

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

-----  
UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI-OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIÈRE  
FILIERE : CHIMIE

## MÉMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

### *THÈME*

*Extraction, analyse et étude des activités antioxydante et antibactérienne des extraits acétonique, éthanolique et aqueux de l'Urtica membranacea - Essai de formulation*

Présenté par : **Ailam Hanane**  
**Taibi Sarah**

Soutenu publiquement le 14/07/2019, devant le jury composé de :

<b>M<sup>r</sup> Mechouet</b>	<b>Mourad</b>	<b>MCA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Président</b>
<b>M<sup>r</sup> Moualek</b>	<b>Idir</b>	<b>MCB</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Examinateur</b>
<b>M<sup>r</sup> Benchoulak</b>	<b>Mounir</b>	<b>MAA</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Encadreur</b>
<b>M<sup>r</sup> Houali</b>	<b>Karim</b>	<b>Professeur</b>	<b>UMMTO</b>	<b>Co-encadreur</b>

# Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents*

*Mon cher papa **Ouali***

*Signe de fierté et d'honneur, ce travail est le vôtre, inshalah tu trouveras ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toute ces années de sacrifice pour moi.*

*Ma chère maman **Malika***

*Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte, ton amour, ta patience, ton encouragement et tes prières ont été pour moi le gage de la réussite. J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection.*

*A mes chers frères **Anis** et **Amayas**.*

*Aux membres des familles **Aïlam** et **Cherchem**.*

*A mes chères amies.*

*A mon binôme **Sarah** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*Et a ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*A vous tous merci.*

*Hanane*



# Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents*

*Mon cher papa **Mouloud***

*Signe de fierté et d'honneur, ce travail est le vôtre, inshalah tu trouveras ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toute ces années de sacrifice pour moi.*

*Ma chère maman **Dalila***

*Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte, ton amour, ta patience, ton encouragement et tes prières ont été pour moi le gage de la réussite. J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection.*

*A mon cher frère **Rabah***

*Aux membres des familles **Taïbi** et **Sadoudi**.*

*A mes chères amies.*

*A mon binôme **Hanane** qui a partagée avec moi les moments difficiles de ce travail.*

*Et a ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.*

*A vous tous merci.*

*Sarah*



# Remerciements

*Ce travail de recherche a été effectué au Laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques et au laboratoire de chimie pharmaceutique de la faculté des sciences de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, sous la direction de Mr **BENCHOUAK Mounir** et Mr **HOUALI Karim**.*

*On tiens particulièrement à remercier **Monsieur BENCHOUAK Mounir**, Maître Assistant A à l'Université de Tizi-Ouzou, Département de chimie, pour avoir encadré et dirigé ce travail, tout au long de sa réalisation, pour ses précieux conseils et qu'il puisse voir en ce travail l'expression de notre profonde gratitude.*

*On tiens à exprimer notre très grande considération et notre vive reconnaissance à **Mr HOUALI Karim**, Professeur à l'Université de Tizi-Ouzou, Département de Biologie, d'avoir accepté de nous co-encadrer et nous orienter afin de réaliser ce modeste travail.*

*On exprime nos vifs remerciements à **Mr MECHOUET Mourad**, Maître de conférence A à l'Université de Tizi-Ouzou, Département de Chimie, d'avoir accepté de présider ce jury.*

*Que **Mr MOUALEK Idir**, Maître de Conférence B, à l'Université de Tizi-Ouzou, Département de Biologie, trouve ici l'expression de notre gratitude pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*On ne saurait oublier de remercier **Mme IRATNI-AICHE Ghénima**, **Dr MAMOÛ Merzouk** et les doctorants du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques, et en particulier **Mme OULD-OUALI Karima** Pour leurs gentillesse et leurs aides dans la réalisation de ce modeste travail.*

**HANANE et SARAH**

# Table des matières

---

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

## Chapitre I : Synthèse bibliographique.

### Partie 01 : Généralités sur l'ortie.

I.1.1. Historique .....	3
I.1.2. Description.....	3
I.1.3. Origine et répartition.....	4
I.1.4. Noms vernaculaires de l' <i>Urtica membranacea</i> .....	4
I.1.5. Taxonomie .....	5
I.1.6. Composition chimique d'ortie.....	5
I.1.7. Propriétés thérapeutiques .....	6
I.1.8. Autres domaines d'utilisation de l'Ortie .....	7

### Partie 02 : Composés phénoliques.

I.2.1. Définition.....	8
I.2.2. Classification des composés phénoliques.....	8
I.2.2.1. Les composés phénoliques simples .....	8
I.2.2.2. Les formes condensées .....	10

### Partie 03 : Stress oxydatif.

I.3.1. Définition.....	12
I.3.2. Radicaux libres .....	13
I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène .....	13
I.3.4. Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène.....	14
I.3.5. Antioxydants.....	15

## Table des matières

---

### Partie 04 : Méthodes d'extraction.

I.4.1. Définition.....	16
1.4.2. Extraction par solvant.....	16
I.4.3. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau .....	17

### Chapitre II : Matériels et méthodes.

II.1. Choix du matériel végétal .....	18
II.2. Collecte du matériel végétal .....	18
II.3. Préparation des extraits par macération à froid .....	19
II.4. Conservation des extraits .....	21
II.5. Rendement .....	21
II.6. Les tests phytochimiques .....	21
II.7. Dosages des métabolites secondaires .....	23
II.7.1. Détermination du contenu phénolique total .....	23
II.7.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes .....	23
II.7.3. Détermination de la teneur en flavonols .....	24
II.7.4. Détermination de la teneur en tanins totaux.....	24
II.7.5. Détermination de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes .....	25
II.8. Mesure de l'activité antioxydante .....	26
II.8.1. Effet scavenger du radical DPPH .....	26
II.8.2. Pouvoir réducteur FRAP .....	27
II.9. Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques .....	28
II.9.1. Spectrométrie Ultra-violet-Visible.....	28
II.9.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrométrie Ultra-violet .....	30
II.10. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudiés .....	31
II.11. Essai de formulation.....	33

## Table des matières

---

### Chapitre III: Résultats et discussion.

III.1. Rendement .....	35
III.2. Tests phytochimiques .....	35
III.3. Dosage des métabolites secondaires .....	36
III.3.1. Détermination du contenu phénolique total .....	36
III.3.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	37
III.3.3. Détermination de la teneur en flavonols .....	38
III.3.4. Détermination de la teneur en tanins totaux .....	38
III.3.5. Détermination de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes .....	39
III.4. Mesure de l'activité antioxydante .....	39
III.4.1. Effet scavenger du radical DPPH .....	39
III.4.2. Pouvoir réducteur FRAP .....	42
III.5. Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques .....	44
III.5.1. Spectrométrie Ultra-violet-Visible .....	44
III.5.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrométrie Ultra- violet .....	46
III.6. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudiés.....	48
III.7. Essai de formulation .....	49
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>51</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>53</b>
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations :

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**FeCl<sub>3</sub>** : Trichlorure de fer.

**Al<sup>3+</sup>** : Ions d'aluminium.

**BSA** : Bovine sérum albumine.

**SDS** : Sulfate dodecyl sodium.

**TEA** : Triéthylamine.

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

**FRAP** : ferric reducing antioxidant power.

**TCA** : Trichlorure amine.

**UV-V** : Ultra-violet-Visible.

**E AG** : Equivalent acide gallique.

**E Q** : Equivalent quercétine.

**E AT** : Equivalent acide tannique.

**E AA** : Equivalent acide ascorbique.

**Abs** : Absorbance.

**pH** : Potentiel en hydrogène.

**HBP** : Hypertrophie Bénigne de la Prostate.

**MS** : matière sèche.

## Liste des figures :

<b>Figure01</b> : Plante <i>Urtica Membranacea</i> .....	4
<b>Figure 02</b> : Squelette de base des flavonoïdes .....	9
<b>Figure 03</b> : Structure générale des tannins hydrolysables .....	11
<b>Figure 04</b> : Structure chimique de proanthocyanidine .....	11
<b>Figure 05</b> : <i>Urtica membranacea</i> fraîche .....	18
<b>Figure 06</b> : <i>Urtica membranacea</i> sèche.....	18
<b>Figure 07</b> : La partie aérienne de l' <i>Urtica membranacea</i> après broyage .....	19
<b>Figure 08</b> : Extrait récupéré avant séchage.....	20
<b>Figure 09</b> : Extrait récupéré après séchage .....	20
<b>Figure 10</b> : Lyophilisateur .....	20
<b>Figure11</b> : Centrifugeuse.....	20
<b>Figure12</b> : Réduction du DPPH par un antioxydant .....	26
<b>Figure13</b> : Spectrophotomètre UV-V .....	25
<b>Figure14</b> : Appareil de la chromatographie liquide à haut performance (HPLC) .....	27
<b>Figure 15</b> : l'huile de romarin.....	33
<b>Figure16</b> : Microscope optique.....	34
<b>Figure 17</b> : Teneur en composés phénoliques des extraits des feuilles d' <i>Urtica membranacea</i> .....	36
<b>Figure 18</b> : Effet du solvant d'extraction sur les flavonoïdes d' <i>Urtica membranacea</i> .....	37
<b>Figure 19</b> : Effet du solvant d'extraction sur la teneur en Flavonols d' <i>Urtica membranacea</i> .....	38
<b>Figure 20</b> : Teneur en tanins totaux des extraits d' <i>Urtica membranacea</i> .....	38
<b>Figure 21</b> : Teneur en chlorophylles et en caroténoïdes des extraits d' <i>Urtica membranacea</i> .....	39
<b>Figure 22</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique .....	40
<b>Figure 23</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux .....	40
<b>Figure 24</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait acétonique .....	41

<b>Figure 25</b> : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique .....	41
<b>Figure 26</b> : Pouvoir réducteur d'acide ascorbique .....	43
<b>Figure 27</b> : Pouvoir réducteur d'extrait acétonique .....	43
<b>Figure 28</b> : Pouvoir réducteur d'extrait éthanolique .....	43
<b>Figure 29</b> : Spectre UV-V de l'extrait acétonique .....	45
<b>Figure 30</b> : Spectre UV-V de l'extrait aqueux .....	45
<b>Figure 31</b> : Spectre UV-V de l'extrait éthanolique .....	45
<b>Figure 32</b> : Chromatographie HPLC des standards .....	47
<b>Figure 33</b> : Chromatographie HPLC de l'extrait acétonique .....	47
<b>Figure 34</b> : Chromatographie HPLC de l'extrait aqueux .....	47
<b>Figure 35</b> : Chromatographie HPLC de l'extrait éthanolique .....	48
<b>Figure 36</b> : Aromatogramme de l'extrait aqueux .....	48
<b>Figure 37</b> : Aromatogramme de l'extrait acétonique .....	48
<b>Figure 38</b> : Aromatogramme de l'extrait éthanolique .....	48
<b>Figure 39</b> : Pommade préparée .....	50
<b>Figure 40</b> : Pommade sous microscope ordinaire .....	50

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 01 :</b> Propriétés thérapeutiques d' <i>Urtica membranacea</i> .....	6
<b>Tableau 02 :</b> Les principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques ...	14
<b>Tableau 03 :</b> Rendement des extraits végétaux après l'évaporation des solvants .....	35
<b>Tableau 04 :</b> Résultats de l'analyse phytochimique qualitative des trois extraits d' <i>Urtica membranacea</i> étudiés .....	35
<b>Tableau 05 :</b> Activités antioxydantes des extraits de plantes, mesurées par la méthode DPPH et exprimées en IC <sub>50</sub> .....	41
<b>Tableau 06 :</b> Activités antioxydantes des extraits de plantes, mesurées par la méthode FRAP et exprimées en IC <sub>50</sub> .....	44
<b>Tableau 07 :</b> Temps de rétention des standards utilisés .....	46
<b>Tableau 08 :</b> Temps de rétention pour les trois extraits d' <i>Urtica membranacea</i> .....	46
<b>Tableau 09 :</b> Diamètres de la zone d'inhibition des extraits .....	48

# **INTRODUCTION**

## **Introduction :**

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique.

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde avec un nombre très élevé de plantes qui possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture.

Actuellement l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime environ 80% des habitants de la planète ont recours à la médecine traditionnelle à base de plante en tant que soins de santé primaire.

Parmi ces dernières l'ortie, « *Urtica membranacea* », une plante sauvage présente partout, sur les chemins, les ruines. On peut la reconnaître les yeux fermés. Elle fait partie des plantes dont on veut toujours se débarrasser et que l'on néglige trop souvent est pourtant c'est une plante aux milles vertus, que nos ancêtres savaient apprécier. Considérer comme une « mauvaise herbe », elle est employée en agriculture, en alimentation, cosmétique, teinturerie, l'industrie de textile et à des fins médicinales.

Elle est couramment utilisée comme tonique dépurative, diurétique et anti inflammatoire en plus, fait toujours l'objet de plusieurs travaux de recherches.

A cet effet et dans le cadre de la valorisation de cette espèce médicinale poussant à l'état spontané dans la région de Tizi-Ouzou, nous nous sommes proposés d'explorer ces activités biologiques dans ce présent travail qui est divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre comprend quatre parties :
  - La première partie est dédiée à des généralités sur l'ortie.
  - La deuxième partie donne un aperçu sur les métabolites secondaires.
  - La troisième partie résume le stress oxydatif.
  - La quatrième partie englobe quelques les méthodes d'extraction.

- Le deuxième chapitre est d'ordre pratique dans lequel sont exposés les matériels, les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir :
- Extraction de la partie aérienne de la plante.
  - Criblage phytochimique de matériel végétal.
  - Dosage des métabolites secondaires.
  - Evaluation de l'activité antioxydante des extraits végétaux de la plante.
  - Analyse par spectrométrie UV-Visible.
  - Examen par chromatographie liquide à haute performance.
  - Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits végétaux de la plante.
  - Essai de formulation.
- Le troisième chapitre est une interprétation et discussion des résultats.

Pour terminer, une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude est établie.

**Chapitre I :**  
**Synthèse**  
**bibliographique**

**Partie 01 :**  
**Généralités sur l'Ortie**

### I.1.1. Historique :

L'Ortie, compagne des premiers campements préhistoriques, fut l'un des premiers légumes utilisés par l'homme. Consommée partout comme épinard, elle fait l'objet de plantations depuis bien longtemps, que ce soit comme fourrage (pour le bétail) ou pour l'industrie (textile et papier) [1].

Au Moyen-âge, l'ortie était considérée comme une panacée. Elle était préconisée contre l'angine, les crachements de sang, les maladies de la rate, les maux de tête. Les graines étaient employées contre les maladies des reins et de poitrine. Le suc frais contre les douleurs articulaires et les plaies enflammées, la racine contre les tumeurs ganglionnaires et les saignements de nez [2].

Son utilisation ne s'est guère limitée à l'Europe, car les bandelettes entourant les momies de l'Egypte ancienne étaient constituées de fibres d'ortie "la Ramie" [3].

Connue aussi chez les Grecques et les Romains, les premiers d'ailleurs à l'avoir appelée Alkalyplie, et qui s'en servaient pour soigner la toux, la tuberculose, l'arthrite ainsi que pour stimuler la poussé des cheveux. Les américains de leurs coté la recommandaient en tisane contre les affections des reins et de la vessie, et son jus pur, contre les maladies de la peau [4].

L'herboriste anglais John Gerard, la qualifiait de contrepoison efficace contre toutes sortes d'empoisonnements du sang. Alors que Nicholas Culpeper, célèbre médecin anglais de la première moitié du XVIIe siècle, la recommandait pour soigner les maladies des vaisseaux sanguins et des voies respiratoires [5].

En effet, l'ortie présente de nombreuses propriétés médicinales, culinaires et agricoles vantées depuis l'Antiquité. De nos jours, elle entre dans la composition d'un grand nombre de plats culinaires et de médicaments et fait toujours l'objet de beaucoup de recherches [1].

### I.1.2. Description :

L'*Urtica membranacea* considérée comme plante annuelle de 30-80 cm, peu hérissée, dressée, souvent rameuse.

Elle possède :

- des feuilles assez grandes, ovales, arrondies ou presque en cœur à la base, incisées-dentées.

- pétiole à peu près égal au limbe, à une seule stipule.
- Des fleurs monoïques, parfois dioïques, en grappes pédonculées, simples, unisexuées, les inférieures ou toutes femelles, cylindriques, plus courtes que le pétiole, à axe dilaté membraneux et florifère seulement en dessus [6].



Figure 01 : plante *Urtica membranacea*.

### I.1.3. Origine et répartition :

L'ortie se disait *Urtica* en latin, mot venant lui-même du verbe *urere* signifiant le verbe brûler faisant allusion aux piqûres brûlantes des poils [7].

Elle se retrouve dans la région méditerranéenne et de l'ouest vers le nord de l'Europe, allant jusqu'à la région nord de la France, Açores [8].

### I.1.4. Noms vernaculaires de l'*Urtica membranacea* :

L'Ortie est connue sous différentes appellations [9], dont on cite :

- **En français** : Ortie à membrane ou ortie dotreuse.
- **En anglais** : Membranous Nettle.
- **En italien** : Ortica Membranosa.
- **En catalan** : Ortiga Membanàcia.
- **En arabe** : heureïgue.
- **En kabyle** : Azegduf.

### I.1.5. Taxonomie :

L'Ortie (*Urtica membranacea*) appartient à la famille des Urticaceae qui regroupe une trentaine d'espèces de plantes herbacées à feuilles velue [6].

- **Règne** : Plantae.
- **Embranchement** : Spermatophytes.
- **Sous-embranchement** : Angiospermes.
- **Classe** : Eudicotylédones.
- **Sous-classe** : Rosidées.
- **Ordre** : Rosales.
- **Famille** : Urticaceae
- **Genre** : *Urtica*.
- **Espèce** : *Urtica membranacea*.

### I.1.6. Composition chimique d'ortie :

Les propriétés médicinales des plantes sont dues à des composés chimiques. Parmi ces derniers, les métabolites primaires qui sont indispensables à leurs existences, ceux-ci englobent des protéines, des lipides, des fibres alimentaires et des hydrates de carbone qui servent à la subsistance et à la reproduction, non seulement de la plante elle-même mais encore des animaux qui s'en nourrissent.

De plus, les plantes synthétisent aussi une gamme extraordinaire d'autres composés appelés métabolites secondaires dont la fonction est loin de faire l'unanimité [10], essentiellement des flavonoïdes, des tanins et des composés volatiles, mais aussi des acides gras, des polysaccharides, des stérols, des terpènes, des vitamines et des minéraux[11 ;12 ;13 ;14].

En effet, les parties aériennes d'*Urtica membranacea* contiennent de la chlorophylle, plusieurs vitamines (vitamine C, K, B1 et B2...), caroténoïdes, huiles essentielles et des minéraux (Fe, Cu, Mn et Ni).

Quant aux polyphénols présents dans cette plante, il s'agit principalement d'après la littérature de kaempferol, isorhamnetine, quercétine, isoquercétine et d'astragaline qui confèrent à la plante ses propriétés antioxydantes [15].

En plus de la composition des feuilles, les poils contiennent de l'acétylcholine, de l'histamine, 5-hydroxytryptamine (sérotonine), des leukotrienes et de l'acide formique qui sont responsables de l'effet urticant de la plante [16 ; 17].

### I.1.7. Propriétés thérapeutiques :

**Tableau 01** : propriétés thérapeutiques d'*Urtica membranacea*.

Propriétés Thérapeutiques	Actions
Traitement de cancer prostatique et d'hypertrophie bénigne de la prostate	Les effets de la racine d'ortie dans le traitement de l'HBP. (un effet comparable à celui de la tamsulosine) [18].
Hypotenseur	Les racines d'ortie peuvent produire des réponses hypotensives à travers des effets vasodilatateurs, par la libération de l'oxyde d'azote endothélial et par l'ouverture des canaux potassiques, et à travers une action inotrope négative [19].
Diurétique	Augmente le débit urinaire [20].
Hépatoprotectrice, Dépurative	Elimination des toxines accumulées dans l'organisme (uréeions de chlorure). La feuille aide à assainir autant la lymphe que le sang en diminuant l'acidité tout en régulant les facteurs inflammatoires [21].
Anti-anémique, Anti-agrégation plaquettaire	Antifatigue grâce à la forte teneur en fer contenu dans la chlorophylle des feuilles [22].
allergique, Antioxydante	Utile dans le traitement de l'allergie au pollen, traitement de longue durée. Effets sur les récepteurs clés et les enzymes associés à la rhinite allergique (feuilles) [23].
Anti-inflammatoire, Immuno-stimulateur	Activité inhibitrice sur un œdème de patte de rat des polysaccharidique de l'extrait aqueux des racines. Une activité immuno-stimulatrice des flavonoïdes glycosides des feuilles sur les neutrophiles [24].
Traitement de rhumatismes et Arthrose	Effet sur la maturation des cellules dendritiques myéloïdes humaines, avec diminution de l'induction la réponse des cellules T primaires du rhumatisme articulaire.

	Consolidation des cartilages. grâce à sa richesse en Silice (surtout les racines) [25].
Effet sur la fonction cérébrale et la mémoire	La feuille d'ortie est capable de diminuer la transcription des facteurs de l'inflammation, et de stimuler la performance cérébrale [26].
Alopécie (chute des cheveux)	Stoppe la chute des cheveux. (surtout les racines) [27].

### I.1.8. Autres domaines d'utilisation de l'Ortie :

#### ➤ Usage de l'ortie dans l'industrie cosmétique :

L'Ortie est également utilisée dans plusieurs produits cosmétiques comme les shampoings, car on lui attribue la capacité de stimuler la croissance des cheveux et un pouvoir de lutter contre la chute, les pellicules, et les cheveux gras [28].

#### ➤ En alimentation :

En cuisine, les jeunes feuilles sont excellentes, cuites en potage, en salade ou comme légume [29].

L'ortie constitue une source industrielle de chlorophylle mise à profit dans l'industrie agroalimentaire (E140) [30 ; 31]. Elle peut aussi être utilisée pour améliorer la conservation et la qualité organoleptique de certains aliments tels que le chocolat [32].

#### ➤ En agriculture :

L'Ortie est utilisée en purin comme tonique universel, en pulvérisation foliaire sur les plantes. Le purin d'ortie a aussi l'avantage de renforcer les défenses naturelles des plantes et d'avoir un certain effet répulsif sur les insectes [33].

Elle est aussi utilisée comme facteur de croissance dans l'alimentation de bétail, des volailles, des poissons et fruits de mer tels que les truites et pour l'amélioration de leur immunité innée [34 ; 35 ; 36].

# **Partie 02 :**

# **Composés phénoliques**

### **I.2.1. définition :**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux, l'élément structural de base est un noyau benzénique auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou liés à une autre fonction chimique (éther méthylique, ester, sucre,...) [37 ; 38].

Ils sont présents sous forme d'hétérosides (lignines, tanins) dans la nature [39]. Ces composés contiennent exclusivement du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène [40]. Les composés phénoliques sont produits par les végétaux pour se protéger contre la lumière UV, insectes, virus et bactéries [41].

Ils jouent un rôle d'antioxydants naturels et suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [42], et assurent aussi la protection de la cellule vivante, vu leur large diversité biologique conférant des activités antiinflammatoires et chimio-prévention [43].

### **I.2.2. Classification des composés phénoliques :**

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyau aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux [44].

On peut distinguer deux catégories :

- Les composés phénoliques simples.
- Les composés phénoliques complexes.

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

Les formes phénoliques simples présentent des structures chimiques allant de simple phénol en C<sub>6</sub> (non présent naturellement chez les végétaux) aux flavonoïdes en C<sub>15</sub> et à des molécules proches.

Sauf exceptions, ces substances sont présentes sous forme soluble dans la vacuole [44].

### I.2.2.1.1. Acide phénolique :

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

➤ **Acide hydroxybenzoïque :**

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une forme de base de type C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>.

Il existe sous forme d'ester ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins [44].

➤ **Acide hydroxycinnamiques :**

Ils présentent une classe très importante dont la structure de base (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) dérivé de celle de l'acide cinnamique [44 ; 45].

### I.2.2.1.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires qui constituent un des plus vastes groupes de polyphénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux [40].

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux [46].

Ces composés ont un poids moléculaire faible, partageant tous une même structure de base de 15 atomes de carbone arrangés en 3 cycles C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> : A, B et C avec un ou plusieurs substituant hydroxyle [47].

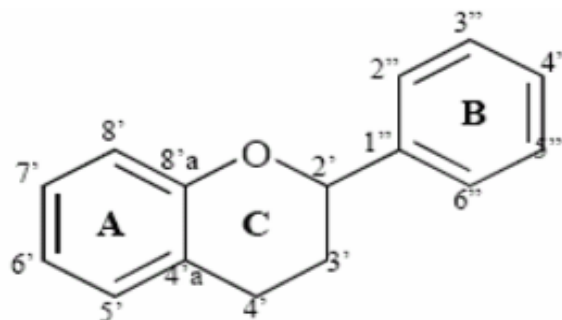


Figure 02 : Squelette de base des flavonoïdes [48].

De plus, les flavonoïdes possèdent de remarquables activités biochimiques et pharmacologiques dues à leur pouvoir antioxydant, antibactérien, antiviral et anti inflammatoire [49].

### **I.2.2.2. Les formes condensées :**

Ces composés résultent généralement de la condensation de certaines des formes simples précédemment évoquées.

Dans tous les cas, les formes condensées sont particulièrement difficile à étudier, et dans la plupart des cas, on est obligé de les dégrader chimiquement ou enzymatiquement avant de pouvoir les analyser [44].

#### **I.2.2.2.1. Tanins :**

Les tanins sont un groupe de polyphénols à haut poids moléculaire et qui existent dans presque chaque partie de la plante : écorce, bois, feuilles et racines [50].

Ces composés sont des molécules fortement hydroxylées et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments.

Les tanins naturels sont subdivisés selon leur structure chimique en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés [51].

#### **➤ Les tanins hydrolysables :**

Ces tanins sont des dimères d'acide gallique condensés sur un dérivé glycosylé, Ils comprennent l'acide gallique et les produits de condensation de son dimère, l'acide hexahydroxydiphénique.

Ces tanins subissent facilement une hydrolyse acide et basique, ils s'hydrolysent sous l'action enzymatique et de l'eau chaude [37].

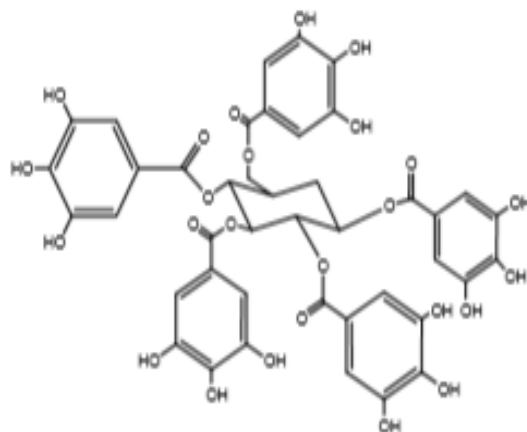


Figure 03 : Structure générale des tannins hydrolysables [52].

➤ **Les tanins condensés :**

Appelés aussi proanthocyanidines ou procyanidines, les tanins condensés, sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation auto oxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diol liées majoritairement par les liaisons C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> (parfois C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>) des unités adjacentes, et nommé ainsi proanthocyanidines de type B.

Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> et par une liaison d'éther additionnelle entre C<sub>2</sub> et C<sub>7</sub>, les proanthocyanidines sont dits de types A.

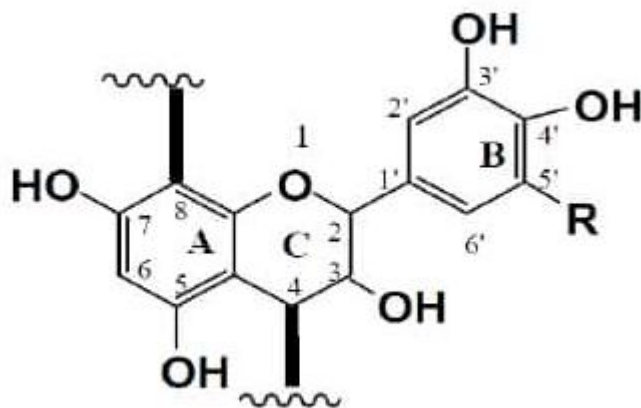


Figure 04 : Structure chimique de proanthocyanidine [53].

**I.2.2.2. Lignines :**

La lignine est une macromolécule tridimensionnelle hydrophobe de haut poids moléculaire, faisant partie des polyphénols, et qui est produite par toutes les plantes vasculaires ligneuses et herbacées.

Elle est le troisième polymère naturel le plus abondant, Dans la paroi cellulaire végétale, la lignine remplit les espaces entre la cellulose et les hémicelluloses, et agit comme une résine qui unit l'ensemble de la lignocellulose (biomasse lignocellulosique) [54].

**Partie 03 :**  
**Stress oxydatif**

### **I.3.1. définition :**

L'oxygène est indispensable à la vie des organismes aérobies où les mitochondries, "poumons" de la cellule, qui en utilisent la majeure partie comme substrat de la chaîne respiratoire pour la production de l'énergie sous forme d'ATP.

Ce métabolisme induit la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) en équilibre avec les systèmes antioxydants [55].

Le stress oxydant est défini comme étant le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination [56].

### **I.3.2. Radicaux libres :**

Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène. Ceci leur confère la dénomination d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) ou de l'azote (ERA ou RNS) [57].

### **I.3.3. Espèces réactives de l'oxygène :**

L'instabilité des espèces oxygénées réactives (**Tableau 2**) rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques. Leurs constantes de vitesse réactionnelle varient selon leurs natures. La durée de vie des espèces oxygénées réactives est extrêmement très courte de la nano à la milli seconde [58].

En effet, la toxicité des espèces oxygénées réactives n'est pas nécessairement corrélée avec leur réactivité, dans plusieurs cas des espèces peu réactives peuvent être à l'origine d'une grande toxicité en raison de leur demi. vie longue qui leur permet de se diffuser et gagner des locations sensibles où elles peuvent interagir et causer des dommages à longue distance de leurs sites de production [59].

**Tableau 02** : Les principales espèces ERO et ERA générées dans les systèmes biologiques [60].

Nom	Symbole
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot -}$
Radical hydroxyle	$OH^{\cdot}$
Monoxyde d'azote	$NO^{\cdot}$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$
Acide hypochlorique	$HOCl$
Oxygène singulet	$^1O_2$
Peroxynitrite	$ONOO^-$
Radical alcoxy	$RO^{\cdot}$
Radical peroxy	$ROO^{\cdot}$

### I.3.4. Principales cibles des espèces réactives de l'oxygène :

Les radicaux libres agissent en s'attaquant à une large gamme de molécules d'importance majeure parmi lesquelles on cite :

- **L'ADN** : c'est la principale cible des ERO, ces dernières sont capables d'apporter des modifications à la molécule d'ADN en altérant de cette manière sa structure et donc son intégrité [61].
- **Les protéines** : les acides aminés qui sont les plus réactifs avec les ERO, sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Ces interactions ont pour conséquences la formation de groupements carbonyles, des clivages des chaînes peptidiques et la formation de ponts bi-tyrosine intra et inter-chaînes. Ces modifications altèrent la fonction de la protéine (perte de son activité enzymatique ou non reconnaissance d'un site spécifique : récepteur ou ligand) [61].
- **Les lipides** : les acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée des radicaux libres car ils s'attaquent aux carbones situés entre deux doubles liaisons, en arrachant un hydrogène.

Cette étape, est la première d'un processus dit « la peroxydation lipidique », qui a des conséquences fâcheuses sur la cellule en altérant la fluidité de sa membrane lipidique la conduisant inévitablement à l'apoptose [61].

### I.3.5. Antioxydants :

Les antioxydants sont des composés qui peuvent inhiber ou retarder les dommages oxydatifs et protègent contre de nombreuses maladies [62].

Ce sont des molécules capables d'interagir avec les radicaux libres en empêchant la propagation des réactions en chaîne d'oxydation [63].

Les principaux antioxydants sont : la vitamine C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et les enzymes endogènes (superoxyde dismutase et la catalase).

Chez les individus en bonne santé, il existe un équilibre entre le système de défense antioxydant naturel et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par le corps, lorsque cet équilibre est perturbé, les ERO peuvent causer des lésions cellulaires et induire des dommages oxydatifs au niveau des protéines, lipides, ADN et ARN [64].

L'activité antioxydante multi-fonctionnelle des composés phénoliques est fortement liée aux cycles de phénols qui agissent en tant que piègeurs d'électrons, ils possèdent également des propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme des agents réducteurs et donateurs d'hydrogène [63].

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme dispose de deux sources d'antioxydants qui sont :

➤ **Antioxydants exogènes :**

Dont la présence est assurée par un apport nutritionnel sous forme de fruits et légumes riches en flavonoïdes, caroténoïdes, vitamines C et E et acide lipidique [61].

➤ **Antioxydants endogènes :**

Ceux-ci sont représentés par des enzymes, des protéines et des endonucléases présentes naturellement dans l'organisme [61].

- ✓ **Enzymatique :** Comme le superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx), la catalase et des endonucléases.
- ✓ **Non enzymatiques :** Protéines (ferritine, transferrine, céruloplasmine et albumine), en plus des oligo-éléments tels que le sélénium, le cuivre et le zinc qui jouent le rôle de cofacteurs d'enzymes à activité antioxydante [61].

# **Partie 04 :**

## **Méthode d'extraction**

### **I.4.1. Définition :**

L'extraction est une technique qui consiste à séparer sélectivement un ou plusieurs composés d'un mélange sur la base de ses ou de leurs propriétés chimiques et physiques.

Il existe ainsi différentes façons d'extraire les principes actifs d'une plante.

Nous distinguons ainsi :

#### **I.4.1.1. Extraction par solvant :**

➤ **La décoction :**

Décrite par **BASSENE et al [65]**, elle est utile lorsque l'on utilise les parties compactes, dures et ligneuses de la plante qui cèdent difficilement leurs principes actifs (racines, graines, écorces).

On place la racine ou l'écorce d'une plante dans de l'eau froide, le tout est porté à ébullition et les constituants se dissolvent dans l'eau.

La décoction dure de 2 à 10 min, dès le commencement de l'ébullition de l'eau, en fonction de la substance de la plante ou la concentration que l'on souhaite obtenir.

➤ **L'infusion :**

Ce type d'extraction est recommandé dans le cas où l'on utilise les parties fragiles, nobles de la plante telles que les fleurs, les feuilles, etc...

L'infusion consiste à recouvrir la partie dont on veut extraire le principe actif d'un solvant initialement bouillant, en générale de l'eau et de le laisser infuser quelques minutes.

Selon la plante que l'on utilise, le temps d'infusion peut varier car plus les feuilles sont fines, plus l'infusion est rapide.

Il est préconisé de couvrir l'infusion pour que les principes actifs ne s'évapore pas **[66]**.

➤ **La macération :**

Cette technique permet d'extraire lentement les principes actifs de plantes fragiles dont les températures élevées risqueraient de les altérer.

Elle consiste à verser de l'eau, de l'alcool ou de l'huile, tout dépend du but recherché, à température ambiante sur la substance végétale réduite en morceaux et broyés, et la laisser reposer quelques heures ou bien un ou plusieurs jours voir un mois, suivant les espèces concernées. Au cours de cette période, il y a lieu d'agiter de temps à autre le mélange. A la fin, on filtre soigneusement ce mélange, en pressant les végétaux macérés [67].

#### **I.4.1.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :**

Contrairement à l'hydrodistillation, l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. La vapeur d'eau fournie par une chaudière, traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille.

Le passage de la vapeur à travers le matériel végétal entraîne l'éclatement des cellules, libérant ainsi l'HE qui, sous l'action de la chaleur est vaporisée pour former un mélange « EAU + HE ».

Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique.

L'absence de contact directe entre l'eau et la matière végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évitent certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [68].

# **Chapitre II :**

## **Matériels et méthodes**

## II.1. Choix du matériel végétal :

La récolte de la plante *Urtica membranacea* a eu lieu en plein floraison au mois d'avril 2019, dans la région d'Azazga, à 30 km du l'est de la wilaya de Tizi Ouzou.

L'*Urtica membranacea* utilisée dans cette étude expérimentale, a été identifié par **Mr. Benganem Abdelkader Nabil**, Maitre-Assistant A au niveau de la faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

## II.2. Collecte du matériel végétal :

Le matériel végétal fraîchement collecté a été traité de la manière suivante :

### II.2.1. Lavage :

La plante *Urtica membranacea* a été lavée par l'eau de robinet pour éliminer les grosses particules (la poussière) présente dans cette plante récoltée, puis rincée à l'aide de l'eau distillée pour éviter la présence des impuretés.

### II.2.2. Séchage :

Le séchage de la matière végétale a été réalisé dans un endroit sec à l'air libre et à l'abri de la lumière pendant 15 jours (jusqu'à l'obtention d'une plante vraiment sèche).



**Figure05** : *Urtica membranacea* fraîche.



**Figure06** : *Urtica membranacea* sèche.

### II.2.3. Concassage et broyage :

Comme indiqué dans **la figure09**, le concassage de l'ortie, suivi par le broyage, a été fait à l'aide d'un broyeur pour diminuer la taille de la matière végétale a pour objectif d'élever la surface du contact avec le solvant utilisé.



**Figure07** : La partie aérienne de l'*Urtica membranacea* après broyage.

## II.3. Préparation des extraits par macération à froid :

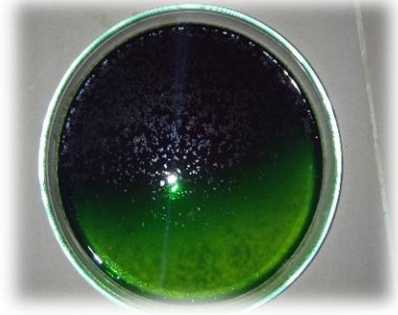
### II.3.1. Extraction des extraits bruts éthanologique et acétonique :

10 g de la poudre de la partie aérienne de la plante est placée dans un bécher contenant 200 ml du solvant adéquat (éthanol ou acétone) pendant 24 h sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique à température ambiante.

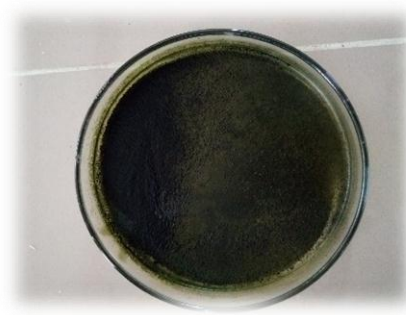
Après filtration à l'aide d'un papier filtre **Wattman N°01**, les solutions récupérées sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif de type **STUART RE300DB** à 60°C et à 40°C pour l'extrait éthanologique et acétonique respectivement.

Les extraits ont été récupérés dans des cristallisoirs couverts de papier aluminium est perforé pour assurer l'évaporation du solvant et éviter l'exposition à la lumière.

Après 03 jours de séchage à l'air libre et à l'abri de la lumière, les résidus ont été récupérés à l'aide d'une lame et conservés dans des Eppendorfs.



**Figure08** : extrait récupéré avant séchage.



**Figure09** : extrait récupéré après séchage.

### II.3.2. Extraction de l'extrait brut aqueux :

20 g de la poudre de la partie aérienne de la plante est placée dans un bécher contenant 500 ml d'eau distillée pendant 24 h sous agitation à l'aide d'un agitateur magnétique à température ambiante.

Après filtration à l'aide d'un papier filtre **Wattman N°01**, la solution récupérée a été centrifugée dans une centrifugeuse de type **SIGMA 2-16** à 4000 tr/min pendant 05 minutes.

Le surnageant est ensuite récupéré dans des cristallisoirs couverts de papier film et placé dans le congélateur à  $-45^{\circ}\text{C}$ .

Après 24h de congélation, l'extrait surgelé subit une sublimation de l'eau présente dans ce dernier à l'aide d'un lyophilisateur de type **CHRIST ALPHA 1-2**.

Après environ 07 heures, l'extrait sec est récupéré dans des flacons propres et stériles.



**Figure10** : lyophilisateur.



**Figure11** : centrifugeuse.

## II.4. Conservation des extraits :

Après avoir éliminé les solvants utilisés, on a obtenu des extraits secs.

Ces derniers ont été conservés dans un réfrigérant à température de +4°C et à l'abri de la lumière.

## II.5. Rendement :

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait obtenue et la masse de la matière végétale sèche initialement utilisée [69].

$$\text{RE (\%)} = (\text{ME} / \text{MS}) \times 100$$

**RE** : Rendement en extrait (%).

**ME** : Masse d'extrait récupérée exprimé en g.

**MS** : Masse de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

## II.6. Les tests phytochimiques :

Ces tests consistent à détecter les différents composés chimiques existant dans l'*Urtica membranacea* par des réactions qualitatives de caractérisation.

Ces réactions sont basées sur les phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques.

Ces dernières permettent de définir la présence ou non de quelques métabolites secondaires.

### ➤ Test pour les alcaloïdes :

10 ml d'une solution méthanolique de chaque extrait (éthanolique, acétonique et aqueux) a été chauffé jusqu'à évaporation totale du solvant. Le résidu obtenu a été dissout dans 1,5 ml de HCL à 2% puis 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer sont ajoutées à la solution obtenue.

La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes [70].

### ➤ Test pour l'amidon :

Traiter 5 ml d'une solution méthanolique de chaque extrait avec le réactif d'amidon.

L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon [70].

➤ **Test pour les composés réducteurs :**

Ajouter à 2 ml des solutions aqueuses de chaque extrait 5 à 8 gouttes de Liqueur de Fehling et chauffer la solution.

Un précipité rouge brique montre la présence des hydrates de carbones [70].

➤ **Test pour les saponosides :**

Les extraits secs ont été traités par de l'eau bouillante, refroidis puis agiter fortement jusqu'à formation d'une mousse.

Les mélanges obtenus sont laissés reposer pendant 20 minutes.

La présence ou l'absence des saponosides est notée par la mousse et son épaisseur, ou sa disparition après 20 minutes [70].

- Pas de mousse : test négatif.
- Mousse de 1 cm : test faiblement positif.
- Mousse de 1 à 2 cm : test positif.
- Mousse plus de 2 cm : test très positif.

➤ **Test pour les flavonoïdes :**

5 ml d'une solution méthanolique de chaque extrait ont été traité avec quelques gouttes de HCL concentré et 0.5 g de tournure de magnésium.

La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en espace de 3 minutes [70].

➤ **Test pour les tanins :**

2 ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  diluée ont été ajouté à 1ml d'une solution aqueuse de chaque extrait.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur bleu noir, verte ou bleu verte et un précipité, selon que les tanins sont catéchiques, galliques ou éllagiques [70].

➤ **Test pour les stérols et stéroïdes :**

10 ml d'une solution méthanolique de chaque extrait a été chauffé jusqu'à évaporation totale du solvant. Le résidu obtenu a été dissout dans 0.5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme et puis a été traité par le réactif de **Liebermann Burchardt**.

Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.

D'autre part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiens et triterpéniques respectivement des colorations bleue et verte violette [70].

## **II.7.Dosages des métabolites secondaires :**

### **II.7.1.Détermination du contenu phénolique total :**

La concentration en composés phénoliques dans l'extrait de la plante a été déterminée à l'aide de la méthode spectrophotométrique de Folin-Ciocalteu.

Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant 200 µl de chaque extrait dissout dans l'eau (à 5mg/ml pour les deux extraits éthanolique et acétonique et à 10 mg/ml pour l'extrait aqueux) avec 1ml de réactif de Folin- Ciocalteu (dilué dix fois) et 800 µl de carbonate de sodium (75mg/ml).

Le mélange a été incubé pendant 45 minutes et l'absorbance a été mesuré par rapport à un blanc, préparé dans les mêmes conditions que l'extrait et en remplaçant l'extrait par le solvant, à 760 nm.

La même procédure a été faite pour la substance standard (acide gallique) et la courbe d'étalonnage a été construite [71].

### **II.7.2.Détermination de la teneur totale en flavonoïdes :**

La teneur totale en flavonoïdes dans l'extrait de la partie aérienne de la plante a été déterminée à l'aide du dosage spectrophotométrique au chlorure d'aluminium.

La formation des complexes jaunâtres, lors de l'ajout du chlorure d'aluminium, est due à la fixation des ions  $Al^{3+}$  sur les atomes d'oxygène présents sur les atomes de carbone 4 et 5 des flavonoïdes [72].

1 ml de chaque extrait préparé dans le méthanol (à 0.2mg/ml pour les deux extraits acétonique et éthanolique et 5 mg/ml pour l'extrait aqueux) a été mélangé avec le même volume d'une solution méthanolique contenant 2% de trichlorure d'aluminium.

Après une incubation de 10 minutes, les absorbances des mélanges réactionnels ont été mesurées à 430 nm par rapport à une solution blanche, préparée dans les mêmes conditions que l'extrait et en remplaçant l'extrait par le solvant.

La même procédure a été faite pour la substance standard (Quercétine) et la courbe d'étalonnage a été construite [71].

### **II.7.3. Détermination de la teneur en flavonols :**

La teneur en flavonols a été déterminée selon la méthode de **KUMARAN** et **KARUNAKARAN** avec modifications mineures [73].

Chaque 1 ml d'extrait dissout dans le méthanol a été mélangé avec 1 ml de trichlorure d'aluminium (2%) et 1.5 ml d'acétate de sodium (50 g/L).

Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance a été lue à 440 nm.

La concentration a été calculée en mg d'équivalent quercétine par gramme d'extrait.

Une courbe d'étalonnage a été établie avec la quercétine dans les mêmes conditions opératoires que celle des essais.

### **II.7.4. Détermination de la teneur en tanins totaux :**

La teneur en tanins totaux a été déterminée selon la méthode de **HAGERMAN** et **BUTLER** :

500 µl de chaque extrait dissout dans l'eau à 10mg /ml est additionné à 1 ml d'une solution de BSA à 1 mg/ml préparé dans le tampon acétate (0,4M, pH=6).

Après incubation à l'abri de la lumière (24h à 4°C), le mélange est centrifugé à 3000 tr/min pendant 20 min.

Le précipité obtenu est dissout dans 2 ml de SDS/TEA (1%/5%), additionné de 500 µl de FeCl<sub>3</sub> dilué (voir annexe 03-A), dissous dans une solution d'HCl à 0,01M, puis incubé 15 min à l'obscurité.

L'absorbance est mesurée à 510 nm.

La même procédure a été adoptée pour la solution standard d'acide tannique avec un temps d'incubation de 15 min à 4°C et la courbe d'étalonnage a été construite [71].

### II.7.5. Détermination de la teneur en chlorophylles et en caroténoïdes :

Les chlorophylles « a » et « b » ainsi que les caroténoïdes sont des pigments colorés qui ont la capacité d'absorber la lumière dans le domaine UV-Visible et de donner plusieurs bandes d'absorbance :

- La chlorophylle « a » absorbe dans des longueurs d'ondes spécifiques l'une entre 350 nm -450 nm et l'autre entre 650 nm – 690 nm.
- La chlorophylle « b » présente une absorbance entre 400 nm – 480 nm et 620 nm – 670 nm.
- Les caroténoïdes ( $\beta$ -carotène) absorbent à 250 nm – 350 nm et à 400 nm – 500 nm [74].

Les teneurs en chlorophylles «a» et «b» et en caroténoïdes d'*Urtica membranacea* sont déterminées selon la méthode de **Hartmut et ses collaborateurs** [75] ; 400 $\mu$ g de chaque extrait pur sont additionnés à 10 ml d'éther diéthylique, le mélange est agité pendant 30 minutes à l'abri de la lumière.

Les extraits obtenus sont centrifugés à 5000 tr/min pendant 10 minutes. Enfin les surnageants sont récupérés. Ils ont fait l'objet d'une lecture à 644 nm, 662 nm et 470 nm.

Les teneurs sont exprimées en mg/g de matière sèche et elles sont calculées selon les équations suivantes :

- Teneur en Chlorophylle «a » ; (Chlo a,  $\mu$ g/ml) = (10,05.Abs<sub>662</sub> – 0,766.Abs<sub>644</sub>).
- Teneur en Chlorophylle «b » (Chlo b,  $\mu$ g/ml) = (16,37.Abs<sub>644</sub> – 3,14.Abs<sub>662</sub>).
- Teneur en Caroténoïdes (g/ml) = (1000.Abs<sub>470</sub> -1.28.Chlo a - 56,7.Chlo b)/230.

## II.8. Mesure de l'activité antioxydante :

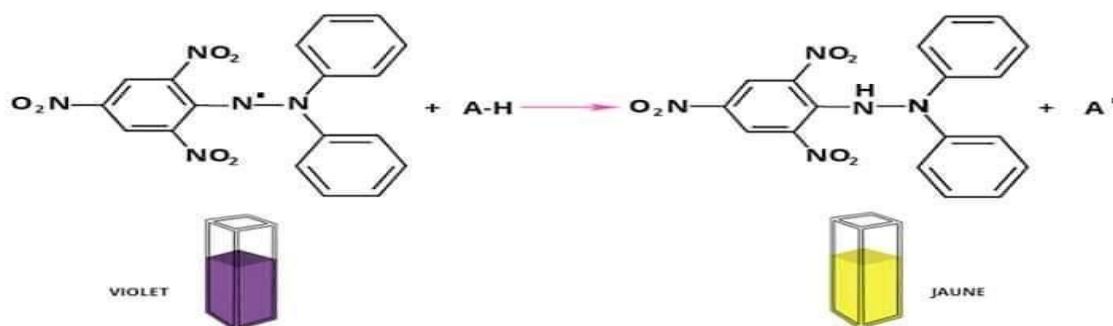
### II.8.1. Effet scavenger du radical DPPH :

La méthode de DPPH $\cdot$  est basée sur la mesure spectrophotométrique de changement de la concentration du radical DPPH résultant de la réaction de DPPH $\cdot$  avec un antioxydant.

Au cours de la réaction, les antioxydants (donneurs de protons) réagissent avec le DPPH $\cdot$ , qui sera réduit au DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) (**figure12**).

Par conséquence, la couleur de la solution change allant du violet (forme radicalaire) au jaune pâle (forme réduite) l'absorbance diminue, en passant de la forme radical DPPH $\cdot$  à la forme DPPH-H.

Le degré de décoloration indique le potentiel de l'activité antioxydante des extraits en termes de capacité de donneur d'hydrogène [76].



**Figure12** : réduction du DPPH par un antioxydant [77].

- **Mode opératoire :**

Un volume de 750  $\mu$ l de DPPH $\cdot$  (40  $\mu$ g/ml) est ajoutée à 250  $\mu$ l de chaque extrait méthanolique à différentes concentrations (0.5 ; 0.75 ; 01 ; 02 ; 03 ; 04 et 05 mg/ml).

Après 30 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

L'activité antioxydante est exprimée en pourcentage d'inhibition de radical DPPH $\cdot$ , et calculée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Abs Témoin} - \text{Abs échantillon})}{\text{Abs témoin}} \times 100.$$

D'où:

- Inhibition % : Pourcentage d'inhibition des radicaux libres.
- Abs Témoin : Absorbance du Témoin.
- Abs échantillon : Absorbance de l'échantillon.

La même procédure a été faite pour la solution standard de l'acide ascorbique [71].

### II.8.2. Pouvoir réducteur FRAP :

L'analyse du pouvoir réducteur est basée sur la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) du complexe ferricyanure ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ), en présence d'antioxydants réducteurs [78].

La forme réduite donne une couleur verte qui est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait [79].

Un volume de 1 ml de tampon phosphate et 1 ml de ferricyanure de potassium à 1% est additionné à un volume de 1 ml de chaque extrait dissout dans l'eau distillée à différentes concentrations (0.5 ; 01 ; 02 ; 03 ; 04 et 05 mg/ml).

Après incubation dans un bain marie à 50°C pendant 20 min, 1 ml de TCA à 10% est ajouté au mélange.

Après centrifugation à 3000 tr/min pendant 10 min, 1 ml de surnageant a été mélangé avec 1 ml d'eau distillée et 200  $\mu\text{l}$  de chlorure ferrique à 0.1%.

L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

La même procédure a été faite pour la substance standard (Acide ascorbique) et la courbe d'étalonnage a été construite.

## II.9. Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques :

### II.9.1. Spectrométrie Ultra-violet-Visible :

Le spectre d'absorption UV a été réalisé avec un spectrophotomètre de type SHIMADZU UV- 1601 à double faisceaux, piloté par un micro-ordinateur dans une cuve ou cellule en quartz d'un centimètre d'épaisseur.

L'absorption optique d'une substance en solution peut être obtenue par la loi de Beer-Lambert, qui s'exprime comme suit :

$$A = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Avec :

$I_0$  : intensité du faisceau incident

$I$  : intensité du faisceau transmis

$A$  : l'absorbance

$\epsilon$  : coefficient d'extinction molaire ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$C$  : concentration ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$L$  : épaisseur de la cellule (cm).

Pour nos extraits, nous avons préparé une solution méthanolique de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  pour chacun des extraits éthanolique et acétonique, et une solution de 0.5 $\text{mg}/\text{ml}$  pour l'extrait aqueux.

Par un balayage de différentes solutions du l'extrait dans le domaine de 190 à 900 nm, on a déterminé la longueur d'onde maximale d'absorption.



**Figure13** : spectrophotomètre UV-V.

### **II.9.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrométrie Ultra-violet :**

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de nos extraits obtenus par l'acétone, l'éthanol et l'eau distillée, a été réalisée avec un appareil **SHIMADZU SPD-20AV** couplé à un appareil UV de marque **SHIMADZU RF-10AXL**.

- **Principe :**

La chromatographie liquide à haute performance est une technique de séparation et d'analyse quantitative et qualitative des molécules, elle fait intervenir les différentes caractéristiques des molécules telles que la polarité, hydrophobicité, affinité... La séparation se fait selon un gradient adapté pour chaque type d'analyse.

- **Mode opératoire :**

La séparation des molécules phénoliques est basée sur leurs caractères hydrophobes/hydrophile. Pour cette raison on a utilisé une colonne C18. La phase mobile est constituée par deux solutions A et B, respectivement un mélange eau-acide formique 0.1 % et l'acétonitrile.

Le gradient utilisé est optimisé pour permettre une meilleure séparation des pics. Après plusieurs tentatives et essais suivant les protocoles décrits par la littérature et en se référant à plusieurs travaux antérieures, nous avons retenu le gradient suivant : un RUN commence par

une phase B à 4% pour une durée de 3.2 min, et se varie de 4% à 100 % pendant 28.8min puis atteint 100% à 34.4 min, demeure à 100 % pendant 2.4 min, atteint 4 % B pendant 1.6 min, pour boucler le cycle en passe à 4% B pendant 4 min [80].

- La détection est réalisée par un détecteur (UV) à 280 nm.
- Le débit de la phase mobile est 1ml /min.
- Le volume d'injection est 10  $\mu$ l.
- Température est 30 °C.



**Figure14** : appareil de la chromatographie liquide à haut performance (HPLC).

## **II.10. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudiés :**

Les tests antibactériens ont pour objectif de rechercher l'activité biologique de chaque extrait vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Ces tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de biochimie analytique et biotechnologies (LABAB) de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou en se basant sur la méthode des puits décrite par **Bag et ses collaborateurs [81]; Mansouri et ses collaborateurs [82]**.

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des trois extraits, nous avons adopté la méthode des puits.

### II.10.1. Nature, origine et conservation des souches :

L'activité antibactérienne des extraits étudiés a été testée sur une souche de bactéries qui est *Pseudo menas aeruginosa* (G-) de la famille des Pseudomonaceae.

La souche a été conservée à 4°C dans une boîte pétrie contenant 10 ml de milieu de conservation.

### II.10.2. Mise en évidence du pouvoir antibactérien des extraits étudiés :

#### II.10.2.1. Préparation de l'inoculum :

A partir de culture jeune de 18-24 h pour les bactéries sur le milieu gélosé adéquat, des suspensions bactériennes dans l'eau physiologique à 0.9% ont été réalisées à une concentration de  $10^7$  à  $10^8$  germes/ml.

Cette dernière est obtenue à l'aide d'un spectrophotomètre en mesurant la densité optique à 625 nm. Cette concentration correspond à une DO située entre 0,08-0,1.

#### II.10.2.2. Diffusion sur milieu gélosé :

- **Principe :**

La méthode de diffusion très utilisée en microbiologie, repose sur la diffusion du composé antibactérien en milieu solide. Cela consiste à mettre la substance inhibitrice dans un puit tracé sur la gélose inoculée par la souche cible au préalable.

La substance inhibitrice diffuse dans le milieu en provoquant un gradient de concentration décroissant autour du puit. Ainsi, la bactérie se développera si la concentration en antibiotique est inférieure à la concentration minimale inhibitrice ; ce qui se matérialisera par l'apparition d'une zone circulaire d'inhibition de la croissance bactérienne autour du puit, et, en fonction du diamètre d'inhibition, la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion, il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester [83 ; 84].

- **Procédure :**

L'activité antibactérienne des extraits de plantes étudiés a été déterminée par diffusion sur milieu gélosé, suivant le protocole décrit par **Bag et ses collaborateurs [81] ; Mansouri**

**et ses collaborateurs [82]** qui utilise 1 ml d'une suspension fraîchement préparée contenant  $5 \times 10^5$  UFC/ml de microorganismes à tester pour inoculer des boîtes de Pétri coulées avec 20 ml de gélose à 1% agar précédemment ensemercer.

L'ensemencement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile : introduire ce dernier dans la suspension bactérienne, l'essorer en le pressant fortement sur la paroi interne du tube (en le tournant) afin de le décharger au maximum. Puis frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas, en stries serrées. Répéter l'opération trois fois en tournant la boîte de  $60^\circ$ , et en pivotant l'écouvillon sur lui-même et enfin, finir l'ensemencement en tournant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Des puits de 06 mm de diamètre ont été tracés sur la gélose molle déjà inoculée avec les microorganismes à tester à une distance de 30 mm chacun.

### **II.10.2.3. Préparation des extraits et réalisation des tests :**

On prépare des solutions mères jusqu'à saturation dans un mélange de DMSO à 15% et le solvant d'extraction de départ.

Un volume de 100 $\mu$ l de chaque extrait a été mis dans les puits.

Un puit imprégné avec 100 $\mu$ l de gentamicine 10  $\mu$ g comme contrôle positif, et un autre avec 100 $\mu$ l de mélange (DMSO à 15% et le solvant d'extraction de départ) comme contrôle négatif.

Les boîtes de pétri ont été conservées à  $4^\circ\text{C}$  pendant 4h pour une pré-diffusion de l'extrait et ont été ensuite incubées à  $37^\circ\text{C}$  pendant 18h.

Les diamètres des zones d'inhibition (mm) sont mesurés, y compris le diamètre des puits [85].

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre  $< 8\text{mm}$ .
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre  $> 20$  mm.

## II.11. Essai de formulation :

Le but de cet essai, a été de préparer une formule pour des éventuels traitements contre les troubles sanitaires comme l'eczéma et les problèmes articulaires (l'arthrose), en associant l'extrait aqueux de la plante avec l'huile essentielle de romarin, afin d'améliorer l'efficacité et l'odeur de notre formulation.

### II.11.1.Extraction de l'huile essentielle de romarin par entrainement à la vapeur :

Les feuilles du romarin ont été récoltées au sein de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Ces dernières ont été lavées, bien séchées puis subit un entrainement à la vapeur afin d'extraire les molécules bioactives.

Un rendement de 0.64% a été noté.



Figure 15 : huile essentielle de romarin.

### II.11.2. Formule :

Composant	Quantité	Fonction
Extrait aqueux	1g	Substances actives
Huile de romarin	1g	Substances actives
Vaseline blanche	8g	Excipient

### II.11.3. Préparation :

L'extrait aqueux a été tamisé puis trituré avec l'huile essentielle de romarin jusqu'à obtention d'un mélange homogène.

La vaseline blanche a été ensuite progressivement ajoutée jusqu'à obtention d'une pommade homogène [86].

### II.11.3. Contrôle de la qualité de la formulation préparée :

#### ➤ Caractères macroscopiques :

L'observation de la couleur, la consistance et l'odeur de la pommade [86].

#### ➤ Caractère microscopique :

Nous avons vérifié l'homogénéité de notre formulation à l'aide d'un microscope de type **OPTIKA B-150** en l'étalant une quantité de cette dernière sur une lame.



**Figure16** : microscope optique.

#### ➤ Homogénéité :

Nous avons vérifié l'homogénéité de la pommade en l'étalant en couche mince sur une surface plane à l'aide d'une spatule. La répartition régulière ou non des composants (extrait et l'huile essentielle de romarin) dans l'excipient a été noté [86].

#### ➤ Mesure de pH :

Le pH a été déterminé en mesurant celui d'une dilution au dixième de notre pommade dans de l'eau distillée chaude [86].

# **Chapitre III :**

## **Résultats et discussions**

### III.1. Rendement des extraits :

Les résultats de rendement des extraits de l'*Urtica membranacea* obtenus sont mentionnés dans le tableau suivant :

**Tableau 03** : Rendement des extraits végétaux après l'évaporation des solvants.

Extraits végétaux	T° d'ébullition des solvants (°C)	Rendement de l'extrait (%)
Aqueux	100	9.56
Ethanolique	78.37	4.98
Acétonique	56	1.89

Les valeurs de rendement des extraits végétaux varient selon la nature du solvant et la quantité de matière sèche initialement utilisée.

### III.2. Tests phytochimiques :

Les tests phytochimiques effectués ont permis d'obtenir les résultats suivants :

**Tableau 04** : Résultats de l'analyse phytochimique des trois extraits d'*Urtica membranacea* étudié.

Extraits	Aqueux	Ethanolique	Acétonique
Familles des composés			
Alcaloïdes	+	-	-
Amidon	-	-	-
Composés réducteurs	+	-	-
Saponosides	-	-	-
Flavonoïdes	+	++	++
Tanins	-	+	++
Stérols et stéroïdes	-	-	-

(-) : Test négatif.

(+) : Test faiblement positif.

(++) : Test positif.

Les résultats des tests de caractérisation phytochimiques ont permis de mettre en évidence la présence des flavonoïdes pour les trois extraits aqueux, éthanolique et acétonique.

On a noté l'absence d'amidon, des saponosides ainsi les stérols et stéroïdes dans ces derniers.

En revanche, les alcaloïdes, les composés réducteurs sont révélés uniquement dans l'extrait aqueux, ainsi que les tanins dans l'extrait éthanolique et acétonique.

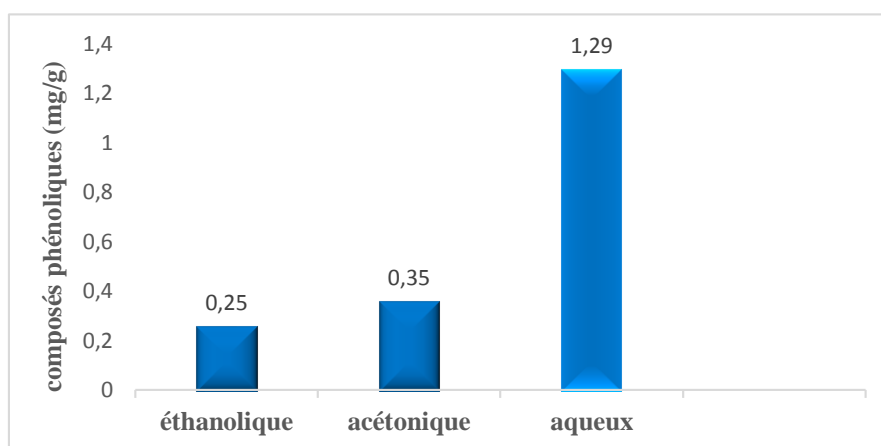
Une étude effectuée par **Daoudi et ses collaborateurs [87]** sur *Urtica membranacea* à confirmer la présence des flavonoïdes et des tanins galliques.

### III.3. Dosage des métabolites secondaires :

#### III.3.1 : Teneur en polyphénols totaux :

Dans notre travail, la teneur en polyphénols totaux des différents extraits a été déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu.

Les teneurs en composés phénoliques totaux des différents extraits sont représentées dans la figure 17 :



**Figure 17 :** Teneur en composés phénoliques des extraits d'*Urtica membranacea*.

La figure révèle que la teneur la plus élevée en composés phénoliques ( $1.29 \pm 0.02$  mg EAG/g M.S) est obtenue pour l'extrait aqueux, cependant, la teneur la plus faible en composés phénoliques ( $0.25 \pm 0.015$  mg EAG/g M.S) est notée pour l'extrait éthanolique.

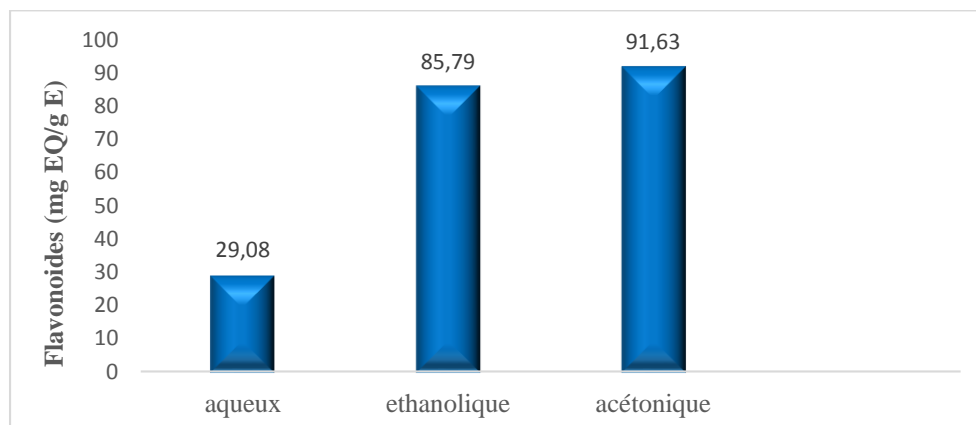
L'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de la partie aérienne de la plante présente l'ordre croissant suivant : eau distillée > acétone pure > éthanol pur.

L'étude menée par **Daoudi et ses collaborateurs [87]** a montré que l'extrait d'*Urtica membranacea* enregistre une valeur de  $0.049 \pm 0.09$  mg EAG/g MS.

Ces valeurs sont largement inférieures à celles obtenues dans cette étude. Ces différences peuvent être en relation avec la différence de la période et le lieu de récolte, le climat et les conditions géographiques [88].

### III.3.2. Teneur en flavonoïdes :

La teneur des extraits d'*Urtica membranacea* en flavonoïdes, varie d'une manière significative en fonction du solvant d'extraction utilisé.



**Figure 18 :** Effet du solvant d'extraction sur les flavonoïdes d'*Urtica membranacea*.

L'extrait acétonique est celui qui a révélé la plus haute teneur en flavonoïdes avec une valeur de  $91.63 \pm 0.81$  mg EQ/g E, s'ensuit l'extrait éthanolique avec une teneur de  $85.79 \pm 0.69$  mg EQ/g E, alors que la plus faible teneur a été révélée pour l'extrait aqueux avec une valeur de  $29.08 \pm 0.15$  mg EQ/g E.

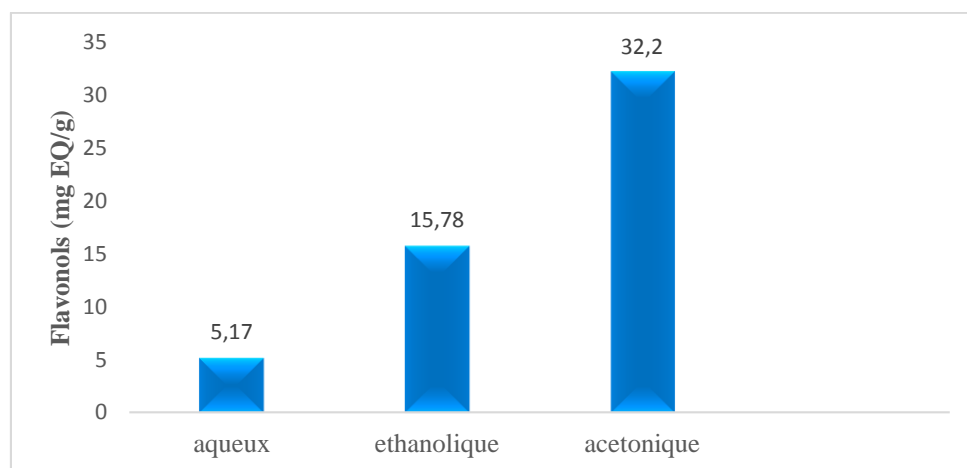
L'étude menée par **Daoudi et ses collaborateurs [87]** montre que l'extrait d'*Urtica membranacea* enregistre une valeur de  $0.002 \pm 0.0002$  mg EAG/g MS.

Cette valeur est largement inférieure à celle obtenue dans notre étude. Cette différence peut être expliquée par le fait que la méthode d'extraction ainsi que la région et la période de la récolte sont différentes.

Un second paramètre pourrait être à l'origine de la différence de la teneur en flavonoïdes, c'est leur solubilité. Selon **Bruneton [89]**, la solubilisation des flavonoïdes dépend de leur glycosylation, les hétérosides sont solubles dans l'eau et l'alcool ou le mélange, et d'autres ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faibles.

### III.3.3. Teneur en Flavonols :

La teneur en Flavonols des extraits d'*Urtica membranacea* a montré des différences en fonction du solvant d'extraction utilisé.

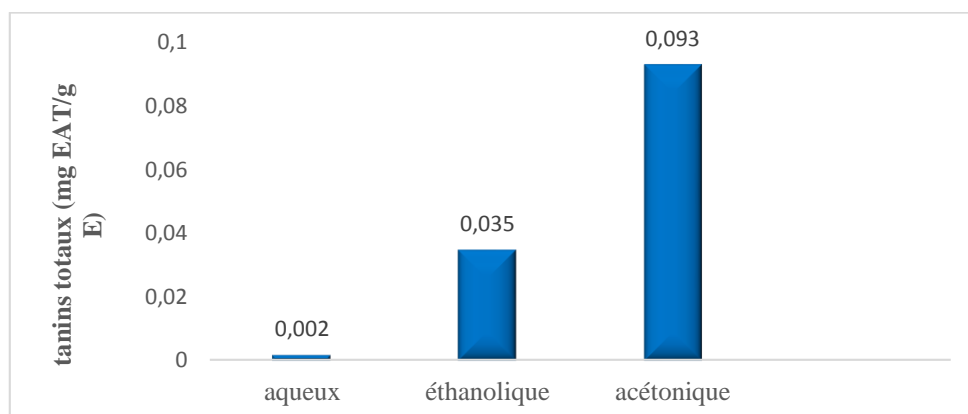


**Figure 19 :** Effet du solvant d'extraction sur la teneur en Flavonols d'*Urtica membranacea*.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait acétonique est riche en flavonols, par contre des teneurs faibles sont observées pour l'extrait aqueux et éthanolique.

#### III.3.4. Teneur en tanins totaux :

Les teneurs en tanins totaux des différents extraits sont représentées dans la figure 20 :



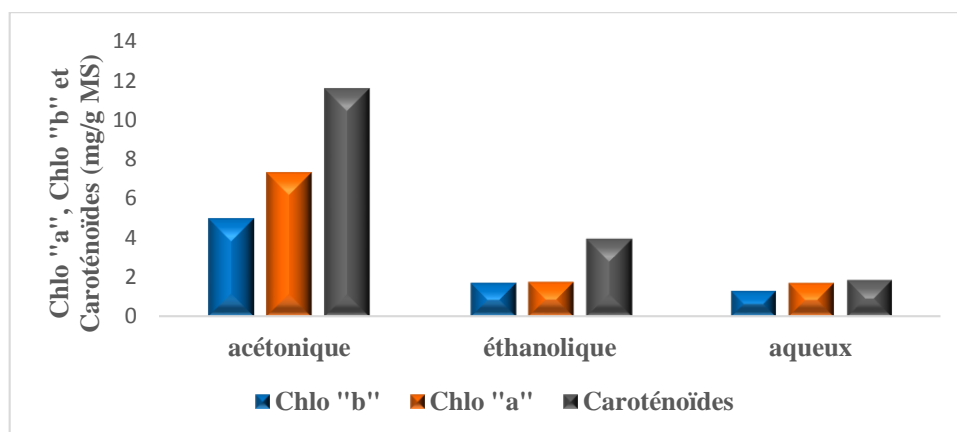
**Figure 20 :** Teneur en tanins totaux des extraits d'*Urtica membranacea*.

La figure révèle que la teneur la plus élevée en tanins totaux est obtenue avec l'extrait acétonique ( $0.093 \pm 0.045$  mg EAT/g E), cependant, les teneurs les plus faibles en tanins totaux sont obtenues pour l'extrait aqueux et éthanolique respectivement ( $0.002 \pm 0.001$  mg EAT/g E,  $0.035 \pm 0.0016$  mg EAT/g E).

Une étude menée par **Zemmouri.H [90]** montre que l'extrait aqueux et éthanolique d'*Urtica dioica* enregistre une valeur de  $1.05 \pm 0.34$  mg EC/g E et de  $6.67 \pm 0.69$  mg EC/g E respectivement.

Ces valeurs sont largement supérieures à celles obtenues dans notre étude. Cette différence peut être expliquée par le fait que la méthode d'extraction ainsi que la région et la période de la récolte sont différentes.

### III.3.5. Teneur en chlorophylles et en caroténoïdes :



**Figure 21 :** Teneur en chlorophylles et en caroténoïdes des extraits d'*Urtica membranacea*.

La figure révèle que les teneurs les plus élevées en chlorophylle « b », chlorophylle « a » et en caroténoïdes :  $4.930 \pm 0.841$  ;  $7.271 \pm 0.920$  et  $11.554 \pm 1.130$  mg/g M.S respectivement, sont obtenus pour l'extrait acétonique.

Les deux extraits éthanolique et aqueux possèdent des teneurs proches en chlorophylle « a » et « b », tandis que la teneur en caroténoïdes est plus élevée pour l'extrait éthanolique  $3.969 \pm 0.782$  mg/g MS.

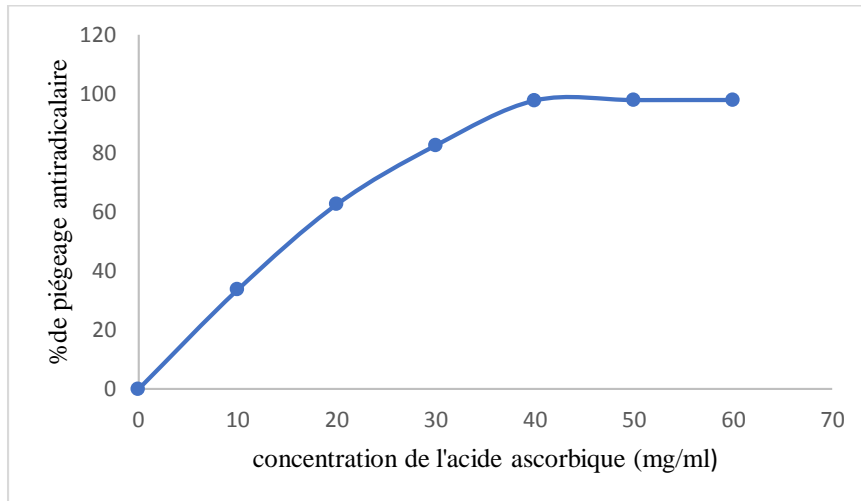
## III.4. Mesure de l'activité antioxydante :

### III.4.1. Effet scavenger du radical DPPH :

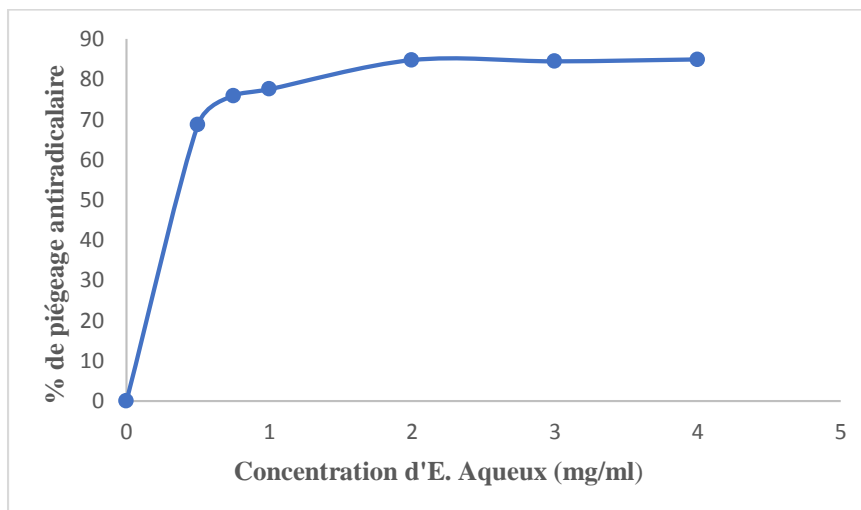
L'inhibition du DPPH radicalaire a été évaluée pour l'extrait éthanolique, acétonique et aqueux de la plante ainsi que pour le témoin positif : acide ascorbique.

L'activité antioxydante des extraits indique leurs capacités à céder des atomes d'hydrogène. Ainsi, une valeur faible d' $IC_{50}$  indique une activité antioxydante forte.

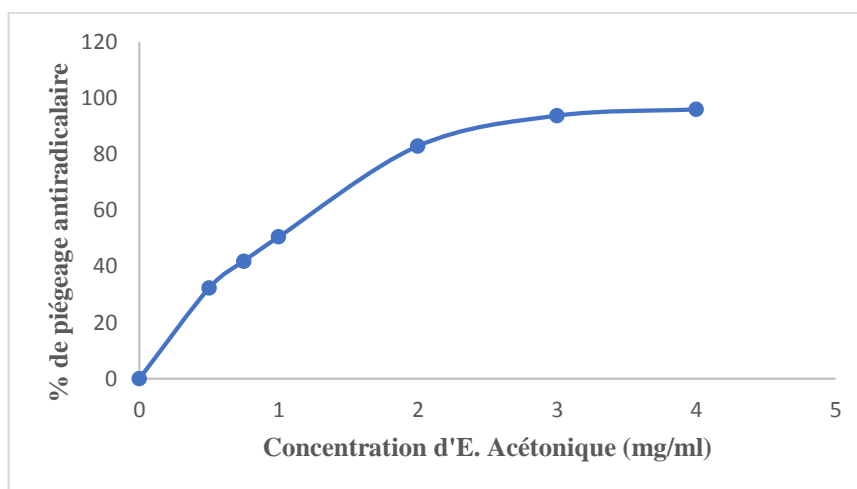
Le pourcentage d'inhibition (% I) pour chaque échantillon a été calculé. Les essais ont été réalisés en triplicata et les résultats sont exprimés en valeur d' $IC_{50} \pm SE$  (Ecart standard).



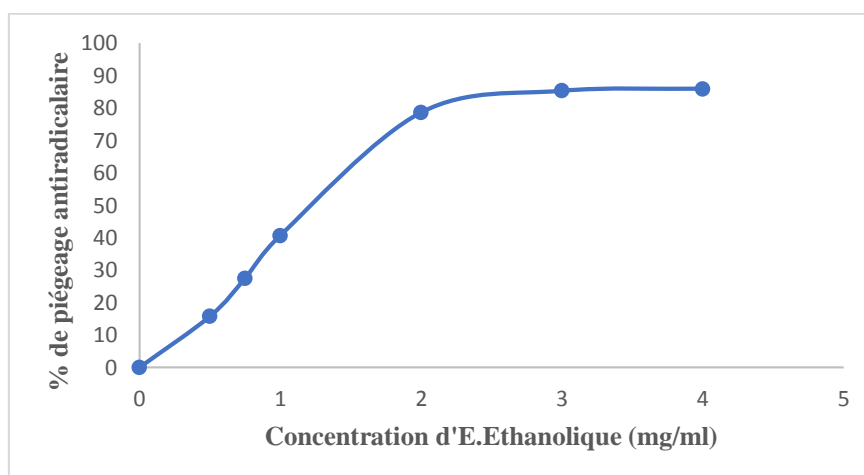
**Figure 22 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.



**Figure 23 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait aqueux.



**Figure 24 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait acétonique.



**Figure 25 :** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH• en fonction des différentes concentrations de l'extrait éthanolique.

La concentration de l'échantillon nécessaire pour inhiber 50% du DPPH radicalaire a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations d'échantillons préparés.

**Tableau 05 :** Activités antioxydantes des extraits de plantes, mesurées par la méthode DPPH et exprimées en IC<sub>50</sub>.

Echantillons	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Acide ascorbique	17.8
Extrait aqueux	490
Extrait acétonique	1200
Extrait éthanolique	1490

La comparaison des  $IC_{50}$  par rapport au témoin positif montre que l'extrait aqueux possède la plus forte activité antioxydante (490  $\mu\text{g/ml}$ ), suivi par l'extrait acétonique (1200  $\mu\text{g/ml}$ ).

Enfin, la plus faible activité est enregistrée pour l'extrait éthanolique (1490  $\mu\text{g/ml}$ ).

L'étude menée par **Zemmouri. H [90]** sur l'extrait éthanolique et aqueux d'*Urtica dioica* a révélé une bonne efficacité antioxydante traduite par une  $IC_{50}$  de l'ordre de  $95,21 \pm 1,71$  et  $152,34 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$  respectivement.

Ces valeurs sont largement inférieures à celle obtenue dans notre étude, ce qui implique que la  $IC_{50}$  de nos extraits est supérieure à celle menée dans cette étude.

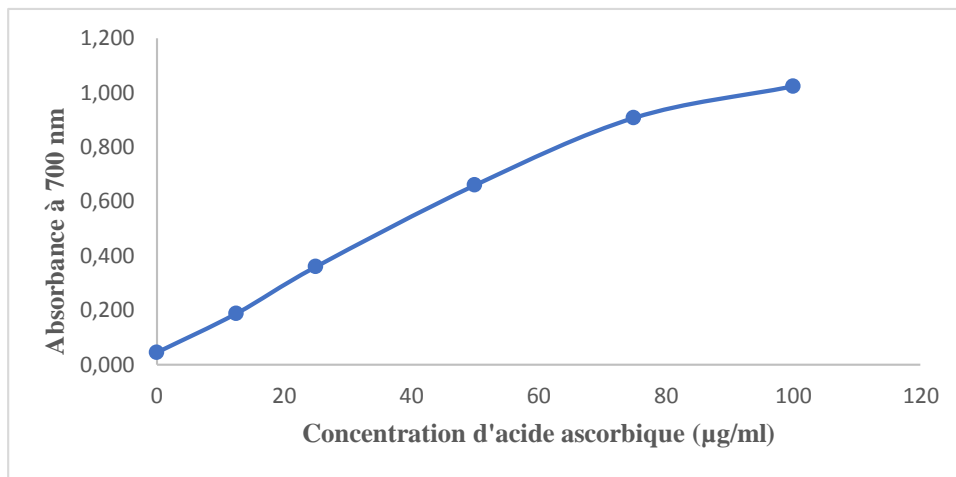
Comparées à l'antioxydant de référence, l'extrait éthanolique a été 83.7 fois moins efficace, l'extrait acétonique 67.4 fois moins efficace, et l'extrait aqueux a été 27.5 fois moins efficace.

**Sidaoui et ses collaborateurs [91]** ont attribué la bonne efficacité antioxydante des extraits d'ortie à leurs fortes teneurs en polyphénols et flavonoïdes et que les groupes hydroxyles des composés phénoliques dont la structure chimique peut fournir les composés nécessaires pour piéger les radicaux libres.

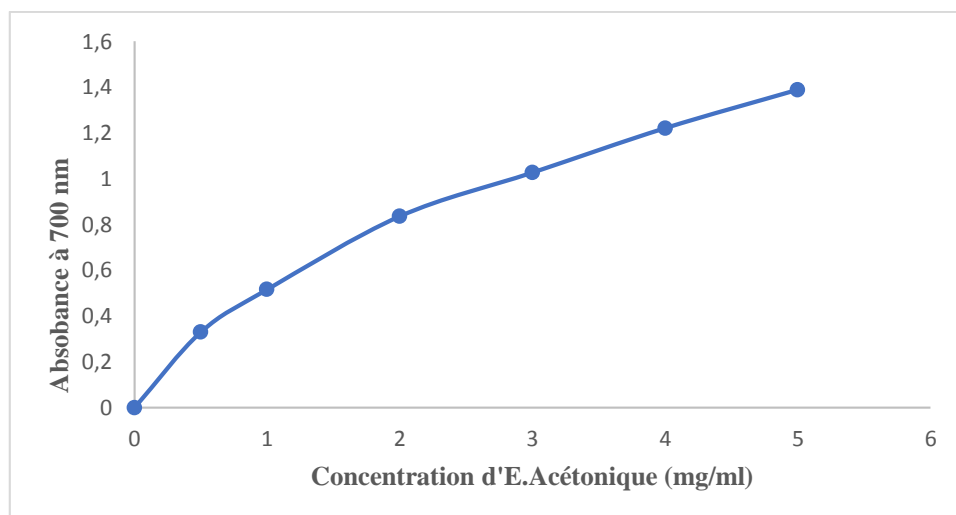
#### **III.4.2. Pouvoir réducteur FRAP :**

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter. Cette méthode est basée sur la capacité des flavonoïdes à réduire le fer ferrique  $\text{Fe}^{3+}$  en fer ferreux  $\text{Fe}^{2+}$ . La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants [92].

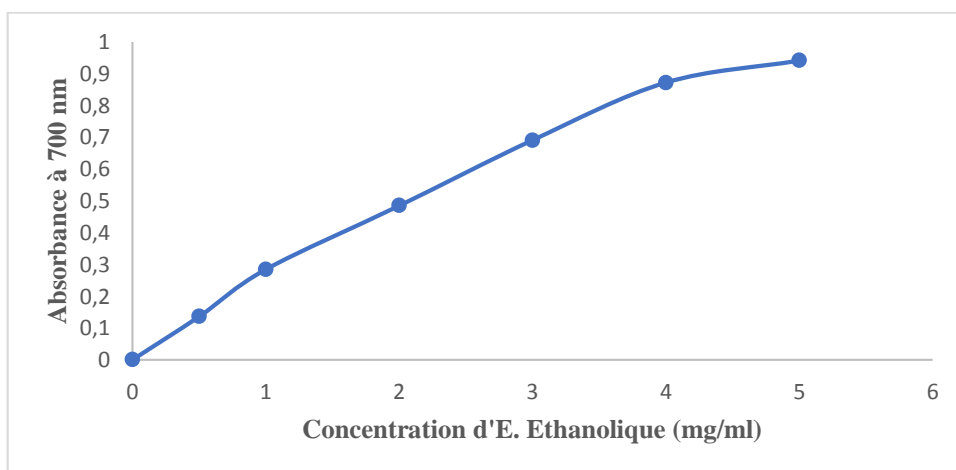
Les figures 26, 27 et 28 montrent que l'extrait acétonique et éthanolique d'*Urtica membranacea* exerce une activité réductrice, mais inférieure à celle du témoin positif (acide ascorbique).



**Figure 26 :** pouvoir réducteur d'acide ascorbique.



**Figure 27 :** pouvoir réducteur d'extrait acétonique.



**Figure 28 :** pouvoir réducteur d'extrait éthanolique.

Les concentrations des échantillons nécessaires pour réduire 50% de fer sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau 06 :** Activités antioxydantes des extraits de plantes, mesurées par la méthode FRAP et exprimées en IC<sub>50</sub>.

Echantillon	IC <sub>50</sub> (µg/ml)
Acide ascorbique.	41.92
Extrait acétonique.	1960
Extrait éthanolique.	2120
Extrait aqueux.	/

La comparaison des IC<sub>50</sub> par rapport au témoin positif montre que l'extrait acétonique possède le pouvoir réducteur le plus élevé (1960 µg/ml), suivi par l'extrait éthanolique (2120 µg/ml).

Par contre, l'extrait aqueux ne possède pas du pouvoir réducteur à faible concentration. Et ceci est justifié par sa faible teneur en flavonoïdes.

Comparés à l'antioxydant de référence, l'extrait acétonique a été 46.7 fois moins efficace et l'extrait éthanolique 50.6 fois moins efficace.

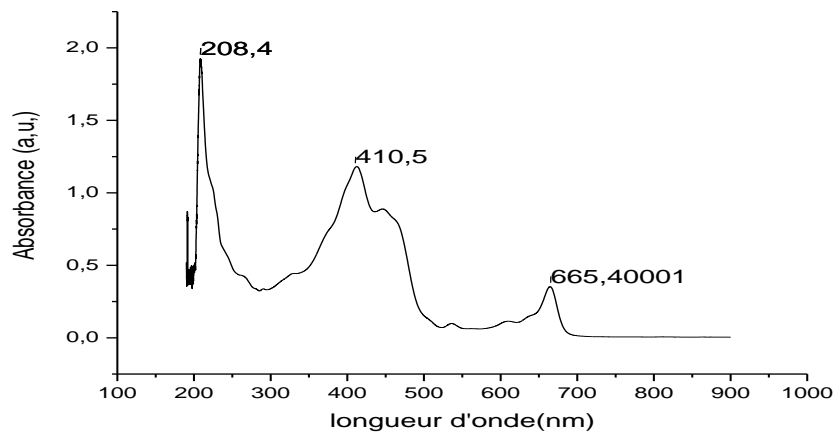
Les études de **Chang et ses collaborateurs [93]** et **Halliwell [94]** sur l'extrait aqueux de l'ortie ont montré une capacité de chélation du Fer de 92% à une concentration de 250 mg de l'extrait.

### **III.5. Identification des constituants des extraits par des méthodes analytiques :**

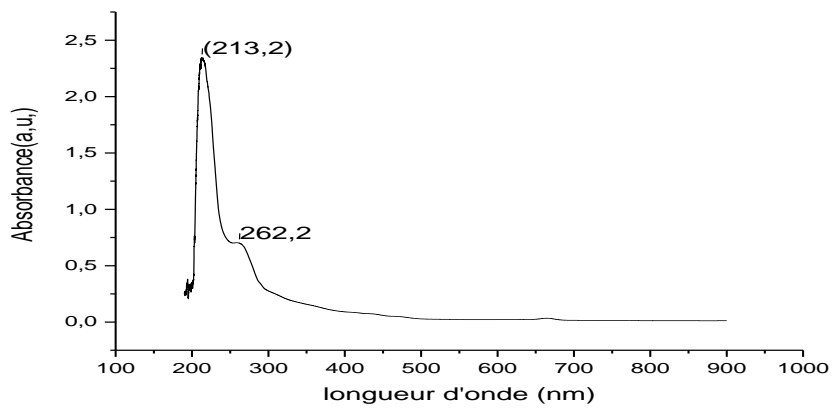
#### **III.5.1. Analyse par spectrométrie UV-Visible :**

L'examen par spectrométrie UV-Visibles de nos extraits indique la présence de divers composés organiques.

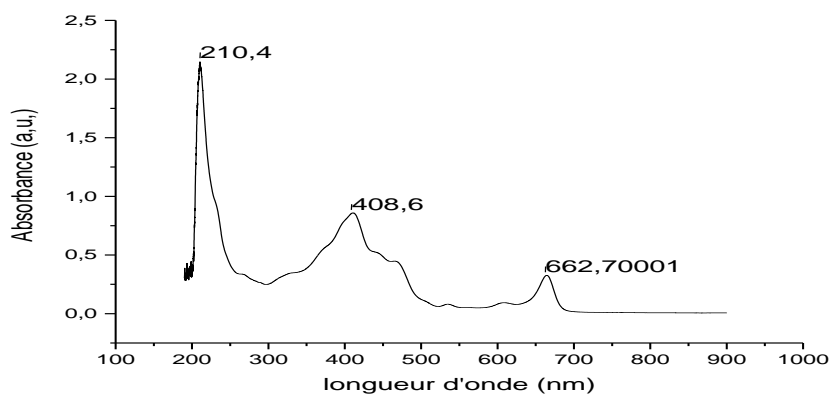
Les résultats sont regroupés dans les figures 29,30 et 31.



**Figure 29 :** spectre UV-V de l'extrait acétonique.



**Figure 30 :** spectre UV-V de l'extrait aqueux.



**Figure 31 :** spectre UV-V de l'extrait éthanolique.

Le spectre UV-V de l'extrait acétonique révèle la présence de l'acide coumarique à 208.4 nm ainsi que la chlorophylle « a » à 410.5 jusqu'à 665.4 nm.

Tandis que l'extrait aqueux révèle la présence des aldéhydes et cétone conjugués  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturée à 213.2 nm ainsi que l'isoquercétine à 262.2 nm.

Enfin l'extrait éthanolique révèle la présence de  $\beta$ -sitostérol à 210.4nm ainsi que la chlorophylle « a » à 408.6 jusqu'à 662.7 nm.

### III.5.2. Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la spectrométrie Ultra-Violet :

Les tableaux 07 et 08 regroupent les différents temps de rétentions des standards et des extraits respectivement.

**Tableau 07 :** Temps de rétention des standards.

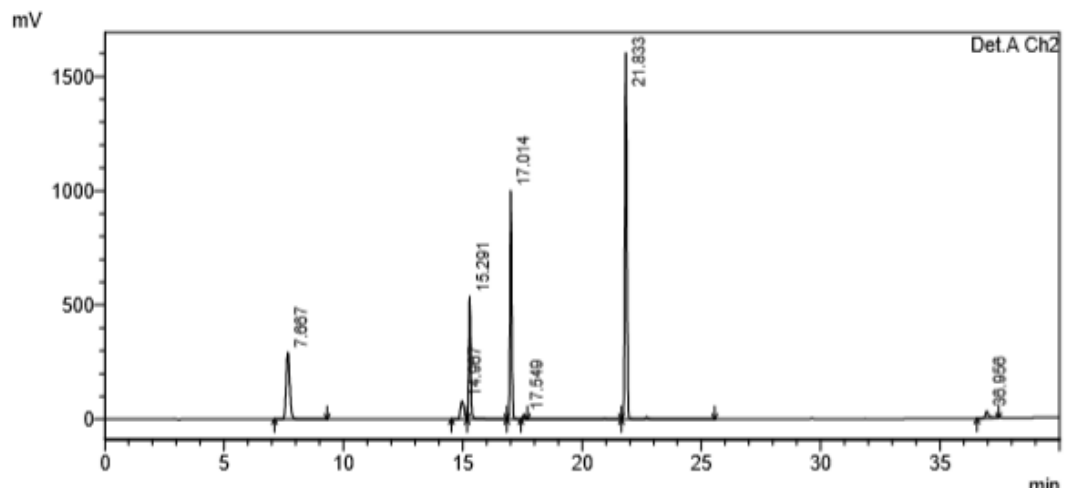
Standards	Temps de rétention (min)
Acide caféique	15.18
Acide coumarique	16.92
Acide cinnamique	21.73
Acide gallique	12.16

**Tableau 08 :** Temps de rétention des différents extraits de la plante.

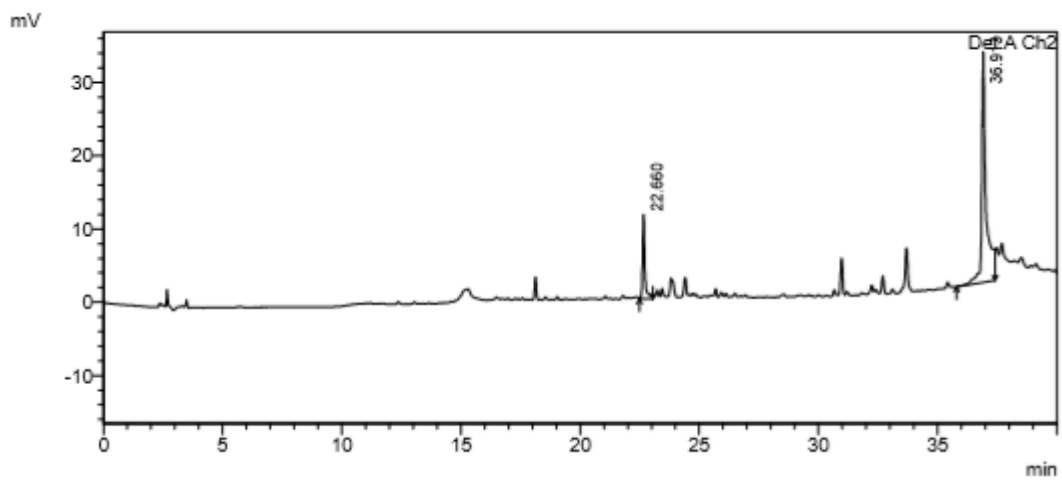
Extraits	Temps de rétention.	
	Pic 1	Pic 2
Extrait acétonique	22.660	36.913
Extrait aqueux	22.619	36.847
Extrait éthanolique	22.663	36.916

D'après les chromatogrammes HPLC obtenus, on constate que les extraits végétaux contiennent un acide phénolique : acide cinnamique, qui correspond au 1<sup>er</sup> pic.

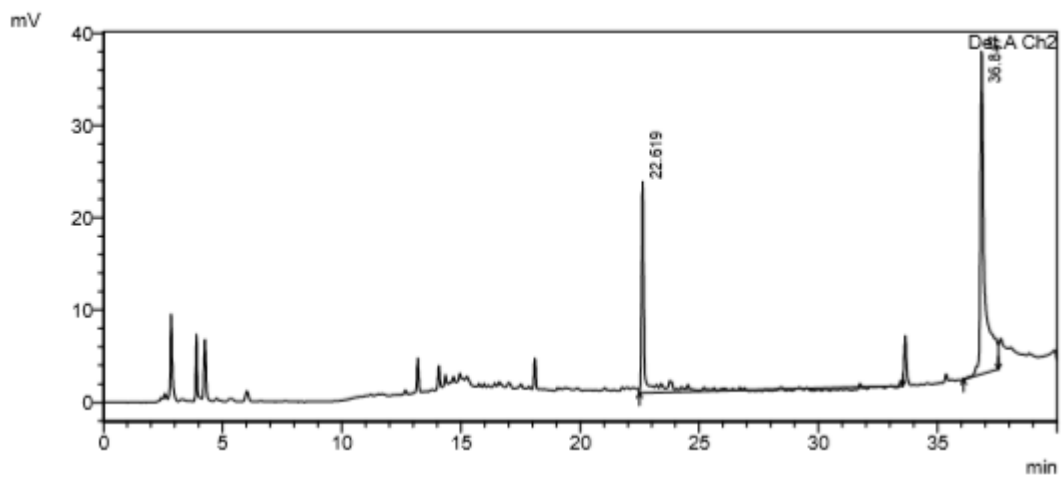
Les figures 32,33, 34 et 35 représentent les chromatogrammes HPLC des standards et des extraits végétaux à 280 nm.



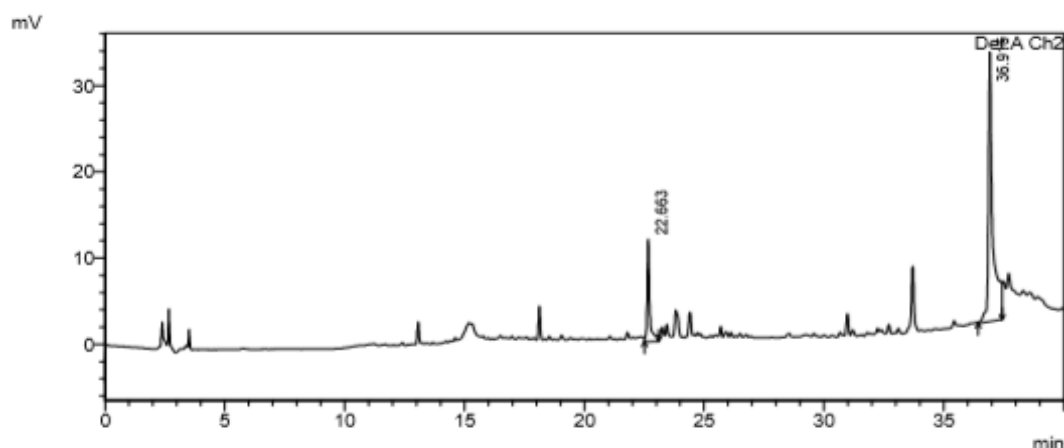
**Figure 32 :** Chromatogramme HPLC des standards à 280 nm .



**Figure 33:** Chromatogramme HPLC de l' extrait acétonique à 280 nm.



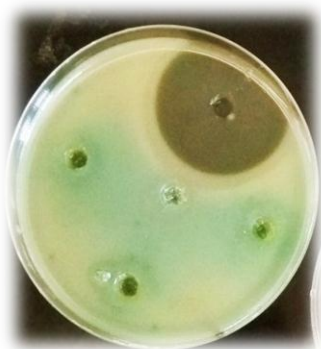
**Figure 34 :** Chromatogramme HPLC de l'extrait aqueux à 280 nm.



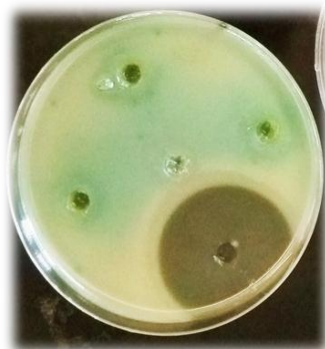
**Figure 35 :** Chromatogramme HPLC de l'extrait éthanolique à 280 nm.

### III.6. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits étudiés :

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne de nos extraits de l'*Urtica membranacea* faite sur une bactérie pathogène du laboratoire LABAB de la faculté des Sciences Biologiques et Agronomiques de l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou a été réalisée par la méthode des aromagrammes. Le pouvoir antibactérien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).



**Figure 36 :** Aromatogramme de l'extrait aqueux.



**Figure 37 :** Aromatogramme de l'extrait acétonique.



**Figure 38 :** Aromatogramme de l'extrait éthanolique.

**Tableau 09 :** Diamètres de la zone d'inhibition des extraits.

Extrait	Concentration (mg/ml)	Diamètre (mm)
Ethanolique	66.7	10.2±0.47
Acétonique	25	/
Aqueux	66.7	/

Les résultats de l'antibiogramme montrent que l'extrait éthanolique de l'*Urtica membranacea* possède une activité antibactérienne légèrement inhibitrice sur la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*, mais les deux extraits acétonique et aqueux n'ont pas un pouvoir antibactérien sur la même souche.

Selon **Albayrak et ses collaborateurs [95]**, l'extrait méthanolique a exercé un effet inhibiteur qui s'est traduit par des zones d'inhibitions de l'ordre de 8 mm vis-à-vis de *Bacillus cereus*, *Morganellamorganii* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Une autre étude menée par **Gülcin et ses collaborateurs [96]** a également montré une résistance de *P.aeruginosa* ATCC 9027 vis-à-vis de l'extrait aqueux des feuilles d'*Urtica dioica* par contre *E.coli* a été sensible à cet extrait.

Pour de nombreuses plantes, en fonction de la date de la récolte il aura des variations très importantes dans la composition chimique et donc dans l'efficacité biologique [97].

Enfin, l'activité antibactérienne est dépendante des caractères physico-chimiques des composés phytobiotiques et des souches employées [98].

**Kalemba et Kunicka [99]** ont établi la corrélation entre la composition chimique et l'activité antibactérienne, et ont classé les molécules chimiques selon leur importance du point de vue activités biologiques comme suit : phénols, alcools, aldéhydes, cétones, éther et hydrocarbures.

### III.7. Essai de formulation :

Nous avons préparé une pommade à base d'extrait aqueux et l'huile essentielle du Romarin en utilisant la vaseline blanche comme excipient.

La couleur, l'odeur, l'homogénéité et le pH ont servi comme élément de contrôle pour notre formulation.

#### ➤ caractères macroscopiques :

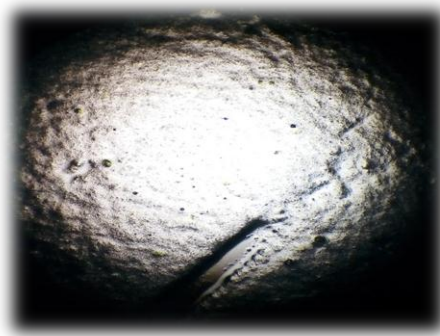
La pommade préparée à une couleur verte clair, une consistance onctueuse et présente l'odeur de l'huile essentielle du romarin.



**Figure 39 :** pommade préparée.

➤ **Caractère microscopique :**

L'examen microscopique de la pommade préparée confirme la répartition homogène des particules.



**Figure 40 :** Pommade sous microscope ordinaire.

➤ **Homogénéité :**

La répartition des particules est homogène à l'échelle macroscopique et microscopique.

➤ **La stabilité :**

La pommade conservée à la température du laboratoire est stable, mais à une température supérieure à 40°C, elle commence à fondre.

➤ **Mesure de pH :**

La valeur de pH pour notre pommade est de 5.1.

D'après la valeur obtenue, on constate que la pommade préparée présente un pH proche de celui recommandé pour les pommades dermiques (4,2 – 5,8) [100].

# CONCLUSION

Les plantes médicinales resteront toujours une source fiable de principes actifs d'intérêt thérapeutique. Face à la phobie des molécules de synthèse chimique, leur utilisation est en progression constante.

Parmi ces plantes, on cite *Urtica membranacea* qui appartient à la famille des Urticaceae et qui reste parmi les plus utilisées dans la médecine traditionnelle.

Pour cela l'objectif assigné à cette étude est de doser quelques composés phénoliques dont les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les flavonols et les tanins totaux, ainsi que quelques pigments colorés dont on cite les caroténoïdes et les chlorophylles afin d'étudier les activités antioxydantes et antibactériennes des extraits d'*Urtica membranacea*.

Dans un premier volet de ce travail, nous avons procédé à l'extraction des molécules bioactives par la méthode de macération à froid en utilisant différents solvants d'extraction : acétone, éthanol et l'eau distillée.

Les rendements les plus élevés sont de l'ordre de 9.56% pour l'extrait aqueux, 4.98% pour l'extrait éthanolique et enfin 1.89% pour l'extrait acétonique.

Après le criblage phytochimique, nous avons pu mettre en évidence la présence des tanins gallique et des flavonoïdes pour les deux extraits acétonique et éthanolique, ainsi que la présence des alcaloïdes, des composés réducteurs et flavonoïdes pour l'extrait aqueux.

Dans un deuxième volet, nous avons mis en évidence et évalué quelques propriétés biologiques de ces extraits.

Les études menées sur les extraits de cette plante, ont révélées que les plus fortes teneurs en polyphénols totaux ont été enregistrées pour l'extrait aqueux, alors que l'extrait acétonique a révélé une plus forte teneur en flavonoïdes, flavonols et en tanins totaux. La plus haute teneur en chlorophylles et en caroténoïdes a été enregistrée avec l'extrait éthanolique. Par contre la plus faible teneur en polyphénols totaux a été révélée par l'extrait éthanolique. Alors que l'extrait aqueux a révélé la plus faible teneur en flavonoïdes, flavonols, tanins totaux ainsi qu'en chlorophylles et caroténoïdes.

Les résultats de la présente étude, ont montré que les extraits d'*Urtica membranacea* ont une activité antioxydante qui varie toujours en fonction du solvant d'extraction et de la concentration.

Les extraits d'*Urtica membranacea* ont exercé une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical DPPH, ainsi qu'une activité réductrice du fer a été exercé par les extraits organiques alors que l'extrait aqueux ne la possède pas à faible concentration.

L'analyse par UV-V et HPLC a mis en évidence la présence de divers composés des extraits.

Les résultats des tests antibactériens ont démontré que les extraits organiques de la plante *Urtica membranacea* possèdent une action inhibitrice vis-à-vis de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-).

Dans un troisième volet, nous avons mis au point une formulation dermique à base de l'extrait aqueux de cette plante.

Les tests de contrôle effectués sur la pommade formulée à base de l'extrait d'*Urtica membranacea* et l'huile essentielle du romarin montrent qu'elle est homogène et stable. De plus elle présente un pH proche de celui recommandé par la pharmacopée pour les pommades dermiques (4.2 -5.8).

Les résultats présentés dans ce modeste travail ne constituent qu'une étape préliminaire dans l'exploitation de substances naturelles à des fins thérapeutiques.

L'évaluation de la composition chimique des différents extraits en recours à l'IR, la CL-SM ou à la RMN aurait pu nous fournir des données supplémentaires sur la nature des composés actifs présents dans les différents extraits étudiés.

Toutefois, il serait intéressant d'approfondir l'étude de l'activité antibactérienne en envisageant d'autres souches et en évaluant la concentration minimale inhibitrice (CMI) en chacun des extraits étudiés pour l'*Urtica membranacea*.

# **Références bibliographiques**

- [1] : **Bertrand B., Jeanne A., 2008.** Les secrets de l'Ortie. 10<sup>ème</sup> Ed. Du Terran. pp 45-95.
- [2] : **Bézanger-beauquesne L., Pinkas M., Torck M. et Trotin F., 1980.** Plante médicinales des régions tempérées.
- [3] : **Bertrand B. ; Jeanne A., 2000.** Saveurs d'ortie, légume de demain. 2<sup>ème</sup> Ed. Editions de Terran pp 61-97.
- [4]: **Keith G., Wheeler R., 2005.** A Natural History of Nettles. ISBN 1-4120-2694-6.
- [5]: **Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D.** Herbal Medicines: a guide for healthcare professionals. 2<sup>nd</sup> edition Londres. Pharmaceutical Press. 2002. pp 530.
- [6] : **Julve Ph., 2017.** Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Tella botanica. *Urtica Membranacea*.
- [7] : **Beloued A., 2001.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger. pp 124.
- [8] : [www.maltawildplants.com /Urtica\\_membranacea](http://www.maltawildplants.com/Urtica_membranacea).
- [9]: [www.conservation-nature.fr/Urtica membranacea](http://www.conservation-nature.fr/Urtica_membranacea).
- [10] : **Cox., Paul A., Michel J., Balick., 1994.** The Ethnobotanical Approach to drug Discovery. *Scientific America*. pp 82-87.
- [11]: **Wetherlit H., 1992.** Evaluation of *Urtica* species as potential sources of important nutrients. *Dev Food Sci*. 29. pp 15- 25.
- [12]: **Rafajlovska V., Rizova V., Djarmati Z., Tsevic V., Cvetkovi L., 2001.** Contents of fatty acids in stinging nettle extract (*Urtica dioica* L.). Obtained with super critical carbon dioxide. *Acta farm.* 51. pp 45- 51.
- [13]: **Krystofova O., Adam V., Babula P., Zehnalek J., Beklova M., Havel L., Kizek R., 2010.** Effects of various doses of selenite on stinging nettle (*Urtica dioica* L.). *International journal of environmental research and public health*, 7(10): 3804 - 3815.
- [14] : **Gül S., Demirci B., Başer K. H. C., Akpulat H. A., et Aksu P., 2012.** Chemical composition and in vitro cytotoxic, genotoxic effects of essential oil from *Urtica dioica* L. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(5): 666-671.
- [15]: **Bhuwan C. J., Minky M., Sushmita S., 2015.** Antioxydant potential and total phenolic contents of *Urtica dioica* whole plant (7). Issue 2: 120-128.
- [16]: **Collier H., Chesher G.B.** Identification of 5-hydroxy tryptamine in the stinging nettle (*Urtica dioica*). *Pharmacology/chemotherapy*. 186-9.
- [17]: **Fu H.Y., Chen, S.J., Chen R.F., Ding W.H., Kuo- Huang L.L., Huang N., 2006.** Identification of oxalic acid and tartaric acid as major persistent pain inducing toxins in the stinging hair of the nettle extract (*Urtica thumbergiana*) *Ann Bot*. 98: 57- 65.
- [18]: **Hoffman D. (2006):** Medical Herbalism. Rochester (VT). Healing Arts Press.
- [19]: **Legssyer A., Ziyat A., Mekhfi H., Bnouham M., Tahri A., Serhrouchni M., 2002.** Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. in isolated rat heart and aorta. *Phytother. Res*. 16. pp 503–507.

- [20] : **Tahri A., Yamani S. Legssyer A. et al. 2000.** Acute diuretic, natriuretic and hypotensive effects of a continuous perfusion of aqueous extract of *Urtica Dioica* in the rat. *J Ethnopharmacology*. (73): 95-100.
- [21]: **Yener Za., Celik I., Ilhan F., Bal R., 2008.** Effects of *Urtica Dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* (47): 418–424.
- [22]: **El Haouari M., Bnouham M., Bendahou M., Aziz M., Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H, 2006.** Inhibition of rat platelet aggregation by *Urtica dioica* leaves extracts. *Phytother. Res.* 20: 568–572.
- [23]: **Roschek B. Jr., Fink RC., Mc Michael M. Alberte RS., 2009.** Nette extract (*Urtica Dioica*) affects key receptors and enzymes associated with allergic rhinitis. *Phytother. Res.* 23(7): 920-926.
- [24]: **Akbay P., Basaran A.A., Undeger U., Basaran N., 2003.** In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother. Res.* 17: 34–37.
- [25]: **Broer J., Behnke B., 2002.** Immunosuppressant effect of IDS30, a stinging nettle leaf extract, on myeloid dendritic cells in vitro. *J Rheumatol* 29(4) : 659-666.
- [26] : **Wichtl M., Anton R., 2003.** Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. 2eme édition française. Paris : éd. Tee & Doc. Cachan. Médicale Internationales: 692.
- [27]: **Davis P H., 1982.** Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh Univ Press.
- [28]: **Kukrića Z.Z., Topalić-Trivunovića L.N., Kukavica B.M., Matoša S.B., Pavičić S.S., Borojab M.M., Savića A.V., 2012.** Characterisation of antioxidant and antimicrobial activities of nettle leaves (*Urtica dioica* L.), *APTEFF* (43): 1-342.
- [29]: **Vajić U-J., Milanović J.G., Živković J., Šavikin K., evacc D.G., Miloradović Z., Bugarski B., Mihailović-Stanojević N., 2015.** Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products* (74) : 912-917.
- [30] : **Allais D., 2009.** La partenelle (grande camomille). *Actualités pharmaceutiques* (47): 58-59.
- [31]: **Ebrahimzadeh M.A., Gharekhani M., Ghorbani M., and Dargany P., 2015:** Effect of Extract of Aerial Parts of *Urtica dioica* (Urticaceae) on the Stability of Soybean Oil, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research Journal*. (14): 125-131.
- [32]: **Belščak-Cvitanović A., Komes D., Durgo K., Vojvodić A., Bušić A., 2015.** Nettle (*Urtica dioica* L.) extracts as functional ingredients for production of chocolates with improved bioactive composition and sensory properties. *Journal Food Science Technology* (52) :7723-7734.
- [33] : Filière des plantes médicinales biologiques du Québec, 2010.
- [34]: **Humphries D.J., Reynolds C.K., 2014.** The effect of adding stinging nettle (*Urtica dioica*) haylage to a total mixed ration on performance and rumen function of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 189:72-81.
- [35]: **Ngugi C.C., Oyoo-Okoth E., Mugo-Bundi J., Orina P.S., Chemoiwa E.J., and Aloo P.A., 2015.** Effects of dietary administration of stinging nettle (*Urtica dioica*) on the growth performance, biochemical, hematological and immunological parameters in juvenile and adult

Victoria Labeo (*Labeo victorianus*) challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology* (44): 533–541.

[36]: **Şandru C.D., Niculae M., Popescu S., Paştiu A.I., Páll E., Spînu M., 2016.** *Urtica dioica* alcoholic extract increases the cell-mediated innate immune potential in chickens. *Industrial Crops and Products*. (88):44-50.

[37]: **Verneris W., Ralph N., 2007.** *Phenolic compound biochemistry*. Ed springer. pp 23-29.

[38]: **Drioli E and Giorno L., 2015.** *Phenolics Compounds*. , *Encyclopedia of Membranes*.

[39] : **Ribereau-Gayon P., 1968.** *Les composés phénoliques des végétaux*. Paris : Dunod.

[40] : **Richter G., 1993.** *Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie*. Lausanne. Ed. Tec et Doc. pp 87.

[41] : **Sandrina A., Heleno., Anabela Martins., Maria João R. P., Queiroz Isabel C.F.R. Ferreira., 2015.** Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds:A review. *Food Chemistry* (173): 501–513.

[42]: **Talbi H., Boumaza A., El-mostafa K., Talbi J., Hilali A., 2015.** Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L. *Mater. Environ. Sci.* (6):1111-1117.

[43]: **Benayahoum A., Guebailia H. A., Houache O., 2013.** A DFT method for the study of the antioxidant action mechanism of resveratrol derivatives, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. (19) : 2285-2298.

[44] : **Sarni P.,** les polyphenols en agroalimentaire. Tec et doc .Paris. pp 21-50.

[45] : **J-j.macheix ., 2005.** Les copposés phénoliques des végétaux Lausanne ,1ere ed.

[46] : **Ghedira K., 2005.** Les flavonoides : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* (4):162 -169.

[47]: **Kelly E. H.,Anthony R .T.,Dennis J.B.,2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry metabolism and structure-activity Relation ships, *Journal of Nutritional Biochemistry*. (13): 572–584.

[48]: **Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity Relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (13) :572–584.

[49] : **Bruneton J., 1999.** *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Tec & Doc, Editions médicales internationales. 3ème Edition. pp 1120.

[50] : **Cowan., MM., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4) :564-582.

[51] : **Machenix J., Jack-Fleurit A., Jay-allemand C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechnique et universitaire romands* .pp 11.

[52] : **Muanda F. N., 2010.** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leur propriété biologique. Thèse de Doctorat en Chimie organique. Université Paul Verlaine-Metz. pp 71-73.

- [53]: **Pizzi, A., 1993.** Wood Adhesives Chemistry and Technology. Marcel Dekker, New York. – (5) : 149-165.
- [54] : **Assad M., 2015.** Fractionnement des complexes lignines-polyphénols polysaccharides issus de différentes biomasses lignocelluloriques par extrusion BI-VIS et separation chromatographiques. These de doctorat. Toulouse. Sciences des agro ressources.
- [55] : **Roede J.R., Jones D.P., 2010.** Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. Environmental and Molecular Mutagenesis. (51) : 380-390.
- [56] : **Zerargui F., 2015.** Activité antioxydante des extraits de racines *Tamus communis* L. et caractérisation des substances bioactives. these doctorat : Université Ferhat Abbas Sétif 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- [57] : **Serteyn D., Mouithys-Mickalad A., Franck T., Grulke S., Lamy M., Deby C., Deby-Dupont G., 2002.** La nature chimique et la réactivité de l'oxygène. Annale de Médecine Vétérinaire. (146): 137-53.
- [58]: **Jacob R.A., 1995.** The integrated antioxidant system. Nutrition Research.15 (5): 755-66.
- [59]: **Kaneko T., Baba N., Matsuo M., 2003.** Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxidinduced cytotoxicity. Chemico-biological interactions. (142):239-254.
- [60] : **Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Calier C., Chapelle J.P., 2007.** Le stress oxydant. (62).10: 628- 638.
- [61]: **Bartosz G., 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. (9): 5-21.
- [62]: **Akshatha S., Anbarasu K., Vijayalashim G., 2015.** Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. Food Science Technology (52):383-390.
- [63]: **Charles Denys J., 2013.** Antioxidant proprieties of spices herbs and other sources. Library of Congress Control Number 201246741. pp 3-39.
- [64]: **Park S., Yang S., Ahn D., Heon Y.J., Kim D.K., 2011:** Antioxidative Phenolic Compounds from the Whole Plant of *Juncus diastrophanthus*. Journal Korean Society for Applied Biological. Chemistry 54: 685-692.
- [65] : **Bassene E., Olschwang., 1987.**Plantes médicinales Africaines.Plantes médicinales et phytothérapie, Tome (21) :173-176.
- [66]: **Luicita L.R., 2006.** Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffé par induction thermomagnétique directe.Thèse de Doctorat .Institut national polytechnique de Toulouse. France.
- [67] : **Cecchini O., Ticli B., 2008.** Les plantes médicinales, édition de Vecchi. Paris. pp 13.
- [68] : **Paris M., Hurabielle M., 1980.** Abrégé de matières médicales. Pharmacognosie. Tome (1).Paris.
- [69] : **Belyagoubi L .M ., 2006.** Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales .Thèse de magister .Université d'Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.
- [70] : **Mengnounif I., 2011.** Etude de la valeur nutritive et de l'activité antioxydante d'*urtica dioica* .Thèse de magister. Université Abou Bekr Belkaid. Telemcen.

- [71]: **Moualek I., Houali K., Iratni –Aich Gh.** Antioxydant and anti-inflammatory activities of *Arbutus unedo* aqueous extract.
- [72] : **Ribereau-Gayon P., 1968.** Les composés phénoliques des végétaux. Paris : Dunod.
- [73] : **Mekhokhe A., Kicher H., Ladjouzi A., Medouni-Haroune L., Brahmi F., Medouni-Adrar S., Madani Kh., 2018.** Antioxidant activity of carob seeds and chemical composition of their bean gum by-products.
- [74]: **Nodin L., Meallet-Renault R., Piard J., 2014.** Séparation et étude des pigments des épinards par spectrofluorimétrie. *Union des professeurs de physique et de chimie.* (108) : 293-309.
- [75]: **Hartmut K., Lichtenthaler A., Wellburn R., 1983.** Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical society transactions* (603):591-592.
- [76]: **Brand-Williams., Cuvelier M.E., Berset C., 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* (28): 25–30.
- [77]: **Endo T., Fukunaga T., Yoshimura T., Esumi K., 2006.** Scavenging DPPH radicals catalysed by binary noble metal-dendrimer nanocomposites. *Journal colloid interf. Science* (302):516-21.
- [78]: **Bijoy M., Jayati S., Probir K.S., 2008.** Antioxidant activities of soybean as affected by bacillus- fermentation to kinema. *Food research international.* (1). 586-593.
- [79]: **Gulçin I., Oktay M., Kireççi E., Küfrevioğlu O.I., 2003.** Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. *Food chemistry.* 83(3). 371-382.
- [80]: **EUROPEAN PHARMACOPOEIA - 8th EDITION** published 15 July 2013.
- [81]: **Bag et al., 2015.** Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs combination. *PLOS-One.*
- [82]: **Mansouri et al., 2018.** Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian oil against 40 avian multi-drug-resistant *Escherichia coli* strains *Veterinary World* Vol (11).
- [83]: **Broadsky T. F., Lewis C., Eble T.E., 1976.** Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.* (123): 33-44.
- [84]: **Nicolas M., Daniel C., 1998.** Activités technologiques en microbiologie –Techniques de base et méthodologie. Editeurs CRDP D'Aquitaine-Bordeaux. pp 152.
- [85] : **Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S.I. 2003.** Antimicrobial activity of essential oils on the native micro flora of organic Swiss chard.
- [86] : **Sanogo R., Konipo., Maiga A., Arama A., Diallo D., Bougoudogo F., 2006.** Formulation d'une Pommade Dermique à Base D'extraits De *Mitracarpus scaber* (ZUCC). *Pharm. Méd. Trad. Afr,* Vol. (14).pp159-17.
- [87] : **Daoudi A., Sabiri M., Bammou M., 2015.** Valorisation des extraits de trois espèces *Urtica* : *Urtica Urens* L. *Urtica Membranacea* Poiret et *Urtica Pilulifera* L.

- [88]: Naczy M., and Shahidi F., 2004. Extraction and analysis of phenolic in food. Journal Chromatography .95-111.
- [89] : Bruneton Jean., 2008. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Tec et Doc. pp 199-339.
- [90] : Zemmouri H., 2015. Etude des activités biologiques et effets comparatifs de Borago officinalis & Urtica Dioica sur l'inflammation branchique dans un modèle d'asthme experimental chez les rats de la souche wistar. Thèse de Doctorat. Université badji Moukhtar Annaba.
- [91]: Sidaoui F., BelghithIgueld S., Barth D., Trabelsi-Ayadi M., Cherif J.K., 2015. Study of Tunisian Nettle Leaves (UrticadioicaL.): Mineral Composition and Antioxidant Capacity of their Extracts Obtained by Maceration and Supercritical Fluid Extraction. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research.7 (4): 707-713.
- [92]: Karagozler A., Erdag B., Calmaz Emek Y., 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from Dorystoechas hastate. Food Chemistry. (111): 400-407.
- [93]: Chang L.W., Yen W.J., Huang S.C., Duh P.D., 2002. Antioxidant activity of sesame coat. Food Chemistry. (78): 347-354.
- [94]: Halliwell B., Gutleridge M., 1984. Article. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. (219):1-4.
- [95]: Albayrak S., Aksoy A., Sagdic O., Albayrak S., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of different extracts of some medicinal herbs consumed as tea and spices inturkey. Journal of Food Biochemistry. (36): 547-554.
- [96]: Gulcin I., Kufrevioglu Ol., Oktay M, Buyukokuroglu ME., 2004. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nette (Urtica Dioica L.). J Ethnopharmacol 90. (2-3) : 205-215.
- [97] : Balansard G., 2007. Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés Antibactérienne ou antiparasitaire. Revue ethnopharmacologie.42.
- [98] : Sari M., Biondi D. M., Kaâbeche M., Mandalari G., D'Arrigo M., Bisignano G., Saija A., Daquino C., Ruberto G. 2006. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian Origanum glandulosum Desf. Flavour and Fragrance Journal. (21): 890-898.
- [99]: Kalembe D., Kunicka A., 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10: 813-829.
- [100] : Dembélé D., 2011. Formulation de pommade antalgique et anti-inflammatoire à base de Securidaca longepedunculata Fresen (Polygalaceae).Thèse de pharmacie. Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

# **Annexes**

## Annexe 01 :

### **Annexe 01-A : Principe de la lyophilisation :**

La lyophilisation consiste en l'élimination progressive de l'eau du produit préalablement congelé (phase solide) par passage à la phase vapeur, sans passer par la phase liquide. Ce changement d'état s'appelle la sublimation.

La lyophilisation consiste aussi à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide de la surgélation puis une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre.

Le principe de base est que lorsqu'on réchauffe de l'eau à l'état gazeux, la vapeur d'eau (ou de tout autre solvant) quitte le produit et on la capture par congélation à l'aide d'un condensateur, ou piège froid.

Cette technique permet de conserver à la fois le volume, l'aspect et les propriétés du produit traité.

Elle peut avoir lieu naturellement (séchage en montagne), ou plus rapidement, dans un lyophilisateur.

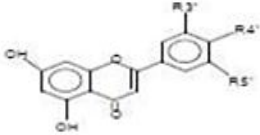
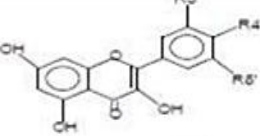
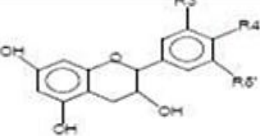
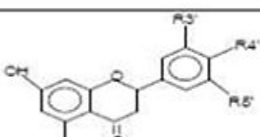
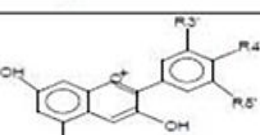
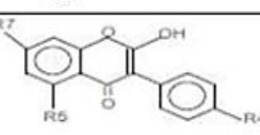
### **Annexe 01-B : Détermination d'IC<sub>50</sub> :**

L'IC<sub>50</sub> représente la quantité de substance d'antioxydant nécessaire pour réduire 50% de la quantité de DPPH initialement présente. Elle est exprimée en µg/ml d'extrait végétal. L'IC<sub>50</sub> (%) est obtenue par l'équation de la droite moyenne du pourcentage de DPPH résiduel en fonction de la concentration en antioxydant. La plus forte activité anti-radicalaire correspond à la fraction qui possède l'IC<sub>50</sub> la plus faible.

La courbe % DO échantillon = f (C échantillon) est tracée et la projection du point correspondant à 50 % de la DO échantillon sur l'axe des abscisses permet de calculer l'IC<sub>50</sub> en µg/ml d'extrait.

## Annexe 02 :

Quelques classes distinctes des flavonoïdes :

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myrecétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Ertodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyantidine
		OH	OH	OH	Delphéndine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daldezine

**Annexe 03 :****Annexe 03-A : solutions à préparer pour le test du pouvoir réducteur FRAP :**

- ❖ **FeCl<sub>3</sub> à 0.1%** : peser 0.1 g et ajuster à 100 ml ED, au laboratoire existe FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O, donc peser 0.16g et ajuster à 100ml ED.
- ❖ **Ferricyanure à 1%** : peser 1g, ajuster à 100 ml ED.
- ❖ **TCA à 10%** : peser 10 g, ajuster à 100 ml ED.
- ❖ **Tampon phosphate** : Prélever 62.5 ml de A + 37.5 ml de B.
  - A : NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : peser 2.399 g ≈ 2.4 g ajusté à 100 ml.
  - B : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : peser 2.839 g ≈ 2.84 g ajusté à 100 ml.

**Annexe 03-B : solution à préparer pour le dosage des tannins totaux :**

- ❖ **Tampon A** :
  - SM<sub>1</sub> : 14.4 ml d'acide acétique glacial + 80 ml ED et 9.94 g NaCl → ajuster à 100 ml ED.
  - SM<sub>2</sub> : 16.41 g acétate de sodium anhydre + 80 ml ED et 9.94 g NaCl → ajuster à 100 ml ED.
  - **Tampon A** : Prendre 4 ml de SM<sub>1</sub> + 6 ml SM<sub>2</sub> → ajuster à 100 ml ED.
  - Ajuster le pH à 4.9 avec du NaOH (1N).
  - NaOH : 4 g ajusté à 100 ml ED.
- ❖ **BSA** : 0.1 g de BSA dans 100 ml ED.
- ❖ **SDS/TEA** : 1g SDS + 5 ml TEA ajuster à 100 ml du Tampon A.
- ❖ **FeCl<sub>3</sub>** :
  - 1.62 g de FeCl<sub>3</sub> dans 100 ml de HCl (0.01 M).
  - HCl (0.01 M) : 50 ml ED dans une fiole, ajouter 83.33µl de HCl (M=12 au laboratoire). puis ajuster à 100 ml ED.
  - Prendre 1 ml du FeCl<sub>3</sub> concentré, diluer avec 17ml ED.

**Annexe 04 :****Réactifs de caractérisation****➤ Réactif d'amidon :**

La préparation du réactif d'amidon s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1.2 g d'iode ( $I_2$ ) dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5 g d'iode de potassium (KI).
- Chauffer pendant 05 minutes.
- Diluer jusqu'à 500 ml.

**➤ Réactif de Mayer :**

La préparation de ce réactif s'effectue comme suit :

- Dissoudre 1.358 g de  $HgCl_2$  dans 60 ml d'eau distillée.
- Dissoudre 5 g de KI dans d'eau distillée.
- Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.

**➤ Réactif de liqueur de Fehling :**

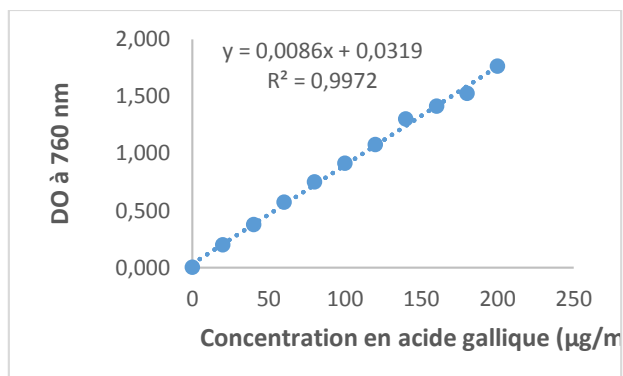
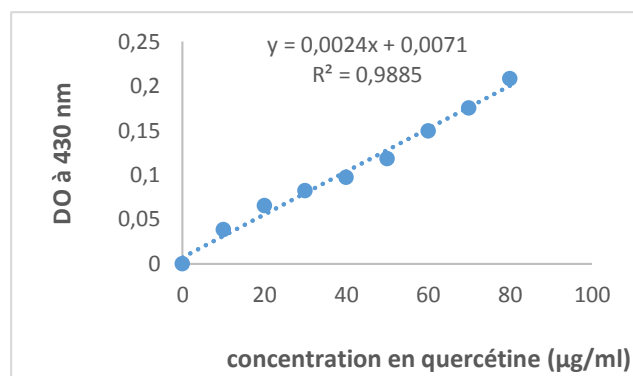
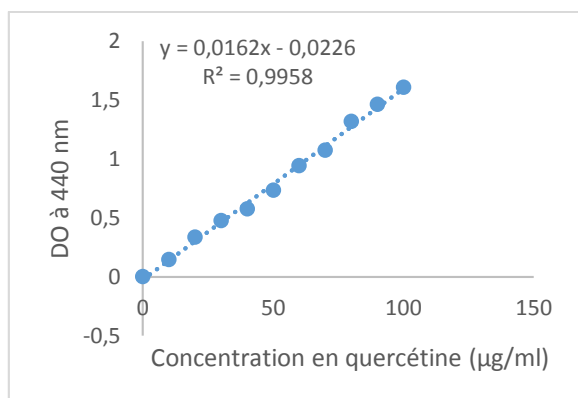
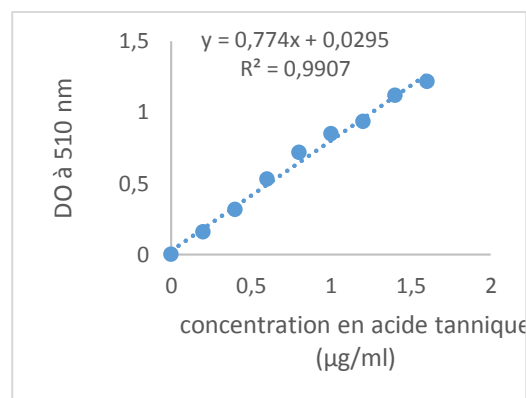
- Mélanger 5 ml de liqueur de Fehling A avec 5 ml de liqueur de Fehling B.
- Le caractère réducteur des aldoses ou des cétones donne un précipité rouge brique.

**➤ Réactif de Folin- Ciocalteu :**

Ce réactif est disponible dans le commerce prêt à l'emploi. Il peut être préparé de la façon suivante :

- 100 g tungstate de sodium et 25 g de molybdate de sodium sont dissous dans 700 ml d'eau distillée.
- Ajouter 50 ml d'acide phosphorique à 85% 100 ml d'acide chlorhydrique concentré.
- Porter à l'ébullition sous reflux durant 10 heures.
- Ajouter ensuite 150 g de sulfate de lithium, quelques gouttes de brome et porter à nouveau à l'ébullition durant 15 min.
- Refroidir et compléter à 1 litre avec l'eau distillée.

## Annexe 05 :

**Annexe 05-A : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux.****Figure 01** : courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique.**Annexe 05-B : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes.****Figure 02** : courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.**Annexe 05-C : Courbes d'étalonnage des flavonols totaux.****Figure 03** : Courbe d'étalonnage établie avec la quercétine.**Annexe 05-D : Courbe d'étalonnage des tannins totaux.****Figure 04** : Courbe d'étalonnage établie avec l'acide tannique.

## Annexe 06 :

## Annexe 06-A : Résultats de l'activité antioxydante DPPH.

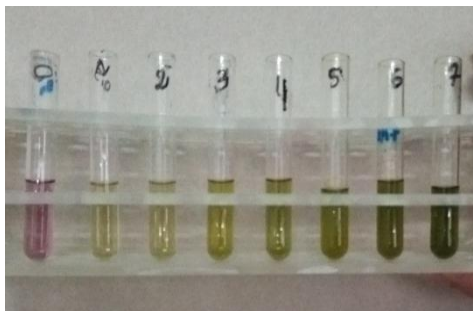


Figure 6-1 : résultat du test DPPH pour l'extrait acétonique.

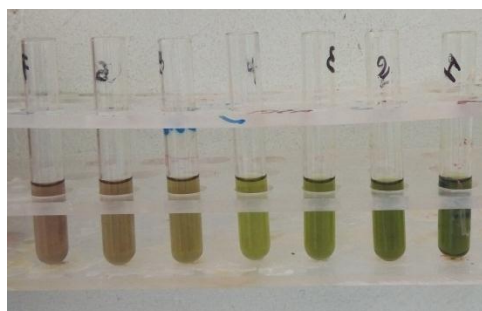


Figure 6-2 : résultat du test DPPH pour l'extrait éthanolique.

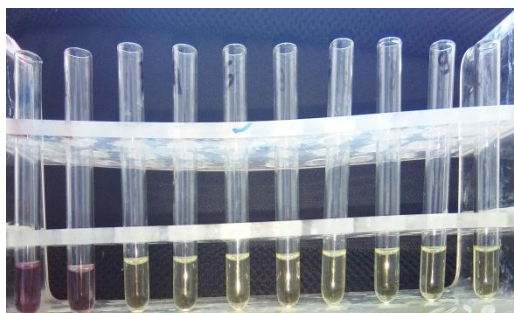


Figure 6-3 : résultat du test DPPH pour l'acide ascorbique.

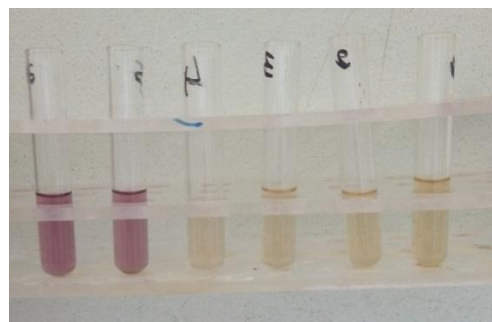


Figure 6-3 : résultat du test DPPH pour l'extrait aqueux.

## Annexe 06-B : Résultats du pouvoir chelateur du fer FRAP.

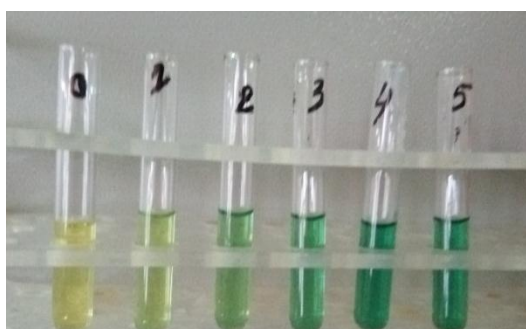


Figure 6-4 : résultat du test FRAP pour l'acide ascorbique.



Figure 6-5 : résultat du test FRAP pour l'extrait acétonique.

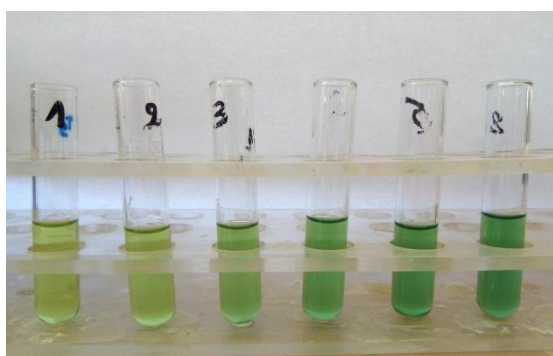


Figure 6-6 : résultat du test FRAP pour l'extrait éthanolique.

## Résumé

Cette étude a pour objectif de déterminer quelques compositions chimiques de la plante *Urtica membranacea* et d'évaluer l'activité antioxydante ainsi que l'activité antibactérienne des extraits de cette plante. Les extraits végétaux ont été obtenus par macération à froid en utilisant trois solvants : acétone, éthanol et l'eau distillée. L'étape d'extraction des polyphénols a été complétée par un screening chimique partiel suivie par le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, des flavonols, des tanins et des pigments colorés. L'activité antioxydante a été étudiée avec deux méthodes différentes : technique de réduction du radical libre DPPH et le pouvoir chélateur du fer. L'examen par spectrométrie UV-Visible et HPLC/UV-V des extraits végétaux indique l'existence de différents composés phénoliques dans les trois extraits. L'activité antibactérienne a été déterminée sur une souche bactérienne : *Pseudomonas aeruginosa* selon la méthode des puits. L'évaluation de l'effet antibactérien de l'extrait éthanolique de l'*Urtica membranacea* a permis d'affirmer qu'il possède un pouvoir inhibiteur sur cette souche bactérienne. Tandis que l'extrait aqueux et acétonique ne possède pas du pouvoir inhibiteur. Pour les différentes propriétés thérapeutiques que possède cette plante, une formulation a été préparée en vue d'un traitement contre les troubles sanitaires.

**Mots clé :** *Urtica membranacea* ; activité antioxydante ; activité antibactérienne ; les composés phénoliques.

## Abstract

This study aims to determine some chemical compositions of the *Urtica membranacea* plant, and to evaluate the antioxidant activity as well as the antibacterial activity of the extracts of this plant. Plant extracts were obtained by cold maceration using three solvents: acetone, ethanol and distilled water. Phytochemical screening tests have been carried out to reveal the general composition of our prepared extracts, while the quantitative determination of both polyphenols and flavonoids have been done to estimate the concentration of these compounds in our extracts. The antioxidant activity has been studied with two different methods: technical reduction of free radical DPPH and the chelating power of iron. Examination by UV-Visible spectrometry and HPLC/UV-V of the plant extracts indicated the existence of different phenolic compounds in the three plant extracts. The antibacterial activity was determined on a bacteria strain: *Pseudomonas aeruginosa* according to the cylinders method. Evaluation of the antibacterial effect of the ethanolic extract of *Urtica membranacea* allowed us to affirm that it possess an inhibitory power on this bacteria, while aqueous and acetonic extracts have no inhibitory power. Finally, a pharmaceutical formulation has been prepared and slightly analysed as a potential solution to help treat against health issues.

**Key words:** *Urtica membranacea*; antioxidant activity; antibacterial activity; phenolic compounds.

## المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد بعض التراكيب الكيميائية من نبات القراص، وتقييم نشاط مضادات الأكسدة و كذلك نشاط مضادات البكتيريا من مستخلصات هذا النبات. بحيث تم الحصول على المستخلصات النباتية عن طريق النقع البارد باستخدام ثلاثة مذيبات الأستون، الإيثانول و الماء المقطر. اتبعت طريقة استخلاص المركبات الفينولية بتحليل كيميائي مع تقدير عديدات الفينول الكلية، الفلافونويدات، الفلافونولات، التانينات والصبغات الملونة. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة بالاعتماد على طريقة تثبيط جذور الـ 2,2-ديفينيل-1-بيكريل ايدرازيل و طريقة القوة المخلفية للحديد. الفحص من قبل مطياف الأشعة فوق بنفسجية المرئية و كذا طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء تكشف عن وجود العديد من المركبات الفينولية في المستخلصات. تم تحديد نشاط مضاد البكتيريا على سلالة بكتيرية بسودوموناس ابروجينوزا وفقا لطريقة الابار لكل من المستخلصات الثلاثة. نظرا لما تحمله النبتة من فوائد صحية عديدة، قمنا بتحضير مرهم بهدف علاج الاضطرابات الصحية.

**الكلمات المفتاحية :** نبات القراص، نشاط مضاد للأكسدة نشاط، مضادات البكتيريا، المركبات الفينولية