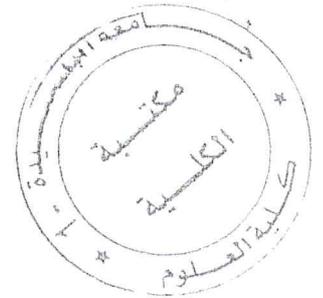


République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère
de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Saad Dahleb Blida 1

Faculté des sciences

Département de chimie



Mémoire présenté par

HAMIDAT ASMA

En vue d'obtention le diplôme de Master

Domaine : Science de la matière

Filière : chimie

Option : Chimie des produits Naturels

Thème

Criblage phytochimique et activités
biologique de l' *Urtica dioïca L*

Soutenu publiquement le 4 juillet devant le jury composé

M. EI HATTAB	Pr	président	Université de Blida
M.R. ZAHI	MCB	Examinatrice	Université de Blida
Z. CHEMAT	MCA	Promotrice	Université de Blida

Promotion 2016/2017

Dédicaces

Notre prophète MOHAMAD, L'émissaire d'Allah que le salut soit sur lui....

A mes parents

Mon père,

En premier chef qui m'a toujours et soutenu sans relâche tout au long du parcours de mes études

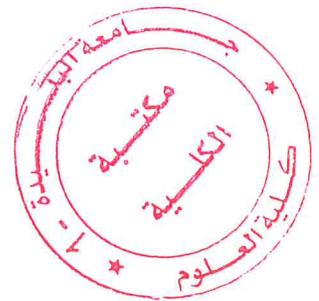
Ma mère,

Tes prières et tes bénédictions m'ont accompagnée tous les jours dans mes études

Mon financé, Mon frère « Mohamed amine » et A mes sœurs « Imane, Bouchera et Amani »

A mes enseignants et enseignantes qui 'ont assisté pour la préparation de ce glorieux projet de recherche scientifique

Avec toute mon affection et ma reconnaissance



Remerciements

*Je Tout d'abord, on rend grâce à Allah qui m'a donné la santé et la volonté pour arriver à
Ce stade.*

*Tout d'abord, je tiens surtout à adresser mes plus vifs remerciements à ma promotrice Mme
CHEMAT-DJENNI Zoubida, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction,
par sa grande patience, par sa disponibilité et ses conseils judicieux.*

*Je remercie également tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils me font d'avoir
acceptés de juger ce travail.*

*Un remerciement chaleureux et sincère à tous nos enseignants, membres de l'équipe
pédagogique du master, « chimie des produits naturels », pour l'effort qui ont fourni tout
au long du cycle.*

A toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Merci à tous.

Résumé

L'ortie dioïque est une plante spontanée, très répandue dans le bassin méditerranéen. Elle appartient à la famille des Urticacées, communément appelée en Algérie « horaig ».

Notre étude porte sur une analyse phytochimique et de examens microbiologiques et pharmacologiques effectuée sur différents extraits de la plante (le suc frais, l'extrait aqueux et l'extrait aqueux des flavonoïdes)

L'analyse photochimique à montrer la présence de plusieurs métabolites secondaires qui sont : les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les glucosides et les anthocyanes.

D'autre part, l'extraction des flavonoïdes a permis de mettre en évidence la forte teneur de la plante en ces composés et en poly Phénols en général.

En outre l'activité anti-oxydante réalisée par la méthode de DPPH de l'extrait aqueux à montrer que ce dernier est doté d'un pouvoir antioxydant important.

Par ailleurs le test antimicrobien n'a pas révélé sensibilité des souches fongiques vis-à-vis les extraits testés sauf pour *Candida albicans* mais une légère inhibition des bactéries à gram positif par défèrent l'extrait.

Mots clés : *Urtica dioica L.*, analyse phytochimique, flavonoïdes, métabolites secondaires, effet, antimicrobien, antioxydant.

Abstract

The nettle is a spontaneous plant widespread in the Mediterranean basin, it belongs to the Urticaceae family, and commonly called in Algeria “ horaig”.

Our study focuses on physiochemical, pharmacological antimicrobial tests, realized on different type of extract (fraish extract, aqueous extract and aqueous extract of flavonoids.

Physiochemical analysis showed the presence of several secondary metabolites, which are the flavonoids, the tannins, saponosids glycosids and anthocyanins.

The extraction of flavonoids, allowed to put on evidence a wealth of phenolic composents especially the flavonoids. Further antioxidant activity performed by the method of DPPH of the aqueous extract has shown that it possesses a significant antioxidant.

In addition, the antimicrobial test showed no sensitivity of fungal strains vis-à-vis the extracts tested, but a slight inhibition of gram-positive bacteria in the aqueous extract.

Keywords: *Urtica dioica L.*, phytochemical analysis flavonoids, secondary metabolites, anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant.

ملخص

نبات القراص (*Urtica dioique L*) كثير الانتشار في البحر الابيض المتوسط ينتمى الى عائلة Urticacées و تدعي في الجزائر "الحرايق".

قامت دراساتنا الفيتوكيميائية ودراسة البكتيريا والصيدالية بوجود مختلف المستخلصات النباتية (مستخلص مستحلب ومضادات الاكسدة .

اثبتت الدراسة الفوتوكيميائية وجود عدة تركيبات ثانوية (الفلافونويدات، تانيس، السبونين، قلوكر اتوسينين) من جهة اخرى، اننا المستخلصات المضاد للاكسدة توضح لنا الامتيازات الموجودة بتركباتها والتولي فينولات بصفة عامة .

برهنت العمليات المضاد للاكسدة عن طريق DPPH للمستحلب انه مضاد للاكسدة، ولكن عدم وجود تفاعل للمستحلب مع الفطريات وذلك عن طريق الاختبار المضاد للبكتيريا ماعدى كانديدا البيكان ولكن تثبيط قليل للبكتيريا + .

الكليمت المفتاحية: (*Urtica dioique L*)،البوليفينولات،الفلافونويدات،النشاط المضاد للاكسدة،النشاط المضاد للبكتيريا .

Abréviations

Abc : Absorbance ;

C : concentration ;

CCM : chromatographie sur couche mince ;

Cp : chromatographie sur papier ;

CE50 : concentration efficace médiane ;

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ;

EM : extrait méthanolique ;

EAc : extrait acétate d'éthyle ;

EEp : extrait éther de pétrole ;

Ech : extrait chloroformique ;

HPLC : Chromatographie liquide haute performance ;

mg : milligramme ;

ml : millilitre ;

ug : microgramme ;

ul : microlitre ;

nm : nanomètre ;

SAB : Sabouraud ;

UV : Ultra-Violet ;

Vit C : Vitamine C ; pourcentage.

Hcl : Acide chlorhydrique ;

Nacl : chlorure de sodium ;

NH₄OH : Ammoniaque ;

PH : Potentiel hydrogène ;

Liste des figures

Chapitre I :

Figure I.1: photo de l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	03
Figure I.2: Poils d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	03
Figure I.3: Tige d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	04
Figure I.4: Feuille d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	04
Figure I.5: Pied femelle d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	04
Figure I.6: Pied mâle d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	04
Figure I.7: Le fruit d' <i>Urtica dioïca</i> L.....	07
Figure I.8 : voies de biosynthèse des flavonoïdes.....	14
Figure I.9 : Piégeage de DPPH par les flavonoïdes (ph : noyau phénolique).....	19
Figure I.10 : Technique de diffusion sur gélose.....	20

Chapitre II :

Figure II.1: Le matériel végétal l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	21
Figure II.2: Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des flavonoïdes.....	24
Figure II.3: profil chromatographique sur couche mince CCM de l'extrait méthanoïque et éther de pétrole et méthanol et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique.....	27
Figure II.4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.....	29
Figure II.5 : Le contenu des composés phénolique des extraits EM, ECH, EB.....	31
Figure II.6 : pourcentage de réduction du radical du libre DPPH de l'extrait chloroformique et butanolique et du standard.....	33
Figure II.7: les CE 50 et les pouvoirs anti oxydante des extraits Ech et EB et du vit C.....	34
Figure II.8 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique (EM), chloroformique (Ech) relatives aux différentes souches bactériennes.....	36
Figure II.9 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique (EM),chloroformique (ECh) et butanolique (EB) ,ATB ,ATF 1 ,ATF 2 relatives aux différentes souches antifongique.....	37

Liste des tableaux

Chapitre I :

Tableau I.1:Principaux constituants chimique de L'espace <i>Urtica dioica</i> L.....	05
Tableau I.2 : Principaux constituants chimique des feuilles l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	06
Tableau I.3:Principaux constituants chimique de la tige l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	07
Tableau I.4 : Principaux constituants des chimique de la fleur l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	08
Tableau I.5 : Principaux constituants des chimique du fruit l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	08
Tableau I.6 : Principaux constituants des chimique des poils l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	08
Tableau I.7 : Principaux constituants des chimique des racines l'espèce <i>Urtica dioica</i> L.....	08
Tableau I.8 : principaux acides hydroxy-benzoïques.....	10
Tableau I.9 : principaux acides hydroxy-cinnamiques.....	11
Tableau I.10 : principaux types des coumarines.....	11
Tableau I.11 : principales classe des flavonoïdes.....	12
Tableau I.12 : Relation entre la fluoresce et la structure des composés phénoliques.....	15
Tableau I.13 :Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes	17
Tableau I.14.: Relation entre la sensibilité des souches et le diamètre d'inhibition	20

Chapitre II :

Tableau II.1: Résumé des réactions positives et Résultats la caractérisation Screening phytochimique.....	23
Tableau II.2 : Calcul du poids de l'extrait sec.....	26
Tableau II.3: Caractéristique des extraits de l'espèce <i>Urtica dioica</i> L (sèche).....	26
Tableau II.4 : Caractéristique des extraits de l'espèce <i>Urtica dioica</i> L (fraîche).....	26
Tableau II.5 : Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et éther de pétrole et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique (sèche).....	27
Tableau II.6: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et éther de pétrole et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique (fraîche).....	28
Tableau II.7:Taux des polyphénols existant dans les extraits EM, Ech et EB <i>Urtica dioica</i>	30

Tableau II.8: Le titre calculée (mg/g) de vitamine C pour les l'espace <i>Urtica dioïca L</i>	31
Tableau II.9: Absorbances et pourcentages del'activité anti radicalaire des différentes concentrations des extraits (chloroformique et butanolique)	32
Tableau II.10: valeur CE50 et APR des extrait Ech et EB de <i>urtica dioïca L</i> et de la vitamine c.DPPH.....	33
Tableau II.11: code de différentes souches microbiennes étudiées.....	35
Tableau II.12: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de extrait méthanolique (EM) et chloroformique (ECh), butanolique (EB).....	36
Tableau II.13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique ,chloroformique ,et butanolique et des ATFs relatives aux différentes souches fongique	36

SOMMAIRE

Dédicace	I
Remerciements.....	II
Résumé.....	III
Abstract.....	IV
ملخص	V
Liste des abréviations.....	VI
Liste des figures.....	VII
Liste des tableaux.....	VIII
Introduction.....	1

Chapitre I : Partie théorique

Recherche bibliographique sur l'espèce *Urtica dioïca* L

I. Généralités sur le genre <i>Urtica</i>	2
I.1. Différents espèces du genre <i>Urtica</i>	2
I.2 Présentation de l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	2
I.2.1 Systématique de l'espèce <i>d'Urtica dioïca</i> L.	2
I.2.2 Description botanique de l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	3,4
I.2.3 Répartition géographique de l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	5
I.2.4 Travaux antérieurs sur la composition du L'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	5,9
I.2.5 Propriétés médicinales du l'espèce <i>Urtica dioïca</i> L.....	9
I.3 Composés phénoliques.....	10
I.3.1 Généralités.....	10
I.3.2. Principales classes des composés phénoliques	10,13
I.4 Etude analytique par chromatographie.....	15
I.4.1 Généralités sur la chromatographie.....	15

I.4.2 Méthodes de séparation et d'identification des composés phénoliques.....	15
I.4.2.1 séparation.....	15
I.4.2.2 Identification	15
I.4.3.3 Mode opératoire.....	16
I.4.3.1 Préparation de la phase stationnaire.....	16
I.4.3.2 Préparation de la phase mobile.....	16
I.4.3.3 Le dépôt.....	16
I.4.3.4 Développement des plaques.....	16
I.4.3.5 Révélation.....	16
I.4.3.6 Identification des flavonoïdes.....	17
I.5 Dosage des polyphénols totaux.....	17
I.5.1 Définition.....	17
I.5.2 Principe.....	18
I.6 Dosage de la vitamine C l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>	18
I.6.1 La molécule de vitamine C.....	18
I.6.2 Propriétés de la vitamine C.....	18
I.7 Activité anti oxydante de l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>	18
I.7.1 Généralités	18
I.7.2 Principe.....	19
I.8 Activité antibactérienne des flavonoïdes de l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>	20
I.8.1 Principe.....	20
Chapitre II :	
II. Extraction des flavonoïdes de l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>	21
II.1 Matériel végétal.....	21
II.2 Caractérisation phytochimique d' <i>Urtica dioïca L</i>	21,23
II.3 Extraction des flavonoïdes.....	24,26
II.4 Etude analytique par chromatographie.....	26,29

II.5 Détermination du potentiel d'hydrogène de l'extrait aqueux.....	29
II.6 Dosage des polyphénols totaux.....	29
II.6.1 Protocole expérimentale.....	29
II.6.2 Résultats et discussions.....	30
II.7 Dosage de la vitamine C l'espace <i>Urtica dioïca L</i>	31
II.7.1 Protocol	31
II.7.2 Résultats de Dosage de vitamine C.....	31
II.8 Activité anti oxydante de l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>	31
II.8.1 Protocole expérimental.....	31
II.8.2 Résultats de l'activité antioxydant testée par la méthode du DPPH	32
II.9 Activité antibactérienne des flavonoïdes de l'espèce <i>Urtica dioïc L</i>	34
II.9.1 Protocole expérimental.....	34
II.9.2 Résultats et discussion.....	37
Conclusion	38
Référence bibliographique	39
Annexe.....	48

Introduction

L'utilisation des plantes médicinales en thérapeutique est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. En effet l'organisation mondiale de la santé estime qu'environ 80% des habitants de la planète ont recours aux plantes en tant que soin de santé primaire [1,2].

Actuellement les chercheurs s'intéressent aux composés des plantes qui sont destinés à l'utilisation dans le domaine phytopharmaceutique. Les molécules issues des plantes sont considérées comme une source très importante des médicaments; sachant que plus de 120 composés provenant de plantes sont utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel les industries pharmaceutiques s'intéressent de plus en plus à la diversité des molécules biologiques des végétaux dans le but d'avoir de nouveaux composés retrouvant les alcaloïdes et les polyphénols [2,3].

Les polyphénols sont en effet dotés de multiples vertus thérapeutiques, ils jouent un rôle très important, principalement dans la lutte contre cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique [4,5].

L'Algérie grâce à sa diversité climatique, renferme une flore très riche en plantes médicinales dont certaines sont très utilisées en médecine traditionnelle qui sont réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, le Sahara et autour des points d'eau[6].

En effet, plusieurs espèces se trouvent répandues sur des centaines d'hectares dans toutes les régions du pays comme la lavande, le romarin, la sauge, l'*ortie*, la mauve... etc. Parmi ces plantes, l'*Ortie* est l'une des plus riches de notre climat méditerranéen[2].

Plusieurs études ont montrés les propriétés médicinales de l'*Ortie* dont la majorité, ont été réalisées sur l'espèce *Urtica dioïca L* [8,17].

L'objectif de notre travail vise à démontrer la richesse de notre plante en composés flavonoïdes par screening phytochimique et par dosage des extraits et déterminer leur activité anti-oxydant et propriétés biologiques.

Ce travail est donc subdivisé en deux chapitre :

- La première chapitre est une synthèse bibliographique l'espèce *Urtica dioïca L* et des généralités sur les composés phénoliques.

- La deuxième chapitre est une étude expérimentale, l'extraction de métabolites secondaire de l'espèce *Urtica dioïca L*. ainsi que son screening photochimique et l'étude de l'activité biologique (antimicrobienne, antioxydant) de l'espèce *Urtica dioïca L*.

En fin, ce travail est achevé par une conclusion générale.

I. Généralités sur le genre *Urtica*

L'ortie fait de la famille des *urticacées*. cette dernière compte une soixantaine de genres, dont le genre *Urtica*. Celui-ci regroupe plus de 80 espèces différentes. *Urtica dioïca* L. (la grande ortie) et *Urtica urens* L. (la petite ortie) sont les espèces les plus utilisées pour leurs multiples propriétés. le mot *Urtica*, qui fut le nom de la plante dans l'antiquité, vient du latin *Urere* (bruler), par extension *Urtication* se disent de toute espèces de démangeaisons similaire à celles provoquées par les piqures *d'ortie* [7,33].

I.1 Différents espèces du genre *Urtica*

Existe plusieurs espèces et les plus important sont :

Urtica dioïca L.

Urtica urens L.

Urtica pilulifera L.

Urtica cannabina L.

Urtica membranacea Poir.

I.2 Présentation de l'espèce *Urtica dioïca* L

Elle a été décrite pour la première fois en 1753 par le naturaliste suédois Carl Von Linné, fondateur de la nomenclature binominale. Appelée la Grande Ortie : *Urtica dioïca* L. Comme elle a été dit précédemment *Urtica* vient du latin *urere* qui signifie « brûler » se rapportant au caractère urticant de la plante. *Dioïca* vient du grec *δίοικο* qui signifie « deux maisons » en référence au caractère *dioïca* de la plante. Ce terme veut dire qu'il s'agit d'une plante unisexuée, avec des pieds mâles et des pieds femelles distincts à la différence de monoïque où les fleurs mâles et femelles sont présentes sur le même pied [18, 19].

I.2.1 Systématique de l'espèce *Urtica dioïca* L

La systématique *d'Urtica dioïca* L [18,22].

Règne :	Plante
<i>Embranchement :</i>	<i>Phanérogames</i>
<i>Sous embranchement :</i>	<i>Angiospermes</i>
<i>Classe :</i>	<i>Dicotylédones</i>
<i>Familles :</i>	<i>Urticacées</i>
<i>Genre :</i>	<i>Urtica</i>
<i>Espèce :</i>	<i>Urtica dioïca</i> L

Nom vernaculaires

Le nom latin (universel) de l'ortie est *Urtica dioïca* L : [21,27].

En France : ortie dioïca, grande ortie (ortie commune, ortie vivace, ortie majeure, ortie féminine ou ortie femelle, ortie de grain, ortie.

En Arabe : قراص حرايق

En anglaise: nettle Word, nettle leaf.

En italienne : *ortica*.

En portugaise : Urtigoa.

I.2.2 Description botanique de l'espèce *Urtica dioica* L

Plante herbacée vivace *dioïca*, de la famille des Urticacées, à rhizome rampant fortement ramifié. Tige non ramifiée de 30 à 100 cm de haut. Feuilles opposées, vertes, à bords dentés. Fleurs insignifiantes en cymes groupées en panicules pendantes les feuilles et les tiges sont couvertes de poils urticants particulièrement abondants au niveau du pétiole. Au microscope, on voit les poils urticants monocellulaires en forme d'aiguille, sur un bulbe basilaire renflé pluricellulaire, fragiles, ces poils se brisent aisément et se vide de leur contenu très irritant. Les poils urticants des tiges et des feuilles contiennent de l'histamine et de l'acide formique [29].



Figure I.1: *Urtica dioica* L.



Figure I.2 : Poils d'*Urtica dioica* L.

I.2.2.1 Racine d'*Urtica dioica* L.

La racine est fibreuse de couleur grise brune pouvant atteindre 5 mm d'épaisseur, irrégulièrement courbier, possédant des stries longitudinales distinctes [25].

I.2.2.2 Tige d'*Urtica dioica* L.

Selon auteurs [21, 22,24] la tige de l'ortie est une tige dressée qui peut atteindre 100 cm de hauteur, quadrangulaire simple, de couleur verte à brune portant des poils urticants et des poils simples.



Figure I.3 : Tige d'*Urtica dioïca* L.

I.2.2.3 Feuilles d'*Urtica dioïca* L.

Les feuilles sont grandes, ovales, lancéolées, aiguës souvent cordées, fortement dentées, couvertes de poils urticants et possédant un pétiole presque aussi long que le limbe, elles sont opposées décussées et stipulées [21, 24, 29].

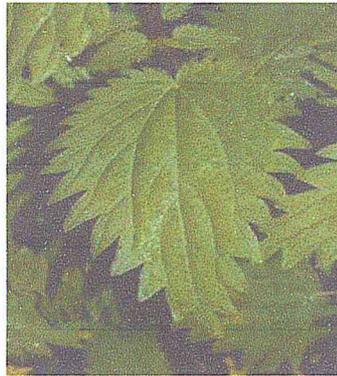


Figure I.4 : Feuille d'*Urtica dioïca* L.

I.2.2.4 Fleurs d'*Urtica dioïca* L.

L'Ortie est dioïque, c'est-à-dire qu'il y a des pieds mâles et des pieds femelles. Les fleurs, apparaissant des mois mars à juin, sont disposées à l'aisselle des feuilles, en grappes ramifiées, dans toute la partie supérieure de la plante. La fleur femelle est verdâtre et comporte un ovaire uniloculaire, uniovulé, surmonté d'un style et d'un stigmate en pinceau. La fleur mâle est jaunâtre (anthères à grains de pollen jaunes) et comporte quatre étamines à filets longs, élastiques, repliés dans le bouton floral [27,28].



Figure I.5 : Pied femelle d'*Urtica dioïca*. Figure I.6 : Pied mâle d'*Urtica dioïca*.

I.2.2.5 Fruits d'*Urtica dioïca* L.

Le fruit est un akène, ovale enfermé dans un calice persistant contenant une graine, provenant des panicules à maturité, il est de couleur sable, jaune brune [21, 27].



Figure I.7 : Le fruit d'*Urtica dioïca*.

I.2.3 Répartition géographique de l'espèce *Urtica dioïca* L

Dans le monde l'espèce *Urtica dioïca* L. est répartie essentiellement dans le bassin méditerranéen [16]. Comme on peut la trouver en Allemagne, en Suisse, Portugal, Canaries .En Algérie, l'espèce cosmopolite, relativement commune dans les ravins des montagnes de Kabylie et dans les régions de Skikda et Annaba, moins fréquente dans l'Atlas Blidéen [17,18].

I.2.4 Travaux antérieurs sur la composition de L'espèce *Urtica dioïca* L

Dans le tableau I.1 : sont réunis Les principaux constituants chimiques *Urtica dioïca* L

Tableau I.1: Principaux constituants chimique de L'espèce *Urtica dioïca* L.

Groupes chimique	constituants	Références
Acide phénols	Acide 2-O-caféyl-malique et ces esters, Acide chlorogénique, Acide coumarique, acide gallique, et Acide férulique, Acide hydroxycinnamique	[30]
Les Flavonoïdes	2% du 3-O glycoside et 3-O-rétinoïdes du Quercitaine, du Kaempférol 3-O-rutinoside et l'isorhamnétol 3-O-rutinoside.	[31]
Minéraux	Calcium 3.24g ,potassium 2.044g ,phosphor 0.673g ,Magnésium 0.0399g, fer 13.4 mg ,manganèse 3.31 mg ,Zinc 1.87 mg ,cuivre 1.59mg ,bore 3.05mg ,sodium 8.06 mg .	[32]

Vitamines	Vit 21 ug, Vit B ₁ 0.03 mg, Vit B ₂ 0.12 mg, Vit B ₉ 221mg, Vit PP 1.45 mg, Vit C 333 mg	[32]
Autres constituants	Scopolétol, sitostérol, glycoprotéines, lipides, sucres, acides aminés libres, chlorophylle.	[31]

Dans le tableau I.2 sont réunis les différents constituants chimiques des feuilles l'espèce *Urtica dioica* L.

Tableau I.2 : Principaux constituants chimique des feuilles de l'espèce *Urtica dioica* L.

Groupe chimique	constituants	Références
Les flavonoïdes (1 à2%)	3-glucosides (quercétol 3-O –glucoside) et 3-rutinosides du quercétol (quercétin),du kaempférol et l'isorhamnétine)	[27,25]
Acide phénols	L'acide caféique et esters, de l'acide caféyl-malique (1.6 %) et l'acide chlorogénique.	[18, 27, 40].
Autres constituants	Scopolétine sous forme de 3-O-β -D-glucoside .les lipide, des sucre, des acides aminés libres (30 mg/ kg), des traces de nicotine. La chlorophylle, des carotènes.	[18]
Minéraux	3 à 5.5 %, et Calcium 0.70 % potassium 0.35 % ,0.30 à 1.90 %, phosphore 0.30 à 0.60 %, soufre 0.25 à 0.70 %, Magnésium 0.16 %, Sodium 0.025 % Fer 0.015 %	[25].

Dans le tableau I.3 sont réunis les différents constituants chimiques de la tige l'espèce *Urtica dioica* L

Tableau I.3: Principaux constituants chimique de la tige l'espèce *Urtica dioica* L.

Groupes chimique	constituants	Références
Les flavonoïdes	La rutine, et la quercétine , du glucoside p-cumaryl , du kaempferol 3-O-glucoside ,du kaempferol 3-O- rutinoside et de l'isorhamnetine 3-O- rutinoside.	[41].
Total des phénols	28.6%	[41]
Acide phénols	L'acide chlorogénique et acide caféylquinique, l'acide 2-O-caféyl-malique, l'acide p-coumarique et un dérivé de l'acide caféique.	[41]

Dans le tableau I.4 sont réunis les différents constituants chimiques de la fleur l'espèce *Urtica dioica* L.

Tableau I.4 : Principaux constituants des chimique de la fleur l'espèce *Urtica dioica* L.

Groupes chimique	constituants	Références
Les flavonoïdes (1 à 2%)	-Kaemphérol-3-O-glucoside -Kaemphérol -3-O-rutinoside -Quercetine -3-O-rutinoside. -Quercétine -3-O- glucoside. -Isorhamnétine -3-O-rutinoside. -Isorhamnétine-3-O- néohespéridoside	[42]
Acide phénols	Acide chlorogénique Acide caféyl-malique	[42]

Dans le tableau I.5 sont réunis les différents constituants chimiques du fruit l'espèce *Urtica dioïca L.*

Tableau I.5 : Principaux constituants des chimique du fruit l'espèce *Urtica dioïca L.*

Groupes chimique	constituants	Références
Huile grasse (30%)	l'acide linoléique (74-83%) 0.1 % de δ -tocophérol Acide gras insturés oméga-3	[25 ,43]
Les lipides	Palmitique et acide gras insaturés oméga-3	[43]
Polysaccharides	Mucilages et caroténoïdes , β - cartène ,lutéine ,violaxanthine ,	[25]

Dans le tableau I.6 sont réunis les différents constituants chimiques des poils l'espèce *Urtica dioïca L.*

Tableau I.6 : Principaux constituants des chimique des poils l'espèce *Urtica dioïca L.*

Groupes chimique	constituants	Références
Acide phénols	L'acide formique et l'acide acétique,l'acétylcholine ,l'acide butyrique ,leucotriènes, et 5- hydroxytryptamine	[29]

Dans le tableau I.7 sont réunis les différents constituants chimiques des racines l'espèce *Urtica dioïca L.*

Tableau I.7: Principaux constituants des chimique des racines l'espèce *Urtica dioïca L.*

Groupes chimique	constituants	Références
Polysacchides en mélange	Glucogalacturonanes	[27]
	Arabinogalactane acide	[25]
Phytostérols	3- β -sitostérol (0.2-1%) Sitostérol-3- β -D-glucoside	[22 ,25]

	(0.05-0.2 %)	
Lignanes	Diarylfurannique et glucosides, dérivés acétylés et glucosides	[25]
Céramides spéciaux	Amides d'acides gras avec des polyhydroxyalkylamines, métabolites des sphingolipides et acide gras, acide (10E ,12Z)-9-hydroxy-10,-12- octadécadiénoïque .	[25]
Autres constituants	Phloroglucinol,aldédes alcools phénylpropaniques ,alcool homovanillique et glucosides ,tanins ,tanins pyrocatechiques (3.5 %) ,diols monoterpéniques	[25, 27]

I.2.5. Propriétés médicinales de l'espèce *Urtica dioïca L*

Aujourd'hui la majorité des propriétés médicinales de l'ortie sont connues. La plupart des pratiques populaires ancestrales ont été confirmées par l'analyse et l'expérimentation parmi les propriétés connues de l'espèce (*Urtica dioïca L*):

- Régénératrice du sang, antianémique et antihémorragique [32]
- Reminéralisante et efficace contre l'arthrose, les rhumatismes et la goutte [9, 10].
- Antiulcéreuse et stimule les fonctions digestives [11].
- Antidiabétique et hypoglycémiant par augmentation de la sécrétion de l'insuline [33].
- Prévention des complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2 [34].
- Dépurative, diurétique et astringente [35].
- Antiasthénique (lutte contre la fatigue) [32].
- Le traitement de l'acné est possible grâce à l'effet anti-inflammatoire du Zinc qu'elle contient [32].
- Les racines ont une action sur l'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP)[14,38].
- Utilisée l'ortie est en Homéopathie pour apaiser l'urticaire [36].
- Utilisée comme engrais naturel et traitement préventif et curatif dans le jardin [37].

I.3 composé phénolique

I.3.1 Généralités

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toute la plante vasculaire. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances chez les végétaux avec plus de 8000 Structures phénolique présentes dans tous les organes de la plante .ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétique principales :la voie shikimate et la voie acétate .Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonction hydroxyles .Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonction hydroxyle [44,45,46].

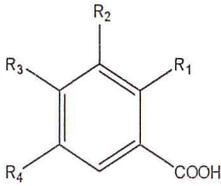
I.3.2 Principales classes des composés phénoliques

I.3.2.1 Acides phénoliques simples

I.3.2.1.1 Acide hydroxy-benzoïque

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque (tableau I.8). Ils ont une structure générale de base de type (C6-C1). Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glucosides.

Tableau I.8 : Principaux acides hydroxy-benzoïques

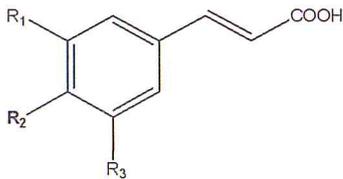
Structure chimique	R1	R2	R3	R4	Exemples
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide phydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH3	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH3	OH	OCH3	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
		OH	H	OH	Acide gentisique

I.3.2.1.2. Acide hydroxy-cinnamique

Ils dérivent de l'acide cinnamique et possèdent une structure générale de base de type (C6-C3). Ils existent souvent souvent sous forme combinée avec des molécules organique .les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduit à une réactivité

chimique importante de ces molécules (le tableau I.9) représente les principaux acides hydroxy-cinnamique [47].

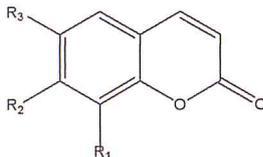
Tableau I.9 : Principaux acides hydroxy-cinnamiques.

Structure chimique	R1	R2	R3	Exemples
	H	H	H	Acide cinnamiques
	H	OH	H	Acide pcoumarique
	OH	OH	H	Acide caféique
	OCH3	OH	H	Acide férulique
	OCH3	H	OCH3	Acide sinapique

I.3.2.2 Les coumarines

Les coumarines dérivent de la cyclisation interne de la chaîne latérale, (Tableau I.10). Ils ont fréquemment un rôle écologique ou biologique [48].

Tableau I.10 : Principaux types des coumarines.

Structure chimique	R1	R2	R3	Exemples
	H	OH	H	Ambéliférol
	OH	OH	H	Aescultol
	OCH3	OH	H	Scopolétole
	OCH3	OH	OH	fraxétole
	H	OH	OH	Daphnétole

I.3.2.3 les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en générale rouges, jaunes ou oranges et possèdent deux fonctions cétones [49].

I.3.2.4 Les tannins

Ce sont des substances d'origine que l'on trouve dans pratiquement toutes les plantes et dans toutes leurs parties. Ils sont caractérisés par leur astringence. Ils dérivent de l'acide gallique et d'autres acides poly-phénoliques. Ils résultent de l'estérification, par ces acides, des fonctions alcooliques du glucose. Leur structure chimique est très variable mais comporte toujours une partie poly-phénolique. Chez les plantes supérieures, on distingue en

générale deux groupes de tannin qui diffèrent entre eux par leur structure ainsi que par leur origine biosynthétique : les tannins hydrolysables et les tannins condensés [50, 51,50].

I.3.2.4.1 Les tannins hydrolysables

Ils sont composés d'ester de sucre et d'un nombre variable de molécules d'acides phénoliques. Le sucre le plus fréquemment rencontré est le glucose. Les acides phénols impliqués dans l'estérification sont l'acide gallique et l'acide hexahydroxydiphénique [52].

I.3.2.4.2 Les tannins condensés ou pro-anthocyanidines

Ce sont des flavones polymériques. Ils consistent en unités flavan-3-ol reliées ensemble par des ponts carbonés en position 4-8 et 4-6. Ils ont été identifiés chez tous les groupes des végétaux. [53-59].

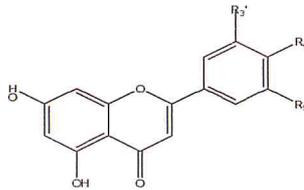
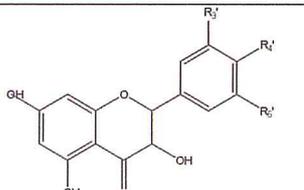
I.3.2.5 Les flavonoïdes

I.3.2.5.1 Généralités

Le nom flavonoïdes proviendrait du terme flavedo. Il désigne la couche externe des écorces d'orange. Cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du mot flavus (flavus=jaune). Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base. Ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbone constitué de deux cycles aromatique qui sont reliés entre eux par une chaîne de C3 en formant ainsi un hétérocycle. Cette structure est généralement représentée selon le système C6-C3-C6, de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, Oxygène, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule. Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits [60-64].

Le tableau I.11 : montre les différentes classes de flavonoïdes, leurs structures et leurs molécules dérivées.

Tableau I.11 : Principales classes des flavonoïdes.

Classes	Structure Chimique	R5	R6	R7	R8	R9	Exemples
Flavones		OH	OH	H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OH	OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		OH	OH	H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	OH	OH	Myricétine

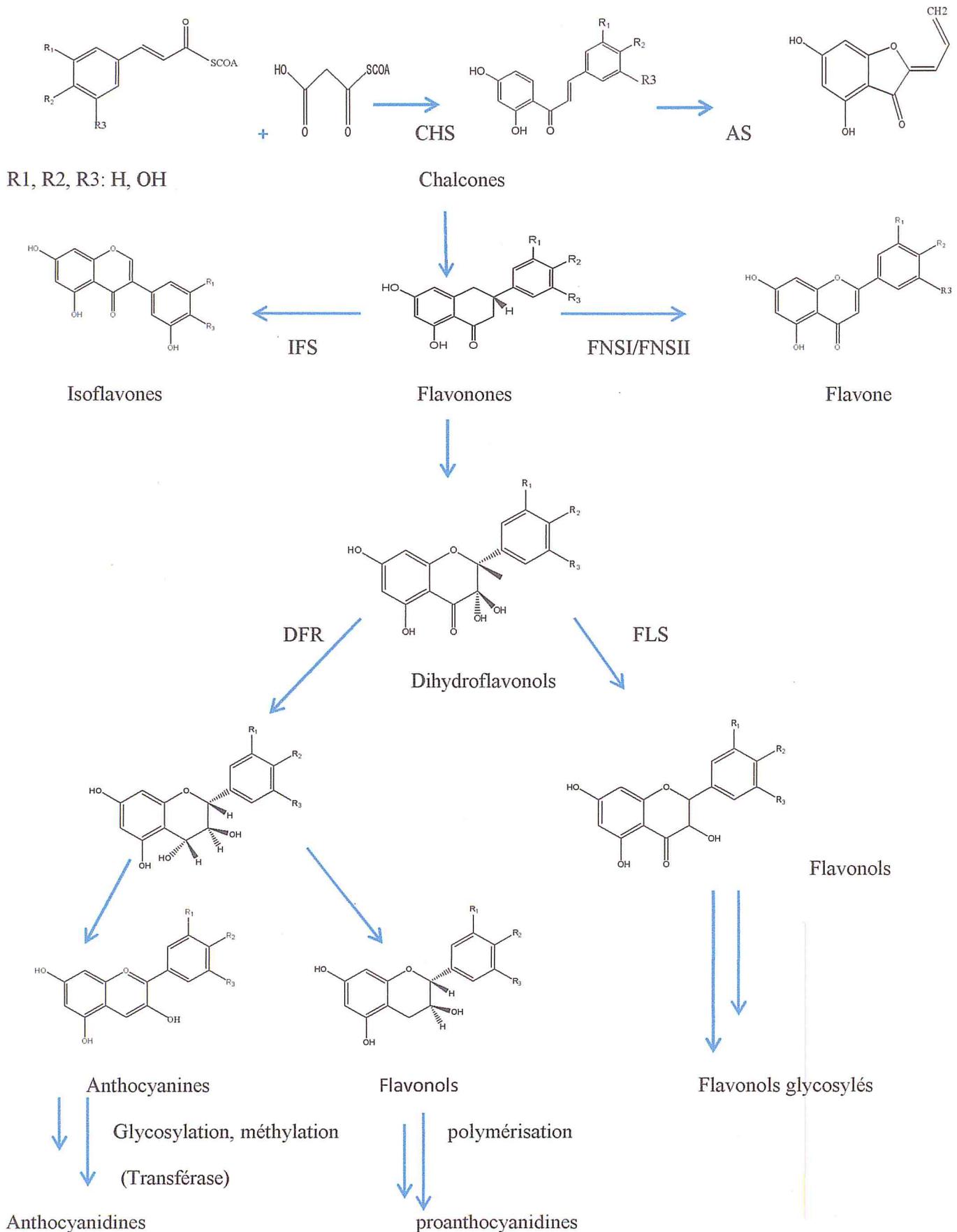
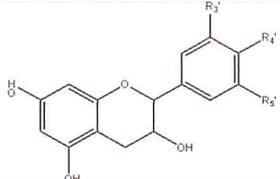
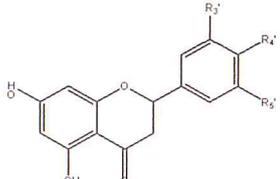
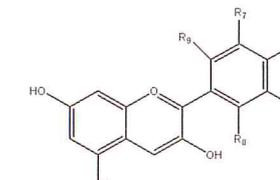
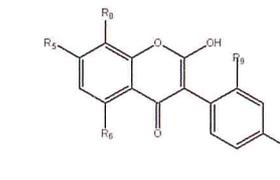


Figure I.8 : voies de biosynthèse des flavonoïdes [40].

Flavanols		OH	OH	OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		OH	OH	H	OH	H	Naringénie
		OH	OH	OH	OH	OH	OH
Anthocyanidines		OH	OH	H	OH	H	Pelargonide
		OH	OH	OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	OH	OH	OH
Isoflavones		OH	OH	/	OH	/	Genisteine
		H	O-GU	/	OH	/	Daidezine

I.3.2.5.2 Biosynthèse des flavonoïdes

Flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune dérivant de la voie de l'acide shikimique, la précurseur de ces molécules est le 4-hydroxycinnamique –coenzyme A synthétisé à partir de la phénylamine. La voie biosynthétique de ces Polyphénols est présentée dans la figure I.8. Plusieurs enzymes (synthèse, réductase, hydroxylase) contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïde. Dans chaque classe de flavonoïde, les molécules sont ensuite diversifiées par hydroxylation (flavonoïde 3'-hydroxylase, flavonoïde 3',5'-hydroxylase), méthylation (O-méthyl transférase), glycosylation (rhamnosyl transférase, flavonoïde glycosyl transférase), acylation (acyl-CoA transférase) ou polymérisation. Enzymes : AS : aurone synthase, CHI : chalcone isomérase, CHS : chalcone synthase, DFR : Dihydroflavonol 4-réductase, FHT : Flavonone 3-hydroxylase, FLS : flavanol synthase, FNSI/FNSII : Flavone synthase, IFS : isoflavone synthase, LDOX : leucoanthocyanidine Dioxygense, LCR : leucoanthocyanidine.

I.4 Etude analytique par chromatographie

I.4.1 Généralités sur la chromatographie

La chromatographie est une méthode physique de séparation basée sur les différentes affinités d'un ou plusieurs composés, repose sur l'entraînement d'un échantillon dissous par une phase mobile (ou éluant) à travers une phase stationnaire (ou phase fixe). La phase stationnaire, fixée soit sur la surface intérieure d'une colonne soit sur une surface plane, retient plus ou moins fortement les substances contenues dans l'échantillon dilué selon l'intensité des forces d'interactions de faible énergie réalisées entre les différentes espèces moléculaires et la phase stationnaire.

I.4.2 Méthodes de séparation et d'identification des composés phénoliques

La détection et l'identification des composés phénoliques se font par plusieurs méthodes qui se complètent.

I.4.2.1 séparation

La séparation des produits phénoliques est essentiellement réalisée par des méthodes chromatographiques :

- chromatographie sur colonne.
- chromatographie sur couche mince.
- chromatographie sur papier.

I.4.2.2 Identification

Une fois que les produits isolés sont purifiés, les techniques suivantes sont utilisées pour déterminer la structure des composés phénolique :

- Fluorescence sous lumière UV.
- Co-chromatographie sur couche mince en présence de témoins.
- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire.
- Spectrométrie de masse.

a-Fluorescence sous lumière UV :

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus la détermination de la structure des composés phénoliques,

Les tableaux I.12 Résumant la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence UV.

Tableau I.12 : Relation entre la fluorescence et la structure des composés phénoliques selon [91, 92] .

Spot coloré	Types de composés phénoliques	
	selon Lahouel	selon Markham
Brun noir	Flavanones ou flavonols 3-OH substitué	-
Violet ou mauves	Flavanones, chalcones, Dihydroflavonols, Isoflavones, flavanones	Flavonols, flavonones, isoflavonnes, flavone
Bleu (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué	Acide phénol
Jaune	Flavonols	Flavonols

Jaune fluorescent	Flavonols , Aurones , chalcone , Flavanones .	-
Jaune pâle	Dihydroflavonols	Flavonols
Rouge ou orange	-	Anthocyanidine 3-glucoside
Rose	-	Anthocyanidine 3,5- diglucoside
Bleu sombres	-	Flavonols, flavonones , aurones
Bleu vif	-	Hydroquinones
Pourpre sombre	-	chalcones

I.4.3 Mode opératoire

I.4.3.1 Préparation de la phase stationnaire

La chromatographie sur couche mince a été réalisée sur des plaques pré-étalées de gel de silice et sur des plaques de polyamide (DC6), quant à ces dernières sont préparées en mélangeant 10 g de poudre de polyamide dans 50 ml d'éthanol, après étalement du gel sur des plaques en verre et séchage, la phase stationnaire sera prête à l'utilisation.

I.4.3.2 Préparation de la phase mobile

La phase mobile est constituée par un mélange de solvants organiques. Pour cela, différents systèmes solvants ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations.

I.4.3.3 Le dépôt

Le dépôt se fait avec des tubes capillaires en verre à usage unique d'une façon perpendiculaire et linéairement. Chaque phase doit être déposée en solution diluée dans le méthanol, on peut effectuer plusieurs dépôts successifs du même analyte en même endroit, cette pratique permet de concentrer l'analyte [93].

I.4.3.4 Développement des plaques

chaque plaque est déposée en position verticale ou légèrement inclinée dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs du système solvant approprié, l'échantillon à étudier sera plus ou moins entraîné par la progression par capillarité de la phase mobile vers le haut de la plaque [93].

I.4.3.5 Révélation

Si les constituants sont colorés, ils seront directement visible sur la plaque, si non la révélation peut se faire soit aux UV ou bien par des méthodes chimiques :

-Révélation aux UV

Qui permet de mettre en évidence sous forme des taches des substances qui absorbent les UV entre 254 nm et 365 nm.

-Révélation par des méthodes chimiques

Ces méthodes consistent à mettre en contact de la plaque un réactif plus ou moins spécifique qui donne un produit coloré par réaction chimique avec les substances à révéler [94].

I.4.3.6 Identification des flavonoïdes

Le comportement d'une molécule particulière dans un système donné est exprimé par sa fluorescence sous UV et par son Rf (le rapport de la distance parcourue par cette molécule sur celle parcourue par la phase mobile c'est à dire le front du solvant) qui est compris entre 0 et 1.

-Structure -Rf

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

-Les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25).

-Les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5).

-Les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) [95].

Tableau I.13 : Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes selon [95].

Structure flavonique	Rf
Augmentation des (OH)	Diminution du Rf
Méthylation des groupements (OH)	Augmentation des valeurs de Rf
Acétylation	Augmentation des valeurs de Rf
Glycosylation	Diminution des valeurs de Rf due principalement de l'introduction de nouveaux groupements (OH)

Pour mieux connaître le contenu de ces extraits en métabolites secondaires, des tests chromatographiques (sur couche mince CCM et sur papier) préliminaires ont été menés sur ces extraits

I.5 Dosage des polyphénols totaux

I.5.1 Définition

Les composés phénoliques totaux ont été estimés ici par la méthode de Singleton .Elle évalue l'ensemble des composés phénoliques réducteurs du réacti Phosphotungstique ou réactif de Folin-Ciocalteu (FCR). Elle est basée sur une réaction d'oxydo-réduction au cours de laquelle, la fonction OH des phénols est oxydée pendant que le FCR est réduit. La réduction du FCR entraîne une diminution de ses propriétés colorimétriques. Ainsi la teneur en phénoliques totaux est déterminée par extrapolation sur une courbe [96].

I.5.2 Principe

L'analyse du contenu polyphénolique total a été faite par la technique de folin-ciocalteu (FC). Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation il réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans l'extrait analysé. Les phénols sont estimés par une spectroscopie UV dont l'acide gallique est utilisé comme un standard à une longueur d'onde $\lambda=765\text{nm}$ [97, 98].

I.6 Dosage de la vitamine C l'espèce *Urtica dioïca L*

I.6.1 La molécule de vitamine C

La vitamine C, de formule brute $C_6H_8O_6$, est le nom communément donné à l'acide ascorbique. Sa masse molaire moléculaire est $M=176\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

I.6.2 Propriétés de la vitamine C

La vitamine C c'est un réducteur: l'oxydant associé a pour formule brute $C_6H_6O_6$. Le couple redox est: ($C_6H_6O_6 / C_6H_8O_6$). La vitamine C est facilement oxydée par de nombreux oxydants, en particulier le dioxygène de l'air. C'est pourquoi la vitamine C est un anti oxygène : réagissant avec le dioxygène, elle empêche celui-ci d'oxyder les constituants des aliments et protège ainsi les corps gras contre le rancissement, limite l'oxydation des ions nitrite en ions nitrate. La présence de vitamine C dans les éléments est indiquée par le code E 300. Son emploi est limité à 300 mg / kg d'aliment. Depuis 1933 l'industrie chimique sait la synthétiser. La vitamine C est synthétisée par de nombreux êtres vivants, mais pas par l'Homme qui doit donc le trouver dans son alimentation. La vitamine C est un antiscorbutique, un anti-infectieux et elle joue un rôle important dans la synthèse du collagène.

I.7 Activité anti oxydante de l'espèce *Urtica dioïca L*

I.7.1 Généralités

Les radicaux libres peuvent être considérés comme des éléments très importants pour la vie de l'organisme suite à l'implication de leurs effets bénéfiques, par exemple les radicaux oxygénés exercent des actions critiques sur les signaux de traduction. Les antioxydants naturels sont présents dans l'alimentation ; pour la plupart se sont des composés phénoliques qui possèdent au moins un noyau aromatique, contenant un ou plusieurs substituants, en effet cette propriété anti-oxydante est en relation directe avec la structure de ces molécules. L'activité anti-oxydante des flavonoïdes peut être mesurée par l'utilisation d'une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre ; c'est la méthode

de DPPH, dont le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydant des composés pures ou de mélange complexe, la méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanoïque de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant. On utilise comme principes actifs l'extrait chloroformique (ECh) et butanolique (EB), ces extraits sont évaporés à sec afin de connaître leurs poids sec puis repris dans le méthanol de telle sorte à avoir des concentrations de 5 mg/ml pour chacun [99,100,103].

I.7.2 Principe

L'activité anti radicalaire de nos produits a été évaluée par la méthode de DPPH. Une solution méthanoïque de DPPH• (2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl) présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant, la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution de l'absorbance [101].

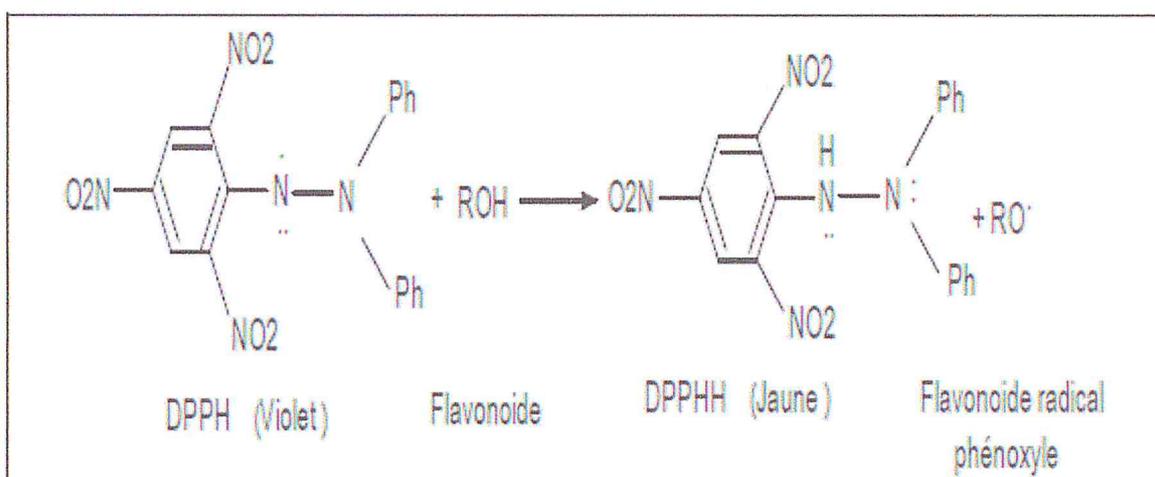


Figure I.8: Piégeage de DPPH par les flavonoïdes (ph : noyau phénolique).

Ce radical est souvent utilisé pour estimer l'activité anti oxydante de nombreux composés dans les composés phénolique. Généralement, les mesures de l'absorbance du DPPH des différentes substances antioxydants (échantillon et témoin) permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs N - Abs E) / Abs N] \times 100$$

Abs N: Absorbance du contrôle négatif.

Abs E : Absorbance de l'échantillon testé.

Les pourcentages d'inhibition ainsi déterminés, nous permettent de calculer la valeur du paramètre CE50 (concentration d'inhibiteur) qui représente la concentration de la substance nécessaire pour diminuer de 50% des radicaux libres dans le milieu réactionnel. Nous pouvons déduire l'activité anti radicalaire (ARP) de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE50 trouvées.

$$ARP = 1/CE50$$

ARP : puissance anti radicalaire.

CE50 : concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.

I.8 Activité antibactérienne des flavonoïdes de l'espèce *Urtica dioïca L*

Le test de sensibilité aux différents Bactéries a été effectué selon la méthode de diffusion des disques. Nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'extrait de l'espace *Urtica dioïca L* dans laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida.

I.8.1 Principe

Le Principe de cette technique est celui du test d'antibiogramme. Elle consiste à placer un disque de papier imprégné de l'extrait sur la gélose inoculée au préalable. L'extrait végétal diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du disque. L'effet de l'extrait de la plante se traduit par la présence d'une zone d'inhibition (ZI) de la croissance microbienne a

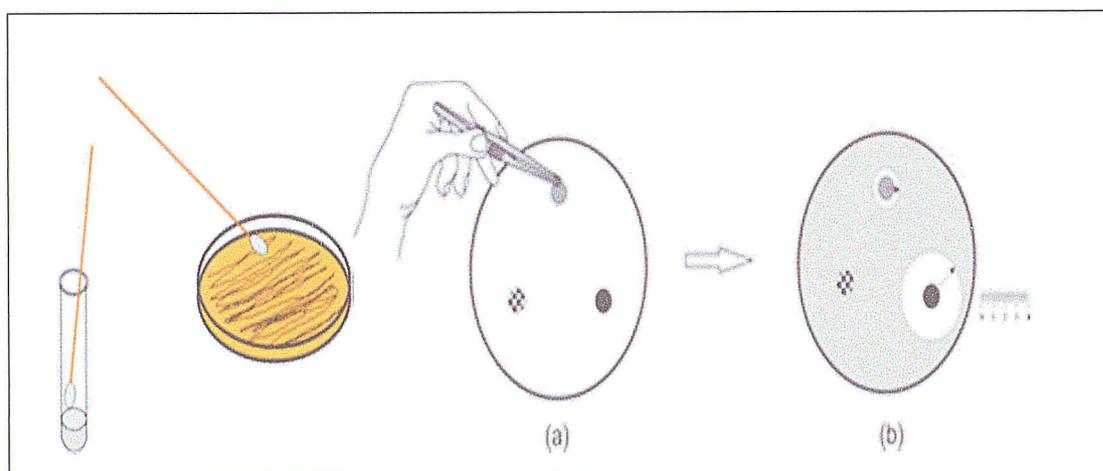


Figure I.9: Technique de diffusion sur gélose.

La sensibilité des souches aux différents agents antimicrobiens a été classifiée par le diamètre de la zone d'inhibition représenté dans le tableau I.14 suivant [106].

Tableau I.14 : relation entre la sensibilité des souches et le diamètre d'inhibition.

Sensibilité	Diamètre
Extrêmement sensible	$D > 23\text{mm}$
Sensible	$18\text{mm} < D < 22\text{mm}$
Intermédiairement	$12\text{mm} < D < 17\text{mm}$
Non sensible (résistante)	$D < 11\text{mm}$

II. Extraction des flavonoïdes de l'espèce *Urtica dioïca L.*

II.1 Matériel végétal

Nous avons utilisé la partie aérienne (tiges et feuilles) de la plante *Urtica dioïca L.*, qui a été récolté au niveau de la Willaya de Blida et identifiée au niveau du département Sciences Agronomiques de l'Université de Blida 1. Nous avons fait la cueillette de la plante mois de mars 2017. La plante a été nettoyée et séchée à l'ombre, à l'air libre et loin de l'humidité pour éviter le développement des moisissures, pendant 3 semaines. Puis broyée à l'aide d'un moulin électrique pour l'obtention d'une poudre fine, qui a été mise dans un flacon en verre dans un endroit sec (pour le screening phytochimique et l'extraction des flavonoïdes). L'extrait aqueux des flavonoïdes et l'extrait aqueux de la poudre végétale (infusé) ont été utilisés pour effectuer l'activité antimicrobienne et le test anti oxydant.



Figure II.1 : Le matériel végétal l'espèce *Urtica dioïca L.*

II.2 Caractérisation phytochimique d'*Urtica dioïca L.*

II.2.1 Scriblage phytochimique

Le scriblage phytochimique est un ensemble de méthode et technique de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante. Ces techniques permettent de détecter la présence des produits appartenant à des classes de composés physiologiquement actifs. Nous avons choisi les classes faciles à détecter compte tenu des techniques disponibles. [87].

Le travail a été effectué sous une hotte à flux laminaire.

II.2.2 Identification de quelques métabolites secondaires

Dans cette partie de nos expériences nous avons fait une étude comparative de la composition chimique de l'infusé de la poudre végétale et le suc frais de *Urtica dioïca L.* qui est obtenu en mixant la poudre à l'aide d'une juteuse électrique (Annexe 1)

Remarque : Dans l'étude comparative de la composition chimique de l'infusé et le suc frais d'*Urtica dioïca L.*, On considère que 5 g de la poudre végétale est équivalente à 5 ml du suc frais et on a calculé :

-La densité de l'eau :

$$d_{H_2O} = m_1/v_1 = 4.9157/5 = 0.98314$$

Avec : m_1 = la masse de 5 ml d' H_2O V_1 = le volume d' H_2O

La densité de l'échantillon : $d_{éch} = m_2/v_2 = 4.9246/5 = 0.98492$

On calcul R_{ds} , le rapport entre deux valeur de densités

$R_{ds} = d_{\text{éch}} / d_{\text{H}_2\text{O}} = 0.98492/0.98314 = 1.0018 \approx 1$

Donc 5 ml du suc frais est équivalent à 5 gr de poudre végétale.

II.2.2.1 Mode opératoire

Les modes opératoires sont les mêmes pour l'infusé et le suc frais. Le screening phytochimique est un ensemble de réactions chimiques simple permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques.

II.2.2.2 Préparation de l'infusé

Nous avons pris 20 g de la poudre végétale sont placés dans 100 ml d'eau bouillante, on laisse infuser pendant 15 minutes, après filtration, le filtrat est ajusté à 100 ml avec de l'eau distillée.

II.2.2.2.1 Mise en évidence des anthocyanes

Nous avons ajouté quelques gouttes d'HCl à 5ml d'infusé et à 5 ml du suc frais, la réaction donne une coloration rouge en présence des anthocyanes. [87].

II.2.2.2.2 Mise en évidence des tanins

Nous avons ajoutés à 5ml d'infusé et à 5 ml du suc frais, quelques gouttes de FeCl₃ à 5 %, la réaction donne une coloration rouge en présence des tanins.

II.2.2.2.3 Mise en évidence des flavonoïdes

Leurs identification s'effectue par la réaction cyanhydrique ou l'essai de Chinoda 5 ml d'infusé et 5 ml du suc sont additionnés à 5 ml d'HCl, un copeau de Magnésium et 1 ml alcool iso butanol. La réduction des flavonols, flavonones et flavones par le magnésium métallique en présence de l'acide chlorhydrique donne une coloration rouge orange [88].

II.2.2.2.4 Mise en évidence des saponosides

La présence des saponosides est détectée de la manière suivante ; à 2 ml d'infusé et du suc frais nous avons ajouté quelques gouttes d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides [87].

II.2.2.2.5 Mise en évidence des glucosides

Proèdre 2 g de poudre végétale et 2 ml du suc frais, nous avons ajouté quelques gouttes d'acide sulfurique, la formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides [88].

II.2.2.2.6 Mise en évidence des caroténoïdes

Nous avons ajouté à 5 ml d'infusé et 5ml du suc frais, Quelques millilitres (3 ml) d'HCl ont été ajoutés dans chaque tube à essai puis 3 ml de H₂SO₄. Il apparaît dans les deux cas une coloration vert bleu qui témoigne la présence des caroténoïdes [89].

II.2.2.2.7 Mise en évidence des Terpène

Nous avons ajouté à 5 ml d'infusé et 5 ml du suc frais, quelques millilitres (2 ml) chloroforme, un volume de 2 ml d'acide sulfurique, il apparaît dans les deux cas une coloration rouge qui témoigne la présence des Terpène [90].

II.2.2.2.8 Mise en évidence des coumarines

Nous avons ajouté à 5 ml d'infusé et 5 ml du suc frais, quelques millilitres (3 ml) NaOH 10% il apparaît dans les deux cas une coloration jaune qui témoigne la présence des coumarines [90].

II.2.2.2.9 Mise en évidence des quinones

II.2.2.2.9.1 Quinones liber

2g de poudre végétale humectée avec 2 ml d'acide chlorhydrique 1N, sont mis en contact pendant 3 h avec 20 ml de chloroforme puis filtrée ce test est réalisé sur le filtrat grâce à 5 ml d'ammoniaque ½ comme réactif la réaction donne une coloration rouge en présence des quinones libres [88].

II.2.2.2.9.2 Quinones combinées

2 gde poudre végétale sont additionnés à 5 ml d'acide sulfurique 2 N puis portés à reflux pendant deux heures la solution extractive est filtrée puis épuisée par 20 ml de chloroforme. La solution de chloroforme est évaporée à sec puis prise par l'ammoniaque concentrée la réaction donne une coloration rouge en présence des quinones combinées. [88].

Le tableau II.1, regroupe les différents résultats du Scriblage phytochimique.

Tableau II.1 : Résumé des réactions positives et Résultats la caractérisation Scriblage phytochimique.

Les métabolites secondaires		Les réactifs	Réaction positive	Les Résultats	
				infusé	Suc frais
Anthocyanes		HCl	Rouge	+	-
Terpène		CHCl ₃ +H ₂ SO ₄	Rouge	+	-
carotènes		HCl +H ₂ SO ₄	Vert bleu	+	-
Les tanins		FeCl ₃	Bleu	+	-
Les flavonoïdes		HCl+Al	noir	+	-
Les saponosides		Acetate de plumb	Rouge	+	+
Les glucosides		H ₂ SO ₄	Orange	+	+
Les quinones	libres	HCl + CHCl ₃ + NH ₄ OH	Précipitation blanc	+	+
	combines	H ₂ SO ₄ + CHCl ₃ + NH ₄ OH	Précipitation blanc	+	+
coumarines		NaOH	Rouge brique	+	+

(+) : Test positif, (-) : Test négatif.

D'après la caractérisation phytochimique réalisée sur l'extrait aqueux et le suc frais, les résultats ont démontré que l'Ortie est riche en métabolites secondaire : les flavonoïdes, les anthocyanes, les tanins, les saponifées, les glucosides et les quinones et caroténoïdes, Terpène, Les résultats négatifs du suc frais par rapport à l'infusé sont dues au type d'extraction, au lieu de stockage et la localisation des métabolites secondaires dans la plante. Ces métabolites secondaires présentent des applications Dans l'industrie pharmaceutique et cosmétique.

II.3 Extraction des flavonoïdes

Nous avons utilisé le procédé décrit par GUIGNARD (2000). Selon l'organigramme représenté sur la figure II.2.

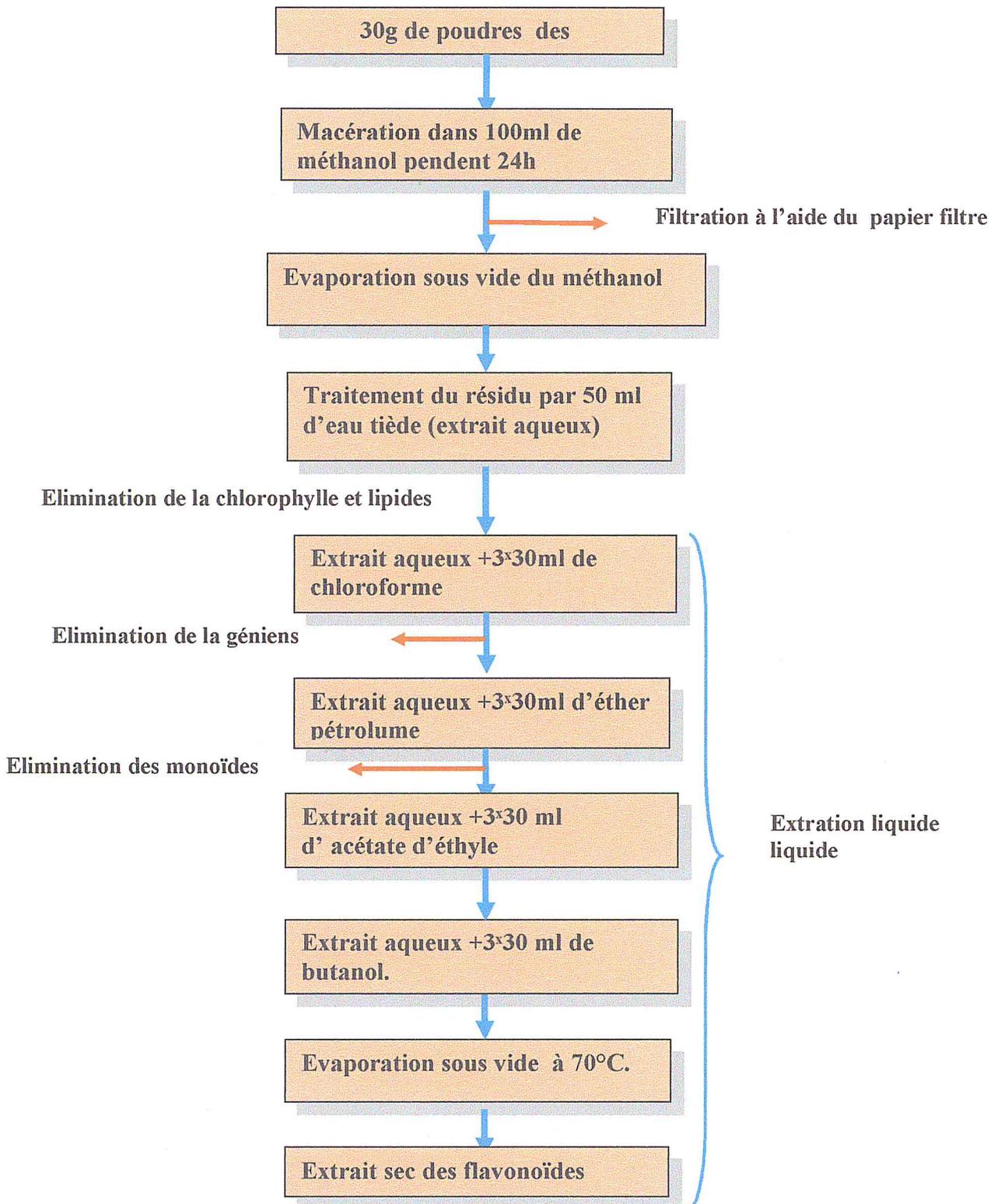


Figure II.2: Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des flavonoïdes.

II.3.1 Macération et évaporation

Nous avons pesé 30 g de la poudre des feuilles séchées sur une balance analytique. Mettre la poudre dans un Erlen Mayer, puis verser 100 ml de méthanol dessus et laisser macérer pendant 72 h. (On filtre chaque 24 h et on récupère les filtrats dans un autre Erlen Mayer). Puis évaporé le méthanol par un évaporateur rotatif (L'évaporation se fait sous vide à l'aide d'une pompe). La température d'évaporation du méthanol est de 45° C sous vide. L'extrait sec obtenu est traité par 50 ml d'eau tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

II.3.2 Extraction liquide-liquide (Annexe 3)

Nous avons utilisé une ampoule à décanter

(Nous avons fait 3 fois la décantation pour chaque solvant).

II.3.2.1 Pour l'élimination de la chlorophylle et des lipides

Mettre l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, et ajouter 30 ml de chloroforme, agiter et laisser décanter un moment jusqu'à la formation de deux phases bien séparées. (La séparation se fait selon la différence de densité entre l'eau et le chloroforme). Ouvrir le robinet pour la récupération de chloroforme avec un certain pourcentage des lipides et de chlorophylle et gardes la phase supérieure dans l'ampoule.

II.3.2.2 Pour l'élimination des génines libres

Mettre 30 ml d'éther dans l'ampoule, agiter et laisser décanter Formation des deux phases, libérer la phase en dessous Libérer ensuite l'autre phase (éther + quelques génines libres)

II.3.2.3 Pour l'élimination des monosides

Mettre 30 ml d'acétate d'éthyle dans l'ampoule qui contient l'extrait aqueux Laisser décanter, puis refaire la même manipulation faite pour l'éther (30 ml × 3).

II.3.2.3 Pour l'obtention des flavonoïdes

Obtenir un extrait aqueux à qui on doit ajouter (3×30 ml) de butanol, On fait la même manipulation faite pour l'éther puisque la phase butanol sera au-dessus de la phase aqueuse. Récupérer la phase de butanol car c'est la phase qui contient les flavonoïdes. Agiter après chaque versement d'un solvant dans l'ampoule à décanter, ensuite ouvrir le bouchon de cette ampoule pour dégazer.

II.3.2.4 Evaporation sous vide de butanol

Peser le ballon du l'évaporateur rotatif avant de verser le butanol dans. Evaporer le butanol pour l'obtention d'un extrait sec des flavonoïdes. La température d'évaporation de butanol est de 55° C. Peser le ballon après l'évaporation pour le calcul du poids de l'extrait sec des flavonoïdes (le pesage se fait par la même balance.

II.3.2.5 Préparation de l'extrait aqueux des flavonoïdes

Le repas équilibrée de la journée contient environ 1g de flavonoïdes. Pour tester si cette dose a un effet anti oxydante, antimicrobien nous avons préparé un extrait aqueux de flavonoïdes à une concentration de 1 g/l.

II.3.3 Calcul du poids de l'extrait sec

Le tableau II.2 regroupe le calcul du poids de l'extrait sec

Tableau II.2: Calcul du poids de l'extrait sec

Poids du ballon vide	116,80 g
Poids de ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes	116,96g
Poids de l'extrait sec des flavonoïdes	0,160 g = 160 mg

Les extraits obtenus de polarités différentes des caractéristique différentes (masse, couleur e rendement). Les résultats de la caractéristique des extraits de l'espèce *Urtica dioïca L* sèche et fraîche sont résumés respectivement dans les tableaux II.3 et II.4.

Tableau II.3: Caractéristique des extraits de l'espèce *Urtica dioïca L* (sèche) :

Extrait	Couleur	Aspect	Masse(g)	Rendement %
Méthanolique (EM)	vert	visqueux	8,35	0,27%
Chloroformique (Ec)	Vert	visqueux	2,01	0,067%
Ether de pétrole (EEp)	Moutarde	visqueux	0,91	0,030%
Acétate d'éthyle (EAc)	Miel	Pâteux	0,63	0,021%
Butanolique (Eb)	Marron foncé	Pâteux	0,16	0,05%

Tableau II.4 : Caractéristique des extraits de l'espèce *Urtica dioïca L* (fraîche) :

Extrait	Couleur	Aspect	Masse(g)	Rendement %
Méthanolique (EM)	vert	visqueux	6,21	0,207%
Chloroformique (Ech)	Vert	visqueux	2,00	0,06%
Ether de pétrole (EEp)	Moutarde	visqueux	0,42	0,014%
Acétate d'éthyle (EAc)	Miel	Pâteux	0,32	0,01%
Butanolique (Eb)	Marron claire	Pâteux	0,13	0,0043%

II.4 Etude des extraits éther de pétrole et méthanolique et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique

Pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer, nous avons procédé à une analyse préliminaire des extraits éther de extraits méthanolique(EM) éther de pétrole (EEP) et chloroformique (ECh) et Acétate d'éthyle(EAc) et butanolique (EB) par CCM. Pour cela ,une partie de chaque extrait a été solubilisée dans le méthanol et déposée sur plaques de gel de silices , qui a ensuite été éluée dans le système de solvants Hexane /AcOEt (60/40) pour chaque extrait. Ensuite, les Chromatogrammes sont détectés en lumière ultraviolette avant et après révélation généralement avec 10%

d'acide sulfurique ou une solution saturée de NaOH (composé phénolique).

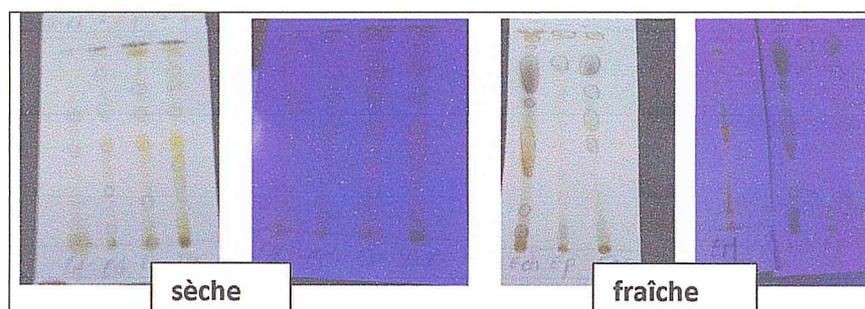


Figure II.3 : Profil chromatographique sur couche mince CCM de l'extrait méthanolique et éther de pétrole et méthanol et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique

La chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique(EM) et éther de pétrole (EEP) et chloroformique (ECh) et Acétate d'éthyle(EAc) et butanolique (EB) effectuée dans le système de solvant Hexane /AcOEt (60/40) a permis d'obtenir les résultats regroupés dans le tableau II.5.

Tableau II.5: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et éther de pétrole et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique (sèche) :

Extraits étudiées	Rf	Couleur des spots sous UV	Couleur des spots après révélation
EM	0,8	Mauve	Bleu vert
	0,67	Orange	Jaune
	0,51	Jaune	-
	0,33	Jaune	-
	0,1	Jaune	Jaune
Ech	0,95	Mauves	Bleu vert
	0,9	Bleu	-
	0,85	Orange	Jaune
	0,80	Rose	Jaune
	0,65	Mauves	Bleu ver t
	0,45	Orange	Jaune
	0,36	Jaune	-
	0,23	Jaune	-
0,1	Orange	Jaune	
EEp	0,94	Mauves	Bleu vert
	0,92	Orange	Jaune
	0,72	Roe	Bleu
	0,61	Orange	Bleu
	0,45	Jaune	-
	0,40	Jaune	-

	0,19	Jaune	-
	0,10	Jaune	-
EC	0,94	Mauves	Bleu vert
	0,92	Orange	Jaune
	0,88	Jaune	-
	0,81	Jaune	-
	0,75	Orange	-
	0,61	Orange	Bleu vert
	0,35	Rose	-
	0,27	Orange	-
	0,1	rose	-
	EB	0,67	Jaune

L'extrait méthanolique plus de 4 taches et éther de pétrole plus de 9 tache et chloroformique plus 10 tache, Acétate d'éthyle plus 8 tache et 1 seule tache jaune butanolique est riche en composés flavonoïdes La présence des spots de couleur bleu et orange, rose jaune et mauve dans sur les chromatogrammes de nos extraits révèlent la présence d'acide phénolique, anthocyanidine 3-glucoside, flavonols, flavones, isoflavonones, flavone [21].

Tableau II.6: Résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanolique et éther de pétrole et chloroformique et Acétate d'éthyle et butanolique (fraîche):

Extraits étudiées	Rf	Couleur des spots sous UV	Couleur des spots après révélation
EM	0,74	mauve	jaune
	0,69	orange	-
	0,62	orange	-
	0,13	bleu	-
	0,10	jeune	-
ECh	0,94	orange	-
	0,90	Rose	-
	0,89	Rose	-
	0,85	bleu	-
	0,75	orange	Rose
	0,60	Rose	-
	0,59	Rose	-
	0,45	jaune	jaune
	0,34	Orange	-
	0,23	Rose	jaune
	0,14	Jaune	-
0,07	Jaune	-	
Epp	0,94	Orange	-
	0,79	Rose	-

	0,64	jaune	-
	0,44	Rose	jaune
	0,29	Rose	-
	0,16	Orange	jaune
	0,05	Orange	-
EC	0,93	Jaune	-
	0,79	Rose	jaune
	0,67	Orange	-
	0,43	Jaune	jaune
	0,17	Orange	-
EB	0,60	jaune	-

I.5 Détermination du potentiel d'hydrogène de l'extrait aqueux

Le pH est un nombre qui représente conventionnellement la concentration en ions hydrogènes d'une solution aqueuse. La détermination potentiométrique du pH est effectuée par mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes judicieusement choisies plongeant dans la solution à examiner, l'une de celle-ci est une électrode sensible aux ions hydrogènes (le plus souvent, une électrode en verre) et l'autre une électrode comparaison. Mode opératoire du pH mètre (Annexe 2) Le pH de l'extrait aqueux est de 6.5 (Le pH obtenu montre que l'extrait aqueux de la plante est légèrement alcalin).

I.6 Dosage des polyphénols totaux

I.6.1 Protocole expérimentale

I.6.1.1 Courbe d'étalonnage

Un standard de calibration a été préparé, en utilisant des solutions d'acide gallique de différentes concentrations de 0.0156 jusqu'à 0.125 mg.ml⁻¹. On prend 1ml de la solution diluée, on lui ajoute 5 ml d'eau distillée et 0.5 ml de réactif de folin-ciocalteu. On laisse le mélange 5 minutes puis on le neutralise avec 4ml de carbonate de sodium. Après agitation, les solutions sont maintenues dans l'obscurité et à la température ambiante pendant 1 heure. L'absorbance de chaque solution a été déterminée à 765 nm. La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure II.4.

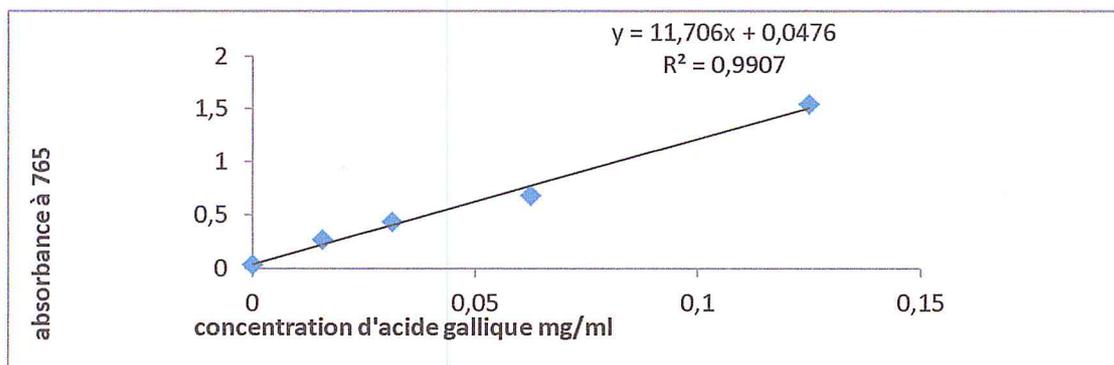


Figure II.4: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

II.6.1.2 Dosage des polyphénols totaux des extraits

Afin de déterminer la quantité de polyphénols totaux présents dans les extraits méthanolique (EM), chloroformique (Ech) et butanolique (EB) de l'espèce *Urtica dioica L*, nous avons utilisé la méthode de Folin-Ciocalteu. Nous avons préparé, dans un premier temps, une solution mère d'extrait de plante, 2mg de chaque extrait (EM et Ech et EB) de l'espèce *Urtica dioica L*, ont été mélangés avec 1ml de méthanol et 6.5ml d'eau distillé. 1ml de la solution mère a été prélevée et introduit dans un tube sec et stérile. On a ajouté à cette solution 0.5ml de réactif de Folin-Ciocalteu et 5ml d'eau distillé. Pour finir, on ajoutant au mélange 4ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium de concentration 75g.l⁻¹. Après incubation pendant 1h à l'obscurité et à température ambiante, on lit l'absorbance à 765 nm à l'aide de la spectrophotométrie UV-visible [98], le total des composés phénoliques est déterminé selon l'équation suivante

$$T = C \cdot V / M$$

T : représente le total des composés phénoliques (mg EAG/ g d'extrait sec de la plante).

C : concentration d'extrait équivalente à l'acide gallique, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (mg.ml⁻¹).

V : le volume d'extrait (ml).

M : poids sec d'extrait de la plante (g).

II.6.2 Résultats et discussions

Le taux de polyphénols existant dans l'extrait méthanolique (EM) et chloroformique (Ech) et butanolique (EB) est calculé et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.7, Et dans la figure II.5 sous forme d'histogramme :

Tableau II.7: Taux des polyphénols existant dans les extraits EM, Ech et EB de *Urtica dioica L*.

Echantillons	Taux de polyphénols %
EM	51
ECh	15
EB	13

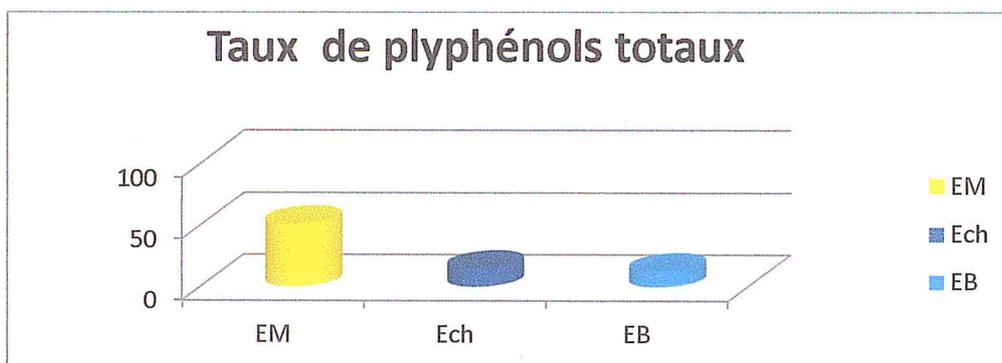


Figure II.5 : Le contenu des composés phénolique des extraits EM, ECH, EB.

D'après les résultats obtenus (tableau 21 et figure 18), nous avons constaté que l'extrait méthanolique de l'espèce *Urtica dioïca L* est plus riche des composés phénolique que les deux extraits chloroformique et butanolique.

II.7 Dosage de la vitamine C l'espèce *Urtica dioïca L*

II.7.1 Protocol

Principe du dosage On prend 5g du produit examinée +10ml d'acide sulfurique +1g amidon dans une Erlenmeyer puis on ajoute 80ml d'eau distillée, on titre avec l'iode 0.01N, on obtient une couleur bleu foncé.

Calcul :

$$\text{Titre} = \frac{VI_2 \cdot C_{I_2} \cdot \text{eq}(\text{vitamine C})}{m(\text{mg})} \cdot 100$$

$$\text{eq vitamine C} = 0.881 \text{ mg}$$

1ml correspond à 0.881mg de vitamine C

Titre calculé en (mg/g)

II.7.2 Résultats de Dosage de vitamine C

Tableau II.8 : Le titre calculée (mg/g) de vitamine C pour les l'espèce *Urtica dioïca L*

	Le titre calculé (mg/100g)	Donnes bibliographique (mg/100g).
Titre calculé en mg/g (l'espèce <i>Urtica dioïca L</i>)	42,28	333

L'espèce du *Urtica dioïca L* est riche en vitamine C 6 fois que possédé l'orange, cette vitamine permet l'absorption digestive du fer nom himnique en transformant le fer ferrique en fer ferreux [19,21].

II.8 Activité anti oxydante de l'espèce *Urtica dioïca L*

II.8.1 Protocol expérimental

II.8.1.1 Préparation de la solution de DPPH

Le 1,1-diphényl-2-picrlhydrazyl(DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), $M=394.33$), est solubilisé dans le méthanol absolu pour en avoir une solution de 100 μmole (4mg de DPPH dissout dans 100 ml de méthanol absolu).

II.8.1.2 Préparation de la solution de vitamine C

La solution de vitamine C est Préparée par dissolution de 50 de la vitamine C dans 10ml de méthanol, cette solution, dite solution mère, subit ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de milligramme par ml (tableau II.10).l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon testé.

II.8.1.3 Préparation des solutions d'extrait

Pour les extraits chloroformique et butanolique (EM, EB), nous avons préparé une solution mère dans le méthanol absolu à raison de 5mg .ml⁻¹ et 4 mg .ml⁻¹ .cette solution est subit, suite, des dilutions pour en avoir différentes concentration allant de 5 mg .ml⁻¹ (0.1 et 0.125 et 0.25 et 0.5) et de 4mg.ml⁻¹(2).

III.8.1.4 Test de DPPH

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml de la solution à tester, on a ajouté 2ml de la solution de DPPH, en suite agité bien les tubes sont placés l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 minutes Pour chaque concentration, le test est répété 3 fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517nm, à l'aide d'une spectrophotométrie UV-visible .pour chaque dilution, un blanc (contrôle négatif) est préparé à partir de la solution DPPH et 1ml de méthanol. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard : l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans la même condition dans le méthanol pour déterminer l'activité antioxydant. Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures.

II.8.2 Résultats de l'activité antioxydant testée par la méthode du DPPH

L'activité anti radicalaire de nos extraits (Ech et EB) a été évaluée par la méthode de DPPH .Une solution méthanoïque de DPPH·(2-2-diphényl-1-picrylhydrazyl)présente une coloration violette sombre, en présence d'un antioxydant , la forme réduite de DPPH-H confère à la solution une coloration jaune, et par conséquent une diminution del'absorbance .Le changement de la couleur de la solution méthanoïque de DPPH en présence de chacun des extraits à tester a été évalué par spectrophotométrie UV-Visible et mesurer à 517nm .L'évaluation du pouvoir anti radicalaire de nos deux extraits (Ech et EB) a été réalisée par comparaison avec celle de l'anti- oxydant, la vitamine C . En faisant varier la concentration des extraits et en calculant pour chaque concentration le pourcentage d'inhibition correspondant. Les résultats figurant dans le tableau II.9, et la figure 20 ci-dessous après illustrent les pourcentages de l'activité anti radicalaire des extraits chloroformique et butanolique de *Urtica dioïca L* (Annexe 4).

Tableau II.9: Absorbances et pourcentages de l'activité anti radicalaire des différentes concentrations des extraits (chloroformique et butanolique) et du standard vis-à-vis du libre DPPH.

	C (mg.ml ⁻¹)	0.1	0.125	0.25	0.5	1	2	4	5
Ech	Absorbance	0.311	0.301	0.269	0.250	0.235	0.022	0.217	0.208
	%d'inhibition	28.93	33.22	49.02	60.28	70.41	81.66	84.75	92.03

EB	Absorbance	0.317	0.309	0.302	0.262	0.248	0.235	0.222	0.098
	%d'inhibition	26.23	29.76	32.45	52.85	61.54	70.52	80.04	91.12
Vit C	Absorbance	0.314	0.286	0.175	0.084	0.062	0.056	0.042	0.032
	%d'inhibition	46.24	51.19	70.13	85.66	89.41	90.44	92.83	94.53

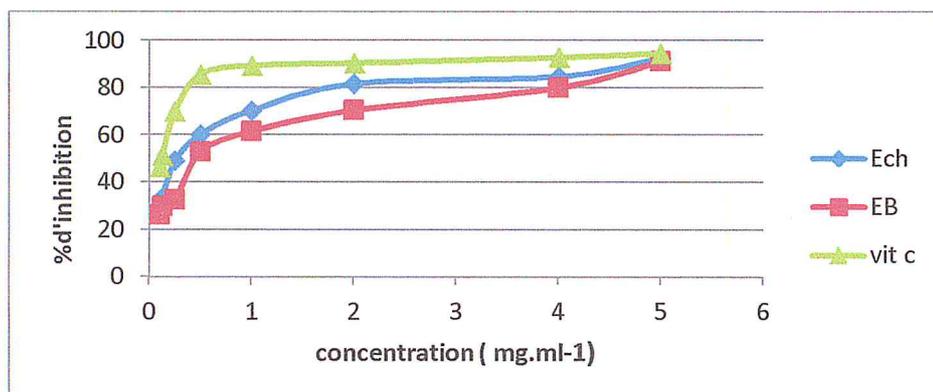


Figure II.6: Pourcentage de réduction du radical du libre DPPH de l'extrait chloroformique et butanolique et du standard

L'interprétation des résultats de l'activité anti oxydante de nos extraits par la méthode de DPPH-La concentration CE_{50} (concentration permettant d'inhiber 50% du radical DPPH).

La concentration CE_{50} des extrait et du standard antioxydant est déduite de la droite représentant le taux d'inhibition de la concentration des extraits Ech et EB (figure II.7).

Les valeurs des CE_{50} des extraits étudiés et de vit C, sont indiquées dans (le tableau II.10).

Nous pouvons déduire l'activité anti oxydante de nos extraits en calculant l'inverse des valeurs des CE_{50} trouvées.

$$ARP = 1/CE_{50}$$

Les valeurs des CE_{50} et ARP des extraits étudiés et de Vit C, sont indiqués dans (le tableau II.10) et dans (la figure II.7) sous forme d'histogramme.

Tableau II.10 : valeur CE_{50} et APR des extraits étudiés et de Vit C, sont indiquées dans le tableau II.10 et dans la figure II.17 sous forme d'histogramme.

Tableau II.10: Valeur CE_{50} et APR des extrait Ech et EB de *Urtica dioïca L* et de la vitamine C.

Composés	CE_{50} (mg.ml ⁻¹)	ARP
Ech	0,78	1,82
EB	0,39	2,56
Vit c	0,27	3,70

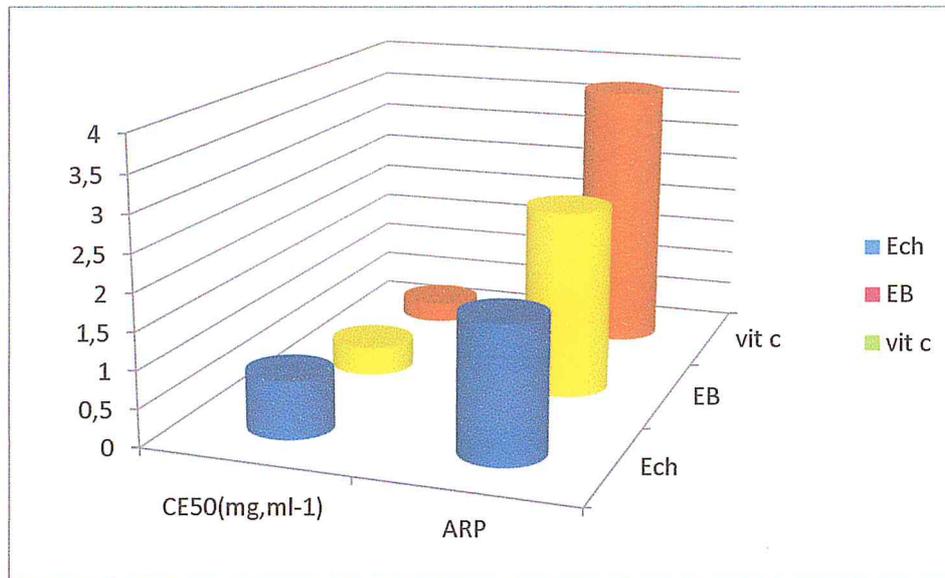


Figure II.7 : Les CE₅₀ et les pouvoirs anti oxydants des extraits Ech et EB et du vit C

L'analyse des résultats montre que les extraits du plant *Urtica dioïca L* sont capables de neutraliser le radical libre DPPH. L'extrait chloroformique semble avoir une activité antioxydante faible que celle de l'extrait butanolique. Comme figurant dans le tableau représenté l'antioxydant standard « vit c » a montré une activité antioxydante puissante avec une CE₅₀ de l'ordre de 0,27 mg.ml⁻¹. Les résultats expliqués qu'un bon effet antioxydant de l'extrait butanolique de concentration de 5mg.ml⁻¹ et la valeur de la CE₅₀ de l'extrait butanolique 0,39 mg.ml⁻¹, donc l'extrait butanolique a une assez bonne activité antioxydante. Si on compare, les valeurs des polyphénols totaux chloroformique et butanolique, il apparaît que celui qui est plus riche en polyphénols est le moins antioxydant. Ceci peut être expliqué par la présence d'autres métabolites dans l'extrait butanolique qui son activité antioxydante.

II.9 Activité antibactérienne des flavonoïdes de l'espèce *Urtica dioïca L*

II.9.1 Protocole expérimental

II.9.1.1 Repiquage des espèces bactériennes

Les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

II.9.1.2 Souche microbiennes testés

Les souches microbiennes testées ont été choisies pour leurs fréquences élevées dans la contamination humaine, quatre souches bactériennes et deux souches fongiques ont été testées. Le Tableau II.11 suivant représente le code des différentes souches microbiennes utilisées dans notre étude :

Tableau II.11 : Code de différentes souches microbiennes étudiées :

Nature des souches	Souches utilisées	Code de la souche
Souches bactériennes	<i>Bacillus ceureus</i>	ATCC 10876
	<i>Pseudomonas aeroginosa</i>	ATCC 27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Escerichia coli</i>	ATCC 25922
Souches fongique	<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433
	<i>Aspergillus Braziliensis</i>	ATCC 16404

II.9.1.3 Préparation de l'inoculum

des colonies bien séparées des espèces bactériennes concernées ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et homogénéisées dans 10 ml de bouillon nutritif puis portées à l'incubation pendant (18-24) heures à 37°C.

II.9.1.4 Préparation des disques

Des disques de papier Wattman n°1 de 9 mm de diamètre, stériles (stérilisation à 120°C pendant 15 min par autoclavage), sont chargés de l'extrait naturel à tester, des disques imprégnés de méthanol sont également utilisés qui vont servir de témoin négatif.

II.9.1.5 Préparation des extraits

Les extraits méthanolique(EM) et chloroformique(Ech) plus butanolique (EB) a été solubilisé dans le DMSO pour obtenir une concentration de 40 mg.ml⁻¹.

II.9.1.6 Préparation des milieux de culture

Les milieux standards utilisés sont la gélose de Muller-Hinton stérile (MH) pour les bactéries et sabouraud stérile (SAB) pour les levures et les champignons à l'usage a été coulée dans des boites de pétrie stériles de 90 mm de diamètre. L'épaisseur de la gélose est de 2 mm répartie uniformément dans les boites. Ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

II.9.1.7 Ensemencement

Des boites de pétrie stériles préalablement coulées, sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. A l'aide d'une pince stérile, les disques de papier filtre contenant les produits à tester sont déposés à la surface de la gélose inoculée au préalable Pour les souches bactériennes L'activité antibactérienne est déterminée en termes de diamètre de la

zone d'inhibition produite autour des disques après 24 h d'incubation à 37°C et 48 heures à 26°C pour les souches fongique) (Annexe 5).

II.9.2 Résultats et discussion

Tableau II.12: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de extrait méthanolique (EM) et chloroformique (ECh), butanolique (EB).

Gram	Souches bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
		CP	EM	ECh	EB
Gram+	<i>Bacillus ceureus ATCC 10876</i>	42	12	20	22
	<i>Staphylococcus aureus ATCC 6538</i>	35	12	20	12
Gram-	<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853</i>	36	10	10	10
	<i>Escherichia coli ATCC 25922</i>	23	10	10	10

« Ciprofloxacine = cp »

Tableau II.13: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait méthanolique ,chloroformique ,et butanolique et des ATFs relatives aux différentes souches fongique .

Souches fongiques	Diamètre de la zone d'inhibition (mm).				
	Mr	APB	EM	ECh	EB
<i>Candida albicans ATCC 24433</i>	-	16	10	-	-
<i>Aspergillus Braziliensis ATCC 16404</i>	-	20	-	-	-

Les résultats mentionnés dans les tableaux II.12 et II.13 sont représentés dans les histogrammes suivant (figure II.8 et II.9) :

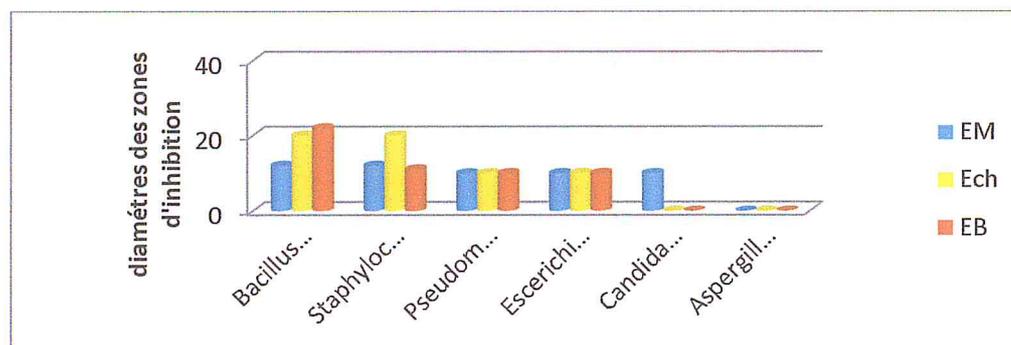


Figure II.8 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique (EM), chloroformique (ECh) relatives aux différentes souches bactériennes.

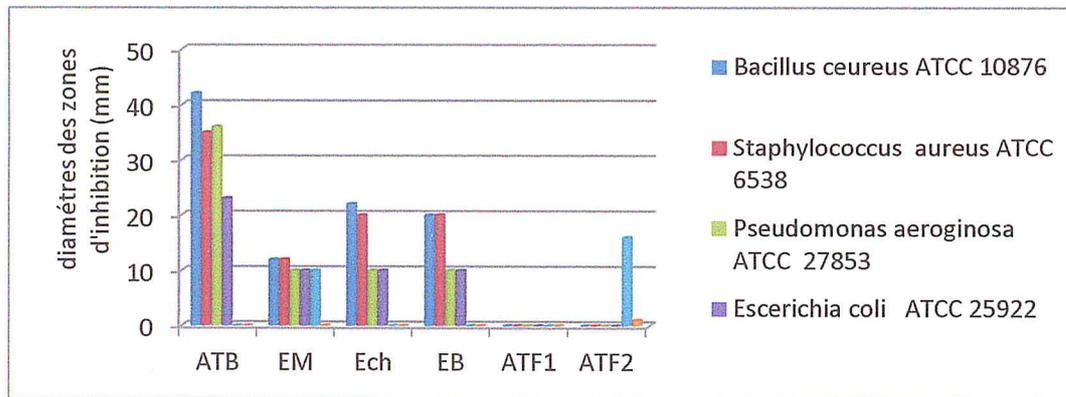


Figure II.9 : Histogramme des diamètres des zones d'inhibition de l'extrait méthanolique (EM), chloroformique (ECh) et butanolique (EB), ATB, ATF 1, ATF 2 relatives aux différentes souches antibactériennes.

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés de *Urtica dioica L* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton). L'activité antibactérienne de nos extraits méthanolique (EM), chloroformique (ECh) et butanolique est estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits flavonoïdes à tester vis-à-vis de quatre germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus ceureus*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C. Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Bacillus ceureus* apparaît sensible vis-à-vis des extraits méthanolique (EM), chloroformique (ECh) et butanolique, ces mêmes extraits ont des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* dont les diamètres des zones d'inhibition varient entre (12-20) mm. La sensibilité d'*Escherichia coli* et de *Pseudomonas aeruginosa* traduit l'action antibactérienne est résistante. Développe des zones d'inhibition équivalentes à 10 mm pour *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. Les résultats obtenus pour les souches antifongiques testées ont montré que la souche *Candida albicans* est résistante pour les extraits des méthanolique (EM), chloroformique (ECh) et butanolique et la même, Résultats avec *Aspergillus Braziliensis*. Selon les résultats représentés dans les tableaux (26,27) et les histogrammes, On peut conclure une sensibilité remarquable chez les bactéries à gram+ par rapport à la bactérie à gram- qui s'est montrée résistante aux extraits testés, ceci peut être expliqué par la présence de la paroi qui joue le rôle d'une barrière protectrice alors que l'extrait ne peut avoir une sensibilité pour toutes les bactéries, les zones d'inhibition obtenues sont de 23 et 25 mm pour *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* respectivement. Ces résultats sont en accord avec les travaux de [107].

Conclusion

Ce travail vise la valorisation d'une plante médicinale très répandue dans le bassin méditerranéen, dont le nom est *Urtica dioica* L. ou « horraig » appartenant à la famille des *Urticacées*. La plante est dotée des propriétés thérapeutiques importantes.

Les résultats du criblage phytochimique révèlent la présence de plusieurs catégories de métabolites secondaires néanmoins les anthocyanes, les flavonoïdes, les tanins les gluconosides, les saponosides et les quinones. L'extraction des parties aériennes de l'espèce *Urtica dioica* L, suivie de la séparation chromatographique successive (CCM) a montré la richesse des extraits chloroformique et butanolique en flavonoïdes, L'évaluation de l'activité anti-oxydante de nos extraits (Ech et EB), par DPPH a montré une excellente activité anti -oxydante de l'extrait butanolique. Nous avons constaté que l'extrait des flavonoïdes est inactif sur les souches bactéries à gram négatif , néanmoins, une étude plus approfondie et sur un large spectre de souches indispensable et en utilisant des doses plus fortes.

Références bibliographique

1. **Marc, T., Gerard, W. et Denis, L.** " Classification de l'anti-inflammatoire in guide pharmacologie étudiants et professionnels paramédicaux ". 4e édition. (2001).
2. **Bérubé-Gagnon, J.** " Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana* ". Mémoire de l'université de Québec. (2006).
3. **Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, T., Luychx, M., vasseur, J., Cazin, J., Cazin, J.C. et Pinkas M.** " Oxygen Species Scavenging activity of phenolic from hawthorn plant organs and pharmaceutical preparations ". *Arznei Forschung*. (1996). vol. 46. pp. 1086-1089.
4. **Bruneton, J.** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales ». *Médicaments Internationaux*, Tech et Doc. (1999). pp. 647-673.
5. **Teixeira Da Silva, J.A.** " Mining the essential oils of the Anthemideae ". *Afr. J. biotechnol* (2004). vol. 3 (12) . pp. 706-720.
6. **Djerroumi, Ahmed-NACEF.** " 100 plant médicinales de l'Algérie ". Dar Houma. (2012). p. 159.
7. **Lefief-Delcourt, Alix.** " L'ortie c'est malin : santé, beauté, jardin, maison ... toutes les vertus les conseils pratiques de cette plante magique ". *Leduc*. (2012). p. 160.
8. **Teucher, T.** " Cytokine Secretion in Whole blood of healthy subjects following oral administration of *Urtica dioica* L plant extract " .
9. **Reihemann, K.** " Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-Kappa B ". *FEBS Lett.* (1999). Vol. 442(1). pp. 89-94.
10. **Chrubasik, S.** " Evidence for antirheumatic effectiveness of stewed *Herba Urtica dioica* in acute arthritis ". *Phytomedicine*. (1997). vol. 4. pp. 105-108.
11. **Gülçin, I., Küfrevioğlu, İ., Oktay, M., Büyükkuroğlu, M.E.** " Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.) ". *Journal of Ethnopharmacology*. (2004). vol. 90. pp. 205-215.
12. **Güder, A. et Korkmaz, H.** " Evaluation of in vitro Antioxidant Properties of Hydroalcoholic *Urtica dioica* leaf Extract *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Waller and their Mixture. " (2012) . vol. 11(3). pp. 913-923.
13. **Ahangarpour, Akram., Mohammadian, Maryam., Dianat, Mahin.** " Antidiabetic Effect of Hydroalcoholic *Urtica* Leaf Extract in Male Rats With Fructose- insulin Resistance ". *Iran J. Med. sci.* (2012). pp. 181-186.
14. **Mohammad Reza Safarinejad, MD.** " *Urtica dioica* for treatment of benign prostatic hyperplasia : A prospective, Randomized, Double-blind, placebo-controlled, crossover study ". *Journal of Herbal pharmacotherapy*. (2005) . vol. 5(4). pp. 1-11.

15. **MANGAMBU ,MUSHAGALUSA,K.F.et KADIMA,N.J .** " Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétique de la ville de Bukavu et ses environs (sud-kivu,R .D.Congo) ." journal of Applied Biosciences.(2014).vol .75.pp.6211-6220.
16. **Ramzan ,Hafiza Sobia.** " protective Role of *Urtica dioica* methanol extract in treating experimentally induced urinary calculi in rats ." Ethiopian intertional Journal of Multidisciplinary Research.(2014).vol.1(3).pp.1-10.
17. **Shivani, Bisht ,N.S., Bhandari ,Snehlata et Bisht, et .** "*Urtica dioica L* :an undervalued,economicallyplant."AgriculturalScienceResearchjournal.(2012).vol.2(5).pp.250-252.
18. **Tissier, alain (1994),**phthothérapie analytique ,phytochimie et pharmacologie,Edition Marc-Aurèle,p.273-279.
19. **Bertrand B. 2010.** Les secrets de l'Ortie. De Terrant. Vol. 1. Le compagnon végétal.
20. **Valnet ,(1992),**PHYTOTHERAPIE,Traitement des maladies par les plantes ,maloine ;6e édition,p.617-625.
21. **Moutsie (2008),** L'ortie, une amie qui vous veut du bien ,l'encyclopédie d'utovie ,Editions d'Utovie.
22. **Diederichs Armelle,(2005),**Laphytothérapie dans le traitement de l'hypertrophie bénigne de la prostate .Etude de Quatre plantes : Epilobium SP.,Pygeum africanum H,Serenoa repens B et *Urtica dioica L .*, Université Louis Pasteur de Strasbourg.
23. **Géhu-Franck J., M et Bournique C.p.(1993),** Schémas de Botanique systématique illustrée :Tome 2 : les plantes à fleurs et fruits (angiospermes), aboratoire de Botanique.Faculté de Pharmacie de Paris.
24. **Schaunberg Paul ,parin Ferdinand (1969),**Guide des plantes médicinales , Delachaux & Niestle S.A., Neuchâtel (suisse),p.317 -318.
25. **Wichtl M., et R. Anton. 2003.** Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. TEC & DOC Lavoisier.
26. **Bernardi A. P. M., López-Alarcón C., Aspee A., Rech S., Von Poser G. L., Bride R. et Lissp E. 2007.** Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. Journal of the chilean chemical Society., 52 (4) : 1326-1329.
27. **Fleurentin Jacques (2008),**plantes médicinales ,traditions et thérapeutique ,édition Ouest-France ,France B.U.santé Nantes ,p 104-105.
28. **Boullard Bernard (2001),** Plantes médicinales du monde, réalités et Croyances, éditions ESTEM, France (paris), p541-542.

29. **Alternative Medicine Review Volume 12**, Number 3 September 2007
30. **Proestos ,c., Boziaris ,I.S., Nycha,G.J.E.and Kamaitis M.** "Analysis of flavonoids and phenolic acids in greek aromatic plants:investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity " *Food Chemistry* .(2006).vol. 95(4).pp.664-671.
31. **Ji, T.F.,Liu, C.H., et Wang.** " Studies on the chemical constituents of *Urtica dioica* L.grown in Tibet autonomous region ". grown in Tibet autonomous region ". *Zhong Yao cai*.(2007).vol.30(6).pp.662-664.
32. **Bertrand, B.** "Les secrets de l'ortie ". De Terran.(2010).Vol.1.p.181.
33. **Farzami,B.,Ahmadvand,D.,Vardasbi, S.,Majin,FJ.,Khaghani,Sh.** " Induction of insulin secretion by a component of *Urtica dioica* leave extract in perfused Islets of Langerhans and its in vivo effects in normal and Streptozotocin diabetic rats" *J.Ethnopharmacol.*,(2003).Vol.89(1).pp.47-53.
34. **Mohammed ,El Houari, etal.**"*Urtica dioica* extract reduces platelet hyperaggregability in type 2 diabetes mellitus by inhibition of oxidant production ,Ca²⁺ mobilization and protein tyrosine phosphorylation " *J.Appl.Biomed* (2007).Vol.5.pp.105-113.
35. **Daovy, Allais .**" *L'ortie dioica* ". *Actualités Pharmaceutiques*.(2009).Vol.48(490).pp.53-55.
36. **Horvilleur ,A. .**" 101 conseil pour vous soigner par l'homéopathie" .Hachette. (1977).
37. **Bertrand,B., Collaert,J.p et Petiot ,E .** " Purin d'ortie & cie " .De Terran.(2004).
38. **Koch,E.et Bieber ,A .** " Pharmacological effects of Saw Palmeto and *Urtica* Extracts For Benign Prostatic Hyperplasia and Sex Drive " .(1994).
40. **Toldy Anna, Stadler Krisztian, Sasvari Maria,Jakus Judit,Jung Kyung J.,Chung Hae Y.,Berkés Istvan, Nyakas Csaba, Radak Zsolt (2005),**the effect of Exercise and nettle Supplementation on oxidative stress markers in the rat brain *Research Bulletin* 65,487-493.
41. **Pinelli Partrizia, Ieri Francesca ,Vignolini Pamela , Bacci Laura, Baronti Silvia,Romani Annalisa (2008),**Extraction and HPLC analysis of phenolic Compound in leaves ,stalks ,and textil fibers of *Urtica L.* , *Agric .Food Chem.*, 56,N.19.
42. **Akbay Pinar ,Basaran A .Ahmet ,Undeger Ulkü et Basaran (2003),**In Vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica L.*, *phytother.Res* .17,34-37;
43. **Yener Zabit ,Celik Ismail ,Ilhan Fatma, Bal Ramazan (2008),**Effects of *Urtica dioica L.* Seed on lipid peroxidation ,antioxidants and liver pathology in aflatoxin-indced tissue injury in rats ,*Food and Chemical Toxicolgy* 47 418-424.

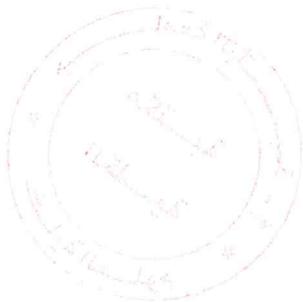
44. Leblam. thèse au laboratoire d'écophysiologie et de biotechnologie des halophytes et des algues au de l'institut universitaire Européen de la mer. Université de Bretagne Occidentale (UBO).
45. Lugasi, A., Hoari, J., Sagi, K. V. et Biro, L. "The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases". *Acta Biologica Szegedensis*. (2003). Vol. 1(4). pp. 119-125.
46. Urquiaga, I. et Leighton, F. "Plant Polyphenol antioxidants and oxidative stress". *Biological Research*. (2000). Vol. 33 (2). pp. 55-64.
47. Sarni Manchdo, P. et Chénier, V. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier. (2006). pp. 2-10.
48. Macheix, J. J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C. Les Composés phénoliques de végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes. (2005). pp. 4-5.
49. Kansol, M. M. R. "Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques ethnobotaniques et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Faso : cas de *Leuc martinicensis* royal ex benth". Mémoire pour obtenir un Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) en sciences biologiques. (2009).
50. Joslyne, M. A. et Goldstein, J. L. "Adv. Food. Res." (1964). Vol. 13. pp. 179-217.
51. Bruneton, J. "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales". *Medicals Internationals, Tech et Doc*. (1999). pp. 647-673.
52. Schmidt, O. Th., Mayer, W. "Naturliche Gerbstoffe". *Angewandte Chemie*. (1956). Vol. 68. pp. 103-115.
53. Weinges, K., Marx, H. D., Kaltenhauser, W., Nder, E., Nader, F., Perner, J. et Seiler, D. "Procyanidine aux Fruchlen". *Liebigs Annalen*. (1968). Vol. 711. pp. 184-204.
54. Weinges, K., Bahrt, W., Ebert, W., Goritz, et Marx, H. D. "constitution enstnung der flavonid-gerbstoffe". *Fortschritt Chemistry Organic Natural* (1969). Vol. 27. pp. 185-260.
55. Haslam, E. "Symmetry and Pranthocyanidin biochemistry". *Phytochemistry*. (1977). Vol. 16. pp. 1625-1640.
56. "Practical Polyphenolics : From structure to molecular recognition and physiological action". Cambridge University Press. (1998).
57. Porter, L. J. "Flavans and proanthocyanidins". In: Harborne, J. B. Chapman and Hall, (1998). pp. 21-62.
58. "Tannis". In Harborne, J. B. (Ed), *Methods in Plant Biochemistry, plant phenolics*. Academic Press. 1989. Vol. 1. pp. 389-419.

59. Balas, L et Vercauteren, J. « Extensive high resolution reverse 2D NMR analysis allows structural elucidation of procyanidin oligomer ». *Magazine of Research in Chemistry*. (1994). Vol. 33. pp. 386-393.
60. Piquemal, G. "Les flavonoïdes". www.detoursante.com/phyto-aromatherapie-195/les-flavonoïdes.html. [En ligne] (2010).
61. Karaali, A., Boycioglu, D., Gûnez, G. et Ozcelik, B. « Flavonoids in fruit and vegetables: their impact on food quality ». Nutrition and health-STREP or CA. European commission 's the 6th framework programme for research. Istanbul technical University. (2004).
62. Malsev, D. et Kuntic, v. "Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal flavonoid complexing reaction". *Journal of the Serbian chemical society*. (2007). vol. 72(10). pp. 921-939.
63. W-Erdman, J., Balentine, J. D., Arab, L., Beecher, G., Messina, M., Scalbaer, A., Vita J., Harnly, Hollman, j. p., L-Keen, C., Mazza, G., Messina, M., Scalber, A., Vita, J., Williamson, G., et Burrowes, J. "Flavonoids and heart health": Proceeding of the North America Flavonoids Workshop, may 31 June 1, 2005. *Journal of nutrition*. (2007). Vol. 137. pp. 718-737.
64. Emerenciano, V. P., Barbosa, K. o. Scotti, M. T. et Ferrero, M. j. p. "self organising amps in chemotaxonomic studies of Asteracea : a classification of tribes using flavonoid data". *Journal of Brazilian chemical society*. (2007). vol. 18(5). pp. 891-899.
65. Narayana, K. R., Reddy, M. S., Chaluvadi, D. R., Ms., Chluvad, M. R. et Krishna, D. R. "bio flavonoids classification pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential". *Indian journal of pharmacology*. (2001). vol. 33. pp. 2-16.
66. Harborne, J. B. "Phytochemical methods". *A guide to modern technique of plants analysis*, third edition. (1998).
67. Chen, y. f., Tsai, H. Y., Wu, T., S. "Anti-inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*". *Planta Medica*. (1995). Vol. 61. pp. 2-8.
68. Garcia-Aguez, A. N., Apam, T. O. R., Delgado, H. P., Velazquez, G. et Maetinez-Vasquez, M., "anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model". *Planta Medica*. (2000). vol. 66. pp. 279-281.
69. Resch, M., Steigel, A., Chem, Z. L. et Bauer, R. "5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*". *J. Nat. Prod.* (1998). Vol. 61. p. 347.
70. Yorshikawa, M., Harada, E., Naitoh, y., Inoue, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Yamahara, j., Murakami, N. "development of bioactive functions in *Hydrangea dulcis* folium". (1994). Vol. 42(11). pp. 2225-2230.

71. Kaysre ,o.et KOLodziej,H.”Antibacterial activity of extract and constituents of Pelarganium sedoides and Pelargonium reniforme “planta Mzdica .(1997). Vol.63(6).pp.508-510.
72. Rice –Evans ,Ca.,Miller.”the relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids” Free Rad .Res.(1995). Vol.22.PP.375-383.
73. van Acker ,S.A., Van den Berg ,D.J., Tromp,Mn.,Griffien,”structural aspects of antioxidant activity of flavonoids” .Free Radic .Med (1996). Vol.20(3).pp.331-342.
74. Cos ,P., Ying,L., Calomme ,M.,Hu,J.P.,Cimanga ,K., Van-Pael,B.,Pieter ,L.”Structure activity relationship and classification of flavonoids inhibitors of xnthine oxydase and superoxide scavengers” .J.Nat prod.(1998). Vol.61. pp.71-76.
75. Landolfi,R.,Mower ,R.L.et Steiner M.” Modification of platelet fuction and arachidonicacide metabolism by flavonoids. Structure-activity relatioBiochem.Pharmacol.(1984)). vol.33. pp. 1525-1530.
76. Singh,B.,Nadkarn,J.R., Vishwakarma,R.A.,Bharate,SB.,Nivarkar.M.,Anandijiwala .,S.the hydroalcoholic extract of Cassia alata (Linn.)leaves and its major compound rhein exhibits antaillergic activity via mast cell stabilization and lipoxygenase inhibition “ .journal of Ethnopharmacology .(2012). vol.1(5).pp.469-473.
77. Di carlo,G,Mascolo,N,Izzo,A.A.et Capasso F.”flavonoids:old and new aspects of a class of a clse of natural therapeutic drugs “ Review Life Sci.(1999).vol.65(4).pp.337-353.
- 78-Izzo,A.”PAF and the digestive tract”.J.Pharmacol.(1996).vol.48. pp.1103-1111.
79. Bracke ,M.,vyncke,B,Opdenakke,r G.,Foidart,J.M.,De pestel,G.et Mareel M.”Effect of catechins and cirtrus flavonoids on inva sion in vitro “Clin .Exp.Metastasis.(1991). vol.9. pp. 13-25.
80. Larocca,L.M.,Giustacchini,I M.,Maggiano ,N.,Ranelletti,F.o.,piantelli,M.,Alcini ,E.et Capelli,A.”Growth-inhibitory effect of quectin and presence of type il estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas” .J.Urol.(1994).195. pp.1029-1033.
81. Scutt,A,Meghji,S.,Caniff,J.p.et Harvey,W.”stabilization of collagen by betel nut polyphenols asmechanism in oral submucous fibrosis”.Experientia.(1987).vol.43. pp.391-393.
82. Makimura,M.,Hirasawa,M.,Kobayashi,k.,Indo,j.,Sakanak,S. T et Otake ,S.”Inhibity effect of tea catechins on collagenase activity”.J.Periodontol .(1993).vol.64. pp.630-636.
83. Cowan,MM.” Plants products as antimicrobial agent “ .Clinical microbiology reviews .(1999). pp.564-570. vol. 12(4).

84. **Recio, M.C., Rlos, J.L et Villar, A** "A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature "Phytotherapy (1989). vol.3. pp.117-125.
85. **Medic-Saric, M., Jasparica, I., Smalcic-Bubalo, A. et Monar, A.** "Optimisation of chromatography of flavonoids and phenolic acids" CROATICA MEDICA ACTA CCACAA. (2004). vol.77(1-2). pp.361-366.
86. **Fugioka, T., Furumi, K., Fujii, H.** "Antiproliferative and facarinda furanocoumarine ether from the root of Angelica Japonica ". Chem.Pharm.Bull. (1999). vol.47. pp.96-100.
87. **Badiaga, M.** "Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologique de Nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récolté au Mali", Thèse de Doctorat. Université Blaise-Pascal-Clermont-Ferrand II, France (2011).
88. **Dohou, N., Yamni, K., Tahrouch, S., Idrissi Hassani, L.M. et Badoc Gmira, N.** "Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, Tymelaea lythroïdes". Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. (2003). Vol.142. PP.61-78.
89. **N'Guessan, K., Kadja B., Zirihi, G., Traoré, D. et Aké-Assi, L.** "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)". Sci. Nat. (2009). vol.6(1) .pp.1-15.
90. **MANGAMBU, M.J.D., MUSHAGALUSA, K.F. et KADIMA, N.J.** "Contribution à l'étude phytochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu et ses environs (sud-Kivu, R.D. Congo)". Journal of Applied Biosciences (2014). vol.75. pp.6211-6220.
91. **M. Lahouel** ; « Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux » ; Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine ; 2005.
92. **K.R. Markham** ; « Techniques of flavonoids identification » ; Academic Press ; p144 London ; 1982.
93. **Sine J. P. 2003.** Séparation et analyse des biomolécules : méthodes physicochimiques cours et exercices. Ellipses éditions marketing S A. p 99-101.
94. **Latifou L. 2005.** Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg.
95. **Bandyukova V. A. et Shinkareko A. L. 1973.** The thin layer chromatography of flavonoids. Chemistry of natural compounds., 9 (1) : 17-21.
96. **Singleton, V.L. and Rossi, J.A.** "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents" American Journal of Enology and Viticulture., (1965). vol.16. pp.144-158.

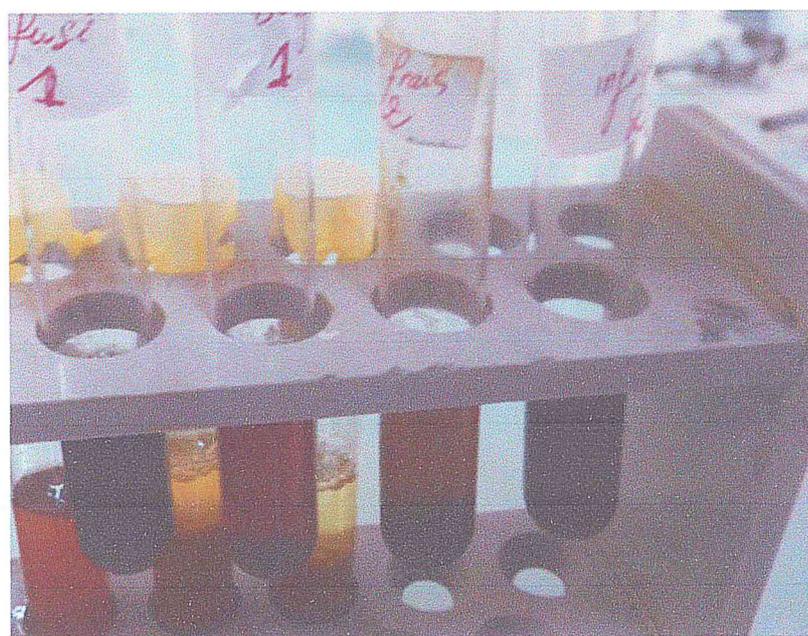
97. Singleton, V.L., Orthofer, R et Lamuela-Raventos, R.M. " Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". *Methods in Enzymology* .(1998).vol.299.pp.152-178.
98. T.S.kujala, J.M.Loponen, k.D.klika, k.pihlaja ;, phenolic and betacyains in red beetroot (beta vulgaris) root : distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds; *J. Agric. food Chem*; 48, 5338-5342; 2000.
99. Fosting Matene S. 2005. Etude phytochimique et activités biologiques de *Maerua angolensis* DC (Capparidaceae). Thèse de docteur en pharmacie de l'université de Bamako. p77-79.
100. Cosio M. S., Buratti S., Mannino S. et Benedetti S. 2006. Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the Labiatae family. *Food chemistry*, 97 (4) : 725-731.
101. Pérez M. B., Calderón N. L. et Croci C. A. 2007. Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L). *Food chemistry*, 104 : 585-592.
102. Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D. et Trinajstić N. 2003. Structure-Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*, 76 (1) : 55-61.
103. Bernardi A. P. M., López-Alarcón C., Aspee A., Rech S., Von Poser G. L., Bride R. et Lissp E. 2007. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the Chilean chemical Society*, 52 (4) : 1326-1329.
104. Dulger B. et Gonuz A. 2004. Antimicrobial activity of some Turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences*. 7 (9): 1559-1562.
105. Güder, A et Korkmaz, H. « Evaluation of in-vitro Antioxydant Properties of Hydroalcoholic solution Extract *Urtica dioica* Leaf Extract in male rats with Fructose-induced insulin Resistance ». *Iran J. med. sci* .(2012).pp181-186.].
106. Emst, M.H. Pittler; " Médecines alternatives : le guide critique"; Ed Elsevier Masson ; 36 ; 2005
107. KURKIK, Z.Z., N., KUKAVICA, B.M., B.M., MATOS, S.B., PAVICIC, S.S., BOROJA, M.M. et SAVIC, A.V." characterization of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L). *APTEFF*. (2012).vol.43.pp.257-272.



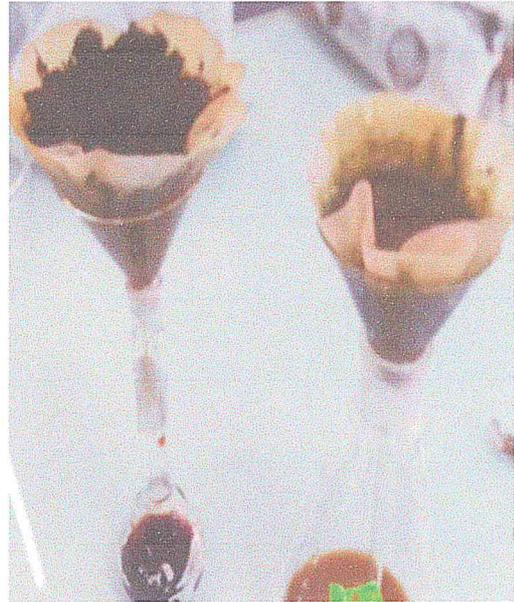
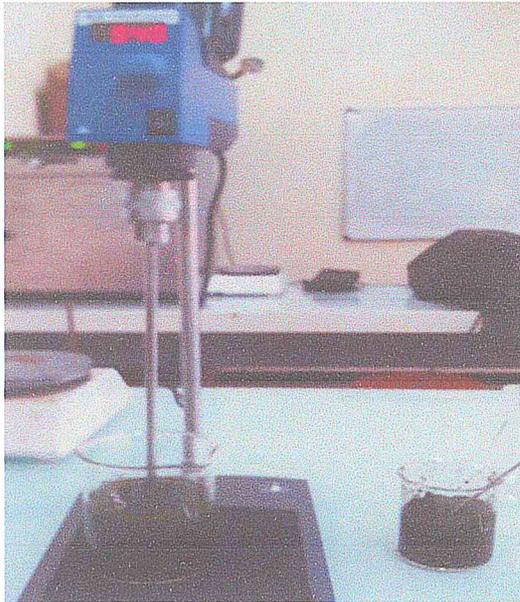
Annexe

Annexe 1

•Les résultats du Scriblage phytochimique



•La différents étape de Scriblage phytochimique



Annexe 2

•Détermination du potentiel d'hydrogène de l'extrait aqueux



Annexe 3

•Extraction liquide-liquide

-Pour l'élimination de la chlorophylle et des lipides



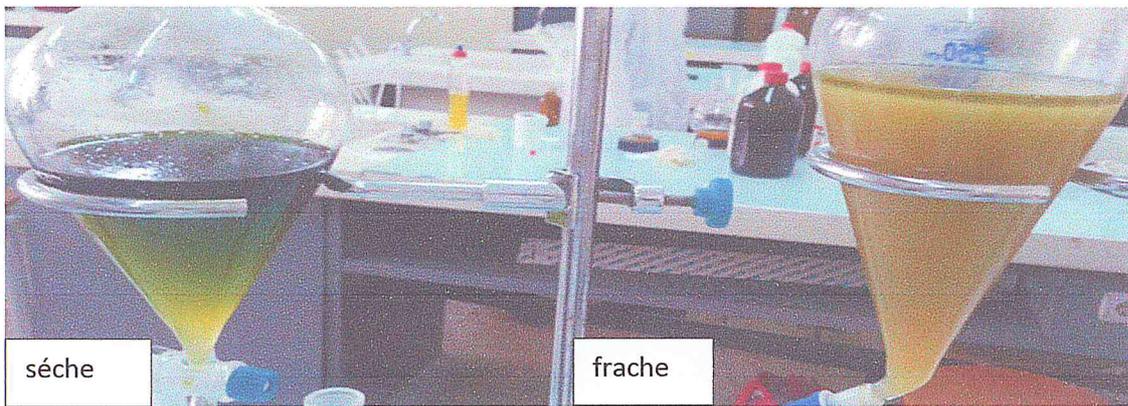
-Pour l'élimination des gènes libres



-Pour l'élimination des monosides



- Pour l'obtention des flavonoïdes



- Différents extraits de la plante *Urtica dioica* L



Annexe



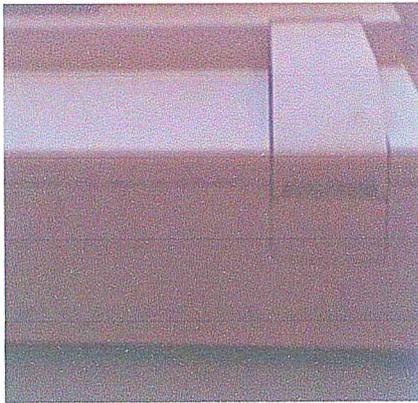
Evaporateur rotatif



H.P.L.C

Annexe 4

•Le changement de la couleur de la solution méthanolique de DPPH en présence des extraits à tester (du violet à jaune pâle)

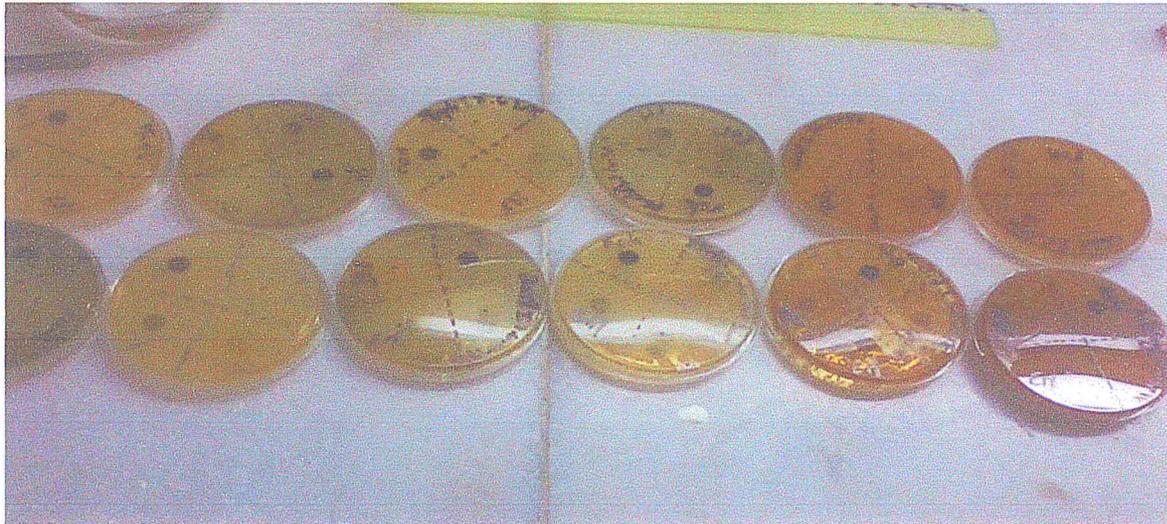


Spectrophotomètre UV-vis

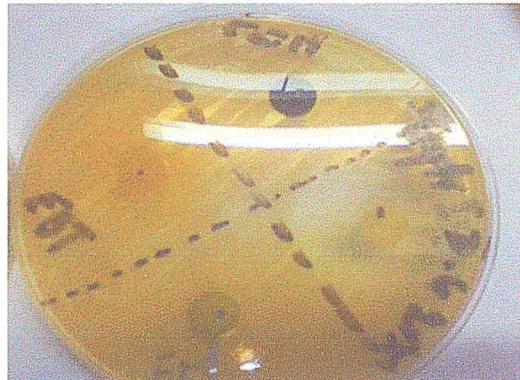
Annexe

Annexe 5

• Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait chloroformique et l'huile essentielle de l'espace *Urtica dioica* L.



Bacillus cereus



Pseudomonas aeruginosa



Escherichia coli



Staphylococcus aureus

