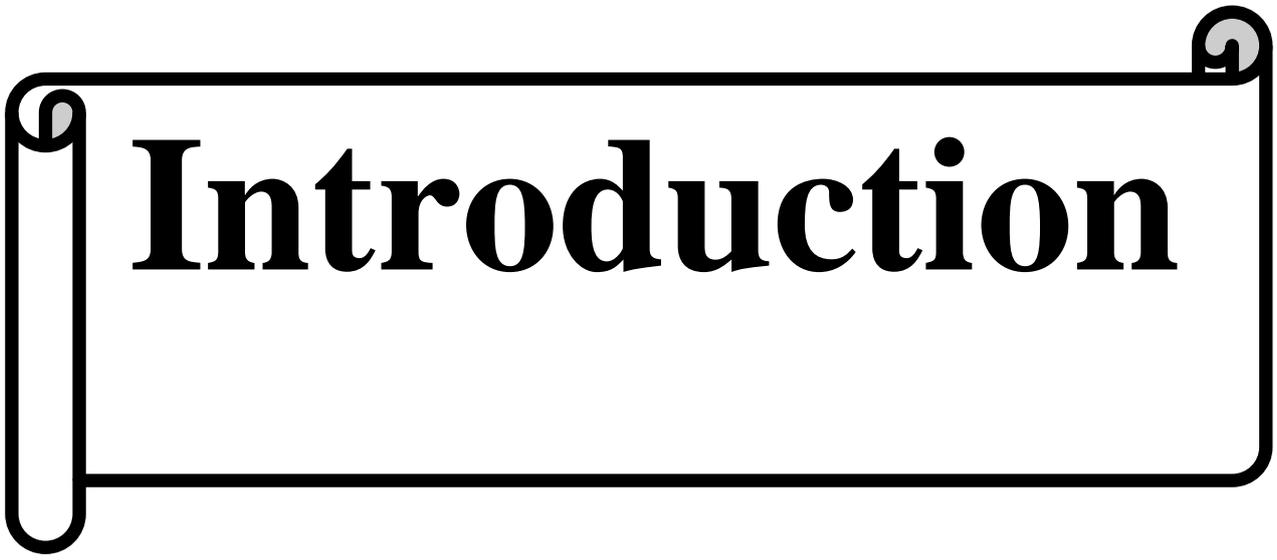
I.2.1.3.1.2.-Structure de l'acétylcholinestérase 14

I.2.1.3.1.3.-Site actif 15

I.2.1.3.1.4.-Mécanisme catalytique 16

I.3.- Méthodes d'extraction	17
I.3.1.- Préparation des extraits végétaux	17
I.3.1.1.-Principe	17
I.3.1.2.-Mode opératoire	18
I.3.2.Extraction de l'enzyme acétylcholinestérase	19
I.3.2.1.-Principe	19
I.3.2.2.-Mode opératoire	20
I.4.-Tests biologiques	20
I.4.1.- Test de la mortalité	20
I.4.2.-Test de la fertilisation	21
I.4.2.1.-Choix de la plante testée	21
I.4.2.1.1.-Généralité	21
I.4.2.1.2.Description botanique	21
I.4.2.1.2.- Position systématique du sorgho	22
I.4.2.1.3.- Importance économique et alimentaire des sorghos cultivés	22
I.4.2.2.- Protocole expérimental	23
I.5. Dosage biologiques	24
I.5.1.Dosage de protéines	24
I.5.1.1.- Principe	24
I.5.1.2. Mode opératoire	24
I.5.2.-Mesure de l'activité de cholinestérase	24
I.5.2.1.-Principe	24
I.5.2.2.-Mode opératoire	25
I.6.Exploitation des résultats	26
I.6.1. Taux de la mortalité	26
I.6.2. Temps de mortalité (TL ₅₀)	26
I.6.3. Dose létale (DL ₅₀)	26
I.6.4.-Taux de germination	27
I.7.-Analyse statistique	27
CHAPITRE II- Résultats et discussion	
II.1.-Effets de l'extrait aqueux sur la mortalité	28
II.2.-Effet sur la cinétique de la mortalité	30
II.3.-Dose létale (DL ₅₀) d'extrait foliaire d' <i>Urtica dioica</i> sur les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i>	32

II.4.-Temps létale 50 (TL ₅₀) d'extrait foliaire d' <i>Urtica dioica</i> sur les larves (L ₄) de <i>Culex pipiens</i>	34
II.5.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l' <i>Urtica dioica</i> sur l'activité d'enzyme cholinestérase	38
II.6.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l' <i>Urtica dioica</i> sur le taux de protéines	40
II.7.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l' <i>Urtica dioica</i> sur l'activité Spécifique	41
II.8.- Effet des extraits végétaux sur le taux de germination des semences	42
Conclusion	45
Référence bibliographiques	47
Annexes	



Introduction

Depuis 170 millions d'année les diptère (les mouches et les moustiques) forment un groupe d'insectes le plus écologiquement diversifié (**BOUDEMAGH *et al.*, 2013**), ils ont toujours été considérés comme source de nuisance pour l'homme, principalement en raison du fait qu'ils peuvent être des vecteurs de maladies. Parmi les espèces connues dans la transmission des maladies à l'homme, nous citons celles appartenant aux genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Les espèces du genre *Culex* transmettent des maladies parasitaires telles la filariose et la fièvre jaune (**ZOUAOUI, 2017**). Le complexe *Culex pipiens* est un groupe moustiques qui a pris naissance en Afrique (**SADALLAH et BELKHAOUNI, 2016**). C'est une espèce de moustique de la famille des Culicidae. Cette dernière est divisée en trois sous-familles; les Culicinae, Anophelinae et les Toxorhynchetinae. La famille de Culicidae regroupe environ 3200 espèces réparties sur 37 genres (**KEMASSI, 2015**).

La lutte anti-moustique par des insecticides est très efficace sur les moustiques culicidés, (**AOUINTY *et al.*, 2006**), les méthodes de lutte pratiquées de manières sporadiques, se font par la pulvérisation des produits chimique (**SADALLAH et BELKHAOUNI, 2016**). Cependant, l'utilisation massive de ces produits n'allai pas tarder à connaître plusieurs difficultés, les phénomènes de résistance, le déséquilibre des écosystèmes, le manque de spécificité et l'effet rémanent chez les insecticides non biodégradables, sont les plus fréquents. Pour éviter ces problèmes, les recherches sont orientées vers la découverte de nouveaux composants (**KARCH, 1987**).

L'utilisation des extraits de plantes comme insecticides est connue depuis longtemps, en effet le pyrèthre, la nicotine et la roténone sont déjà connus comme agents de lutte contre les insectes Dans des travaux encore plus récents, les propriétés insecticides de certaines plantes ont été testées sur les larves d'insectes (**LAOUIRA, 2014**).

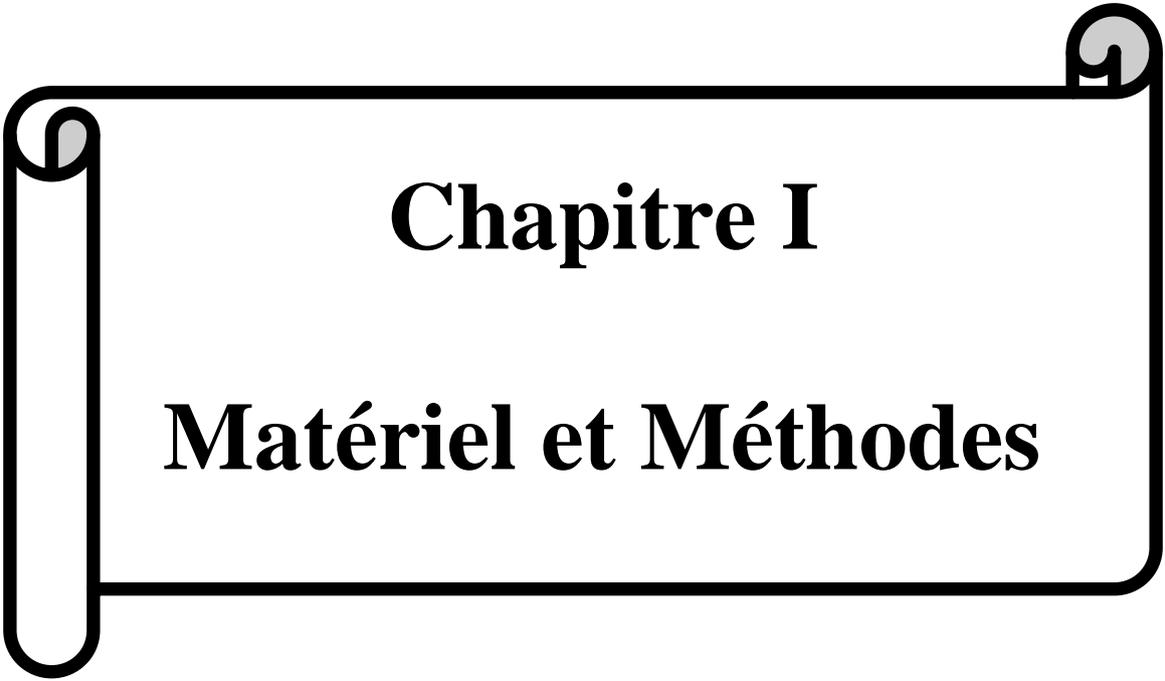
L'ortie, compagne des premiers campements préhistoriques, fut l'un des premiers légumes utilisés par l'homme. Consommée partout comme épinard, elle fit l'objet de plantation depuis bien longtemps (**MEGNOUNIF, 2011**). Est une plante que l'on peut reconnaître grâce à son pouvoir urticant. Considérée comme une «mauvaise herbe », l'Ortie « *Urtica dioica* » est en réalité une plante riche en vitamines et minéraux et antioxydants telles que les composés phénoliques. Elle possède de nombreuses vertus médicinales qui remontent à l'Antiquité. Sa richesse en minéraux et vitamines fait d'elle une excellente plante nutritionnelle. Elle est utilisée dans plusieurs autres

domaines comme l'alimentation animale l'horticulture et l'agriculture (AIT BRAHAM et BELHAMEL, 2016).

La présente étude a pour objectif principal la valorisation de l'Ortie (EL Herayeg), *Urtica dioica*) provenant de la région de GHARDAIA, par une étude de ses activités anticholinestérase sur les larves L4 de *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum Vulgare* (Sorgho).

Ce travail est structuré en deux chapitres :

Le premier chapitre concerne la méthodologie adoptée pour la partie expérimentale. Le deuxième chapitre regroupe l'ensemble des résultats qui seront suivis d'une discussion, à la fin une conclusion générale qui achève ce travail.



Chapitre I

Matériel et Méthodes

CHAPITRE I- Méthodologie de travail :

I.1.-Principe adopté :

Notre étude a pour but de valoriser l'extrait aqueux foliaire de l'ortie (EL Herayeg), *Urtica dioica* par l'étude de la mortalité et la détermination de ses activités anticholinésterase sur les larves L4 de *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum vulgare* (Sorgho).

I.2.- Matériels d'études :

I.2.1.-Matériel biologique :

Le matériel biologique de notre étude se compose des larves de *Culex pipiens* de quatrième stade, de l'enzyme cholinésterase, et des plantes *Urtica dioica* (l'ortie) et *Sorghum Vulgare* (Sorgho).

I.2.1.1.-Choix de la matière végétale :

L'étude porte sur la plante *Urtica dioica* (l'ortie), la récolte est réalisée dans la région de HASSI LGARA(MENIA) de la wilaya de GHARDAIA au mois de Décembre 2017 (photo 1).



Photo 1 : *Urtica dioica* (HASSI LGARA, MENIA, GHARDAIA) (Originale, 2017).

Les feuilles de la plante est rincée avec l'eau, laissée séchée pendant un mois à l'abri de la lumière et dans une température ambiante une fois séchée, elle sera broyée jusqu'à l'obtention d'une poudre fine puis conservée dans des bocaux hermétiques en verre portant une étiquette ou le nom de l'espèce, la date et lieu de récolte sont mentionnés.

La poudre sera utilisée dans les différentes analyses ultérieures (photos 2).



Photos 2: Séchage et broyage de la plante (Originale, 2017).

I.2.1.1.1.-Dénominations vernaculaires :

Nom latin :	<i>Urtica dioica</i> L. Syn., <i>Urtica major</i> , Kanitz
Noms français :	<i>Ortie dioïque, grande ortie, ortie piquante, ortie élevée, ortie, ortie commune, ortie vivace</i>
Noms anglais :	<i>Nettle, Common Nettle, Stinging Nettle, Tall Nettle, Slender Nettle, Greater Nettle, Nettle leaf</i>
Nom italien :	<i>Ortica comune.</i>
Nom espagnol :	<i>Ortiga gran, ortiga grossa, ortiga major, ortiga mayor</i>
Nom Allemand :	Brennesselwurzel, Nesselwurzel, Haarnesselwurzel, Hanfnesselwurzel

(BOUGAR et BELKACEM KOURMI, 2016).

Noms arabes Horaïg, Bent en nar, Bouzegdouf (BELOUED, 2009).

I.2.1.1.2.-Position systématique :

Règne :	Plantae.
Sous règne :	Tracheobionta (plante vasculaire).
Embranchement :	magnoliophyta (Phanérogames).
Classe :	Magnoliopsida.
Sous classe :	Rosidae.
Ordre :	Urticales.
Famille	Urticaceae.
Genre :	<i>Urtica</i> .
Espèce :	<i>Urtica dioica</i> L (AIT BRAHAM et BELHAMEL, 2016).

I.2.1.1.3.-Description de la plante :

Le terme *Urtica* vient du mot latin *urere* qui signifie « brûler » et qui fait allusion à ses poils urticants dont le contact est très irritant.

Le terme *dioica* donne le mot dioïque et vient du grec « dis » qui signifie deux fois et « oikos » qui signifie maison. Ce terme désigne donc que les fleurs mâles et les fleurs femelles se trouvent sur des pieds séparés (BOYRIE, 2016). Elle est appelée aussi grande ortie (DJERROUMI et NACEF, 2012).

Plante herbacée vivace, de 50 à 120 cm (SCHAUENBERG et FERDINARD, 2006), à tige dressée quadrangulaire portant des poils urticants et des poils courts. Feuilles ovales, acuminées, longue de 4 à 15 cm sur 2 à 8 cm de large, fortement dentées sur les bords, à grosses dents, ovales-triangulaire ; pétiole 1 à 2 fois plus court que le limbe, à deux stipules linéaire-lancéolées de 4 à 12 mm de long. Fleurs dioïques, parfois monoïque, en grappes rameuses bien plus longue que le pétiole, les fructifères pendantes ; périanthe pubescent. Graine ovée de 1 à 2 mm de long sur 0.75 mm de large, obtus, brun olive, très finement ponctuée (BELOUED, 2009). (Photo 3). Elle est considérée à tort comme une mauvaise herbe (DJERROUMI et NACEF, 2012)



Figure 1 : Ortie dioïque. (A) parties aériennes, (1) fleur femelle, (2) fleur mâle, (6) akène, (7) poils urticants (DRAGHI, 2005).

I.2.1.1.4.-Habitat :

Parmi les espèces du genre *Urtica*, *Urtica dioica* est la plus répandue, elle est très commune en région méditerranéenne. Elle est 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. On la trouve donc près des habitations, jardins, ruines, décombres, haies, fossés ou encore à la lisière des bois. Elle pousse sur tous les terrains, argileux ou sablonneux, calcaires ou siliceux, surtout ceux contenant des matières organiques fraîches mais toujours riches en azote (elle fait partie des plantes nitrophiles) et de préférence avec une certaine humidité (plante hygrophile) surtout lors de son implantation.

Urtica dioica est très résistante à la sécheresse, on la trouve aussi bien en plein soleil à l'abri d'une façade qu'au fond d'un vallon ombragé. Symbole de milieux riches et fertiles, l'Ortie ne pousse jamais seule, mais en grands massifs compacts (**AIT BRAHAM et BELHAMEL, 2016**).

I.2.1.1.5.-Compositions chimiques :**❖ Les composés chimiques des poils urticants :**

L'action urticante est due au liquide contenu dans les poils. Ce liquide est libéré au moindre choc après rupture de l'extrémité des poils, qui deviennent ainsi une véritable aiguille hypodermique. Des travaux ont été effectués en 1947 par EMMELIN et FELDBERG, et ces chercheurs ont trouvé que le liquide des poils contenait au moins trois composés qui pourraient être à l'origine des réactions de muscle lisse : l'acétylcholine, à une concentration de 1 %, l'histamine, à une concentration de 1 pour 500 à 1 pour 2000, et la 5- hydroxy-tryptamine (la sérotonine). On trouve également une petite quantité de leucotriènes (**LAOUIRA, 2014**).

❖ Les composés chimiques des feuilles :

Les feuilles d'Ortie contiennent une assez large variété de constituants chimiques tels que les composés phénoliques (**AIT BRAHAM et BELHAMEL, 2016**). Elles contiennent une substance histaminique, de l'acide formique, de la silice, du potassium, du tanin, des glucoquinines, de la chlorophylle et les vitamines A et C, en traces (**SCHAUENBERG et FERDINARD, 2006**).

❖ Composition chimique des racines :

Les différentes études ont montré que les racines renfermaient de nombreuses molécules appartenant à différentes familles chimiques :

- des polysaccharides: glycanes, glucogalacturonanes, arabinogalactane acide
- un acide gras: de l'acide (10E, 12Z)-9-hydroxy-10,12-octadécadiénoïque.
- des lectines.
- des céramides.
- des terpènes diols et des terpènes diols glucosides.
- des stérols et stérols glucosides.
- des composés phénoliques.
- des dimères du phénylpropane (**DRAGHI, 2005**).

I.2.1.1.6.-Domaines d'utilisation de l'Ortie :

❖ Usage médical :

L'ortie est un remède traditionnel utilisé depuis des années contre l'anémie et le manque d'énergie: on dit que c'est un excellent fortifiant grâce à sa haute teneur en fer et autres minéraux. On dit aussi qu'elle stimule les fonctions digestives (lourdeurs et crampes d'estomac) (**GUESSOUM et LECHEHEB, 2015**).

L'ortie est diurétique (calculs et rétention urinaire), anti-diarrhéique, antianémique (grâce à sa teneur en fer) et reconstituante, dépurative (nettoie et active le sang), vermifuge et révulsive.

Chez les femmes, elle favorise la venue du lait et normalise les règles. Elle est efficace aussi contre les maux de tête, les irritations intestinales et les maladies pulmonaires, tout comme elle stimule l'activité intellectuelle (à recommander aux enfants dont les résultats scolaires sont peu brillants).

En usage externe, elle guérit les affections de la bouche, les rhumatismes, l'acné, nettoie la peau et combat la chute des cheveux (**DJERROUMI et NACEF, 2013**).

❖ Usage de l'ortie dans l'industrie cosmétique :

L'Ortie est également utilisée dans plusieurs produits cosmétiques comme les shampoings, car on lui attribue la capacité de stimuler la croissance des cheveux et un pouvoir de lutter contre la chute, les pellicules, et les cheveux gras (DRAGHI, 2005).

❖ En agriculture :

Grâce à sa richesse en azote et en oligo-élément, elle est utilisée sous forme de purin d'ortie il a aussi l'avantage de renforcer les défenses naturelles des plantes et d'avoir un certain effet répulsif sur les insectes (BOUGAR et BELKACEM KOURMI, 2016).

L'extrait d'ortie utilise comme phytostimulant: il stimule la fertilisation et les défenses naturelles des plantes vis-à-vis de certaines maladies ou d'invasions de parasites. De fortes concentrations de l'extrait d'ortie peuvent produire des effets inverses de ceux recherchés et soit favoriser, soit inhiber la croissance des plantes (BOYRIE, 2016).

I.2.1.2.-Choix de l'insecte :

L'étude porte sur des larves de Quatrième stade de *Culex pipiens* (photo 4), le choix des larves se justifie, car il est plus difficile de détruire le moustique adulte que la larve et cette destruction ne peut être efficace qu'en cas d'urgence ou d'invasion massive (SÉGUY, 1931).



Photo 3: Photo de Larve L4 de *Culex pipiens* (BALENGHIEN, 2006).

I.2.1.2.1.- Généralité sur *Culex pipiens*:

Culex pipiens est un moustique qui appartient à une variété dite commune de moustiques (*Culex*) européens. Il est également nommé maringouin, cousin ou moustique domestique. Il existe des sous-espèces de *Culex pipiens* (BOUDERHEM, 2014). Il vit très largement dans les agglomérations.

La femelle de *Culex pipiens* est zoophile (photo 5), c'est-à-dire qu'elle prend ses repas sanguins préférentiellement sur les animaux. Elle repère son hôte par les mouvements, les formes et les couleurs de celui-ci (sombre en particulier), puis par l'odeur de substances chimiques, comme le gaz carbonique, qu'il dégage en respirant (TORALY CARO, 2005).



Photo 4: Femelle de *Culex pipiens* lors d'un repas de sang (BALENGHIEN, 2006).

I.2.1.2.2.-Position systématique:

Règne :	Animalia
Embranchement :	Arthropoda
Sous-embranchement :	Hexapoda
Classe :	Insecta
Sous-classe :	Pterygota
Ordre :	Diptera
Sous-ordre :	Nematocera
Famille :	Culicidae
Sous-famille :	Culicinae
Genre :	Culex
Espèce :	<i>Culex pipiens</i> (AMRAOUI, 2012)

I.2.1.2.3.-Cycle de développement :

Le cycle de développement des moustiques dure environ douze (12) à vingt (20) jours (**ADISSO et ALIA, 2005 ; KPONDJO, 2008**). Il comprend quatre stades : l'œuf, la larve, la nymphe (pupe) et l'adulte. Cette métamorphose se déroule en deux phases (**TABTI, 2017**).

-la phase aquatique regroupant les trois premiers stades.

-la phase aérienne qui concerne l'adulte ailé ou imago (dernier stade).

La phase aquatique débute quelques jours après la fécondation, suivant les espèces, les œufs de diverses formes (**MERABTI, 2015**).

Les œufs sont déposés en paquets formant une nacelle qui flotte sur l'eau (photo 6). Cette nacelle mesure 3-4 mm de long et 2-3 mm de large. L'éclosion se produit environ 24h à 48h après l'oviposition (**TORAL Y CARO, 2005**).

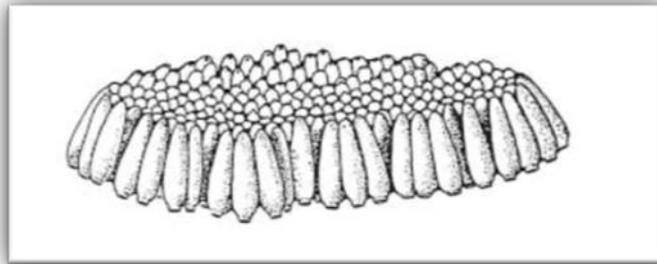


Photo 5: Œufs de *Culex pipiens* (**TORAL Y CARO, 2005**).

A maturité, les œufs éclosent et donnent des larves de stade 1 (1 à 2 mm) qui, jusqu'au stade 4 (1,5 cm) se nourrissent de matières organiques, de microorganismes et même des proies vivantes (pour les espèces carnassières). Malgré leur évolution aquatique, les larves de moustiques ont une respiration aérienne qui se fait à l'aide de stigmates respiratoires ou d'un siphon (**RODHAIN et PEREZ, 1985**).

Au bout de six (6) à dix (10) jours et plus, selon la température de l'eau et la disponibilité en nourriture, la quatrième mue donne naissance à une nymphe: c'est la nympheose (**GUILLAUMOT, 2006**), généralement sous forme de virgule ou d'un point d'interrogation, la nymphe, mobile, ne se nourrit pas durant tout le stade nymphal (phase de métamorphose) qui dure un (1) à cinq (5) jours.

Elle remonte de temps à autre à la surface de l'eau pour respirer et plonge vers le fond, dès qu'elle est dérangée. A la fin de ce stade, la nymphe s'étire, son tégument se fend dorsalement et, très lentement, le moustique adulte (imago) s'extirpe de l'exuvie : c'est l'émergence, qui dure environ quinze (15) minutes au cours desquelles l'insecte se trouve exposé sans défense face à de nombreux prédateurs de surface (**RODHAIN et PEREZ, 1985**).

Dans la Phase aérienne, les sujets des deux (2) sexes s'accouplent en vol ou dans la végétation et ont une distance de vol de un (1) à deux (2) km. Grâce aux longs poils dressés sur leurs antennes, les mâles peuvent percevoir le bourdonnement produit par le battement rapide des ailes des femelles, qui s'approchent des essaims lors du vol nuptial. A ce moment, le mâle féconde la femelle en lui laissant un stock de sa semence. La femelle dotée d'un caractère particulier, celui du maintien en vie jusqu'à la mort des spermatozoïdes, conserve la semence du mâle dans une ampoule globulaire ou vésicule d'entreposage (spermatique). Elle ne s'accouple donc qu'une seule fois (**DARRIET, 1998**).

Les adultes mâles et femelles se nourrissent de jus sucrés, de nectars et d'autres sécrétions végétales. Pourtant, une fois fécondées, les femelles partent à la recherche d'un repas sanguin duquel, elles retirent les protéines et leurs acides aminés, nécessaires pour la maturation des œufs. Ce repas sanguin prélevé sur un vertébré (mammifère, amphibien, oiseau), est ensuite digéré dans un endroit abrité (photo 7) (**GUILLAUMOT, 2006**).

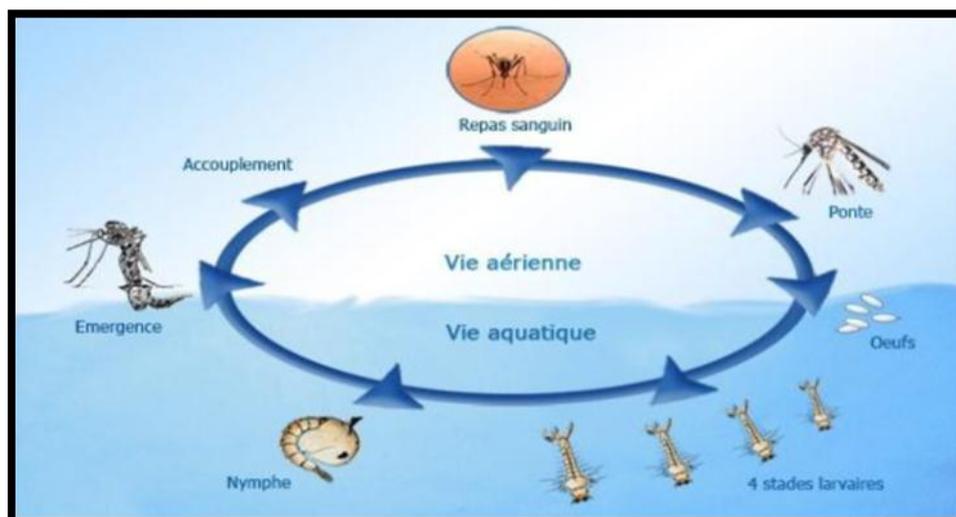


Photo 6 : Cycle de développement chez les moustiques (**TAHRAOUI, 2012**).

I.2.1.2.4.-Elevage des moustiques :**I.2.1.2.4.1.-Echantillonnage :**

La collecte des larves a été effectuée au cours du mois de Février 2018, les larves de moustiques sont prélevées dans un bassin d'irrigation situées à Rue du martyr Taleb Bahmed Yahia, El-Atteuf, Ghardaïa (photo8).



Photo 7 : Bassin de prélèvement El-Atteuf, Ghardaïa (Originale, 2018).

Les échantillons sont déposés dans des bacs en plastique à l'aide d'une passoire afin de réduire la quantité d'eau lors du prélèvement des larves. Les larves contenues dans les bacs sont ensuite transvasées dans des bouteilles de 1,5 litre et transportées au laboratoire de l'université.

I.2.1.2.4.2.- Elevage :

L'élevage des moustiques est réalisé dans une salle à l'université de Ghardaïa, munie d'un système d'échauffement qui permet d'atteindre une température de 30C⁰ et une humidité relative de 40%. Les échantillons sont déposés à l'intérieur des bacs en plastique dans une cage cubique de 60cm avec une armature en bois, couverte de tulle, avec deux portes coulissantes facilitent la manipulation des insectes (photo9). Les larves sont nourries tous les 2 à 3 jours d'une mixture composée de dattes et de feuilles de palmier dattier. Ainsi les adultes femelles et males sont nourris de l'eau sucrée, et pour assurer une fécondation des femelles un repas sanguin (Pris d'un hôpital) est porté chaque deux jour.



Photo 8 : Cage utilisée pour l'élevage de *Culex pipiens* (Originale, 2018).

I.2.1.3.-Cholinestérase :

Les cholinestérases sont des hydrolases de serine qui agissent préférentiellement sur les esters de choline (**GIRARD, 2006**). Il se distingue deux types:

L'acétylcholinestérase (EC: 3.1.1.7) et la butyrylcholinestérase (EC: 3.1.1.8).

Ces deux types se distinguent principalement par leur spécificité vis à vis du substrat, ainsi l'acétylcholinestérase ou cholinestérase vraie hydrolyse l'acétylcholine (neurotransmetteur naturel), tandis que la butyrylcholinestérase ou pseudocholinestérase (EC: 3.1.1.8) hydrolyse à la fois la butyrylcholine et l'acétylcholine (**BOTTI et al., 1999**).

I.2.1.3.1.-Acétylcholinestérase :

I.2.1.3. 1.1.- Définition :

L'acétylcholinestérase (AChE) est une protéine exprimée dans le système nerveux et sanguin des eucaryotes supérieurs (**COLLETIER, 2006**). Elles appartiennent à la famille des cholinestérases (**SANSON, 2009**). Le principal rôle biologique de l'acétylcholinestérase est la régulation de la transmission de l'influx nerveux en assurant l'hydrolyse rapide de l'acétylcholine au niveau des synapses cholinergiques centrales et périphériques (**BARNARD, 1974**) (figure 1). Ces enzymes se retrouvent dans les tissus du système nerveux ainsi que dans le cerveau, les globules rouges et le plasma de plusieurs vertébrés (**CAMIRE, 2007**), au sein des synapses dites cholinergiques, qui utilisent le neurotransmetteur ACh (**COLLETIER, 2006**). Elles sont impliquées dans le mécanisme de la transmission de l'influx nerveux dans l'organisme (**CAMIRE, 2007**).

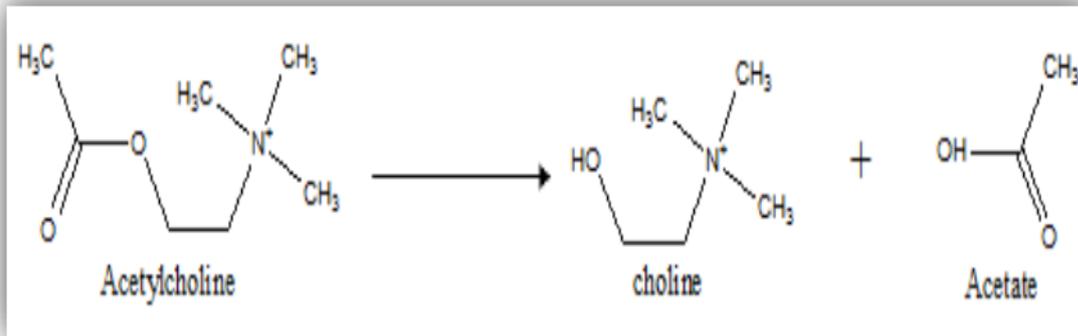


Figure 2 : Hydrolyse de l'acétylcholine (LAOUAR, 2015).

I.2.1.3.1.2.-Structure de l'acétylcholinestérase :

Les séquences codantes pour l'AChE ont été clonées à partir d'espèces de Vertébrés et d'Invertébrés telles que les insectes, nématodes, poissons, reptiles, oiseaux et plusieurs mammifères comme l'être humain. Un ou plusieurs gènes codent l'acétylcholinestérase chez les invertébrés. Il y a quatre gènes chez *Caenorhabditis elegans* (Rhabditidae) un nématode, deux gènes chez le puceron du coton *Aphisgossypii* (Glover 1877) (Aphididae) et le moustique *Culex pipiens* (Linné, 1758) (Culicidae) (BADIOU *et al.*, 2007).

La structure tridimensionnelle de l'AChE a été déterminée, par cristallographie, chez la torpille (SUSSMAN *et al.*, 1991), la drosophile (HAREL *et al.*, 2000) et les mammifères comme l'homme (Bourne *et al.*, 1995 ; Marchot *et al.*, 1996 ; Kryger *et al.*, 2000) ainsi que celle de la BChE humaine (Nachon *et al.*, 2002). Les domaines catalytiques de ces enzymes sont organisés comme un ensemble globulaire de feuillets β et d'hélices α (pli α/β) (photo10)

La structure publiée en 1991 était celle du dimère entier d'AChE. Chaque monomère est constitué de 11 feuillets β et de 15 hélices α , ainsi que d'une courte portion de feuillet β , à l'extrémité N-terminale, qui n'est engagée dans aucune interaction avec le reste de la structure. Le repliement global de l'enzyme est typiquement celui de la famille des α/β hydrolases (OLLIS *et al.*, 1992).

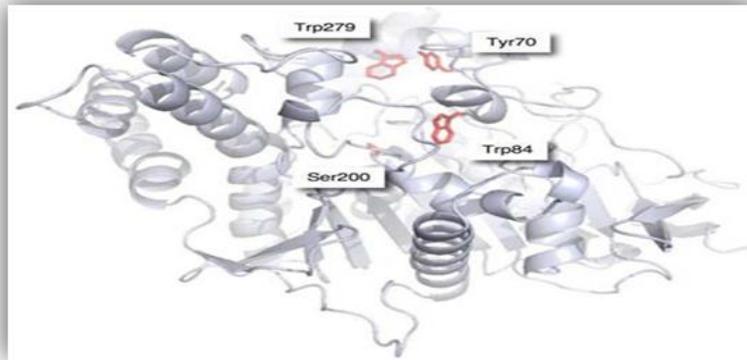


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la TcAChE de feuillets β et d'hélices α (MOREL *et al.*, 1999 ; SUSSMAN *et al.*, 1991)

Dans le dimère, les deux monomères sont liés, l'un à l'autre, par un « paquet » de 4 hélices α : deux hélices α de chaque monomère, dont l'hélice α C-terminale, participent à la mise en place d'un accolement inter-résidus très stable. Les cystéines C-terminales (Cys537) de chacun des deux monomères établissent entre elles un pont disulfure inter-chaînes qui stabilisera, covalamment, cette interface de dimérisation. On distingue, dans un monomère d'AChE, deux domaines indépendants l'un de l'autre, et disposés de part et d'autre de la gorge menant au site actif. Ces domaines correspondent en fait aux deux moitiés de la chaîne polypeptidique : le domaine constitué des résidus 1 à 305 s'accolera en effet sur l'autre, constitué des résidus 306 à 537 (MOREL *et al.*, 1999).

I.2.1.3.1.3.-Site actif :

Le site actif, au sein duquel se trouve la machinerie catalytique, se subdivise en un sous-site estérasique et un sous-site « anionique ».

Le site estérasique abrite la triade catalytique. Comme toutes les enzymes de la famille des protéases à sérine, l'AChE possède une telle triade. Les résidus qui la composent, Ser200, His440 et Glu327 ont été identifiés par mutagenèse (GIBNEY, 1990). La Ser200 est au cœur des deux étapes essentielles de la réaction catalytique. En effet, dans un premier temps, le groupement acétyle d'une molécule d'ACh se lie à la Ser200 pour former l'intermédiaire tétraédrique ; c'est l'étape d'acétylation. L'ACh est ensuite clivée, et la portion choline est expulsée. Enfin, l'AChE est régénérée au cours de l'étape de déacétylation, et l'acétate est expulsé. L'His440 permet le transfert de proton nécessaire aux deux étapes sus-mentionnées.

Le Glu327 permet à la fois de polariser l'His440 et de la maintenir dans une orientation favorable à ce transfert.

La photo numéro 11 présente la structure du site actif, les résidus de la triade catalytique, du trou oxyanion, du site anionique et de la poche acyle sont représentés par des bâtonnets jaunes, orange, cyan et vert, respectivement. Les liaisons hydrogène qui assurent le maintien de la triade catalytique sont représentées par des tirets noirs. En face du site estérasique, au fond de la gorge, se situe le site anionique. Est constitué des résidus Trp84, Glu199 et Phe330. La charge positive du ligand sera effectivement stabilisée par l'attraction électrostatique du résidu Glu199, mais le sera beaucoup plus effectivement par son interaction avec les électrons π des noyaux aromatiques environnant. Les résidus Trp84 et Phe330 seront les deux plus importants contributeurs à cette énergie de stabilisation (LAOUAR, 2015).



Figure 4 : Le site actif de la TcAChE (LAOUAR, 2015).

I.2.1.3.1.4.-Mécanisme catalytique :

L'AChE (acétylcholine acétyle hydrolase – EC 3.1.1.7) est une carboxylestérase de type B, appartenant à la famille des sérines hydrolases (QUINN, 1987).

Le mécanisme catalytique des sérines hydrolases (figure 2), conservé, est le suivant:

- Formation du complexe michaëlien.
- Attaque nucléophile de la sérine catalytique sur le substrat.
- Formation du 1er intermédiaire tétraédrique.
- Libération du 1er produit (choline).
- Attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la sérine acylée.
- Formation du 2ème intermédiaire tétraédrique.
- Libération du 2ème produit (acétate) (LAOUAR, 2015).

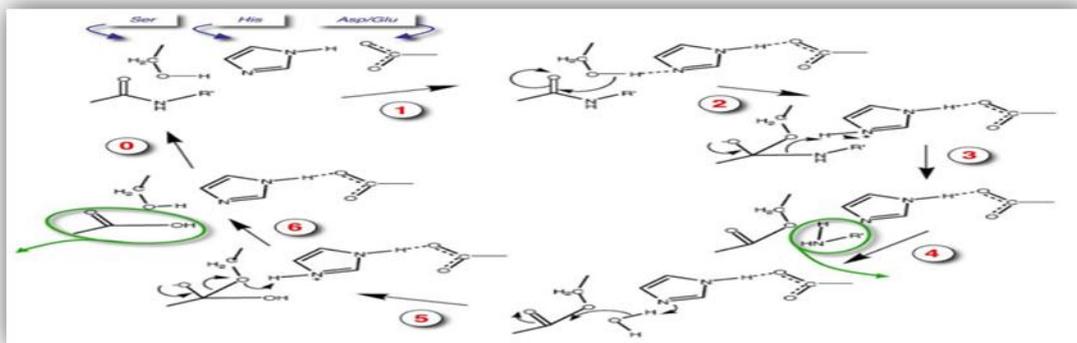


Figure 5 : Mécanisme général d'hydrolyse par une sérine hydrolase (LAOUAR, 2015).

I.3.- Méthodes d'extraction :

Pour la présente étude deux extractions ont été réalisées, une extraction à reflux de la plante *Urtica dioica* récoltée et une extraction de l'enzyme cholinestérase à partir des larves (L4) de *Culex pipiens*.

I.3.1.- Préparation des extraits végétaux :

I.3.1.1.-Principe :

L'extraction par reflux est une méthode d'extraction solide-liquide à chaud. Le reflux permet la réalisation d'une extraction à une température constante (température de reflux) égale à la température d'ébullition du solvant. Ainsi le solvant s'évapore et le réfrigérant condense les vapeurs qui retombent dans le ballon, permettant au solvant d'être ainsi recyclé. Le chauffage (augmentant solubilité et transfert de matière), l'ébullition (agitation) et le reflux (recyclage du solvant) permettent une extraction efficace avec un appareillage relativement simple. Le chauffage à reflux est utilisé pour extraire efficacement des composés phytochimiques (BONYS, 2013).

I.3.1.2.-Mode opératoire :

L'extrait aqueux est obtenu par solubilisation des fractions actives dans de l'eau distillée et du méthanol. 100 grammes de la poudre végétale est misent dans un ballon de 1000 ml capacité

avec suffisamment de la solution aqueuse de méthanol (2:1) (2/3 de méthanol et 1/3 d'eau distillée). Le ballon est surmonté par un réfrigérant permettant la condensation des fractions volatiles organiques lors d'extraction. Le mélange est porté à ébullition à 50°C pendant 6 heures (photo 12).

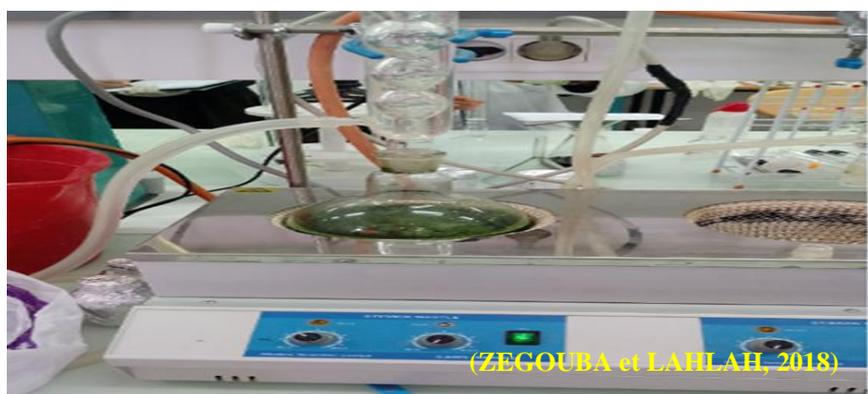


Photo 9: Montage d'extraction à reflux (Originale, 2018).

L'homogénat est refroidi et filtré à l'aide d'un papier filtre. Pour éliminer le méthanol, le filtrat est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif muni d'une pompe à vide à une température de 50°C pendant 2 à 3 heures (photo 13). Le produit obtenu, est un extrait aqueux conservé dans un bocal hermétiquement fermé et couvert par du papier aluminium. Qui servira par la suite aux tests biologiques (figure 3).



Photo 10 : Montage de rota vapeur pour l'élimination du solvant (Originale, 2018).

Les solutions (les extraits aqueux des feuilles) sont conservées dans des bouteilles bien fermées et étiquetées, nous avons noté sur chaque bouteille le nom de l'espèce et la date de préparation.

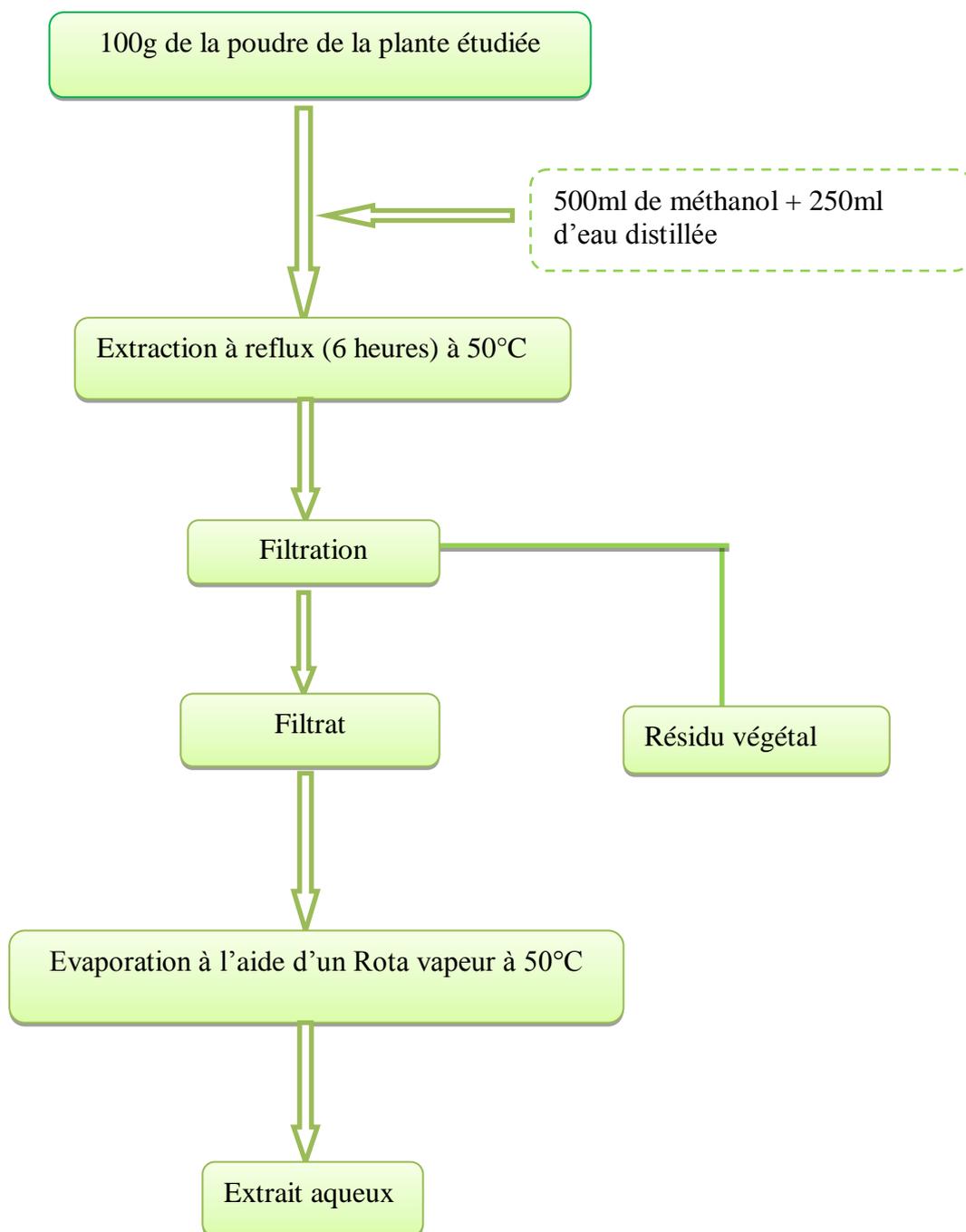


Figure 6 : Protocole d'extraction par reflux.

I.3.2.-Extraction de l'enzyme acétylcholinestérase :

I.3.2.1.-Principe :

L'extraction de l'acétylcholinestérase est réalisée selon la méthode de *liu et al*, (2006), les étapes doivent être réalisées à froid afin d'éviter l'altération de l'enzyme (annexe I).

I.3.2.2.-Mode opératoire :

Les larves sont amputées et homogénéisées individuellement dans un mortier. L'homogénat est récupéré avec 0.5 ml d'eau glace et 1 ml d'un mélange de 0.1 M tampon phosphate (pH 7.5) contenant 0.1% d'un détergent : le triton X-100, afin d'éliminer les impuretés et les lipides membranaires détruits par le détergent, une sédimentation est effectuée par centrifugation à 10.000 g pendant 20 mn dans une centrifugeuse de type SEGMA 6300, 5666. Le surnageât renfermant l'enzyme est récupéré à l'aide d'une micropipette

I.4.-Tests biologiques :

I.4.1.- Test de la mortalité :

On prépare les tubes contenant chacun 1ml d'eau et dans chaque tube on introduit 4 larves de stade L4 de *Culex pipiens*. Nous avons préparé une série de dilutions de: 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, chaque dose est appliquée à 3 répétitions, avec une préparation témoin, soit un total de 72 larves et on note chaque heure la mortalité (figure 4).

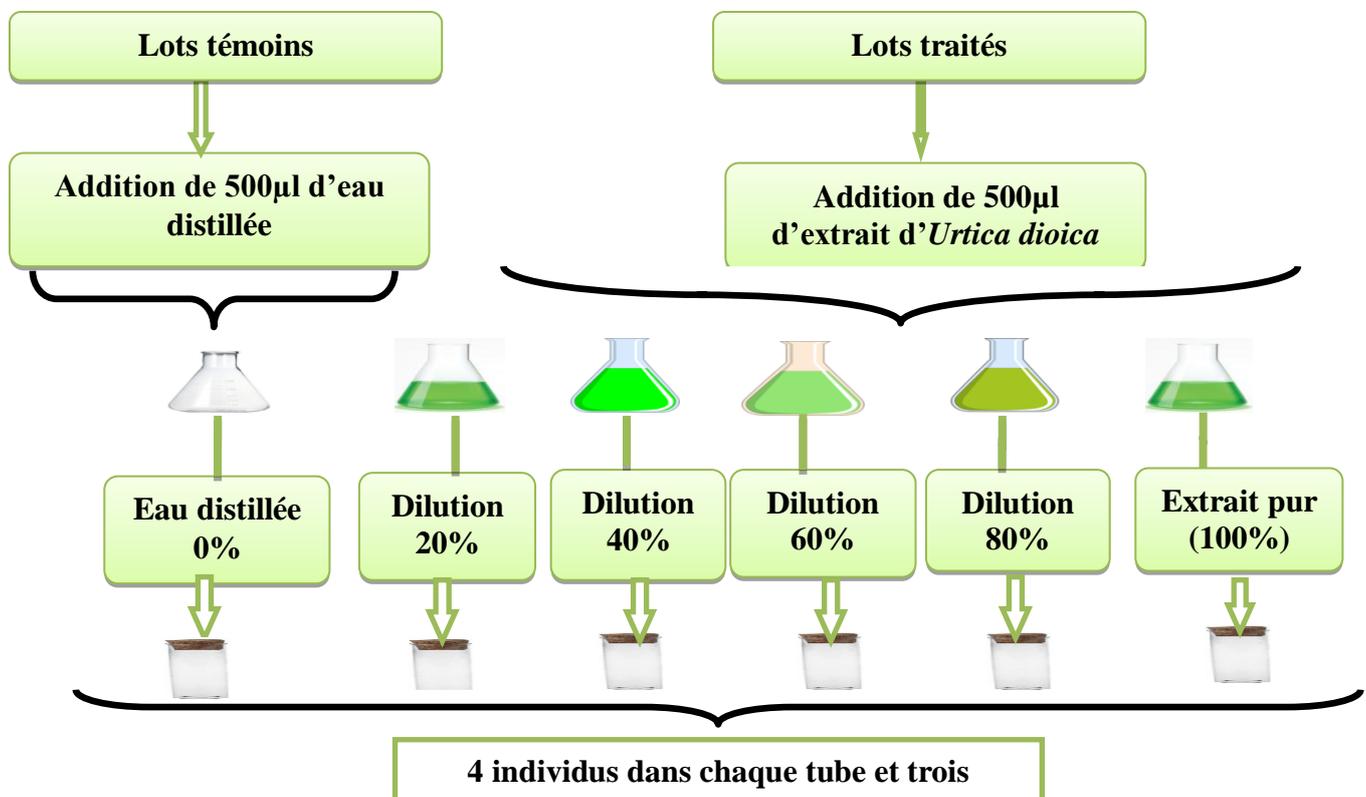


Figure 7 : Protocole d'étude de la mortalité.

I.4.2.-Test de la fertilisation :**I.4.2.1.-Choix de la plante testée :****I.4.2.1.1.-Généralité :**

Le sorgho, *Sorghum vulgare* Pers (synonyme : *Sorghum bicolor* (L.) Moench) (ZOLIKPO, 2011) (photo 14) est une poacée originaire d'Afrique. C'est au nord-est de l'Afrique tropicale que l'on trouve la plus grande diversité d'espèces du genre Sorghum, aussi bien chez les types cultivés que sauvages. L'introduction du sorgho en Amérique s'est faite depuis l'Afrique de l'Ouest avec le commerce des esclaves. Il est désormais cultivé partout dans les zones arides d'Afrique, d'Asie, d'Amérique, d'Europe et d'Australie (LEPICIER, 2012).



Photo 11 : *Sorghum vulgare* (Sorgho) (BALOTA, 2012).

I.4.2.1.2.Description botanique :

Sorgho (photo15) est une plante annuelle atteignant 5 m de haut, à talle(s) unique ou multiples, partant de la base ou des nœuds de la tige principale (LEPICIER, 2012).

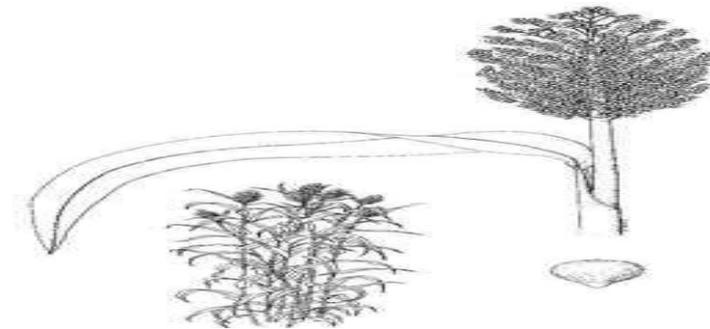


Figure 8 : Représentation du *Sorghum vulgare* (BRÖHAN, 2011).

I.4.2.1.2.- Position systématique du sorgho :

Règne :	Plantae
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Liliopsida
Ordre :	Cyperales
Famille :	Poaceae
Genre :	Sorghum
Espèce :	<i>Sorghum bicolor</i> (L. Moench) (synonyme : <i>Sorghum vulgare</i> (ZOLIKPO, 2011) ; (OGTR, 2017).

I.4.2.1.3.- Importance économique et alimentaire des sorghos cultivés :

Le sorgho est une des espèces de céréales les plus importantes en termes d'alimentation humaine et animale au niveau mondial. Dans de nombreux pays en voie de développement, il constitue un des pivots de la sécurité alimentaire (THERA, 2017).

Le rôle de ses grains est important dans l'alimentation des habitants de ces régions, voire primordial en conditions semi-arides. Le sorgho est également cultivé dans beaucoup d'autres régions du Monde, pour être distribué sous forme de grains ou de fourrage dans l'alimentation des animaux domestiques (DEHAYNIN, 2007).

La production en grains ainsi que les surfaces consacrées à sa culture placent le sorgho au 5e rang mondial des céréales, loin derrière les trois plus importantes (blé, riz et maïs). En Afrique, il occupe la seconde place, avec une production représentant la moitié de celle du maïs. Sur le plan mondial, le rendement moyen à l'hectare est de 1,3 tonne mais ce chiffre couvre des disparités importantes (3,5 tonnes par hectare aux Etats-Unis à 0,7 en Afrique). En région tempérée, le sorgho est actuellement réservé à l'alimentation animale, les productions de sirop, de sucre, d'alcool et d'amidon n'étant plus compétitives. En zone tropicale semi-aride, la plante entière est utilisée par des millions d'hommes. Les grains, riches en protéines, sont transformés pour l'alimentation humaine ; les tiges servent de combustible et de matériau de construction ; les résidus de récolte (tiges, feuilles) fournissent un complément de fourrage pour le bétail (DEU et HAMON, 1994).

I.4.2.2.- Protocole expérimental :

On commence par peser 5g de terreau non salé avec 4% de CaCO_3 pour chaque pot à un diamètre de 3 cm ; nous réalisons un semis de dix (10) graines de *Sorghum vulgare* L dans chaque pot. La première irrigation est effectuée par un apport de 2 ml/pot par l'extrait aqueux de l'ortie, puis on rajoute 4ml de l'eau distillé jour après jour (photo 16). L'expérimentation est suivie durant 18 jours en notant quotidiennement le taux de germination, et le niveau de croissance des semis.



Photo 12 : Test de la fertilisation (Originale, 2018).

I.5. Dosage biologiques :

I.5.1. Dosage de protéines :

I.5.1.1.- Principe:

Le taux de protéine est déterminé selon la méthode de Bradford (1976). Le dosage des protéines est réalisé afin de déterminer l'activité enzymatique spécifique qui exprime la quantité de substrat hydrolysée en unité de temps présent dans le milieu réactionnel, c'est une technique colorimétrique basée sur le changement de coloration de bleu de Coomassie lors de sa fixation aux protéines. Ce réactif, rouge-brun à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines et par conséquent possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible (à 595 nm) qui permet un dosage protéique simple et très sensible. La teneur en protéines en (mg/ml) est obtenue grâce à une courbe d'étalonnage réalisée (Annexe II), en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) dans les mêmes conditions expérimentales.

I.5.1.2. Mode opératoire :

100µl de l'échantillon à doser (contenant au maximum 50µg de protéine) est mélangé avec 2500µl de réactif au bleu de commassie, (Annexe III). La lecture des absorbances est réalisée à 595 nm après 2 min. Le taux de protéine est déterminé à l'aide d'une gamme étalon (0 à 100 µg de protéines) avec le sérum albumine bovin (BSA) (Annexe IV).

I.5.2.-Mesure de l'activité de cholinestérase :

I.5.2.1.-Principe :

La mesure de l'activité enzymatique de cholinestérase repose sur la méthode d'ELLMAN *et al.* (1961) par spectrophotomètre, le substrat de l'enzyme dont on veut mesurer l'activité est constitué de l'acétylcholine, et d'un DTNB, dans une réaction d'oxydoréduction consécutive à la réduction enzymatique de l'acétylcholine en thiocholine et acétate. Le groupement thiol de la thiocholine réduit le chromogène DNTB en TNB (acide 5-thio(2-nitrobenzoïque), composé jaune qui possède une absorbance maximale entre 412-415 nm. L'augmentation de la coloration dans le temps indique la formation de thiocholine qui est le reflet de l'activité de l'enzyme (GHENABZIA, 2009).

$$As = A/P$$

As: Activité enzymatique spécifique en nanomoles .min⁻¹.μg de protéine.

A: Activité enzymatique en nanomoles .min⁻¹.ml⁻¹.

P : concentration en protéine (μg/ml).

I.6. Exploitation des résultats :

I.6.1. Taux de la mortalité :

La mortalité est le premier critère de jugement de l'efficacité d'un traitement chimique ou biologique le pourcentage de la mortalité observée chez les larves de culex témoins et traités, est estimé en appliquant la formule suivante :

$$\text{Mortalité observée} = (\text{Nombre de morts} / \text{Nombre totale des individus}) \times 100$$

(OULED EL HADJ et al, 2006).

I.6.2. Temps de mortalité (TL₅₀) :

Le temps léthal 50 (TL₅₀), correspond au temps nécessaire pour que 50% des individus d'une population morte suite à un traitement par une substance quelconque. Il est calculé à partir de la droite de régression des probits correspondants au pourcentage de la mortalité corrigée en fonction des logarithmes du temps de traitement, il a utilisé, la formule de SCHNEIDER et la tables des probits (KEMASSI, 2014). Formule de SCHNEIDER :

$$MC = [M2 - M1 / 100 - M1] \times 100$$

*MC% de mortalité corrigée.

*M2% de mortalité dans la population traitée.

*M1% de mortalité dans la population témoin.

I.6.3. Dose létale (DL₅₀) :

La Dose Létale 50 (DL₅₀) correspond à la quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50% (la moitié) d'un groupe traité. La DL₅₀ est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière. Pour la présente étude, la méthode des probits est suivie (KEMASSI, 2014).

I.6.4.-Taux de germination :

La germination est une période transitoire au cours de laquelle la graine qu'était à l'état de vie latente, manifeste une reprise des phénomènes de multiplication et d'allongement cellulaire. La germination correspond au passage de l'état de vie ralentie à l'état de vie active, que les réserves qui jusque l'assuraient le métabolisme résiduel de l'embryon vont être activement métabolisées pour assurer la croissance de la plantule (**MEDJOURI et LAIB, 2016**).

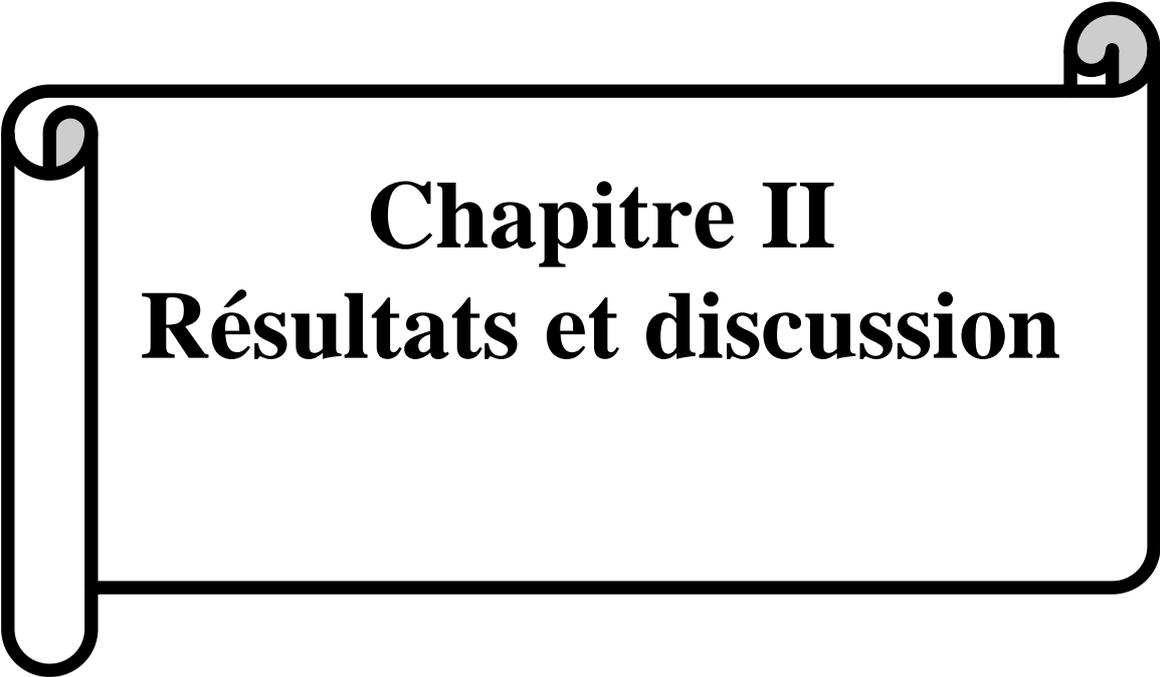
Le taux de germination est déterminé à partir du nombre total des graines met en germination et le nombre des graines germée (**AHOTON, 2009**), en effet, le taux de germination est calculé par la formule suivante :

$$TG\% = \frac{\text{Nombre des graines germée} \times 100}{\text{Nombre des graines semies}}$$

I.7.-Analyse statistique :

Les traitements des données obtenues fait appel à des approches statistiques. D'après DAGNELIE (1975) l'analyse de la variance consiste à étudier la comparaison des moyennes à partir de la variabilité des échantillons. L'analyse de la variance ANOVA est utilisée pour l'analyse des résultats après le test de normalité. Il permet suivant le niveau de la signification de déterminer l'influence des facteurs étudiés ou des interactions entre les facteurs. Afin de rechercher les relations entre les différents paramètres étudiés et l'influence d'un variable sur un autre, un test de corrélation est réalisé.

Les résultats obtenus pour chaque paramètre biochimique seront interprétés statistiquement à l'aide du logiciel «STATISTICA version 10.FR- copyright 2011». La probabilité inférieure à 0,01 donne un effet hautement significatif, à 0,05 un effet significatif et pour une probabilité supérieure à 0,05, il est considère que l'effet n'est pas significatif.



Chapitre II
Résultats et discussion

CHAPITRE II- Résultats et discussion:

Le présent chapitre vise à présenter les résultats sur l'effet biologique des extraits aqueux obtenus par une extraction à reflux des feuilles d'*Urtica dioica* (Ortie). Les paramètres mesurés sont la mortalité, la dose létale 50 (DL₅₀), les temps létaux 50 (TL₅₀) de l'extrait, l'activité de cholinestérase, l'activité spécifique, le taux de protéines, ainsi que l'étude de l'activité fertilisante sur *Sorghum Vulgare* (Sorgho).

II.1.-Effets de l'extrait aqueux sur la mortalité :

La variation de taux de la mortalité cumulée observée des larves (L4) de *Culex pipiens* au niveau de différents lots témoins et traités par l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* à différentes concentrations (100% ,80%, 60%,40% 20%) sont regroupé dans le tableau 1

Tableau 1- Taux de mortalité cumulée observé chez les larves (L4) de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioica*.

Temps (heurs)	Témoin	Lots expérimentaux				
		<i>Culex pipiens</i> (L ₄) traités par l'extrait aqueux d' <i>Urtica dioica</i>				
		Doses				
		20%	40%	60%	80%	100%
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	8,33	16,66	25	50	83,33
5	0	8,33	16,66	33,33	75	83,33
6	0	8,33	16,66	33,33	75	83,33
7	0	8,33	25	58,33	83,33	91,66
8	0	8,33	33,33	58,33	91,66	91,66
9	0	8,33	33,33	66,66	91,66	100
10	0	16,66	33,33	91,66	91,66	100
11	0	16,66	66,66	100	100	100
12	0	16,66	83,33	100	100	100
13	0	16,66	83,33	100	100	100
14	0	33,33	83,33	100	100	100
15	0	33,33	83,33	100	100	100
16	0	33,33	83,33	100	100	100
17	0	33,33	83,33	100	100	100
18	0	33,33	83,33	100	100	100
19	0	33,33	83,33	100	100	100
20	0	33,33	83,33	100	100	100
21	0	33,33	83,33	100	100	100
22	0	33,33	83,33	100	100	100
23	0	33,33	83,33	100	100	100
24	0	50	91,66	100	100	100
25	0	50	91,66	100	100	100
26	0	50	91,66	100	100	100
27	0	58,33	91,66	100	100	100
28	0	58,33	91,66	100	100	100
29	0	58,33	91,66	100	100	100
30	0	66,66	91,66	100	100	100
31	0	66,66	91,66	100	100	100
32	0	66,66	91,66	100	100	100
33	0	66,66	91,66	100	100	100
34	0	66,66	91,66	100	100	100
35	0	83,33	91,66	100	100	100
36	0	83,33	91,66	100	100	100
37	0	83,33	91,66	100	100	100
38	0	83,33	91,66	100	100	100
39	0	83,33	91,66	100	100	100
40	0	83,33	91,66	100	100	100
41	0	83,33	91,66	100	100	100
42	0	83,33	91,66	100	100	100
43	0	83,33	91,66	100	100	100
44	0	83,33	91,66	100	100	100
45	0	83,33	91,66	100	100	100
46	0	83,33	91,66	100	100	100

47	0	83,33	91,66	100	100	100
48	0	83,33	100	100	100	100
49	0	83,33	100	100	100	100
50	0	83,33	100	100	100	100
51	0	83,33	100	100	100	100
52	0	83,33	100	100	100	100
53	0	83,33	100	100	100	100
54	0	91,66	100	100	100	100
55	0	91,66	100	100	100	100
56	0	91,66	100	100	100	100
57	0	91,66	100	100	100	100
58	0	91,66	100	100	100	100
59	0	91,66	100	100	100	100
60	0	91,66	100	100	100	100
61	0	91,66	100	100	100	100
62	0	91,66	100	100	100	100
63	0	91,66	100	100	100	100
64	0	91,66	100	100	100	100
65	0	91,66	100	100	100	100
66	0	91,66	100	100	100	100
67	0	91,66	100	100	100	100
68	0	91,66	100	100	100	100
69	0	91,66	100	100	100	100
70	0	91,66	100	100	100	100
71	0	91,66	100	100	100	100
72	0	100	100	100	100	100

Les résultats de tableau 1 rapportent que le taux de la mortalité cumulée varie selon les concentrations ; les valeurs rapportées pour le lot témoin sont plus faible que celles notées pour les lots traités. L'extrait aqueux d'*Urtica dioica* engendre une mortalité larvaire totale de 100% chez les larves L₄ de *Culex pipiens*, pour les lots traités par l'extrait aqueux pur des feuilles d'*Urtica dioica*. Le pourcentage de mortalité augmente en fonction de la concentration en extrait appliqué, un pourcentage de mortalité de 91,66 %, 66,66% , 33,33% et 8,33% respectivement est noté au niveau du lot traité par l'extrait des feuilles à 80%, 60% , 40% et 20% de concentration.

II.2.-Effet sur la cinétique de la mortalité :

Suite à l'exposition des larves L₄ de *Culex pipiens* aux différentes concentrations d'extrait aqueux d'*Urtica dioica*, un suivi expérimental pendant 72 heures (3 jours) et réalisé. La figure 6 illustre la cinétique de la mortalité cumulée des larves de *Culex pipiens* au niveau de différents lots traités et témoin.

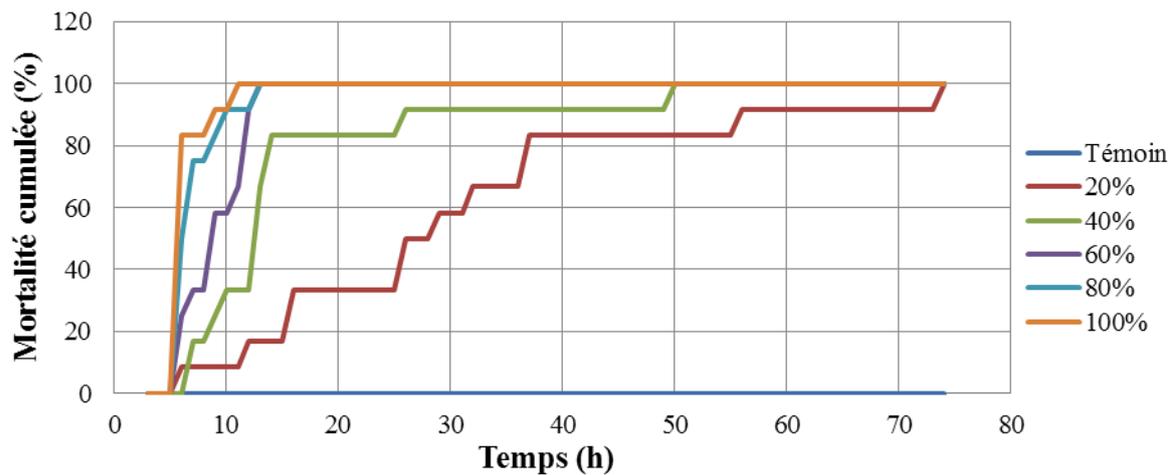


Figure 10 : Cinétique de la mortalité cumulée observée chez les larves (L_4) de *Culex pipiens* témoins et traitées par l'extrait aqueux foliaire d'*Urtica dioica* (Ortie).

Au vu des résultats, le temps révèle un taux de mortalité maximale 100% chez les larves (L_4) de *Culex pipiens* traités par les extraits aqueux non dilués (100%). (figure 6)

En effet les taux de mortalité cumulée des larves augmentent chaque heure pour atteindre un taux maximal (effet cumulatif, la mort se produit après l'accumulation d'une certaine quantité de l'extrait dans le corps des insectes). Un taux de mortalité de 100% est atteint au bout de 72 heures.

Les tests biologiques de MERABTI *et al.*, (2015) ont montré que l'extrait aqueux des fruits de *Citrullus colocynthis* a une toxicité élevée contre les deux espèces (*Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*). Le taux de mortalité des larves de *Culex pipiens* a été significativement variable avec les différentes concentrations et le temps d'exposition. Il augmente avec l'augmentation de la concentration et le temps d'exposition. Le taux de mortalité le plus élevé (100%) a été observé à partir de 100 mg/L après 72 h d'exposition, ou avec la dose de 200 mg/L après uniquement 48h.

KEMASSI *et al.*, (2015) notent que chez les larves du *Culex pipiens* traitées à l'aide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana*, le taux de mortalité varie en fonction de la concentration en extrait, cette action est probablement liée à la concentration des extraits en molécules actives capable de tuer les larves.

D'après LAOUIRA (2014) qui confirme l'effet insecticide des poudres des feuilles de quatre plantes testées, dont laurier rose est classé premier de point de vue toxicité, suivit respectivement par l'Eucalyptus, l'Ortie et le Faux poivrier. Les résultats indiquent que les poudres des feuilles de ces plantes se sont avérées trop toxiques vis-à-vis des adultes de *Drosophila*

melanogaster avec des taux de mortalité très élevés par rapport au myrte et à l'olivier, qui pour ce cas, se sont avérés sans effet significatif sur la mortalité des adultes de *Drosophila melanogaster*.

ZOUAOUI (2007) évalué l'effet de l'extrait aqueux de la plante *Laurus nobilis* sur l'aspect toxique des larves de moustiques (*Culex pipiens*), Cet extrait montre une activité larvicide avec une relation dose-réponse, une toxicité élevée au niveau du stade larvaire 2, comparativement aux stades L₃ et L₄. Cette sensibilité est encore plus élevée lorsque l'exposition des larves aux insecticides est prolongée dans le temps (48h et 72h).

AOUINTY *et al.*, (2006) montre que après avoir exposé des larves du stade 4 de l'espèce *C. pipiens* aux différentes concentrations des cinq extraits aqueux pendant 24 h, le taux de mortalité varie selon les concentrations. Pour tous les extraits, à l'exception de celui du laurier rose, la mortalité des larves atteint un taux de 100 % à partir d'une concentration de 4 %. Cependant, dans l'extrait du *Ricinus communis*, la mortalité est plafonnée à 100 % dès la concentration de 1 %. De l'ensemble de ces résultats un premier classement de l'efficacité toxique des extraits testés est mis en évidence, ainsi les extraits les plus toxiques sont ceux des feuilles du ricin et du bois de thuya et le moins toxique celui des feuilles du laurier rose.

II.3.-Dose létale (DL₅₀) d'extrait foliaire d'*Urtica dioica* sur les larves (L₄) de *Culex pipiens* :

Tableau 2 : Mortalité corrigée et probits correspondants en fonction de la concentration de l'extrait appliqué

Doses			Mortalité corrigée	
Pourcentage (%)	Concentration (mg/ml)	Log [c _{mg/ml}]	Pourcentage (%)	Probits
100	0,1068	-0,9714	100	7,614
80	0,0854	-1,0685	91,66	6,37268
60	0,0640	-1,1938	66,66	5,4288
40	0,0427	-1,3695	33,33	4,56028
20	0,0213	-1,6716	8,33	3,59566

Tableau 3 : Équation de régression, coefficient de régression et les valeurs de DL₅₀ pour l'extrait aqueux d'*Urtica dioica*

Organe	Equation de régression	Coefficient de régression	Dose létale 50 [mg/ml]
feuille	$Y=5,4278x+12,326$	$R^2=0,924$	DL₅₀%=0.0446

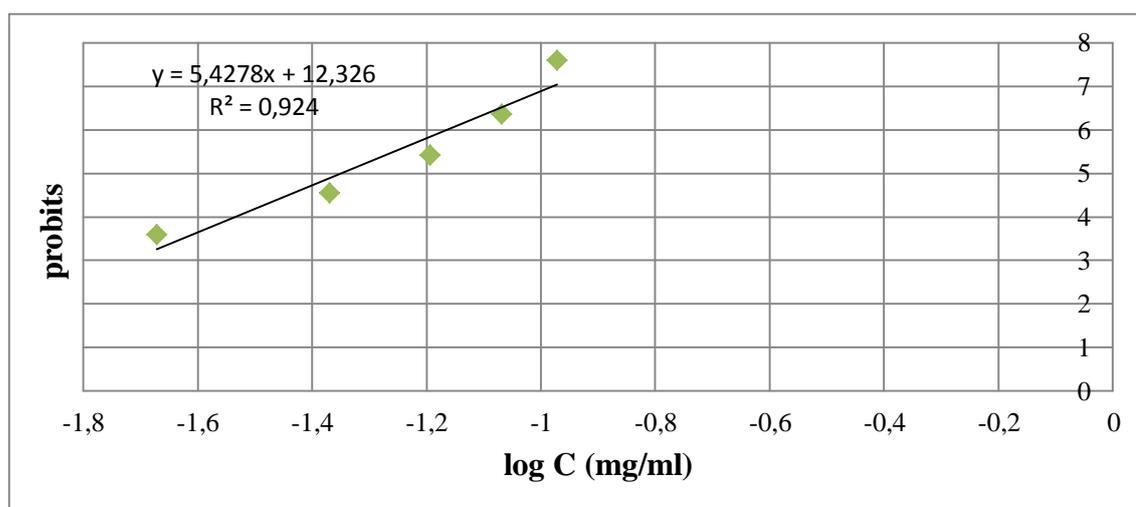


Figure 11 : Relation entre la mortalité corrigée des larves (L₄) de *Culex pipiens* et la dose de l'extrait aqueux foliaire d'*Urtica dioica* (Ortie).

Les tests de l'effet des extraits d'*Urtica dioica* ont été effectués sur larves (L₄) de *Culex pipiens*, afin d'estimer les doses entraînant une mortalité de 50% d'individus selon le modèle des Probits. Au vu des résultats, il est noté que la concentration qui cause la mortalité de 50% des larves par l'extrait aqueux des feuilles est de $DL_{50} = 0.0446$ mg/ml.

Selon AOUINTY *et al.*, (2006) Les CL₅₀ calculées pour des larves du quatrième stade (L₄) de l'espèce *Culex pipiens* sont montrés que parmi les 5 extraits testés, deux se sont révélés intéressants en terme de toxicité, l'extrait de *T. articulata* et celui du *R. communis*. Ils présentent en effet les CL₅₀ les plus faibles qui sont respectivement de 530 mg/l et de 600 mg/l.

EL-AKHAL *et al.*, (2014) ont évalué l'activité larvicide sur les larves de *Culex pipiens* de l'huile essentielle de *Tyhmus vulgaris*. Elle a montré une intéressante activité larvicide envers l'espèce *Culex pipiens*, avec une valeur de 103 ppm pour la CL₅₀.

ZOUAOUI (2007) informe que l'application de extrait aqueux de *Laurus nobilis* chez les larves de *Cx pipiens* a permis d'établir les doses létales, DL50 des L2 pendant, 24h, 48h et 72h(568.88, 584.44, 391.93 mg/l)respectivement, L3 pendant, 24h, 48h et 72h (1309.894, 1002.423, 658.291) respectivement et les DL50 des L4 sont(949.67, 1309.89, 936.723) respectivement.

II.4.-Temps létale 50 (TL₅₀) d'extrait foliaire d'*Urtica dioica* sur les larves (L₄) de *Culex pipiens*

Les calculs de temps létal 50% (TL₅₀) ont été effectués en dressant la droite de régression des probits correspondants aux pourcentages des mortalités corrigées en fonction des logarithmes des temps de traitement. Les données sont groupées en classe de temps, dans cette étude en heure. Les méthodes d'analyse de survie permettent d'associer la fréquence et le délai de survie de l'événement étudié qui est la mort des insectes.

Le temps qui écoule entre le début du traitement et la date de la dernière observation est étudiée. À la dernière heure du comptage le nombre de survivants, est noté. Les mortalités et les probits correspondants sont illustrés dans le tableau 4, ainsi les droites de régressions correspondantes sont illustrées dans le tableau 5.

Tableau 4 : Probits correspondants aux pourcentages de la mortalité corrigée en fonction du temps enregistrés chez les larves de *Culex pipiens* traitées par l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* à différentes concentrations.

Temps (heurs)	Log de temps	Probits de pourcentage de la mortalité corrigée chez les larves L4 (<i>Culex pipiens</i>) traité par l'extrait d' <i>Urtica dioica</i> (l'ortie)				
		Doses				
		100%	80%	60%	40%	20%
1	0	-	-	-	-	-
2	0,30	-	-	-	-	-
3	0,47	-	-	-	-	-
4	0,60	5,9544	5	4,326	4,0264	3,59566
5	0,69	5,9544	5,674	4,56028	4,0264	3,59566
6	0,77	5,9544	5,674	4,56028	4,0264	3,59566
7	0,84	6,37268	5,9544	5,20224	4,326	3,59566
8	0,90	6,37268	6,37268	5,20224	4,56028	3,59566
9	0,95	7,6140	6,37268	5,4288	4,56028	3,59566
10	1	7,6140	6,37268	6,37268	4,56028	4,0264
11	1,04	7,6140	7,6140	7,6140	5,4288	4,0264
12	1,07	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,0264
13	1,11	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,0264

14	1,14	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
15	1,17	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
16	1,20	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
17	1,23	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
18	1,25	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
19	1,27	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
20	1,30	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
21	1,32	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
22	1,34	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
23	1,36	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544	4,56028
24	1,36	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5
25	1,39	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5
26	1,41	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5
27	1,43	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,20224
28	1,44	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,20224
29	1,46	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,20224
30	1,47	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,4288
31	1,49	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,4288
32	1,50	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,4288
33	1,51	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,4288
34	1,53	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,4288
35	1,54	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
36	1,55	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
37	1,56	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
38	1,57	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
39	1,59	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
40	1,60	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
41	1,61	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
42	1,62	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
43	1,63	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
44	1,64	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
45	1,65	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
46	1,66	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
47	1,67	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268	5,9544
48	1,68	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
49	1,69	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
50	1,69	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
51	1,70	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
52	1,71	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
53	1,72	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	5,9544
54	1,73	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
55	1,74	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
56	1,74	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
57	1,75	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
58	1,76	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
59	1,77	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
60	1,77	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
61	1,78	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
62	1,79	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
63	1,79	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268

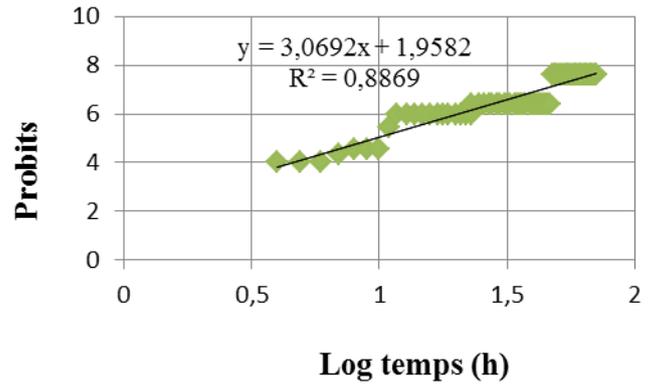
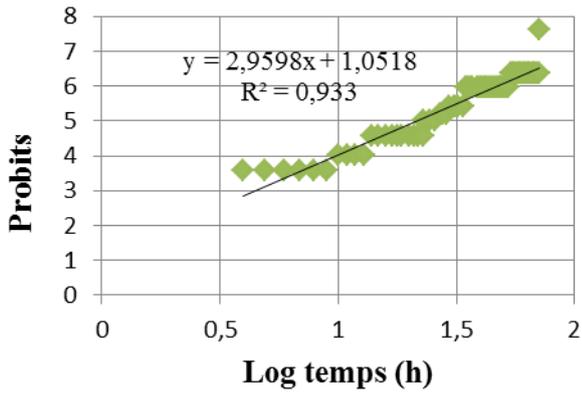
64	1,80	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
65	1,81	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
66	1,81	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
67	1,82	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
68	1,83	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
69	1,83	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
70	1,84	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
71	1,85	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	6,37268
72	1,85	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140	7,6140

Tableau 5 : Équation des droites de régression, coefficients de régressions et les valeurs de TL₅₀ évaluées pour les cinq concentrations de l'extrait aqueux.

Concentration (%)	Equation de régression	Coefficient de régression	Temps léthal 50 (TL ₅₀) (en heure)
100	Y=0,832x+6,266	R ² =0,436	0,03
80	Y=1,257x+5,570	R ² =0,532	0,35
60	Y=1,856x+4,596	R ² =0,532	1,65
40	Y=3,069x+1,958	R ² =0,886	9,79
20	Y=2,959x+1,051	R ² =0,933	21,60

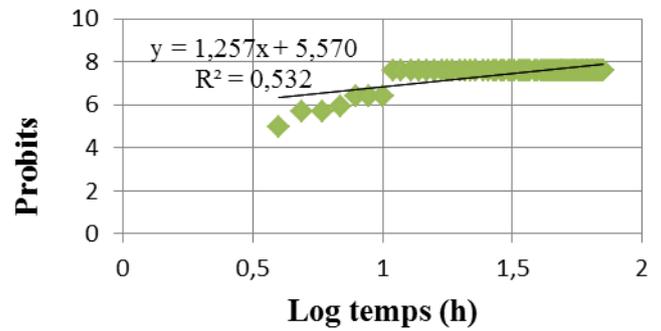
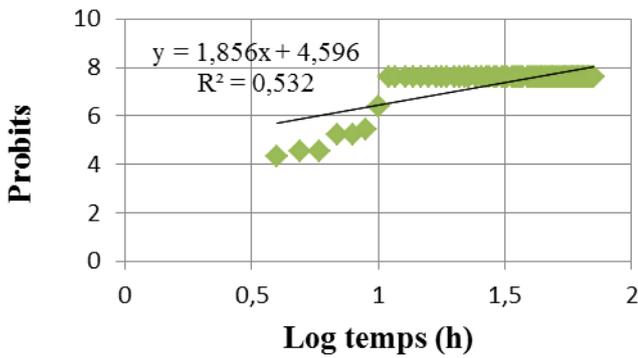
Au vu des valeurs de la TL₅₀ de chaque concentration en extrait aqueux foliaire d'*Urtica dioica* présenté dans la tableau 5 et la droite de régression des probits en fonction du logarithme des durées de traitement présenté dans la figure 8, il apparaît que les extraits foliaires d'*Urtica dioica* à 100% et 80 % présentent une valeur minimale de TL₅₀ avec respectivement 0,03 et 0,35, donc semblent les plus toxiques que les autres concentrations. Cela signifie une rapidité d'action particulière vis-à-vis les larves (L4) de *Culex pipiens*. Pour les autres concentrations le temps létale pour 50% des individus augmentent avec la diminution de la dose, il est de 1,65 pour la dose 60% , de 9,79 pour la dose 40%, cependant la valeur maximale de TL₅₀ corresponde à la dose la plus faible de l'extrait aqueux de 20% soit 21,60.

D'après LAOUIRA (2014), La valeur de TL₅₀ la plus courte est enregistrée chez *Drosophila melanogaster* nourrie par la poudre de Laurier rose soit 14,21 heures. Elle est suivit par les poudres du Faux poivrier, d'Eucalyptus et de l'Ortie respectivement avec des durées de 17,38 heures, 17,56 heures et 28,93heures. Alors que le TL50 le plus long s'observe pour la poudre du myrte avec 56,83 heures, soit 2 jours et 10 heures, suivit en fin, par la poudre d'olivier représentée par 120,82 heures, soit 5 jours et 2 heures.



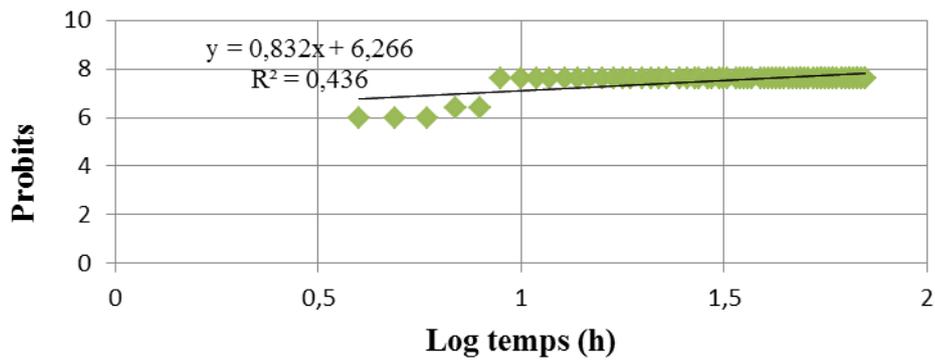
A-Action de l'extrait à la dose 20% dans le temps.

B-Action de l'extrait à la dose 40% dans le temps.



C-Action de l'extrait à la dose 60% dans le temps.

D-Action de l'extrait à la dose 80% dans le temps.



E-Action de l'extrait à la dose 100% dans le temps

Figure 12 : A, B, C, D, E, Action de l'extrait aqueux foliaires de l'*Urtica dioica* sur les larves (L4) de *Culex pipiens*.

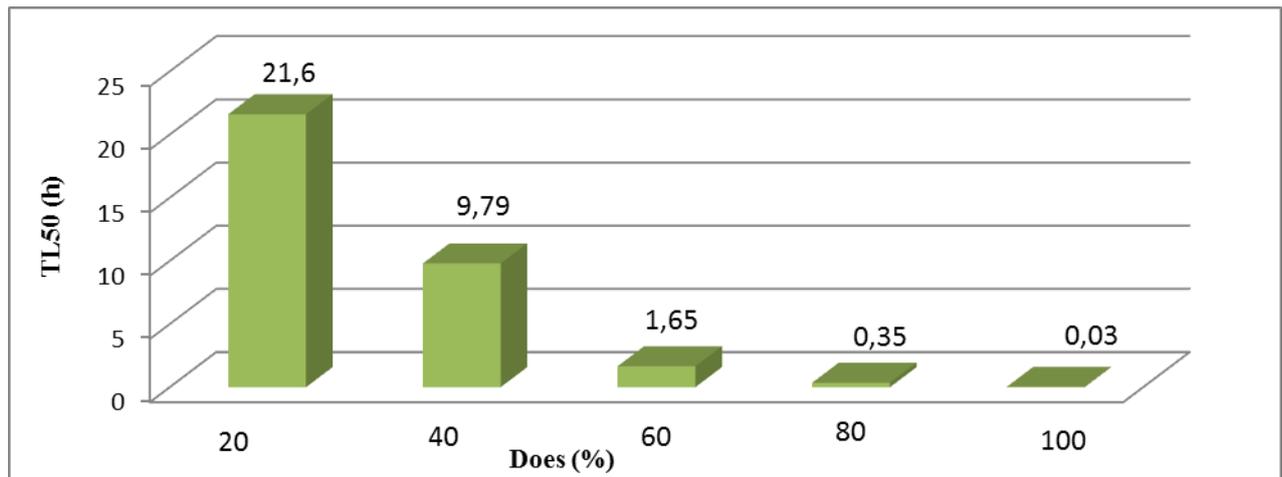


Figure 13 : Temps létale de 50 des larves (TL₅₀) à différentes doses de l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* (Ortie).

II.5.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l'*urtica dioica* sur l'activité d'enzyme cholinestérase :

Les résultats de l'action de différentes doses d'extrait d'*Urtica dioica* sur l'activité cholinestérasique chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens* sont illustrés dans la figure 10. Il semble que la diminution de l'activité d'enzyme cholinestérase est inversement proportionnelle à la dose de l'extrait.

Ainsi il apparaît des variations très importantes de l'activité cholinestérasique entre les larves témoins qui sont de 5.59 ± 0.35 nanomole /mn/ml et les larves traitées. Les valeurs sont de 5.53 ± 1.33 nanomole /mn/ml pour les larves traitées par la dose 20%, de 4.88 ± 2.70 nanomole /mn/ml pour les larves traitées par la dose 40%, de 4.54 ± 0.93 nanomole /mn/ml pour les larves traitées par la dose 60% et de 3.99 ± 0.48 nanomole /mn/ml, pour les larves traitées par la dose 80%, l'activité cholinestérasique la plus faible est de 2.89 ± 0.48 enregistré pour la dose 100%.

L'analyse de la variance de l'effet de l'extrait foliaire de la plante *Urtica dioica* sur l'activité d'enzyme cholinestérase montre une différence très hautement significative dans les valeurs de l'activité d'enzyme cholinestérase rapportées chez les larves traitées par les doses (100%, 80%, 60%, 40%, 20%) avec un facteur F égale à $F = 595,5379$; $P = 0.000011$, $F = 389,4744$; $P = 0.000026$, $F = 155,6069$; $P = 0.000161$, $F = 37,04046$; $P = 0.002624$ et $F = 149,9226$; $P = 0.000173$ respectivement, comparativement aux larves témoins.

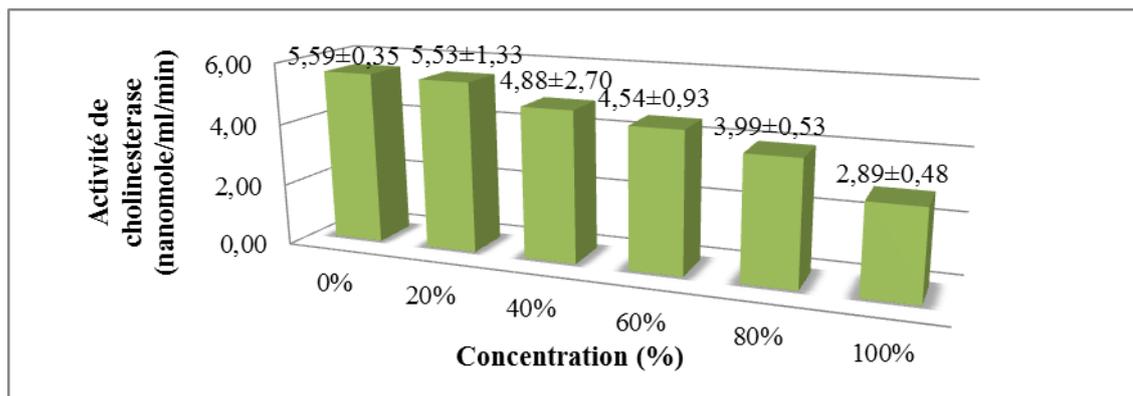


Figure 14 : Activité cholinestérasique chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens* témoins et traités par différentes doses d'extrait de l'*Urtica dioica* (ortie).

GHNABZIA (2009) rapporte que les différentes doses de Kiuk 200SL (inhibiteur de cholinestérase), entraînent une inhibition de l'acétylcholinestérase, chez le criquet pèlerin (*Schistocerca gregaria*). L'activité cholinestérasique pour la dose 8g de Kiuk 200SL est de $3,81 \pm 3,68$ nmole/min/ml pour les individus mâles et $5,6 \pm 5,98$ nmole/min/ml pour les femelles par rapport aux individus témoins mâles et femelle avec respectivement $43,65 \pm 13,69$ nmole/min/ml et $84,73 \pm 24,26$ nmole/min/ml; l'inhibition persiste 24 heures après traitement.

Les travaux de HAMID OUDJANA (2009) observés, 24 h après traitements à différentes doses chez les individus de *S.gregaria*, apparaissent semblables aux valeurs notées avant 24 h, une activité de $24,81 \pm 4,91$ nanomole/min/ml chez les individus femelles et un taux moyen de cholinestérase de $28,99 \pm 8,00$ nanomole/min/ml chez les individus mâles ayant reçu la dose de 2g de Malatox EC50/l un insecticide organophosphoré inhibiteur de cholinestérase.

En 2017 HAMID OUDJANA montre que les mesures neurochimiques laissent apparaître une chute de l'activité cholinestérasique chez les femelles de $16,34 \pm 1,44$ nanomole /mn /ml et chez les mâles de $8,08 \pm 1,94$ nanomole /mn /ml du criquet pèlerin traités par l'extrait foliaire de *C. vulgaris*. Cette diminution est plus perceptible pour les mâles par rapport aux femelles.

II.6.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l'*Urtica dioica* sur le taux de protéines :

Les résultats relatifs aux taux de protéines chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens* témoins et traités à différentes concentrations de l'extrait foliaire de l'*Urtica dioica* sont présentés dans la figure 11. Les larves témoins enregistrent un taux de protéines égal à $240,03 \pm 2,16 \mu\text{g/ml}$. Il apparaît une diminution du taux de protéines chez les larves traitées, les valeurs sont de $117,53 \pm 3,555 \mu\text{g/ml}$ à la dose 100%, de $139,47 \pm 1,748 \mu\text{g/ml}$ à la dose 80%, de $148,92 \pm 0,609 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 60%, et de $159,47 \pm 1,748 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 40% et de $202,53 \pm 3,162 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 20%. L'analyse de la variance pour les valeurs du taux de protéines montre une différence très hautement significative rapportées chez les larves traitées par les doses (100% ,80%, 60%,40% et 20%) avec un facteur F égale à $F = 143568,3$; $P = 0.000007$, $F = 154333,8$; $P = 0.000006$, $F = 160357,9$; $P = 0.000006$, $F = 166251,6$; $P = 0.000006$ et $F = 198147,8$; $P = 0.000005$, respectivement, comparativement aux larves témoins.

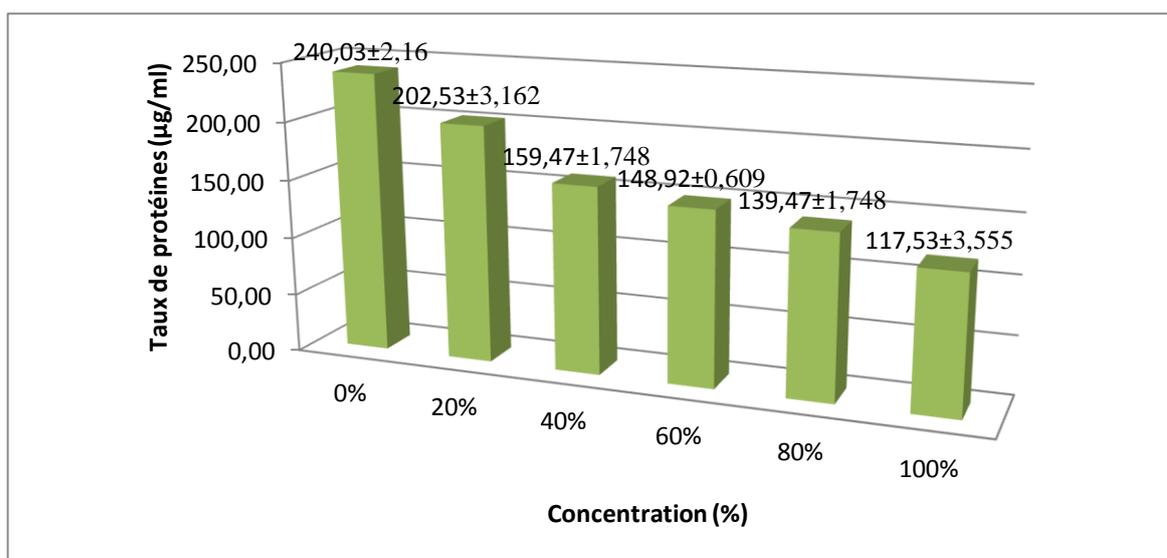


Figure 15: Taux de protéines chez les *Culex pipiens* (L₄) traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de l'*Urtica dioica* (Ortie).

BEN DAHOU et FILI (2017) montrent que les résultats relatifs aux taux de protéines chez les individus adultes de *Drosophiles* témoins et traités à différentes concentrations de l'extrait foliaire de *P. harmala* enregistrent une diminution du taux de protéines chez les individus traités, les valeurs sont de $10.5 \pm 6.71 \mu\text{g/ml}$ à la dose 100%, de $16.1 \pm 10.81 \mu\text{g/ml}$ à la dose 80% ,de $20.1 \pm 13.75 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 60%, et de $29.4 \pm 20.50 \mu\text{g/ml}$ pour la dose 40% et de $20,79 \pm 14.55 \mu\text{g/ml}$

NADJI (2011) note que le taux de protéines totales dans les larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* et *Aedes vexans*, montre une différence significative entre les deux espèces. Le contenu des protéines chez les larves du quatrième stade de *Culiseta longiareolata* est plus élevé que les larves d'*Aedes vexans*,

II.7.-Etude de l'effet toxique des extraits aqueux de l'*Urtica dioica* sur l'activité Spécifique :

Les résultats de l'action de différentes doses d'extrait de l'*Urtica dioica* sur l'activité cholinestérasique spécifique chez les larves de stade 4 de *Culex pipiens* sont illustrés dans la figure 12. Il apparaît des variations de l'activité entre les larves témoins qui sont de $0,023 \pm 0,013$ nanomole /mn/ μ g. Après traitement par l'extrait de l'ortie à la dose 20%, l'activité spécifique est de $0,020 \pm 0,012$ nanomole /mn/ μ g, la dose 40% l'activité spécifique est de $0,031 \pm 0,018$ nanomole /mn/ μ g, la dose 60% et 80%, l'activité spécifique est de $0,030 \pm 0,018$ et $0,029 \pm 0,017$ respectivement nanomole /mn/ μ g, pour la dose 100% l'activité est de $0,024 \pm 0,015$ nanomole /mn/ μ g. Il semble que l'activité spécifique diminue ou augmente légèrement par rapport aux individus témoins.

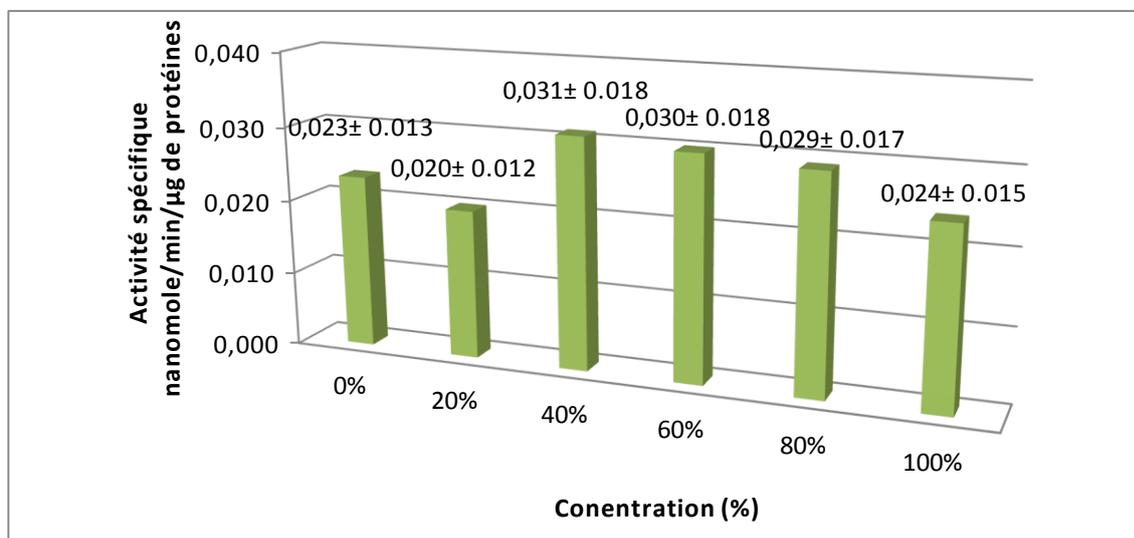


Figure 16 : Activité spécifique cholinestérasique chez les *Culex pipiens* (L₄) traités à différentes doses d'extraits des feuilles de l'*Urtica dioica*.

D'après HAMID OUDJANA (2009) l'activité spécifique semble être liée au taux de protéines et à l'activité cholinestérasique qui est inversement proportionnelle à la dose de la toxine, GALGANI *et al.*, (1983) montre que l'inhibition d'enzyme ainsi que l'altération de protéines peuvent induire une chute d'activité spécifique.

GHNABZIA (2009) constaté que la diminution de l'activité spécifique coïncide avec la chute de l'activité cholinestérasique cérébrale, l'inhibition de l'acétylcholinestérase provoque une accumulation anormale de l'acétylcholine dans les tissus, les récepteurs étant, saturé en acétylcholine, la membrane demeure dépolarisée ce qui a pour effet de stopper la transmission nerveuse dans la portion cholinergique de système nerveux.

II.8.- Effet des extraits végétaux sur le taux de germination des semences :

La variation de taux de la germination de *Sorghum vulgare* au niveau de différents lots témoins et traités par l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* à différentes concentrations (100% ,80%, 60%,40% 20%) sont regroupés dans le tableau 6.

Les résultats de tableau 6 et de la figure 13 rapportent que le taux de germination varie selon les concentrations ; les valeurs rapportées pour le lot témoin sont plus faible que celles notées pour les lots traités (doses 20% et 40%). pour la dose 60%, elle entraîne une convergence dans le taux de germination de Sorgho comparativement aux témoins non traités.

Contrairement les fortes doses 80 % et 100% entraînent une réduction significative du taux de germination des semences de Sorgho.

Tableau 6 : Taux de germination de *Sorghum vulgare* témoins et traitées par l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioica*.

Lots expérimentaux						
<i>Sorghum vulgare</i> témoins et traitées par l'extrait aqueux d' <i>Urtica dioica</i>						
Les jours	Taux de germination (%)					
	Témoins	20%	40%	60%	80%	100%
1	5	2,5	5	2,5	-	-
2	17,5	37,5	22,5	20	5	2,5
3	20	42,5	25	20	5	5
4	20	42,5	25	20	5	5
5	20	42,5	25	20	5	5
6	27,5	42,5	25	20	5	5
7	27,5	42,5	25	20	5	5
8	30	52,5	32,5	25	7,5	5
9	30	55	32,5	27,5	7,5	5
10	30	57,5	37,5	30	12,5	5
11	30	57,5	37,5	30	12,5	5

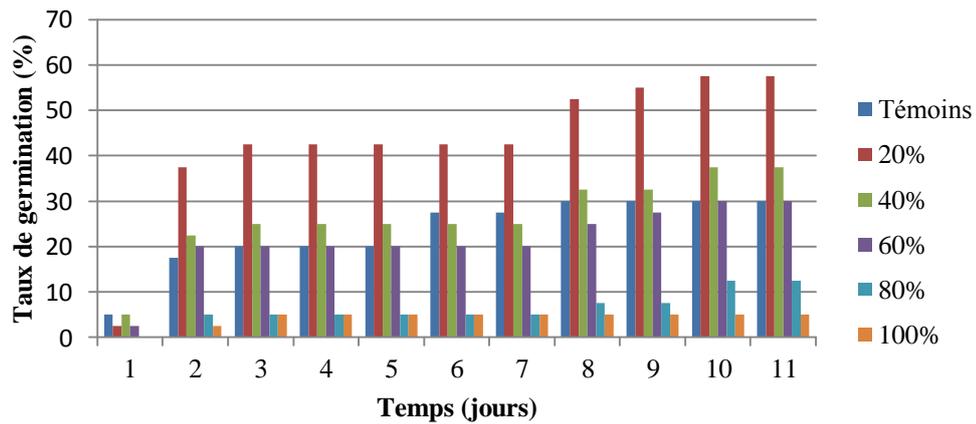


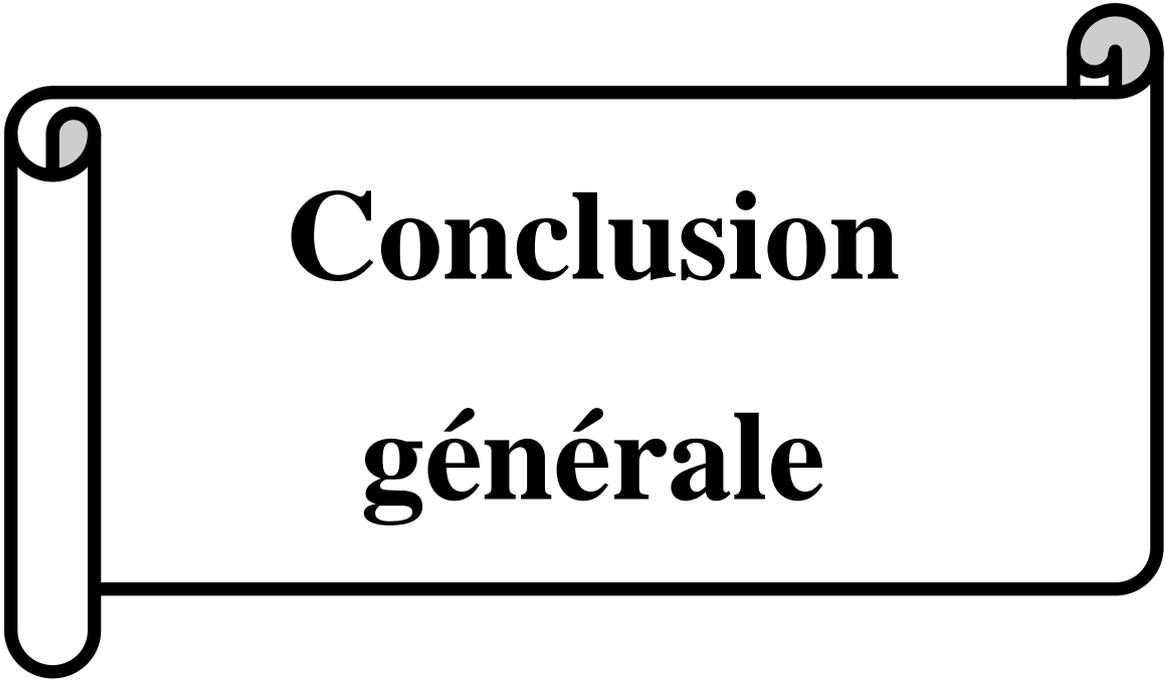
Figure 17: Taux de germination de *Sorghum vulgare* (Sorgho) traités à différentes doses de l'extrait des feuilles de l'*Urtica dioica* (Ortie).

DABIRE (2004) montre que l'extrait aqueux des feuilles de *Calotropis procera*, aux doses 8 % et 12% d'émulsion et des écorces de Balanites à la dose forte 12%, ont sensiblement augmenté le taux de germination des semences par rapport aux témoins non traités.

Ainsi l'application de l'extrait aqueux des racines de *S. longepedunculata* sur les semences de mil a fait baisser significativement leur taux de germination. L'extrait aqueux d'*E. alba* à la dose forte 12% a également entraîné une réduction significative du taux de germination des semences de mil comparativement aux témoins non traités. Le traitement des semences à l'huile essentielle de Citronnelle a entraîné une inhibition complète de la germination des semences de mil. La réduction du taux de germination des semences de Sorgho suite à l'emploi de l'huile est également importante. L'huile essentielle d'Eucalyptus a aussi affecté négativement le taux de germination des semences de mil et de Sorgho de façon significative comparativement au témoin non traité mais à un degré moindre par rapport à celle de la Citronnelle.

KEMASSI *et al*, 2015, informent que l'extrait aqueux foliaire ou racinaire pur ou dilué à 50% de *Pergularia tomentosa* engendre une inhibition totale de la germination des graines d'orge après 10 jours de suivi quotidien. Selon les résultats obtenus, le taux maximum de germination est de 70% au niveau du lot traité par l'extrait foliaire à 25%. Alors que pour les autres concentrations, les taux de germination signalés varient entre 83,33% à 93,33%.

BOYRIE, 2016, note que L'extrait d'ortie s'utilise comme phytostimulant: il stimule la fertilisation et les défenses naturelles des plantes vis-à-vis de certaines maladies ou d'invasions de parasites.



Conclusion
générale

Le but de la présente étude était d'évaluer l'extrait aqueux foliaire de l'ortie (El herayeg) *Urtica dioica* par l'étude de ses activités anticholinestérasique sur les larves de quatrième stade de *Culex pipiens* et fertilisante sur *Sorghum vulgare*.

Suite à l'exposition des larves L₄ de *Culex pipiens* aux différentes concentrations (100%, 80%, 60%, 40%, 20%) d'extrait aqueux d'*Urtica dioica*, les taux de mortalité cumulée des larves augmentent chaque heure pour atteindre un taux maximal avec une mortalité larvaire totale 100% pour les lots traités par l'extrait aqueux pur, les autres lots traités, montrent un pourcentage de mortalité qui augmente en fonction de la concentration en extrait appliqué, un pourcentage de mortalité de 91,66 %, 66,66% , 33,33% et 8,33% respectivement est noté au niveau du lot traité par l'extrait des feuilles à 80%, 60% , 40% et 20% de concentration. Un taux de mortalité de 100% est atteint au bout de 72 heures.

Au vu des résultats, il est noté que la concentration qui cause la mortalité de 50% des larves par l'extrait aqueux des feuilles est de $DL_{50} = 0.0446$ mg/ml, avec des valeurs de la TL_{50} de chaque concentration en extrait aqueux foliaire il apparaît que les extraits foliaires d'*Urtica dioica* à 100% et 80 % présentent une valeur minimale de TL_{50} avec respectivement 0,03 et 0,35 mais pour les autres concentrations le temps létal pour 50% des individus augmentent avec la diminution de la dose, il est de 1,65 pour la dose 60% , de 9,79 pour la dose 40%, cependant la valeur maximale de TL_{50} correspond à la dose la plus faible de l'extrait aqueux de 20% soit 21,60.

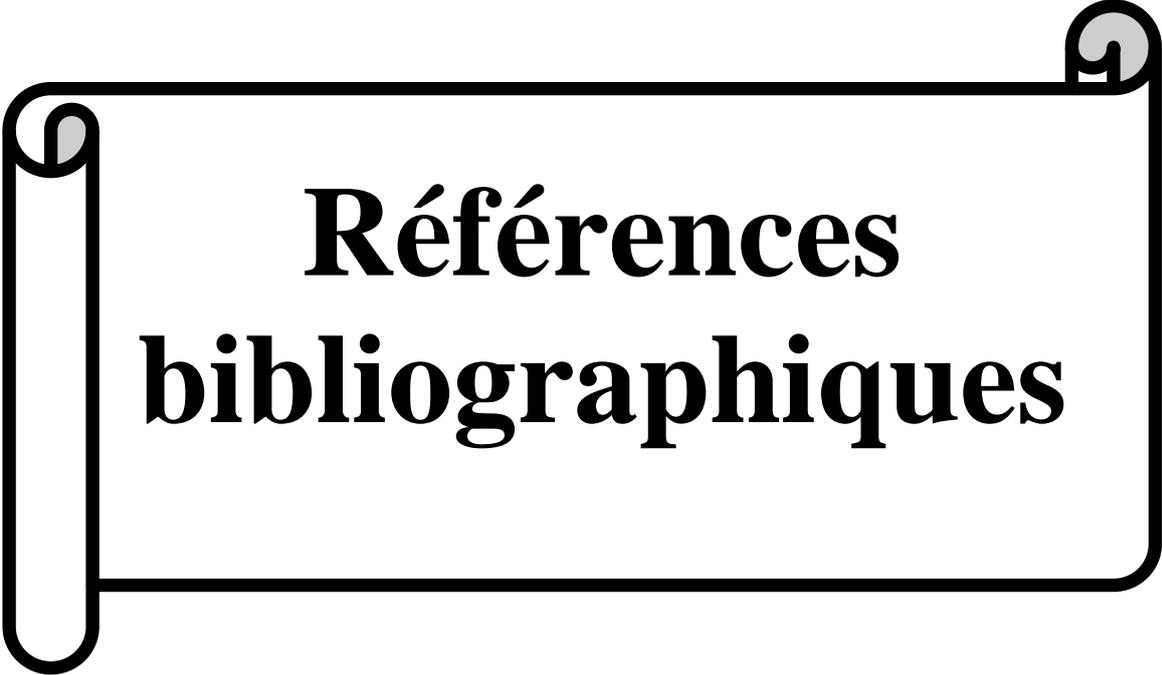
Ainsi il apparaît des variations très importantes de l'activité cholinestérasique entre les larves témoins qui sont de 5.59 ± 0.35 nanomole /mn/ml et les larves traités. Les valeurs sont de 5.53 ± 1.33 nanomole /mn/ml pour les larves traités par la dose 20%, de 4.88 ± 2.70 nanomole /mn/ml pour les larves traités par la dose 40%, de 4.54 ± 0.93 nanomole /mn/ml pour les larves traités par la dose 60% et de 3.99 ± 0.48 nanomole /mn/ml, pour les larves traités par la dose 80%, l'activité cholinestérasique la plus faible est de 2.89 ± 0.48 enregistré pour la dose 100%. L'activité spécifique est variée selon la dose de l'extrait, qui prend une valeur maximale à la dose 40%. $0,031 \pm 0.018$ nanomole /mn/ μ g. pour le taux de protéines Il ya une diminution des larves traités, les valeurs sont de $117,53 \pm 3,555$ μ g/ml à la dose 100%, de $139,47 \pm 1,748$ μ g/ml à la dose 80%, de $148,92 \pm 0,609$ μ g/ml pour la dose 60%, et de $159,47 \pm 1,748$ μ g/ml pour la dose 40% et de $202,53 \pm 3,162$ μ g/ml pour la dose 20%.

D'autre part, le taux de germination de *Sorghum vulgare* au niveau de différents lots témoins et traités par l'extrait aqueux d'*Urtica dioica* (ortie) à différentes concentrations (100%, 80%, 60%, 40%, 20%) varie selon les concentrations de l'extrait, la valeur la plus élevée est enregistrée au niveau des pots traités avec la dose la plus faible (20%). Les valeurs des lots témoins sont plus faibles que celles notées pour les lots traitement (doses 20% et 40%). Pour la dose 60% entraîné une convergence dans le taux de germination de Sorgho comparativement aux témoins non traités mais contrairement aux fortes doses 80% et 100% presque entraîné une réduction significative du taux de germination des semences de sorgho.

L'analyse de la variance de l'effet de l'extrait foliaire de la plante *Urtica dioica* sur l'activité d'enzyme cholinestérase montre une différence significative dans les valeurs de l'activité d'enzyme cholinestérase rapportées chez les larves traitées par les doses (100%, 80%, 60%, 40%, 20%) avec un facteur F égale à $F = 595,5379$; $P = 0.000011$, $F = 389,4744$; $P = 0.000026$, $F = 155,6069$; $P = 0.000161$, $F = 37,04046$; $P = 0.002624$ et $F = 149,9226$; $P = 0.000173$ respectivement, comparativement aux larves témoins. Ainsi l'analyse de la variance pour les valeurs du taux de protéines montre une différence significative rapportée chez les larves traitées par tous les doses comparativement aux larves témoins.

En perspective, pour une meilleure poursuite de la présente étude, il est souhaitable de :

- Utiliser des solvants organiques à polarité différente pour l'extraction afin d'extraire les différentes familles de composés chimiques.
- Faire une étude phytochimique des extraits pour identifier le principe actif responsable.
- Approfondir les études sur d'autres paramètres physiologiques et biochimiques notamment le taux des glucides, le taux des lipides.
- Réaliser les tests sur d'autres espèces.
- Réaliser la même étude sur d'autres stades de l'insecte.
- Utiliser d'autres espèces végétales pour le test de fertilisation.



**Références
bibliographiques**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADISSO, D., ALIA, R. (2005).** Impact des fréquences de lavage sur l'efficacité et la durabilité des moustiquaires à longue durée d'action de types Olys et Net et Permanet dans les conditions de terrain. Mémoire de fin de formation en. ABM-DITEPAC-UAC, Cotonou. 79p.
- AIT BRAHAM, S. et BELHAMEL, C. (2016).** Propriétés antioxydantes d'extraits d'une plante médicinale : *Urtica dioica* L. Mémoire de Fin de Cycle en vue de l'obtention du diplôme master, Université A. MIRA - Bejaia : 39 p.
- AMRAOUI, F. (2012).** Le moustique *Culex pipiens*, vecteur potentiel des virus West Nile et fièvre de la vallée du Rift dans la région du Maghreb, thèse de doctorat, Université Mohammed v-agdal rabat, Maroc, 84 p.
- AOUNTY, B., OUFARA, S., MELLOUKI, F., MAHARI, S. (2006).** Évaluation préliminaire de l'activité larvicide des extraits aqueux des feuilles du ricin (*Ricinus communis* L.) et du bois de thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Mast.) sur les larves de quatre moustiques culicidés : *Culex pipiens* (Linné), *Aedes caspius* (Pallas), *Culiseta longiareolata* (Aitken) et *Anopheles maculipennis* (Meigen). *Biotechnol. Agron. Soc.* 10 (2) : 67 – 71.
- BADIOU, A., MELED, M., BELZUNCES, L. (2007).** Honeybee apis mellifera acetylcholinesterase. *Journal of insectbiochem*, vol. 9(11): 12-18.
- BALENGHIEN, T. (2006).** De l'identification des vecteurs du virus West Nile à la modélisation du risque d'infection dans le sud de la France, thèse de doctorat, Université joseph fourier, Grenoble. 222p.
- BALOTA, M. (2012).** Sorghum (*Sorghum vulgare* L.) Marketability: Grain Color and Relationship to Feed Value. VT Crop Physiologist, Suffolk, VA.
- BARNARD, E. A. (1974).** The Peripheral Nervous System, Plenum Press, New York, p: 201-224.
- BELOUED, A. 2009.** Plantes médicinales d'Algérie. 5^{ème} Edition, office des publications universitaires, Alger. 152 p.
- BEN DAHOU, A et FILI, N. (2017).** Cholinestérase et toxicité des extraits aqueux foliaires de *Peganum Harmala* sur *Drosophila Melanogaster* dans la région de GHARDAIA. Mémoire de master. Université de GHARDAIA. 63p.
- BONYS, N.F. (2013).** Stratégie analytique des tradimédicaments : établissement de profils chromatographiques des métabolites phytochimiques apolaires, Thèse de doctorat, Université De Paris-Sud, Paris. 68 p.
- BOTTI, S., FELDER, C., LIFSON S., SUSSMAN J., SILMAN I. (1999).** A modular treatment of molecular traffic through the active site of cholinestérase. *Journal of biophysique*, vol. 77: 2430-2431.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BOUDERHEM, A. (2014).** Effet des huiles essentielles de la plante *Laurus nobilis* sur l'aspect Toxicologique et morphométrique des larves des moustiques (*Culex pipiens* et *Culiseta longiareolata*). Mémoire de master. Université echahid hamma lakhdar, el-oued. P46.
- BOUGAR, N et BELKACEM KOURMI, Z. (2016).** Contribution à la caractérisation physico-chimique et anti-bactérienne de l'extrait de la plante *urtica dioica* L (ortie dioïque). Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention d'un diplôme de Master en Chimie, Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana, 56 p.
- BOURNE, Y., TAYLOR P. et MARCHOT P. (1995).** Acétylcholinestérase inhibition by fasciculin: crystal structure of the complex. *Cell.*, 83, 503-512.
- BOYRIE, J. (2016).** *Urtica dioica* L : une plante aux usages multiples. Thèse pour l'obtention du diplôme d'état de docteur en pharmacie, Faculté de Pharmacie, Bordeaux. 14 p.
- CAMIRÉ, M. (2007).** Effets de l'exposition chronique aux pesticides sur le statut physiologique du poisson d'eau douce. Ed. UQAM, Québec: 107p.
- COLLETIER, J.PH. (2006).** étude des relations structure – dynamique – fonction au sein de l'acétylcholinestérase. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université, université JOSEPH FOURIER. 214 p.
- D.L. OLLIS, E. CHEAH, M. CYGLER, B. DIJKSTRA, F. FROLOW, S.M. FRANKEN, M. HAREL, S.J. REMINGTON, I. SILMAN, J. SCHRAG. (1992).** The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng*, 5, 197-211.
- DABIER, T.G. (2004).** Etude de l'efficacité d'extraite végétaux contre les agents pathogènes fongiques transmis par les semences de mil et de sorgho. Mémoire de fin d'étude. Université polytechnique de BOBO-DIOULASSO (U.P.O). BURKINA FASO : 65p
- DAGNELIE, P. (1975).** Théorie et méthodes statistiques. Les méthodes de l'inférence statistique. Ed. Les presses agronomiques de Gembloux, S.B.L., Belgique:463 p.
- DARRIET, F. (1998).** La lutte contre les moustiques nuisant et vecteurs de maladie Khartall aorston, Paris. 91p.
- DEU, M., & HAMON, P. (1994).** Diversité des sorghos: application à la gestion des ressources génétiques et à la sélection. *Agriculture et développement* (3), 25-31.
- DJERROUMI, A et NACEF, M. (2012).** 100 plantes médicinales d'Algérie, édition HOUMA, ALGER ,109 p.
- DRAGHI, F. (2005).** L'ortie dioïque (*Urtica dioica* L.) étude bibliographique. Thèse pour obtenir le diplôme d'état de docteur en pharmacie, faculté de Pharmacie, université Henri poincare Nancy 1, 76 p.
- EL-AKHAL, F., GRECHE, H., OUAZZANI, F CHAHDI, GUEMMOUH, R., EL OUALI LALAMI, A. (2015).** Composition chimique et activité larvicide sur *Culex pipiens* d'huile

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- essentielle de *Thymus vulgaris* cultivées au Maroc Chemical composition and larvicidal activity of *Culex pipiens* essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Morocco . *J. Mater. Sci.* 6 (1) : 214-219.
- EL-AKHAL, F., GRECHE, H., OUAZZANI, F CHAHDI., GUEMMOUH, R., EL OUALI LALAMI, A. (2015).** Composition chimique et activité larvicide sur *Culex pipiens* d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* cultivées au Maroc Chemical composition and larvicidal activity of *Culex pipiens* essential oil of *Thymus vulgaris* grown in Morocco . *J. Mater. Sci.* 6 (1) : 214-219.
- ELLMAN, G.L, COURTNYk.d, ANDRES, V et FEATHERSTONE, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology and hysiology*, 38, 84-90 p.
- GHENABZIA, I. (2009).** Cholinestérase et toxicité par les carbamates chez *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Thèse de Magister, Ouargla: 100p.
- GHNIMI, W. (2015).** Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées: *Ricinus communis* et *Jatropha curcas*. Evaluation de leur propriété anti-oxydante et de leur action inhibitrice sur l'activité de L'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat, université de LORRAINE (FRANCE) et université de CARTHAGE (TUNISIE). 225 P.
- GIRARD, E. (2006).** Altérations génétiques des cholinestérases chez des souris: conséquences morphologiques et fonctionnelles à la jonction neuromusculaire. Thèse de doctorat, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Paris : 14-18 p.
- GUESSOUM, D et LECHEHEB, H. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes chez *Urtica dioica* L. et évaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire de Master, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, université des Frères Mentouri, Constantine, 65 p.
- GUILLAUMOT, L. (2006).** Les moustiques et la dengue. Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie. 15 p. Article. Site: Institut Pasteur. Date de consultation : 04.07.2008.
- HAMID OUDJANA, A. (2009).** Cholinestérases et toxicité par les organophosphorés chez *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775), Thèse de magister en biologie, Université kasdi Merbah. OUARGLA, 136 p.
- HAMID OUDJANA, A. (2017).** Cholinestérases et toxicité d'extraits de quelques plantes acridicides ou acridifuges chez *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775), Thèse de doctorat, université kasdi Merbah. OUARGLA, 93p.
- KEMASSI, A., (2014).** Toxicité comparée des extraits d'*Euphorbia guyoniana* (Stapf.) (Euphorbiaceae), *Cleome arabica* L. (Capparidaceae) et de *Capparis spinosa* L. (Capparidaceae) récoltés de la région de Ghardaïa (Sahara septentrional) sur les larves du cinquième stade et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (Orthoptera-Cyrtacanthacridinae). Thèse de doctorat, Université Kasdi Merbah, Ouargla: 230p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- KEMASSI, A., BOUKHARI, K., CHERIF, R., GHADA, K., BENDAKEN, N., BOUZIANE, N., BOUAL, Z., BOURAS, N et OULD ELHADJ-KHELIL, A., OULD ELHADJ, M.D. (2015).** Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae). El Wahat pour les Recherches et les Etudes. Vol.8 n°1 (2015) : 44 – 61.
- KEMASSI, A., BOUKHARI, K., CHERIF, R., GHADA, K., BENDAKEN, N., BOUZIANE, N., BOUAL, Z., BOURAS, N et OULD ELHADJ-KHELIL, A., OULD ELHADJ, M.D. (2015).** Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. & Reut.) (Euphorbiaceae). El Wahat pour les Recherches et les Etudes. Vol.8 n°1 (2015) : 44 – 61.
- KPONDJO, N.M. (2008).** Développement des larves de moustiques dans un écosystème particulier : milieu sous jacinthe d'eau *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms-Laubauch, Licence Professionnelle, Ecole polytechnique d'Abomey Calavi. Benin.
- LAOUIRA, S. (2014).** Contribution à l'étude de l'effet insecticide et comportemental des extraits de quelques plantes médicinales sur *drosophila melanogaster* et essai de lutte. Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de Magistère, école nationale supérieure agronomique, el-harrach, 88 p.
- MARCHOT, P., RAVELLI R.B., RAVES, M.L., BOURNE, Y., VELLOM, D.C., KANTER, J., CAMP S., SUSSMAN J.L. ET TAYLOR, P. (1996).** Soluble monomeric acetylcholinesterase from mouse: expression, purification, and crystallization in complex with fasciculin. Protein Sci., 5, 672-679.
- MEGNOUNIF, I. (2011).** Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydante d'*Urtica dioica* (l'ortie).mémoire de magister en biologie, option physiopathologie cellulaire, Université ABOUBEKR BELKAID, Tlemcen : 77 p.
- MERABTI, B. (2015).** Identification, composition et structure des populations Culicidiénne de la région de Biskra (Sud-est Algérien). Effets des facteurs écologiques sur l'abondance saisonnière. Essais de lutte, thèse de doctorat, Université kasdi Merbah, Ouargla, 168 p.
- MERABTI, B., LEBOUZ, I., ADAMOU, A et OUKAKID, M. L. (2015).** Effet toxique de l'extrait aqueux des fruits de *citrullus colocynthis* (L.) schrad sur les larves des *culicidae*. Revue des BioRessources. Vol 5 N° 2 :120-130.
- MOREL, N., BON, S., GREENBLATT H.M., VAN BELLE, D., WODAK, S.J., SUSSMAN, J.L., MASSOULIE, J. ET SILMAN, I. (1999).** Effect of mutations within the peripheral anionic site on the stability of acetylcholinesterase. Mol. Pharmacol., 55, 982-992.
- NADJI, H. (2011).** Contribution à l'étude des moustiques de la région de Biskra : aspects systématique, écologique, biochimique et énergétique, Thèse de magister en biologie, Université Mohamed Kheider –BISKRAR, 69p.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

OFFICE OF THE GENE TECHNOLOGYREGULATOR. (2017). The Biology of *Sorghum bicolor* (L.) Moench subsp. bicolor (Sorghum). Rapport du département de santé du gouvernement d'Australie, Version 1.1.

OULD EL HADJ M. D., TANKARI DAN-BADJO A., HALOUANE F. et DOUMANDJI S. (2006)- Toxicité comparée des extraits de trois plantes acridifuges sur les larves du cinquième stade et sur les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775) (*Orthoptera Cyrtacanthacridinae*). Sécheresse, vol. 17(3): 407-414.

QUINN, D, M. (1987) Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition-states. ChemRev 87: 955–979. Rodhain F., Perez C, 1985. Précis d'Entomologie Médicale et Vétérinaire. Maloine, s.a. 114 p.

SANSON, B. (2009). Dynamique structurale de l'acétylcholinestérase étudiée par cristallographie aux rayons X et par une méthode spectroscopique complémentaire. Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université, université JOSEPH FOURIER. 211 P.

SCHAUENBERG, P et PARIS, F. (2008). Guide des plantes médicinales : analyse, description et utilisation de 400 plantes, delachaux et niestlé, Paris .321p.

SÉGUY, E. (1931). Les moustiques : biologie et nouvelles méthodes de destruction. Revue d'histoire naturelle. 388-396p.

SUSSMAN J.L., HAREL M., FROLOW F., OEFNER C., GOLDMAN A., TOKER L. et SILMAN, I., (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedocalifornica*: aprototypic acetylcholine-binding protein. Science, 253, 872–879.

TABTI, N. (2017). Etude comparée de l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur les populations purifiées et des populations des gîtes artificiels de *Culex pipiens* (Diptera – Culicidae) dans la ville de Tlemcen, thèse de doctorat, Université de Tlemcen, 136p.

TORAL, Y CARO, M.G. (2005). Evaluation in vitro de l'efficacité du fipronil sur *Culex pipiens pipiens*. Thèse Doctorat. Ecole Nationale Vétérinaire. Toulouse. 55p.

ZOUAOUI, A. (2017). Evaluation de l'effet larvicide de l'extrait aqueux des feuilles de *Laurus nobilis* L. à l'égard de *Culex pipiens*. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master. Département : Biologie Animale., Université des Frères Mentouri, Constantine, 46 p.



Annexes

Annexe I :

Extraction de l'enzyme acétylcholinestérase

Réactifs :

Détergent : le triton X-100

Tampon phosphate : acide citrique 2.10 g, phosphate disodique 7.16 g

Tampon phosphate de sodium 7.4 :

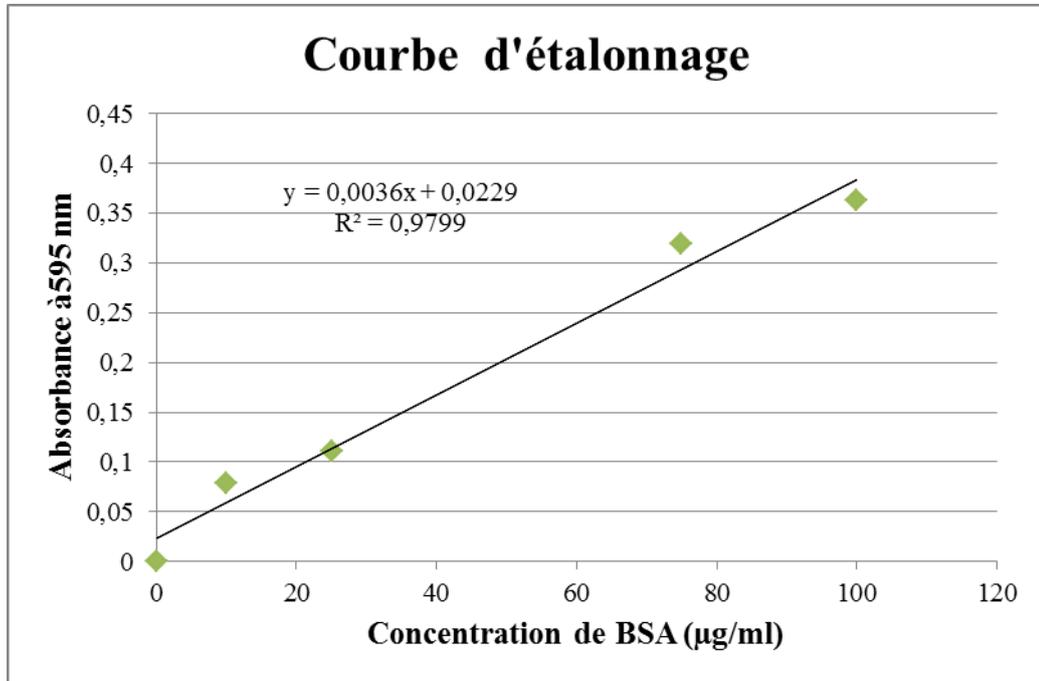
a-2.10 g d'acide citrique (0.1M) dans 100 ml d'eau distillée

b-7.16 g de phosphate disodique ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (0.2M) dans 100 ml d'eau distillée

Mode opératoire :

L'extraction est réalisée selon *liu et al*, (2006), les étapes doivent être réalisées à froid afin d'éviter l'altération de l'enzyme. Les larves sont amputées et homogénéisées individuellement dans un mortier. L'homogénat est récupéré avec 0.5 ml d'eau glace et 1 ml d'un mélange de 0.1 M tampon phosphate (pH 7.4) contenant 0.1% d'un détergent : le triton X-100, afin d'éliminer les impuretés et les lipides membranaires détruits par le détergent, une sédimentation est effectuée par centrifugation à 10.000 g pendant 20 mn dans une centrifugeuse de type SEGMA 6300, 5666. Le surnageât renfermant l'enzyme est récupéré à l'aide d'une micropipette.

Annexe II:
Courbe d'étalonnage des protéines



Annexe III :

Dosage des protéines par méthode de Bradford :

1-réactif:

Commassie Brillant Bleu, éthanol, acide phosphorique

- Dissoudre 10 mg de Commassie Brillant Bleu G-250 dans 5 ml d'éthanol à 96%
- Agiter énergiquement pour favoriser la dissolution du colorant.
- Ajouter ensuite 10 d'acide phosphorique à 85%
- Ajuster le volume à 100 ml avec l'eau distillée.
- Filtrer pour éliminer le colorant non dissout. La solution est stable 1 à 2 semaines au froid.

2-mode opératoire :

- Réaliser une gamme étalon (0 à 100 µg de protéines) avec le sérum albumine bovin (BSA)
- Prélever 0.1 ml de l'échantillon à doser (contenant au maximum 50 µg de protéines).
- Ajouter 2.5 ml de réactif au bleu de commassie et lire l'absorbance à 595 nm après 2 min.

Annexe IV :
Gamme d'étalonnage de protéines

Tube n°	0	1	2	3	4	5	échantillon
Étalon (100 µg /ml)	0	0.01	0.0125	0.05	0.0875	0.1	
Eau distillée (ml)	0.1	0.09	0.0875	0.05	0.0125	0	
Concentration finale (µg /ml)	0	10	25	50	75	100	
Bleu de Commassie				2.5			
Temps de repos				2mn			
A ₅₉₅	0	0.079	0.111	0.318	0.319	0.363	

Annexe V :

Activité enzymatique : méthode d'ELMAN 1961

Principe de la méthode :

L'acétylcholinestérase hydrolyse l'acétylcholine iodée en thiocholine et acétate. La thiocholine réagit avec DNTB et le produit de la réaction prend une coloration jaune pouvant être mesurée au spectrophotomètre à 412 nm ; le taux auquel la couleur est produite représente l'activité de l'acétylcholine.

1-1 Réactifs : Acétylcholine 1g, DNTB (acide 5-thio (2-nitrobenzoïque)), l'eau distillée.

1-2 mode opératoire :

Préparation des réactifs (milieu d'ELMAN):

- Iodure d'acétylcholine (P.M.289.18)

Dissoudre 0.5 g dans 12.5 ml d'eau distillée.

Faire de 0.5 ml.

-DNTB (P.M.396.35)

Dissoudre 0.4 g dans 20 ml de tampon phosphate (2.10 g d'acide citrique, 7.16 g de phosphate disodique (Na₂ HPO. 2H₂O)) 0.25M, pH 7

Faire des aliquotes de 1ml

Mélange réactionnel d'ELMAN :

- 0.5 ml de solution d'acétylcholine
- 1 ml de solution de DNTB
- 10 ml de tampon phosphate 0.5 M PH7

Compléter à 100 ml d'eau distillée

Le mélange réactionnel est préparé directement dans la cuve de dosage, l'activité est évaluée contre un blanc à 25 °C, dans un tampon phosphate de sodium (0,1mol⁻¹ et pH 7) en présence d'un volume de substrat et de DNTB (500µl) et d'un volume d'échantillon (500µl), l'absorbance est mesurée à 412 nm pendant 10 mn avec un intervalle de 60s entre chaque mesure sur un spectrophotomètre.

L'activité enzymatique se calcule par la formule suivante $A = \frac{\Delta D O.V}{(t2 - t1).\epsilon.d.x}$